

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI

FACULTATEA DE CHIMIE

ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE

**METODE RAPIDE ȘI SENSIBILE DE
DETERMINARE A PROTEINELOR ȘI
PEPTIDELOR**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat,

Prof. univ. dr. Gabi DROCHIOIU

Student-doctorand,

Chimist Elena MIHALCEA

Iulie 2025

Mulțumiri

Mulțumesc îndrumătorului științific, prof. univ. dr. ***Gabi Drochioiu*** pentru tot sprijinul acordat în realizarea acestei teze, pentru îndrumările și discuțiile științifice care au contribuit la finalizarea cercetărilor și integrarea mea în munca de cercetare.

În aceeași măsură, adresez recunoștința mea profundă și respectuoasă membrilor comisiei de îndrumare, doamnei conf. dr. habil. ***Brîndușa Alina Petre***, domnului prof. dr. habil. ***Gheorghiță Zbancioc*** și domnului conf. dr. ***Robert Vasile Grădinaru***, pentru sprijinul științific, sfaturile valoroase și încrederea acordată pe întreaga durată a studiilor doctorale. De asemenea, aleasă recunoștință adresez membrilor Comisiei de îndrumare și integritate academică, CSIII dr. ***Dana Mihaela Suflet***, prof. univ. dr. habil. ***Gheorghiță Zbancioc*** și conf. univ. dr. ***Robert Vasile Grădinaru***, care au verificat și corectat forma finală a tezei mele de doctorat.

Totodată, exprim mulțumiri sincere cercetătorilor și cadrelor didactice din cadrul Facultății de Chimie, care, prin sfaturile lor pertinente sau prin colaborările directe au contribuit la finalizarea acestei lucrări.

Mulțumiri speciale adresez doamnei dr. ***Andra Cristina Enache***, de la Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași, pentru colaborarea deosebită în cadrul implementării proiectului „Programul Operațional Capital Uman 2014-2020 – Suport educațional și formativ pentru doctoranzi și tineri cercetători în pregătirea inserției în piața muncii” (Cod SMIS 2014+: 153322, 2022-2023).

Sunt, de asemenea, profund recunoscătoare tuturor profesorilor de chimie care m-au ghidat pe parcursul anilor de formare, contribuind în mod semnificativ la dezvoltarea mea didactică și profesională.

În final, doresc să îmi exprim întreaga grațitudine față de duhovnicul meu, față de familia mea și față de toți cei dragi care, prin răbdare, susținere continuă și încurajări constante, au fost alături de mine pe tot parcursul studiilor doctorale și nu numai.

Elena Mihalcea

CUPRINS

INTRODUCERE	1
PARTEA I. STUDIU DE LITERATURĂ	6
I.1. PROTEINELE: STRUCTURĂ, CARACTERIZARE ȘI DETERMINARE	6
<i>I.1.1. Generalități.....</i>	<i>6</i>
<i>I.1.2. Structura proteinelor</i>	<i>8</i>
<i>I.1.3. Funcțiile proteinelor în organism</i>	<i>11</i>
<i>I.1.4. Clasificarea proteinelor</i>	<i>13</i>
<i>I.1.5. Alosteria proteinelor</i>	<i>14</i>
<i>I.1.6. Solubilitatea proteinelor și extracția lor</i>	<i>15</i>
<i>I.1.7. Determinarea proteinelor</i>	<i>16</i>
<i>I.1.8. Metode de determinare a proteinelor</i>	<i>21</i>
<i>I.1.9. Materiale biologice analizate.....</i>	<i>37</i>
<i>I.1.10. Tehnici de extracție și fracționare a proteinelor</i>	<i>38</i>
<i>I.1.11. Concluzii.....</i>	<i>41</i>
I.2. PEPTIDE ȘI AMINOACIZI: STRUCTURĂ, CARACTERIZARE, ROL BIOLOGIC ȘI DETERMINARE CANTITATIVĂ	42
<i>I.2.1. Generalități.....</i>	<i>42</i>
<i>I.2.2. Peptidele, caracterizare și determinare</i>	<i>43</i>
<i>I.2.3. Separarea peptidelor</i>	<i>44</i>
<i>I.2.4. Determinarea structurii și caracteristicilor peptidelor</i>	<i>44</i>
<i>I.2.5. Determinări cantitative</i>	<i>44</i>
<i>I.2.6. Metoda biuretului</i>	<i>46</i>
<i>I.2.7. Spectroscopia de fluorescență în analiza peptidelor</i>	<i>46</i>
<i>I.2.8. Peptide de sinteză recente</i>	<i>46</i>
<i>I.2.9. Aminoacizii proteinogeni.....</i>	<i>49</i>
<i>I.2.10. Determinarea aminoacizilor.....</i>	<i>52</i>
<i>I.2.11. Fluorimetria.....</i>	<i>52</i>
<i>I.2.12. Spectrometria de masă.....</i>	<i>53</i>
<i>I.2.13. Metode combinate</i>	<i>54</i>

I.2.14. Concluzii.....	55
I.3. INSTRUMENTE ȘI REACTIVI ÎN ANALIZA COMPUȘILOR PEPTIDICI	56
I.3.1. HPLC utilizată în separarea peptidelor	56
I.3.2. Electroforeza capilară.....	60
I.3.3. Spectrometria de masă MALDI-ToF	60
I.3.4. Spectrometria de masă ESI-Ion trap MS.....	64
I.3.5. Spectropolarimetria de dicroism circular	66
I.3.6. FTIR - Spectroscopia în infraroșu.....	69
I.3.7. Spectrometria RMN.....	71
I.3.8. Spectrele de fluorescență.....	72
I.3.9. Concluzii.....	72
OBIECTIVELE TEZEI.....	73
PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE	74
II.1. REACTIVI, INSTRUMENTE ȘI METODE DE CERCETARE .	74
II.1.1. Reactivi chimici	74
II.1.2. Compuși peptidici investigați	78
II.1.3. Materialul biologic	81
II.1.4. Instrumente de laborator	82
II.1.5. Metode de analiză chimică.....	85
II.1.6. Estimarea experimentală a concentrației proteinelor.....	86
II.1.7. Varianta biuret propusă.....	89
II.1.8. Absorbția biuretilui la 226 nm.....	90
II.1.9. Interpretarea datelor cu diverse programe de calculator	91
II.1.10. Analiza statistică.....	91
II.1.11. Concluzii.....	92
II.2. DETERMINAREA PROTEINELOR ȘI PEPTIDELOR PRIN REACȚIA BIURETULUI.....	93
II.2.1. Reacția biuretilui.....	94
II.2.2. Studiu comparativ	95
II.2.3. Spectrele UV-Viz ale complexului biuret	102
II.2.4. Validarea determinărilor la 560 nm	104
II.2.5. Probe reale.....	105

<i>II.2.6. Determinarea proteinei din carne.....</i>	<i>108</i>
<i>II.2.7. Extracția proteinelor</i>	<i>110</i>
<i>II.2.8. Avantaje ale noii variante biuret</i>	<i>115</i>
<i>II.2.9. Interferența aminoacizilor proteinogeni</i>	<i>117</i>
<i>II.2.10. Discuții.....</i>	<i>120</i>
<i>II.2.11. Concluzii.....</i>	<i>125</i>
II.3. DETERMINAREA PEPTIDELOR.....	126
<i>II.3.1. Reacția glutationului cu ionii de cupru.....</i>	<i>126</i>
<i>II.3.2. Separarea și determinarea HPLC a peptidelor</i>	<i>129</i>
<i>II.3.3. Peptida P10 și interacțiunea acesteia cu ionii de cupru.....</i>	<i>130</i>
<i>II.3.4. Studiul UV-Viz al peptidei N-CBZ-S-benzil-L-cisteinil-L-tirozină (BCT)...</i>	<i>133</i>
<i>II.3.5. Determinări ale peptidelor cu conținut de triptofan</i>	<i>134</i>
<i>II.3.6. Concluzii.....</i>	<i>139</i>
II.4. STUDII SPECTROFOTOMETRICE ÎN DOMENIUL UV	141
<i>II.4.1. Studii spectrofotometrice în UV îndepărtat.....</i>	<i>141</i>
<i>II.4.2. Absorbția proteinelor la 280 nm</i>	<i>144</i>
<i>II.4.3. Influența ionilor de cupru în ultraviolet</i>	<i>146</i>
<i>II.4.4. Determinarea proteinelor în ultraviolet prin reacția biuretilui.....</i>	<i>147</i>
<i>II.4.5. Determinarea concentrației zeinelor</i>	<i>150</i>
<i>II.4.6. Discuții asupra rezultatelor obținute</i>	<i>155</i>
<i>II.4.7. Concluzii.....</i>	<i>157</i>
II.5. REZULTATE OBȚINUTE. DETERMINAREA PROTEINELOR CU ACID SULFANILIC DIAZOTAT.....	158
<i>II.5.1. Reacția tirozinei cu acidul sulfanilic diazotat.....</i>	<i>160</i>
<i>II.5.2. Reacția histidinei cu acidul sulfanilic diazotat</i>	<i>164</i>
<i>II.5.3. Determinarea proteinelor cu acidul sulfanilic diazotat.....</i>	<i>165</i>
<i>II.5.4. Concluzii.....</i>	<i>168</i>
II.6. FLUORIMETRIA.....	170
<i>II.6.1. Studii de fluorescență 3D.....</i>	<i>172</i>
<i>II.6.2. Efectul ionilor de cupru</i>	<i>173</i>
<i>II.6.3. Determinări fluorimetrice comparative între tirozină și peptidă.....</i>	<i>175</i>
<i>II.6.4. Fluorimetria în studiul zeinelor.....</i>	<i>176</i>
<i>II.6.5. Discuții.....</i>	<i>181</i>

<i>II.6.6. Concluzii.....</i>	<i>182</i>
II.7. DISEMINAREA REZULTATELOR ȘI ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ.....	184
<i>II.7.1. Lucrări publicate.....</i>	<i>184</i>
<i>II.7.2. Participări la sesiuni, conferințe și congrese științifice.....</i>	<i>185</i>
<i>II.7.3. Proiecte de cercetare în care a fost implicat studentul doctorand.....</i>	<i>186</i>
CONCLUZII GENERALE	187
BIBLIOGRAFIE	191
ABREVIERI	218

INTRODUCERE

Proteinele și peptidele sunt componente biochimice deosebit de importante ale materiei vii. Funcțiile biochimice ale proteinelor includ cataliza, transportul prin membrane sau fluide corporale, contracția musculară, protecția, structura și reglarea metabolică.. Proteinele îndeplinesc un rol-cheie în buna funcționare și existența organismelor, iar homeostazia acestora este asociată cu bunăstarea organismului. În organism peptidele pot fi obținute în urma hidrolizei enzimatică a proteinelor, iar succesiunea aminoacizilor dintr-o proteină este dictată de secvența de nucleotide dintr-un segment al ADN-ului.

În această lucrare de doctorat s-a explorat complexitatea analizei proteinelor și s-a propus aducerea unor contribuții la îmbunătățirea metodologiei de determinare a acestor bioheteropolimeri. Complexitatea și diversitatea peptidelor și proteinelor se datorează atât numărului mare de posibilități de legare a α -aminoacizilor în vederea formării lor, cât și particularităților legate de conformație și configurație a moleculelor acestora. Teza se axează pe metodele, principiile, procedurile, avantajele, dezavantajele și aplicațiile diferitelor tehnici folosite pentru determinarea proteinelor, care se bazează pe caracteristicile unice ale proteinelor imprimate de secvența unică de aminoacizi. Metode precum Kjeldahl și Dumas au în vedere determinarea conținutului de azot. Spectroscopia în infraroșu se bazează pe absorbția unei lungimi de undă a radiației infraroșii specifice legăturii peptidice. Interacțiunile cupru-legătură peptidică permit cuantificarea colorimetrică a proteinelor prin metodele biuret, Lowry și cu acid bicinchoninic (BCA). Aminoacizii specifici pot fi implicați în mecanismele de detecție ce stau la baza metodelor metodele Lowry, BCA, de legare a coloranților și chiar cuantificarea în domeniul UV la lungimea de undă de 280 nm. Metoda BCA utilizează, de asemenea, puterea de reducere a proteinelor într-o soluție alcalină.

Metodele de determinare a proteinelor și peptidelor sunt variate. Biochimia peptidelor are un rol important în studiul lor, precum și în studiul proteinelor și a funcțiilor acestora. Determinarea conținutului de proteine și peptide în materiale biologice este esențială în cercetarea științifică. Metodele spectrofotometrice, fluorimetrice, cromatografice și electrochimice sunt tehnici analitice utilizate pentru cuantificarea acestor componente în mostre biologice. Sunt analizate, de asemenea metodele de cuantificare a proteinelor, care includ determinarea concentrației proteinelor folosind tehnici precum absorbția ultravioletă, metoda Lowry, metoda acidului bicinchoninic, metoda Bradford și metoda Kjeldahl (Pulikkottil, 2024). Determinarea proteinelor din alimente și semințele

plantelor de cultură este de asemenea importantă din motive practice (Chang și Zhang, 2017). De aceea, această teză de doctorat vizează instrumentele, principiile, procedurile, avantajele, dezavantajele și aplicațiile diferitelor metode de analiză a proteinelor care se bazează pe caracteristicile unice ale acestor macromolecule și aminoacizilor. Anumite metode sunt implementate ca metode oficiale pentru stabilirea informațiilor nutriționale, însă metodele rapide pot fi potrivite pentru controlul calității, iar alte metode foarte sensibile sunt necesare pentru determinările unor cantități infime de proteine.

Tema lucrării de doctorat „Metode rapide și sensibile de determinare a proteinelor și peptidelor” a fost aleasă din mai multe motive și anume: (i) există o experiență vastă în domeniul cercetării proteinelor în cadrul Facultății de Chimie, conform studiilor realizate anterior pe această temă și care au fost menționate în bibliografia aferentă acestei lucrări, (ii) aplicabilității practice a determinărilor în diverse domenii de la medicină la agricultură și la experimentele de laborator cu elevii, (III) gradul redus de dificultate a măsurătorilor spectrofotometrice și fluorimetrice care permit obținerea unei game largi de date experimentale într-un interval redus de timp, (iv) dar și datorită absenței unor studii bine fundamentate asupra îmbunătățirii metodelor de determinare rapidă și sensibilă a compușilor peptidici. Astfel, au fost continuate cercetările din cadrul universității în domeniul metodologiei de determinare a proteinelor, iar cercetările descrise în această lucrare devin astfel de interes pentru comunitatea științifică mondială, lucru dovedit de impactul acestora la nivel internațional.

De menționat este și importanța determinării proteinelor, iar pentru aceasta este semnificativ să se aleagă tehnica adecvată dintre metodele disponibile (Janairo et al., 2011). Complexitatea cercetărilor în acest domeniu este legată și de necesitatea de a cunoaște intervalul special de concentrație a proteinelor la care este sensibilă o analiză. Alegerea metodei este un factor important în reducerea erorilor și asigurarea unor rezultate mai fiabile (Miranda, 2024). În plus, se iau în considerare mai mulți factori, cum ar fi natura proteinei, natura altor componente prezente în probă și viteza, precizia și sensibilitatea preferată a analizei. (Zheng și colab., 2017). Acestea și alte metode de analiză a proteinelor diferă în ceea ce privește viteza și sensibilitatea lor. Din cauza naturii complexe a diferitelor proteine, se pot întâlni provocări în ceea ce privește analiza acestora prin metodele existente. Anumite metode sunt necesare ca metode oficiale pentru stabilirea informațiilor nutriționale, metodele rapide fiind potrivite pentru controlul calității, iar alte metode foarte sensibile sunt necesare pentru determinări cu o cantitate infimă de proteine (Dee și colab., 2024). De aceea, alegerea metodei de utilizat în măsurătorile proteinelor trebuie făcută cu prudență pentru a evita

generarea de erori analitice (Miranda, 2024). De toate aceste aspecte s-a ținut cont în cercetările descrise în această teză de doctorat.

Teza de doctorat „Metode rapide și sensibile de determinare a proteinelor și peptidelor” cuprinde 229 pagini, un număr de 92 figuri, 7 tabele și 340 indici bibliografici. Rezultatele prezentate în partea de contribuții personale constituie subiectul a trei articole științifice publicate în jurnale cotate Web of Science a căror factor de impact cumulat este de 5,3 (Mihalcea, E., Enache, A.C., Grădinaru R.V., Drochioiu, G., 2023; Drochioiu, G., Mihalcea, E. și colab., 2024; Mihalcea, E. & Drochioiu, G., 2025) și două articole științifice publicate în proceeding-urile conferințelor internaționale (Darie-Ion, L., Drochioiu, G., Pui, A., Mihalcea, E., Grădinaru, V. R., Drochioiu, G., 2021) Mihalcea, E., Drochioiu, G., Jitaru, S. C., Mangalagiu, V., Gradinaru, R.V. 2022).

Autoarea acestei teze de doctorat are calitatea de autor principal la 3 lucrări științifice. Rezultatele cercetării doctorale obținute au fost diseminate la conferințe organizate pe plan național (2) și internațional (3). Dezvoltarea profesională a fost facilitată și de implicarea în proiectul de cercetare ”Programul Operațional Capital Uman 2014-2020 „Suport educațional și formativ pentru doctoranzi și tineri cercetători în pregătirea inserției în piața muncii” Cod SMIS 2014+: 153322, 2022-2023”.

Teza de doctorat cu titlul „Metode rapide și sensibile de determinare a proteinelor și peptidelor” este structurată în două părți principale, o parte teoretică ce cuprinde studiul de literatură realizat referitor la tema aleasă și partea de contribuții personale în care sunt prezentate rezultatele originale ale cercetării doctorale, precum și propriile observații. Prima parte conține informații referitoare la stadiul actual al cunoașterii diferitelor metode folosite în determinarea proteinelor și peptidelor, fiind împărțită în 3 capitole. Au fost incluse aici informații legate de structura compușilor cu legături peptidice, importanța peptidelor neuroprotectoare, metodele de sinteză ale peptidelor și principalele metode fizico-chimice utilizate în caracterizarea structurală și conformațională a compușilor peptidici. Finalul acestei părți evidențiată este în directă legătură cu principalele obiective propuse în realizarea tezei de doctorat.

Partea a doua este una originală și prezintă în detaliu contribuțiile personale aduse în domeniul metodologiei de determinare a proteinelor și peptidelor cu referire și la aplicațiile noilor metode și variante de analiză chimică. Aceasta parte a lucrării de doctorat este structurată în 7 capitole, primul oferă informații legate de materialele biologice, chimicalele și instrumentele folosite în cercetările experimentale, precum și metodele aplicate în

obținerea și investigarea compușilor de interes pentru această cercetare. Al doilea capitol descrie rezultatele obținute prin aplicarea unei variante noi a metodei biuretului, precum și aplicarea acestora la determinări ale unor probe reale.

Al treilea capitol descrie posibilitatea folosirii metodelor spectrofotometrice în caracterizarea peptidelor, avantajele măsurătorilor spectrofotometrice în domeniul UV fiind discutate în capitolul patru. Investigarea posibilității de determinare a proteinelor bazată pe utilizarea reacției acidului sulfanilic cu azotitul de sodiu în mediu acid a fost descrisă în capitolul cinci. Capitolul al șaselea cuprinde un studiu fluorimetric al determinării peptidelor, aminoacizilor și proteinelor. Ultimul capitol al tezei cuprinde activitatea științifică desfășurată pe parcursul anilor de studiu doctoral și lista lucrărilor publicate.

