

ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE CHIMICE
INSTITUTUL DE CHIMIE MACROMOLECULARĂ „PETRU PONI”
Domeniul CHIMIE

*PROGRESE ÎN PROIECTAREA COMPOZITELOR
POLIMER/ENZIME PENTRU APLICAȚII ÎN
CATALIZĂ*
**REZUMATUL TEZEI DE
DOCTORAT**

Conducător de doctorat
Dr. Habil. MARCELA MIHAI

Student-doctorand
Ing. LARISA-MARIA PETRILA

ACADEMIA ROMÂNĂ

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași

Doamnei/Domnului.....

Vă facem cunoscut faptul că în ziua de **20.11.2025**, ora **10⁰⁰**, în Sala de Conferințe a Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” din Iași, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat **„Progrese în proiectarea compozițiilor polimer/enzime pentru aplicații în cataliză”**, autor **ing. Larisa-Maria PETRILA**, în vederea acordării titlului științific de doctor.

PREȘEDINTE: CS I dr. Maria CAZACU

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC: CS I Dr. habil. Marcela MIHAI

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

REFERENȚI: Prof. univ. dr. Rénato FROIDEVAUX

Universitatea din Lille, Franța

Prof. univ. dr. ing. Carmen TEODOSIU

Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași

CSI dr. Anton AIRINEI

Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni”, Iași

În conformitate cu Regulamentul privind organizarea și desfășurarea studiilor de doctorat pentru acordarea titlurilor științifice în Academia Română, vă transmitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica aprecierile și observațiile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

Director ICMPP,
CS I dr. Valeria HARABAGIU

Mulțumiri

Finalizarea acestei teze de doctorat reprezintă nu doar încununarea unui efort academic, ci și rezultatul unei călătorii în care am fost însoțită și sprijinită de oameni cu o pregătire profesională remarcabilă, cărora doresc să le adresez întreaga mea recunoștință.

*În primul rând, doresc să îi mulțumesc conducătorului meu de doctorat, doamna **CS I Dr. Marcela MIHAI**, pentru îndrumarea științifică, pentru exigența constructivă și pentru sprijinul acordat de-a lungul întregului proces de cercetare și elaborare a acestei teze de doctorat. Sub coordonarea sa am participat la diverse activități formative, stagii internaționale, proiecte de cercetare și conferințe științifice, experiențe care au contribuit semnificativ la aprofundarea tematicii și la consolidarea încrederii mele ca cercetător independent. Îi sunt profund recunoscătoare pentru că acum cinci ani mi-a oferit oportunitatea de a mă alătura grupului său din cadrul Institutului de Chimie Macromoleculară Petru Poni și sper că nu a regretat niciodată șansa pe care mi-a oferit-o.*

*Exprim mulțumiri profunde **Comisiei de îndrumare și integritate academică**, formată din domnul conf. univ. dr. Robert-Vasile GRĂDINARU, domnul CS III dr. Florin BUCĂTARIU și domnul CS dr. Marius-Mihai ZAHARIA, care m-au sprijinit pe parcursul studiilor doctorale cu sugestii și observații valoroase.*

*Profunde mulțumiri **Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat**, formată din domnul prof. univ. dr. Rénato Froidevaux, doamna prof. dr. Carmen Teodosiu și domnul CS I Dr. Anton Airinei, pentru disponibilitatea de a evalua această lucrare, pentru timpul acordat și pentru sugestiile valoroase oferite.*

Deosebite mulțumiri domnului prof. univ. dr. Rénato Froidevaux, pentru oportunitatea de a desfășura un stagiu de cercetare în cadrul colectivului pe care îl coordonează la Universitatea din Lille. Experiența acumulată în cadrul acestui stagiu a avut un impact esențial asupra structurării și aprofundării tematicii prezentei teze de doctorat, iar răbdarea și îndrumarea de înaltă calitate pe care mi le-a oferit au facilitat dezvoltarea abilităților mele de cercetare.

*Le sunt recunoscătoare colegilor mei din **Laboratorul Polimeri Funcționali**, pentru colaborarea strânsă, pentru schimburile de idei și pentru sprijinul reciproc în momentele de provocare, dar și pentru atmosfera caldă, care a transformat munca într-un efort comun plin de sens. Adresez mulțumiri și colegilor din cadrul **Institutului de Chimie Macromoleculară Petru Poni**, pentru disponibilitatea de a împărtăși cunoștințe, pentru dialogul profesional și pentru sprijinul oferit pe parcursul activităților de cercetare, contribuind direct sau indirect la realizarea acestei teze de doctorat.*

*Doresc să adresez mulțumiri **Academiei Române și Institutului de Chimie Macromoleculară Petru Poni** pentru oportunitatea de a desfășura stagiul de doctorat în cadrul unui institut de cercetare de excelență. Mulțumiri deosebite **Institutului Leibniz de Cercetare a Polimerilor** din Dresda, Germania și **Universității din Lille**, Franța, pentru sprijinul financiar și logistic oferit în realizarea unor stagii de cercetare doctorală.*

*Sunt profund recunoscătoare **familiei mele**, cea mai bună galerie de susținători pe care mi-aș fi putut-o dori. Fraților mei **Mădălin, Valentin și Ovidiu**, cumnatei mele **Iulia** și nepotului meu **Tudor**, le mulțumesc pentru iubirea necondiționată, susținerea neîntreruptă și încrederea nestrămutată pe care au avut-o în mine. Îi mulțumesc **iubitului meu, Roland**, portul meu în furtună, pentru răbdare, sprijin și încurajare în toate momentele importante. Le mulțumesc **tuturor prietenilor mei** pentru prezența lor constantă, pentru optimismul și echilibrul pe care mi le-au oferit atunci când am avut cea mai mare nevoie.*

*Un gând de recunoștință profundă se îndreaptă către **mama mea, Valentina**, modelul meu de determinare și devotament. Dragostea ei necondiționată, sacrificiile și curajul cu care ne-a crescut singură, fiind mereu alături de noi în fiecare etapă a vieții, au reprezentat sprijinul cel mai puternic. Încrederea pe care mi-a insuflat-o zi de zi a fost temelie pe care am construit acest vis, motiv pentru care îi dedic această teză de doctorat.*

*Cu recunoștință,
Drd. Ing. Larisa-Maria PETRILA*

CUPRINS TEZĂ/REZUMAT

LISTA ABREVIERILOR	i/i
LISTA FIGURILOR	ii
LISTA TABELELOR	ix
INTRODUCERE	1/1
PARTEA I STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	7
CAPITOLUL 1 CONSIDERAȚII GENERALE ASUPRA MATERIALELOR COMPOZITE UTILIZATE ÎN IMOBILIZAREA DE ENZIME	7
1.1. Materiale compozite	7
1.2. Enzime. Metode de imobilizare a enzimelor	9
1.2.1. Imobilizarea enzimelor prin adsorbție pe un material suport.....	10
1.2.2. Imobilizarea prin entrapare	11
1.2.3. Imobilizarea prin legare covalentă	12
1.3. Materiale compozite cu enzime imobilizate	12
1.3.1. Material suport sub formă de fibre.....	14
1.3.2. Material suport sub formă de hidrogeluri.....	17
1.3.3. Material suport sub formă de micro- și nanoparticule	19
1.3.4. Materiale suport sub formă de particule miez-înveliș.....	22
1.3.5. Materiale suport sub formă de filmele subțiri	29
1.3.6. Materiale suport sub formă de complecși polimer/enzimă	31
1.4. Concluzii parțiale	33
CAPITOLUL 2 APLICAȚII ALE MATERIALELOR COMPOZITE CU ENZIME IMOBILIZATE	35
2.1. Introducere	35
2.2. Principalele aplicații ale materialelor compozite polimeri/enzime.....	35
2.2.1. Aplicații în protecția mediului.....	35
2.2.2. Aplicații în industria chimică	39
2.2.3. Aplicații ca biosenzori.....	42
2.2.4. Aplicații ca materiale cu proprietăți antimicrobiene	44
2.2.5. Aplicații pentru industria alimentară.....	46
2.2.6. Aplicațiile în industria cosmetică și de parfumerie.....	49
Concluzii, provocări și perspective.....	50
PARTEA a II-a: CONTRIBUȚII ORIGINALE.....	53/5
CAPITOLUL 3 MATERIALE ȘI METODE.....	53
3.1. Materialele utilizate	53
3.1.1. Polimerii utilizați.....	53
3.1.2. Enzimele utilizate.....	55
3.1.3. Alți compuși chimici	57
3.1.4. Microparticule suport anorganice.....	60
3.2. Metode de obținere a materialelor	60
3.3. Imobilizarea de enzime pe materiale compozite miez-înveliș.....	62
3.3.1. Prepararea soluțiilor tampon de pH.....	62
3.3.2. Imobilizarea PEP pe materialele suport miez-înveliș	63
3.3.3. Imobilizarea LAC pe materialele suport miez-înveliș	65

3.4. Prepararea de complecși interpolielectrolitici între LAC și polizaharide	65
3.4.1. Prepararea complecșilor LAC/CHI	65
3.4.2. Prepararea complecșilor LAC/CHI-g-PNIPAM	66
3.5. Metode de caracterizare a materialelor	67
3.5.1. Titrarea polielectrolitică	67
3.5.2. Titrarea potențiometrică	67
3.5.3. Spectrofotometria UV-Viz	68
3.5.4. Spectroscopia de fluorescență	68
3.5.5. Spectroscopia de fotoelectroni cu raze X	70
3.5.6. Analiza termogravimetrică	70
3.5.7. Microscopia electronică de baleiaj	70
3.5.8. Microscopia de forță atomică	71
3.5.9. Dispersia dinamică a luminii	71
3.5.10. Măsurători de potențial zeta	72
3.5.11. Studii de simulare moleculară	72
3.6. Metode de evaluare a activității enzimatică și a stabilității enzimelor imobilizate ..	73
3.6.1. Determinarea activității enzimatică a LAC	73
3.6.2. Determinarea pH-ului optim pentru enzimele libere și imobilizate	73
3.6.3. Determinarea stabilității la temperatură a LAC libere sau imobilizate	73
3.6.4. Determinarea capacității de reutilizare a LAC imobilizate	74
3.6.5. Determinarea parametrilor cinetici	74
3.7. Studii de degradare catalitică a coloranților	75
3.7.1. Determinarea capacității sistemului enzimă/mediator de a degrada coloranți utilizând enzimă liberă	75
3.7.2. Determinarea capacității sistemului enzimă imobilizată/mediator de a degrada coloranți	75
3.7.3. Studiul influenței proceselor secundare de sorbție asupra degradării IC sub acțiunea LAC imobilizate pe materialele compozite miez-înveliș	76
3.7.4. Studiul influenței cantității de enzimă imobilizată asupra procesului de degradare a IC	77
3.7.5. Studiul influenței pH-ului asupra procesului de degradare a IC	77
3.7.6. Studiul influenței concentrației colorantului asupra procesului degradare a IC ..	77
3.7.7. Reutilizarea biocatalizatorilor în procesul de degradare a IC	78
3.7.8. Identificarea potențialilor produși de degradare prin spectrometrie de masă și spectrometrie de masă cuplată cu cromatografie de lichide de înaltă performanță	78
CAPITOLUL 4 OBȚINEREA MATERIALELOR COMPOZITE SUPT PENTRU	
IMOBILIZAREA DE ENZIME	80/5
4.1. Introducere	80
4.2. Obținerea materialelor compozite prin depunerea strat-după-strat de polielectroliți	81/5
81/5	
4.2.2. Caracterizarea materialelor compozite obținute	85
4.3. Selectarea materialelor cu potențial în imobilizarea de enzime	93
4.4. Concluzii parțiale	94/7

CAPITOLUL 5 IMOBILIZAREA DE ENZIME PE MATERIALE COMPOZITE MIEZ – ÎNVELIȘ.....	96/8
5.1. Introducere	96
5.2. Studii de imobilizare a pepsinei.....	97
5.2.1. Caracterizarea pepsinei	97
5.2.2. Imobilizarea pepsinei pe materiale compozite obținute prin depunere strat-după-strat de polielectroliți.....	98
5.2.3. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor compozite cu pepsină imobilizată	104
5.3. Studii de imobilizare a lacazei	107/8
5.3.1. Caracterizarea lacazei.....	107
5.3.2. Imobilizarea lacazei pe materialele compozite obținute prin depunere strat-după-strat de polielectroliți.....	108
5.3.3. Caracterizarea fizico-chimică a materialelor compozite după imobilizarea LAC	111
5.3.4. Evaluarea proprietăților catalitice ale materialelor compozite cu LAC imobilizată.....	114/10
5.4. Evaluarea rezultatelor și selectarea variantelor optime material suport/ enzimă....	119
5.5. Concluzii parțiale	121/11
CAPITOLUL 6 OBȚINEREA DE NANOSTRUCTURI PRIN FORMAREA DE COMPLECȘI INTERPOLIELECTROLITICI LACAZĂ/POLIMERI NATURALI..	123/13
6.1. Introducere	123
6.2. Prepararea complexelor lacază / chitosan	125/13
6.2.1. Caracterizarea LAC.....	125
6.2.2. Studiul interacțiunii dintre LAC și CHI	127/13
6.2.3. Formarea și caracterizarea complexelor interpolielectrolitici	134/15
6.2.4. Studiul influenței tărie ionice asupra stabilității complexelor LAC/CHI	137
6.2.5. Evaluarea proprietăților catalitice ale nanostructurilor LAC/CHI	138/17
6.2.6. Evaluarea stabilității la depozitare a nanostructurilor LAC/CHI	142
6.3. Prepararea nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM	145/19
6.3.1. Caracterizarea soluției inițiale de polimer.....	145
6.3.2. Formarea și caracterizarea complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM	153/19
6.3.3. Studiul stabilității termice a complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM	153
6.3.4. Studiul stabilității complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM în funcție de tăria ionică	155
6.3.5. Evaluarea proprietăților catalitice ale nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM	156/21
6.3.6. Studiul stabilității la depozitare.....	160
6.4. Concluzii parțiale	162/23
CAPITOLUL 7 UTILIZAREA MATERIALELOR COMPOZITE OBȚINUTE PRIN IMOBILIZAREA LACAZEI ÎN DEGRADAREA CATALITICĂ A COLORANȚILOR	164/24
7.1. Introducere	164

7.2. Determinarea capacității sistemului enzimă/ mediator de a degrada coloranți utilizând LAC liberă. Selecția mediatorilor	166
7.3. Degradarea IC sub acțiunea LAC imobilizate pe microparticule compozite obținute prin depunere strat-după-strat de polielectroliti	168/25
7.3.1. Evaluarea capacității sistemului enzimă/ mediator de a degrada coloranți utilizând enzima imobilizată	168/25
7.3.2. Studiul influenței proceselor secundare de sorbție asupra degradării IC	170
7.3.3. Studiul influenței cantității de enzimă imobilizată pe materialele compozite asupra procesului de degradare a IC	171
7.3.4. Studiul influenței pH-ului asupra procesului de degradare a IC	172
7.3.5. Studiul influenței concentrației colorantului asupra procesului de degradare a IC	173
7.3.6. Reutilizarea materialelor compozite.....	173/26
7.3.7. Mecanismul de degradare enzimatică a IC	174/26
7.4. Degradarea coloranților IC și CR sub acțiunea nanostructurilor LAC/CHI și LAC/CHI-g-PNIPAM.....	183/29
7.4.1. Evaluarea capacității nanostructurilor LAC/CHI de a cataliza degradarea unor coloranți.....	184/29
7.4.2. Evaluarea capacității nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM de a cataliza degradarea unor coloranți.....	186/30
7.5. Concluzii parțiale	188/32
CONCLUZII GENERALE.....	190/34
BIBLIOGRAFIE	196/40
ANEXA 1: DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE ÎN PERIOADA DE PREGĂTIRE DOCTORALĂ	230/42
ANEXA 2: ARTICOLE PUBLICATE ÎN PERIOADA DE PREGĂTIRE DOCTORALĂ	237

LISTA ABREVIERILOR

ABTS – acid 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic)	LbL – strat-după-strat (<i>engl. layer-by-layer</i>)
AFM – microscopie de forță atomică (<i>engl. atomic force microscopy</i>)	LCST – temperatura critică a soluției (<i>engl. low critical solution temperature</i>)
ALG – alginat	MS – spectrometrie de masă
ASG – aldehida siringică	PAA – poli(acid acrilic)
CHI – chitosan	PEI – poli(etilenimina)
CHI-g-PNIPAM – chitosan grefat cu lanțuri de poli(<i>N</i> -izopropilacrilamidă)	PEI _M – poli(etilenimină) cu masă molară mare
CR – Congo Red	PEI _m – poli(etilenimină) cu masă molară mică
DLS – dispersia dinamică a luminii (<i>engl. dynamic light scattering</i>)	PEP – pepsina
EDAX – spectroscopie cu raze X cu dispersie de energie (<i>engl. energy-dispersive X-ray</i>)	PMA – poli(acid metacrilic)
ESI – MS – spectrometrie de masă cu sursă de ionizare prin electrostropire (<i>engl. electrospray ionization mass spectrometry</i>)	PNIPAM – poli(<i>N</i> -izopropilacrilamidă)
GA – aldehida glutarică	RM – raport masic
HPLC-MS – cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (<i>engl. high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry</i>)	RMSD – eroare medie pătratică (<i>engl. root mean square deviation</i>)
IC – Indigo Carmine	SEM – microscopie electronică de baleiaj (<i>engl. scanning electron microscopy</i>)
LAC – lacaza	STEM – microscopie electronică de baleiaj cu transmisie (<i>engl. scanning transmission electron microscopy</i>)
	TGA – analiza termogravimetrică (<i>engl. thermogravimetric analysis</i>)
	XPS – spectroscopia de fotoelectroni cu raze X (<i>engl. X-ray photoelectron spectroscopy</i>)

INTRODUCERE

Repere conceptuale generale. Importanța, actualitatea și motivația tezei de doctorat

Enzimele, considerate „*catalizatorii vieții*”, sunt structuri proteice de origine naturală, implicate într-o multitudine de procese biologice. Acestea accelerează procesele biologice esențiale vieții, în absența lor reacțiile metabolice fiind prea lente pentru a o susține. Enzimele sunt caracterizate printr-o specificitate și o eficiență catalitică extraordinară, acestea contribuind la digestia alimentelor și reglarea metabolismului, sinteza ADN-ului și determinarea răspunsului imunitar. În afara rolului lor biologic primordial, enzimele au o importanță crescută și în alte domenii precum cel industrial, medical sau în protecția mediului. În funcție de originea lor și de specificitatea catalitică, enzimele pot cataliza procese de interes industrial, pot servi în diagnosticarea sau tratarea unor afecțiuni sau pot cataliza degradarea unor poluanți din mediu.

