



Universitatea Babeş-Bolyai din Cluj-Napoca

Facultatea de Fizică

Departamentul de Fizică Biomoleculară



**Tehnici și aplicații ale spectroscopiei Raman
în cercetarea carotenoizilor din resursele marine vii
și în bioeconomia albastră**

Rezumatul tezei de doctorat

Autor:

Fran Nekvapil

Conducător științific:

Prof. Dr. habil. Simona Cîntă Pînzaru

Cluj-Napoca, 2020

Conținut (se referă la teză *in extenso*):

Mulțumiri	1
1. Introducere generală	2
1.1. Structura și scopul acestei teze	2
1.2. Spectroscopia Raman: tehnologia și metodologie	4
1.3. Carotenoizi: proprietăți fizice și chimice	4
1.4. Extinderea domeniului de aplicații: tehnici ale spectroscopiei Raman pentru mediul marin și resursele sale	5
1.5. Tehnicile Raman utilizate și caracteristicile generale ale instrumentelor utilizate în cercetarea prezentată	6
2. Aspecte experimentale în spectroscopia Raman a carotenoizilor din bio-matrici native: cazul citricelor	6
2.1. Evaluarea prospețimii citricelor utilizând spectroscopia Raman - articol de cercetare original	6
3. Comportamentul semnalului Raman al carotenoizilor și structura electronică descrise prin micro-spectroscopia Raman multi-laser și DFT; semnalul carotenoizilor ca markeri fiziologici în cianobacterii sondate prin spectroscopie Raman rezonantă <i>in vivo</i>	8
3.1. Descriere cuprinzătoare a spectrelor Raman și a structurii electronice a fucoxantinei	8
3.2. Excitarea non-rezonantă a fucoxantinei și a β -carotenului în stare solidă: diferențierea carotenoizilor în biosistemele complexe	11
3.3. Efectul agresiunii nanoparticulelor metalice asupra semnalului Raman al carotenoizilor din cianobacterii la nivel celular	13
3.4. Nanoparticule de ferită de zinc de mangan și spectroscopia lor Raman - articol de cercetare original	15
3.5. Capitolul 3. Concluzii	16
4. Analiza comparativă a țesuturilor, detectarea <i>in situ</i> și rolurile biochimice ale carotenoizilor studiat prin spectroscopie rezonantă Raman și SERS; prepararea și conservarea delicată a țesuturilor pentru analiza Raman	17
4.1. Studiu comparativ al metabolismului carotenoizilor la echinoderme studiat prin spectroscopie de rezonanță Raman și tehnici SERS	18
4.1.1. Detectarea și caracterizarea carotenoizilor la echinoderme	18
4.1.2. Proceduri generale de prelevare a probelor	18
4.1.3. Detectia SERS a carotenoizilor din extractele sistemului digestiv	18
4.1.4. Detectia SERS a carotenoizilor din fluidul celomic	19
4.1.5. Echinenona și β -caroten din gonade ale echinodermelor - efectul mediului molecular asupra benzilor Raman ale carotenoizilor	19
4.1.6. Detectarea prin tehnici micro-Raman rezonante a carotenoizilor în ouăle native ale echinodermelor	20
4.1.7. Localizarea a semnalului carotenoizilor în larve	20
4.2. Studiu comparativ prin spectroscopie Raman al fluidului celomic al echinodermelor și al mediului acvatic nativ al acestora: perspectivă pentru un potențial indicator al agresivității mediului	21
4.3. Pachete de microsferă de carotenoizi: ouă intacte de arici de mare monitorizate prin instrumentele spectroscopiei Raman - articol de cercetare original	22