În cadrul prezentei teze s-a urmărit îndeplinirea următoarelor obiective:

O1 Studiul determinării conținutului de proteine și peptide din materiale biologice cu metode rapide și sensibile, spectrofotometrice, colorimetrice, fluorimetrice, și cromatografice;

O2 Perfecționarea metodologiei de determinare a proteinelor folosind metoda biuretului;

O3 Studiul interferenței aminoacizilor și a unor compuși chimici din mediul biologic în analiza proteinelor din organisme vii;

O4 Studiul experimental al interacțiunii ionilor de cupru cu aminoacizii și alți compuși interferenți (ex. acizi din ciclul Krebs);

O5 Diseminarea rezultatelor obținute prin publicarea acestora în jurnale de specialitate cu factor de impact și prezentarea acestora la diferite manifestări științifice naționale și internaționale.

Pe parcursul cercetărilor, s-au adăugat noi obiective, necesare înțelegerii mai profunde a metodologiei de determinare a proteinelor și peptidelor, cum ar fi:

O6 Determinarea proteinelor cu acid sulfanilic diazotat;

O7 Determinarea ionilor de cupru extrași de către proteine și peptide în mediu alcalin cu o reacție bazată pe utilizarea rezorcinei;

O8 Metode fluorimetrice utilizate în studiul proteinelor și peptidelor.

Lucrarea se încheie cu concluziile generale care se referă la noutățile aduse de această teză de doctorat ca urmare a rezultatelor obținute, bibliografia, abrevierile și anexa cuprinzând publicațiile științifice susținute sau apărute în jurnale cu factor de impact.

PARTEA II. CONTRIBUȚII PERSONALE

II.1. REACTIVI, INSTRUMENTE ȘI METODE DE CERCETARE

Albumina serică bovină a fost utilizată ca proteină standard pentru măsurătorile spectrofotometrice și pentru testarea noilor metode. Aminoacizii au fost cumpărați de la Fluka și Merck, iar acidul sulfanilic și azotitul de sodiu, de la Merck (Darmstadt, Germania). Alcoolul etilic a fost achiziționat de la Chemical Company S.A. din Iași, România.

Reactivul Pauly (Ma & Liu, 2023) a fost preparat prin amestecarea volumelor egale de soluție A și B, astfel: Soluția A a fost preparată prin dizolvarea a 0,1 g de acid sulfanilic (SA) în 2 mL de NaOH 2,5 M, la care s-au adăugat imediat 20 mL de HCl cu concentrația 1M, iar Soluția B a fost nitritul de sodiu 0,1 M. O curbă de etalonare a fost realizată cu o soluție de tirozină în domeniul de concentrații 0-100 $\mu\text{g/mL}$.

Reactivul biuret clasic: constă din diferite cantități de compuși chimici, cum ar fi sulfatul de cupru pentahidrat $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $c = 3,25 \text{ g/L}$, tartratul de potasiu-sodiu $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $c = 9,02 \text{ g/L}$ și NaOH $c = 24 \text{ g/L}$. Alți autori recomandă un reactiv biuret format din 9,00 g/L tartrat sodic de potasiu, 0,024 g/L hidroxid de sodiu, 1,90 g/L sulfat cupric anhidru și a fost propus și 5,00 g/L iodură de potasiu (Laurenciano și colab., 2021). Apoi, se adaugă cu agitare 300 ml de NaOH 10% (p/v) la 500 mL de soluție conținând 0,3% sulfat de cupru pentahidrat și 1,2% tartrat de sodiu și potasiu, apoi se diluează la un litru. Reactivul este stabil timp de câteva luni. Dacă se adaugă un gram de iodură de potasiu pe litru și se depozitează la întuneric, reactivul devine stabil pe termen nelimitat. Un volum de probă se amestecă cu două până la cinci volume de reactiv; raportul optim depinde de concentrațiile maxime de proteine de determinat. Prezența proteinelor dă o culoare violet cu absorbție maximă în jurul valorii de 550-555 nm; de obicei, se citesc absorbanțele la 540 nm, însă se poate determina maximum benzii de absorbție în domeniul 520-570 nm.

Noul reactiv biuret (BR) este o soluție de alcalin-alcoolică preparată prin dizolvarea a 20 g de KOH în 100-200 mL de apă de grad milliQ, adăugând apoi 450 mL etanol absolut sau 475 mL etanol 95% (v/v) și completând cu apă până la 1 L.

Reactivul cu ninhidrină (NR) clasic utilizat pentru determinarea lizinei în supernatantul de biuret, dar și a aminoacizilor liberi în diverse medii a fost obținut din 400 mg ninhidrină ce au fost apoi dizolvate în 25 mL tampon acetat (pH 5,5) și ajustată la un volum final de 100 mL cu etilenglicol.

Reactivul cu ninhidrină modificat: S-au dizolvat 400 mg de ninhidrină și 400 mg de CdCl_2 în 25 mL soluție tampon acid acetic-acetat de sodiu cu pH-ul 5,5 și s-a completat la semn, la 100 mL, cu glicerină. Soluția a fost preparată extemporaneu.

Reacția de diazotare a acidului sulfanilic cu azotit de sodiu în mediu acid, la temperatura camerei, este binecunoscută (figura II.1.2.):

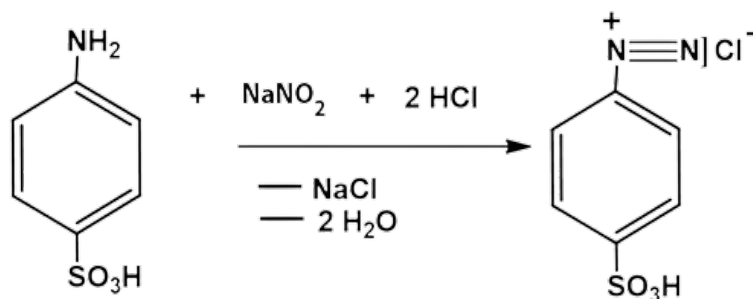


Figura II.1.2. Reacția chimică de diazotare a acidului sulfanilic.

Reacția Pauly este reacția histidinei și tirozinei cu acidul sulfanilic diazotat. Astfel, tirozina, histidina și proteinele conținând acești aminoacizi formează prin cuplare un colorant azoic roz. Intensificarea culorii și virarea spre roșu se produce prin alcalinizare. Reactivii utilizați sunt, de regulă, acidul sulfanilic 1% în HCl 10%, NaNO_2 5% și Na_2CO_3 30%.

În cercetările realizate s-au preparat soluțiile următoare: (i) soluție de acid sulfanilic (SA) 35 mg% (m/v) acidulată cu 1 mL HCl 37% (la 100 mL în flaconul cotat), (ii) soluție apoasă de NaNO_2 30 mg%, (iii) soluție de tirozină (Tyr) 30 mg% în Na_2CO_3 8%. Aceste soluții au fost mai diluate față de cele raportate în literatură pentru determinări de aminoacizi, peptide și proteine, nu pentru identificarea tirozinei și a histidinei în proteine. Reacția chimică de cuplare a sării de diazoniu a acidului sulfanilic cu tirozina este redată în figura II.1.3:

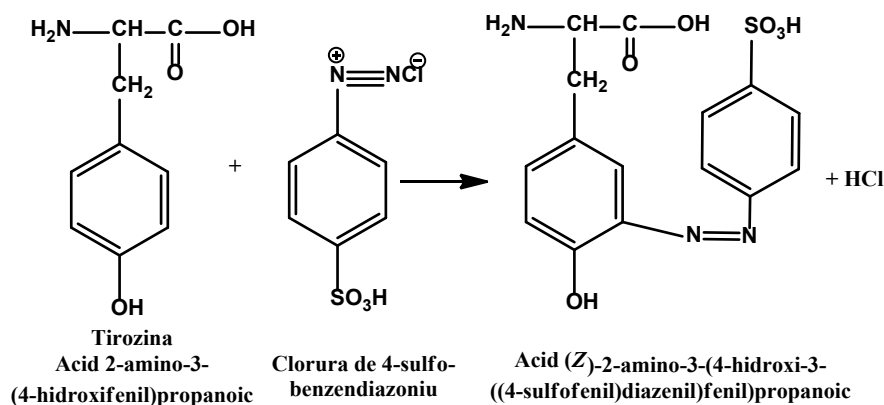


Figura II.1.3. Reacția chimică de cuplare a sării de diazoniu a acidului sulfanilic cu tirozina

Analiza spectroscopică în infraroșu. Modificările structurale ale peptidelor și complexilor lor cu ioni de cupru au fost puse în evidență cu un spectrometru clasic cu transmisie, după pastilarea probei de aproximativ 1-2 mg de peptidă, la 200 atm. Spectrele FTIR de absorbție moleculară s-au obținut cu ajutorul unui spectrofotometru cu transformantă Fourier (FT-IR) model Shimadzu 8400S (Duisburg, Germania). Spectrele IR au fost înregistrate în domeniul $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ și cu o rezoluție spectrală de 2 cm^{-1} . Probele au fost mojarate cu pulbere de bromură de potasiu (KBr) și presate până când se obține pastila transparentă. Spectrele FTIR obținute au fost procesate cu ajutorul programului (software) Origin.

Studii de spectrofluorimetrie. Spectrele de fluorescență 2D și 3D au fost înregistrate utilizând un spectrofluorometru FP-8350 (JASCO, Tokyo, Japonia). Soluțiile de peptidă sau proteină analizate au fost excitate la diferite lungimi de undă pentru a obține spectre de emisie. Toate măsurătorile au fost efectuate la 27°C folosind o cuvă transparentă de cuarț SUPRASIL® (cu un drum optic de 0,5 cm și un volum de 1,7 mL (Hellma, Mulheim, Germania) și un suport celular de tip FMH-802.

II.1.5.1. Metoda micro-Kjeldahl

Această metodă presupune: mineralizarea materialului de analizat (vegetal, lapte, carne, etc.) cu acid sulfuric, în prezența sulfatului de cupru sau a sulfatului de mercur, la aproximativ 330°C . Pentru ridicarea punctului de fierbere al amestecului se adaugă în prezent sulfat de sodiu sau de potasiu. Durata mineralizării este de 4-6 ore la folosirea catalizatorului cu CuSO_4 și de aproximativ 1-2 ore prin adăugarea de oxid galben de mercur, respectiv de numai o oră în cazul variantelor *micro* utilizând cantități reduse de material vegetal (30-100 mg probă biologică). Amoniacul rezultat se distilă în prezența NaOH sau KOH și $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ și se titrează cu HCl sau H_2SO_4 cu concentrație cunoscută, în prezența unui indicator, cum ar fi amestecul de roșu de metil cu verde de bromcrezol.

II.1.6.1. Determinarea proteinelor cu metoda biuretilui propusă

Metoda biuretilui este selectivă, în sensul că reacția biuretilui este dată numai de compușii peptidici. Cu toate acestea, gelatina, zeina, peptona, albumina sunt materiale care conțin în molecule legături peptidice, dar care prezintă absorbante diferite, iar maximele benzilor de absorbție pot diferi și ele.

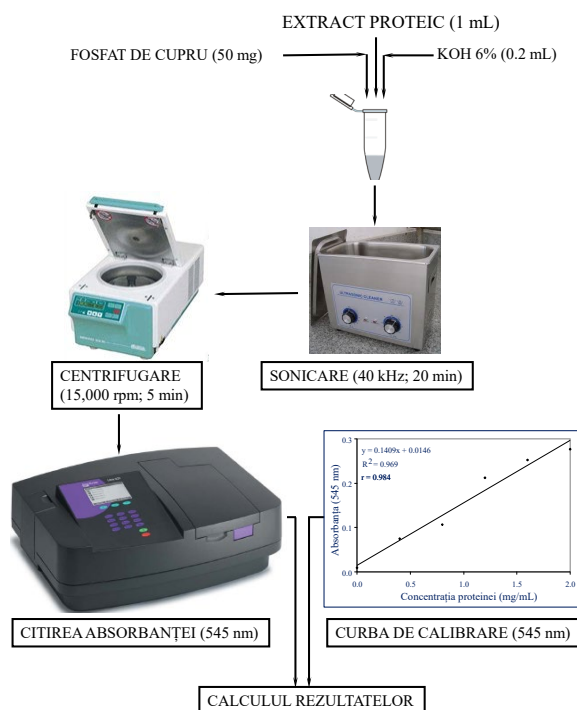


Figura II.1.6. Metodologia de determinare a proteinelor din soluții prin reacția biuretilui.

II.1.7. Varianta biuret propusă

Analiza experimentelor realizate a condus la o procedură care oferă avantaje maxime în determinarea proteinelor. Astfel, la 1 mL de soluție proteică aflată într-un flacon Eppendorf din plastic, s-au adăugat 0,5 mL de soluție alcalină-alcoolică și 20-30 mg de pulbere de fosfat de cupru. Amestecul rezultat a fost sonicat timp de 30 minute și apoi centrifugat la 15000 rpm timp de 5 minute. Dacă proteinele se află în soluție, timpul de sonicare poate fi redus la numai 10 minute.

Spectrul supernatantului limpede a fost citit în intervalul 190-840 nm față de un martor realizat numai cu reactivii. Au fost analizate spectrele și valorile absorbției în domeniul lungimilor de undă de interes, cum ar fi 300-350 nm, 400-700 nm sau 545 nm și 560 nm. Curbele de calibrare au fost trasate la lungimea de undă la care absorbția biuretilui prezintă un maximum, de exemplu la aproximativ 545 nm sau la 326 nm. Citirea la spectrofotometrul cu microplăci s-a realizat la 560 nm.

În cazul proteinelor din cereale și ale altor semințe de plante, s-a luat în lucru câte 50-100 mg de făină din semințele fin măcinate, care au fost tratate cu câte 1 mL de soluție alcalin-alcoolică și aproximativ 50 mg de pulbere de fosfat de cupru. Fiolele Eppendorf care conțin acest amestec au fost agitate manual și apoi sonicate timp de 30 min. După centrifugare la 15000 rpm timp de 5 minute, supernatantul limpede a fost măsurat într-un spectrofotometru în cuve de 1 cm (în vizibil s-au utilizat cuve din material plastic), față de

martorul realizat numai cu reactivi și tratat în mod similar. Curba de calibrare a fost realizată fie cu ajutorul unei soluții alcalin-alcoolice de BSA (1 mL), fie cu valorile proteinelor obținute prin metoda micro-Kjeldahl.

II.2. DETERMINAREA PROTEINELOR ȘI PEPTIDELOR PRIN REACȚIA BIURETULUI

În această teză de doctorat s-a propus să se studieze și să se îmbunătățească metoda de determinare a proteinelor și peptidelor bazată pe binecunoscuta reacție a biuretului care presupune formarea complexilor colorați ai compușilor cu legături peptidice cu ionii de cupru în mediu bazic. De aceea, a fost studiată mai întâi reacția clasică ce presupune formarea complexilor biuret între compușii peptidici și complexul ionilor de cupru cu tartrații (metoda originală folosea sare Seignette, adică tartratul dublu de sodiu și potasiu) în mediu alcalin. Ionii de cupru precipită în soluții alcaline și, de aceea, au fost complexați cu sare Seignette înainte de a reacționa cu proteinele. Prin încălzirea ureei la peste 170 °C, aceasta condensează cu eliberarea unei molecule de amoniac și rezultă un compus organic numit biuret. Acesta este cel mai simplu compus care, cu ionii de cupru formează un complex colorat violet, de unde și numele de reacția biuretului.

Astfel, cercetarea reacției biuretului a presupus următoarele: (i) studiul metodei clasice; (ii) caracterizarea noii variante propuse în această lucrare; (iii) măsurarea absorbanțelor biuretului pe un domeniu larg de lungimi de undă cu ajutorul spectrofotometrului normal și măsurarea acestor valori cu un cititor de plăci și compararea lor; (iv) studiul reacției biuretului în domeniul ultraviolet; (v) aplicații ale metodei biuretului îmbunătățite utilizând probe reale.

II.2.1. Reacția biuretului

Metoda biuret clasică este rapidă și simplă de aplicat și nu depinde de compoziția în aminoacizi a proteinei (Liu & Pan, 2017). Astfel, o variantă a metodei biuret a fost propusă pentru produsele pe bază de porumb folosind un reactiv alcalin care conține dodecil sulfatul de sodiu și tratament termic. Metoda biuret se bazează pe reacția ionilor de cupru (II) cu legăturile peptidice ale proteinelor, care are ca rezultat un chelat proteic de culoare violet. Sunt necesare minim două legături peptidice pentru fiecare ion Cu^{2+} . Metoda biuret este frecvent utilizată pentru determinarea proteinelor totale ca metodă de referință (Zhang et al. 2017). De asemenea, conținutul de proteine al soluțiilor artificiale a fost determinat utilizând metoda biuret cu BSA ca standard (Zhang et al., 2017)

II.2.2. Studiu comparativ

În acest capitol a fost studiată, pe de o parte, utilizarea reactivului biuret clasic în raport cu reactivul bazat pe utilizarea unei soluții alcalin-alcoolice și fosfat de cupru insolubil, iar pe de altă parte, aplicarea noii variante a metodei biuretelui la determinarea proteinelor din variate medii, de la soluții artificiale la probe reale, în raport cu metodele cunoscute. Pentru cercetarea eficienței reactivului biuret clasic, la 1 mL soluție de BSA cu concentrațiile în domeniul 0-10 mg/mL s-au adăugat 4 mL reactiv biuret ce conține sulfat de cupru și tartrat de sodiu și potasiu. S-a trasat curba de calibrare cu BSA, iar din această curbă standard a rezultat slaba sensibilitate a metodei clasice (figura II.2.1).

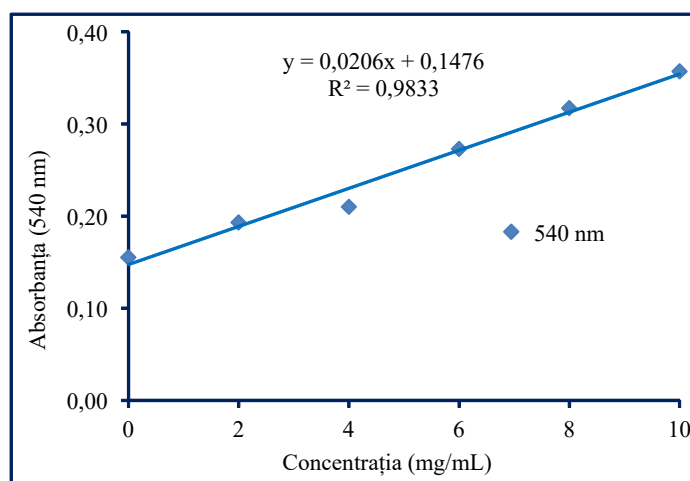


Figura II.2.1. Curba de etalonare realizată cu BSA (0-10 mg/mL) și reactiv biuret clasic.