Deși proprietățile catalitice ale enzimelor sunt extrem de promițătoare, utilizarea acestora în aplicații la scară largă este limitată de stabilitatea lor redusă în condiții diferite de cele din mediul lor natural. Pentru a contracara aceste limitări, se apelează deseori la imobilizarea enzimelor pentru a le îmbunătăți stabilitatea în condiții variate. Imobilizarea enzimelor reprezintă un subiect de interes crescut pentru cercetarea științifică, motivat de dorința de a crește stabilitatea și performanța catalizatorilor enzimatici, în special în vederea dezvoltării unor biocatalizatori cu aplicabilitate industrială. Din această perspectivă, literatura de specialitate descrie unele metode de imobilizare a enzimelor precum și diferite tipuri de materiale care pot servi drept suport pentru imobilizarea acestora.

Deși subiectul imobilizării enzimelor a fost deja studiat în ultimii ani, acesta este departe de a fi epuizat, prezentând un interes ridicat pentru dezvoltarea de noi materiale suport pentru imobilizarea de enzime, studiul interacțiunilor care se stabilesc între enzime și materialele suport și care modulează activitatea catalitică a enzimelor imobilizate sau dezvoltarea de noi direcții de utilizare a enzimelor imobilizate.

Studiile actuale privind imobilizarea de enzime prezintă interes și din punctul de vedere al dezvoltării unor sisteme catalitice inovatoare, de tip materiale compozite pe bază de enzime și polimeri. Utilizarea polimerilor în obținerea unor astfel de materiale este justificată de versatilitatea structurală și funcțională a acestora, putând fi utilizați polimeri de origine naturală sau sintetică, cu diferite proprietăți fizice sau chimice, polimeri biodegradabili, sensibili la stimuli sau combinații de polimeri. Selecția atentă a polimerilor

permite adaptarea proprietăților materialelor obținute, influențând direct eficiența și/sau stabilitatea biocatalizatorilor.

În acest context, **motivația** dezvoltării de **materiale compozite polimer/enzime** este susținută atât de aspecte teoretice cât și de considerente de aplicabilitate. Dezvoltarea acestui domeniu poate aduce contribuții semnificative în înțelegerea interacțiunilor dintre enzime și polimeri, identificarea efectului pe care imobilizarea enzimelor îl poate avea asupra proprietăților catalitice ale acestora, optimizarea condițiilor de imobilizare a diferite enzime, precum și în proiectarea unor biocatalizatori eficienți pentru diferite tipuri de aplicații. Această abordare este relevantă în special prin prisma potențialelor aplicații ale materialelor obținute, proiectarea acestora putând fi direcționată către diferite aplicații precum biosenzori, suprafețe cu proprietăți antimicrobiene, catalizatori cu aplicabilitate industrială sau de mediu, farmaceutică sau alimentară.

O direcție aplicativă cu un impact semnificativ pentru societate este utilizarea materialelor compozite polimer/enzime drept **catalizatori pentru degradarea unor poluanți din apă**, această metodă de tratare a apelor uzate răspunzând provocărilor actuale legate de protecția mediului. Motivația proiectării de materiale compozite polimer/enzime pentru astfel de aplicații este argumentată și de necesitatea dezvoltării unor soluții sustenabile și ecologice de depoluare, precum și de posibilitatea de utilizare a unor polimeri de origine naturală, justificând alegerea acestora.

Obiectivele tezei și metodologia experimentală

Pornind de la considerentele prezentate mai sus, a fost formulat un obiectiv principal al tezei de doctorat constând în ***proiectarea, obținerea și caracterizarea fizico-chimică și biochimică a unor noi materiale compozite pe bază de enzime și polimeri naturali sau sintetici, destinați unor aplicații catalitice.***

Din acest obiectiv principal au fost derivate patru obiective secundare:

- Optimizarea obținerii de materiale suport pentru imobilizare de enzime prin depunere strat-după-strat de polielectroliți pe microparticule de silice;
- Imobilizarea enzimelor pe materiale suport de tip miez-înveliș obținute prin depunere strat-după-strat de polielectroliți pe microparticule de silice;
- Obținerea de nanostructuri enzime/polimeri sub formă de complecși interpolielectrolitici;
- Utilizarea materialelor compozite obținute prin imobilizarea lacazei drept catalizatori pentru degradarea unor poluanți din ape uzate.

Conținutul tezei de doctorat

Teza de doctorat intitulată „***Progrese în proiectarea compozitelor polimer/enzime pentru aplicații în cataliză***” se întinde pe 195 pagini și cuprinde șapte capitole ce includ 100 figuri, 21 tabele, 12 ecuații și 310 referințe bibliografice. Lucrarea prezentată este structurată în două secțiuni principale: *Partea I - Stadiul actual al cunoașterii* care cuprinde două capitole și prezintă contextului științific care motivează alegerea temei de cercetare, a materialelor și a metodelor experimentale și *Partea a II-a - Contribuții originale* care este structurată în cinci capitole și prezintă rezultatele originale obținute în urma studiilor doctorale.

Capitolele 1 și 2 prezintă stadiul actual al cunoașterii și descriu contextul general al imobilizării enzimelor, principalele metode de imobilizare raportate în literatura de specialitate precum și șase tipuri principale de materiale pe bază de polimeri care sunt utilizate în imobilizarea de enzime, respectiv principalele direcții de utilizare ale materialelor compozite polimer/enzime. Analiza riguroasă a tendințelor de cercetare în acest domeniu a permis identificarea unor direcții de cercetare care au fost exploatate în cadrul studiilor experimentale desfășurate pe parcursul pregătirii acestei teze de doctorat, luând în considerare expertiza departamentului și posibilitățile de dezvoltare a direcțiilor de cercetare selectate.

Capitolul 3 se referă la materialele utilizate, cuprinzând și o descriere amănunțită a metodelor experimentale întrebuintate pentru obținerea materialelor compozite polimer/enzime. Capitolul descrie o metodologie exhaustivă de caracterizare a materialelor și de evaluare a proprietăților catalitice și a potențialelor aplicații ale materialelor compozite obținute, valorificând metode de caracterizare moderne și tehnici biochimice consacrate.

Capitolul 4 prezintă obținerea materialelor compozite proiectate pentru a servi ca suport pentru imobilizarea de enzime utilizând metoda depunerii strat-după-strat de polielectroliți pe microparticule de silice. Capitolul cuprinde atât detalii privind obținerea materialelor compozite, cât și caracterizarea acestora prin diferite tehnici experimentale, fiind identificate principalele aspecte care influențează proprietățile materialelor și fiind selectate materialele cele mai performante, în vederea testării ulterioare.

Capitolul 5 descrie imobilizarea a două enzime – pepsina și lacaza – pe unele materiale compozite miez-înveliș, selectate dintre cele prezentate în Capitolul 4. Rezultatele prezentate în cadrul acestui capitol urmăresc optimizarea procesului de imobilizare a enzimelor, caracterizarea fizico-chimică a materialelor după imobilizarea enzimelor și, în cazul materialelor cu lacază imobilizată, evaluarea proprietăților catalitice ale acestora, fiind

demonstrată fezabilitatea utilizării acestor materiale ca suport pentru imobilizarea de enzime. Totodată, studiile efectuate au permis identificarea celor mai promițătoare materiale compozite cu enzime imobilizate, din punct de vedere al performanței catalitice, acestea fiind selectate pentru testare în aplicații catalitice.

Capitolul 6 urmărește obținerea de nanostructuri pe bază de lacază și chitosan sau chitosan grefat cu poli(*N*-izopropilacrilamidă). Metodologia propusă în cadrul acestui capitol urmărește mecanismul de interacțiune dintre enzimă și polizaharide prin diferite metode experimentale și confirmarea acestuia prin intermediul simulării de dinamică moleculară, precum și evidențierea principalelor caracteristici ale nanostructurilor formate și evaluarea activității catalitice a nanostructurilor formate în diferite condiții experimentale. Capitolul contribuie la înțelegerea mecanismelor de interacțiune dintre proteine și polizaharide și propune obținerea unor nanostructuri inovative, formate cu lacază, enzimă de interes industrial, și o polizaharidă modificată, sensibilă la stimuli externi.

Capitolul 7 prezintă potențialele aplicații ale nanostructurilor și compozitelor polimer/enzime în degradarea catalitică a unor coloranți din mediul apos, evidențiind potențialul lor aplicativ. Studiile prezentate urmăresc capacitatea unora dintre materialele selectate de a degrada coloranți în diferite condiții experimentale, dar și identificarea mecanismului de degradare enzimatică a unuia dintre coloranții testați. Nu în ultimul rând, capitolul scoate în evidență o soluție neconvențională de tratare a apelor uzate, respectiv utilizarea nanostructurilor enzime/polizaharide drept catalizatori pentru degradarea unor coloranți.

Teza de doctorat se încheie cu o serie de concluzii generale și perspective de dezvoltare a studiilor propuse, fiind însoțită de două Anexe organizate după cum urmează: Anexa 1 – Diseminarea rezultatelor științifice și Anexa 2 – Copii ale articolelor publicate.

Rezultatele prezentate în teza de doctorat intitulată ***Progrese în proiectarea compozitelor polimer/enzime pentru aplicații în cataliză*** prezintă obținerea unor materiale compozite pe bază de polimeri și enzime. Metodele experimentale utilizate au permis obținerea unor materiale compozite cu utilitate practică, atât sub formă de microparticule miez anorganic, înveliș polimeric și lacază imobilizată, cât și sub formă de nanostructuri lacază/polizaharide. Cele două tipuri de materiale compozite obținute au demonstrat menținerea unei activități catalitice satisfăcătoare, testată în diferite condiții experimentale și o îmbunătățire globală a proprietăților enzimei, manifestată printr-o creștere a stabilității acestora în diferite condiții. De asemenea, cele două tipuri de materiale cu lacază imobilizată au fost utilizate cu succes în degradarea unor coloranți din mediu apos, demonstrând

fezabilitatea acestora de a acționa drept catalizatori pentru degradarea unor poluanți organici din mediu apos.

PARTEA a II-a

CONTRIBUȚII ORIGINALE

CAPITOLUL 4

OBȚINEREA MATERIALELOR COMPOZITE SUPORT PENTRU IMOBILIZAREA DE ENZIME

Rezultatele prezentate în acest capitol au făcut subiectul următoarelor publicații:

1. **Petrila, L. M.**, Bucatariu, F., Stoica, I., Mihai, M., & Froidevaux, R. (2025a). *J Environ Chem Eng*, 13(2), 115631. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.115631>
2. Bucatariu, F., **Petrila, L.**, Teodosiu, C., & Mihai, M. (2022). *CR Chim*, 25, 95–108. DOI: [10.5802/crchim.171](https://doi.org/10.5802/crchim.171)
3. **Petrila, L. M.**, Bucatariu, F., Mihai, M., (2025b). *Rev Roum Chim*, 70, 465-473. <https://doi.org/10.33224/rrech.2025.70.7-8.10>

4.2. Obținerea materialelor compozite prin depunerea strat-după-strat de polielectroliți

4.2.1. Depunerea strat-după-strat a polielectroliților și reticularea materialelor compozite obținute

Pentru obținerea materialelor compozite s-au utilizat o serie de polimeri ionici încadrați în categoria polielectroliților slabi. Aceștia posedă o serie de caracteristici specifice, în special sensibilitate la modificările de pH și de tărie ionică (Petrila, 2021). Totodată, polielectroliții selectați diferă în termeni de masă molară și dispunere a catenei (liniară/ramificată). Astfel, este de așteptat ca gradul de ionizare al polielectroliților, și astfel și conformația acestora, să fie influențate de condițiile experimentale de lucru.

Pentru formarea de multistraturi de polielectroliți au fost utilizate combinații ale policationilor (PEI_m , PEI_M) și polianionilor (PAA, PMA) selectați pentru acest studiu, totodată utilizându-se ca suport microparticule de silice care diferă prin porozitate (SP1k și SP2k). Depunerea învelișului organic prin formarea multistraturilor a fost urmărită prin efectuarea de titrări polielectrolitice care au permis determinarea indirectă a cantității de material organic depus după fiecare etapă. Depunerea multistraturilor a fost realizată astfel

încât să se obțină materiale cu număr crescător de straturi duble depuse, în care un dublu-strat este definit prin depunerea alternantă a unui strat de polication și a unui de polianion. Figura 4.2. prezintă variația cantității de material organic depus pe suportul anorganic, în funcție de numărul de duble-straturi depuse, respectiv în funcție de suportul anorganic utilizat.

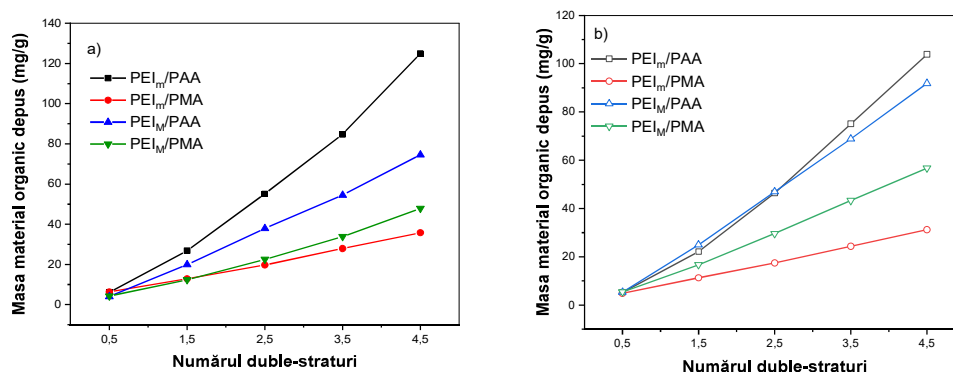


Figura 4.2: Variația cantității de material organic depus pe microparticulele Daisogel SP1k (a) și SP2k (b) în funcție de numărul de duble-straturi depuse (rezultate publicate parțial în **Petrila, 2025a**)

Pe baza reprezentărilor grafice din Figura 4.2. se poate observa că indiferent de porozitatea silicei utilizate ca suport la depunere, cantitatea de material organic depus urmărește același trend de creștere, aproximativ liniar, odată cu creșterea numărului de straturi depuse. Se remarcă, de asemenea, că materialele compozite obținute cu PAA, pentru același polication și indiferent de suportul anorganic folosit, conțin o cantitate mai mare de material organic, ceea ce sugerează depunerea a unui film polimeric cu o grosime mai mare pe materialul suport, comparativ cu materialele obținute cu PMA. Acest comportament este rezultatul conformației PAA: la pH-ul soluției de ~ 3 , grupările funcționale de pe catenele de PAA sunt parțial ionizate, iar catenele cu masă moleculară mare adoptă o conformație încolăcită formând ghemuri care conduc la depunerea unui strat organic gros. Pe de altă parte, PMA este ionizat puternic la pH ~ 8 iar catenele sale sunt întinse, în aceste condiții stratul depus fiind mai subțire decât în cazul depunerii PAA. În ceea ce privește influența policationului, se poate constata că, pentru același polianion și indiferent de suportul anorganic folosit, utilizarea policationului cu masă molară mai mică, PEI_m, determină depunerea unui strat mai gros.

Pentru a asigura o mai bună coeziune a straturilor depuse, s-a procedat la reticularea chimică a catenelor de PEI după fiecare etapă de depunere a acestuia, utilizând o cantitate de reticulant care să asigure raportul de 10:1 între grupările carbonil ale reticulantului și

grupările aminice ale policationului. Raportul ales a fost optimizat în studii anterioare realizate în cadrul echipei de cercetare, cantitatea necesară de reticulant fiind calculată pe baza cantității de polication depus, determinată indirect prin titrări polielectrolitice (Bucatariu, 2022). Reticularea catenelor de PEI asigură o mai mare stabilitate a straturilor depuse și favorizează utilizarea ulterioară a materialelor compozite în aplicații care vizează exploatarea în cicluri multiple de utilizare sau în condiții de presiune hidrodinamică, după cum sugerează literatura de specialitate (Ghiorghita, 2019).

4.4. Concluzii parțiale

În cadrul acestui capitol, s-a studiat obținerea de materiale compozite miez anorganic – înveliș organic prin depunerea strat-după-strat de polielectroliți pe microparticule de silice, obiectivul principal al studiului fiind legat de optimizarea procesului de depunere a polielectroliților în vederea obținerii unor microparticule miez-înveliș stabile. Astfel, s-au studiat mai multe combinații experimentale, incluzând două tipuri de silice suport, doi policationi și doi polianioni. Totodată, s-a urmărit obținerea de materiale compozite prin depunerea mai multor straturi de polielectroliți, obținând materiale cu 0,5; 1,5; 2,5 și 4,5 duble-straturi. Pentru îmbunătățirea caracteristicilor materialelor, acestea au fost supuse unui tratament acido-bazic. Materialele astfel obținute au fost caracterizate utilizând o combinație de metode fizico-chimice moderne pentru a studia compoziția chimică, încărcarea suprafeței și morfologia materialelor obținute. Rezultatele obținute au evidențiat o serie de aspecte importante:

- porozitatea silicei suport nu influențează puternic tendința de depunere a multistraturilor de polielectroliți și nici cantitatea totală de material organic depus;
- masa molară a polielectroliților utilizați influențează formarea multistraturilor și stabilitatea acestora, materialele obținute utilizând PEI_m fiind caracterizate de cea mai redusă stabilitate;
- utilizarea PEI_M a determinat obținerea unor învelișuri organice mai stabile ca urmare a interacțiunii mai bune dintre cei doi polielectroliți.

Pe baza acestor observații, **au fost selectate materialele care vor fi utilizate ca suport pentru imobilizarea de enzime, și anume, compozitele obținute prin depunerea strat-după-strat de polielectroliți a perechilor de polielectroliți PEI_M/PAA și PEI_M/PMA .**

CAPITOLUL 5

IMOBILIZAREA DE ENZIME PE

MATERIALE COMPOZITE MIEZ – ÎNVELIȘ

Rezultatele prezentate în acest capitol au făcut subiectul următoarelor publicații:

1. **Petrila, L. M.**, Bucatariu, F., Stoica, I., Mihai, M., & Froidevaux, R. (2025a). *J Environ Chem Eng*, 13(2), 115631. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.115631>
2. **Petrila, L. M.**, Bucatariu, F., Mihai, M., (2025b). *Rev Roum Chim*, 70, 465-473. <https://doi.org/10.33224/rrech.2025.70.7-8.10>

5.3. Studii de imobilizare a lacazei

Influența pH-ului asupra imobilizării LAC

Un rol primordial în imobilizarea cu succes a enzimelor îl joacă pH-ul, acesta influențând, pe de o parte, ionizarea grupărilor funcționale care ar putea fi implicate în imobilizarea enzimei și, pe de altă parte, conformația și stabilitatea enzimelor. Influența pH-ului asupra randamentului de imobilizare a fost studiată în intervalul de pH = 3,5 – 5,5, astfel încât să poată fi conservate atât o activitate satisfăcătoare a enzimei, cât și o stabilitate a catenelor polimerice din materialul compozit. Analizând randamentele de imobilizare obținute, prezentate în Figura 5.12., se remarcă faptul că cele mai bune rezultate sunt obținute la pH = 4,5 pentru ambele tipuri de microparticule suport.