4.4. Explorarea rolului de protecție biologică a carotenoizilor prin spectroscopie Raman: stresul mecanic al celulelor - articol de cercetare original	23
4.5. Capitolul 4. Concluzii	24
5. Modificarea proprietăților optice ale carotenoizilor la legarea de proteinele crustacianine investigate prin rezonanță Raman cu mai multe linii laser și prin DFT; similitudini ale semnalului lor cu polienele nesaturate; aplicarea spectroscopiei Raman în bioeconomie albastră și economie circulară	25
5.1. Semnalul Raman rezonant al pigmentilor din crustacee localizați într-o structură poroasă de carbonat biogenic - controverse și noi descoperiri privind originea culorii	26
5.2. Nanoarhitectura naturală a crabului albastru (<i>Callinectes sapidus</i> Rathbun, 1896) studiată prin spectroscopie Raman și microscopie electronică de scanare	27
5.3. Porozitate specifică culorii în nanoarhitecturi 3D naturale dublu pigmentate din crusta crabului albastru - articol de cercetare original	29
5.4. De la bioeconomia albastră la economia circulară prin cercetări analitice de înaltă sensibilitate asupra deșeurilor din exploatarea crustaceelor (crab albastru) - articol de cercetare original	29
5.5. Promovarea și exploatarea designului natural ultrastructurat al materialului neutilizat de la creveți într-un compozit biogenic valoros	30
5.6. Capitolul 5. Concluzii	31
6. Concluzii, impact și perspective	32
Referințe selectate	34
Abrevieri	37
Lista publicațiilor incluse în teză	38
Sumar	40

Mulțumiri

În primul rând, doresc să exprim cele mai profunde mulțumiri prof. habil. dr. Simona Cintă Pinzaru, ghidul meu prin tărâmul științei. Conducerea ei a îmbunătățit dezvoltarea mea profesională și s-a extins în multe sfere ale vieții mele private. Dacă ar fi trebuit să aleg una singură, cea mai importantă lecție pe care am învățat-o de la ea, ar fi că sunt capabil să fac față oricaror provocări, oricât de proaste ar fi șansele; prin eforturi poți deveni suficient de bun. Am învățat să-mi prețuiesc munca și să nu renunț înainte ca lupta să înceapă.

Prof. Dr. Vasile Chiș ii sunt recunoscător pentru inițierea și obținerea rezultatelor în calcule teoretice DFT care au îmbogățit în mod semnificativ studiile prezentate în această teză. Doresc să-mi exprim mulțumirile pentru îndrumarea și susținerea constantă.

Conf. dr. Lucian Barbu-Tudoran este creditat pentru rezultatele perspicace ale microscopiei electronice și pentru discuții pe parcursul studiilor cuprinse în această teză. Îi sunt adânc recunoscător, de asemenea, pentru efortul constant de-a lungul programului doctoral.

Comitetul meu de îndrumare, format din prof. Dr. Vasile Chiș, Conf dr. Lucian Barbu-Tudoran și prof. Dr. Horia Banciu a oferit sugestii foarte constructive care au simplificat prezentarea conținutului tezei într-o versiune mai clară și cu mai mult impact. Mai mult, dr. Sanja Tomšič și dr. Branko Glamuzina au oferit un ajutor de neprețuit în selectarea, colectarea și pregătirea probelor adecvate scopului studiilor.

De asemenea, doresc să mulțumesc multor alți cercetători de la Universitatea Babeș-Bolyai, Universitatea din Dubrovnik și Institutul Național de Cercetare -Dezvoltare a Tehnologiilor Izotopice și Moleculare din Cluj-Napoca, care mi-au oferit asistență sau discuții valoroase în timpul programului meu de doctorat.

Doresc să adresez un gând de recunoștință familiei, care m-a susținut în diferite moduri, dar în primul rând cu dragoste și înțelegere. Îmi voi aminti acum și de dragii mei prieteni, care au strălucit o scânteie de lumină chiar și în zilele mele proaste și mi-au ridicat continuu spiritul.

Realizarea acestei teze nu ar fi posibilă fără infrastructura, facilitățile și granturile Universității Babeș-Bolyai, renumită pentru tradiția și excelența sa. Acest sprijin este recunoscut cu respect.

