

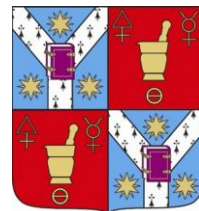


**UNIVERSITATEA „AL.I. CUZA” DIN IAȘI**

**FACULTATEA DE CHIMIE**

**ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE ȘI ȘTIINȚE ALE  
VIEȚII ȘI PAMÂNTULUI**

**DOMENIUL CHIMIE**



***Contribuții la studiul extracției și aplicațiilor  
biomedicale și analitice ale zeinelor din porumbul  
autohton***

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

Coordonator științific,

Prof. Dr. GABI DROCHIOIU

Doctorand,

Chimist SABINA BĂNCILĂ

IAȘI

2016

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

Doamnei/Domnului.....

Vă aducem la cunoștință că în data de **20.12.2016**, ora **12:00**, în sala Amfiteatrul P3, Facultatea de Chimie, d-ra Sabina Băncilă, va susține, în ședința publică, teza de doctorat cu titlul „ Contribuții la studiul extracției și aplicațiilor biomedicale și analitice ale zeinelor din porumbul autohton”, în vederea obținerii titlului științific de Doctor în Științe Exacte, domeniul CHIMIE.

Comisia de doctorat are următoarea componență:

**Președinte: Prof. univ. dr. Ionel MANGALAGIU**

Facultatea de Chimie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași

**Conducător științific: Prof. univ. dr. Gabi DROCHIOIU**

Facultatea de Chimie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași

**Referenți: Prof. univ. dr. Dan CAȘCAVAL**

Facultatea de Inginerie Chimică și Protecție a MEDIului, Universitatea Tehnică  
“Gheorghe Asachi” din Iași

**Conf. univ. Dr. Gheorghe STOIAN**

Facultatea de Biologie, Universitatea din București

**Prof. univ. dr. Aurel PUI**

Facultatea de Chimie, Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, în dublu exemplar, eventualele observații și aprecieri.

Vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

Mulțumesc domnului **Profesor Dr. Gabi Drochioiu** pentru suportul științific acordat în realizarea acestei teze de doctorat precum și pentru îndrumarea și formarea mea ca cercetător în decursul acestei perioade

Mulțumesc doamnei **Lector Dr. Brîndușa Alina Petre** pentru discuțiile cu caracter științific și pentru sprijinul și încrederea acordate

Mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare, domnului **Profesor Dr. Aurel Pui** și domnului **Conferențiar Dr. Robert Vasile Grădinaru** pentru suportul științific acordat în realizarea referatelor și a tezei de doctorat

Mulțumesc programului ERASMUS MUNDUS și doamnei **Profesor Dr. Yifat Miller** de la *Ben-Gurion University of the Negev* pentru cercetările privind modelarea moleculară

Mulumesc proiectelor: Qualifarin și PN-II-PT-PCCA-2013-4-1149 pentru sprijin financiar, dar și proiectelor de tinere echipe PN-II-RU-TE-2014-4-092, PN-II-RU-TE-2011-3-0038

Mulțumesc domnișoarei **Dr. Raluca Ștefănescu** pentru ajutorul acordat în realizarea spectrelor de masă de tip MALDI-ToF, dar și pentru discuțiile cu caracter științific.

Mulțumesc Centrului Avansat de Cercetare - Dezvoltare în Medicina Experimentală (CEMEX) de la Universitatea de Medicină și Farmacie “Gr.T.Popa” Iași pentru permisiunea de a analiza probe la spectrometrul de masă.

Mulțumesc colegei mele **Dr. Laura Ion** pentru ajutorul acordat în realizarea gelurilor de electroforeză, pentru încrederea și pentru suportul științific, dar mai ales moral pe care mi le-a acordat ori de câte ori am avut nevoie

De asemenea, țin să le mulțumesc membrilor **grupului de cercetare Biochimie** pentru atmosfera colegială și pentru discuțiile cu caracter științific și nu numai.

*Dedic această teză mamei mele, bunicii mele **Elisabeta** și surorii mele **Sandra***

## Cuprins

Motivație .....	4
Introducere .....	6
Capitolul III. Rezultate obținute.....	8
Optimizarea metodologiei de analiză.....	8
III.3. Determinarea concentrației zeinei extrase folosind metoda Biuret.....	8
III.4. Aplicarea metodei Biuret folosind probe reale.....	9
III.5. Eficiența metodei de determinare a proteinelor investigate .....	10
III.6. Avantajele utilizării metodei propuse.....	11
III.7. Concluzii.....	12
Capitolul IV. Studiul extracției zeinelor .....	14
IV.2. Studiul extracției zeinelor din făina comercială .....	14
IV.3. Extracția zeinelor din făina obținută din porumb hibrid .....	15
IV.4. Extracția zeinelor sub acțiunea microundelor .....	16
IV.5. Concluzii .....	18
Capitolul V. Metode de caracterizare a zeinelor .....	20
V.1. Caracterizarea zeinelor prin electroforeză .....	20
V.2. Caracterizarea zeinelor prin spectrometrie de masă MALDI-Tof.....	21
V.2.1. Extracția în doi solvenți diferiți .....	22
V.2.2. Reacția cu iodacetamida.....	26
V.3. Concluzii.....	26
Capitolul VI. Aplicațiile zeinelor .....	28
VI.1. Funcționalizarea zeinelor .....	28
VI.4. Concluzii .....	29
Concluzii generale.....	31
Bibliografie selectivă.....	32
Activitate științifică.....	33

**Cuvinte cheie:** zeine, proteomică, ultrasunete, microunde, funcționalizare

## Motivație

Zeina este un polimer natural, relativ ieftin și ușor de obținut în cantități industriale, care formează filme dure, lucioase, rezistente la atacuri microbiene. Astfel, aceasta poate fi utilizată în industria farmaceutică și alimentară, dar și tehnologică prin obținerea unor materiale biodegradabile. Compoziția chimică a hranei trebuie să fie echilibrată și să conțină pe lângă zaharuri și amidon care produc energie, acizi grași, aminoacizi esențiali și proteine cu o compoziție apropiată de aceea din corpul uman sau animal. Cerealele sunt bogate în substanțe energetice, zaharuri și grăsimi, însă au proteine sărace în lizină și triptofan, doi aminoacizi esențiali [1]. De fapt, cerealele cum ar fi porumbul, grâul, orzul, ovăzul, etc., conțin prolamine (prolamina din porumb se numește zeină), care sunt aproape lipsite de astfel de aminoacizi și conferă astfel cerealei în cauză o valoare alimentară scăzută. Zeina poate fi însă folosită ca adaos în hrana animalelor poligastrice, deoarece bacteriile, în procesul rumegării, pot transforma aminoacizii neesențiali în aminoacizi esențiali, inclusiv în lizină și triptofan. În hrana animalelor supuse îngrășării, cum este cazul păsărilor și porcilor, cerealele trebuie suplimentate cu produse ce conțin aminoacizi esențiali cum ar fi șrotul de soia, făina de pește, unele vitamine etc. De aceea, este recomandat ca zeina să fie extrasă din făinurile de porumb, ceea ce ar avea ca rezultat creșterea valorii nutritive a acestora, în timp ce zeina purificată ar putea fi utilizată în industrie pentru obținerea copolimerilor, maselor plastice, peliculelor biodegradabile pentru încapsularea medicamentelor sau pentru obținerea medicamentelor retard, cu eliberare prelungită.

De aceea, prezenta lucrare de doctorat investighează posibilitățile de extracție a zeinei din făinurile de porumb autohton, folosind metode bioanalitice “eco-friendly” cu aplicabilitate pe scară largă. Mai mult, interesul nostru a fost focalizat către studiul structurii și proprietăților zeinelor în vederea lărgirii gamei sale de utilizări, folosirea zeinelor la obținerea de medicamente sau la reținerea ionilor de metale grele, toate acestea având aplicații biomedicale sau industriale.

## Introducere

Teza de doctorat intitulată "*Contribuții la studiul extracției și aplicațiilor biomedicale și analitice ale zeinelor din porumbul autohton.*" are ca obiectiv principal realizarea unei cercetări mai aprofundate a zeinei, o materie primă ieftină, biologică, disponibilă în cantități industriale și cu mare aplicabilitate practică și care constă într-un amestec de proteine solubile în soluții alcoolice, cu posibilitatea găsirii unor noi căi de valorificare a acesteia. Acest obiectiv este secundat de studiul proteinelor și a aminoacizilor din cereale, studiul decontaminării mediului de metale grele cu ajutorul zeinei, contribuții la obținerea de noi medicamente sau îmbunătățirea căilor de aplicare a medicamentelor existente, precum și aplicarea unor metode spectroscopice, electroforetice, au spectrometrice de masă în cercetările de biochimie și toxicologie. Astfel, în cadrul acestei teze, am urmărit îmbunătățirea metodologiei de extracție și de determinare a zeinelor, prolamine proteice, alcool-solubile din făinurile comerciale, dar și din semințele de porumb autohton, hibrid, din varietăți locale sau din linii consangvinizate. Ca urmare, lucrarea se referă și la obținerea unor făinuri de porumb cu compoziții chimice diferite, utilizabile în diverse ramuri economice (creșterea animalelor, producerea de amidon și alcool etilic, industria de medicamente etc.).

Dintre activitățile de cercetare cuprinse în prezenta teză de doctorat enumerăm:

- obținerea de făinuri cu granulații diferite și caracterizarea acestora;
- extracția proteinelor prolaminice (zeine) din făinurile de porumb;
- caracterizarea acestora folosind diferite metode chimice de analiză;
- optimizarea metodelor folosite la extracția zeinei;
- urmărirea aplicabilității zeinelor pentru realizarea de sisteme de eliberare controlată a medicamentelor;
- studiul capacității de reținere a metalelor grele;
- caracterizarea prin spectroscopie FTIR a zeinei pure și funcționalizate în prezența/absența ionilor metalelor grele;
- diseminarea rezultatelor la manifestări științifice și publicarea lor în reviste naționale și/sau internaționale cu factor de impact sau BDI.

Lucrarea de față a avut ca punct de plecare invenția cu titlul "Procedeu de obținere din porumb a fracțiilor farinice de înaltă calitate biologică sau industrială" [2], aparținând conducătorului de doctorat, profesor universitar Dr. Gabi Drochioiu, de la Universitatea "Alexandru Ioan Cuza" din Iași, patent cu numărul RO128468 și urmărește să pună în

evidență aplicabilitatea acestei invenții, prin posibilitatea obținerii de compoziții diferite ale făinurilor și dezvoltarea unor cercetări originale asupra zeinelor.