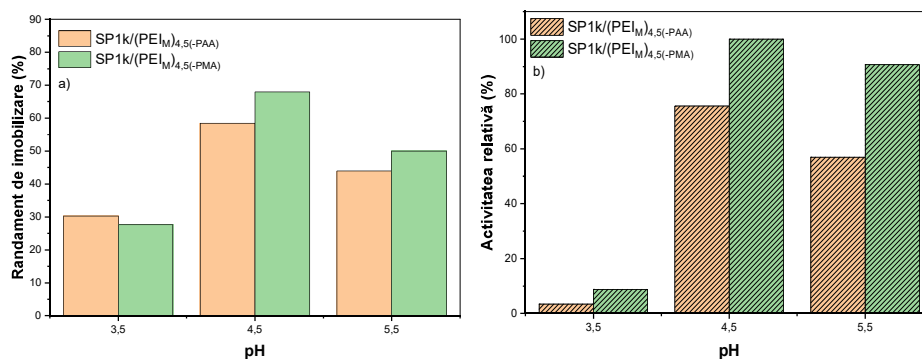


Figura 5.12: Randamentul de imobilizare (a) și activitatea enzimatică relativă (b) a LAC imobilizate în funcție de pH-ul de imobilizare (**Petrila, 2025a**)

După cum este prezentat în Figura 5.12., la pH scăzut imobilizarea este redusă, cel mai probabil din cauza ionizării grupărilor funcționale ale polianionului rămas în structura compozitelor miez-înveliș, care generează repulsii electrostatice între compozit și enzimă. Randamentele de imobilizare obținute în intervalul de pH = 4,5 - 5,5 variază ușor, sugerând

faptul că o variație mică a pH-ului nu afectează puternic procesul de imobilizare. În plus, a fost studiată activitatea enzimatică a materialelor compozite LAC1@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA) și LAC1@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA) (Figura 5.12 b), observându-se că imobilizarea LAC la pH = 4,5 a conservat cea mai bună activitate catalitică (definită ca 100% pentru cele mai bune rezultate obținute, celelalte valori fiind raportate la cea mai mare activitate obținută), această valoare a pH-ului asigurând un grad satisfăcător de ionizare a grupelor funcționale ale materialului compozit. Totodată, se poate aprecia că la această valoare a pH-ului conformația enzimei a fost adecvată, favorizând imobilizarea acesteia fără a afecta centrul activ al enzimei.

De asemenea, se remarcă faptul că atât randamentul de imobilizare cât și activitatea enzimatică relativă sunt mai ridicate în cazul imobilizării LAC pe materialul compozit cu PMA, sugerând o afinitate mai mare a suportului față de enzimă, cel mai probabil datorită unei interacțiuni mai bune cu materialul suport, bazată atât pe interacțiuni electrostatice, cât și de natură hidrofobă.

Influența concentrației asupra imobilizării LAC

Un alt parametru important în eficiența procesului de imobilizare enzimatică este concentrația inițială a enzimei care influențează puternic difuzia acesteia în timpul procesului de imobilizare. În acest sens, efectul concentrației enzimei asupra etapei de imobilizare a fost studiat în intervalul de concentrație 1 - 8 mg/mL, Figura 5.13. prezentând randamentul imobilizării și masa de enzimă imobilizată (mg/mg) în funcție de concentrația inițială a enzimei.

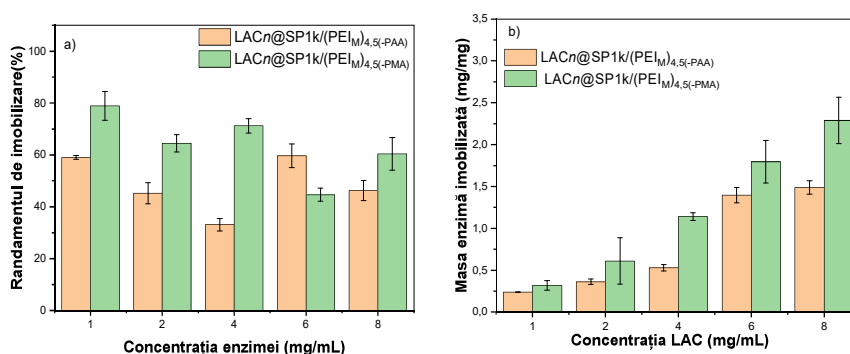


Figura 5.13: Randamentul de imobilizare a LAC (a) și masa de enzimă imobilizată (b) în funcție de concentrația inițială a enzimei (Petrila, 2025a)

După cum este prezentat Figura 5.13., cel mai mare randament de imobilizare a enzimei a fost obținut la o concentrație inițială de 1 mg/mL și corespunde valorii de $59,02 \pm 0,07\%$ pentru materialele suport SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA) și $78,90 \pm 5,53\%$ pentru materialele

suport SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA). O eficiență satisfăcătoare a imobilizării a fost menținută în intervalul de concentrație 2 - 8 mg/mL, în timp ce pentru concentrații mai mari de enzimă, ar putea apărea saturarea suprafeței. În timp ce o creștere a concentrației poate conduce la o cantitate mai mare de enzimă imobilizată, datorită agregării enzimei pe suprafața materialului, stabilitatea și activitatea catalitică a unui biocatalizator obținut cu o concentrație mai mare de enzimă pot fi afectate de interacțiunile slabe dintre agregatele de enzimă și materialul suport și de limitările difuzionale, respectiv împiedicările sterice care reduc probabilitatea de interacțiune dintre moleculele de substrat și centrul activ al enzimei. Astfel, se poate aprecia că utilizarea unor concentrații mai mici de enzimă determină randamente mai bune de imobilizare deși cantitatea cea mai mare de enzimă imobilizată se găsește la cea mai mare concentrație testată pentru LAC (Figura 5.13 b).

5.3.4. Evaluarea proprietăților catalitice ale materialelor compozite cu LAC imobilizată

Determinarea activității catalitice a materialelor compozite cu enzimă imobilizată

De departe cel mai important parametru de urmărit în cazul obținerii de biocatalizatori prin imobilizare de enzime este menținerea unei activități enzimatică satisfăcătoare. Din acest motiv, determinarea activității catalitice a biocatalizatorilor obținuți prin imobilizare de enzime este primordială în stabilirea parametrilor optimi de obținere a unor biocatalizatori eficienți. Activitatea enzimatică a materialelor compozite după imobilizarea LAC a fost studiată în condiții similare celor utilizate pentru determinarea activității LAC în soluție, respectiv urmărind conversia ABTS la pH = 4,5 și temperatura de 25 °C. Activitatea enzimatică a materialelor compozite obținute prin imobilizarea LAC la concentrații inițiale de 1-8 mg/mL a fost exprimată prin activitatea relativă, considerând activitatea maximă obținută ca fiind 100% (indiferent de tipul microparticulelor utilizate ca suport pentru imobilizare) și raportând celelalte valori de activitate obținute la valoarea maximă.

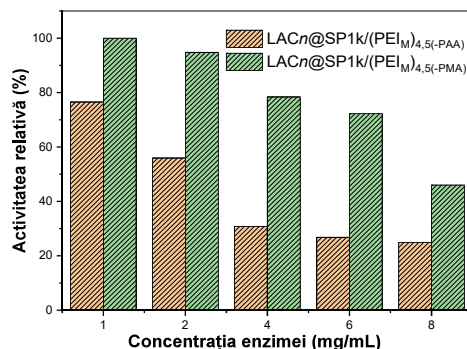


Figura 5.17: Activitatea enzimatică relativă a materialelor compozite cu LAC imobilizată la concentrațiile $n = 1-8$ mg/mL și pH = 4,5 (Petrila, 2025a)

Analizând activitatea enzimatică a materialelor $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA)$ și $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$ obținute după imobilizarea LAC la concentrații inițiale de enzimă de 1–8 mg/mL și pH = 4,5 (Figura 5.17.), se poate observa că, în general, activitatea enzimatică relativă scade odată cu creșterea concentrației de enzimă, cea mai bună activitate fiind menținută la o concentrație inițială de 1 mg/mL atât pentru compozitele $SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA)$, cât și pentru $SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$.

Reutilizarea materialelor compozite cu LAC imobilizată

Pentru a studia capacitatea de reutilizare materialelor compozite cu LAC imobilizată la concentrația de 2 mg/mL s-a utilizat aceeași metodă de determinare a conversiei ABTS în condiții optime de temperatură și pH. După fiecare ciclu de utilizare a materialelor compozite cu LAC imobilizată, acestea au fost separate, spălate cu soluție tampon acetat și reutilizate pentru conversia ABTS utilizând o soluție proaspătă de substrat.

Analizând capacitatea de reutilizare a materialelor compozite cu LAC imobilizată (Figura 5.20.), se remarcă faptul că acestea pot fi reutilizate cu succes în șapte cicluri de utilizare, cu o pierdere a activității de sub 5% în primele trei cicluri de reutilizare și menținerea a aproximativ 50% din activitatea inițială după șapte cicluri de reutilizare.

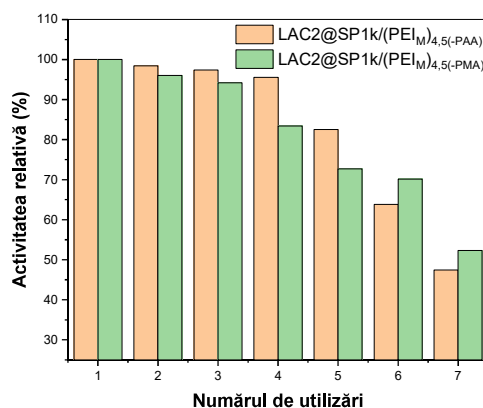


Figura 5.20: Activitatea enzimatică relativă la reutilizare a materialelor compozite cu LAC imobilizată

Aceste rezultate confirmă faptul că imobilizarea LAC conferă avantaje economice semnificative comparativ cu utilizarea enzimei în stare nativă, prin imobilizare fiind facilitată recuperarea și reutilizarea biocatalizatorilor, reducând atât costurile asociate cu utilizarea catalizatorilor enzimatici, cât și impactul asupra mediului.

5.5. Concluzii parțiale

În cadrul acestui capitol a fost studiată imobilizarea de enzime pe materiale compozite de tip miez-înveliș obținute prin depunerea strat-după-strat de polielectroliti. Într-o primă

etapă, a fost studiată imobilizarea PEP ca enzimă model pe cele două tipuri de materiale, urmărindu-se studiul unor parametri de interes precum pH-ul și concentrația enzimei în soluția inițială, cantitatea de material organic depus pe microparticulele suport, respectiv aplicarea unor tratamente acido-bazice de flexibilizare și/sau reticularea chimică a învelișului organic. Ulterior optimizării parametrilor menționați, a fost studiată imobilizarea LAC în condițiile optimizate, în vederea obținerii unor biocatalizatori cu potențiale aplicații catalitice.

În cazul materialelor compozite obținute prin depunerea strat-după-strat de polielectroliți, studiile efectuate au evidențiat o serie de concluzii:

- principalele caracteristici care influențează imobilizarea enzimelor sunt stabilitatea învelișului organic, porozitatea acestuia, caracterul hidrofil/hidrofob și disponibilitatea grupărilor funcționale;
- caracteristicile enzimei au o influență crescută asupra procesului de imobilizare, optimizarea procesului presupunând determinarea pH-ului și a concentrației optime de imobilizare;
- în cazul materialelor cu LAC imobilizată a fost studiată activitatea catalitică a acestora, studiile realizate reliefând menținerea unei activități catalitice satisfăcătoare după imobilizarea enzimei, coroborată cu o îmbunătățire a stabilității enzimei imobilizate pe un domeniu mai larg de pH și la creșterea temperaturii, comparativ cu LAC în stare liberă;
- materialele compozite cu LAC imobilizată au un avantaj considerabil comparativ cu enzima liberă, putând fi utilizate cu succes în cel puțin șapte cicluri catalitice.

În ansamblu, se poate aprecia că cele mai bune rezultate au fost obținute la imobilizarea enzimelor la $\text{pH} = 4,5$, pe microparticulele obținute prin depunerea strat-după-strat de polielectroliți având 4,5 duble-straturi și care au fost supuse tratamentului acido-bazic. Întrucât valoarea de pH optimă pentru imobilizare poate determina denaturarea PEP, proprietățile catalitice ale acesteia nu au fost studiate. În schimb, rezultatele obținute la imobilizarea LAC, au evidențiat o bună interacțiune între materialele compozite miez-înveliș și enzima încărcată negativ, sugerând că aceste materiale compozite suport pot fi utilizate cu succes în imobilizarea unor enzime, cu menținerea unei activități enzimatiche satisfăcătoare, evidențiindu-se faptul că **imobilizarea are cele mai bune rezultate la $\text{pH} = 4,5$ și o concentrație a enzimei în intervalul 1 – 6 mg/mL.**

CAPITOLUL 6

OBTINEREA DE NANOSTRUCTURI PRIN FORMAREA DE COMPLECȘI INTERPOLIELECTROLITICI LACAZĂ/POLIMERI NATURALI

Rezultatele prezentate în acest capitol au făcut subiectul următoarelor publicații:

1. **Petrila, L. M.**, Karayianni, M., Vasiliu, T., Puf, R., Mihai, M., Pispas, S. (2025c). *Int J Biol Macromol.*, 322(2), 146754. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146754>
2. **Petrila, L. M.**, Ciobanu, T.A., Vasiliu, T., Pispas, S., Mihai, M. (2025d). *Biomacromolecules*, 26, 6244-6257. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5c01217>

6.2. Prepararea complecșilor lacază / chitosan

6.2.2. Studiul interacțiunii dintre LAC și CHI

Interacțiunea dintre LAC și CHI a fost investigată prin spectroscopie de fluorescență, pe baza studiilor de stingere a fluorescenței. Datorită prezenței reziduurilor de aminoacizi aromatici, cum sunt triptofanul, tirozina și fenilalanina, LAC prezintă fluorescență intrinsecă. Rolul triptofanului în emisia de fluorescență a LAC este semnificativ, deoarece LAC prezintă șapte reziduuri de triptofan (Saoudi, 2017). Pentru a determina K_{SV} , a fost utilizată regresia liniară, valorile K_{SV} și k_q determinate la fiecare temperatură fiind prezentate în Tabelul 6.1.

*Tabelul 6.1: Valorile constantei Stern-Volmer (K_{SV}), constantei de stingere bimoleculară (k_q), constantei aparentă de legare (K_a) și valorile numărului de situsuri de legare (n) la interacțiunea LAC cu CHI, la diferite temperaturi. R^2 - coeficient de corelație.
(Petrila, 2025d)*

Temperatura (K)	$K_{SV} (M^{-1})$	$k_q (M^{-1} \cdot s^{-1})$	R^2	$K_a (M^{-1})$	n	R^2
298	$1,56 \cdot 10^5$	$1,56 \cdot 10^{13}$	0,991	$6,30 \cdot 10^4$	0,93	0,987
303	$1,73 \cdot 10^5$	$1,73 \cdot 10^{13}$	0,985	$6,45 \cdot 10^3$	0,76	0,989
308	$1,90 \cdot 10^5$	$1,90 \cdot 10^{13}$	0,980	$4,78 \cdot 10^3$	0,73	0,990

După cum este prezentat în Tabelul 6.1., K_{SV} crește ușor cu temperatura, sugerând o stingere mai eficientă, după cum s-a raportat și pentru interacțiunea CHI cu albumina serică bovină (Bekale, 2015), dar și la interacțiunea CHI și a nanocompozitelor CHI/oxid de

grafenă cu β -galactozidaza (Li, 2025). Creșterea K_{SV} poate fi asociată cu o creștere a mișcării moleculare datorată temperaturii, care favorizează coliziunea dintre moleculele din sistem, dar nu implică neapărat o interacțiune mai puternică între acestea. Scăderea intensității fluorescenței observată odată cu creșterea temperaturii ar putea fi, de asemenea, rezultatul unei denaturări parțiale a LAC, indusă termic, care determină expunerea triptofanului din structura internă a enzimei, sporind șansele de interacțiune a acestuia cu CHI.

Mecanismul de stingere poate fi elucidat pe baza valorii constantei bimoleculare de stingere, k_q , luând în considerare faptul că, pentru procesele de stingere dinamice, valoarea maximă a acesteia pentru diverși stingători este în jur de $2 \cdot 10^{10} \text{ (M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ (Antonov, 2024; Lakowicz, 2006). Valorile calculate ale k_q pentru sistemele LAC/CHI (Tabelul 6.1.) sunt mult mai mari decât această valoare, ceea ce conduce la presupunerea că mecanismul de stingere observat este static (Lakowicz, 2006). Un efect similar a fost observat pentru stingerea fluorescenței intrinseci la diferite proteine în prezența CHI sau a derivaților de CHI, printre cele studiate numărându-se caseinatul de sodiu (Antonov, 2024), caseina (Ma, 2023), ovalbumina (Leite Milião, 2022), β -lactoglobulina (Agudelo, 2013), albumine serice bovine (Bekale, 2015; Liu, X., 2015) sau umane (Bekale, 2015).

Efectul temperaturii asupra interacțiunii dintre LAC și CHI poate fi evaluat pe baza constantei aparente de legare (K_a) și a numărului de situsuri de legare, care au fost calculate (Tabelul 6.1.) din graficul Stern-Volmer dublu logaritm (Figura 6.4 b). După cum se observă din valorile prezentate în Tabelul 6.1., la temperatură ambiantă există aproximativ un situs de legare pentru CHI. Constanta K_a scade cu temperatura, ceea ce sugerează că legarea este mai puțin favorabilă la creșterea temperaturii, iar stabilitatea complexului format scade cu creșterea temperaturii, așa cum s-a observat și în cazul altor sisteme care implică proteine (Asemi-Esfahani, 2021; Dehdasht-Heidari, 2021; Habibian Dehkordi, 2021). Un astfel de comportament este de așteptat deoarece temperatura accelerează mișcarea browniană, favorizând coliziunea dintre molecule, dar nu și legarea lor. În plus, temperatura poate induce modificări conformaționale în cazul moleculelor biologice, crescând sau scăzând accesibilitatea situsurilor de legare.

Pentru o mai bună înțelegere a mecanismului de interacțiune dintre LAC și CHI, au fost realizate simulări moleculare care au urmărit să evidențieze reziduurile de aminoacizi din structura enzimei care interacționează cu CHI. De asemenea, prin efectuarea de simulări la două valori de temperatură s-a urmărit evaluarea potențialului efect protector al CHI asupra enzimei. Conformația inițială și cea finală a LAC, în absența sau prezența CHI, obținute din simulările moleculare, sunt prezentate în Figura 6.5 a, în care enzima este

reprezentată tridimensional, cu evidențierea elementelor de structură secundară și în Figura 6.5 b, în care evidențiază îndeosebi suprafața exterioară a enzimei (*engl. quicksurface*).