Universitatea din Dubrovnik este creditată pentru inițierea mea în munca transfrontalieră și pentru furnizarea primitoare de facilități de cercetare. Mai exact, participarea mea la programul Erasmus + (finanțat de Uniunea Europeană) la Universitatea Babeș-Bolyai, acordată în timpul studiului meu la Universitatea din Dubrovnik a motivat lucrările prezentate în paginile următoare.

Institutul Național pentru Cercetare și Dezvoltare a Tehnologiilor Izotopice și Moleculare (INCDTIM Cluj-Napoca), personalul și facilitățile sale sunt, de asemenea, recunoscuți pentru că au îmbogățit această teză cu posibilități experimentale suplimentare.

1. INTRODUCERE GENERALĂ

1.1. Structura și scopul acestei teze

În 1921, omul de știință indian Sir Chandrasekhara Venkata Raman se afla într-o călătorie în Europa, unde a fost fascinat de culoarea albastră a Mării Mediterane, care a inspirat mai multe studii experimentale și a generat înțelegerea unui nou proces optic câțiva ani mai târziu. De fapt, conferința sa susținută în 1930 cu ocazia decernării Premiului Nobel s-a deschis cu sintagma „Culoarea mării” (Raman, 1930).

O căutare în baza de date Web of Science (www.webofknowledge.com) pentru termenii „Raman” + „marin” arată că aplicațiile de spectroscopie Raman legate de mediul marin au luat avânt în jurul anului 2013 (Figura 1), dar cercetarea a început mult mai devreme. Înregistrarea *in vivo* a semnalului Raman al pigmentilor carotenoizi din carapacea de homar viu s-a raportat încă din 1977 (Salares și colab., 1977) și reprezintă o utilizare inteligentă a spectroscopiei de rezonanță Raman, de asemenea utilizată pe parcursul lucrării descrise în această teză, dar cu echipamente mult mai flexibile și performante. Cu toate acestea, abia de acum două decenii, tehnologia Raman a devenit suficient de matură, robustă și compactă pentru a permite măsurări *in situ* ale proceselor din mediul marin (Pasteris și colab., 2004; Zhang și colab., 2012).

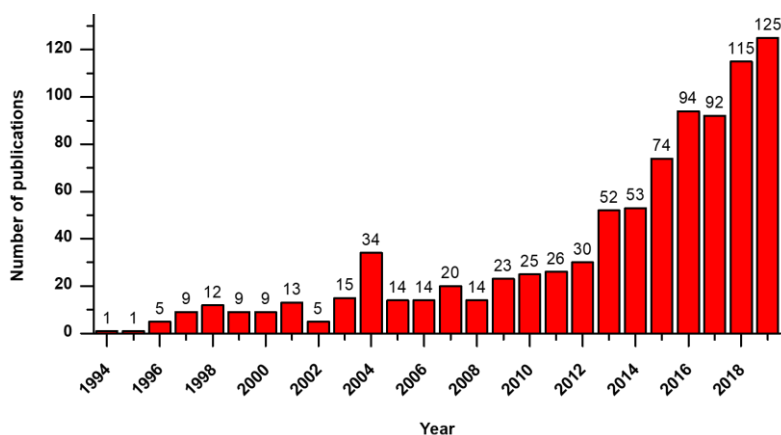


Figure 1. Graficul numărului de publicații, obținut utilizând cuvintele cheie „Raman” + „marine” în funcție de anul publicării, generat prin instrumentul de căutare al platformei Web of Science (www.webofknowledge.com). Figura prezintă intervalul de ani din 1994 și 2019, unde a fost observată continuitatea publicațiilor. Tendința și interesul în creștere în aplicarea tehnicilor de spectroscopie Raman la cercetarea mediului marin sunt evidente.

Conceptele bioeconomiei albastre privind cea mai eficientă exploatare a resurselor marine fără degradarea capacității lor de reînnoire sunt atrăgătoare; cu toate acestea, este nevoie de multă muncă suplimentară pentru a răspunde la întrebarea „cum se realizează efectiv aceste concepte?” Aceasta include, de

asemenea, întrebarea „cum să caracterizați în mod eficient materialul la îndemână, nedistructiv și cu consum minim de substanțe chimice, muncă și timp?”