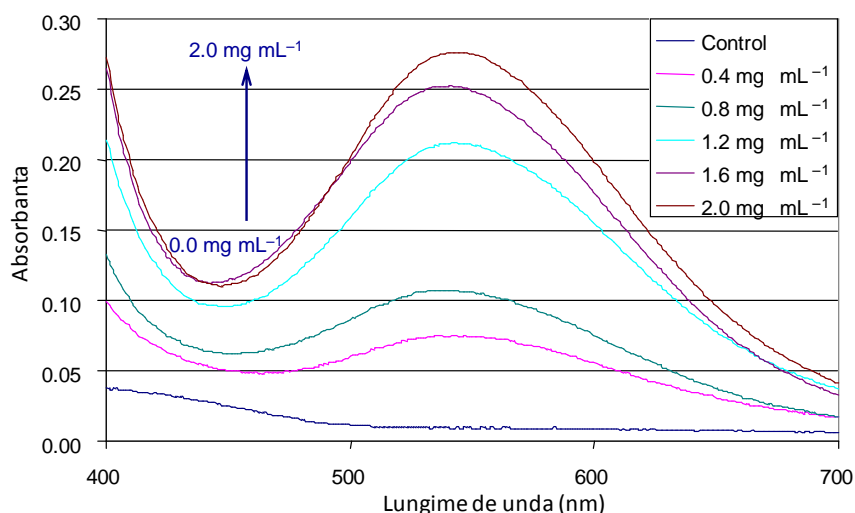
Lucrarea are un număr de 6 capitole și cuprinde un număr de 142 pagini, 62 figuri, 13 tabele și se finalizează cu publicarea a 3 articole științifice. În **Capitolul I**, sunt prezentate principalele aspecte legate de stadiul actual al cunoașterii în domeniul proteinelor prolaminice, o caracterizare a acestora privind proprietățile, metodele de extracție și caracterizare a acestora, iar în finalul acestui capitol sunt prezentate o serie de aplicații ale zeinelor. În **Capitolul II**, sunt prezentate pe larg materialele, reactivii și instrumentele folosite în cadrul experimentelor din teza de doctorat, dar și modul de lucru privind metodele de extracție și caracterizare a zeinelor. **Capitolul III** prezintă prima parte a cercetărilor personale privind optimizarea metodei de extracție a zeinelor din porumb, utilizând făinuri comerciale, dar și semințe de porumb care au fost măcinate până la o anumită granulație, în funcție de necesitatea realizării unor extracții mai eficiente. De asemenea, sunt prezentate măsurători spectroscopice și fluorimetrice ale proteinelor, dar și o îmbunătățire a metodei biuretului de determinare a concentrației proteinelor. **Capitolul IV** cuprinde un studiu amănunțit al extracției zeinelor privind cele mai importante aspecte cum ar fi: influența solventului, a temperaturii utilizând termomixerul, ultrasunetele și microundele. În **Capitolul V** sunt prezentate o serie de măsurători privind caracterizarea proteinelor prolaminice prin electroforeză unidimensională, urmată de măsurători prin spectrometrie de masă de tip MALDI-ToF. În **Capitolul VI** sunt prezentate două aplicații ale zeinelor și anume funcționalizarea acestora și reacția lor cu ionii metalelor grele. Mai mult, a fost realizat un studiu al interacțiunii peptidei fluorescente glicil-L-triptofan cu zeinele. Teza de doctorat se încheie cu prezentarea concluziilor generale, a referințelor bibliografice, iar în anexe sunt adăugate lucrările publicate *in extenso*, precum și posterele prezentate la conferințe internaționale și naționale. Prezenta lucrare de doctorat deschide perspective noi de cercetare în domeniul biochimiei agricole și biotehnologiei prin găsirea unor metode mai bune de extracție a zeinelor și investigarea unor noi posibilități de utilizare a zeinelor. Din cadrul tezei, au fost publicate un număr de 3 lucrări științifice cotate ISI cu un factor de impact cumulativ de 5,7, din care contribuția cercetărilor proprii a fost de 2,7 unități.

## Capitolul III. Rezultate obținute.

### Optimizarea metodologiei de analiză

#### III.3. Determinarea concentrației zeinei extrase folosind metoda Biuret

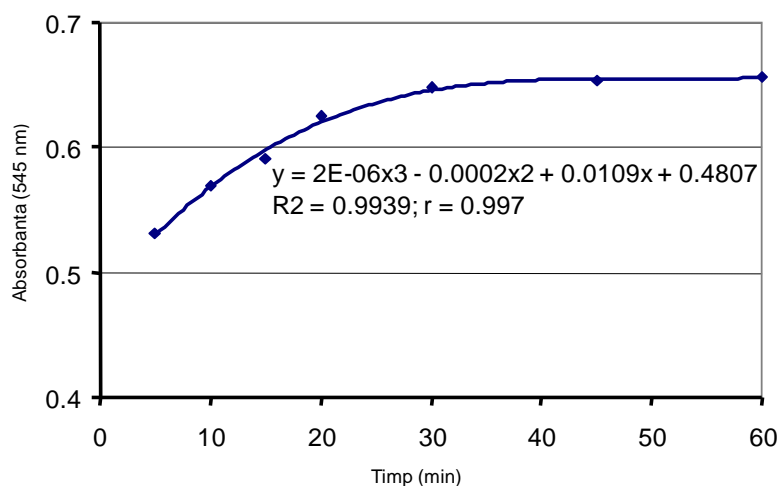
Zeina, proteină solubilă în alcool, care se găsește în porumb, are o calitate nutritivă redusă datorită conținutului scăzut în aminoacizii triptofan și lizină [176, 29]. Pentru a evalua calitatea proteinei din porumb, anterior, au fost propuse o serie de teste rapide [177, 178, 179]. Metoda biuretilui este o metodă simplă și accesibilă de determinare a proteinelor, ce poate fi aplicată și la determinarea zeinei.



**Figura III.9.** Spectrele UV-Vis obținute folosind reactivul Biuret pe un interval de concentrație 0-2 mg/mL. Lungimea de undă de 454 nm a fost aleasă pentru trasarea curbei de etalonare utilizată la determinarea zeinei.

Extracția rapidă a proteinei s-a efectuat în condiții de ultrasonicare asemănătoare cu cele descrise în literatură [180]. Absorbanta măsurată la 545 nm a fost dependentă de timpul de sonicare (**Figura III.10.**) și s-a încadrat într-o dependență polinomială de ordin 3, de forma  $y = 2E-06 x^3 - 0,0002 x^2 + 0,0109 x + 0,4807$ . Valoarea absorbantei (y) complexului zeinei extrase cu ionii de cupru crește până la aproximativ 25 minute de extracție (în ecuație, x). După această perioadă, nu s-a mai extras o cantitate suplimentară de proteină în următoarele 10 minute. Coeficientul de corelație (r), este destul de ridicat sugerând faptul că extracția proteinelor prin această metodă este eficientă.

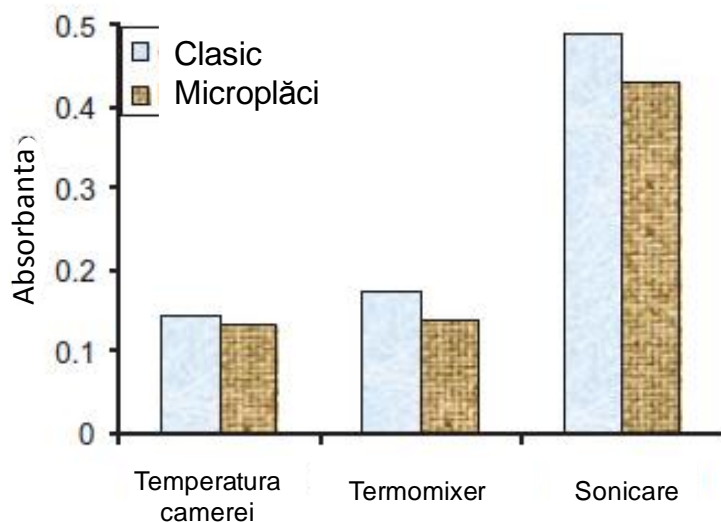




**Figura III.10.** Dependența absorbanței complexului zeinic de timpul de sonicare. Zeina a fost extrasă utilizând fracțiunea cu granulația mai mică de 100  $\mu\text{m}$  utilizând reacția cu ionii de cupru

#### III.4. Aplicarea metodei biuret folosind probe reale

În **Figura III.12.** sunt redate valorile absorbanțelor pentru zeina extrasă din făina cu granulația de 710  $\mu\text{m}$  în etanol 70%. Între cele două serii de date obținute cu ajutorul cititorului în microplăci și, respectiv, la spectrofotometru, s-a găsit o corelație semnificativă ( $r = 0,998$ ) și o ecuație a dreptei  $y = 0,8761 \cdot x$ , unde  $y$  reprezintă valoarea absorbăanței biuretilui la 560 nm,  $x$  valoarea absorbăanței citită cu ajutorul spectrofotometrului, iar  $r$  coeficientul de corelație. Extracția la ultrasunete a crescut concentrația de zeină de 3,4 ori, de la 0,143 la 0,488 unități de absorbăanță. Cititorul în microplăci a oferit avantajul utilizării unui volum mic de extract zeinic și cantități mici de reactivi. Din păcate, microplăcile pot fi utilizate numai pentru soluții transparente la lungimi de undă predefinite. Datorită faptului că reacția biuretilui utilizează fosfat de cupru, această sare poate interfera în cuantificarea absorbăanței. Mai mult decât atât, microplăcile nu pot fi utilizate pentru extracția proteinei totale cu soluție alcoolică alcalină deoarece atât făina de porumb cât și fosfatul de cupru sunt insolubile și absorb la 545 nm.



**Figura III.12.** Valorile absorbanței obținute prin reacția biuret măsurate la 545 nm la spectrofotometru UV-Vis (Clasic) și la 560 nm la un cititor de plăci (Microplăci) pentru extractul de zeină (Clasic: 1 mL extract a fost tratat cu 0,2 mL KOH 6% și 20 mg fosfat de cupru; Microplăci: 200  $\mu$ L extract zeinic a fost tratat cu 40  $\mu$ L KOH și 5 mg fosfat de cupru). Condiții de lucru: agitate la temperatura camerei sau cu ajutorul unui termomixer la 60°C timp de 30 minute și respectiv sonicare la temperatura camerei timp de 10 min

### III.5. Eficiența metodei de determinare a proteinelor investigate

Reactivul biuret clasic este obținut prin dizolvarea a 9 g tartrat de sodiu și potasiu, a 3 g de sulfat de cupru cu 5 molecule de apă și a 5 g de iodură de potasiu în 400 mL de NaOH 0,2 M și ajustarea volumului final la 1 L folosind apă distilată [181]. Procedura noastră de determinare a proteinelor nu are nevoie de un astfel de reactiv deoarece proteina brută este extrasă în soluție alcalină alcoolică, urmând imediat reacția ei cu ionii de cupru. În timpul procesului de extracție dacă se folosește un agent de reducere de tipul DTT-ului, după reacția biuret dintre legătura peptidică și ionii de cupru, se observă apariția unui precipitat negru, sulfură de cupru, care este îndepărtat prin centrifugare.

Testul Bradford este mai rapid și mai sensibil decât metoda clasică folosind reactivul biuret. Cu toate acestea, bazându-ne pe metoda descrisă aici care constă în special în sonicarea probelor, determinarea proteinei extrase din făina de porumb prin reacția biuretilui devine mai rapidă decât metoda Bradford. În general, metoda biuretilui consumă mai mulți reactivi decât alte teste de determinare a proteinelor [180,182]. Cu toate acestea, creșterea porumbului necesită teste de proteine viabile pentru cel puțin 30-50 mg probă, deoarece

cantitățile mici generează erori datorate compoziției diferite a semințelor de porumb individuale. Testul propus este aplicabil în varianta microplăcilor reducând proporțional cantitatea de eșantion (probă) luată în lucru (5 mg) și volumele/cantitățile de reactivi utilizate.

Proteinele cu un conținut de aminoacizi aromatici diferit pot da valori variabile (mai mari sau mai mici) ale absorbanței biuretilui [183]. Cu toate acestea, nu am constatat un astfel de fenomen, probabil datorită compoziției în aminoacizi relativ omogenă a proteinei din făinurile de porumb luate în lucru în cadrul tezei de doctorat.