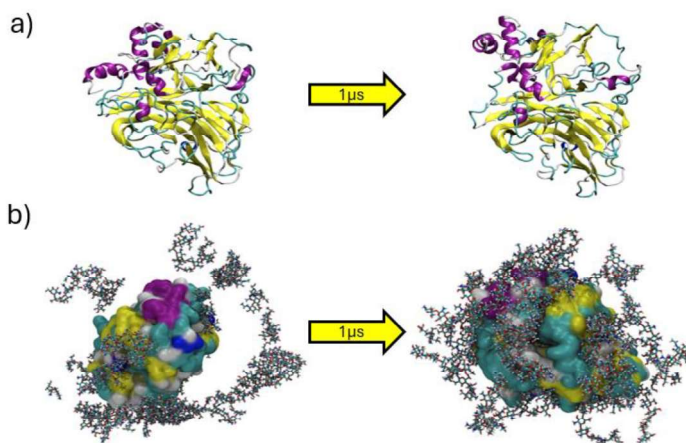


Figura 6.5: Conformația inițială și cea finală a LAC (a) și conformația inițială și finală a LAC la interacțiunea cu CHI (b). Pentru LAC, culoarea regiunilor este: α -helix magenta, β -pliate galben și conformație aleatorie în turcoaz. Pentru polimer, culoarea atomilor componenți este: N albastru, O roșu, C verde, iar H alb (Petrila, 2025d)

După cum evidențiază Figura 6.5 a, structura enzimei suferă modificări minime în timpul simulării de dinamică moleculară. Totodată, Figura 6.5 b evidențiază faptul că interacțiunea cu CHI are loc la suprafața enzimei, centrul catalitic al enzimei rămânând nemodificat din punct de vedere conformațional. Astfel, interacțiunea cu CHI determină formarea unui strat polimeric la suprafața enzimei care ar putea juca un rol important în stabilizarea moleculei.

6.2.3. Formarea și caracterizarea complexelor interpolielectrolitici

Formarea complexelor LAC/CHI a fost realizată prin adăugarea unor volume variabile de soluție de CHI 1 mg/mL preparată în soluție tampon acetat la pH = 4,5, peste soluția de LAC 0,5 mg/mL preparată în același solvent, conform metodei prezentate în **Capitolul 3, secțiunea 3.4.1**. Codificarea probelor respectă modelul $(LAC/CHI)_{RM}$, unde RM reprezintă raportul masic de amestecare între componente. Formarea complexelor LAC/CHI a fost urmărită prin intermediul DLS, analizând variația intensității luminii dispersate, indicele de polidispersitate și distribuția dimensională a complexelor formați.

O primă confirmare a formării complexelor interpolielectrolitici LAC/CHI a fost obținută analizând variația intensității luminii dispersate în funcție de raportul masic dintre componente (Karayianni, 2024). Astfel, după cum este evidențiat în Figura 6.7 a, intensitatea luminii dispersate crește odată cu creșterea cantității de CHI utilizată la formarea

complecșilor, demonstrând formarea cu succes a nanostructurilor și sugerând faptul că polizaharida joacă un rol important în caracteristicile complecșilor formați. De asemenea, se remarcă faptul că indicele de polidispersitate are valori destul de scăzute pentru toate probele (Figura 6.7 b), sugerând faptul că nanostructurile formate au dimensiuni relativ omogene.

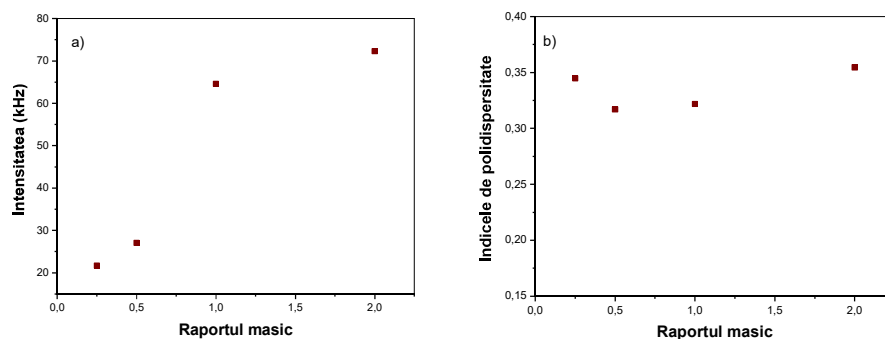


Figura 6.7: Variația intensității luminii dispersate (a) și a indicelui de polidispersitate (b) în funcție de raportul de masă utilizat la formarea complecșilor

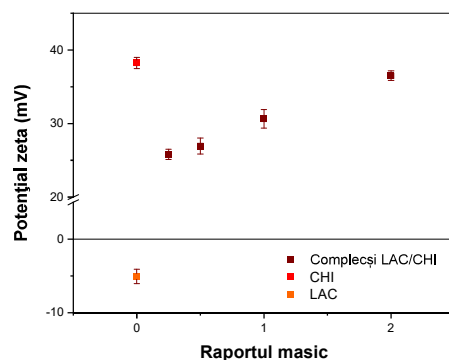


Figura 6.9: Potențialul zeta al nanostructurilor LAC/CHI în comparație cu valorile pentru LAC și CHI

Măsurătorile de potențial zeta (Figura 6.9.) evidențiază faptul că toți complecșii formați sunt încărcăți ionic pozitiv ceea ce sugerează faptul că suprafața enzimei este acoperită parțial de catene de CHI, după cum au evidențiat și simulările moleculare (Figura 6.5.). O variație similară a potențialului zeta a fost observată și de către Li și colaboratorii care au studiat formarea de complecși interpolielectrolitici între CHI și proteina α -lactoglobulină extrasă din zer (Li, 2018) și de către Bourouis și colaboratorii care au studiat formarea complecșilor CHI cu proteine din soia (Bourouis, 2025), concluzionând că la formarea complecșilor, proteina este înconjurată de catenele de CHI, încărcarea ionică pozitivă a acestuia fiind cea care dictează sarcina globală a nanostructurilor formate. Valorile potențialului zeta măsurat pentru nanostructurile formate sunt ușor mai mici decât potențialul

zeta al CHI în soluție, demonstrând faptul că un rol important în formarea complexelor îl are procesul de neutralizare parțială a sarcinilor opuse de pe catenele de CHI și LAC, respectiv formarea interacțiunilor electrostatice între cele două macromolecule.

6.2.5. Evaluarea proprietăților catalitice ale nanostructurilor LAC/CHI

Un aspect extrem de important în cazul nanostructurilor înglobând enzime este efectul procesului de complexare asupra structurii terțiare a enzimei, respectiv asupra capacității catalitice a acesteia. Activitatea catalitică a nanostructurilor LAC/CHI a fost studiată urmărind oxidarea ABTS și a fost comparată cu activitatea soluției inițiale de LAC, rezultatele fiind prezentate în Figura 6.11.

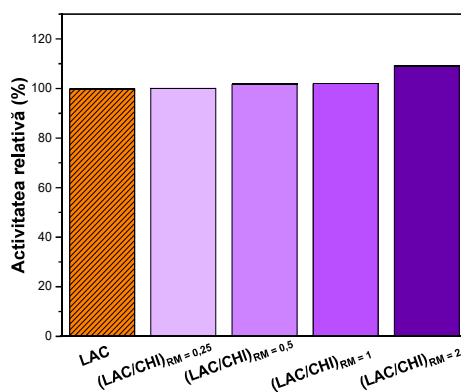


Figura 6.11: Activitatea enzimatică relativă a nanostructurilor LAC/CHI comparată cu activitatea LAC în soluție (Petrila, 2025d)

După cum este evidențiat în Figura 6.11., activitatea enzimatică a LAC nu variază puternic după înglobarea acesteia în complexii interpolielectrolitici, demonstrând faptul că interacțiunea cu CHI nu afectează proprietățile catalitice ale enzimei. Se remarcă totuși o creștere a activității catalitice de ~3% pentru complexii preparați la $RM = 0,25 - 1$, respectiv de ~10% pentru complexii preparați la $RM = 2$, care poate sugera faptul că CHI stabilizează structura enzimei, permițând totodată și accesul la centrul activ al acesteia. Creșterea activității catalitice în cazul complexelor LAC/CHI poate fi datorată și modificărilor produse de introducerea nanostructurilor în mediul de reacție, ce pot determina modificarea pH-ului spre valoarea optimă pentru enzimă, reducerea repulsiilor electrostatice dintre enzimă și substrat sau intensificarea interacțiunilor secundare care permit legarea substratului la centrul activ al enzimei.

Un alt aspect important legat de activitatea catalitică a enzimelor este stabilitatea acestora în diferite condiții experimentale. Un prim aspect de luat în considerare este pH-ului mediului care poate influența interacțiunea enzimei cu substratul, dar și stabilitatea

nanostrucurilor în care este înglobată LAC. În acest sens, a fost studiată influența pH-ului asupra activității catalitice a LAC în soluție și a complexelor LAC/CHI, utilizând soluții de ABTS preparate la diferite valori de pH.

După cum este prezentat în Figura 6.12 a, variația pH-ului influențează puternic activitatea catalitică atât în cazul soluției de LAC, cât și a LAC înglobate în nanostructuri, confirmând faptul că formarea complexelor LAC/CHI nu modifică caracteristicile catalitice ale enzimei. Astfel, se remarcă faptul că cea mai mare activitate enzimatică a fost obținută la pH = 3,5 atât în cazul enzimei libere, cât și a nanostructurilor LAC/CHI, această valoare de pH fiind optimă pentru enzima utilizată, după cum a fost evidențiat și în cadrul **Capitolului 5**. În ceea ce privește activitatea enzimatică a nanostructurilor, se remarcă faptul că la pH scăzut (3,5) activitatea enzimatică este ridicată, similar enzimei libere. În schimb, creșterea pH-ului determină o scădere accentuată a activității catalitice, tendință care se menține atât în cazul enzimei libere, cât și a nanostructurilor.

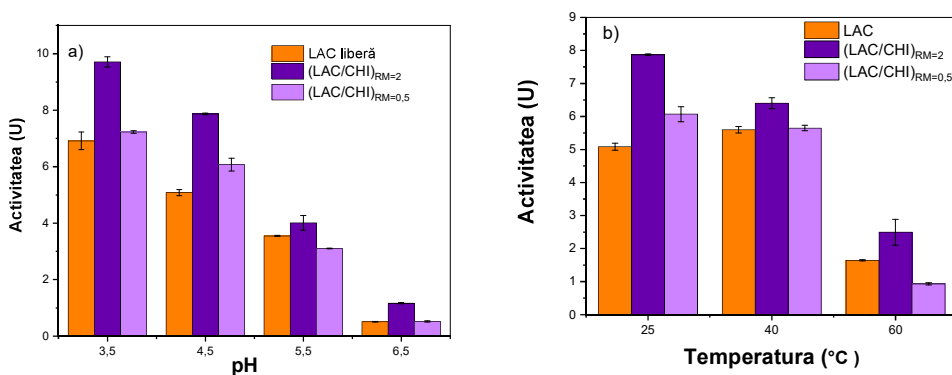


Figura 6.12: Influența pH-ului (a) și a temperaturii (b) asupra activității catalitice a LAC în soluție și a nanostructurilor LAC/CHI

De remarcat este faptul că la valori superioare de pH activitatea catalitică este ușor mai mare în cazul nanostructurilor decât în cazul soluției de enzimă analizată în condiții similare, sugerând faptul că cel puțin în cazul nanostructurilor formate la rapoarte masice mai mari, formarea complexelor are un rol protector asupra enzimei. Totodată, variația activității catalitice cu variația pH-ului urmează o tendință similară pentru enzima liberă și pentru cea înglobată în nanostructuri, confirmând faptul că formarea complexelor nu afectează puternic structura și parametrii cinetici ai enzimei.

Un efect similar este observat și în ceea ce privește stabilitatea enzimei la temperatură. Astfel, analizând activitatea enzimatică a LAC și a complexelor LAC/CHI după incubarea la diferite temperaturi, se remarcă o scădere considerabilă a activității catalitice după

incubare la temperaturi mai mari de 40 °C, datorată, cel mai probabil degradării termice a enzimei (Figura 6.12 b). Totuși, în cazul nanostructurilor LAC/CHI, se pot observa activități catalitice mai mari decât a enzimei libere după incubarea la temperatură, sugerând menținerea unei mai bune integrități structurale comparativ cu enzima în stare nativă. Astfel, atât în cazul variațiilor de pH, cât și în cazul variațiilor de temperatură, se poate observa că nanostructurile LAC/CHI obținute la concentrații mai mari de CHI (RM = 2) își păstrează mai bine caracteristicile comparativ cu probele obținute cu mai puțin CHI (RM = 0,5), ceea ce sugerează că rolul protector al CHI este dependent și de cantitatea de polimer utilizat.

6.3. Prepararea nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM

6.3.2. Formarea și caracterizarea complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM

Formarea nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM a fost realizată conform metodei prezentate în **Capitolul 3, secțiunea 3.4.2**. Codificarea probelor respectă modelul (LAC/CHI-g-PNIPAM)_{RM}, unde RM reprezintă raportul masic de amestecare între componente. Formarea nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM a fost confirmată de creșterea intensității luminii dispersate, după cum este evidențiat în Figura 6.18 a, în mod similar ca în cazul nanostructurilor LAC/CHI.

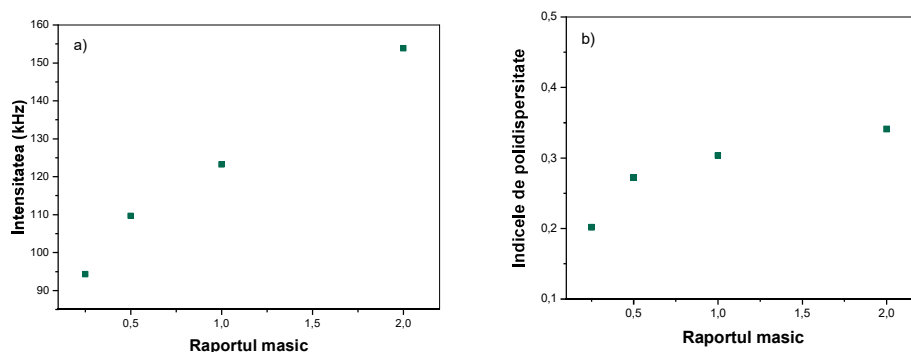


Figura 6.18: Variația intensității luminii dispersate (a) și a indicelui de polidispersitate (b) cu raportul masic pentru nanostructurile preparate la pH = 4,5 (rezultate publicate parțial în **Petrila, 2025c**)

Și în acest caz intensitatea luminii dispersate crește cu creșterea cantității de polizaharidă utilizată, sugerând formarea unor nanostructuri de dimensiuni mai mari sau cu densitate mai mare. În ceea ce privește polidispersitatea nanostructurilor formate (Figura 6.18 b), se remarcă faptul că valorile indicelui de polidispersitate sunt destul de reduse, confirmând obținerea unor nanostructuri cu dimensiuni relativ omogene.

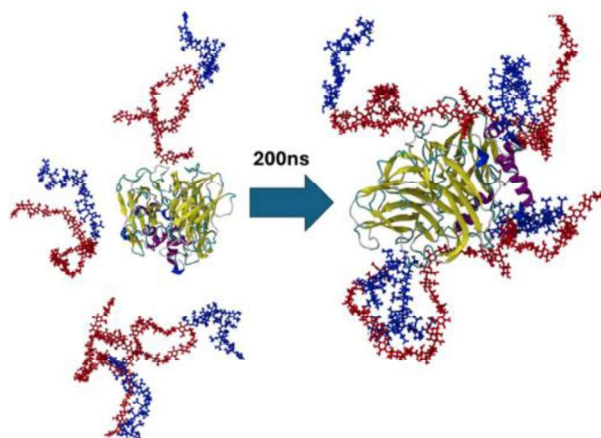


Figura 6.20: Secvențe din simulare reprezentând conformația inițială a sistemului enzimă-copolimer și complexul LAC/CHI-g-PNIPAM obținut după 200 ns de interacțiune. CHI este colorat în roșu, iar PNIPAM este colorat în albastru (**Petrila, 2025c**)

Studiul interacțiunii dintre LAC și CHI-g-PNIPAM, realizat prin simulare dinamică moleculară, coroborează aceste observații. Astfel, simularea efectuată plecând de la 4 molecule de CHI-g-PNIPAM plasate în proximitatea enzimei evidențiază faptul că interacțiunea dintre proteină și polizaharidă este rapidă, conducând la formarea de nanostructuri, după cum evidențiază Figura 6.20.

Simulările efectuate conduc la două constatări principale: (1) atât catenele de CHI cât și cele de PNIPAM din copolimer interacționează cu enzima și (2) aceste interacțiuni au loc la suprafața enzimei, după cum se evidențiază mai clar în Figura 6.21.

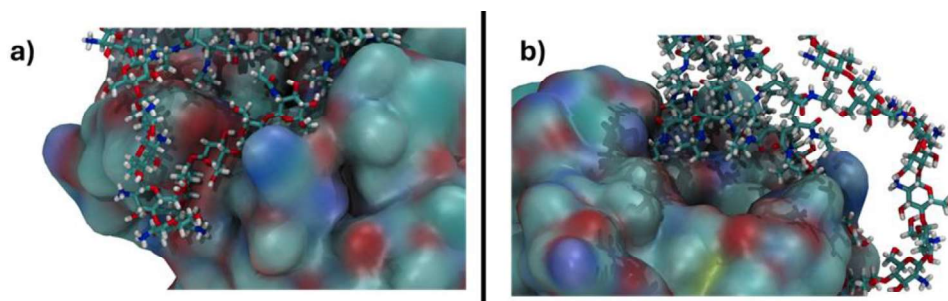


Figura 6.21: Detaliu ilustrând interacțiunea dintre CHI și LAC (a), respectiv interacțiunea dintre LAC și PNIPAM (b). Pentru copolimer, codul de colorare al atomilor este următorul: N - albastru, O - roșu, C - verde teal, iar H - alb.