Acest lucru se datorează și faptului că volumul de reactiv este de 4 ori mai mare, ceea ce conduce la diluarea soluției de biuret. Reacția a avut loc într-un interval de timp foarte scurt de numai 1 minut, când s-a înregistrat absorbția maximă a complexului biuret format. Stabilitatea sa a fost de asemenea ridicată, astfel încât probele pot fi citite la un colorimetru sau un spectrofotometru într-un interval mai larg de timp.

S-au comparat aceste valori cu cele obținute cu varianta biuret propusă. Noua metodă aplicată în cadrul acestui experiment a constatat în tratarea a șase volume de câte 1 mL de BSA cu concentrațiile 0, 2, 4, 6, 8 și, respectiv, 10 mg/mL BSA cu câte 1 mL de soluție alcalin-alcoolică (45 mL alcool etilic absolut, 2 g KOH și apă până la 100 mL) și aproximativ 50 mg de pulbere de fosfat de cupru insolubil, sonicare timp de 30 min, centrifugare la 15000 rpm și citire la 540 nm. Această variantă a condus la valori ale absorbanței biuretelui mai mari decât cele obținute cu metoda clasică (figura II.2.2).

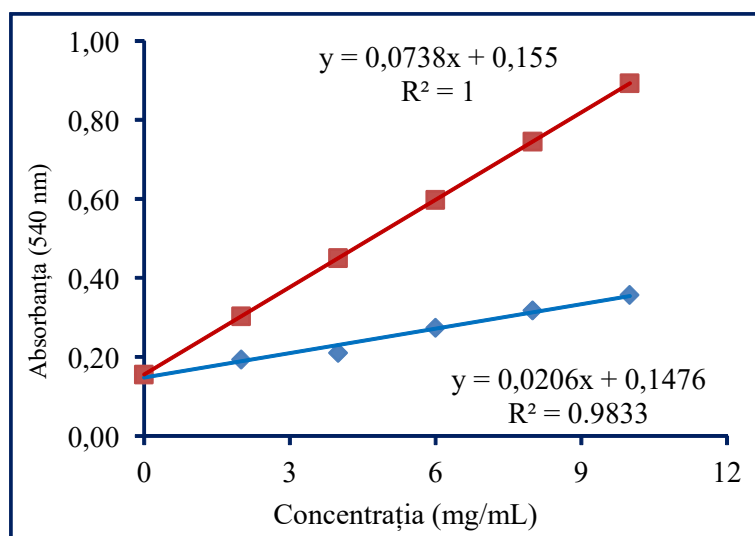


Figura II.2.2. *Comparație între curbele de etalonare realizate cu BSA (0-10 mg/mL) pentru reactivul cu fosfat de cupru (roșu) și reactivul biuret clasic(albastru).*

Ecuatiile de regresie calculate și coeficienții de corelație între valorile absorbanței și cele ale concentrațiilor au confirmat rezultatele mult mai bune obținute cu metoda îmbunătățită ($A_{540} = 0,0738 \cdot c + 0,155$, $r = 1$ și, respectiv, $A_{540} = 0,0206 \cdot c + 0,1476$, $r = 0,991$, unde A_{540} reprezintă absorbanța la 540 nm, iar c , concentrația de BSA exprimată în mg/mL).

Aceste experimente cu înlocuitorii fosfatului de cupru au condus la obținerea de soluții supernatant opalescente în toate cazurile. Ca si concluzie a rezultat că se poate utiliza fosfat de cupru din care proteinele extrag ionii de cupru pentru a forma complexul biuret, însă este necesară verificarea transparenței soluțiilor de biuret rezultate. Filtrarea probelor după efectuarea reacției biuretelui a condus, de asemenea la rezultate mulțumitoare, însă durata procedurilor a crescut corespunzător. Din păcate, acest procedeu de obținere a soluțiilor de biuret limpezi durează foarte mult, iar o parte din soluția de analizat rămâne pe hârtia de filtru ceea ce determină necesitatea utilizării unor volume mai mari de reactivi și materiale biologice.

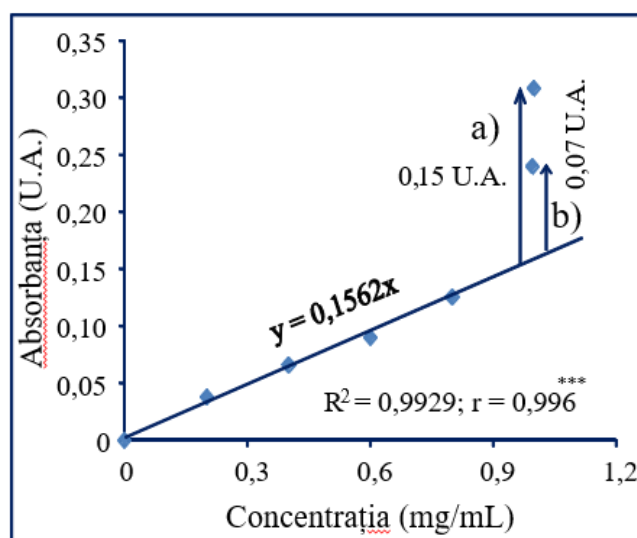


Figura II.2.7. Curbe de etalonare în domeniul 0-1 mg/mL BSA (a) înainte de corecția valorilor biuretelui și (b) după calculul contribuției opalescenței.

II.2.3. Spectrele UV-Viz ale complexului biuret

Spectrele de absorbție în intervalul de lungimi de undă 300-700 nm ale soluțiilor de BSA de concentrații diferite sunt prezentate în figura II.2.8. Două maxime de absorbție sunt vizibile în această figură, la 326 nm și, respectiv, 545 nm. Deoarece ionii de cupru au fost extrași din fosfatul de cupru insolubil proporțional cu concentrația proteinei, maximum de la lungimea de undă de 326 nm ar putea fi important pentru a determina cantități mici de proteine (sub 2 mg/mL). Astfel, valorile absorbanței la această lungime de undă au fost de 4 ori mai mari decât cele de la 545 nm.

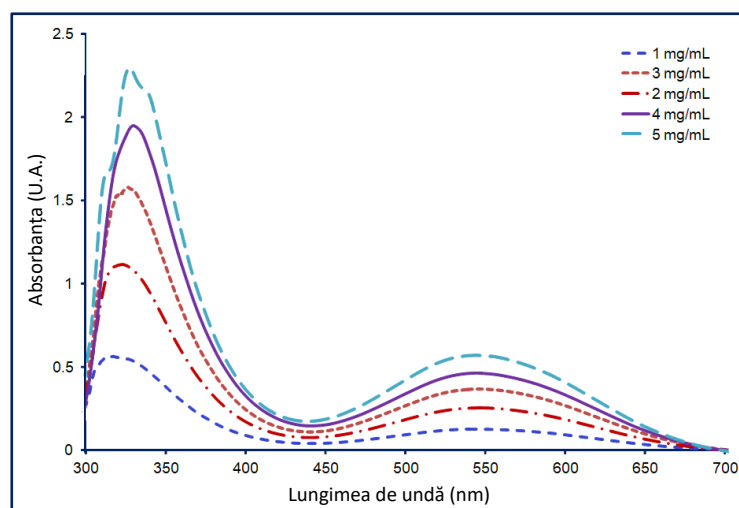


Figura II.2.8. Spectrele absorbanței biuretelui în domeniul UV-Viz ale unor soluții de BSA de diferite concentrații.

Curbele de calibrare corespunzătoare realizate cu BSA la cele două lungimi de undă sunt prezentate în figura II.2.9. S-a găsit astfel că, prin utilizarea spectrofotometrelor moderne, este posibil să se măsoare cu exactitate valori ale absorbantei mai mari de 1,0 U.A. Astfel, curba de calibrare trasată la 326 nm a fost liniară până la aproximativ 2,5 U.A. În ambele cazuri coeficientul de corelație r a fost foarte semnificativ prin testul Student t . Astfel, R^2 a avut valoarea 0,99 și, respectiv, 0,9959, iar ecuațiile de regresie calculate din datele absorbantei la cele două lungimi de undă și concentrațiile respective au fost $A_{326} = 0,4328 \cdot c + 0,1886$ și, respectiv, $A_{545} = 0,1164 \cdot c$, curbele de etalonare fiind liniare în domeniul de concentrații 1-5 mg/mL și, respectiv, 0-5 mg/mL, intersecția celei de-a doua drepte intersectând ordonata în origine.

Deoarece spectrofotometrele mai vechi erau scalate pentru un domeniu de valori ale absorbantei în domeniul 0,0-1,0 U.A., iar după valoarea 1, unitară, nu se puteau realiza măsurători, se recomanda ca măsurătorile să se realizeze cel mai bine în domeniul 0,2-0,8, unde era asigurată o relație de proporționalitate între valorile absorbantei soluțiilor de analizat și valorile concentrației analitului. Dimpotrivă, spectrofotometrele moderne, inclusiv acela utilizat în cadrul prezentei teze de doctorat, oferă o sensibilitate mult mai mare, ceea ce permite realizarea determinărilor mult dincolo de valoarea unitară a absorbantei.

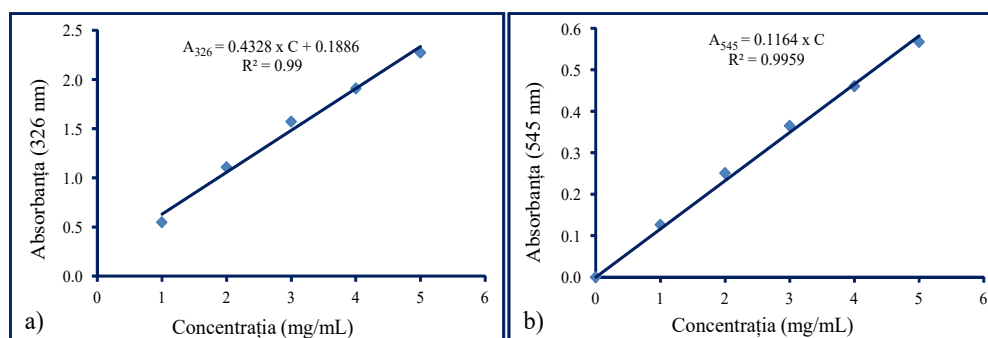


Figura II.2.9. Curbele de etalonare pentru determinarea proteinelor la 326 nm (a) și la 545 nm (b).

De aceea, s-a studiat posibilitatea determinării proteinelor cu ajutorul metodei biuretelui propuse în această lucrare, la valori ale absorbantei supraunitare. Curbele de etalonare s-au dovedit a fi liniare în domeniul 0-2,5 U.A., după cum rezultă și din figura II.2.9. În concluzie, s-a demonstrat în această lucrare posibilitatea determinărilor într-un domeniu mai larg de valori ale absorbantei cu ajutorul spectrofotometrelor moderne.

II.2.5. Probe reale

O metodă biuret modificată a fost aplicată pentru produsele pe bază de porumb folosind un reactiv alcalin care conține dodecil sulfatul de sodiu și tratamentul termic (Liu & Pan, 2017). Cu toate acestea, metoda clasică bazată pe utilizarea sulfatului de cupru și tartratului de sodiu și potasiu prezintă numeroase dezavantaje. Astfel, s-a constatat că amidonul, fibrele, uleiul și alte substanțe neproteice din soluția tulbure care urmează să fie analizată interferează în determinările colorimetrice.

Într-un alt experiment, au fost testate alte 20 de probe de porumb pentru a se urmări corelația dintre valorile biuretilui și cele ale metodei micro-Kjeldahl (figura II.2.12). Proteina brută a fost astfel determinată pe baza unei curbe de calibrare folosind valorile absorbției biuret în funcție de conținutul de proteină brută al probelor de porumb analizate prin metoda micro-Kjeldahl. Conținutul în proteină brută determinat cu metoda biuret a fost similar cu acela măsurat cu metoda micro-Kjeldahl. Utilizarea băii cu ultrasunete a facilitat o complexare mai eficientă în prezența soluțiilor alcalin-alcoolice și a fosfatului de cupru insolubil. Etanolul a împiedicat opalescența generată de amidonul din probele de porumb, în timp ce pulberea de fosfat a fost sursa de ioni de cupru care au format complexul biuret cu legăturile peptidice ale proteinelor. Ecuația de regresie a fost după cum urmează: $B = 1,0664 \cdot K - 0,7313$ ($R^2 = 0,9755$; $r = 0,987$), unde B este procentul de proteină brută determinat prin metoda biuret, iar K reprezintă valorile micro-Kjeldahl.

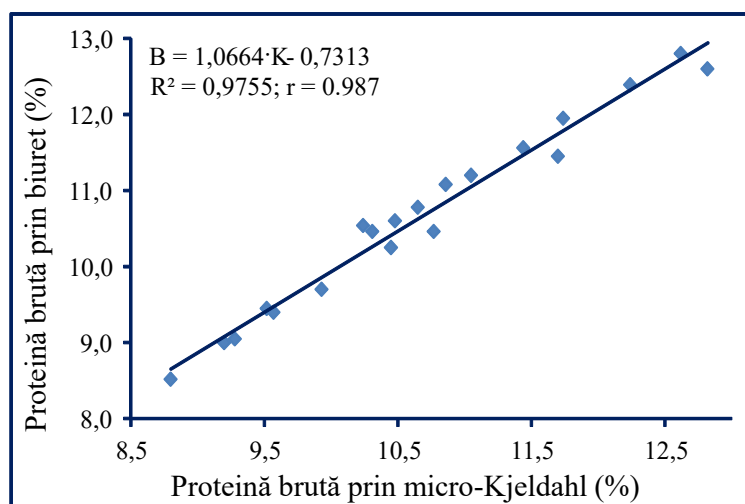


Figura II.2.12. Strânsa corelație dintre valorile proteinei brute determinate cu metoda biuretilui propusă și cele obținute cu metoda micro-Kjeldahl clasică.

Referitor la determinarea proteinelor cu metoda biuretului reflectată în figura II.2.12, proteina pură a fost determinată anterior cu metoda Barnstein și a prezentat valori relativ mai scăzute în raport cu proteina brută determinată cu metoda Kjeldahl, varianta micro în care s-au luat în lucru probe de câte 50 mg. Deoarece determinarea proteinei pure cu această metodă este deosebit de laborioasă, s-a propus determinarea absorbânței biuretului la un număr mare de probe, de pildă 50 probe ce se pot determina zilnic, după care se selectează probele cu valori ale absorbânței pe întreg domeniul de valori și anume probe cu valori mici, mijlocii și, respectiv, mari cu care se trasează curba de etalonare sau calibrare.

II.2.6. Determinarea proteinei din carne

Un volum de 0,3 mL de probă de cercetat (suspensie de carne) a fost amestecată prin agitare energetică cu 1 mL reactiv alcalin-alcoolic într-o fiolă Eppendorf cu volumul total de 2 mL, după care a fost adăugată o cantitate de aproximativ 50 mg fosfat de cupru insolubil. Flacoanele cu amestecuri au fost agitate energetic, apoi supuse sonicării pe o baie cu ultrasunete timp de 30 min. După sonicare, conținutul eprubetelor a fost centrifugat la 18000 rpm, timp de 7 min. Supernatantul limpede a fost citit la spectrofotometru în domeniul de lungimi de undă de la 200 nm la 700 nm, față de o probă de referință realizată numai cu reactivii. S-a constatat o absorbție intensă în domeniul ultraviolet al spectrului, în timp ce absorbânța biuretului la 545 nm a prezentat valoarea 0,485 la prima probă din serie (figura II.2.13).

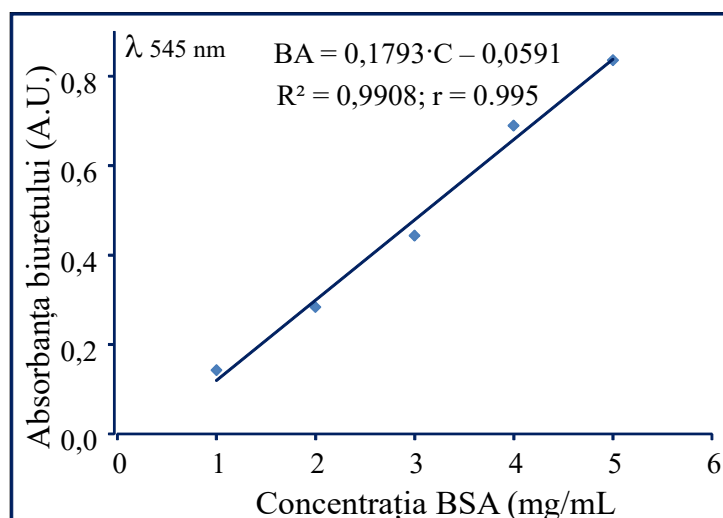


Figura II.2.14. Curba de etalonare a proteinelor cu BSA.

Inițial, reacția biuretului a fost testată pe volume diferite de suspensie pentru a se determina care este volumul potrivit de probă pentru încadrare în domeniul de absorbantă de 0-1 unități al spectrofotometrului la 545 nm, lungime de undă la care complexul biuret al proteinelor prezintă absorbanta maximă.

Pentru calculul concentrației proteinei din carne, s-a utilizat o curbă de etalonare realizată cu BSA în domeniul de concentrații 1,0-5,0 mg/mL (figura II.2.14). Deoarece este mult mai facil să se folosească o foaie excel pentru calculul concentrațiilor, s-a utilizat ecuația de regresie $BA = 0,1793 \cdot C - 0,0591$, de unde s-a calculat concentrația conform relației: $C = (BA + 0,00591) / 0,1793$, unde BA este valoarea absorbantei biuretului format de BSA, iar C, concentrația sa exprimată sub formă de mg/mL BSA. Aplicând această ultimă formulă, s-a obținut o valoare de 4,215 mg proteină într-un volum de soluție 0,3 mL. Deoarece din 10 g carne de vacă au rezultat 200 mL de suspensie, din care s-au luat în lucru 0,3 mL, s-a obținut o conținut de $C = (4,215 \text{ mg} / 0,3 \text{ mL} \times 200 \text{ mL}) / 10 \text{ g} = 281 \text{ mg/g}$ proteină, ceea ce înseamnă 28,1% proteină, valoare ce se încadrează în domeniul de valori ale conținutului normal de proteină a cărnii de vacă (26,0-30,3%)

II.2.7.3. Durata extracției sub acțiunea ultrasunetelor

Procedura clasică, constând în contactul obișnuit, datorat agitării mecanice, între făină și alcool, nu a reușit să elimine întregul conținut de zeină din făina de porumb în cele 270 minute ale experimentelor. Astfel, în lipsa sonicării amestecurilor soluțiilor alcoolice cu făinurile de porumb, a fost extrasă numai o proporție de aproximativ 40% din extracția maximă realizată prin sonicare timp de 30 minute.

Figura II.2.15 prezintă relația dintre absorbția biuretului la 545 nm a probelor de semințe fin măcinate (dimensiunea particulelor 100 μm) și durata de sonicare a fiolelor Eppendorf din plastic care conțin amestecurile de reacție. Toate probele au conținut din 50 mg de făină de porumb din același tip de porumb. Una dintre aceste probe nu a fost sonicată, ci agitată manual timp de un minut și a prezentat o valoare a absorbției de numai 0,639 U.A. Absorbția maximă a fost citită după 30 de minute de sonicare ($A_{545} = 1,537 \text{ U.A.}$), în timp ce 1 mL de 5 mg/mL BSA dizolvat în soluție alcalină-alcoolică a avut 1,57 U.A. De fapt, ecuația de regresie a fost $A_{545} = 0,2964 \cdot c$ ($R^2 = 0,998$), unde c este concentrația BSA exprimată în mg/mL. Prin urmare, concentrația de proteine a acestei probe a fost de 9,80%, ceea ce este normal pentru semințele de porumb.