Căldura generată în timpul sonicării nu a avut un efect semnificativ asupra extracției proteinei din probele de făină degresate. Cu toate acestea, temperatura băii cu ultrasunete pe toată perioada sonicării a fost menținută pe cât posibil constantă prin adăugarea unor cuburi de gheață sau prin efectuarea unor pauze în cadrul experimentelor. De exemplu, agitarea la ultrasunete timp de 15 minute a fost urmată de centrifugarea eppendorf-urilor timp de 10 minute, apoi s-au adăugat noi volume de solvent proaspăt pentru extracție și procedura a fost repetată.

Cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) a proteinelor cerealiere a devenit o metodă puternică pentru izolarea și caracterizarea acestora [184-187]. Scopul nostru a fost să determinăm conținutul total de proteine printr-o metodă spectrofotometrică foarte simplă și eficientă prin creșterea concentrației de zeină extrasă cu ajutorul sonicării. Într-adevăr, metoda HPLC este superioară testului nostru, însă necesită instrumente și accesorii relativ scumpe. Cea mai pură zeină se obține atunci când se apelează la o extracție care se efectuează la o temperatură joasă conform metodei propuse de Carter și colaboratorii săi [73]. Având în vedere că interesul pentru studierea zeinei este din nou în creștere [30] am studiat, în special o serie de metode clasice de extracție ale zeinei și am constatat că sonicarea poate îmbunătăți mult atât extracția cât și parametrii analitici ai metodei de analiză.

### **III.6. Avantajele utilizării metodei propuse**

Este binecunoscut faptul că există puține substanțe care interferă cu testul biuret ( de exemplu, sărurile de amoniu). În plus, în experimentele noastre, am găsit mai puține abateri de la liniaritate în comparație cu măsurătorile în domeniul ultraviolet. Metoda biuretilui, care determină proteinele totale din porumb, implică o incubare prealabilă a probelor (sonicare) timp de 30 minute urmată de reacția proteinelor extrase cu o sare de cupru insolubilă (fosfat de cupru) la un pH ridicat. În general, ultrasunetele măresc viteza unei reacții chimice, timpul de reacție scade, condițiile de reacție sunt mai blânde, iar energia consumată scade

semnificativ [188]. Am utilizat ultrasunetele atât pentru îmbunătățirea randamentului de extracție, cât și a vitezei de reacție a testului biuret.

Micro-metoda biuret modificată s-a dovedit a fi o tehnică simplă, reproductibilă și de încredere. Pe parcursul metodei sunt utilizați reactivi și sticlărie necostisitoare. În plus, nu este necesară nici o pregătire în prealabil a probelor, cu excepția citirilor uzuale a soluțiilor colorate care se realizează folosind un spectrofotometru sau un cititor de microplăci. Mai mult, metoda biuretilui este rapidă, mai simplă decât tehnica Kjeldahl și poate fi recomandată ca un înlocuitor al acesteia din urmă.

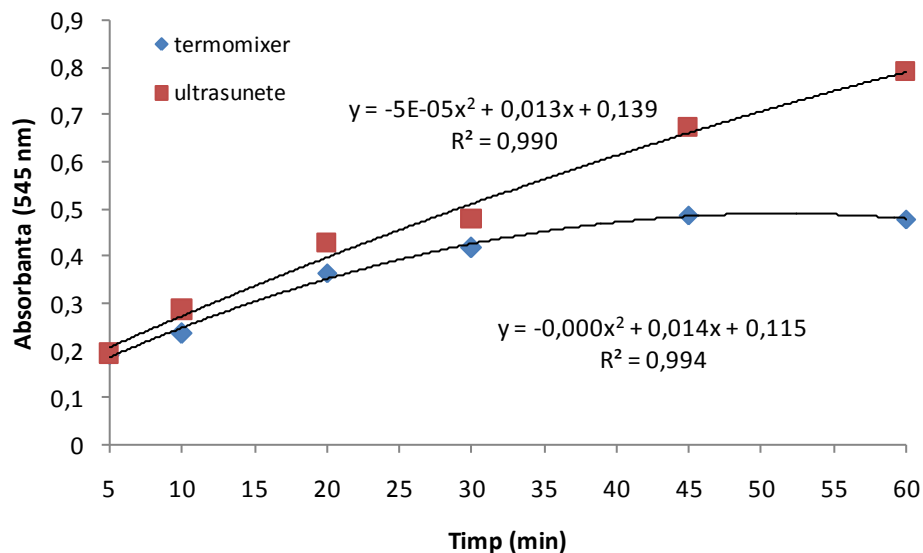
### III.7. Concluzii

- ✓ s-au studiat duritatea a două sorturi de făinuri comerciale diferite din România, una degerminativă și alta germinativă.
- ✓ s-a observat faptul că făina de tip Enache, degerminată, a prezentat 90% din particule în intervalul 355 - 710  $\mu\text{m}$ , în timp ce varietatea Aro, numai 83,6%, duritatea sa mai mare fiind reflectată și de un procent de 5% făină cuprinsă în intervalul 0,71 - 1,0 mm.
- ✓ s-au realizat o serie de determinări spectrale ale zeinelor și albuminei serice bovine în prezența ionilor de fier și aluminiu.
- ✓ din spectre s-au observat următoarele: zeinele prezintă un maxim la 277 nm care se deplasează cu 18 nm atunci când se adaugă ioni de  $\text{Fe}^{3+}$ . Ionii de  $\text{Al}^{3+}$  determină deplasarea benzii de la 277 nm la 290 nm, și scăderea valorii absorbantei cu 30%.
- ✓ s-a studiat comportarea spectrofluorimetrică a zeinei standard sau a extractelor zeinice, la diferite concentrații prin excitarea resturilor de aminoacizi aromatici (fenilalanină și tirozină).
- ✓ din spectrele de fluorescență s-au observat următoarele: la concentrații ridicate de zeină se observă fenomenul de autostingere, iar o parte din energia de excitație a fenilalaninei a fost cedată tirozinei în procesul de absorbție a radiației UV de la 275 nm.
- ✓ a fost propusă o metodă simplă și precisă de extracție a zeinei din făina de porumb comercială și din semințe hibrid asistată de ultrasunete, concomitent cu reacția biuretilui.
- ✓ s-a avut în vedere optimizarea concentrației reactivilor și a timpului de incubare, asigurând o precizie, reproductibilitate și acuratețe sporite.

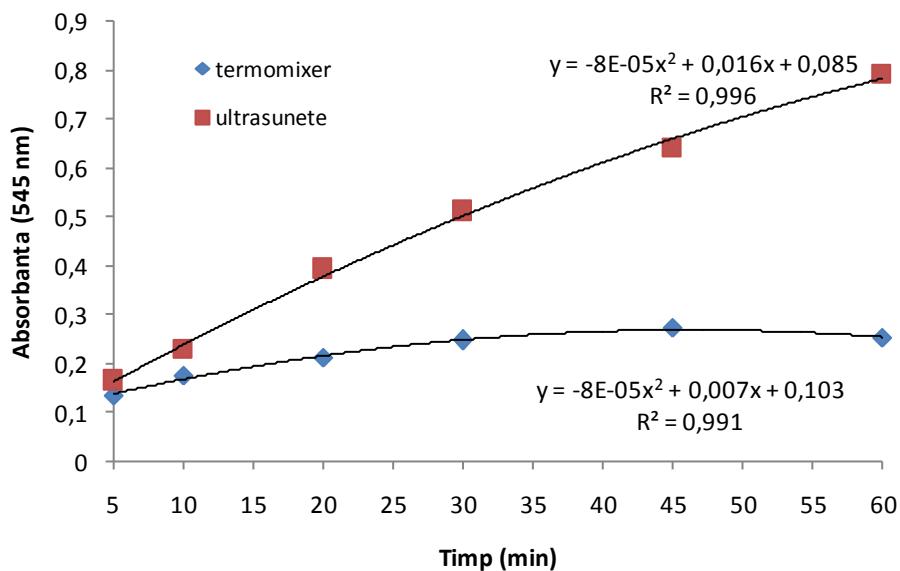
- ✓ utilizarea ultrasonicării a îmbunătățit în mod semnificativ capacitatea de extracție a proteinelor și determinarea lor din materiale biologice cum sunt făinurile cerealiere.
- ✓ parametrii optimi de extracție pentru  $\alpha$ -zeină au fost 30 minute la 60 °C în etanol 70% utilizând făină degresată cu diametrul particulelor de 100  $\mu$ m.

## Capitolul IV. Studiul extracției zeinelor

### IV.2. Studiul extracției zeinelor din făina comercială



*Figura IV.9. Relația dintre absorbanta biuretilui la 545 nm și timpul extracției zeinei din făina comercială F1 cu granulația de 250 μm.*

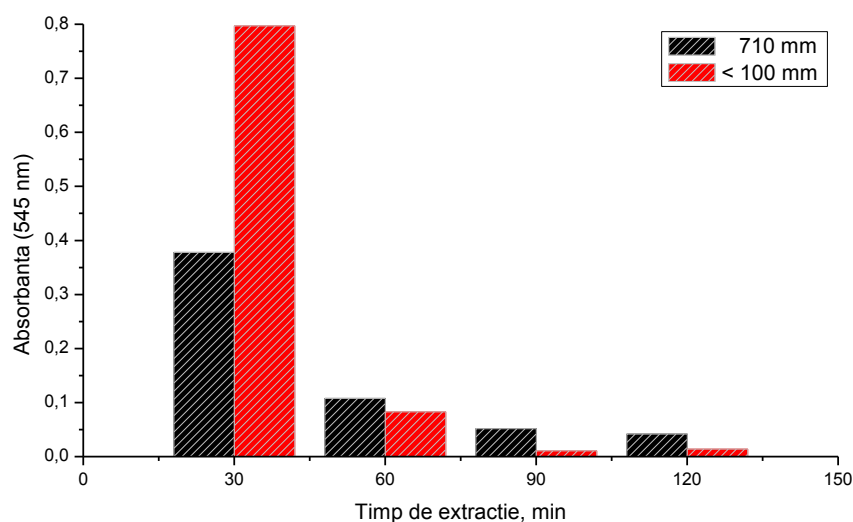


*Figura IV.10. Dependența absorbantei biuretilui la 545 nm de timpul de extracție a zeinei din făina comercială F1 cu granulația de 500 μm.*

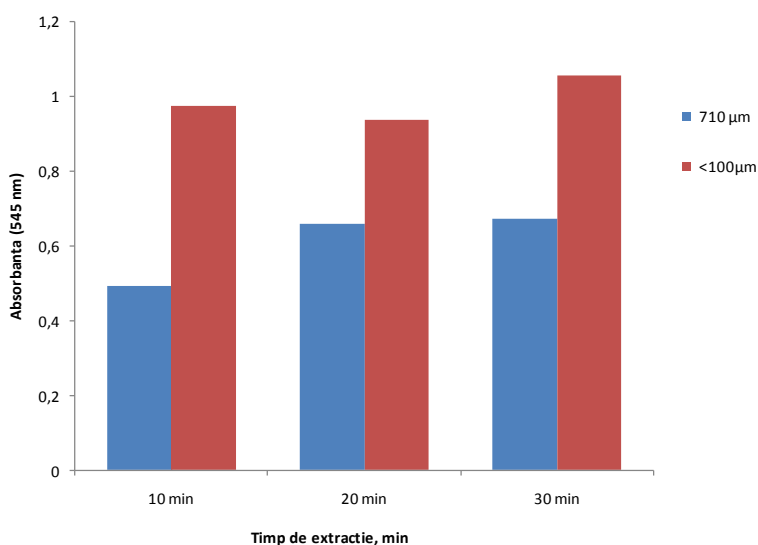
Extracția zeinei din făina de 250  $\mu\text{m}$  pe un termomixer a atins un maxim la 45 minute, când absorbanta a prezentat valoarea de 0,4 (**Figura IV.9**). Extracția asistată de ultrasunete a atins un maxim la 60 minute, moment în care valoarea absorbantei a fost de 0,8. La făina cu granulația mai mare, având un diametru al particulelor de 500  $\mu\text{m}$ , s-a extras pe termomixer numai jumătate din cantitatea de zeină față de metoda cu ultrasunete. În ceea ce privește granulația mai fină, de 250  $\mu\text{m}$ , diferența dintre cele două metode de extracție a fost mai mare decât în cazul făinei de 500  $\mu\text{m}$  (**Figura IV.10**). Din **Figurile IV.9 și IV.10**, se observă o serie de diferențe. În primul rând, metoda extracției la termomixer determină o extracție mai slabă a zeinei în cazul făinei mai granulate (500  $\mu\text{m}$ ). Contrar, folosind metoda ultrasunetelor s-a extras o cantitate de zeină aproape identică în cazul celor două granulații luate în lucru. Mai mult decât atât, sonicarea a fost mai eficientă atunci când s-a aplicat la făina mai granulată, chiar dacă extracția a fost mai lentă în primele 5 minute.