Suprafața enzimei urmează același principiu de colorare (**Petrila, 2025c**)

Astfel, după cum este prezentat în Figura 6.23., toate nanostructurile formate sunt încărcate ionic pozitiv, cu valorile ale potențialului zeta variind între +16 și +26 mV. Potențialul zeta crește ușor la creșterea raportului masic LAC/CHI-g-PNIPAM, demonstrând faptul că încărcarea pozitivă a copolimerului este cea care dictează proprietățile

nanostrucurilor formate, totodată confirmând faptul că acesta este dispus la suprafața nanostructurilor formate. Acest lucru poate fi observat și în Figurile 6.21. și 6.22. în care sunt prezentate rezultate ale simulării moleculare, care evidențiază clar că polizaharida este legată electrostatic la suprafața enzimei, ceea ce conduce la o sarcină ionică netă pozitivă pe suprafața acesteia. Totodată, scăderea potențialului zeta al nanostructurilor comparativ cu soluția inițială de CHI-g-PNIPAM demonstrează o neutralizare parțială a sarcinilor la complexarea CHI-g-PNIPAM cu LAC.

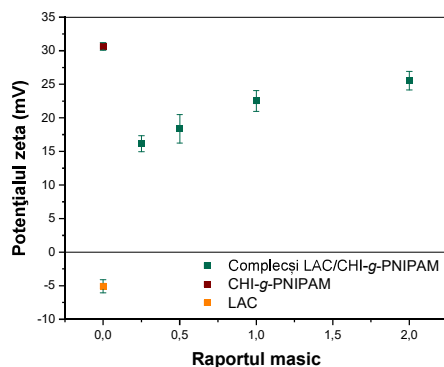


Figura 6.23: Variația potențialului zeta în funcție de raportul masic pentru nanostructurile preparate la pH = 4,5 (Petrila, 2025c)

6.3.5. Evaluarea proprietăților catalitice ale nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM

Evaluarea activității catalitice a nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM este determinantă în stabilirea unor potențiale aplicații ale acestora și a fost evaluată în oxidarea ABTS, rezultatele fiind prezentate în Figura 6.29.

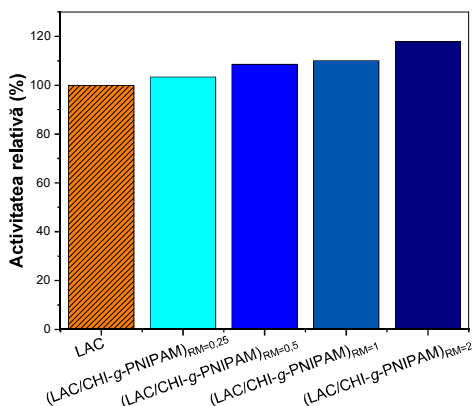


Figura 6.29: Activitatea catalitică relativă a nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM în comparație cu activitatea LAC în soluție (Petrila, 2025c)

După cum s-a observat și în cazul complexșilor LAC/CHI, complexarea cu CHI-g-PNIPAM determină o ușoară creștere a activității catalitice a LAC. Aceste rezultate confirmă

faptul că prezența copolimerului nu conduce la denaturarea enzimei, ci dimpotrivă determină o creștere a accesibilității centrului activ sau o creștere a afinității dintre substrat și enzimă ca urmare a unei adsorbții mai bune a ABTS pe suprafața complexului. Totodată, creșterea activității enzimatice se poate datora și creării unui mediu optim pentru desfășurarea reacției catalitice.

De o importanță capitală este și stabilitatea activității catalitice a complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM în diferite condiții experimentale. Variația pH-ului poate influența drastic activitatea enzimatică, deoarece poate afecta gradul de ionizare al substratului, dar și interacțiunea acestuia cu enzima. Efectul pH-ului asupra activității catalitice a LAC și a complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM a fost evaluat în intervalul 3,5-6,5, folosind oxidarea ABTS ca reacție catalitică model, rezultatele fiind prezentate în Figura 6.31 a.

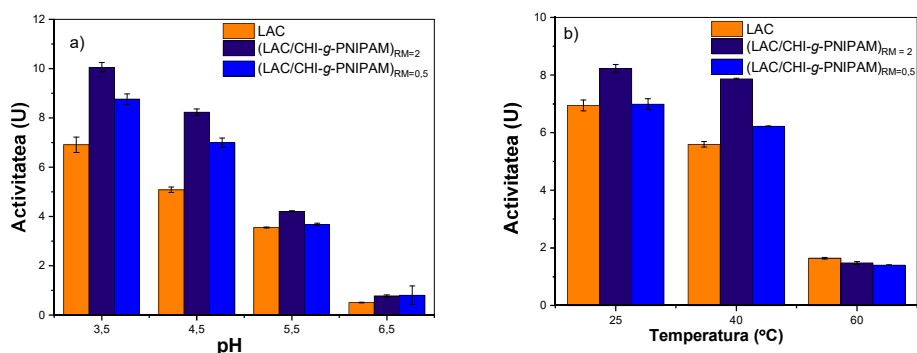


Figura 6.1: Efectul pH-ului (a) și a temperaturii (b) asupra activității catalitice a complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM (Petrila, 2025c)

După cum este prezentat în Figura 6.31 a, pH-ul influențează puternic activitatea catalitică atât în cazul LAC în soluție, cât și a complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM. Cea mai mare activitate enzimatică a fost înregistrată la pH = 3,5 atât pentru LAC liberă, cât și pentru LAC încorporată în nanostructuri, demonstrând că formarea complexelor cu CHI-g-PNIPAM nu modifică esențial caracteristicile enzimei. Creșterea pH-ului conduce la o scădere progresivă a activității enzimatice, probabil datorită scăderii capacității de interacțiune dintre enzimă și substrat. În plus, creșterea pH-ului poate determina modificări structurale atât în enzima liberă, cât și în cazul nanostructurilor, ceea ce conduce la o pierdere semnificativă a activității enzimatice. Cu toate acestea, se poate observa că activitatea catalitică a nanostructurilor este mai mare la toate valorile de pH în comparație cu cea a enzimei libere, ceea ce sugerează că formarea complexelor cu CHI-g-PNIPAM a indus un efect pozitiv asupra enzimei, protejând-o de efectul negativ al variațiilor în condițiile de mediu.

Temperatura este un alt parametru care poate afecta activitatea enzimatică a LAC libere și imobilizate. Stabilitatea termică a LAC în soluție și a nanostructurilor a fost evaluată prin determinarea activității enzimatică după incubarea probelor la diferite temperaturi timp de 15 minute (Figura 6.31 b). Incubarea LAC și a complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM la temperaturi mai ridicate conduce la o scădere importantă a activității enzimatică, cel mai probabil cauzată de perturbarea structurii terțiare a enzimei, cu alterarea situsului activ sub efectul temperaturii. Acest efect este de așteptat având în vedere că enzima a fost expusă la temperaturi ridicate la care apare o tranziție de fază a catenelor laterale de PNIPAM, și care poate genera rearanjări ale catenelor copolimerice din jurul enzimei. Cu toate acestea, activitatea catalitică a nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM incubate la temperaturi ≤ 40 °C este mai mare comparativ cu activitatea catalitică a soluției LAC incubată în condiții similare, evidențiind efectul benefic al complexării CHI-g-PNIPAM asupra stabilității enzimei.

6.4. Concluzii parțiale

Acest capitol prezintă formarea de nanostructuri prin interacțiunea dintre LAC și două polizaharide – CHI și CHI-g-PNIPAM. Primul studiu a urmărit formarea nanostructurilor LAC/CHI, acordând o importanță crescută elucidării mecanismului de interacțiune dintre enzimă și polizaharidă. Astfel, sunt prezentate o serie de studii de fluorescență care servesc drept punct de plecare în analiza interacțiunilor dintre LAC/CHI, prin intermediul unor modele teoretice consacrate. Rezultate obținute în urma acestei analize au fost confirmate prin studii de simulare de dinamică moleculară, evidențiind tipul de interacțiuni și modul de legare în sistemul LAC/CHI, o importanță crescută fiind acordată caracterizării nanostructurilor prin prisma menținerii activității catalitice a enzimei înglobate. Principalele concluzii observate în urma acestor studii sunt:

- LAC și CHI sunt capabile să interacționeze în condițiile analizate, principalele tipuri de interacțiuni care se formează fiind cele electrostatice, legăturile de hidrogen și forțele van der Waals;
- formarea nanostructurilor LAC/CHI depinde de raportul masic dintre enzimă și polizaharidă, nanostructurile formate având o sarcină globală pozitivă;
- înglobarea LAC în nanostructuri cu CHI nu determină denaturarea enzimei sau modificări conformaționale importante, dar determină o ușoară creștere a activității enzimatică ca urmare a stabilizării structurii enzimei și a favorizării interacțiunii cu substratul;

- CHI joacă un rol stabilizant pentru enzimă la variațiile de temperatură și pH, dar și la depozitare, asigurând o menținere mai bună a activității catalitice comparativ cu soluția de enzimă analizată în condiții similare.

Cel de-al doilea studiu prezentat a investigat formarea de nanostructuri între LAC și CHI-g-PNIPAM, analizând rezultatele și din perspectiva proprietăților de termosensibilitate ale polizaharidei grefate. Rezultatele obținute au demonstrat formarea cu succes a nanostructurilor, alături de o serie de aspecte principale:

- raportul masic dintre componente influențează dimensiunea și proprietățile nanostructurilor formate, similar nanostructurilor pe bază de CHI;
- utilizarea CHI-g-PNIPAM în formarea nanostructurilor compozite determină o autoasamblare mai omogenă a sistemului, acestea adoptând o conformație aproximativ sferică mai bine definită decât în cazul sistemului LAC/CHI;
- utilizarea polizaharidei modificate induce nanostructurilor proprietăți de sensibilitate la temperatură;
- nanostructurile au prezentat o creștere semnificativă a activității catalitice a enzimei, precum și o îmbunătățire a stabilității acesteia la variațiile de temperatură și pH și la depozitare în comparație cu enzima nativă.

Rezultatele prezentate în acest capitol evidențiază capacitatea de interacțiune dintre enzime și polizaharide, cu formarea unor nanostructuri care îmbunătățesc caracteristicile catalitice ale enzimei. Nanostructurile astfel formate sunt stabile în diferite condiții de mediu, pot prezenta răspuns la stimuli externi și pot cataliza cu succes reacții specifice.

CAPITOLUL 7

UTILIZAREA MATERIALELOR COMPOZITE

OBȚINUTE PRIN IMOBILIZAREA LACAZEI

ÎN DEGRADAREA CATALITICĂ A COLORANȚILOR

Rezultatele prezentate în acest capitol au făcut subiectul următoarelor publicații:

1. **Petrila, L. M., Bucatariu, F., Stoica, I., Mihai, M., Froidevaux, R. (2025a).** *J Environ Chem Eng*, 13(2), 115631. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.115631>
2. **Petrila, L. M., Karayianni, M., Vasiliu, T., Puf, R., Mihai, M., Pispas, S. (2025c).** *Int J Biol Macromol.*, 322(2), 146754. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146754>
3. **Petrila, L. M., Ciobanu, T.A., Vasiliu, T., Pispas, S., Mihai, M. (2025d).** *Biomacromolecules*, 26, 6244-6257. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5c01217>

7.3. Degradarea IC sub acțiunea LAC immobilizate pe microparticule compozite obținute prin depunere strat-după-strat de polielectroliți

7.3.1. Evaluarea capacității sistemului enzimă/ mediator de a degrada coloranți utilizând enzima immobilizată

Utilizarea compozitelor cu LAC immobilizată în degradarea IC a fost testată în prezența aceluiași mediator, utilizând materialele compozite $LAC1@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA)$ și $LAC1@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$. După cum este prezentat în Figura 7.3., se poate remarca faptul că ambele materiale compozite își mențin capacitatea de degradare a colorantului în prezența celor doi mediatori testați.

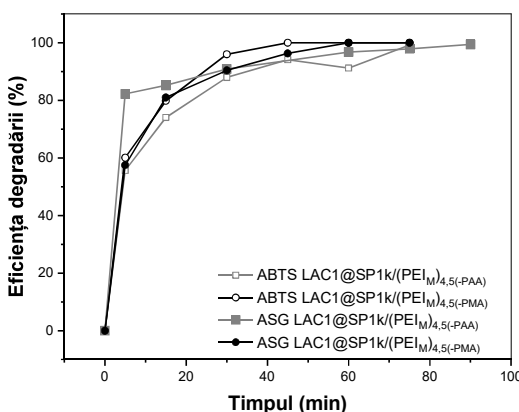


Figura 7.3: Eficiența degradării IC în prezența materialelor compozite $LAC1@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA)$ și $LAC1@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$, utilizând ca mediator ABTS sau ASG (Petrița, 2025a)

Utilizarea ASG ca mediator a condus la o degradare mai rapidă, de până la 80%, în cazul probei $LAC1@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA)$, dar a avut un impact mai redus în cazul $LAC1@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$, sugerând o interacțiune mai bună între mediatori și cel de-al doilea material compozit. Cel mai probabil, degradarea mai rapidă a probei de colorant în prezența ASG este favorizată de masa moleculară mai mică a mediatorului care poate difuza mai ușor către situsul activ, chiar și atunci când se utilizează enzima immobilizată. Deși ASG este oxidat mai lent de enzimă, forma sa oxidată este mai stabilă, favorizând transformarea colorantului în produșii săi de degradare (Cañas, 2010). S-a observat, de asemenea, că atunci când se utilizează ca suport pentru imobilizarea LAC materialul compozit obținut cu PMA, degradarea probei de colorant este mai rapidă, atât datorită cantității mai mari de LAC immobilizată, cât și a stabilității sale mai bune, după cum s-a observat anterior din testele de activitate enzimatică (Figura 5.5 b).

7.3.6. Reutilizarea materialelor compozite

În ceea ce privește reutilizarea materialelor compozite $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA)$ și $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$, acestea au fost testate cu succes în 4 cicluri de degradare a colorantului, cu o eficiență de degradare de 100%. O observație interesantă a fost faptul că, pe măsură ce materialele $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA)$ și $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$ sunt reutilizate, timpul necesar pentru degradarea completă a probei de colorant crește ușor, dar, cu toate acestea, degradarea completă a IC poate fi realizată. Din acest motiv, eficiența degradării a fost calculată pentru fiecare tip de material compozit testat ținând cont de timpul cel mai mic necesar pentru degradarea completă a probei de colorant (corespunzător primului ciclu de utilizare) (Figura 7.8.).

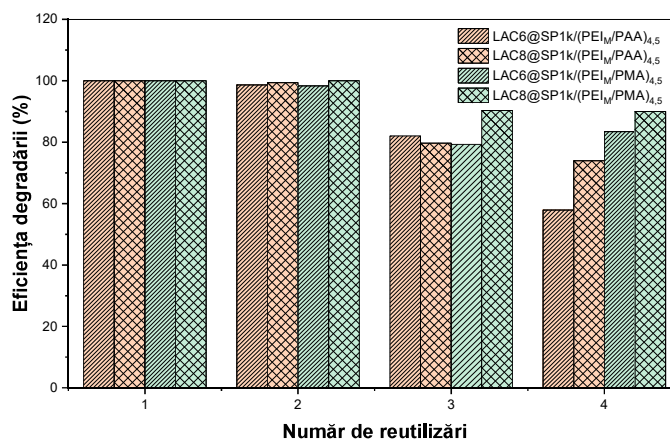


Figura 7.8: Eficiența degradării IC sub acțiunea $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA)$, și $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$, (Petrila, 2025a)

Scăderea eficienței de degradare odată cu creșterea numărului de reutilizări a $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA)$ și $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$ (evidențiată prin creșterea timpului necesar degradării complete a colorantului) este un fenomen normal care poate fi asociat cu acumularea unor impurități pe suprafața materialelor compozite, reducând difuzia reactivilor și, prin urmare, eficiența enzimei imobilizate. Cu toate acestea, degradarea colorantului observată în acest studiu a fost mai mare de 60% chiar și după 4 cicluri de reutilizare, demonstrând stabilitatea sporită a enzimei imobilizate.

7.3.7. Mecanismul de degradare enzimatică a IC

Elucidarea mecanismului de degradare enzimatică a colorantului este extrem de importantă în evaluarea eficienței și siguranței procesului de depoluare a apelor întrucât scindarea moleculei de colorant poate determina formarea unor metaboliți potențial mai toxici decât molecula de plecare. În acest context, diferite metode analitice pot fi utilizate

pentru identificarea intermediarilor de reacției, precum și la evaluarea eficienței procesului de degradare enzimatică. Mecanismul de degradare a IC sub acțiunea LAC a fost investigat prin două metode analitice utilizate complementar, respectiv ESI-MS și HPLC-MS. Degradarea colorantului a fost testată utilizând o soluție de IC de concentrație 50 mg/L, în prezența ASG, la temperatură ambiantă, utilizând LAC4@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA) și, comparativ, o soluție de LAC 1 mg/mL, pH = 4,5. Pentru o mai bună evidențiere a compușilor obținuți prin degradare enzimatică au fost propuse două metodologii experimentale (descrise în Capitolul 3, subcapitolul 3.7.9): (i) *metoda ESI(+)* – MS și *ESI(-)* – MS, constând în prelevarea de eșantioane din mediul de reacție la fiecare 5 minute și analiza lor directă prin ESI-MS, utilizându-se atât modul de ionizare pozitiv cât și cel negativ și (ii) *metoda HPLC-MS* constând în prelevarea de eșantioane din mediul de reacție la fiecare 10 minute, separarea moleculelor pe o coloană cromatografică de tip C18 și analiza directă a compușilor prin ESI-MS.

În Figura 7.13. sunt prezentate spectrele de masă obținute pentru eșantioane prelevate din mediul de reacție și înregistrate în modul de ionizare negativ. În spectrele prezentate, se pot observa o serie de semnale care apar la rapoarte m/z mai mari (m/z 263, 305, 341, 387, 427, 469) care pot fi atribuite prezenței solventului și a aducților pe care acesta îi formează la ionizare.

Pentru o identificare mai precisă a eventualilor produși de degradare, a fost selectată o secțiune de interes a spectrelor înregistrate care este prezentată la o scară mărită în Figura 7.13 b. Astfel, se evidențiază prezența mediatorului la m/z 151, 166 și 181, după cum a fost identificat și în spectrul de masă al soluției inițiale de ASG (Figura 7.10.). Totodată, prezența moleculei inițiale de colorant este evidențiată prin semnalul m/z 210, după cum a fost identificat și în literatura de specialitate (Wang, 2022) și confirmat în spectrul de masă al soluției de colorant (Figura 7.9 a). Se remarcă faptul că semnalul înregistrat pentru molecula de colorant scade în intensitate pe parcursul degradării și dispare complet după circa zece-cinsprezece minute de reacție, sugerând scindarea moleculei de colorant. Coroborat cu dispariția culorii probei după circa 10 minute observată vizual, se poate aprecia că degradarea IC are loc printr-un mecanism care determină, în primă etapă, scindarea grupărilor cromofore ale colorantului.