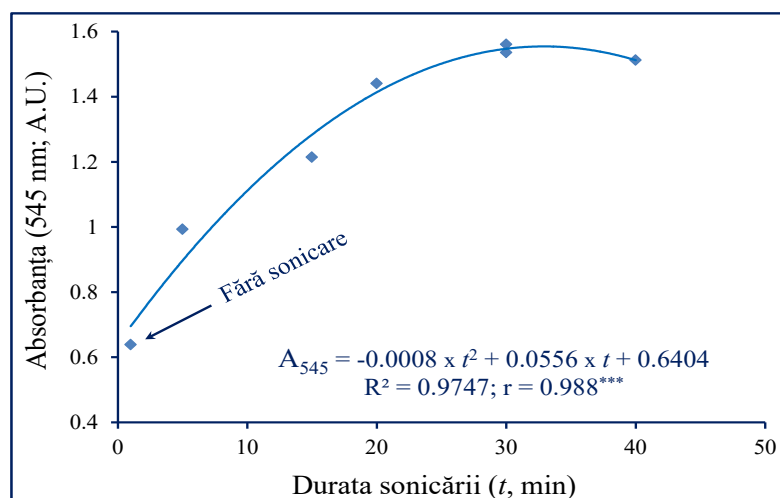


Figura II.2.15. Determinarea timpului de extracție a proteinelor din probe de porumb sub acțiunea ultrasunetelor (Mihalcea și colab., 2025).

Rezultatele obținute au indicat extracția totală a α -zeinei din făina de porumb analizată în soluția alcoolică de extracție, iar reziduul a conținut doar urme de soluție de zeină. De asemenea, prin spectrometrie de masă de tip MALDI-ToF MS s-a demonstrat că soluțiile alcoolice au conținut aproape în totalitate α -zeină (figura II.2.16).

II.2.8. Avantaje ale noii variante biuret

Metoda propusă în această lucrare este relativ simplă și nu necesită echipamente complexe, ceea ce o face accesibilă pentru laboratoare mai slab dotate, însă specializate în determinări asupra materialelor biologice. Reactivii sunt ieftini și ușor de procurat sau preparat, iar metoda în sine nu implică cheltuieli mari. Rezultatele pot fi obținute într-un timp scurt pe un număr relativ mare de probe, ceea ce este util într-o analiză de rutină. Sensibilitate metodei propuse este medie (1-20 mg), însă aceasta a fost îmbunătățită mult în cadrul acestei lucrări. Astfel, raportul reactivi/probă a fost scăzut și, în plus, citirea probelor se poate realiza și la 326 nm, ceea ce a contribuit la o creștere semnificativă a sensibilității. Metoda poate detecta în general concentrații moderate de proteine, fiind potrivită pentru multe aplicații biologice și biochimice. S-a propus astfel creșterea sensibilității determinării prin biuret pentru soluții diluate de proteine, însă s-a aplicat la materiale biologice precum carne, făinuri de cereale, etc. Metoda s-a dovedit deosebit de robustă și s-au obținut rezultate consistente. Această variantă îmbunătățită poate fi utilizată pentru a analiza o gamă variată de probe biologice.

Astfel, metoda biuret îmbunătățită ce utilizează pulbere de fosfat de cupru insolubil prezintă numeroase avantaje, mai ales când este aplicată la determinarea proteinelor din

materialele vegetale. Astfel, supernatantul biuret poate fi citit atât la un spectrofotometru sau colorimetru obișnuit la 545 nm sau la 560 nm, în al doilea caz (în microplăci). De asemenea, parte din supernatant poate fi recuperat și utilizat la alte determinări, fără a recurge la noi cântăriri a materialului de analizat. În plus, este avantajos să se utilizeze același supernatant pentru a reduce erorile de raportare a conținutului în aminoacizi sau alți componenți ai supernatantului respectiv la conținutul său în proteine. S-au pipetat din același supernatant (rezultat după extracție și centrifugare) anumite volume care au fost tratate cu reactivi specifici pentru a determina doi dintre aminoacizi esențiali și anume, triptofanul și lizina (Drochioiu, G. Mihalcea, E. și colab., 2024).

Astfel, triptofanul reacționează cu acidul glioxilic 0,1 M în acid sulfuric 7 N și clorură ferică 1,8 mM, timpul de reacție fiind de 30 min (Nurit, E. et al., 2009), iar lizina a fost tratată cu un reactiv pe bază de ninhidrină. Curbele de calibrare au fost trasate la lungimile de undă la care compușii colorați rezultați din reacțiile chimice ale acestor aminoacizi prezentau maxime de absorbție. Valorile absorbanțelor au fost comparate cu valorile concentrațiilor măsurate cu metode standardizate. În acest caz, determinările necesită doar 50 mg/probă de făină de semințe măcinate pentru cuantificarea a trei componente diferite (componentă totală și doi aminoacizi).

Un alt avantaj al metodei propuse este interferența redusă a ionilor de cupru în domeniul ultraviolet în care complexul biuret prezintă o intensitate semnificativă a absorbției radiației electromagnetice. Astfel, atât proba de cercetat cât și proba oarbă pot fi diluate corespunzător cu reactiv biuret sau cu soluții alcaline și pot fi citite la 220-230 nm. În acest fel reacția se poate desfășura pe volume de ordinul microlitrilor de probă, iar sensibilitatea metodei permite citirea unor volume de 0,7-1,0 mL în cuve de cuarț în domeniul UV.

II.2.9. Interferența aminoacizilor proteinogeni

Toate determinările s-au făcut la concentrații de 2 mg/mL proteină sau aminoacid (figura II.2.17). Dacă în cercetările realizate s-a observat că gelatina nu prezintă absorbție în domeniul UV, reacția biuretelui permite obținerea unei valori destul de ridicate în domeniul vizibil. Cu această ocazie s-a remarcat faptul că proteinele prezintă maxime ale absorbției biuretelui la lungimi de undă puțin diferite, ceea ce a indicat necesitatea de a trasa curbe de etalonare individuale pentru fiecare proteină în parte. Explicația pentru acest fenomen ar putea fi legată de compoziția aminoacidă a fiecărei proteine în parte. De pildă, proteina BSA ce conține în molecula sa resturi de aminoacizi capabili să lege mai intens ionii de cupru ce ar putea deplasa maximum de absorbție spre valori mai mari ale lungimii de undă.

De asemenea, în timp ce triptofanul a prezentat o slabă absorbție la lungimea de undă caracteristică biuretilui, serina a sugerat o puternică interferență dacă se află la aceeași concentrație cu proteinele. Acest fenomen este important de exemplu la determinarea proteinelor din semințele plantelor insuficient maturate sau a materialelor hidrolizate. Aceste date obținute au determinat studierea rolului aminoacizilor proteinogeni în determinarea proteinelor cu noua metodă biuret, bazată pe mobilizarea ionilor de cupru din pulberile insolubile de fosfat de cupru.

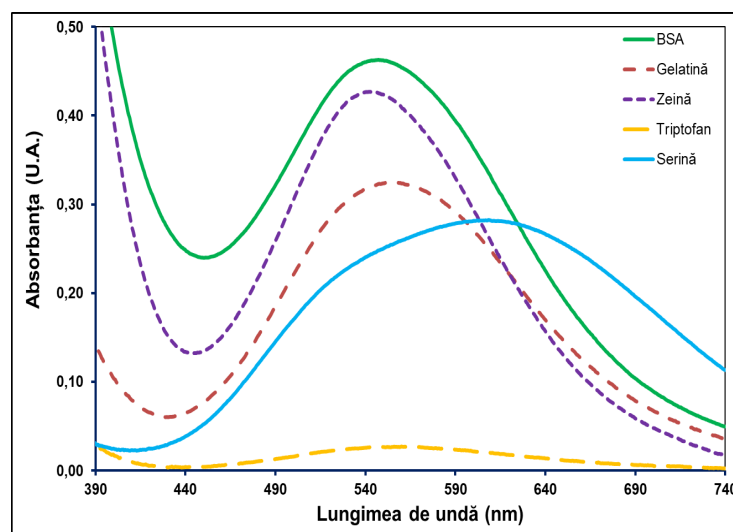


Figura II.2.17. *Spectre de absorbție ale unor proteine și aminoacizi tratați cu soluție alcalin-alcoolică în prezența fosfatului de cupru insolubil. Concentrații: 2 mg/mL în soluție apoasă, cu excepția zeinei, 2 mg/mL în soluție alcoolică 70% (Mihalcea și colab., 2022).*

Inițial, s-a investigat interferența a doi aminoacizi, și anume triptofanul, cu un maxim de absorbție la 556,5 nm și serina, 605,5 nm. Valorile maxime ale absorbantei acestor complexe au fost, de asemenea, complet diferite (triptofan - 0,027 U.A.; serină - 0,282 U.A.). Astfel, valoarea absorbantei biuretilui în determinarea BSA ar crește de la 0,463 A.U. la 0,490 A.U. (+5,83%) în prezența triptofanului, dar la 0,711 A.U. (+53,56%) datorită prezenței serinei.

În această teză de doctorat, s-a investigat absorbția biuret a aminoacizilor proteinogeni la lungimea de undă maximă a acestora, precum și la 545 nm, la care absoarbe complexul biuret al proteinelor (figura II.2.18). Pentru aceasta, atât determinarea proteinei BSA, cât și a aminoacizilor proteinogeni s-a realizat la o concentrație de 2 mg/mL.

S-a constatat, astfel o interferență majoră a unor aminoacizi, în timp ce alți aminoacizi au prezentat o interferență slabă în analiza proteinelor cu metoda biuretilui.

Aceste rezultate au fost deja trimise la publicare în *Revue Roumaine de Chimie* (Mihalcea, E. și Drochioiu, G., 2025).

Aminoacizii individuali extrag ioni de cupru din fosfatul de cupru insolubil pentru a forma complexe cu maxime de absorbție diferite. În figura II.2.18 se observă că absorbanta maximă a unui aminoacid aparține histidinei, urmată de serină și glicină, deși maximele lor de absorbție sunt diferite (Mihalcea și colab., 2025). La capătul opus se află arginina, deși conține în moleculă 4 atomi de azot care ar putea lega ioni de cupru, triptofanul și leucina având cea mai slabă interferență.

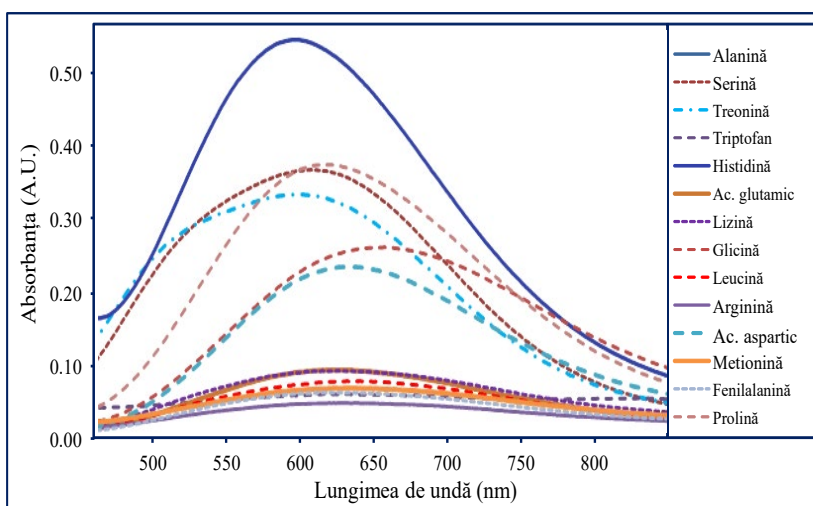


Figura II.2.18. Spectrele de absorbție ale aminoacizilor proteinogeni supuși reacției biuretului (2 mg/mL aminoacizi).

Din figura II.2.18 se remarcă faptul că doar câțiva aminoacizi prezintă o interferență mai slabă, în timp ce majoritatea interferează intens dacă sunt în concentrație mai mare. De aceea, este recomandabil ca proteinele să fie purificate înainte de efectuarea reacției biuretului, dacă se consideră că proteinele sunt însoțite de aminoacizi. Se mai observă de asemenea, că legarea ionilor de cupru reprezintă sursa acestor absorbții intense a aminoacizilor în mediul alcalin.

Metoda micro-Kjeldahl este exactă, iar precizia sa depinde de finețea măcinării materialului de analizat și de cantitatea de material vegetal luată în lucru. Metoda prezintă însă o slabă productivitate și un consum relativ ridicat de reactivi și de energie, fiind mai dificil de aplicat în cadrul lucrărilor de ameliorare. Sunt utilizate totuși variantele sale micro datorită exactității lor și a consumului redus de material vegetal, atât de prețios îndeosebi în primele faze ale procesului de ameliorare. Concentrațiile proteinelor pot fi determinate pur

și simplu prin citirea absorbanței biuretului probei la o lungime de undă de 540 nm sau la 750 nm în cazul metodei Lowry și la 595 nm în testul Bradford (Martina & Vojtech, 2015).

Sensibilitatea metodei clasice la determinarea proteinelor totale din ser este într-adevăr scăzută, limita de detecție fiind în general de 0,2 - 1,7 g/L; această sensibilitate este suficientă pentru estimarea concentrației proteinei totale din ser, cu o valoare situată în domeniul 60 - 80 g/L.

În metoda biuret clasică se măsoară reacția ionilor cuprici cu legăturile peptidice, când se formează un complex cu tartratul, care absoarbe la 540-550 nm (Sapan & Lundblad, 2015). Autorii acestei lucrări, citată aici, au explicat faptul că proteinele și alți compuși polipeptidici extrag ionii de cupru, Cu^{2+} , din complexii acestora cu tartrații. Ceea ce s-a demonstrat în această teză de doctorat este faptul că, deoarece proteinele formează complexi de tip biuret, deosebit de stabili, aceștia pot extrage ionii de cupru și din fosfatul de cupru insolubil (CuPi).

Aplicații ale noii metode. După determinarea proteinelor cu varianta biuret propusă, a fost determinat triptofanul din probele de porumb pentru a identifica varietățile de porumb de înaltă calitate în cercetările de ameliorare a plantelor (Drochioiu, Mihalcea și colab., 2024). Calitatea porumbului este dată atât de valoarea sa nutritivă și de conținutul biochimic al bobului, dar și de conținutul și calitatea proteinelor din bob. Variantele cu o valoare nutritivă înaltă conțin un procent ridicat de proteină brută și o balanță aminoacidă echilibrată în care aminoacizii esențiali, în special lizina și triptofanul, se află în proporție mai mare.

Pentru ridicarea calității biologice a porumbului s-au introdus gene mutante de tip *opaque-2* (care determină formarea unei semințe cu aspect opac). Aceste gene conferă un conținut superior de lizină și de triptofan, aminoacizi ce sunt deficitari în cerealele normale, concomitent cu reducerea conținutului în prolamine, cum ar fi zeinele. Astfel, proteinele din porumb sunt asimilate în proporție mai mare de către animalele monogastrice. Există o corelație pozitivă între calitatea porumbului și calitatea cărnii animalelor furajate cu porumb. Porumbul de calitate, bogat în proteine și aminoacizi esențiali, reprezintă un aliment valoros în hrana omului, evitându-se o serie de carențe care ar conduce la pelagră și alte afecțiuni specifice nutriției cu porumb de calitate necorespunzătoare.

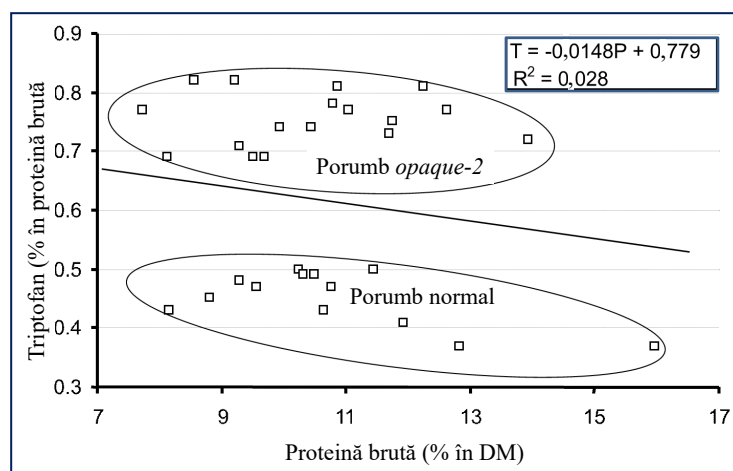


Figura II.2.19. Corelația dintre conținutul în triptofan (% în proteine) și proteină totală (% în DM, masă uscată) din unele probe de porumb normal și opaque-2 (Drochioiu, Mihalcea și colab., 2023).

Deoarece conținutul de lizină din semințele de porumb este de aproximativ 4 ori mai mare decât cel de triptofan, se poate utiliza numai conținutul în triptofan al semințelor de porumb pentru evaluarea calității nutritive a acestora (Nurit, 2009).

Astfel, în figura II.2.19 se observă o separare netă între conținutul în triptofan al probelor *opaque-2* de 0,70-0,85% în proteina brută și cele de porumb normal (0,30-0,50%). În acest fel pot fi selectate varietățile mutante de cele normale, fără a face analize genetice costisitoare.

S-au realizat experimente specifice pentru a îmbunătăți o metodă care s-a dovedit selectivă, rapidă și ieftină, aplicabilă la o gamă largă de materiale biologice. În comparație cu metodele de mai sus, metoda biuretelui prezintă avantajele unei operațiuni ușoare, ale unei precizii excelente și ale unei interferențe mai reduse. Principiul acestei metode este acela că legătura peptidică de la joncțiunea dintre reziduurile a doi aminoacizi adiacenți și doi ioni de cupru, Cu^{2+} , pot forma un complex violet-mov în condiții alcaline, iar intensitatea culorii este proporțională cu conținutul de proteine din probă.

II.3. DETERMINAREA PEPTIDELOR

II.3.5. Determinări ale peptidelor cu conținut de triptofan

S-au realizat măsurători spectrofotometrice ale soluțiilor de triptofan (figura II.3.8) în carese regăsesc spectrele triptofanului cu concentrații cuprinse în domeniul 1-10 $\mu\text{g/mL}$, care sunt concentrații deosebit de reduse care permit măsurători sensibile în soluție în cazul acestui aminoacid. În același timp, peptidele care conțin acest aminoacid pot fi determinate ușor în domeniul UV, metoda fiind deosebit de sensibilă. La separarea prin tehnica HPLC a

acestor peptide, se poate observa utilitatea triptofanului în monitorizarea absorbantei la valoarea de 280 nm.