Scopul principal al tezei de doctorat prezentat aici este extinderea aplicabilității tehnicilor experimentale și teoretice ale spectroscopiei Raman, inclusiv RRS, SERS, SERRS, NIR-Raman, FT-Raman și DFT, în studii de biologie marină și biofizică. Teza urmărește în continuare să demonstreze detecția moleculară de înaltă precizie a carotenoizilor în eșantioane biologice complexe din lumea reală, mai degrabă decât să rămână în spațiile de configurație ale laboratorului și încadrul studierii compușilor standard. Prin urmare, constatările și îmbunătățirile metodologice pot aborda într-adevăr conceptele și întrebările discutate mai sus. Prin urmare, lucrările prezentate aici deschid oportunități neexploatate până acum de a aborda problemele majore biologice, biotehnologice și economice legate de mediul marin dintr-un nou punct de vedere, multi- și transdisciplinar.

Cercetările prezentate aici au urmat patru linii principale de experimente, grupate după tipul de eșantioane în patru capitole (Fig. 2). Toate studiile efectuate contribuie la obiectivul comun: obținerea unei mai bune înțelegeri a semnalului Raman al carotenoizilor (și carotenoproteinelor) și extinderea aplicabilității tehnicilor experimentale Raman și a metodelor computaționale la biotehnologia marină și la domeniile sale conexe. Ne adresăm și prezentăm opiniile noastre cu privire la controversele majore referitoare la semnalul Raman al acestor pigmenți și prezentăm contribuțiile noastre la controversele de lungă durată din comunitatea științifică. Figura 2 afișează schematic suprastructura acestei teze.