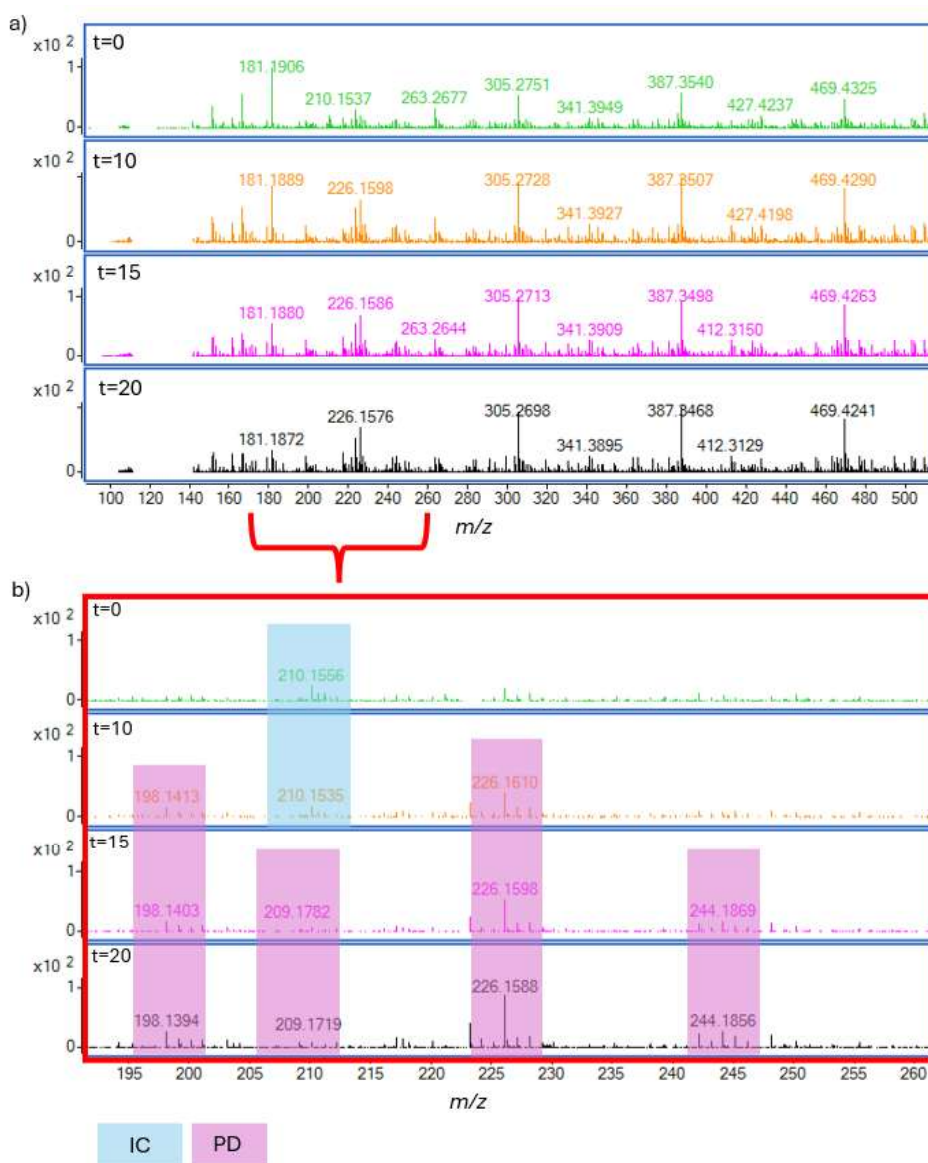


Figura 7.11: (a) Spectrele de masă înregistrate în modul ESI (–) la degradarea enzimatică a IC utilizând LAC4@(*SP1k*/(*PEI*)_{4,5}(-PMA) și (b) secțiune reprezentând o regiune de interes a acestora și spectre (PD – produși de degradare)

În ceea ce privește potențialii produși de degradare ai IC, se evidențiază prezența a două semnale principale la m/z 226, care este asociat cu prezența acidului isatin 5-sulfonic, și la m/z 198, asociat cu prezența acidului indolin 5-sulfonic, aceștia fiind principalii metaboliți obținuți la degradarea enzimatică a IC, după cum au raportat și alți cercetători (Ahlawat, 2022; Leontieș, 2022; Wang, 2022). Se remarcă faptul că semnalul acestor compuși apare inclusiv în eșantionul prelevat la 10 minute, sugerând faptul că reacția de degradare enzimatică este foarte rapidă.

7.4. Degradarea coloranților IC și CR sub acțiunea nanostructurilor LAC/CHI și LAC/CHI-g-PNIPAM

7.4.1. Evaluarea capacității nanostructurilor LAC/CHI de a cataliza degradarea unor coloranți

Condițiile selectate pentru studiile de degradare a coloranților au fost stabilite pe baza celor prezentate în cadrul secțiunii 7.3. Testele au fost realizate utilizând nanostructurile LAC/CHI, determinând capacitatea de degradare a unor soluții apoase de IC sau CR de concentrație inițială 50 mg/L, rezultatele obținute fiind prezentate în Figura 7.18.

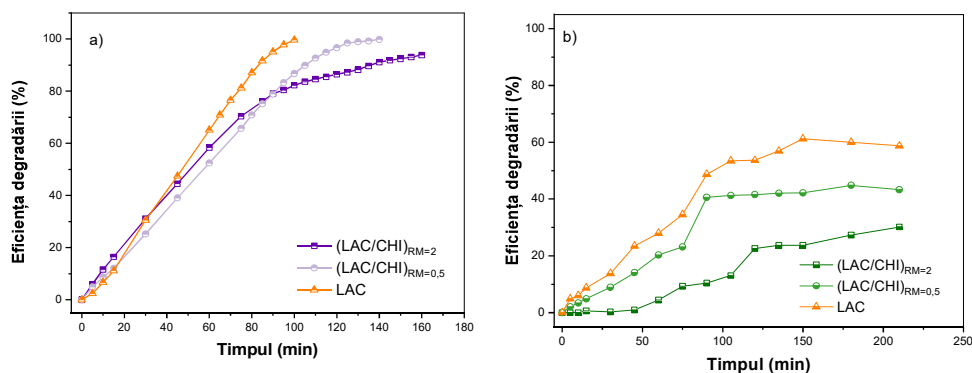


Figura 7.18: Eficiența degradării IC (a) și CR (b) utilizând LAC sau LAC/CHI (Petrila, 2025d)

După cum este prezentat în Figura 7.18., înglobarea LAC în nanostructurile pe bază de CHI influențează capacitatea acestora de a degrada coloranți, afectând cinetica procesului de degradare. Astfel, în cazul degradării IC (Figura 7.18 a), se observă degradarea completă a probei de colorant în prezența nanostructurilor LAC/CHI, dar cu o viteză mai redusă comparativ cu utilizarea LAC libere. Se remarcă faptul că în primele 20-30 de minute de contact, viteza de degradare este aproape constantă atât pentru LAC în soluție, cât și pentru nanostructurile LAC/CHI, ceea ce sugerează că, în timpul acestei faze inițiale, interacțiunea dintre enzimă, mediator și molecula de colorant are loc în mod eficient, iar situsurile catalitice sunt probabil saturate, permițând degradarea cu o viteză aproape maximă. Totodată, în cazul nanostructurilor LAC/CHI, acest efect poate fi generat și de adsorbția moleculelor de IC pe suprafața încărcată pozitiv a nanostructurilor, facilitând astfel interacțiunea colorantului cu enzima. Pe măsură ce reacția avansează, se observă diferențe în profilurile de degradare enzimatică a colorantului IC. Astfel, se remarcă faptul că pentru nanostructurile LAC/CHI viteza de degradare scade treptat, sugerând că prezența CHI joacă un rol esențial în eficiența catalitică a acestor nanostructuri. Viteza de degradare a

colorantului este mai mică în cazul complexilor LAC/CHI_{RM=2}, un comportament care confirmă faptul că degradarea enzimatică a colorantului este un proces limitat de difuzie, prezența unui număr mai mare de catene de CHI în structura complexilor LAC/CHI scăzând accesibilitatea situsului activ al enzimei sau expulzarea produșilor de degradare. Acest efect este extrem de important în contextul degradării IC, deoarece structura chimică mai complexă a colorantului împiedică accesibilitatea acestuia la centrul catalitic al enzimei, în timp ce prezența unui sistem conjugat în structura sa induce o stabilitate superioară și rezistență la degradarea enzimatică comparativ cu molecule cu structură mai simplă. Cu toate acestea, degradarea colorantului este completă atât în prezența enzimei în soluție cât și a nanostructurilor LAC/CHI, demonstrând faptul că aceste sisteme păstrează activitatea catalitică a LAC, chiar și în cazul degradării unor compuși mai complecși. Deși degradarea colorantului este mai lentă în prezența nanostructurilor LAC/CHI, stabilitatea acestora la factorii de mediu este mai mare, ceea ce ar putea prezenta avantaje comparativ cu enzima în soluție în degradarea coloranților în medii mai complexe. În cazul CR, se poate observa faptul că degradarea nu este completă, nici în prezența enzimei în soluție nici a nanostructurilor, acest colorant fiind mai stabil la degradare enzimatică. Totuși, soluția de LAC are o capacitate de degradare mai mare comparativ cu nanostructurile LAC/CHI, facilitând degradarea a aproximativ 55% din colorant la o concentrație inițială de 50 mg/L, comparativ cu doar 20-25% în cazul complexului (LAC/CHI)_{RM=2}. Eficiența de degradare mai scăzută în cazul CR poate fi explicată printr-o combinație de factori, inclusiv afinitatea mai scăzută dintre colorant și enzimă, masa molară mai mare și structura mai complexă a colorantului care îngreunează transferul de masă, făcând degradarea enzimatică a CR mai dificilă (Stoilova, 2010).

7.4.2. Evaluarea capacității nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM de a cataliza degradarea unor coloranți

Rezultatele obținute pentru nanostructurile LAC/CHI confirmă faptul că acestea mențin capacitatea catalitică a enzimei, putând acționa drept catalizatori pentru degradarea unor poluanți din mediu. În continuare, a fost testată capacitatea catalitică a nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM în degradarea celor doi coloranți, la o concentrație inițială de 50 mg/L, utilizând ASG ca mediator, rezultatele fiind prezentate în Figura 7.20.

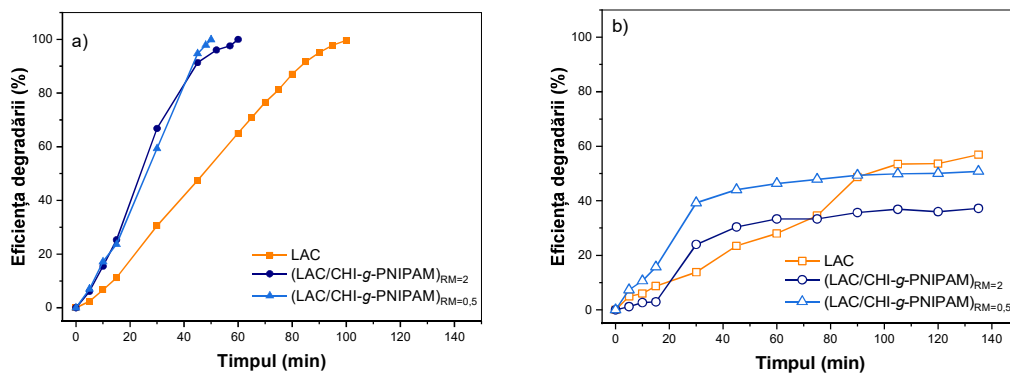


Figura 7.20: Eficiența degradării unor probe de IC (a) și CR (b) de concentrație inițială 50 mg/L, în prezența LAC în soluție sau a nanostructurilor $(\text{LAC/CHI-g-PNIPAM})_{\text{RM}=2}$ și $(\text{LAC/CHI-g-PNIPAM})_{\text{RM}=0,5}$ (Petrila, 2025c)

Pentru comparație, în Figura 7.20 au fost adăugate și curbele de degradare a celor doi coloranți în prezența LAC libere, prezentate și anterior în Figura 7.18. După cum este prezentat în Figura 7.20., degradarea IC este completă atât în prezența soluției de LAC, cât și a nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM. Degradarea IC în prezența LAC în soluție s-a realizat în aproximativ 80-90 de minute, în timp ce utilizarea nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM a determinat o creștere a vitezei de degradare, observându-se degradarea completă a probei de IC în aproximativ 45 de minute sub acțiunea complexului $(\text{LAC/CHI-g-PNIPAM})_{\text{RM}=0,5}$ și 60 de minute în prezența $(\text{LAC/CHI-g-PNIPAM})_{\text{RM}=2}$. Aceste rezultate evidențiază eficiența mai ridicată a nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM în degradarea IC, corelată cu creșterea importantă a activității enzimatice (Figura 6.29. din Capitolul 6). Eficiența mai mare de degradare a coloranților în cazul acestor nanostructuri comparativ cu nanostructurile LAC/CHI poate fi rezultatul interacțiunii dintre CHI-g-PNIPAM și IC, care pare să faciliteze interacțiunea dintre colorant și perechea enzimă-mediator, remarcându-se că viteza procesului de degradare crește de 3 ori în cazul nanostructurilor comparativ cu enzima liberă. Totodată, creșterea eficienței catalitice se poate datora și unei mai bune accesibilități a centrului activ al LAC după formarea complexelor cu CHI-g-PNIPAM sau a unei stabilități mai bune a acestora. Observații similare au fost raportate de Zhang și colaboratorii, care au studiat degradarea enzimatică a coloranților *Malachite Green* și *Acid Orange 7* în prezența unor nanostructuri preparate cu LAC și PEI (Zhang, 2015). Autorii au evidențiat eficiența sporită a nanostructurilor în degradarea *Acid Orange 7*, cu o creștere de 3 ori a vitezei de degradare comparativ cu enzima liberă. Pe de altă parte, viteza de degradare a *Malachite Green* a fost mai scăzută, probabil din cauza diferențelor structurale dintre cei doi coloranți.

În cazul degradării CR, eficiența degradării a fost mai scăzută atât pentru LAC în soluție, cât și pentru nanostructurile LAC/CHI-g-PNIPAM, confirmând comportamentul observat în cazul complexelor LAC/CHI. Eficiența de degradare înregistrată în cazul CR a fost de circa 55% la utilizarea soluției de LAC și de circa 25-40% la utilizarea complexelor LAC/CHI-g-PNIPAM.

Rezultatele obținute în aceste studii confirmă menținerea capacității catalitice a LAC în oxidarea unor substraturi mai complexe după înglobarea acestora în nanostructuri complexe, sugerând faptul că acestea pot servi drept catalizatori în degradarea unor coloranți din mediu apos.

7.5. Concluzii parțiale

Studiile prezentate în cadrul acestui capitol au urmărit degradarea enzimatică a unor coloranți utilizând LAC imobilizată pe microparticule compozite obținute prin depunerea strat-după-strat de polielectroliți sau în prezența nanostructurilor complexe LAC/CHI și LAC/CHI-g-PNIPAM.

În cadrul primului studiu, materialele compozite obținute prin imobilizarea LAC au fost testate în degradarea unui poluant model, colorantul sulfonic IC. Degradarea colorantului sub acțiunea biocatalizatorilor a fost investigată în mai multe condiții, incluzând doi mediatori, diverse valori de pH și concentrație a poluantului, dar și utilizând materiale compozite cu diferite cantități de enzimă imobilizată, conturându-se o serie de concluzii principale:

- toate materialele compozite testate au fost capabile să conducă la 100% degradare a probei de colorant în prezența ambilor mediatori testați, dar cu o eficiență mai mare la utilizarea mediatorului ASG comparativ cu utilizarea ABTS;
- materialele compozite cu LAC imobilizată au acționat cu succes în degradarea IC la diferite valori de pH sau concentrații de colorant, determinând degradarea completă a acestuia în toate condițiile testate;
- materialele compozite au putut fi reutilizate fără o scădere semnificativă a eficienței de degradare catalitică în mai multe cicluri, cu o degradare completă a colorantului chiar și după patru cicluri de reutilizare;
- evaluarea mecanismului de degradare enzimatică a IC în prezența LAC sau a materialelor compozite cu LAC imobilizată a demonstrat faptul că imobilizarea enzimei nu induce modificări în profilul de degradare a colorantului;

- analiza produşilor de degradare a IC au permis identificarea principalilor compuşi care se formează la degradarea enzimatică a IC, metaboliţii principali fiind acidul isatin 5-sulfonic, 4-amino-3(carboxicarbonil)benzensulfonatul, acidul 2-amino-5-benzensulfonic, acidul 3-oxoindolin 5-sulfonic şi acidul indolin 5-sulfonic.

În cadrul celui de-al doilea studiu prezentat a fost testată capacitatea nanostructurilor LAC/CHI şi LAC/CHI-g-PNIPAM de a facilita degradarea coloranţilor IC şi CR. Studiile efectuate au confirmat capacitatea catalitică a acestora, remarcându-se o serie de aspecte principale:

- atât nanostructurile LAC/CHI, cât şi nanostructurile LAC/CHI-g-PNIPAM au permis degradarea completă a probelor de IC în toate condiţiile testate;
- în cazul nanostructurilor LAC/CHI, s-a evidenţiat o viteză de degradare a colorantului uşor mai mică decât în cazul LAC în soluţie, sugerând posibile limitări difuzionale în interacţiunea dintre colorant, enzimă şi mediator;
- nanostructurile LAC/CHI-g-PNIPAM au prezentat o capacitate catalitică mai bună decât LAC în soluţie la degradarea IC, datorată unei mai bune accesibilităţi la centrul activ al enzimei, după cum a fost observat şi în cazul testelor de activitate enzimatică;
- atât în cazul degradării CR cât şi a IC, s-a observat o viteză de degradare mai mare pentru nanostructurile preparate la $RM = 0,5$, comparativ cu cele preparate la $RM = 2$, confirmând faptul că degradarea coloranţilor este un proces limitat difuzional, prezenţa unei cantităţi mai mari de CHI sau CHI-g-PNIPAM în compoziţia nanostructurilor limitând transferul de masă.

Rezultatele prezentate în cadrul acestui capitol subliniază eficienţa utilizării enzimelor imobilizate în dezvoltarea unor metode de tratare a apelor uzate eficiente, inovative şi prietenoase cu mediul. Materialele compozite testate s-au remarcat printr-o eficienţă crescută în degradarea poluantului ţintă, printr-o stabilitate crescută la parametrii de proces şi o capacitate crescută de reutilizare fără o pierdere semnificativă a capacităţii catalitice. De asemenea, rezultatele demonstrează fezabilitatea utilizării unor nanostructuri de tip LAC/polizaharidă în degradarea unor poluanţi din mediu. Studiile incluse în această lucrare propun o metodă inovativă şi eficientă de tratare a apelor poluate cu compuşi organici, care se înscrie în tendinţele actuale de dezvoltare a unor tehnologii verzi, cu eficienţă ridicată şi impact de mediu scăzut.