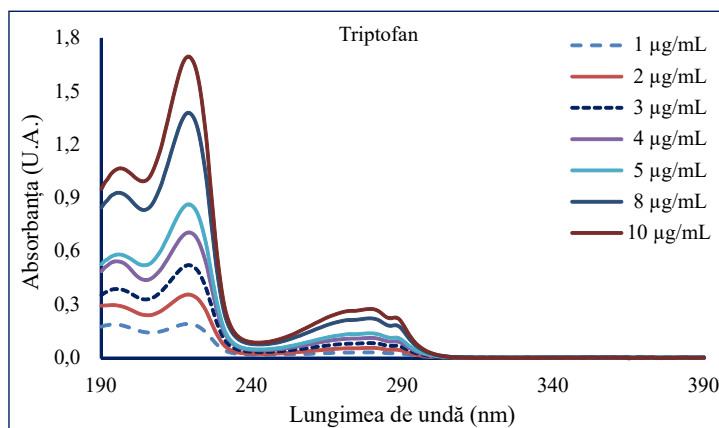


Figura II.3.8. Spectrele UV ale unor soluții apoase de triptofan.

Curbele de etalonare au fost trasate cu ajutorul datelor prezentate în tabelul II.3.1. Din acest tabel se remarcă valoarea maximă a absorbantei triptofanului în ultraviolet la 219 nm (1,697 U.A.). Deși triptofanul absoarbe intens și specific la 280 nm, se observă că absorbanta la această lungime de undă este de șase ori mai mică decât aceea la $\lambda_{\max} = 219$ nm ($1,697/0,277 = 6,12$).

Tabelul II.3.1. Valorile absorbantei triptofanului la diferite lungimi de undă și concentrații în soluție apoasă

Lungimea de undă (nm)	Absorbanta (U.A.)						
Concentrația (µg/mL)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	8,0	10,0
196	0,187	0,295	0,389	0,543	0,583	0,931	1,068
205	0,145	0,242	0,331	0,440	0,524	0,838	1,002
214	0,174	0,318	0,458	0,617	0,754	1,206	1,482
219	0,193	0,358	0,524	0,708	0,865	1,381	1,697
220	0,191	0,354	0,520	0,703	0,858	1,368	1,681
280	0,033	0,058	0,085	0,114	0,140	0,224	0,277

Pentru determinarea peptidelor care au în structura lor primară un rest de triptofan, s-a luat în studiu o dipeptidă, glicil-triptofanul (notată Gly-Trp sau GW), deoarece este simplă și ușor de studiat, conține glicină care nu absoarbe la 280 nm și a fost ușor de procurat sau sintetizat. Această peptidă, neavând decât o dublă legătură (din gruparea peptidică) nu este capabilă să dea un răspuns în reacția biuretului. În schimb aceasta poate fi un candidat ideal pentru studiile spectrofotometrice și fluorimetrice datorită prezenței triptofanului în

molecula sa. În plus, această peptidă a fost folosită în diverse cercetări în cadrul laboratorului de biochimie (Ciobanu și colab., 2015).

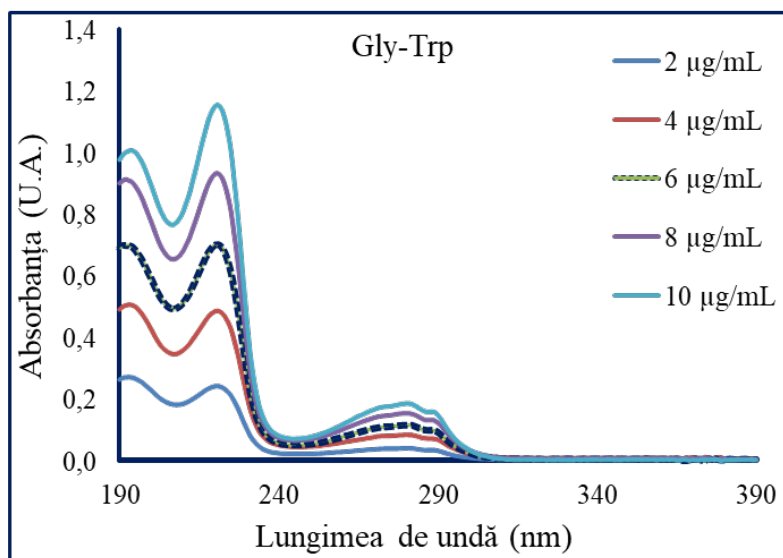


Figura II.3.10. Spectrele UV ale unor soluții apoase de glicil-triptofan.

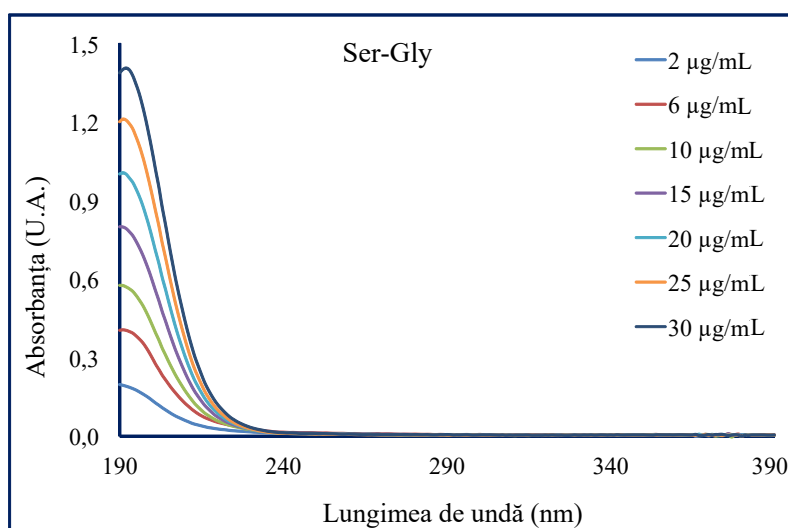


Figura II.3.11. Spectrele UV ale unor soluții apoase ale peptidei seril-glicină (Ser-Gly) SG).

Din figura de mai sus rezultă o puternică absorbție a peptide seril-glicină în domeniul ultraviolet îndepărtat la lungimi de undă sub 205 nm și una mult mai slabă la peste 220 nm. Este de remarcat faptul că s-au utilizat concentrații mult mai mari decât în cazul peptidei GW (figura 2.3.10). Aceste date au indicat că există posibilitatea unor măsurători eronate în cazul în care o astfel de peptidă este separată într-un instrument HPLC și determinată cantitativ la 220 nm. Tabelul II.3.2 reflectă mai bine această idee, deoarece din datele prezentate a rezultat că absorbția maximă a avut loc la 192 nm.

Tabelul II.3.2. Valorile absorbanței peptidei seril-glicină (SG) la diferite lungimi de undă și concentrații.

Lungimea de undă (nm)	Absorbanța (U.A.)						
Concentrația(μg/mL)	2,0	6,0	10,0	15,0	20,0	25,0	30,0
192	0,191	0,404	0,570	0,792	1,000	1,206	1,406
205	0,093	0,197	0,283	0,402	0,512	0,624	0,739
220	0,027	0,053	0,059	0,073	0,087	0,100	0,120

Cu valorile din tabelul II.3.2 s-au trasat curbe de etalonare ce pot fi utilizate la determinări cantitative ale acestei peptide aflate în soluțiile sale (figura II.3.12). Coeficienții de corelație foarte înalți au confirmat posibilitatea determinării sensibile a acestei peptide în special la 192 nm, iar la 205 nm poate fi de asemenea evaluată. Curbele de etalonare au fost liniare pe întregul interval de concentrații 2-30 μg/mL.

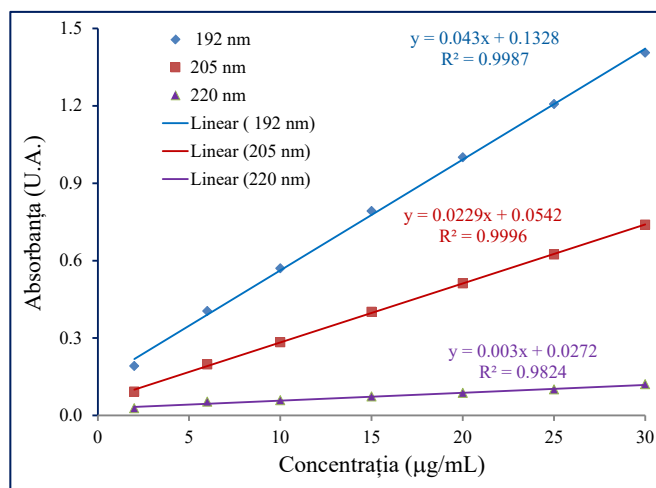


Figura II.3.12. Curbe de etalonare cu peptide seril-glicină în domeniul de concentrații 2,0-30,0 μg/mL la diferite lungimi de undă în ultraviolet.

Importanța acestui demers constă în faptul că se pot determina ușor concentrațiile și cantitățile foarte reduse ale unor peptide care nu absorb la lungimi de undă mai mari, cum ar fi λ 280 nm. Astfel, se poate afla concentrația acestora în soluții diluate, înainte de a fi utilizate în alte experimente.

II.4. STUDII SPECTROFOTOMETRICE ÎN DOMENIUL UV

Metodele spectrofotometrice pentru analiza proteinelor totale sunt, în general, simple, rapide și sensibile. Astfel de teste sensibile ale proteinelor pot avea aplicații în știința

criminalistică, în detectarea contaminanților proteici din medicamente și într-o serie de alte aplicații de interes pentru cercetare.

II.4.1. Studii spectrofotometrice în UV îndepărtat

În vederea îmbunătățirii metodologiei de determinare a proteinelor s-au realizat măsurători spectrofotometrice în domeniul UV pentru realizarea unor proceduri extrem de sensibile. Astfel, rezultatele au indicat faptul că este esențială purificarea înaltă a proteinelor și peptidelor înaintea măsurătorilor pentru obținerea unor valori corecte ale concentrațiilor.

De aceea, experimentul a fost repetat cu concentrații mai mari de BSA și anume în domeniul 0,005-0,100 mg/mL, pentru a surprinde mai bine diferențele între valorile A_{280} și A_{190} (figura II.4.2). Sensibilitatea mare a determinării proteinelor în UV îndepărtat a condus la valori supraunitare ale absorbției BSA. Rezultatele obținute indică clar marea sensibilitate a măsurătorilor în jurul valorii de 190 nm, astfel încât se pot măsura concentrații de BSA sub 0,01 mg/mL. Din figura II.4.2 reiese și faptul că pe măsură ce concentrația proteinei crește, maximum de absorbție se deplasează spre valori ale lungimii de undă mai mari. Astfel, maximum benzii de absorbție pentru concentrația de 0,005 mg/mL BSA a fost la 190 nm (0.369 U.A.), pentru 0,02 mg/mL a fost găsit la 192 nm (1.383 U.A.), iar pentru 0,1 mg/mL la $\lambda = 200$ nm (2,605 U.A.).

Deoarece este cunoscută determinarea proteinelor la 205 nm, 214 nm și, respectiv, 220 nm, în ultimul caz când se utilizează instrumentele HPLC, s-a propus studiul absorbției proteinei BSA la aceste lungimi de undă. În primul rând, s-au comparat valorile absorbției BSA la 280 nm cu cele în jurul lungimii de undă de 190 nm. Astfel, dacă la 280 nm, 0,1 mg/mL BSA prezintă o absorbantă $A_{280} = 0,069$, la 200 nm absorbanta crește la $A_{200} = 2,605$ U.A., fiind de $2,605/0,069 = 37,75$ ori mai ridicată. În tabelul II.4.1 au fost trecute valorile absorbantei BSA la diferite lungimi de undă.

Tabelul II.4.1. *Valorile absorbantei BSA în domeniul ultraviolet, la diferite lungimi de undă.*

Lungimea de undă	Absorbanta (UA)			
	0,005 mg/mL	0,01 mg/mL	0,02 mg/mL	0,1 mg/mL
205 nm	0,151	0,296	0,631	2,468
214 nm	0,081	0,153	0,321	1,479
220 nm	0,062	0,111	0,233	1,078
280 nm	0,071	0,011	0,015	0,069

II.4.2. Absorbția proteinelor la 280 nm

Deoarece s-au studiat unele proteine pentru îmbunătățirea metodologiei de determinare cu ajutorul metodei biuretului, s-au trasat spectrele de absorbție UV-Viz, reținând numai domeniul reprezentativ 250-400, 450 nm (figura II.4.3).

Diferențe majore între valorile absorbanței acestor proteine în domeniul UV 250-300 nm au condus la concluzia că numai unele dintre acestea pot fi determinate astfel.

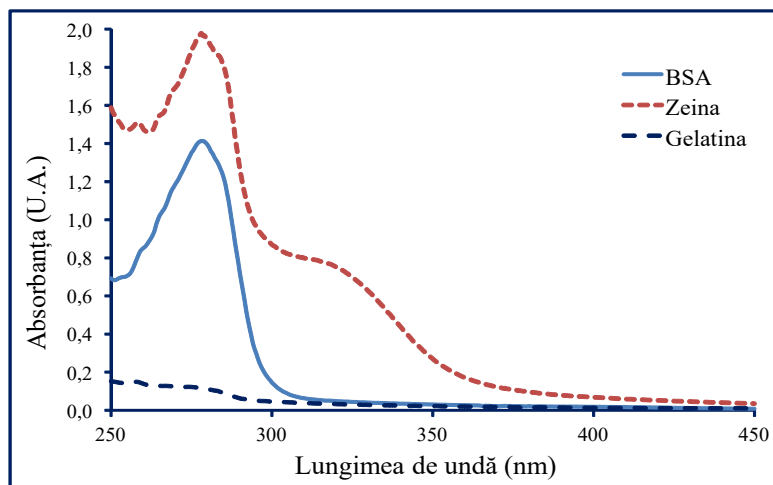


Figura II.4.3. Spectrele UV-Viz ale proteinelor BSA, zeină și gelatină (concentrația 2 mg/mL)

Din analiza celor trei spectre de absorbție în ultraviolet rezultă că zeina prezintă o absorbantă maximă la 278 nm (1,977 U.A., mult superioară absorbantei BSA (278,5 nm: 1,413 u.A.), ceea ce poate conduce la erori de determinare a concentrației. Pe de altă parte nu se cunoaște absorbanta compușilor colorați însoțitori pentru a elimina contribuția absorbantei acestora din valoarea absorbantei totale la 274 nm sau 278 nm.

II.4.4. Determinarea proteinelor în UV prin reacția biuretului

În acest experiment, s-au utilizat soluții apoase de BSA cu concentrația cuprinsă în domeniul 0-0,1 mg/mL. La 1 ml soluție de BSA, s-au adăugat aproximativ 50 mg de pulbere de fosfat de cupru și 0,1 mL soluție KOH 2%. Sonicarea fiolelor Eppendorf cu amestecul de reacție a durat 15 min, după care acestea au fost centrifugate la numai 5000 rpm. S-au trasat spectrele UV-Viz în domeniul de lungimi de undă 190-690 nm, în cuve de cuarț cu drumul optic de 1 cm (figura II.4.4.). Proba martor (control, blank) absoarbe intens în domeniul 190-220 nm, iar raportarea spectrelor soluțiilor de BSA la spectrul probei martor realizată numai cu reactivii conduce la obținerea unor franjuri în acest domeniu (190-220 nm). De aceea, s-

a analizat numai domeniul 220-570 nm, pentru a surprinde atât absorbția biuretului în ultraviolet, cât și în domeniul vizibil la 540-550 nm. S-a remarcat o intensă absorbție a complexului biuret la 229 nm, fapt care nu a mai fost raportat până acum în literatură. De asemenea, benzile de absorbție au fost deosebit de înguste, mai ales la concentrații relativ mai mari ale BSA. Sensibilitatea determinărilor la 229 nm a fost deosebit de ridicată astfel încât la o concentrație de 0,1 mg/mL s-a găsit o absorbanță de 2,819 U.A. Spectrometrele moderne permit măsurători ale valorilor supraunitare ale absorbanței, fără erori, după cum rezultă din multiplele lucrări științifice recente (Chen și colab., 2009; Babakhanova și colab., 2022).

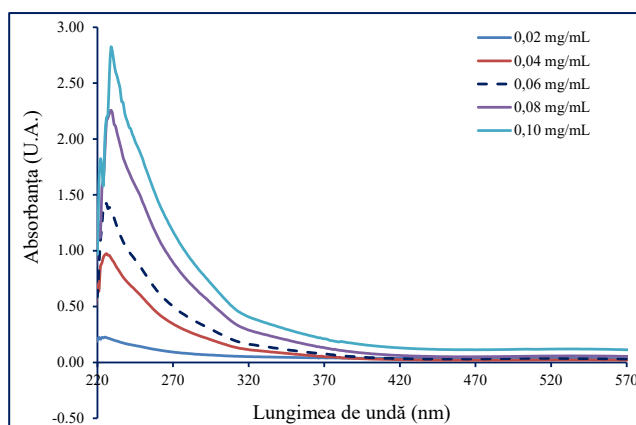


Figura II.4.4. Spectrele UV-Viz ale complexului biuret al BSA la diferite concentrații ale proteinei

Masa moleculară a BSA este de 66463 Da (aproximativ 66,5 kDa), iar coeficientul molar de extincție $43824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ la 279 nm. S-a calculat astfel coeficientul molar de absorbție al BSA în reacția biuretului cu citirea absorbanței la 229 nm, care a fost $1.873.591,97 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Această valoare a coeficientului molar în reacția biuretului a fost de 42,75 ori mai mare decât acela al BSA la 279 nm.

Dovada existenței complexului biuret este absorbția acestuia la 540 nm. Același complex absoarbe intens și la 229 nm (figura II.4.5). Astfel, deși valorile absorbanței biuretului la 545 nm au fost reduse ($C = 0,04 \text{ mg/mL}$, $A_{545} = 0,023 \text{ U.A.}$; $C = 0,08 \text{ mg/mL}$, $A_{545} = 0,058 \text{ U.A.}$), forma spectrului și existența unei benzi evidente cu un maxim la 545 nm au confirmat formarea complexului biuret chiar și la concentrații reduse.

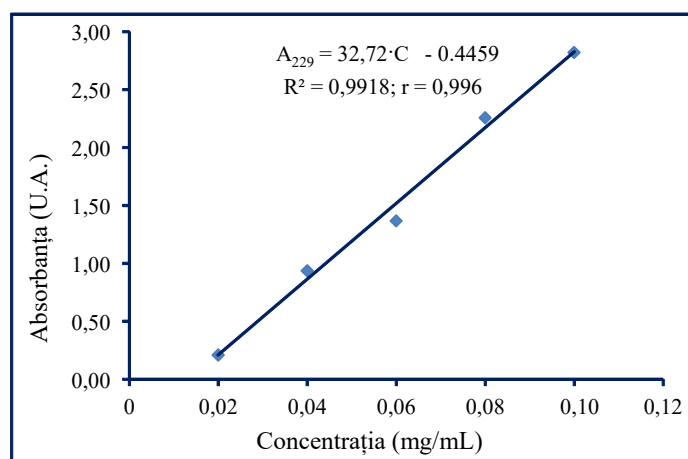


Figura II.4.5. Curba de calibrare în ultraviolet la 229 nm, realizată cu BSA cu concentrația 0,02-0,10 mg/mL

S-a studiat creșterea sensibilității metodei biuret prin citirea valorilor absorbantei la 229 nm, în loc de 545 nm și s-a constatat o creștere a valorilor absorbantei biuretilui la 229 nm. Raportul dintre valorile absorbantei biuretilui obținute la cele două concentrații de BSA (0,04 mg/mL și, respectiv, 0,08 mg/mL) a prezentat următoarele valori: $0,935/0,023 = 40,65$ și, respectiv, $2,257/0,058 = 38,9$ (reprezentarea spectrelor în figura II.4.6). Așadar, citirea valorilor absorbantei la 229 nm este de aproximativ 40 de ori mai sensibilă decât măsurarea absorbantei la 545 nm.