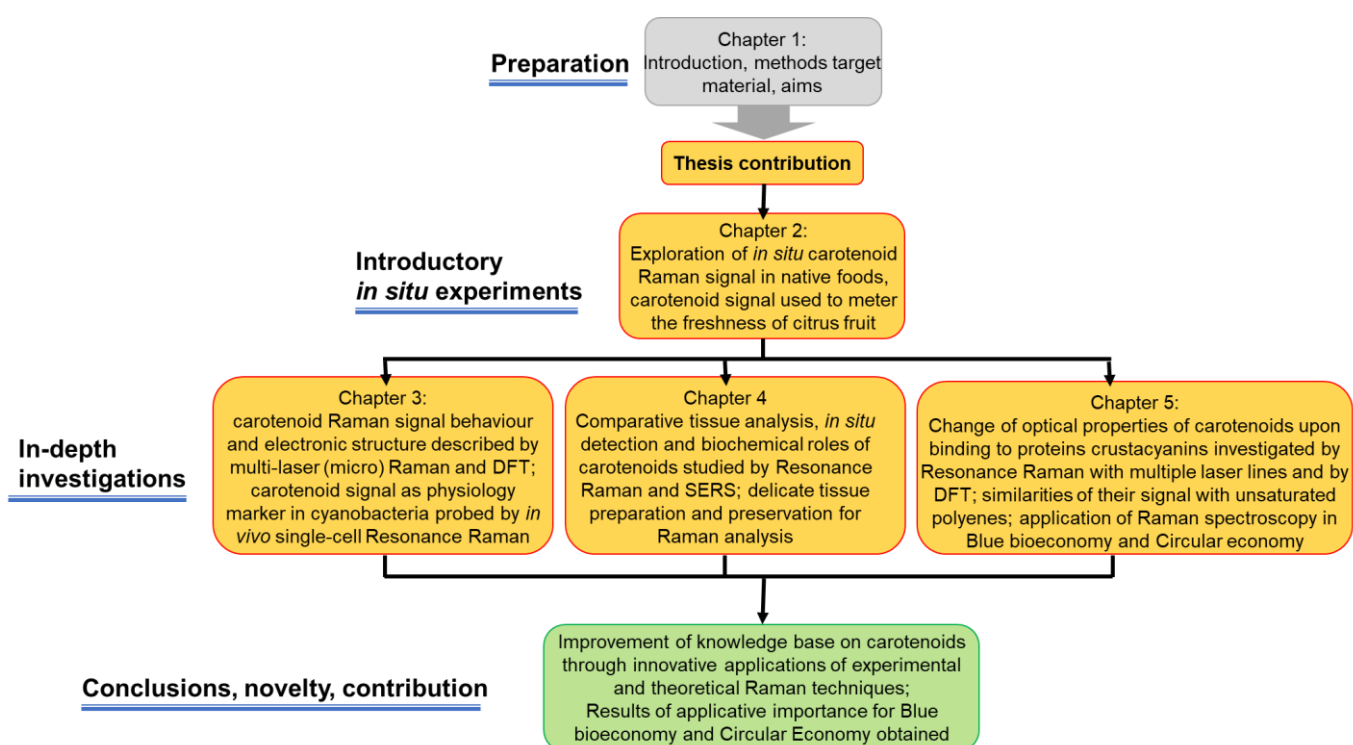


Figura 2. Prezentarea schematică a suprastructurii și fluxului acestei teze.

1.2. Spectroscopia Raman: tehnologie și metodologie

Secțiunile introductive ale unei cărți de Ewen Smith și Geoffrey Dent intitulată „Spectroscopia Raman modernă - O abordare practică”, rezumă elementele de bază ale analizei spectroscopiei Raman într-un mod ușor de citit și de înțeles (Smith și Dent, 2005). Pe scurt, împrăștierea inelastică (Raman) are loc atunci când fotonii incidenți pe material (molecula) provoacă deplasarea nucleelor atomice, care ulterior modifică energia fotonului împrăștiat. Această diferență de energie vibrațională este baza măsurătorilor spectroscopiei Raman (RS). Atât spectroscopia Raman, cât și spectroscopia de absorbție în infraroșu (IR) utilizate pe scară largă sunt metode pentru sondarea structurii moleculare a probei în funcție de interacțiunea fotonilor cu legăturile atomice (împrăștierea în RS și absorbția în IR). Cu toate acestea, spectroscopia Raman prezintă performanțe mai mari în analiza probelor hidratate datorită secțiunii transversale de împrăștiere relativ mai reduse a legăturilor O-H, ceea ce este avantajos pentru sondarea probelor biologice native.

1.3. Carotenoizi: proprietăți fizice și chimice

Introducerea în carotenoizi, ca ținte moleculare ale studiilor descrise aici, se datorează posibilității de detectare selective a acestor compuși moleculari din probe complexe. Potrivit lui Maoka (2020), până în prezent au fost descrise aproape 1000 de structuri carotenoizi, multe specii moleculare fiind găsite doar în organisme specifice. Cu toate acestea, doar aproximativ 40 de carotenoizi apar într-o dietă tipică pentru om. Acești carotenoizi obișnuiți se obțin de obicei prin fructe și legume. Acești compuși au atras atenția comunității științifice datorită asocierii lor cu fotosinteza și captarea și transferul de energie, de ex. fucoxantină în diatomee (Gundermann și Büchel, 2014), β -caroten, violaxantină, 9'-cis-neoxantină și luteină în alge verzi (Takaichi, 2011), α -caroten, β -caroten, zeaxantină și luteină în alge roșii (Takaichi, 2011) și o gamă mai largă de carotenoizi la plantele superioare. Mai mult, derivarea provitaminei A (în special din β -caroten; Tang 2010) și efectele benefice generale asupra organismelor vii (Dose și colab., 2016) este un alt atribut important al carotenoizilor. Anumiti carotenoizi, cum ar fi luteina și zeaxantina, sunt critice pentru funcționarea normală a retinei oculare la mamifere (Widjaja-Adhi și colab., 2018). Carotenoizii au o structură terpenoidă (secțiunile 3.1. și 3.2.), iar rolurile lor biologice sunt mediate în primul rând prin capacitatea de eliminare a radicalilor liberi (Mortensen și Skibsted, 1997) și absorbția UV-Vis în 200 - 300 nm (mai mică) și intervalul 400 - 500 nm (mai mare) (Flores-Hidalgo și colab., 2017). Natura exploatează, de asemenea, carotenoizii incorporați în agregate, având o culoare gălbuie, roșie sau maronie, cum sunt viu colorate cochiliile în nevertebrate (Figure 3). Suplimentarea cu cantaxantină a promovat o activitate mai mare a enzimelor antioxidante în piele (Andrei și colab., 2007). O carte detaliată despre carotenoizi este prezentată de John T. Landrum și alții, intitulată „Chimia și biochimia carotenoizilor” (Landrum și colab., 2010).