CONCLUZII GENERALE

Teza de doctorat intitulată „*Progrese în proiectarea compozitelor polimer/enzime pentru aplicații în cataliză*” a urmărit obținerea unor materiale inovative, pe bază de polimeri naturali sau sintetici și enzime, care să poată fi utilizați drept catalizatori în diferite tipuri de procese. Teza de doctorat se întinde pe 195 pagini și cuprinde șapte capitole ce includ 100 de figuri, 21 de tabele, 12 ecuații și 310 referințe bibliografice. Lucrarea este structurată în două secțiuni principale: Partea I, intitulată „*Stadiul actual al cunoașterii*” este formată din două capitole și prezintă o sinteză a contextului științific care motivează alegerea materialelor și a metodelor experimentale utilizate iar Partea a II-a, intitulată „*Contribuții originale*” este structurată în cinci capitole și prezintă rezultatele proprii obținute în cadrul studiilor efectuate.

Analiza minuțioasă a rezultatelor experimentale obținute au evidențiat o serie de aspecte principale pentru fiecare dintre studiile propuse, după cum este prezentat în continuare:

1. Optimizarea obținerii de materiale suport pentru imobilizare de enzime prin depunere strat-după-strat de polielectroliți:

- porozitatea silicei utilizate ca suport pentru depunerea straturilor de polielectroliți nu influențează proprietățile materialului obținut;
- la tratamentul acido-bazic, utilizarea unui polication cu masă molară mică determină o stabilitate mai scăzută a multistraturilor formate comparativ cu utilizarea aceluiași polication, dar cu o masă molară mai mare;
- masa molară și conformația polianionului influențează caracteristicile materialului compozit format, inclusiv grosimea și stabilitatea învelișului organic la tratamentul acido-bazic;
- reticularea catenelor de polication determină stabilizarea învelișului organic, iar aplicarea tratamentului acido-bazic flexibilizează rețeaua polimerică;
- caracterizarea fizico-chimică a materialelor compozite a confirmat depunerea cu succes a învelișului organic și a evidențiat influența perechii polication/polianion asupra proprietăților materialelor formate, evidențiindu-se morfologia, încărcarea suprafeței și compoziția chimică a învelișului organic;
- cele mai bune rezultate în termeni de stabilitate a învelișului organic au fost obținute pentru materialele compozite SP2k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA) și SP2k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA).

2. Imobilizarea pepsinei pe materiale suport de tip miez-înveliș obținute prin depunere strat-după-strat de polielectroliți:

- imobilizarea enzimei nu a fost influențată de porozitatea silicei utilizate ca suport pentru depunerea învelișului de polielectroliți, imobilizarea enzimei realizându-se cu precădere la suprafața materialului;
- în cazul materialelor cu un număr mic de duble-straturi depuse sorbția enzimei are loc în special la suprafața materialului;
- cantitatea de enzimă imobilizată a fost mai mare în cazul materialelor supuse tratamentului acido-bazic, care flexibilizează învelișul organic, cele mai mari cantități de PEP fiind imobilizate pe compozitele SP2k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA) și SP2k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA);
- cantitatea de enzimă imobilizată a fost mai mare în cazul materialelor obținute cu perechea de polielectroliți PEI_M/PMA care a favorizat formarea de legături fizice slabe între învelișul organic și enzimă, cele mai mari cantități de enzimă imobilizată fiind de aproximativ 266 mg/g pentru compozitul SP2k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA) și de 271 mg/g pentru compozitul SP2k/(PEI_M)_{2,5}(-PMA);
- cele mai bune randamente de imobilizare au fost obținute la pH = 4,5 și o concentrație a soluției inițială de PEP de 1 mg/mL;
- deși au permis imobilizarea unor cantități satisfăcătoare de pepsină, condițiile utilizate nu au permis menținerea activității enzimatice.

3. Imobilizarea lacazei pe materiale suport de tip miez-înveliș obținute prin depunere strat-după-strat de polielectroliți:

- imobilizarea LAC a fost realizată cu succes pe microparticulele compozite testate, cele mai mari randamente de imobilizare a enzimei fiind obținute la pH = 4,5 și o concentrație inițială de 1 mg/mL;
- randamentele de imobilizare a LAC pe materialele compozite obținute cu perechea de polielectroliți PEI_M/PMA au fost mai mari decât cele obținute pe materialele compozite obținute cu perechea de polielectroliți PEI_M/PAA, confirmând tendințele observate la imobilizarea pepsinei;
- cele mai mari randamente de imobilizare a LAC au fost de aproximativ 80% pe materialul compozit SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA) și de aproximativ 60% pe SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PAA), obținute la pH = 4,5 și o concentrație inițială a soluției de enzimă de 1 mg/mL;

- imobilizarea LAC în condițiile propuse a permis menținerea unei activități catalitice satisfăcătoare, mai ridicate în cazul LAC imobilizate pe compozitele SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA);
- imobilizarea LAC a determinat creșterea stabilității enzimei în diferite condiții experimentale, inclusiv la incubarea la temperaturi crescute sau variații de pH, cu modificarea pH-ului optim al enzimei de la 3,5 în stare nativă la 5,5 în stare imobilizată;
- a fost posibilă reutilizarea enzimei în cel puțin șapte cicluri catalitice, cu pierderea a sub 5% din activitatea enzimatică în primele trei cicluri de reutilizare și menținerea a peste 50% din activitatea inițială după șapte cicluri de reutilizare;
- imobilizarea cu succes a enzimelor pe suprafața materialelor compozite a fost confirmată și prin intermediul metodelor de caracterizare utilizate, fiind observate modificări în morfologia, compoziția chimică și încărcarea ionică a suprafeței materialelor compozite.

4. Obținerea de nanostructuri enzimă/polizaharide:

- studiile de stingere a fluorescenței la interacțiunea LAC cu CHI au evidențiat capacitatea de interacțiune dintre cele două componente, evidențiind scăderea capacității de interacțiune odată cu creșterea temperaturii și au permis determinarea teoretică a tipurilor de interacțiune predominante care se formează între proteină și polizaharidă, respectiv legături de hidrogen și van der Waals;
- rezultatele obținute au fost confirmate prin studii de simulare de dinamică moleculară, acestea evidențiind atât tipurile de interacțiuni predominante, cât și mecanismul de autoasamblare a celor două componente;
- formarea nanostructurilor LAC/CHI determină o ușoară creștere a activității catalitice, comparativ cu enzima liberă, de circa 3% pentru nanostructurile preparate la rapoarte de masă 0,25 - 1 și de aproximativ 10% pentru nanostructurile preparate la RM = 2;
- într-o manieră similară, a fost studiată formarea de nanostructuri între LAC și CHI-g-PNIPAM, confirmată atât prin metode experimentale, cât și prin tehnici de simulare de dinamică moleculară;
- înglobarea LAC în nanostructuri determină o creștere a activității enzimatică a acesteia de până la 20% în cazul nanostructurilor preparate la RM = 2, probabil prin creșterea accesibilității centrului activ al enzimei, creșterea afinității dintre

enzimă și substrat sau prin modificarea micromediului enzimei, ceea ce favorizează desfășurarea reacției enzimatice;

- nanostructurile LAC/CHI-g-PNIPAM au prezentat sensibilitate la temperatură ca urmare a prezenței catenelor de polimer sintetic;
- pentru ambele tipuri de nanostructuri studiate, dimensiunea nanometrică și încărcarea pozitivă a suprafeței au fost confirmate prin măsurători de dispersie dinamică a luminii și măsurători de potențial zeta, iar morfologia nanostructurilor a fost confirmată prin microscopie electronică de baleiaj;
- înglobarea LAC în cele două tipuri de nanostructuri a determinat o creștere a stabilității enzimei la variații de pH și la incubarea la temperatură, sugerând faptul că polizaharidele au un rol stabilizator asupra enzimei, formând o barieră protectoare care previne denaturarea acesteia.

5. *Utilizarea materialelor compozite cu lacază imobilizată drept catalizatori pentru degradarea unor coloranți din soluții apoase:*

- a fost studiată capacitatea materialelor compozite miez-înveliș cu LAC imobilizată, de a cataliza degradarea colorantului IC, observându-se capacitatea acestora de a degrada complet colorantul în prezența celor doi mediatorilor chimici testați;
- degradarea colorantului a fost influențată de caracteristicile materialului compozit testat, observându-se o viteză mai mare de degradare a colorantului în prezența $LACn@SP1k/(PEI_M)_{4,5}(-PMA)$ ca urmare a proprietăților catalitice mai bune a acestor materiale;
- testele efectuate cu materiale compozite cu enzimă activă și cu enzimă inactivată termic au demonstrat că decolorarea probei de IC se datorează degradării enzimatice a colorantului, procesele de sorbție a colorantului pe suprafața compozitului fiind extrem de reduse în condițiile testate;
- degradarea colorantului a fost testată în diferite condiții de pH și concentrație, observându-se degradarea completă a probelor de colorant în toate condițiile testate, cu o viteză de degradare mai mare la $pH = 5,5$, corelată cu o activitate catalitică optimă;
- materialele compozite cu lacază imobilizată au putut fi reutilizate cu succes în degradarea colorantului în cel puțin patru cicluri de reutilizare, permițând degradarea completă a colorantului chiar și la reutilizare;

- prin intermediul MS și HPLC-MS, a fost elucidat mecanismul de degradare enzimatică a colorantului, identificând-se principalii produși de degradare, respectiv acidul isatin 5-sulfonic, 4-amino-3(carboxicarbonil)benzensulfonatul, acidul 2-amino-5-benzensulfonic, acidul 3-oxoindolin 5-sulfonic și acidul indolin 5-sulfonic;
- de asemenea, a fost studiată capacitatea nanostructurilor LAC/CHI și LAC/CHI-g-PNIPAM de a cataliza degradarea coloranților IC și CR;
- degradarea colorantului IC a fost completă în prezența ambelor tipuri de nanostructuri, utilizând ca mediator chimic ASG;
- viteza de degradare a colorantului a fost puternic influențată de accesibilitatea centrului catalitic al enzimei după includerea acestuia în complexe interpolielectrolitici, observându-se o degradare mai rapidă la utilizarea nanostructurilor LAC/CHI-g-PNIPAM, comparativ cu nanostructurile LAC/CHI;
- viteza de degradare a colorantului a fost influențată, de asemenea, de cantitatea de polizaharidă utilizată la formarea nanostructurilor, cantitățile mai mici de polizaharidă determinând o cinetică mai bună a procesului de degradare enzimatică, favorizând interacțiunea sistemului colorant – enzimă – mediator și reducând riscul de apariție a limitărilor difuzionale;
- cea mai rapidă degradare a IC a fost obținută în 45 minute, la utilizarea nanostructurilor (LAC/CHI-g-PNIPAM)_{RM=0,5};
- degradarea colorantului CR a fost mai redusă atât sub acțiunea nanostructurilor LAC/CHI și LAC/CHI-g-PNIPAM, obținându-se eficiențe de degradare de circa 25-40%, sugerând o afinitate mai scăzută între colorant și sistemul enzimă-mediator;
- profilul de degradare a CR în prezența nanostructurilor lacază/polizaharide, preparate cu diferite concentrații de polizaharidă, a confirmat faptul că procesul de degradare enzimatică a colorantului este controlat de difuzie.

Rezultatele obținute au permis identificarea unor **perspective** valoroase de cercetare care pot fi dezvoltate în studii ulterioare, câteva dintre acestea fiind:

- utilizarea microparticulelor compozite miez-înveliș obținute prin depunerea strat-după-strat de polielectroliti ca suport pentru imobilizarea unor alte tipuri de enzime de interes industrial precum glucoz-oxidaza, lipaza sau catalaza;

- testarea materialelor compozite cu lacază immobilizată în degradarea unor alți poluanți de interes precum compuși medicamentoși (oxacilină, diclofenac, ibuprofen, doxorubicină), a altor coloranți (*Remazol Brilliant Blue*, *Reactiv Orange 16*, *Malachite Green*) sau a altor poluanți emergenți precum bisfenolul A, reziduurile de pesticide sau de produse cosmetice și de îngrijire, optimizarea proceselor de degradare enzimatică a poluanților testați și identificarea mecanismului de degradare a poluanților prin HPLC-MS;
- testarea materialelor compozite cu LAC immobilizată în degradarea unor poluanți în condiții dinamice, utilizând coloane cu material compozit dispus în pat fix sau fluidizat;
- immobilizarea nanostructurilor LAC/CHI sau LAC/CHI-*g*-PNIPAM pe nanoparticule metalice în vederea facilitării separării acestora din mediul de reacție;
- studiul mecanismului de interacțiune dintre alte enzime (glucoz-oxidaza, catalaza, α -amilaza sau β -galactozidaza) cu polimeri naturali sau sintetici, inclusiv cu alte polizaharide modificate și sensibilele la stimuli externi și obținerea de noi nanostructuri enzime/ polimeri, pentru diferite tipuri de aplicații catalitice, biomedicale sau de mediu.

Rezultatele originale prezentate în cadrul acestei teze de doctorat au făcut subiectul a 6 articole științifice publicate în reviste cotate ISI dintre care trei încadrate Q1. Rezultatele prezentate sunt susținute de 14 comunicări orale și 5 comunicări de tip poster la conferințe naționale și internaționale, acestea fiind apreciate prin cinci premii obținute la manifestări științifice, completate cu 5 articole științifice și 5 comunicări orale ale căror rezultate nu sunt prezentate în teză. O parte dintre rezultatele obținute au fost susținute financiar prin trei proiectate naționale de cercetare și două stagii de cercetare și prin participarea la trei școli de sezon.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- Agudelo, D., Nafisi, S., Tajmir-Riahi, H.A. (2013). Encapsulation of milk β -lactoglobulin by chitosan nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*, 117, 6403–6409. <https://doi.org/10.1021/JP402573V>
- Ahlawat, A., Jaswal, A.S., Mishra, S. (2022). Proposed pathway of degradation of indigo carmine and its co-metabolism by white-rot fungus *Cyathus bulleri*. *International Biodeterioration Biodegradation*, 172, 105424. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2022.105424>
- Antonov, Y.A., Kulikov, S.N., Bezrodnykh, E.A., Zhuravleva, I.L., Berezin, B.B., Tikhonov, V.E. (2024). An insight into the effect of interaction with protein on antibacterial activity of chitosan derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 259, 129050. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.129050>
- Asemi-Esfahani, Z., Shareghi, B., Farhadian, S., Momeni, L. (2021). Effect of Naphthol yellow S as a food dye on the lysozyme structure and its mechanisms of action. *Journal of Molecular Liquids*, 332, 115846. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2021.115846>
- Bekale, L., Agudelo, D., Tajmir-Riahi, H.A. (2015). Effect of polymer molecular weight on chitosan–protein interaction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 125, 309–317. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2014.11.037>
- Bourouis, I., McClements, D.J., Li, H., Pang, Z., Liu, X. (2025). Interaction mechanism between soy protein microgels and chitosan and the resulting physical properties: effect of biopolymer ratio, pH and ionic strength. *Food Hydrocolloids*, 168, 111557. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2025.111557>
- Bucatariu, F., Petrilă, L.M., Teodosiu, C., Mihai, M. (2022). Versatile nanostructured SiO₂/cross-linked polyelectrolyte composites for emerging pollutants removal from aqueous media. *Comptes Rendus Chimie*, 25, 95–108. <https://doi.org/10.5802/CRCHIM.171>
- Cañas, A.I., Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28, 694–705. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.05.002>
- Dehdasht-Heidari, N., Shareghi, B., Farhadian, S., Momeni, L. (2021). Investigation on the interaction behavior between safranal and pepsin by spectral and MD simulation studies. *Journal of Molecular Liquids*, 344, 117903. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2021.117903>
- Ghiorghita, C.A., Bucatariu, F., Dragan, E.S. (2019). Influence of cross-linking in loading/release applications of polyelectrolyte multilayer assemblies. A review. *Materials Science and Engineering C*, 105, 110050. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110050>
- Habibian Dehkordi, S., Farhadian, S., Ghasemi, M. (2021). The interaction between the azo dye tartrazine and α -Chymotrypsin enzyme: Molecular dynamics simulation and multi-spectroscopic investigations. *Journal of Molecular Liquids*, 344, 117931. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2021.117931>
- Karayianni, M., Lotos, E.D., Mihai, M., Pispas, S. (2024). Coassembly of a hybrid synthetic–biological chitosan-g-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer with DNAs of different lengths. *Polymers*, 16, 3101. <https://doi.org/10.3390/POLYM16213101>

- Lakowicz, J.R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd Edition, Springer, Berlin. <http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Leite Milião, G., de Souza Soares, L., Balbino, D.F., de Almeida Alves Barbosa, É., Bressan, G.C., de Carvalho Teixeira, A.V.N., dos Reis Coimbra, J.S., de Oliveira, E.B. (2022). pH influence on the mechanisms of interaction between chitosan and ovalbumin: a multi-spectroscopic approach. *Food Hydrocolloids*, 123, 107137. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.107137>
- Leontieș, A.R., Răducan, A., Cristina Culiță, D., Alexandrescu, E., Moroșan, A., Eduard Mihaiescu, D., Aricov, L. (2022). Laccase immobilized on chitosan-polyacrylic acid microspheres as highly efficient biocatalyst for naphthol green B and indigo carmine degradation. *Chemical Engineering Journal*, 439, 135654. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.135654>
- Li, H. X., Xu, B., Tang, L., Zhang, J.H., Mao, Z.G. (2015). Reductive decolorization of indigo carmine dye with *Bacillus sp.* MZS10. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 30–37. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2015.04.007>
- Li, Q., Zhao, Z. (2018). Characterization of the structural and colloidal properties of α -lactalbumin/chitosan complexes as a function of heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 972–978. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04628>
- Li, Z., Wang, H., Chen, S., Li, J., Zheng, C., Liu, Y., Hao, C. (2025). Molecular studies between chitosan and graphene oxide-chitosan nanocomposites with β -galactosidase: From interaction mechanism to structural and functional changes. *Journal of Molecular Structure*, 1325, 140992. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2024.140992>
- Liu, X., Xia, W., Jiang, Q., Xu, Y., Yu, P. (2015). Binding of a novel bacteriostatic agent—chitosan oligosaccharides–kojic acid graft copolymer to bovine serum albumin: spectroscopic and conformation investigations. *European Food Research and Technology*, 240, 109–118. <https://doi.org/10.1007/S00217-014-2312-Y>
- Ma, N., Wang, L., Zhou, L., Wan, Y., Ding, S., Qian, W. (2023). Analysis of the interaction between chitosan with different molecular weights and casein based on optical interferometry. *Food Hydrocolloids*, 137, 108386. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.108386>
- Petrila, L.M., Bucatariu, F., Mihai, M., Teodosiu, C. (2021). Polyelectrolyte multilayers: an overview on fabrication, properties, and biomedical and environmental applications. *Materials* 2021, 14, 4152. <https://doi.org/10.3390/MA14154152>
- Petrila, L.M., Bucatariu, F., Stoica, I., Mihai, M., Froidevaux, R. (2025a). A green approach combining polyelectrolyte-based core-shell microparticles and laccase for indigo carmine degradation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13, 115631. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2025.115631>
- Petrila, L.M., Bucatariu, F., Mihai, M. (2025b). Optimization of pepsin sorption on core-shell composite materials for enhancing enzyme retention. *Revue Roumaine de Chimie*, 70, 465-473. <https://doi.org/10.33224/rrch.2025.70.7-8.10>
- Petrila L.M., Karayianni M., Vasiliu T., Puf R., Pispas, S., Mihai M. (2025c). Stimuli-responsive laccase/chitosan-g-PNIPAM complexes: a sustainable strategy for biodegradation of organic pollutants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 322, 146754. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146754>