### **IV.3. Extracția zeinelor din făina obținută din porumb hibrid**

Din măsurătorile noastre la temperatura camerei, se observă că cea mai mare cantitate de zeină a fost extrasă după 30 minute din făina de 100  $\mu\text{m}$  (**Figura IV.12**). Chiar dacă făina de 710  $\mu\text{m}$  conține mai multă zeină, cantitatea extrasă în primele 30 minute a fost de două ori mai mică decât în cazul făinei de 100  $\mu\text{m}$ . La creșterea temperaturii până la 60  $^{\circ}\text{C}$ , extracția asistată de ultrasunete a zeinelor din făina de 100  $\mu\text{m}$  a fost mai eficientă în primele 10 minute, în timp ce la granulația de 710  $\mu\text{m}$ , o extracție mai completă necesită un timp de 30 minute (**Figura IV.13**). Astfel, la această temperatură, s-a extras o cantitate de 65% din totalul zeinei în primele 30 minute. În aceeași perioadă de timp, la granulația de 100  $\mu\text{m}$  s-a extras 88% din zeină. La temperatura camerei, 74% din cantitatea totală de zeină a fost extrasă în condițiile sonicării în primele 60 minute.



**Figura IV.12.** Absorbanța biuretelui extractelor alcoolice pentru diferiți timpi de extracție. Extracția sub acțiunea ultrasunetelor a fost realizată la 25°C utilizând 2 granulații diferite (710 μm și 100 μm).



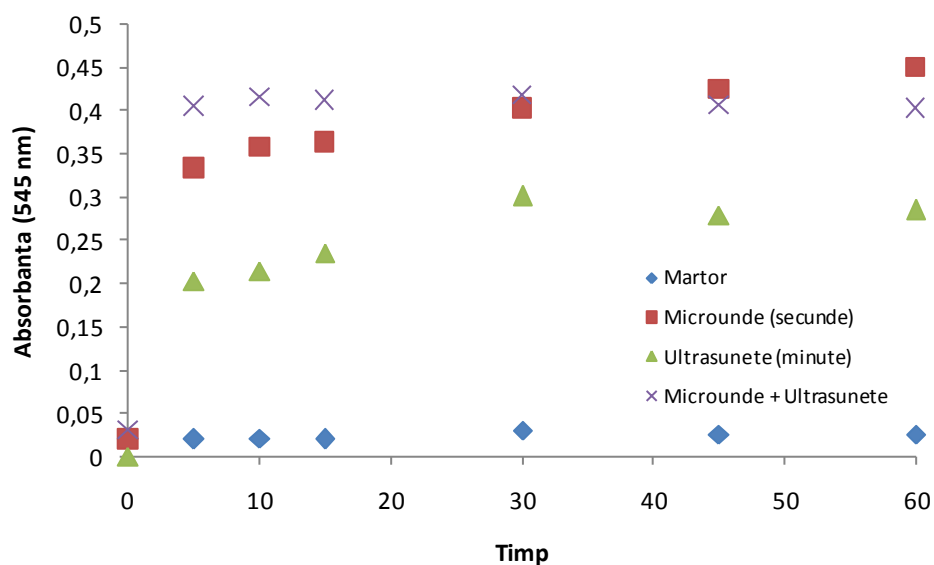
**Figura IV.13.** Relația absorbantei biuretelui cu timpul de extracție a zeinelor sub acțiunea ultrasunetelor la 60 °C (granulații: < 710 μm și < 100 μm).

#### IV.4. Extracția zeinelor sub acțiunea microundelor

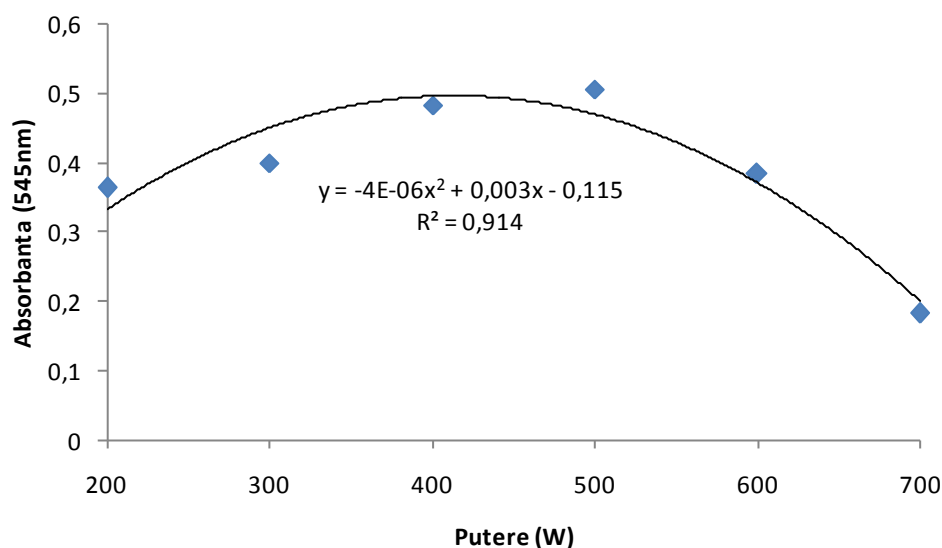
În **Figura IV.14.** este redată dependența absorbantei biuretelui în funcție de concentrația zeinei extrase la diferite intervale de timp. Zeina a fost extrasă din făină de



porumb hibrid folosind microundele. Cantitatea de zeină extrasă a fost comparată cu aceea extrasă sub acțiunea ultrasunetelor. De asemenea, zeina a fost extrasă folosind microundele și ulterior prin ultrasunete timp de 15 minute pentru a studia și influența acestora în procesul de extracție. De regulă, ultrasunetele au condus la o creștere a absorbantei în primele 30 minute, apoi au indus o scădere a acesteia. Din datele obținute anterior, s-a demonstrat că în primele 30 minute extracția zeinei este aproape aceeași ca și în cazul probelor extrase la microunde. Din aceste date, se poate spune că cea mai mare cantitate de zeină se extrage după 60 secunde sub acțiunea microundelor, în timp ce doar jumătate din cantitatea de zeină a fost extrasă într-un timp echivalent, însă exprimat în minute.



**Figura IV.14.** Relația absorbantei biuretilui cu timpul de extracție a zeinelor sub acțiunea microundelor și ultrasunetelor, granulația de 100  $\mu\text{m}$ . În cazul probelor denumite în grafic "Microunde + Ultrasunete", s-a avut în vedere următoarele intervale de timp 5, 10, 15, 30, 45, 60 secunde pentru Microunde și apoi 15 minute pentru Ultrasunete.



**Figura IV.15.** *Dependența concentrației de zeină extrasă de puterea aplicată la extracția acesteia asistată de microunde la 15 secunde iradiere.*

În **Figura IV.15.** este redată relația dintre absorbanta biuretilui și concentrația de zeină extrasă la diferite valori ale puterii cuptorului cu microunde. Cantitatea de zeină extrasă respectă o ecuație polinomială de ordin doi. Se observă că cea mai mare cantitate de zeină se extrage la 500 W, după care aceasta scade posibil datorită faptului că sub acțiunea caldurii, moleculele se fragmentează brusc.

#### **IV.5. Concluzii**

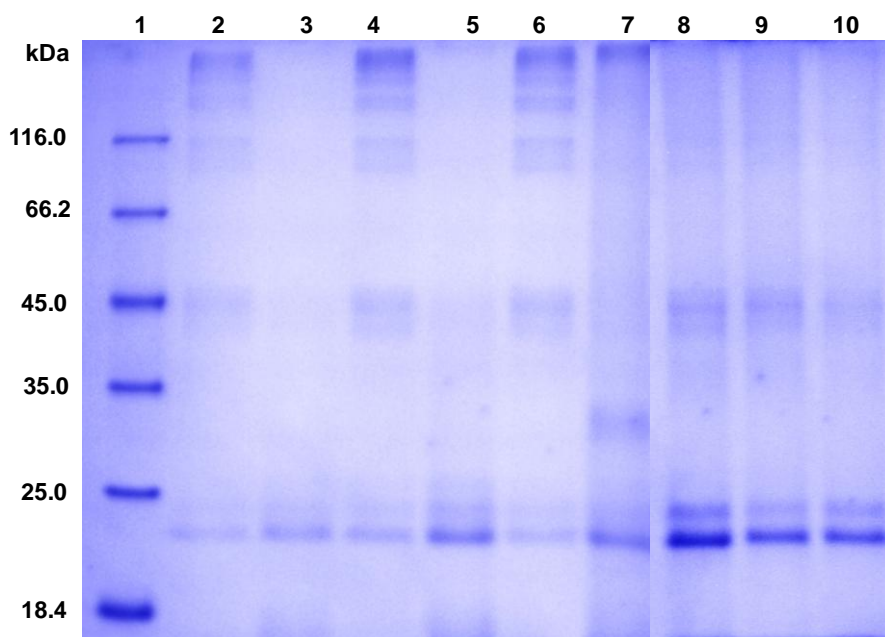
- ✓ s-a studiat extracția zeinelor din semințele și făinurile de porumb cu diverși solvenți organici și amestecuri de solvenți.
- ✓ s-a observat că făinurile de porumb cu granulație mare (mai dure) necesită o cantitate mai mare de alcool pentru extracția zeinelor, în timp ce, din cele fine, zeina se extrage mai ușor în soluții apoase de alcool (cu concentrații de minim 50%). Cea mai mare cantitate de zeină se extrage utilizând etanolul, iar cea mai mică la folosirea alcoolului izopropilic.
- ✓ s-au realizat extracții ale zeinelor din făina comercială la două granulații diferite (250  $\mu\text{m}$  și, respectiv, 500  $\mu\text{m}$ ) sub acțiunea ultrasunetelor și cu ajutorul unui termomixer. S-au observat următoarele: extracția sub acțiunea ultrasunetelor a zeinei a atins un maximum la 60 minute, iar la folosirea termomixerului, la 45 minute. La făina cu granulația mai mare, având un diametru al particulelor de 500  $\mu\text{m}$ , s-a extras prin

termomixare numai jumătate din cantitatea de zeină extrasă sub acțiunea ultrasunetelor.