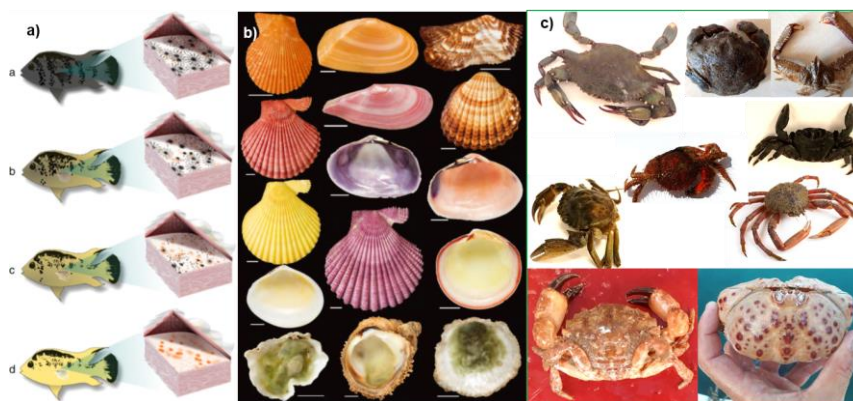


Figura 3. Diversitatea colorării cochiliei la animalele acvatice pe bază de carotenoizi și poliene nesaturate: a) pești *tilapia* (reproduse din Sefc și colab., 2014, licențiate sub Creative Commons CC-BY Attribution); b) cochilii de moluște bivalve (reproduse din Wade și colab., 2019, cu permisiunea Wiley și Sons, licența nr. 4864300984502); c) cochilii de crustacee (secțiunea 5.1; credite foto: Fran Nekvapil, Branko Glamuzina, Ana Gavrilović). Pentru mai multe detalii, consultați publicațiile / secțiunea respectivă.

1.4 Lărgirea domeniului de aplicații: tehnici ale spectroscopiei Raman pentru mediul marin și resursele sale

Această secțiune este alcătuită ca un scurt studiu al domeniilor din biologia marină, biochimie și cercetare ecologică, unde tehnicile spectroscopice Raman prezintă un avantaj unic, datorită caracterului nedistructiv și rapid al analizei, cuplat cu o sensibilitate ridicată la structura moleculară și gradul de rezoluție spațială. În unele cazuri, nu există nici o metodă de cercetare sau monitorizare alternativă adecvată. Teza actuală urmează aceste piste și îmbunătățește utilitatea spectroscopiei Raman în domeniile actuale și își extinde gama de aplicații. O revizuire exhaustivă a literaturii nu este încercată aici, ci mai degrabă, următoarele secțiuni prezintă cadrul prezentului studiu plasând tehnicile de spectroscopie Raman în contextul problemelor economice, de mediu și sociale (Figura 4).

Appliction area	Impact components			
	Scientific	Economic	Environmental	Social
Carotenoids	Green	Green		
Pollution			Green	Green
Seafood		Green		Green
Marine toxins	Green	Green	Green	
Deep sea	Green	Green	Green	
Biocalcification	Green	Green	Green	
Archaeology	Green			Green
Blue bioeconomy	Green	Green	Green	Green

Figura 4. Previzualizarea principalelor domenii de aplicare ale spectroscopiei Raman legate de biologia marină și componentele de impact ale acestora.