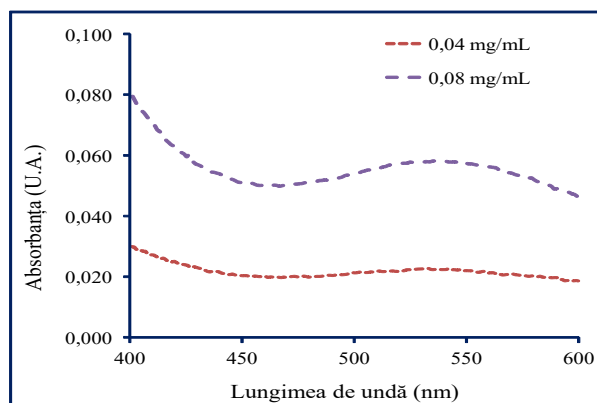


Figura II.4.6. Spectrele în vizibil ale soluțiilor de biuret ale BSA la concentrații 0,04 mg/mL și, respectiv, 0,08 mg/mL BSA.

II.5. REZULTATE OBȚINUTE. DETERMINAREA PROTEINELOR CU ACID SULFANILIC DIAZOTAT

Acidul sulfanilic are în molecula sa o grupare funcțională amino care poate fi diazotată, nu numai la 0-5°C, ci chiar la temperatura camerei. Cuplarea sării de diazoniu a

acidului sulfanilic cu doi aminoacizi, histidina și tirozina, existenți în moleculele proteinelor și peptidelor, conduce la formarea unor azoderivați de culoare galben-roșie, colorimetrabili.

II.5.1. Reacția tirozinei cu acidul sulfanilic diazotat

Inelul fenolic al tirozinei reacționează cu sarea de diazoniu, generând un compus azoic colorat. Absorbția acestuia a fost studiată spectrofotometric în domeniul UV-Viz. Deoarece tirozina are o reacție de cuplare cu acidul sulfanilic diazotat este posibilă cuantificarea tirozinei în soluțiile sale. Această reacție conduce la formarea unui compus azoic colorat, iar valorile absorbanței acestui compus sunt direct proporționale cu concentrația tirozinei.

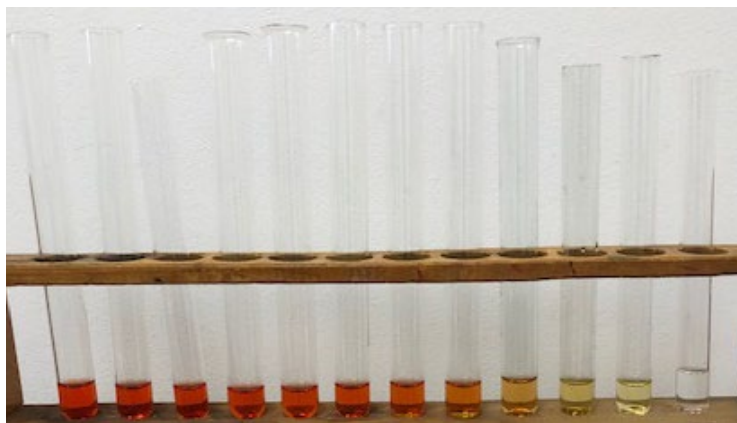


Figura II.5.2. *Reacția Pauly a tirozinei (concentrații 0-300 $\mu\text{g/mL}$) cu acidul sulfanilic diazotat.*

Pentru a deveni o metodă fiabilă, de pildă una pentru determinarea tirozinei și a peptidelor ce conțin acest aminoacid, trebuie studiate interferențele din partea altor substanțe cum ar fi fenolii și alți compuși care interferă în reacția Pauly. De aceea, în această lucrare a fost studiată doar posibilitatea de a determina spectrofotometric compușii care conțin tirozină în molecula lor, cum ar fi zeinele, proteinele din porumb solubile în alcool.

II.5.2. Reacția histidinei cu acidul sulfanilic diazotat

Histidina este un aminoacid ce conține un inel imidazolic, cu formula moleculară $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ și are masa molară M 155,15 g/mol. Inelul aromatic are un caracter bazic ce permite cuplarea acestuia cu o sare de diazoniu. Pentru realizarea reacției histidinei cu sarea de diazoniu a acidului sulfanilic, au fost preparate trei soluții după cum urmează: soluția 1 conține 350 $\mu\text{g/mL}$ acid sulfanilic cu 1 mL HCl 37% la 100 mL de soluție; soluția 2, având 300 $\mu\text{g/mL}$ NaNO_2 și soluția 3 conține 300 $\mu\text{g/mL}$ histidină în Na_2CO_3 8%. Acidul sulfanilic

s-a dizolvat ușor în prezența acidului clorhidric. Pentru a obține sarea de diazoniu la temperatura camerei, s-a pipetat prin picurare într-un mL soluție 1, un volum de 1mL soluție 2 și amestecul a fost supus agitării. Într-o serie de eprubete au fost pipetate câte 1 mL din soluția 3 cu concentrații cuprinse în domeniul 0-300 $\mu\text{g/mL}$, apoi s-au pipetat câte 1 mL din sarea de diazoniu (tabelul II.5.1). În timpul pipetării sării de diazoniu peste soluția de histidină s-a observat formarea unei soluții roșu-deschis, datorită azoderivatului format.

Tabel II.5.1 . Modul de lucru pentru obținerea amestecurilor utilizate la determinarea răspunsului colorimetric (spectral) la concentrații diferite de tirozină

Eprubeta	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Na_2CO_3 8%, mL	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,0
Tirozină, mL	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Sare diazoniu	1 mL										

S-a observat astfel obținerea unei colorații roșii cu intensități proporționale cu concentrațiile soluțiilor de histidină (figura II.5.6). Au fost citite apoi spectrele atât față de apă, cât și față de proba oarbă.



Figura II.5.6. Reacția Pauly a histidinei (concentrații 0-300 $\mu\text{g/mL}$) cu acidul sulfanilic diazotat.

II.5.3. Determinarea proteinelor cu acidul sulfanilic diazotat

Proteinele care conțin tirozină și/sau histidină reacționează cu acidul sulfanilic diazotat pentru a forma soluții colorimetrabile. Într-o primă etapă, s-a studiat realizarea spectrelor UV-Viz ale proteinelor, folosind BSA drept martor. Evident, în domeniul spectral sub 240 nm, proba oarbă a interferat puternic, însă, prin recurgerea la software-ul computerului, aceste erori pot fi eliminate, iar spectrele devin mult mai curate. Absorbția maximă a

coloranților azoici formați, în raport cu proba oarbă, a fost observată în zona de lungimi de undă 275-350 nm, adică în domeniul ultraviolet (figura II.5.7).

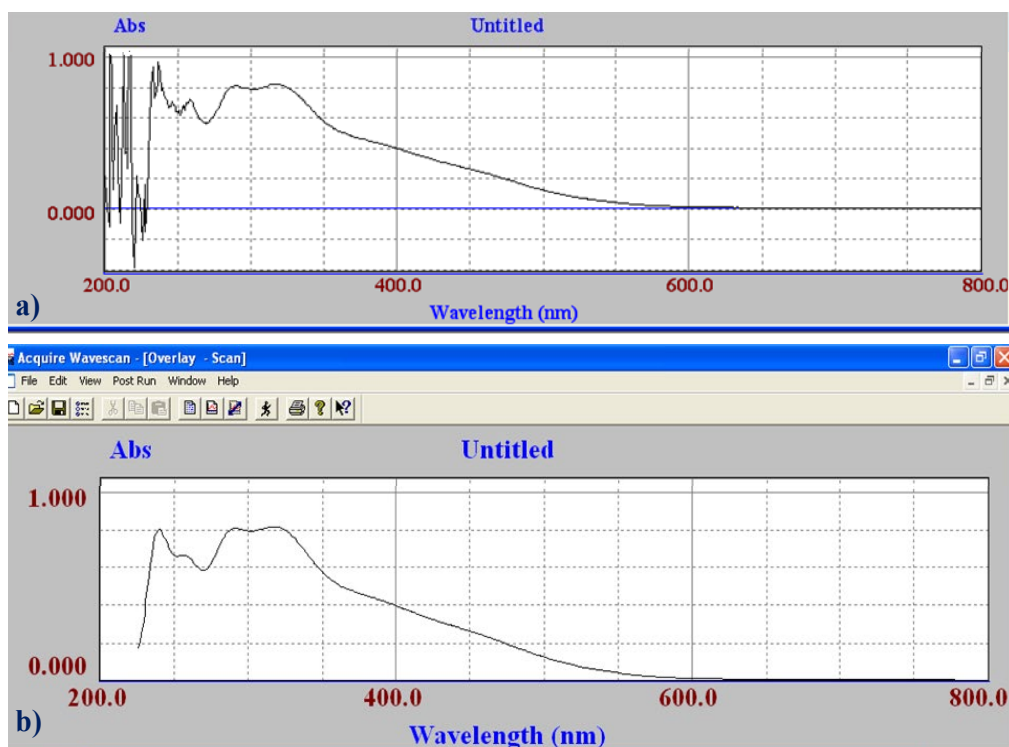


Figura II.5.7. *Spectrul UV-Viz al BSA tratată cu sarea de diazoniu a acidului sulfanilic: a) spectrul original în care se observă erorile produse de absorbția puternică a probei oarbe în UV îndepărtat; b) spectrul prelucrat electronic de software-ul spectrofotometrului care elimină automat erorile și îmbunătățește calitatea determinărilor.*

Spectrul de absorbție al BSA tratată cu soluții de sare de diazoniu a acidului sulfanilic a arătat că este posibilă măsurarea concentrației proteinelor în domeniul ultraviolet la 365 nm cu o mai mare sensibilitate decât în domeniul vizibil (figura II.5.9).

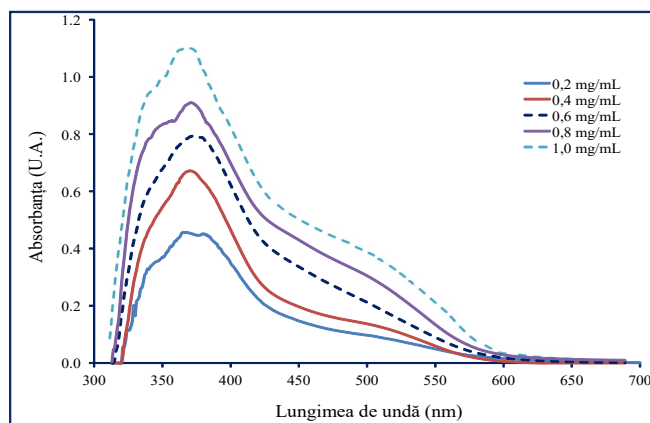


Figura II.5.9. *Spectrele de absorbție ale BSA tratată cu soluții de sare de diazoniu a acidului sulfanilic, concentrațiile proteinei fiind 0,2-1,0 mg/mL.*

De aceea, a fost construită o curbă de etalonare cu BSA în domeniul de concentrații 0,2-1,0 mg/mL la 365 nm (figura II.5.10). Dependența absorbantei de concentrație a fost liniară în domeniul de concentrații 0,2-1,0 mg/mL BSA, iar ecuația de regresie a fost: $A_{365} = 0,6812 \cdot C + 0,3746$ ($R^2 = 0,9892$; $r = 0,994$), unde A_{365} este valoarea absorbantei la 365 nm, iar C, concentrația BSA exprimată în mg/mL.

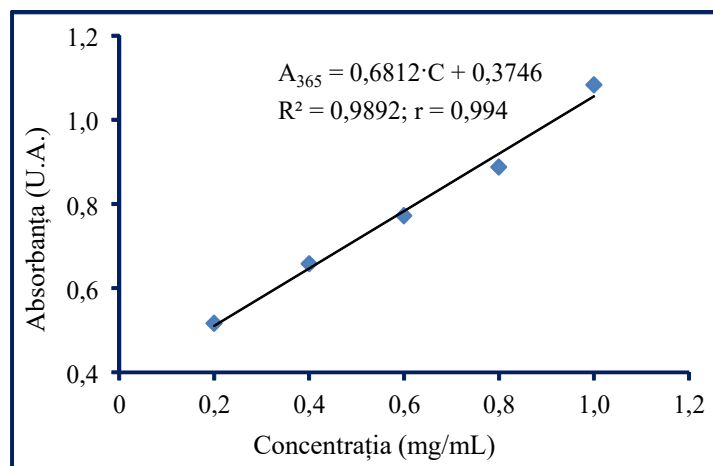


Figura II.5.10. Curba de etalonare la determinarea proteinelor cu acid sulfanilic diazotat.

II.6. FLUORIMETRIA

Metodele fluorimetrice de analiză prezintă avantajul unei sensibilități și selectivități ridicate, compușii putând fi determinați chiar la concentrații de 1-10 $\mu\text{g/mL}$. Inițial s-au determinat spectrele de emisie prin metoda fluorimetrică caracteristice peptidei protejate N-CBZ-S-benzil-L-cisteinil-L-tirozină (BCT) și aminoacidului L-tirozină.

Pentru a evidenția impactul ionilor de fier asupra fluorescenței peptidei s-au efectuat diferențele spectrale dintre măsurătorile de fluorescență efectuate în prezența și absența acestor ioni. Astfel s-a constatat o stingere a fluorescenței la lungimea de unde de emisie de 303 nm.

II.6.1. Studii de fluorescență 3D

Analog, s-a preparat o soluție 18 μM de peptidă N-CBZ-S-benzil-L-cisteinil-L-tirozină astfel: într-o cuvă de cuarț s-a transferat un volum de 96 μL soluție de peptidă de concentrație 0,187 mM, 4 μL apă distilată și 900 μL tampon de acetat de sodiu la pH 7.

În continuare s-a trasat spectrul de fluorescență (figura II.6.4) în domeniul de excitare 250 nm-490 nm și emisie între 260 nm-500 nm, proba de referință fiind un amestec de 100

μL apă distilată și 900 μL tampon de acetat de sodiu la pH 7. Din spectrul 3D s-a observat doar un maxim de emisie situat la perechea spectrală $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}}$ 275 nm / 301 nm.

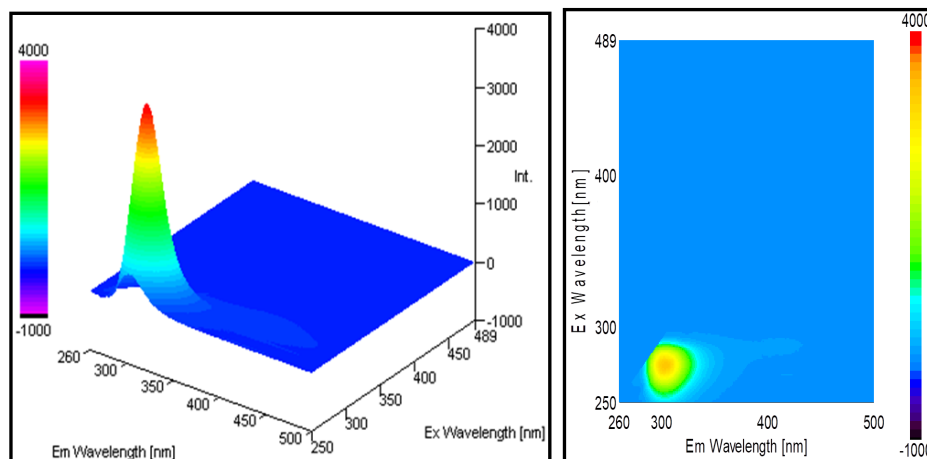


Figura II.6.4. *Spectrul de emisie în 3D (stânga) al peptidei N-CBZ-S-benzil-L-cisteinil-L-tirozină la o concentrație de 18 μM și spectrul de proiecție (dreapta) în soluție tampon acetat 45 mM pH 7,0.*

Analog s-a trasat spectru 3D al tirozinei, o soluție 7 μM în tampon acetat la pH 7 în același domeniu spectral de excitație și emisie.

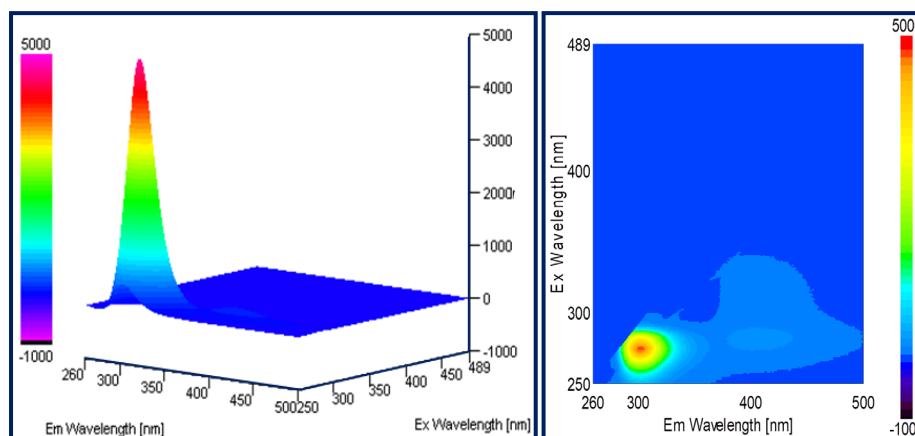


Figura II.6.5. *Spectrul de emisie în 3D (stânga) al L-tirozinei la o concentrație de 7 μM și spectrul de proiecție (dreapta) în soluție tampon acetat 45 mM pH 7,0.*

II.6.2. Efectul ionilor de cupru

S-au realizat măsurători de fluorescență folosind peptida N-CBZ-S-benzil-L-cisteinil-L-tirozină dizolvată în tampon acetat la adăugarea ionilor de Cu^{2+} . Astfel, în vederea acestei determinări, s-a utilizat o soluție diluată de peptidă (4.5 μM) și s-au modificat parametrii de achiziție astfel încât excitarea a avut loc în domeniul 200 nm-370 nm, iar emisia a fost înregistrată în intervalul cuprins între 210 nm și 380 nm, proba de referință fiind aceeași. Soluția de peptidă diluată a fost preparată astfel: 24 μL peptidă de concentrație

0,187 mM, 76 μL apă distilată și 900 μL tampon acetat de sodiu 50 mM cu pH 7. Figura II.6.6 prezintă spectrul de emisie fluorescentă în 3D a peptide diluate corespunzător.