Petrila, L.M., Ciobanu, T.A., Vasiliu, T., Pispas, S., Mihai, M. (2025d). Chitosan/*Trametes versicolor* Laccase Nanostructures with Modulated Catalytic Activity. *Biomacromolecules*, 26, 6244–6257. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5c01217>

Petrila, L.M., Grădinaru, V.R., Bucatariu, F., Mihai, M. (2022). Polymer/Enzyme composite materials—versatile catalysts with multiple applications. *Chemistry*, 4, 1312–1338. <https://doi.org/10.3390/CHEMISTRY4040087>

Saoudi, O., Ghaouar, N., Othman, T. (2017). Fluorescence study of laccase from *Trametes versicolor* under the effects of pH, chemical denaturants and ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*, 225, 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2016.11.050>

Stoilova, I., Krastanov, A., Stanchev, V. (2010). Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1, 208–215. <https://doi.org/10.4236/ABB.2010.13029>

Wang, C., Wang, S., Zhang, J., Jiang, S., Cui, D., Sun, H., Liu, C., Li, L., Zhao, M. (2022). The biodegradation of Indigo Carmine by *Bacillus safensis* HL3 spore and toxicity analysis of the degradation products. *Molecules*, 27, 8539. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27238539>

Zhang, X., Hua, M., Lv, L., Pan, B. (2015). Ionic polymer-coated laccase with high activity and enhanced stability: application in the decolourisation of water containing AO7. *Scientific Reports*, 5, 8253. <https://doi.org/10.1038/srep08253>

ANEXA 1: DISEMINAREA REZULTATELOR OBTINUTE ÎN PERIOADA DE PREGĂTIRE DOCTORALĂ

1. *Lucrări științifice publicate în reviste științifice cotate ISI (rezultate incluse în teză):*

- 1.1. **Petrila L.M.**, Grădinaru R., Bucatariu F., Mihai M. (2022). Polymer/enzyme composite materials – versatile catalysts with multiple applications. *Chemistry*, 4(4), 1312-1338. (FI₂₀₂₄ = 2,4, Q3 | FI_{publicare} = N/A; **articol pe coperta jurnalului**)
- 1.2. Bucatariu F., **Petrila L.M.**, Mihai M., Teodosiu C. (2022). Versatile nanostructured SiO₂/cross-linked polyelectrolyte composites for emergent pollutants removal from contaminated waters. *Comptes Rendus Chimie*, 25 (S3), 1-14. (FI₂₀₂₄ = 0,6, Q3 | FI_{publicare} = 2,55, Q3; **articol pe coperta jurnalului**)
- 1.3. **Petrila L.M.**, Bucatariu F., Stoica I., Mihai M., Froidevaux R. (2025a). A green approach combining polyelectrolyte-based core-shell microparticles and laccase for indigo carmine degradation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(2), 115631. (FI₂₀₂₄ = 7,4, Q1)
- 1.4. **Petrila L.M.**, Bucatariu F., Mihai M. (2025b). Optimization of Pepsin Sorption on Core-Shell Composite Materials for Enhancing Enzyme Retention. *Revue Roumaine de Chimie*, 70, 465-473. (FI₂₀₂₄ = 0,6, Q4).

- 1.5. **Petrila, L. M.**, Karayianni, M., Vasiliu, T., Puf, R., Mihai, M., Pispas, S. (2025c). Stimuli-responsive laccase/chitosan-g-PNIPAM complexes: a sustainable strategy for biodegradation of organic pollutants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 322, 146754. (FI₂₀₂₄ = 8,5, Q1).
- 1.6. **Petrila, L.M.**, Ciobanu, T.A., Vasiliu, T., Pispas, S., Mihai, M. (2025d). Chitosan/*Trametes versicolor* Laccase Nanostructures with Modulated Catalytic Activity. *Biomacromolecules*, 26, 6244–6257. (FI₂₀₂₄ = 5,5, Q1).
2. **Lucrări științifice publicate în reviste științifice cotate ISI (rezultate care nu incluse în teză):**
 - 2.1. Bucatariu F., Teodosiu C., Morosanu I., Fighir D., Ciobanu R., **Petrila L.M.**, Mihai M. (2021). An overview on composite sorbents based on polyelectrolytes used in advanced wastewater treatment. *Polymers*, 13, 3963. (FI₂₀₂₄ = 4,9, Q1 | FI_{publicare} = 4,967, Q1)
 - 2.2. Bucatariu F., Zaharia M.M., **Petrila L.M.**, Simon F., Mihai M. (2022a). Sand/polyethyleneimine composite microparticles: Eco-friendly, high selective and efficient heavy metal ion catchers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 649, 129540. (FI₂₀₂₄ = 5,4, Q2 | FI_{publicare} = 5,518, Q2)
 - 2.3. Bucatariu F., **Petrila L.M.**, Zaharia M.M., Simon F., Mihai M. (2022b). Sand/polyethyleneimine composites with enhanced pollutants sorption/ desorption properties. *Water*, 14(23), 3928. (FI₂₀₂₄ = 3, Q2 | FI_{publicare} = 3,4)
 - 2.4. Bucatariu F., **Petrila L.M.**, Ciobanu, T.A., Zaharia M.M., Mihai M. (2025). Dynamic ultra-fast sorption/desorption of Indigo carmine onto/from versatile core-shell composite microparticles. *Applied Sciences*, 15(19), 10725 (FI₂₀₂₄ = 2,5, Q2)
 - 2.5. Bucatariu F., **Petrila L.M.**, Zaharia M.M., Pispas S., Mihai M. (2024). Complexation of human serum albumin with thermoresponsive Chitosan-g-PNIPAM graft copolymer. *Journal of Molecular Liquids* (FI₂₀₂₄ = 5,2, Q2). *În curs de evaluare*
3. **Lucrări științifice publicate in extenso în volumele unor manifestări științifice:**
 - 3.1. **Petrila, L.M.**, Bucatariu F., Zaharia M.M., Mihai M. Separation and water cleaning by composites of polyelectrolytes and inorganic microparticles (2023). 12th International Conference on Environmental Engineering and Management, ISSN 2457-7049, ISSN – L 2457-7049, 195-196, 2023.
 - 3.2. **Petrila L.M.**, Zaharia M.M., Bucatariu F., Mihai M., Pispas S. (2023). Exploring the remarkable properties of water soluble chitosans. Proceedings of International

Conference Progress in Organic Macromolecular Compounds, ISSN 2810 – 2347
ISSN – L 2810 – 2126, 102-105, 2023.

3.3. **Petrila L.M.**, Karayianni M., Pispas S., Mihai M. (2024). Laccase/ Chitosan-g-PNIPAM hybrid nanostructures for potential environmental applications. 7th Edition International Conference EmergeMAT, ISSN 2602-0424 ISSN-L 2602-0416, 154, 2024.

3.4. **Petrila L.M.**, Karayianni M., Vasiliu, T., Pispas S., Mihai M. (2025). Novel biocatalysts as laccase/polysaccharide nanoassemblies. Proceedings of International Conference Progress in Organic Macromolecular Compounds, ISSN 2810 – 2126 ISSN – L 2810 – 2126, 134-136, 2025.

4. Comunicări orale la manifestări științifice naționale și internaționale (rezultate incluse în teză):

4.1. **Petrila L.M.***, Bucatariu F., Mihai M. Composite materials based on polyelectrolytes used as sorbents in batch and column studies. *MacroYouth' ICMPP – Open Door to the Future. Scientific Communications of Young Researchers*, 19 noiembrie 2021, Iași, România.

4.2. **Petrila L.M.***, Bucatariu F., Mihai M. Silica/polyelectrolyte sorbents for the removal of organic pollutants. *1st Edition Ph.D. Students' Days*, 26 noiembrie 2021, Arad, România.

4.3. Bucatariu F., **Petrila L.M.**, Zaharia M.M., Mihai M. Core-shell polyelectrolyte composites with versatile properties in pollutants removal from contaminated waters. *Congresul Internațional al Universității „Apollonia” din Iași*, 28 februarie – 2 martie 2022, Iași, România.

4.4. **Petrila L.M.***, Bucatariu F., Mihai M. Composite materials employed in the removal of emerging pollutants from contaminated waters. *12th International Conference on Materials Science and Engineering*, 9-12 martie 2022, Brașov, România.

4.5. **Petrila L.M.***, Bucatariu F., Mihai M. Composite materials with immobilized pepsin for water cleaning. *NeXT-Chem: Innovative Cross-Sectoral Technologies Exploratory Workshop*, 19-20 mai 2022, București, România.

4.6. **Petrila L.M.***, Bucatariu F., Simon F., Mihai M. Core-shell microparticles for enzyme immobilization. *ICMPP – Open door to the future scientific communications of young researchers MacroYouth*, 18 noiembrie 2022, Iași, România.

4.7. **Petrila L.M.**, Bucatariu F.*, Zaharia M., Mihai M. Separation and water cleaning by composites of polyelectrolytes and inorganic microparticles. *12th International*

Conference on Environmental Engineering and Management, 13-16 septembrie 2023, Iași, România.

4.8. **Petrila L.M.***, Bucatariu F., Mihai M. Catalase/polymer composite microparticles for environmental applications. *ICMPP – Open door to the future scientific communications of young researchers MacroYouth*, 17 noiembrie 2023, Iași, România.

4.9. **Petrila L.M.***, Froidevaux R., Mihai M. Harnessing immobilized laccase for sustainable water remediation. *Exploratory Workshop NeXT-Chem: Innovative Cross-Sectoral Technologies*, 21-22 martie 2024, București, România.

4.10. **Petrila L.M.***, Froidevaux R., Mihai M. Polyelectrolytes/ laccase composite biocatalysts for water cleaning applications. *International Conference of the Doctoral School at the “Gheorghe Asachi” Technical University of Iasi (TUIASI)*, 15-17 mai 2024, Iași, România.

4.11. **Petrila L.M.***, Karayianni M., Pispas S., Mihai M. Green hybrid nanostructures for efficient degradation of water pollutants. *Simpozionul Internațional „Prioritățile chimiei pentru o dezvoltare durabilă”*, 16 – 18 octombrie 2024, București, România.

4.12. **Petrila L.M.***, Karayianni M., Pispas S., Mihai M. Laccase/ chitosan-g-PNIPAM hybrid nanostructures for potential environmental applications. *7th Edition International Conference EmergeMAT*. 30-31 octombrie 2024, București, România.

4.13. **Petrila L.M.***, Karayianni M., Pispas S., Mihai M. Laccase/ polysaccharide hybrid nanostructures for efficient dye degradation. *ICMPP – Open door to the future scientific communications of young researchers MacroYouth*, 15 noiembrie 2024, Iași, România.

4.14. **Petrila L.M.***, Karayianni M., Vasiliu, T., Pispas S., Mihai M. Novel biocatalysts as laccase/polysaccharide nanoassemblies. *Progress in organic and macromolecular compounds*, 30th edition, 23-26 septembrie 2025, Iași, România.

5. Comunicări poster la manifestări științifice naționale și internaționale (rezultate incluse în teză):

5.1. **Petrila L.M.***, Zaharia M.M., Bucatariu F., Mihai M., Pispas S. Exploring the remarkable properties of water soluble chitosans. *Progress in organic and macromolecular compounds*, 29th edition, 4-6 octombrie 2023, Iași, România.

5.2. **Petrila L.M.***, Bucatariu F., Froidevaux R., Mihai M. Polyelectrolyte layer-by-layer nanoarchitectures – versatile materials with various applications. *NATO ASI Summer School Nanomaterials and Nanoarchitectures II*.

Composite Materials & Their Applications, 28 iunie – 5 iulie 2024, Smolenice, Slovacia.

5.3. Marandiș C.G.*, Zaharia M.M., **Petrila L.M.**, Lotos E.D., Bucatariu F., Mangalagiu I., Mihai M., Pispas S. Chit-g-PNIPAM: a versatile pH/temperature multi-responsive copolymer in aqueous environment. *PolyChar World Forum on Advanced Materials 30th Edition*, 11-13 septembrie 2024, Iași, România.

5.4. **Petrila L.M.***, Karayianni M., Pispas S., Mihai M. Laccase/ polysaccharide hybrid nanostructures for efficient dye degradation. ICMPP – *Open door to the future scientific communications of young researchers MacroYouth*, 15 noiembrie 2024, Iași, România.

5.5. **Petrila L.M.***, Karayianni M., Ciobanu, A.T., Vasiliu, T., Pispas S., Mihai M. Enzyme/polysaccharide nanoassemblies: preparation, characterisation and potential applications. *Progress in organic and macromolecular compounds, 30th edition*, 23-26 septembrie 2025, Iași, România.

6. Comunicări orale la manifestări științifice naționale și internaționale (rezultate care nu sunt incluse în teză):

6.1. Lotos E.D.*, Karayianni M., Vasiliu A.L., **Petrila L.M.**, Mihai M., Pispas S., Simionescu B. Interaction between water-soluble chitosan and thermo-responsive poly(*N*-isopropylacrylamide). ICMPP – *Open door to the future scientific communications of young researchers MacroYouth*, 17 noiembrie 2023, Iași, România.

6.2. **Petrila L.M.***, Ciobanu T.A., Bucatariu F., Mihai M. Unlocking Innovative Solutions for Polycation/Polyanion/Catalase Bi- and Tri-Component Interpolyelectrolyte Complexes. *EPF European Polymer Congress*, 22-27 iunie 2025, Groningen, Olanda.

6.3. Ciobanu T.A.*, **Petrila L.M.**, Bucatariu F., Zaharia M.M., Mihai M. Sand/polyelectrolyte composites for wastewater treatment. *Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering (NanoBioMat)*, 25 – 27 iunie 2025, online.

6.4. Ciobanu T.A.*, **Petrila L.M.**, Bucatariu F., Zaharia M.M., Mihai M. Core/shell composites based on sand and weak polyelectrolytes for water cleaning. *13th International Conference on Environmental Engineering and Management*, 17-20 septembrie 2025, Iași, România.

- 6.5. Bucatariu F.*, Zaharia M.M., **Petrila L.M.**, Mihai M., Pispas S. Interaction studies of chitosan-g-PNIPAM multiresponsive chains with a model protein. *Progress in organic and macromolecular compounds*, 30th edition, 23-26 septembrie 2025, Iași, România.

7. Membru în echipe de implementare pentru proiecte de cercetare naționale:

- 7.1. Membru doctorand (perioada 01.02.2022 – 31.10.2022) în cadrul proiectului *Quartz sand/polyelectrolyte composite microparticles with high loading/release of some inorganic/organic compounds from polluted waters*, cod proiect PN-III-P2-2.1-PED-2019-1996, acronim POLYSAND.
- 7.2. Membru doctorand (perioada 01.07.2023 – prezent) în cadrul proiectului *Polysaccharide based (bio)hybrid nanostructures*, cod proiect PNRR-III-C9-2022 – I8, acronim HYBSAC.
- 7.3. Membru doctorand (perioada 08.01.2025 – prezent) în cadrul proiectului *Arhitecturi polielectrolți/enzime construite pe microparticule anorganice pentru curățarea statică/dinamică a apelor prin procese de sorbție/cataliză*, cod proiect: PN-IV-P1-PCE-2023-1545, acronim PolyEnzIM.

8. Stagii de cercetare și formare profesională:

- 8.1. Școala de Vară „Technological challenges of transformation to renewable energy”, Universitatea din Aalborg, Danemarca, 29 iulie – 8 august 2022, participare finanțată din venituri proprii.
- 8.2. Stagiul de cercetare la Institutul Leibniz de Cercetare a Polimerilor din Dresda, Germania, 16 august – 6 noiembrie 2022, finanțat de Institutul Leibniz de Cercetare a Polimerilor din Dresda.
- 8.3. Școala de Primăvară în Managementul de Proiecte BioNanoTech, Lacul Roșu, România, 24 – 28 aprilie 2023, participare finanțată din proiectul *BioNanoTech – Centru Suport pentru Managementul Proiectelor Orizont 2020*, cod MySmis 107524.
- 8.4. Stagiul de cercetare la Institutul Charles Viollette din cadrul Universității din Lille, Franța, 1 octombrie 2023 – 31 mai 2024, finanțat de Ministerul Educației prin programul de burse HG 118/2023 și de către Universitatea din Lille prin programul de mobilitate MobLilex 2023.
- 8.5. Școala de vară NATO ASI Summer School Nanomaterials and Nanoarchitectures II. Composite Materials & Their Applications, 28 iunie – 5 iulie 2024, Smolenice,

Slovacia, participare finanțată din proiectului *Polysaccharide based (bio)hybrid nanostructures (HYBSAC)*, cod proiect PNRR-III-C9-2022 – I8.

9. Premii obținute la manifestări științifice:

- 9.1. **Best Oral Presentation** pentru lucrarea *Silica/polyelectrolyte sorbents for the removal of organic pollutants*, prezentată în cadrul 1st Edition Ph.D. Students' Days, 26 noiembrie 2021, Arad, România.
- 9.2. **Premiul „Sorin I. Roșca” al Societății de Chimie din România** pentru lucrarea *Catalase/polymer composite microparticles for environmental applications* prezentată în cadrul ICMPP – *Open door to the future scientific communications of young researchers MacroYouth*, 17 noiembrie 2023, Iași, România.
- 9.3. **Innovation Award** pentru lucrarea *Harnessing immobilized laccase for sustainable water remediation* prezentată în cadrul *Exploratory Workshop NeXT-Chem: Innovative Cross-Sectoral Technologies*, 21 – 22 martie 2024, București, România.
- 9.4. **Premiul Societății de Chimie din România** pentru lucrarea *Green hybrid nanostructures for efficient degradation of water pollutants* prezentată în cadrul *Simpozionului Internațional „Prioritățile chimiei pentru o dezvoltare durabilă”*, 16 – 18 octombrie 2024, București, România.
- 9.5. **Premiul I pentru cea mai bună prezentare orală** pentru lucrarea *Laccase/polysaccharide hybrid nanostructures for efficient dye degradation* prezentată în cadrul ICMPP – *Open door to the future scientific communications of young researchers MacroYouth*, 15 noiembrie 2024, Iași, România.