1.5. Tehnicile Raman utilizate și caracteristicile generale ale instrumentelor în cercetarea prezentată

Această secțiune descrie instrumentele, avantajele și dezavantajele acestora și tehnicile pentru care instrumentele particulare sunt potrivite. Secțiunile ulterioare ale acestei teze vor oferi detalii specifice despre configurarea analizei probelor respective, cu toate acestea, se va face referire la proprietățile generale ale echipamentelor prezentate aici pentru a evita repetări.

Toate experimentele (Capitolul 2 - Capitolul 5) sunt derulate prin utilizarea fie a uneia sau a ambelor tipuri de spectroscopie Raman de rezonanță (RRS) sau împrăștiere Raman amplificată la suprafață (SERS). Acolo unde a fost fezabil, rezultatele RRS au fost comparate cu spectrele non-rezonante obținute cu liniile laser NIR (785 sau 1064 nm) și prin calculele teoretice DFFT (Density Functional Theory). Rezultate complementare au fost, de asemenea, obținute prin spectroscopie FT-Raman și microscopie electronică, după caz.

2. ASPECTE EXPERIMENTALE IN INVESTIGAREA CAROTENOIZILOR ÎN BIOMATRICI NATURALE: CAZUL VARIETĂȚILOR DE CITRICE ȘI COAJA LOR

2.1. Evaluarea prospețimii citricelor folosind spectroscopia Raman - articol de cercetare original

Capitolul 2 își propune să prezinte detectarea semnalului Raman de la carotenoizi în probele din lumea reală; în acest caz am luat în considerare citricele, care nu necesită pregătirea prealabilă a probei pentru a realiza analiza Raman in situ în coajă. Studiul tratează un lanț alimentar uman de coastă și prezintă aspecte experimentale importante ale analizei carotenoizilor în alimentele comune ale omului.

Un număr considerabil de studii publicate au avut ca scop dezvoltarea unor indicatori pentru prospețimea fructelor și legumelor sau stadiul de maturare, având în vedere în principal semnalul licopenului și β -carotenului din roșii (de exemplu, Martin și colab., 2017; Hara și colab., 2018 și referințe în acesta), dar și în alte alimente. Prin urmare, cele 3 benzi principale de carotenoizi [ν_1 (C=C), ν_2 (C-C) și ν_3 (C-CH₃)] pot fi ușor înregistrate (Jehlička și colab., 2014; de Oliveira și colab., 2010; Schulz și colab., 2005; Oren și colab., 2015).

Cu toate acestea, acest capitol, precum și toate secțiunile următoare ale acestui document, demonstrează că diferențierea carotenoidă fie în semnal rezonant, fie nerezonant, poate fi realizată la un alt nivel al analizei spectrală. Acest lucru înseamnă, în funcție de cazurile particulare, lățimea benzii (FWHM), deconvoluția

anvelopei benzii, comparația directă a benzii între spectrele probelor corespunzătoare sau iluminarea aceluiași punct cu mai multe linii laser rezonante la pigmenți diferiți.

În plus, în următorul studiu (secțiunea 2.1.), Propunem un model simplu pentru evaluarea in situ a stării de prospețime a citricelor, profitând de intensitatea semnalului carotenoid Raman și de informațiile conținute de la nivelul fundal spectral (background). Carotenoizii prezintă în mod inerent un anumit fundal de fluorescență scăzută, incrementală, sub excitația de 532 nm, care rezultă din tranziția $S_1 \rightarrow S_0$ cu randament scăzut de fluorescență (Noguchi și colab., 1989; Kukura și colab., 2004; Redeckas și colab., 2016). Alte componente chimice cu semnal Raman nespecific contribuie, de asemenea, la fondul spectral, iar creșterea sistematică a fondului spectral în timp, combinată cu scăderea simultană a semnalului Raman global al carotenoizilor, ne-a permis să definim coeficientul de prospețime exprimat ca $C_{\text{fresh}} = I_{\text{Semnal Raman}} / I_{\text{fundal Raman}}$ la banda ν_1 (C=C). Acest cadru de interpretare a spectrelor funcționează atât pe instrumente Raman portabile, cât și pe laborator, permițând perspectiva asupra determinării prospețimii fructelor.