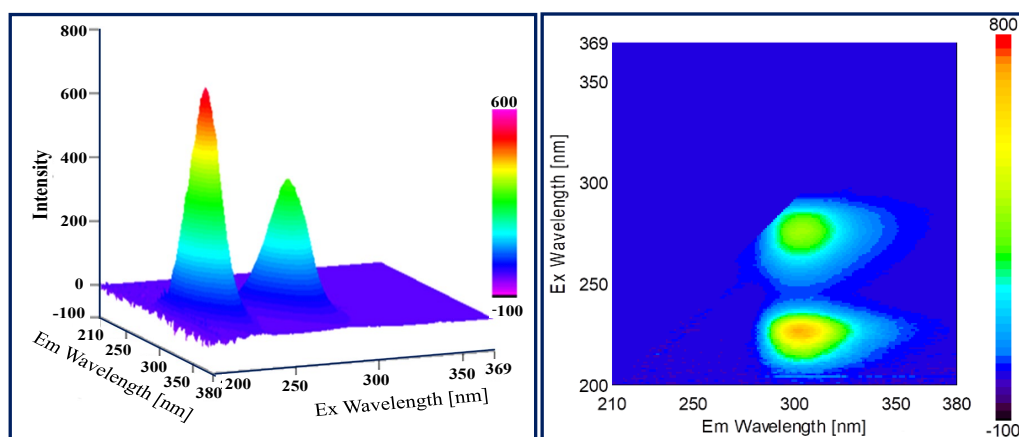


Figura II.6.6. *Spectrul de emisie fluorescentă în 3D a peptidei (4.5 μM , stînga) și reprezentarea proiecției acestuia (dreapta) în tampon de acetat de sodiu 45 mM cu pH 7.*

La adăugarea ionilor de cupru s-a observat o ușoară modificare a intensității fluorescenței. Creșterea intensității fluorescenței poate fi pusă pe seama complexării ionilor de cupru de către atomul de sulf din peptidă fapt care ar determina o stingere intermoleculară mai puțin pronunțată a fluorescenței restului fenolic, caracteristic tirozinei, de către atomii de sulf din moleculele de peptidă adiacente (figura II.6.7).

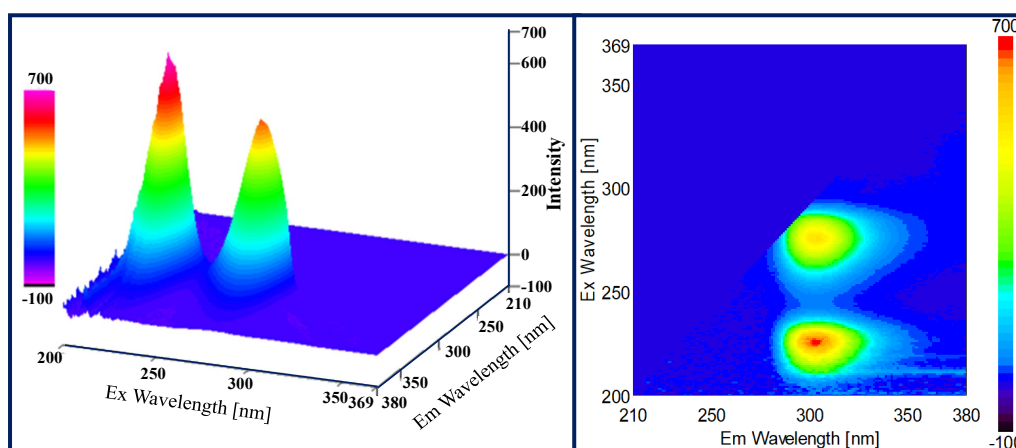


Figura II.6.7. *Spectrul de emisie al fluorescenței în 3D (stînga) și de proiecție (dreapta) pentru peptida N-CBZ-S-benzil-L-cisteinil-L-tirozină (4.5 μM) la adăugarea ionilor de Cu^{2+}*

Concluzia ce se poate extrage din aceste măsurători de fluorescență este că ionii metalelor grele, cum ar fi de exemplu cuprul influențează stingerea fluorescenței.

II.6.3. Determinări fluorimetrice comparative între tirozină și peptidă

S-au efectuat măsurători de fluorescență, citite atât sub formă de spectre de fluorescență, cât și în 3D, domeniul de excitare fiind 250 nm-490 nm, iar domeniul de emisie 260 nm-500 nm. Atât pentru tirozină, cât și pentru peptidă au fost efectuate măsurători de fluorescență folosind spectrofluorimetrul Jasco 8350 (Japonia). Rezultatele obținute se pot observa în figura II.6.8. Deși concentrația tirozinei a fost mai mare 5,5 μM , intensitatea fluorescenței peptidei BCT a fost mai ridicată (figura II.6.8). Această comportare poate fi atribuită prezenței grupărilor protectoare carboxibenzoil (Cbz) și benzil din această moleculă care pot induce o creștere a intensității semnalului fluorescenței.

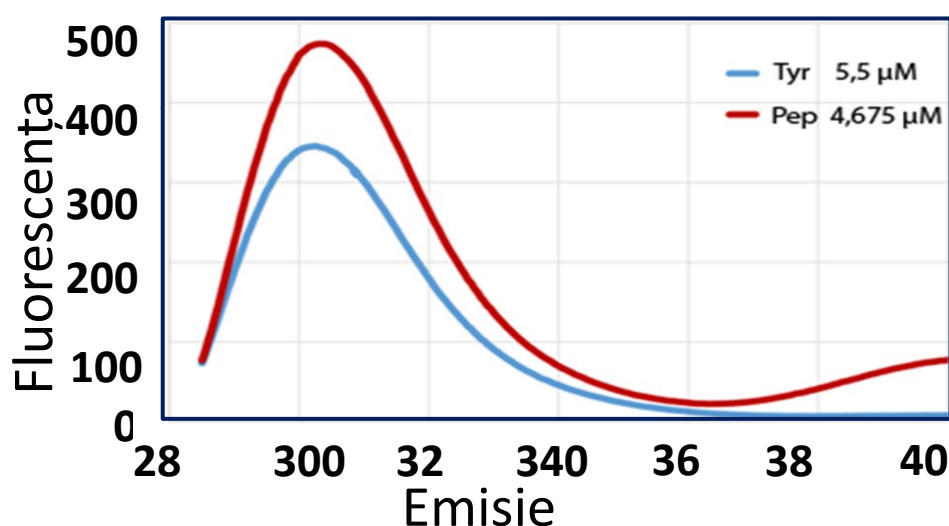


Figura II.6.8. Spectre de emisie pentru tirozina (5,5 μM , albastru) și peptidă (4,7 μM , roșu) în tampon acetat 45 mM pH 7,0.

II.6.4. Fluorimetria în studiul zeinelor

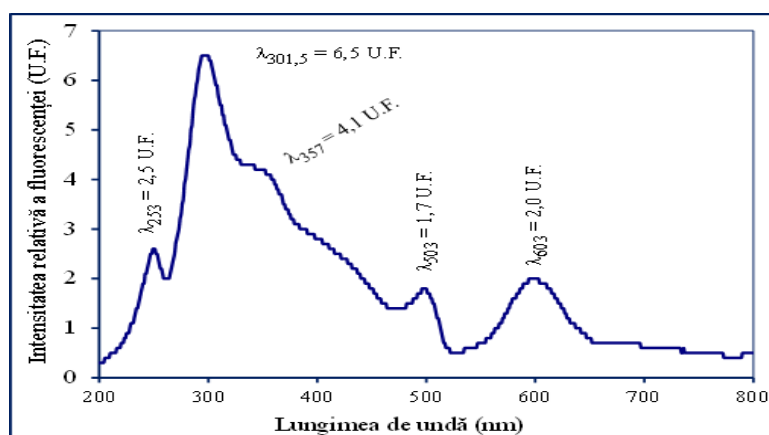


Figura II.6.9. Spectrul de fluorescență a unei soluții alcoolice (70%) de zeină (excitație la 250 nm, emisie în domeniul 200-800 nm).

Zeinele sunt proteine de rezervă din surse vegetale. Deoarece zeinele se pot obține în stare aproape pură în extractele alcoolice s-a studiat comportarea fluorimetrică în vederea cuantificării acestor proteine. Pentru aceasta s-au realizat spectre având diferite lungimi de undă de excitație. Astfel, utilizarea unei lungimi de undă de excitație la 250 nm a condus la o slabă fluorescență a zeinei, după cum era de așteptat, deși în molecula α -zeinei se află nouă resturi de fenilalanină (figura II.6.9). Din această figură se observă însă câteva benzi de fluorescență, începând cu semnalul minor de la 253 nm datorat probabil dispersiei luminii UV care a fost absorbită la 250 nm

Deși de intensitate relativ redusă, cea mai importantă bandă de emisie fluorescentă a fost observată la 301 nm (6,5 unități de fluorescență), în timp ce a fost remarcat și un umăr la 357 nm de 4,1 U.F. Două semnale de intensitate mai mică a emisiei au fost observate la $\lambda = 503$ nm respectiv $\lambda = 603$ nm. Ultimul semnal poate fi atribuit în mod clar și efectiv fluorescenței zeinelor datorată resturilor de fenilalanină analog celui care se regăsește și la 301,5 nm. Această ultimă bandă se datorează tranziției electronice de pe nivelul superior de excitare, pe unul inferior, iar de pe acesta, direct pe nivelul corespunzător stării fundamentale (emisie la 301,5 nm) sau în două trepte (emisie a două cuante de lumină cu $\lambda = 603$ nm). În figura II.6.11 se remarcă alături spectrului de fluorescență al aceleiași soluții de zeină, însă supusă excitației la o lungime de undă de 280 nm.

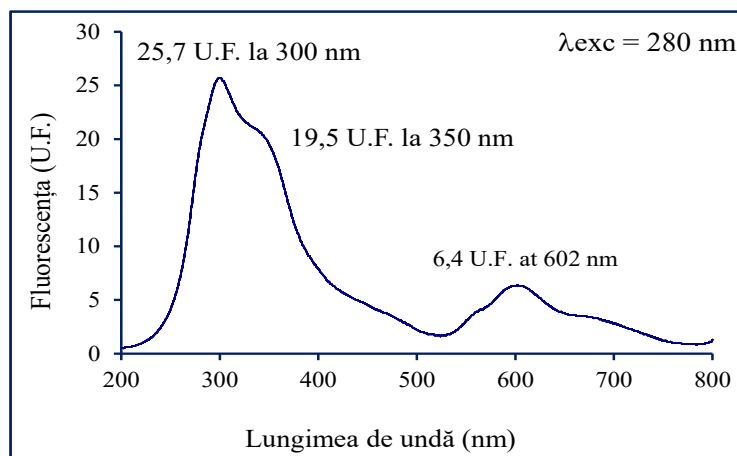


Figura II.6.11. Spectrul de fluorescență a unei soluții de zeină excitată la 280 nm.

În figura II.6.12 a fost inclus spectrul de fluorescență al soluției de zeină la care excitarea a fost realizată la lungimea de undă de 260 nm. Umărul de la $\lambda_{263} = 8,3$ U.F. poate fi fost caracteristic dispersiei radiației de excitare. Teoretic, emisia tirozinei este la 301 nm. Maximul de emisie a fost însă observat la 296 nm (intensitatea relativă 21,1 U.F.), în timp

ce la 301 nm această intensitate a scăzut la 96,2% din aceea maximă (20,3 U.F.). Suplimentar, s-a observat un umăr specific de la 350 nm (10,3 U.F.) și cel de la 598 nm (5,8 U.F.). Era de așteptat ca această ultimă lungime de undă menționată să reprezinte dublul celei corespunzătoare maximului principal.

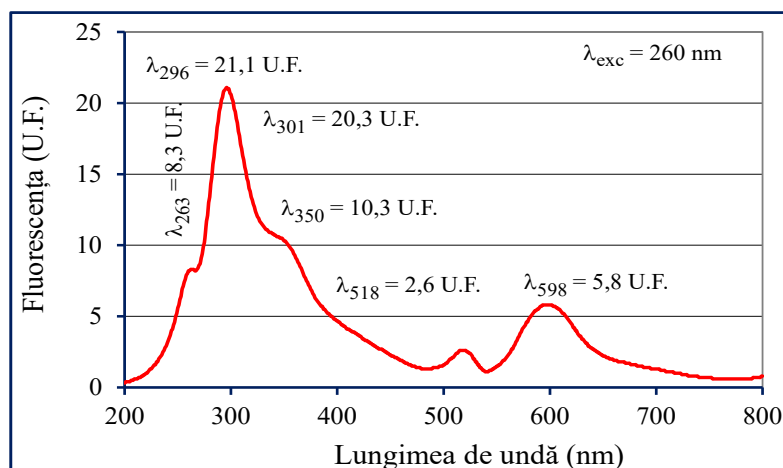


Figura II.6.12. *Spectrul de fluorescență a unei soluții de zeină excitată la 260 nm.*

Metodele fluorimetrice se bazează pe măsurarea emisiei de lumină de către proteine și peptide în urma excitării cu o lungime de undă specifică. Aceste metode sunt sensibile și selective, furnizând informații despre structura și interacțiunile moleculare ale proteinelor și peptidelor în special în soluție. Deoarece zeinele conțin resturi de tirozină în moleculele lor, iar acestea au capacitatea de a emite cuante de lumină la lungimea de undă de 300 nm, dacă excitarea se face la mai multe lungimi de undă, atunci acestea se pot determina cantitativ nu numai la o singură lungime de undă de excitare, de pildă la 274,2 nm, ci la această lungime, concomitent și la altele pentru a elimina, pe cât posibil, interferențele.

CONCLUZII GENERALE

În această teză de doctorat cu titlul "Metode rapide și sensibile de determinare a proteinelor și peptidelor" au fost studiate și îmbunătățite metodele de determinare a proteinelor și peptidelor. Astfel, s-a urmărit îmbunătățirea metodologiei de determinare a proteinelor și peptidelor cu metode bioanalitice ieftine, robuste, rapide și sensibile. Au fost propuse noi tehnici spectrofotometrice UV-*Viz* și fluorescente de determinare a proteinelor, peptidelor și aminoacizilor componenți ai acestora în comparație cu metodele de referință descrise în literatura de specialitate. Determinarea proteinelor cu noile metode a fost

comparată cu o metodă standardizată, și anume metoda micro-Kjeldahl care măsoară conținutul de azot din probele de cercetat sau cu valorile metodelor spectrofotometrice cunoscute.

Cercetările realizate în perioada studiilor doctorale au condus și la o mai bună înțelegere a interacțiunilor ionilor de cupru cu proteinele, în vederea găsirii unor aplicații în analiza chimică a proteinelor.

Studiul metodelor rapide și sensibile de determinare a proteinelor și peptidelor a condus la concluzii experimentale referitoare la găsirea unor noi modalități de lucru și s-a concentrat pe următoarele direcții:

1). *Îmbunătățirea metodologiei de determinare a proteinelor cu metoda biuretului*

Au fost studiate condițiile de reacție ale proteinelor cu ionii de cupru și s-a evidențiat faptul că înlocuirea reactivului cu sulfat de cupru și tartrat dublu de sodiu și potasiu conduce la îmbunătățirea stabilității, rapidității și, mai ales a sensibilității determinărilor cu metoda biuret.

A fost studiată formarea complexului biuret și absorbția sa în ultraviolet și s-a demonstrat că acesta este stabil numai în mediu alcalin, însă se descompune ușor în mediu acid și chiar prin diluare cu apă, deoarece diluarea soluției ce conține acest complex conduce la descompunerea sa.

Interferența aminoacizilor în metoda biuret propusă în această teză a fost studiată în domeniul vizibil. S-a constatat că histidina interfere puternic, în timp ce alți aminoacizi, precum triptofanul au prezentat o slabă interferență. S-a mai constatat că aminoacizii formează complecși cu maxime de absorbție diferite, astfel încât interferența aceluiași aminoacid la 545 nm poate fi diferită de aceea la 560 nm.

2). *Studiul determinării proteinelor utilizând reacția acestora cu sarea de diazoniu a acidului sulfanilic*

A fost studiată reacția Pauly utilizând sare de diazoniu a acidului sulfanilic (SA) și aminoacizii tirozină și histidină. S-a constatat că acești aminoacizi formează compuși azoici ce absorb atât în domeniul vizibil, cât și în ultraviolet.

A fost studiată reacția Pauly cu proteinele și s-a constatat că există un domeniu larg de lungimi de undă unde azoderivații formați absorb relativ intens, inclusiv în domeniul ultraviolet.

A fost propusă o metodă de determinare a proteinelor bazată pe reacția Pauly, în care curbele de etalonare se trasează cu proteinele de analizat.

3). *Determinarea proteinelor în ultraviolet.*

Spectrele în domeniul ultraviolet ale peptidelor și proteinelor au prezentat maxime de absorbție, caracteristic legăturilor peptidice. Peptidele și proteinele având în molecule resturi de aminoacizi aromatici prezintă un maxim de absorbție specific la 274-280 nm.

Au fost cercetate metodele de determinare a proteinelor în UV îndepărtat și s-a constatat că este necesară purificarea acestora, altfel apar erori datorită multiplelor interferențe. Purificarea se poate realiza cu acid tricloracetic (TCA) după metodele recomandate în literatură, iar separările prin HPLC permit astfel de determinări.

4). *Studiul determinării peptidelor cu metode spectrofotometrice sensibile, rapide și selective atât în domeniul UV, cât și Viz, fie prin măsurători directe sau prin derivații rezultați din reacțiile chimice ale peptidelor.*

Glutationul, o tripeptidă cu rol de protecție în celulele vii, a fost determinat cu metoda biuretului propusă în această lucrare atât în domeniul vizibil, cât și în ultraviolet la 228 nm. Sensibilitatea măsurătorilor la 228 nm a fost de circa 44 ori mai mare în domeniul UV decât în domeniul vizibil.

O altă peptidă model, având 10 resturi aminoacide în moleculă și o înaltă capacitate de legare a ionilor de cupru, a fost luată în studiul legării ionilor de cupru la peptide la diferite valori de pH. S-a constatat că această peptidă leagă puternic ionii de cupru atât datorită grupării sulfhidrilice, cât și datorită aminoacizilor cu capacitate de legare de astfel de ioni. Însă, creșterea intensității absorbției complexului format de P10 cu ionii Cu^{2+} a fost mai mare cu creșterea pH-ului soluției rezultate.

Au fost studiate mai multe peptide între care peptida N-CBZ-S-benzil-L-cisteinil-L-tirozină (BCT) și seril-glicina sau glicil-triptofanul. S-a constatat că fiecare dintre toate aceste peptide pot fi determinate în UV, la diferite lungimi de undă, pentru fiecare este necesar să se întocmească curba de etalonare și să se calculeze coeficientul molar de absorbție.

5). *Studiile fluorimetrice au vizat atât peptidele cât și proteinele și, în special, zeinele.*

Intensitatea fluorescenței unor peptide, aminoacizi și proteine a fost măsurată pentru a găsi posibilități de evaluare a concentrației compușilor peptidici. Cercetarea peptidei N-CBZ-S-benzil-L-cisteinil-L-tirozină (BCT) a indicat faptul că fluorescența sa nu este influențată semnificativ de celelalte resturi aminoacide sau grupări protectoare, însă este influențată de diverși contaminați ai soluției sale, cum ar fi fericianura de potasiu și ionii de cupru.

Zeinele pot fi determinate fluorimetric datorită prezenței în molecula lor a unui număr relativ mare de resturi de tirozină, în ciuda absenței celor de triptofan și obținerii lor în stare pură prin extracție cu soluții alcoolice. Deoarece zeina conține resturi de tirozină în moleculă, iar acestea emit în jurul valorii de 300 nm, se poate realiza excitarea la mai multe lungimi de undă, pentru a elimina, pe cât posibil, interferențele. Cea mai intensă fluorescență a fost observată la 270 nm, ceea ce a sugerat că determinarea fluorimetrică a zeinelor ar trebui făcută la această lungime de undă.