- ✓ s-au realizat extracții ale zeinelor din făina obținută prin măcinarea porumbului hibrid la două granulații diferite și anume 710  $\mu\text{m}$  și 100  $\mu\text{m}$ . S-au observat următoarele: extracția zeinei din făina cu granulația de 100  $\mu\text{m}$  a fost maximă în mai puțin de 30 minute de sonicare. În același interval de timp, s-a extras doar jumătate din cantitatea de zeină din făina mai dură. Cantitatea de zeină extrasă folosind termomixerul timp de 270 minute a fost de 68,3% din totalul de proteină extrasă. În plus, 74% din totalul de zeină s-a extras în condițiile sonicării în primele 60 minute.
- ✓ s-a studiat pentru prima dată extracția zeinelor din făinurile de porumb hibrid cu ajutorul microundelor. Rezultatele au indicat faptul că este extrasă o cantitate dublă de zeină în numai 60 secunde, în comparație cu metoda ce utilizează ultrasunete, și care a fost aplicată pe o perioadă de 60 min și nu secunde.

## Capitolul V. Metode de caracterizare a zeinelor

### V.1. Caracterizarea zeinelor prin electroforeză



**Figura V.3.** Separarea prin electroforeză unidimensională a zeinelor sub acțiunea microundelor și ultrasunetelor în absența sau prezența DTT-ului. Probele numerotate 1- 10 au următoarea semnificație: (1) - amestec standard de proteine; (2) - semințe de porumb hibrid KWS granulația 100  $\mu\text{m}$  în etanol 70% la o putere de 200 W; (3) -semințe de porumb hibrid KWS granulația 100  $\mu\text{m}$  în etanol 70% cu DTT la o putere de 200 W; (4) - semințe de porumb hibrid KWS granulația 100  $\mu\text{m}$  în etanol 70% la o putere de 700 W; (5) - făină de porumb hibrid KWS granulația 100  $\mu\text{m}$  în etanol 70% cu DTT la o putere de 700 W; (6) - semințe de porumb hibrid KWS granulația 100  $\mu\text{m}$  în etanol 70% la ultrasunete; (7) - semințe de porumb hibrid KWS granulația 100  $\mu\text{m}$  în etanol 70% cu DTT la ultrasunete; (8) - zeină standard în etanol 70% cu DTT la o putere de 700 W; (9) - zeină standard în etanol 70% la o putere de 700 W; (10) - zeină standard extrasă la ultrasunete timp de 15 minute

Probele provenite prin extracția zeinelor cu etanol în prezența sau absența DTT, sub acțiunea microundelor, prin iradiere timp de 15 secunde (din 5 în 5 secunde) sunt prezentate în **Figura V.3**. Probele provenite de la tratamentul cu ultrasunete, pe baie timp de 15 minute, par să aibă concentrații mai reduse de zeină decât cele aflate sub acțiunea microundelor. Din **Figura V.3**. se observă că profilele electroforetice ale zeinelor extrase sub acțiunea microundelor la două puteri diferite, de 200 W și de 700 W (probele 2 și 4) sunt asemănătoare, ceea ce sugerează faptul că energia microundelor nu influențează structura

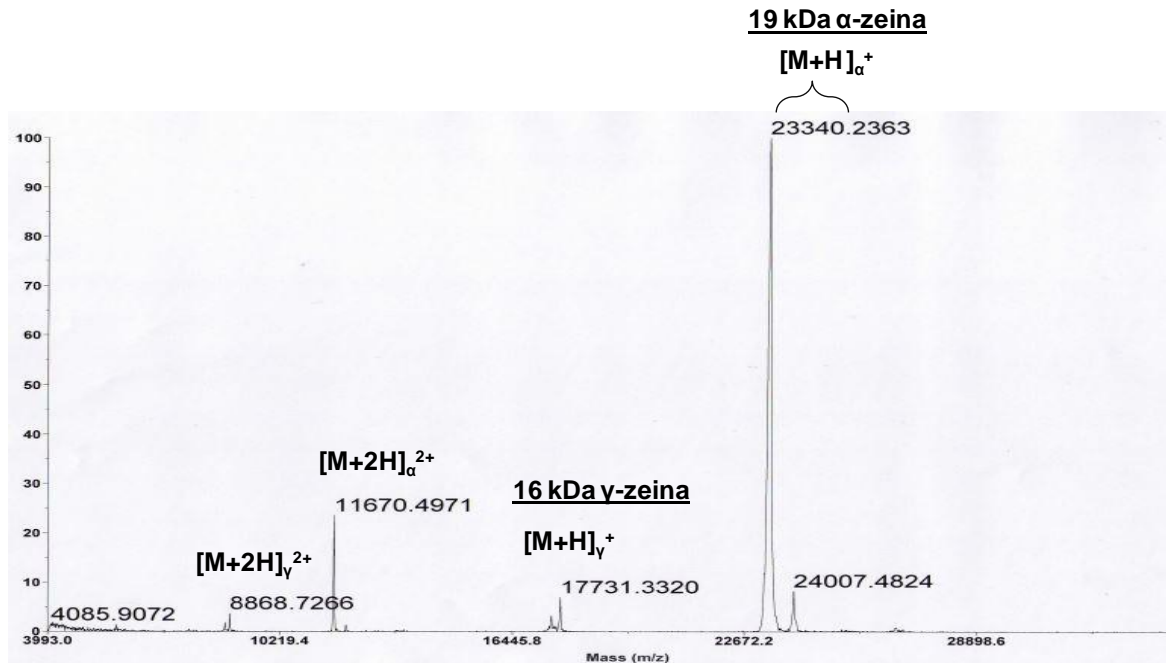
zeinelor.. Astfel, s-au observat 3 benzi cu mase moleculare cuprinse în intervalul 22 - 25 kDa corespunzătoare  $\alpha$ -zeinelor și o bandă la 45 kDa specifică dimerilor de  $\alpha$ -zeină. Acest lucru este confirmat de dispariția acestei benzi în cazul profilelor electroforetice ale probelor 3 și 5, atunci când probele au fost tratate cu agentul reducător DTT. În cazul zeinelor extrase cu ajutorul ultrasunetelor (probele 6 și 7) se observă că profilul electroforetic este asemănător cu cel în care s-a folosit extracția sub acțiunea microundelor. În cazul probelor 8, 9 și 10 s-a utilizat zeina standard. Aceasta a fost ținută timp de 15 secunde la microunde (probele 8 și 9) și 15 minute la ultrasunete (proba 10). Se observă prezența a două benzi la 22 și 23 kDa și a unei benzi la 45 kDa, însă, pe de altă parte au dispărut în totalitate benzile de la mase moleculare  $> 66$  kDa. S-a introdus zeina standard pentru a studia efectul microundelor și s-a constatat că la puterea și timpul de acțiune a microundelor din aceste experimente, zeinele nu suferă modificări vizibile.

## V.2. Caracterizarea zeinelor prin spectrometrie de masă MALDI-ToF

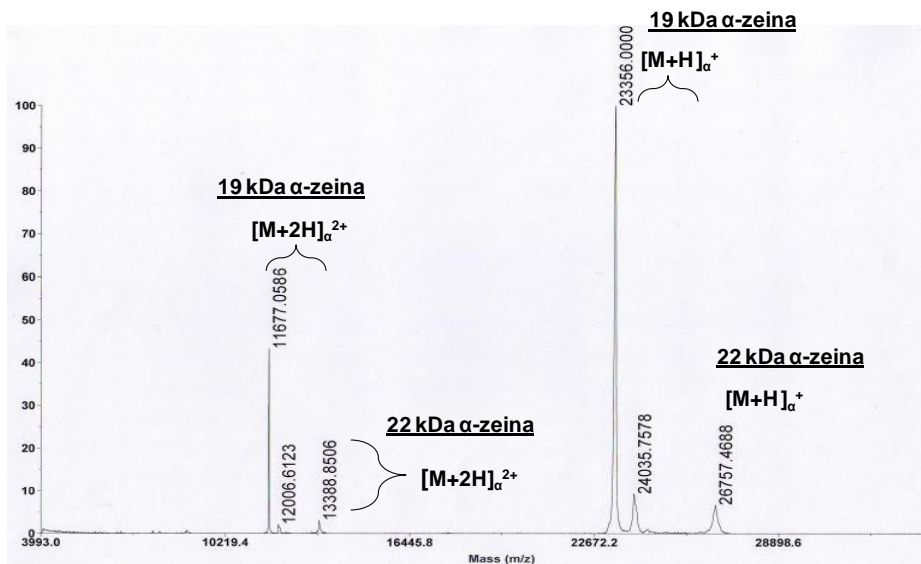
Baza mondială de date UniProt (eng. *Universal Protein Resource*) este catalogul online cel mai cuprinzător și cu o permanentă actualizare a informațiilor cu privire la secvența și funcția proteinelor ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). În această bază de date, există o multitudine de tipuri de zeine. Fiecare tip de făină comercială, fiecare soi de semințe de porumb posedă un anumit genotip, o anumită secvență de aminoacizi proprie și deci un anumit tip de zeină. Variabilitatea zeinelor este foarte mare și este folosită pentru a diferenția liniile și soiurile sau hibridii de porumb între ei. Printre obiectivele acestei lucrări a fost și caracterizarea făinurilor comerciale și cele provenite de la porumb hibrid autohton folosind spectrometria de masă MALDI-ToF.

Ionul molecular teoretic  $[M+H]^+$  calculat cu ajutorul programului IsotopIdent de la adresa de internet [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), are valoarea de 29063 Da pentru  $\alpha$ -zeină, 19559 Da pentru  $\beta$ -zeină, 23689 Da pentru  $\gamma$ -zeină și respectiv 16369 Da pentru  $\delta$ -zeină.

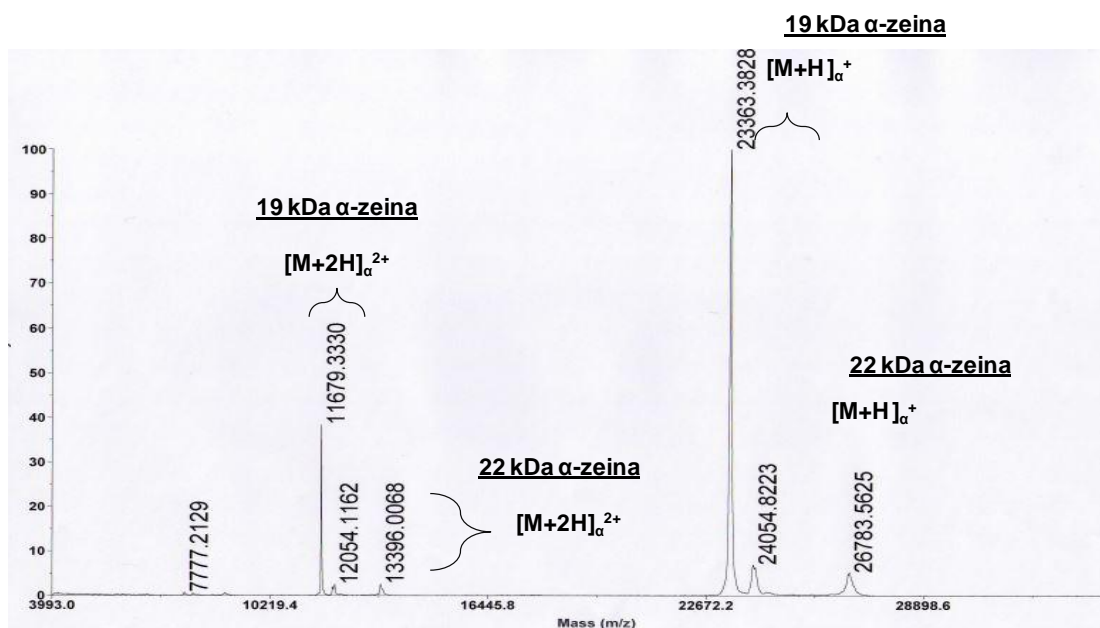
## V.2.1. Extracția în doi solvenți diferiți



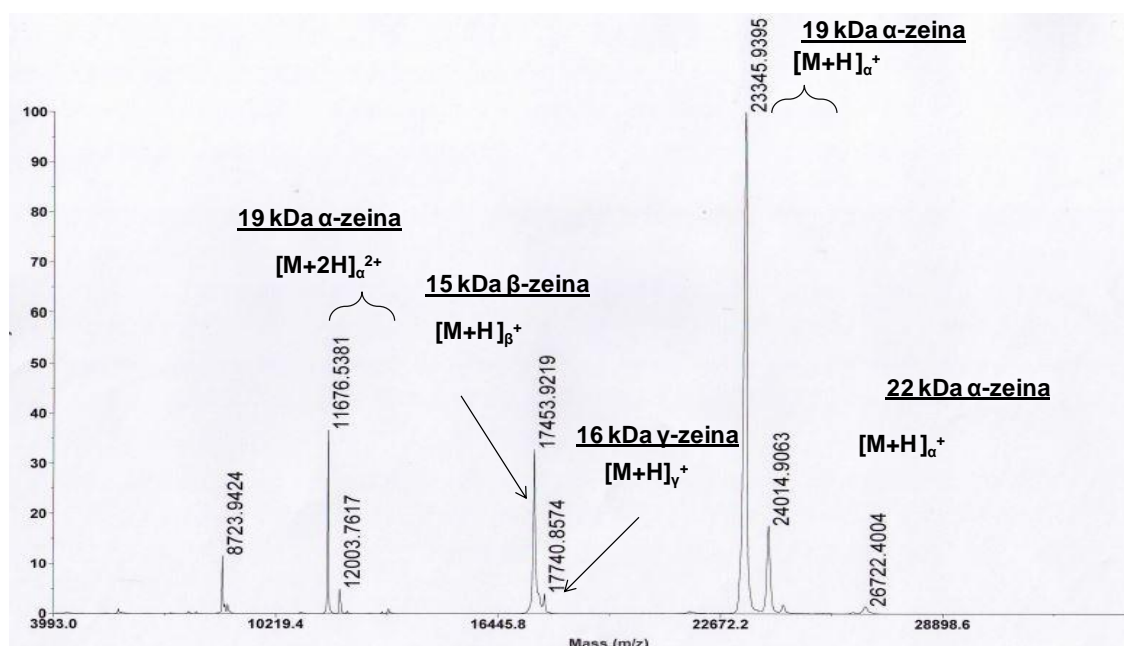
**Figura V.4.** Spectrul de masă MALDI-Tof al probei P1 (extracție cu etanol 70%, 30 min pe baie cu ultrasunete din făina de semințe de porumb KWS cu granulația < 710  $\mu\text{m}$ ).



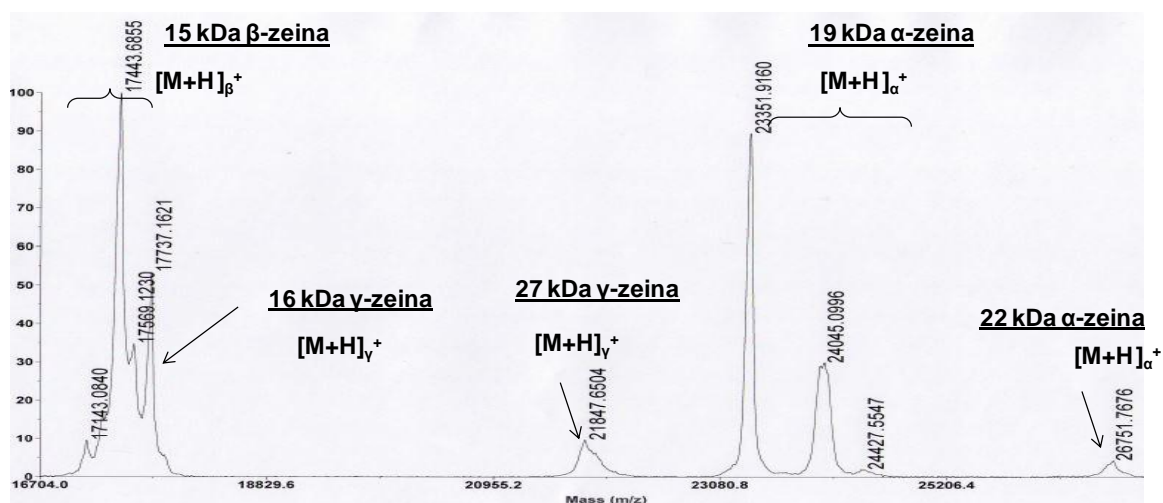
**Figura V.5.** Spectrul de masă MALDI-Tof al probei P2 (extracție cu etanol 70%, 30 min pe baie cu ultrasunete făină F1 granulația de 710  $\mu\text{m}$ ).



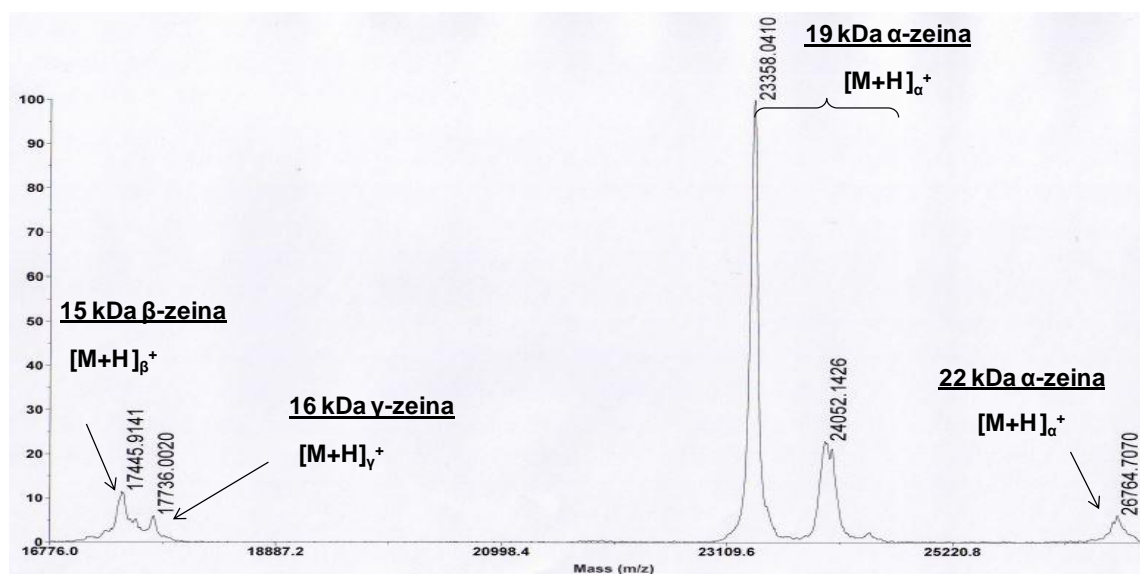
*Figura V.6. Spectrul de masă MALDI-Tof al probei P3 (extracție cu etanol 70%, 30 min pe baie cu ultrasunete până F1 granulația de 250  $\mu$ m)*



*Figura V.7. Spectrul de masă MALDI-Tof al probei P4 (extracție cu ACN 60%, 10 mM DTT, 60 min la 60  $^{\circ}$ C, făină din semințe de porumb hibrid KWS cu granulația de 710  $\mu$ m).*

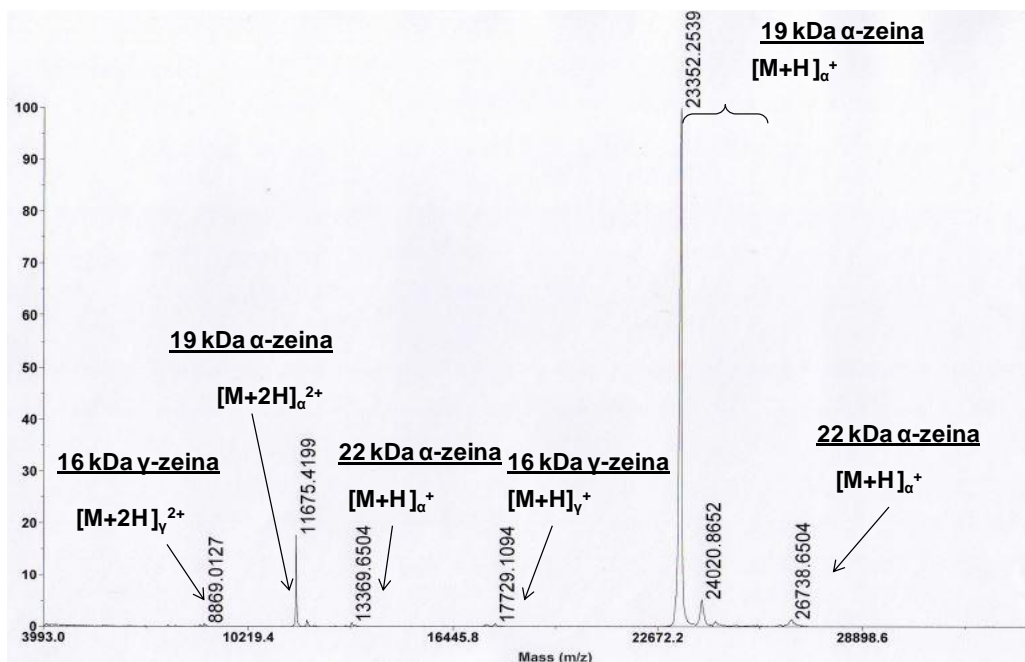


**Figura V.8.** Spectrul de masă MALDI-Tof al probei P5 (extracție cu ACN 60%, 10 mM DTT, 60 min la 60°C, făină comercială F1 cu granulația de 710  $\mu\text{m}$ ).