6). *Determinarea unor probe reale.*

Studiile realizate în cadrul tezei de doctorat au condus la concluzia că este posibil să se determine proteinele, dar și aminoacizii componenți de interes în aceeași soluție, după o singură cântărire a materialului analizat. Metodele propuse sunt simple, cu costuri reduse și oferă rezultate fiabile pentru determinarea sensibilă, selectivă și rapidă a proteinelor și peptidelor în diverse medii biologice.

Validarea metodelor propuse a fost realizată în conformitate cu standardele internaționale pentru selectivitate, linearitate, acuratețe, precizie, robustețe, limită de detecție și limită de cuantificare (Araujo, 2009; Sahoo și colab., 2018).

În urma cercetărilor realizate s-au obținut date de cercetare care au permis atât îmbunătățirea metodologiei de determinare a proteinelor și peptidelor, cât și publicarea lor în reviste internaționale cu factor de impact și susținere la conferințe naționale și internaționale. Astfel, au fost publicate sau acceptate la publicare trei lucrări științifice cu factor de impact (două dintre acestea fiind deja publicate). De asemenea, au fost publicate două lucrări științifice în volumele conferințelor internaționale, iar altele au fost susținute la conferințe naționale și internaționale fiind publicate numai sub formă de rezumat.

Totodată, în afara noilor metode elaborate și prezentate în această teză de doctorat, au fost perfecționate metodele analitice existente de determinare a peptidelor și proteinelor și, mai mult, s-a urmărit îmbunătățirea sensibilității determinărilor și lărgirea domeniului de concentrații cu ajutorul spectrofotometrelor și spectrofluorimetrelor moderne. Astfel, acestea permit determinări în domeniul UV îndepărtat, iar spectrele pot fi prelucrate direct pe instrumentele respective pentru îmbunătățirea calității spectrelor (engl. smoothing, îndepărtarea asperităților), iar datele pot fi prelucrate în Excel.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- ❖ Babakhanova, G., Zimmerman, S. M., Pierce, L. T., Sarkar, S., Schaub, N. J., Simon Jr, C. G. **2022**. Quantitative, traceable determination of cell viability using absorbance microscopy. *PLoS One*, 17(1), e0262119.
- ❖ Bancila, S., Ciobanu C. I., Murariu, M., Drochioiu, G. **2016**. Ultrasound-assisted zein extraction and determination in some patented maize flours. *Rev. Roum. Chim.*, 61(10), 725-731.
- ❖ W., Lea, J. M. **2017**. Chemical and nutritional properties of channel and hybrid catfish byproducts. *Food Sci. Nutr.*, 5(5), 981-988.
- ❖ Buric, F., Viknander, S., Fu, X., Lemke, O., Carmona, O. G., Zrimec, J., Zelezniak, A. **2025**. Amino acid sequence encodes protein abundance shaped by protein stability at reduced synthesis cost. *Protein Science*, 34(1), e5239.
- ❖ Darie-Ion, L., Drochioiu, G., Pui, A., **Mihalcea, E.**, Gradinaru, V. R. **2021**. Zein conjugates of biomedical interest: synthesis and characterization by MALDI-ToF mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 21(6.1), 155-162.
- ❖ Darie-Ion, L., Jayathirtha, M., Hitruc, G. E., Zaharia, M. M., Gradinaru, R. V., Darie, C., Pui, A., Petre, B. A. **2021**. A proteomic approach to identify zein proteins upon eco-friendly ultrasound-based extraction. *Biomolecules*, 11(12), 1838.
- ❖ Downard, K. M., Cody, R. B. **2024**. Amino acid composition determination from the fractional mass of peptides. *J. Mass Spectrom.*, 59(10), e5089.
- ❖ Drochioiu, G., **Mihalcea, E.**, Lagobo, J., Ciobanu, C. I. **2024**. Rapid tryptophan assay as a screening procedure for quality protein maize. *Molecules*, 29, 4341.
- ❖ Drochioiu, G., **Mihalcea, E.**, Lagobo, Z. C., Gradinaru, R. V. **2023**. Simultaneous determination of protein and two essential amino acids in maize. 2. Int. Paris Congr. Med. Health Sci. October 24-26, 2023, Paris.
- ❖ Drochioiu, G., Ciobanu, C. I., Bancila, S., Ion, L., Petre, B. A., Andries, C., Gradinaru, R. V., Murariu, M. **2016**. Ultrasound-based protein determination in maize seeds. *Ultrason. Sonochem.*, 29, 93–103.
- ❖ Drochioiu, G., Murariu, M., Petre, B. A., Manea, M., Przybylski, M. **2007**. Synthesis and characterization of a nonapeptide with specific Cu-binding properties. *Rev. Chim. (Bucharest)*, 58(3) 311-315.

- ❖ East, K. W., Skeens, E., Cui, J. Y., Belato, H. B., Mitchell, B., Hsu, R., Lisi, G. P. **2020**. NMR and computational methods for molecular resolution of allosteric pathways in enzyme complexes. *Biophys. Rev.*, 12(1), 155-174.
- ❖ Er, E. Ö., Özbek, B., Bakırdere, S. **2021**. Determination of seventeen free amino acids in human urine and plasma samples using quadruple isotope dilution mass spectrometry combined with hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1641, 461970.
- ❖ Gradinaru, R., Murariu, M., Dragan, E. S., Drochioiu, G. **2007**. Protein determination based on the biuret absorption in the UV range and copper binding to peptides. *Rom. Biotech. Lett.* 12(3) 3235-3239.
- ❖ Gregersen Echters, S., Abdul-Khalek, N., Mikkelsen, R. K., Holdt, S. L., Jacobsen, C., Hansen, E. B., Overgaard, M. T. **2022**. Is Gigartina a potential source of food protein and functional peptide-based ingredients. Evaluating an industrial, pilot-scale extract by proteomics and bioinformatics. *Future Foods*, 6, 100189.
- ❖ Grothoff, W., Khodakivskyi, I., Shin, A., Little, R., Connolly, S., Kabytaev, K. **2025**. MRM-based LC-MS method for accurate C-peptide quantitation. *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab.* 36, 1-8.
- ❖ Guo, J., Zhou, H. X. **2016**. Protein allostery and conformational dynamics. *Chem. Rev.*, 116(11), 6503-6515.
- ❖ Hamada, J. S. **2000**. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *J. Food Sci.*, 65, 305–310.
- ❖ Hamley, I. W. **2020**. *Introduction to peptide science*. John Wiley & Sons, pp. 2-32.
- ❖ Han, S. W., Chee, K. M., Cho, S. J. **2015**. Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chem.*, 172, 766-769.
- ❖ Hansen, D. B., Joullié, M. M. **2005**. The development of novel ninhydrin analogues. *Chem. Soc. Rev.*, 34(5), 408-417.
- ❖ Iyer, S. S., Chen, F., Ogunmolu, F. E., Moradi, S., Volkov, V. A., van Grinsven, E. J., Akhmanova, A. **2025**. Centriolar cap proteins CP110 and CPAP control slow elongation of microtubule plus ends. *J. Cell Biol.*, 224(3), e202406061.
- ❖ Janairo G., Linley M. S., Yap L., Llanos-Lazaro, N., Robles, J. **2011**. Determination of the sensitivity range of biuret test for undergraduate biochemistry experiments, *e –J. Sci. Technol.*, 5(6), 77-83.
- ❖ Ji, T. H. **1973**. Interference by detergents, chelating agents, and buffers with the Lowry protein determination. *Anal. Biochem.*, 52(2), 517-521.

- ❖ Jiang, L., Hea, L., Fountoulakis, M. **2004**. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J. Chromatogr. A* 1023, 317–320.
- ❖ Jureschi, M. **2020**. Peptide amiloidice: sinteză, caracterizare și aplicații biomedicale. Teză de doctorat, UAIC Iași.
- ❖ Kaliszewska, A., Struczyński, P., Bączek, T., Niedźwiecki, M., Konieczna, L. **2025**. Comprehensive Analysis and Comparison of Amino Acid Levels in Cerebrospinal Fluid and Plasma of Children with Leukemia by the LC-MS Technique. *Int. J. Mol. Sci.*, 26(5), 1888.
- ❖ Kothe, U. **2010**. Recent progress on understanding ribosomal protein synthesis. In *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier, Amsterdam, Olanda, pp. 353–382.
- ❖ Lupaescu, A. **2020**. Analogi ai peptidei neuroprotectoare NAP: sinteză, caracterizare și interacțiune cu ionii metalici. Teză de doctorat, UAIC Iași.
- ❖ Manthei, D. M., Keren, D. F. **2024**. Clinical indications and applications of serum and urine protein electrophoresis. *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*, 1, 43-61.
- ❖ Manzoor, M., Singh, J., Ray, A., Gani, A. **2021**. Recent advances in analysis of food proteins. *Food biopolymers: Structural, functional and nutraceutical properties*, 269-298.
- ❖ Marshall, T., Williams, K. M. **2000**. Total protein determination in urine: elimination of a differential response between the Coomassie blue and pyrogallol red protein dye-binding assays. *Clin. Chem.*, 46(3), 392-398.
- ❖ Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., Gómez-Ruiz, J. Á. **2012**. Extraction/fractionation techniques for proteins and peptides and protein digestion. In *Proteomics in foods: principles and applications*. Boston, MA: Springer US, pp. 21-49.
- ❖ McCaldin, D. J. **1960**. The chemistry of ninhydrin. *Chem. Rev.*, 60(1), 39-51.
- ❖ McGrath, R. **1972**. Protein measurement by ninhydrin determination of amino acids released by alkaline hydrolysis. *Anal. Biochem.*, 49, 95-102.
- ❖ Means, G. E., Feeney, R. E. **1990**. Chemical modifications of proteins: history and applications. *Bioconjugate Chem.*, 1(1), 2-12.
- ❖ Meyer, V. R. (2010). *Practical high-performance liquid chromatography*. John Wiley & Sons.
- ❖ Mihalcea, E., Drochioiu, G., Jitaru, S. C., Mangalagiu, V., Gradinaru, R.V. **2022**. Protein and peptide determination based on the modified biuret procedure: implications

for various biotechnologies. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 22(6.1), 113-120. DOI: 10.5593/sgem2021/6.1/s25.38

- ❖ **Mihalcea, E.**, Enache, A. C., Grădinaru, R. V., Drochioiu, G. **2024**. Simultaneous determination of protein and essential amino acids in biological samples. *Acta Chemica Iași*, 32(1), 1-12.
- ❖ **Mihalcea, E.**, Drochioiu G. **2025**. Improved protein assay based on the biuret reaction: interference of proteinogenic amino acids. *Rev. Roum. Chim.*, acceptable.
- ❖ Minkiewicz, P., Dziuba, J., Darewicz, M., Iwaniak, A., Dziuba, M., Nalecz, D. **2008**. Food peptidomics. *Food Technol. Biotechnol.*, 46, 1–10.
- ❖ Mir, S. A. **2011**. Resorcinol method for colorimetric microdetermination of copper in pure forms. *Int. J. ChemTech Res.*, 3(2), 661-670.
- ❖ Miranda, M. P. **2024**. Comparison of the effect of sodium chloride concentration on protein determination: Bradford and Biuret methods. *Anal. Biochem.*, 687, 115450.
- ❖ Mocanu, C. S., Jureschi, M., Drochioiu, G. **2020**. Aluminium binding to modified amyloid- β peptides: Implications for alzheimer's disease. *Molecules*, 25(19), 4536.
- ❖ Mocanu, C. S., Darie-Ion, L., Petre, B. A., Gradinaru, V. R., Drochioiu, G. **2022**. A computational study of metal ions interaction with amyloid- β 1–42 peptide structure in hyperpyrexia: Implications for Alzheimer disease. *J. King Saud University-Science*, 34(6), 102184.
- ❖ Mostovenko, E., Hassan, C., Rattke, J., Deelder, A. M., van Veelen, P. A., Palmblad, M. **2013**. Comparison of peptide and protein fractionation methods in proteomics. *EuPA Open Proteomics*, 1, 30-37
- ❖ Mousavizadeh, F. S., Sarlak, N. **2023**. A sensitive dual mode turn-on fluorescence and colorimetric nanosensor for ultrasensitive detection of trace amount of gluten proteins in bread products based on crystalline nano cellulose and gold nanoparticles. *Spectrochim. Acta A*, 287, 122095.
- ❖ Murariu, M., Dragan, E. S., Drochioiu, G. **2007**. Synthesis and mass spectrometric characterization of a metal-affinity decapeptide: copper-induced conformational alterations. *Biomacromolecules*, 8(12) 3836-3841.
- ❖ Murariu, M., Irimia, M., Aelenei, N., Drochioiu, G. **2003**. Spectrophotometric assay of amino acids in biological materials. *Bull. Inst. Polit. Iasi*, 48(f.1-2) 219-225.
- ❖ Park, Y., Metzger, B. P., Thornton, J. W. **2024**. The simplicity of protein sequence-function relationships. *Nature Commun.*, 15(1), 7953.
- ❖ Peters, T. **1975**. Putman FW (ed.). The plasma proteins. Academic Press. pp. 133–181.

- ❖ Peterson, G. L. **1977**. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83(2), 346-356.
- ❖ Picariello, G., Mamone, G., Addeo, F., Ferranti, P. **2012**. Novel mass spectrometry-based applications of the 'omic' sciences in food technology and biotechnology. *Food Technol. Biotechnol.*, 50(3), 286.
- ❖ Pulikkottil, R. D. **2024**. Extraction, isolation, and characterization techniques of structural proteins. In *Fish Structural Proteins and its Derivatives: Functionality and Applications*. Singapore: Springer Nature Singapore, pp. 37-72.
- ❖ Rahman, M. M., Lamsal, B. P. **2021**. Ultrasound-assisted extraction and modification of plant-based proteins: Impact on physicochemical, functional, and nutritional properties. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 20(2), 1457-1480.
- ❖ Silva, N. H., Vilela, C., Marrucho, I. M., Freire, C. S., Neto, C. P., Silvestre, A. J. **2014**. Protein-based materials: from sources to innovative sustainable materials for biomedical applications. *J. Mater. Chem. B*, 2(24), 3715-3740.
- ❖ Simonian, M. H. **2002**. Spectrophotometric determination of protein concentration. *Curr. Prot. Cell Biol.*, 15(1), A-3B.
- ❖ Stefanescu, R., Brebu, S., Matei, M., Risca, I. M., Surleva, A., Drochioiu, G. **2017**. Contribution to casein determination by UV spectrophotometry. *Acta Chemica Iasi*, 25(2) 112-125.
- ❖ Wang, J., Chen, J., Shan, H., Shi, Z., Liu, J., Zang, Y., Aoki, T. **2025**. One-Pot synthesis of amino acid-based functional hyper-crosslinked ionic polymers as heterogeneous catalysts for efficient fixation of CO₂ with epoxides. *Sep. Purif. Technol.*, 354, 129036.
- ❖ Wüthrich, K. **2001**. The way to NMR structures of proteins. *Nat. Struct. Biol.*, 8(11), 923-925.

LUCRĂRI PUBLICATE ȘI PARTICIPĂRI LA MANIFESTĂRI ȘTIINȚIFICE

A. Articole științifice publicate in extenso în reviste cotate Web of Science cu factor de impact:

1. Drochioiu, G., **Mihalcea, E.**, Lagobo, J., Ciobanu, C. I. Rapid tryptophan assay as a screening procedure for quality protein maize. *Molecules*, 29, 4341, 2024.

Impact factor 4,6 Q2

<https://doi.org/10.3390/molecules29184341>

2. **Mihalcea E.**, Enache A.C., Grădinaru R.V., Drochioiu G., Simultaneous determination of protein and essential amino acids in biological samples, *Acta Chemica Iași*, 32(1), 2024.

Impact factor (IF) 0,3 Q4

<https://doi.org/10.47743/achi-2024-1-0001>

3. **Mihalcea, E.**, Drochioiu, G. Improved protein assay based on the biuret reaction: interference of proteinogenic amino acids. *Revue Roumaine de Chimie*. Acceptată la publicare 2025.

Impact factor (IF) 0,4 Q4

rev_roum@icf.ro

B. Lucrări științifice publicate în proceeding-uri ale conferințelor internaționale

4. **Mihalcea, E.**, Drochioiu, G., Jitaru, S. C., Mangalagiu, V., Gradinaru, R.V. **2022**.

Protein and peptide determination based on the modified biuret procedure: implications for various biotechnologies. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 22(6.1), 113-120.

<https://doi.org/10.5593/sgem2022/6.1/s25.14>

5. Darie-Ion, L., Drochioiu, G., Pui, A., **Mihalcea, E.**, Gradinaru, V. R., **2021**. Zein conjugates of biomedical interest: synthesis and characterization by MALDI-ToF mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 21(6.1), 155-162.

<https://doi.org/10.5593/sgem2021/6.1/s25.38>

C. Lucrări prezentate la manifestări științifice internaționale

1. Darie-Ion, L., Drochioiu, G., Pui, A., **Mihalcea, E.**, Grădinaru, V. R., Zein conjugates of biomedical interest: synthesis and characterization by MALDI-ToF mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. 25. Advances in Biotechnology, Albena, Bulgaria, XXIth International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2021

<https://www.sgem.org/index.php/elibrary-research-areas?view=publication&task=show&id=8282>

2. **Mihalcea E.**, Drochioiu, G., Jitaru, S. C., Mangalagiu, V., Grădinaru, R.V., Protein and peptide determination based on the modified biuret procedure: implications for various biotechnologies. XXIInd International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM 2022.

https://epslibrary.at/sgem_jresearch_publication_view.php?page=view&editid1=8642

3. Drochioiu G., **Mihalcea E.**, Lagobo Z.M., Grădinaru R.V., Simultaneous determination of protein and two essential amino acids in maize, International Paris Congress on Medical and Health Sciences, Paris- France, 24-26 October, 2023.

<https://www.iksadparis.org/health>

https://www.researchgate.net/profile/Selda-Sokoli-3/publication/382863353_2-MEDICAL_PROCEEDINGS_BOOK-1/links/66af93e151aa0775f26937e1/2-MEDICAL-PROCEEDINGS-BOOK-1.pdf

D. Lucrări prezentate la manifestări științifice naționale

4. **Mihalcea E.**, Amiri N. Peptide complexes with heavy metal ions: P10 peptide and its relationship with copper ions, poster, Scientific communication session for students, masters and doctoral students in open to knowledge frontier chemistry, 11th edition, Iași, 29-30 October 2020.

<https://www.chem.uaic.ro/files/File/2020-2021/scssmd-29-30-oct-2020/2020-program-scssmd-29-30-oct-2020.pdf>

5. **Mihalcea E.**, Enache A.C., Drochioiu G. Simultaneous determination of protein and essential amino acids in biological samples, poster, IașiCHEM 5-MIT 2023, Faculty of Chemistry Conference, Iași, Romania, 26-27 October 2023, abstract in Book of Abstracts IașiCHEM 5-MIT 2023, p.24.

<https://www.chem.uaic.ro/ro.manifestari/zu-2023.html>

<https://www.chem.uaic.ro/files/File/iasichem/2023-IASICHEM-PROGRAM-FINAL-SITE.pdf>