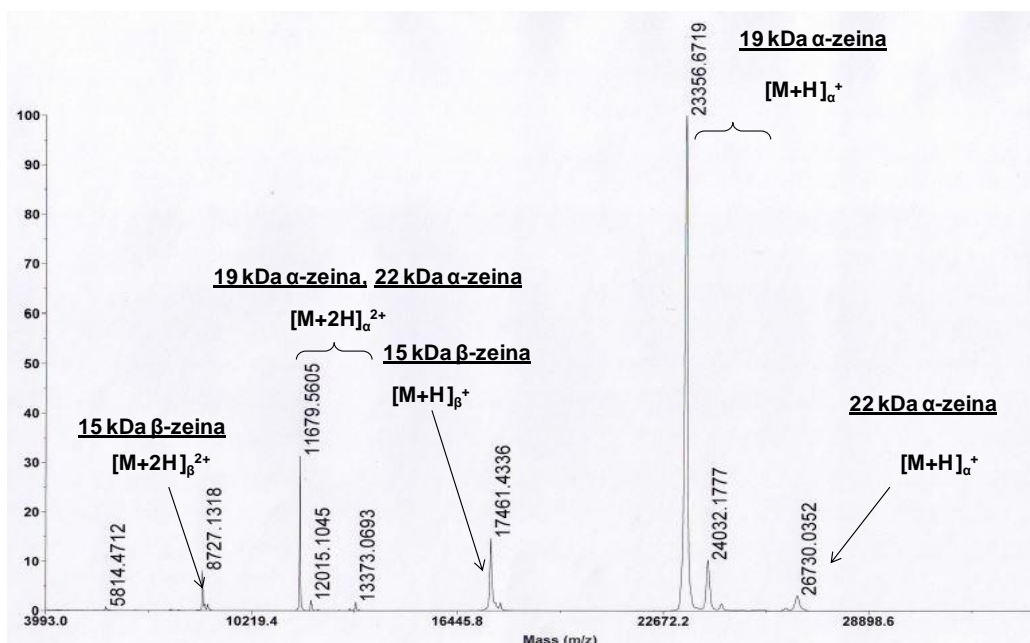


**Figura V.9.** Spectrul de masă MALDI-Tof al probei P6 (extracție cu ACN 60%, 10 mM DTT, 60 min la 60 °C, făină comercială F1 cu granulația de 250  $\mu\text{m}$ ).





**Figura V.10.** Spectrul de masă MALDI-ToF al probei P7 (extracție cu etanol 70%, 30 min pe baie cu ultrasunete, provenită din semințe de porumb KWS cu granulația < 100 μm).



**Figura V.11.** Spectrul de masă MALDI-ToF al probei P8 (extracție cu ACN 60%, 10 mM DTT, 60 min la 60°C din făina obținută din semințe de porumb hibrid KWS cu granulația < 100 μm).

## V.2. 2. Reacția cu iodacetamida

*Tabel V.1. Valorile experimentale ale maselor zeinelor înainte (P11) și după (P12) reacția cu iodacetamida*

Familia de zeine	P11	P12	Diferența	Număr de
	m/z experimental	m/z experimental	m/z	cisteine
15 kDa $\beta$ -zeine	17468	17795	327	6
19 kDa $\alpha$ -zeine	23354	23435	81	2
19 kDa $\alpha$ -zeine	24025	24109	84	2
19 kDa $\alpha$ -zeine	24433	24470	37	1
22 kDa $\alpha$ -zeine	26736	26773	37	1

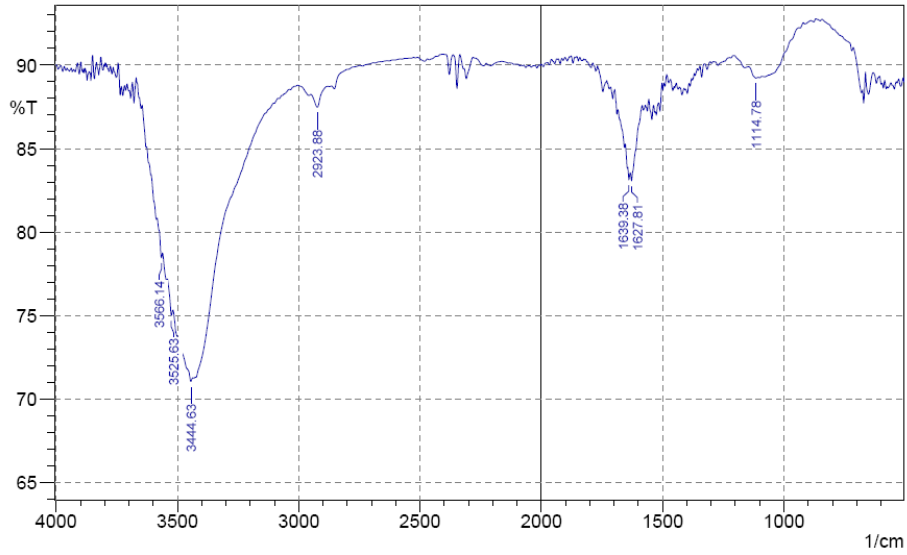
## V.3. Concluzii

- ✓ s-a realizat caracterizarea zeinelor prin electroforeză unidimensională pe gel de poliacrilamidă utilizând porumbul hibrid KWS 3871 la două granulații diferite și anume 710  $\mu\text{m}$  și  $< 100 \mu\text{m}$ . Din rezultatele obținute, se poate concluziona că se extrage o cantitate mai mare de zeină atunci când probele au fost sonicate, comparativ cu extracția lor pe un agitator mecanic, însă la o temperatură de 60 °C
- ✓ în soluție de etanol 70% s-au extras și oligomeri de zeină având mase moleculare ridicate. Acest lucru a fost observat prin apariția unei benzi caracteristice dimerilor de  $\alpha$ -zeine la aproximativ 45 kDa și dispariția ei după tratarea probelor cu DTT
- ✓ s-a studiat influența extractantului în procesul de extracție utilizând spectrometria de masă MALDI ToF. Din spectrele probelor din Figurile V.4.- V.9. se poate concluziona că semnalele din intervalul 23.3- 24.1 kDa au fost caracteristice 19 kDa  $\alpha$ -zeinei iar cele din intervalul 24.5-26.7 kDa au fost caracteristice 22 kDa  $\alpha$ -zeinei. De regulă, spectrele au fost similare indiferent de granulația cu care s-a lucrat și indiferent de tipul de făină investigată. În prezența agentului de reducere DTT, s-a observat apariția semnalelor caracteristice 15 kDa  $\beta$ -zeinei de la m/z 17. 4 kDa și m/z 21.1 kDa caracteristic 27 kDa  $\gamma$ -zeinei.
- ✓ din spectrele MALDI ToF ale probelor P7, P8 (Figurile V.10.- V.11.) se poate concluziona că atunci când extracția s-a realizat cu ACN 60%, a apărut un semnal nou la m/z 17461 caracteristic 15 kDa  $\beta$ -zeinei.

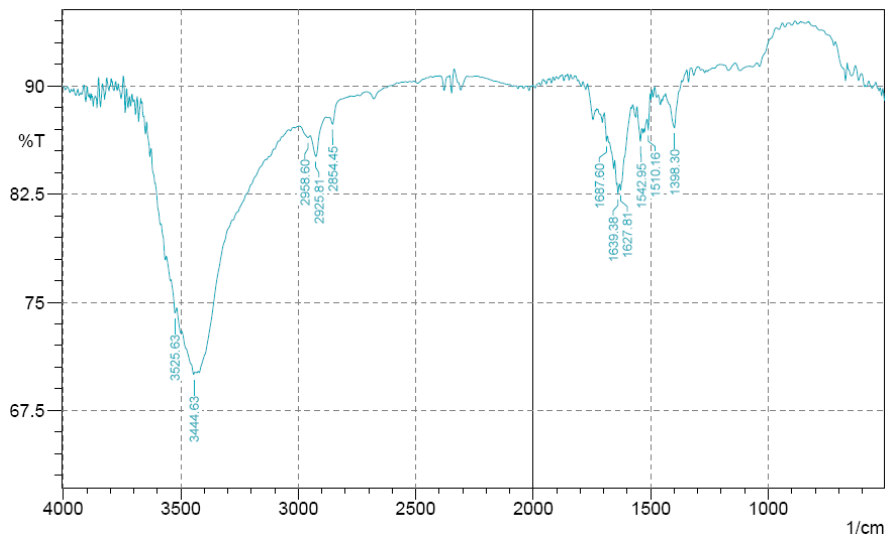
- ✓ în urma reacției cu iodacetamidă a probei P9, în spectrul MALDI-Tof s-au observat trei deplasări în spectrul de masă și anume deplasarea semnalului corespunzător  $\beta$ -zeinei prin modificarea a șase resturi de cisteină și două deplasări ale semnalelor corespunzătoare  $\alpha$ -zeinelor prin modificarea unui rest de cisteină

# Capitolul VI. Aplicațiile zeinelor

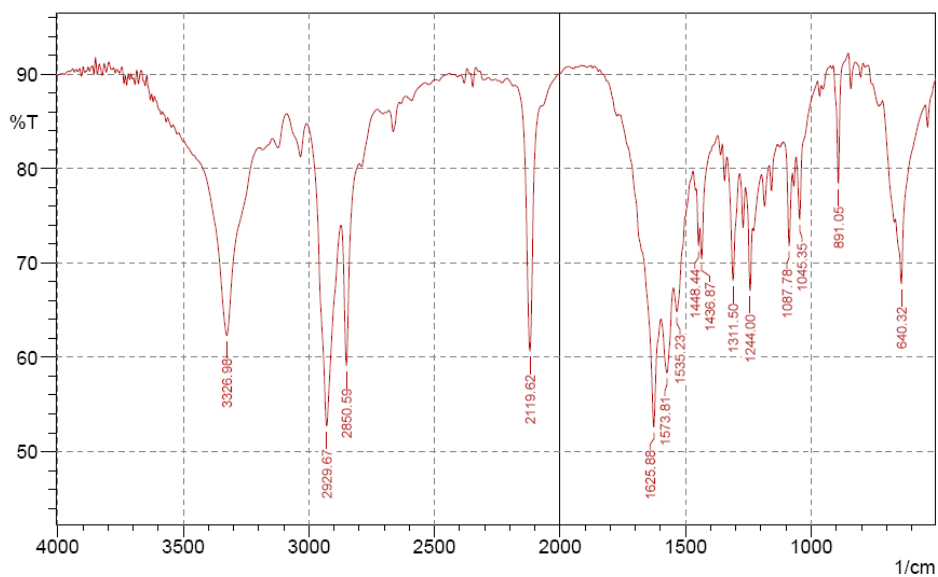
## VI.1. Funcționalizarea zeinelor



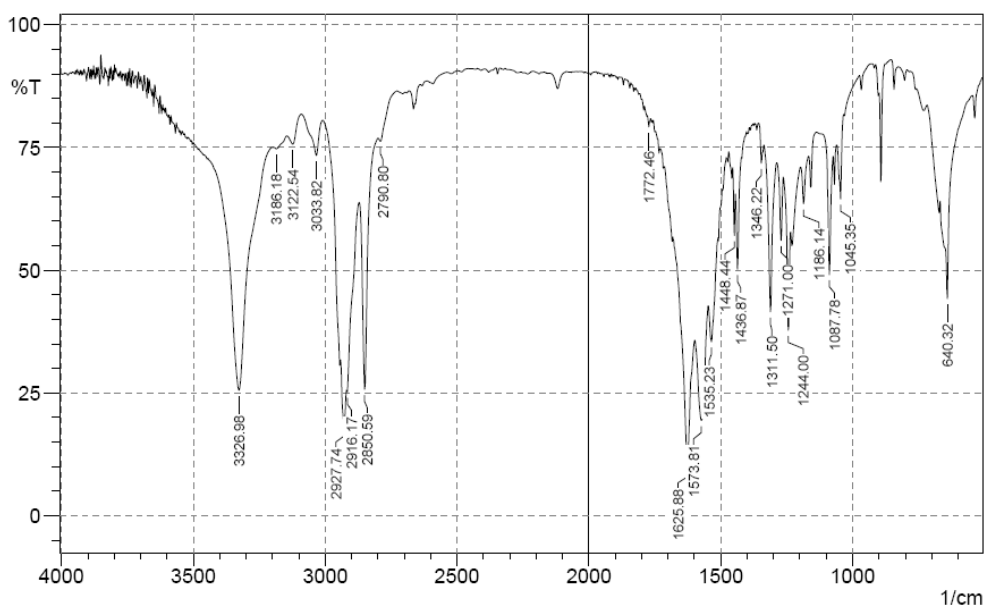
*Figura VI.1. Spectrul FT-IR al zeinei standard netratate.*



*Figura VI.2. Spectrul FT-IR al zeinei acetilate.*



*Figura VI.3. Spectrul FT-IR al His-Ac-zeinei ( histidil-acetil-zeinei).*



*Figura VI.4. Spectrul FT-IR al His-Ac-zeinei în prezența ionilor de  $\text{Cu}^{2+}$*

#### VI.4. Concluzii

- ✓ s-a investigat acetilarea zeinelor și funcționalizarea acestora, precum și interacțiunea lor cu ionii metalelor grele utilizând spectroscopia de infraroșu

- ✓ cele mai importante benzi din spectrul FTIR al zeinei sunt cele de la 1639 și, respectiv, la 1628  $\text{cm}^{-1}$ , caracteristice legăturilor peptidice. Acestea au arătat o conformație neordonată și una  $\beta$ -pliată a moleculelor proteice
- ✓ Prin tratare cu clorură de acetyl, grupările aminice libere sunt acetilate și, în consecință, spectrul zeinei se modifică semnificativ. Astfel, s-a observat apariția la 2925  $\text{cm}^{-1}$  a unui semnal mai intens decât acela al zeinei netratate, ceea ce reflectă creșterea numărului de legături -C-H, provenite de la grupările acetyl adăugate (-CH<sub>3</sub>CO) și care s-au legat de grupările aminice libere. De asemenea, la 1398  $\text{cm}^{-1}$  și la 1542  $\text{cm}^{-1}$  au apărut semnale care denotă structura de tip acetamidic (CH<sub>3</sub>CONH-).
- ✓ s-a realizat funcționalizarea zeinei cu aminoacidul histidină. Spectrul FT-IR obținut pentru histidil-acetyl-zeina s-a modificat foarte mult. Astfel, au apărut o serie de semnale, mai intense, în regiunea amidă I și amidă II la 1626  $\text{cm}^{-1}$ , 1573  $\text{cm}^{-1}$  și 1532  $\text{cm}^{-1}$ . Alte semnale importante apar la 1437  $\text{cm}^{-1}$ , 1244  $\text{cm}^{-1}$ , 1088  $\text{cm}^{-1}$ , 1045  $\text{cm}^{-1}$ , 893  $\text{cm}^{-1}$ , și, respectiv, 640  $\text{cm}^{-1}$ . Ultimul semnal este o caracteristică a inelului imidazolic și confirmă legarea resturilor de histidină de zeină.
- ✓ s-a realizat reacția dintre compusul funcționalizat cu histidină și ionii de Cu<sup>2+</sup> și respectiv de Ni<sup>2+</sup>. În cazul celor două metale grele, s-a observat dispariția semnalului de la 2119  $\text{cm}^{-1}$ , În prezența lor s-a observat apariția a două semnale noi, unul la 1448  $\text{cm}^{-1}$  și a altul la 1346  $\text{cm}^{-1}$

## Concluzii generale

Teza de doctorat intitulată "Contribuții la studiul extracției și aplicațiilor biomedicale și analitice ale zeinelor din porumbul autohton." este structurată în două părți și anume:

**Stadiul actual al cunoașterii în domeniul de cercetare** ce cuprinde Capitolul I și **Cercetări personale** (Capitolul II, Capitolul III, Capitolul IV, Capitolul V, Capitolul VI). Pe baza rezultatelor obținute, putem concluziona următoarele:

- 1. S-au studiat sorturi de făinuri diferite și a fost optimizată metoda de extracție a proteinelor prolaminice din făina de porumb comercială și din semințe de porumb hibrid**
- 2. S-a realizat studiul extracției zeinelor sub acțiunea termomixerului, ultrasunetelor și microundelor utilizând metoda optimizată anterior**
- 3. S-a realizat caracterizarea proteinelor prolaminice prin electroforeză unidimensională și prin spectrometrie de masă MALDI-ToF**
- 4. S-a studiat funcționalizarea zeinelor cu histidină precum și interacțiunea compusului nou format cu ionii metalelor grele. S-a investigat interacțiunea aminoacizilor fluorescenți cu zeina**

Rezultatele prezentate, (extracția zeinelor, caracterizarea lor, dar și posibile aplicații) pot fi utilizate ulterior pentru noi cercetări în domeniu

## Bibliografie selectivă

1. Drochioiu G., Chimia ameliorării plantelor- Selecția liniilor de cereale de calitate biologică superioară și obținerea de făinuri cu înaltă valoare nutritivă, Editura TAO, 2003.
2. Drochioiu G., Process For Separating Floury Fractions Of High Biological Or Industrial Quality, Patent RO 128468-A2, 2013.
3. Cabra V., Arreguin R., Galvez A., Quirasco M., Vazquez-duhalt R., Farres A., Characterization of a 19 kDa  $\alpha$ -zein of high purity, J. Agr. Food Chem., 2005, 53,725-729.
4. Anderson T.J., Lamsa B.P.Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and Modifications for Various Applications: A Review., Cereal Chem., 2011, 88, 159–173.
5. Nonthanum P., LeeY., PaduaG. W., Effect of pH and ethanol content of solvent on rheology of zein solutions, J. Cereal Sci.,2013, 58, 76-81.
6. Esen A. A proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L.), J. Cereal Sci., 1987, 5, 117-128.
7. KimS., Xu J., Aggregate formation of zein and its structural inversion in aqueous ethanol, J. Cereal Sci., 2008, 47 1–5.
8. Wilson C., A nomenclature for zein polypeptides based on isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Cereal Chem., 1985, 62, 361-365.
9. Wilson C., Serial Analysis of Zein by Isoelectric Focusing and Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis, Plant Physiol., 1986, 82, 196-202.
10. Adams W. R., Huang S., Kriz A., Luethy M. H., Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Zeins in Mature Maize Kernels, J. Agric. Food Chem., 2004, 52, 1842-1849.
11. Wang J.F., Geil P.H., Kolling D.R., Padua G.W., Analysis of zein by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, J. Agric. Food. Chem.,2003, 51, 5849-5854.
12. Lakowicz J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third edition, Springer, University of Maryland School of Medicine Baltimore, Maryland, USA, 2006.
13. Drochioiu G., Determination of the crude protein content of seeds of *Phaseolus vulgaris* with a variant of the biuret method, *Cercetari Agronomice in Moldova*, **1995**, 28, 39–44.
14. **Bancila S.**, Pintilie O., Gradinaru R. V., Sandu I., Drochioiu G., Interaction of heavy metal ions with glycyl-L-tryptophan in the presence of amyloid- $\beta$  peptides, *Revista de Chimie*, **2016**, 142, 974-977.



## Activitate științifică

Rezultatele obținute în prezenta teză de doctorat au fost publicate în reviste naționale și internaționale sau prezentate la diverse manifestări științifice, oral sau sub formă de postere.

### Lucrări științifice cu factor de impact

1. **Bancila S.**, Pintilie O., Gradinaru R. V., Sandu I., Drochioiu G., Interaction of heavy metal ions with glycyl-L-tryptophan in the presence of amyloid- $\beta$  peptides, *Revista de Chimie*, **2016**, 142, 974-977 **IF=0,956** (Factor impact personal: 0,956/ 1 drd = 0,956)
2. Drochioiu G., Ciobanu C. I., **Bancila S.**, Ion L., Petre B. A., Andries C., Gradinaru R. V., Murariu M., Ultrasound-based protein determination in maize seeds, *Ultrasounds Sonochemistry*, **2016**, 29, 93–103 **IF=4,321** (Factor impact personal: 4,321 / 3 drd = 1,44)
3. **Bancila S.**, Ciobanu C. I., Murariu M., Drochioiu G., Ultrasound-assisted zein extraction and determination in some patented maize flours, *Revue Roumaine de Chimie*, acceptată (Factor impact personal: 0,25 / 1 drd = 0,25)

Factor impact total: **2,646**

### Alte lucrări publicate în perioada studiilor doctorale

1. Surleva A. R., **Bancila S.**, Todorova E. V., A study on ninhydrin reaction with weak acid dissociable cyanide and its application for toxic cyanide determination, *Science Journal of Analytical Chemistry*, **2014**, 2(1) 1-6. doi: 10.11648/j.sjac.20140201.11 (Factor impact personal: 0,48/ 1 drd = 0,48)

### Lucrări publicate în proceeding-urile conferințelor

1. Pintilie O., Zaharia M., Tudorachi L., **Bancila S.**, Drochioiu G., Sandu I.. Emphasizing the effects of heavy metals on plants through released amino acids, *International Scientific Conference UGALMAT 2014, Advanced Materials and Technologies*, Galati University Press, pp. 161-169, 29-31 Mai 2014

## Lucrări prezentate la conferințe internaționale

1. Drochioiu G., Murariu M., Petre A.B., Ciobanu C., **Bancila S.**, Processes for separating and monitoring corn solids, oil, and zein from sieved cornmeals, EUROINVENT, EUROPEAN EXHIBITION OF CREATIVITY AND INNOVATION, Romanian Inventors Forum, 2014
2. Pintilie O., Zaharia M., Tudorachi L., **Bancila S.**, Drochioiu G., Sandu I., Effect of Heavy Metals on the Germination of Wheat Seeds, *International Scientific Conference UGALMAT 2014, Advanced Materials and Technologies, Galati University Press*, pp. 154-160, 29-31 Mai 2014, (Poster P30)
3. Ciobanu C. I., **Bancila S.**, Habasescu L., Drochioiu G., Influence of bent-core azocompounds on fluorescent peptides, *The 15th International balkan Workshop on Applied Physics*, 2-4 iulie 2015, Poster P3, Material Physics
4. **Bancila S.**, Ciornea E., Ciubotariu E., Zaharia M., Stefanescu R., Drochioiu G.. Effect of potassium iodate and 2,4-dinitrophenol on enzymes involved within the oxidative stress, *19th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Sibiu, România, 2-5 Septembrie 2015, (Poster).
5. Ciobanu C. I., Nicolescu A., Murariu M., **Bancila S.**, Antoci V. Drochioiu G., Synthesis and analysis of new mutant neuropeptides with potential therapeutic for symptomatic treatment in Alzheimer disease, *19th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Sibiu, România, 2-5 Septembrie 2015*, (Poster)

## Lucrări prezentate la conferințe naționale

1. **Băncilă S.**, Ciobanu C., Ion L., Petre B. A., Andrieș C. Murariu M., Spectrophotometric and SDS-PAGE characterisation of zein(s): ultrasound extraction conditions, *a XXXIII-a Conferința Națională de Chimie*, Căciulata, Călimănești, Râmnicu Vâlcea, octombrie 2014, Poster
2. **Băncilă S.**, Ciobanu C. I., Petre B. A., Murariu M., Grădinaru R. V. Drochioiu G., Ultrasonic extraction of  $\alpha$ -zein, *Zilele Universității "Al.I.Cuza" Iași*, 29-30 octombrie 2015, prezentare orală

## Stagii de cercetare obținute în timpul studiilor doctorale

1. 20.10.2014 - 21.04.2015 - Bursă Erasmus Mundus, *Ben-Gurion University of the Negev*, Beer Sheva, Israel, Department of Chemistry

## Membri în proiecte de cercetare

1. 01.05.2015 - 01.06.2016 - Asistent cercetare în cadrul proiectului de parteneriat Metafore PN-II-PT-PCCA-2013-4-1149. Director proiect: Prof. Dr. Gabi Drochioiu;