Acest lucrare a fost:

- *publicat in Food Chemistry, on 1. March 2018, Impact factor (2018) = 5.39;*
 - Citation: Nekvapil, F., Brezestean, I., Barchewitz, D., Glamuzina, B., Chis, V., Cintă Pinzaru, S. Citrus fruits freshness assessment using Raman spectroscopy. Food Chem. 2018a, 242: 560–567. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.105.
- *prezentat oral la 16th International Symposium Prospects for the 3rd Millennium Agriculture, Cluj-Napoca (Romania), 28th – 30th September 2018*
 - Citation: Nekvapil, F., Brezestean, I., Barchewitz, D., Glamuzina, B., Chis, V., Cintă Pinzaru, S., Andronie, L. Are the market citrus fresh? Raman spectroscopy can promptly tell it. In: Vodnar, D.C. (ed.) Book of Abstracts, no. 4/2017. Faculty of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Cluj-Napoca, ISSN: 2392-6937, ISSN-L: 2392-6937. p. 230.

3. Comportamentul semnalului Raman al carotenoizilor și structura electronică descrise prin micro-spectroscopia Raman multi-laser și DFT; semnalul carotenoizilor ca markeri fiziologici în cianobacterii, *in vivo*

În ciuda importanței fucoxantinei în biomedicină și farmacologie, acest compus nu este încă caracterizat în mod cuprinzător prin tehnici ale spectroscopiei Raman. Acest lucru ar permite detectarea, identificarea și cuantificarea rapidă, precum și creșterea generală a eficienței cercetării asupra acestor compusi. Secțiunile 3.1. și 3.2. vizează studii teoretice și experimentale detaliate asupra semnalului Raman al carotenoizilor puri, fucoxantină și β -caroten, inclusiv luarea în considerare a benzilor majore și minore și a perspectivelor cantitative și cu accent pe structura și profilul benzii lor intense ν_1 (C=C). Pentru a realiza acest lucru, am folosit excitație Raman prin rezonanță și non-rezonanță, calcule DFT, SERS și FT-Raman. Mai mult, prospectăm diferențierea carotenoizilor *in situ* în microorganisme fotosintetice unicelulare: fucoxantină în diatomee *Cylindrotheca closterium* și *Skeletonema costatum* și β -caroten în cianobacterii *Coelomoron pussilum*. Ulterior, folosind cunoștințele obținute, în secțiunea 3.3. exploatăm semnalul de rezonanță Raman de la celule *C. pussilum* individuale expuse la nanoparticule de ferită pentru a prospecta utilitatea semnalului carotenoizilor microbieni în studiile ecotoxicologice.

3.1. Descriere cuprinzătoare a spectrelor Raman și a structurii electronice a fucoxantinei

Spectrele Raman obținute de la fucoxantină solidă, policristalină, soluția stoc în etanol și soluția SERS cu cea mai mare concentrație sunt prezentate în Figura 5. Toate spectrele au prezentat cele patru mari benzi Raman, ν_1 (1522 - 1531 cm^{-1}), ν_2 (1140 - 1200 cm^{-1}), ν_3 (1010 - 1020 cm^{-1}) și ν_4 (961 - 964 cm^{-1}), și mai multe benzi mai slabe, care vor fi abordate în cele ce urmează. Fucoxantina a fost excitată pre-rezonant cu 532 nm, așa cum se observă prin prezența benzilor armonice și combinații liniare în regiunea 2000-300 cm^{-1} și non-rezonant cu linii laser 632,8 și 785 nm. Pozițiile și atribuțiile tuturor benzilor observate sunt date în Tabelul 1.

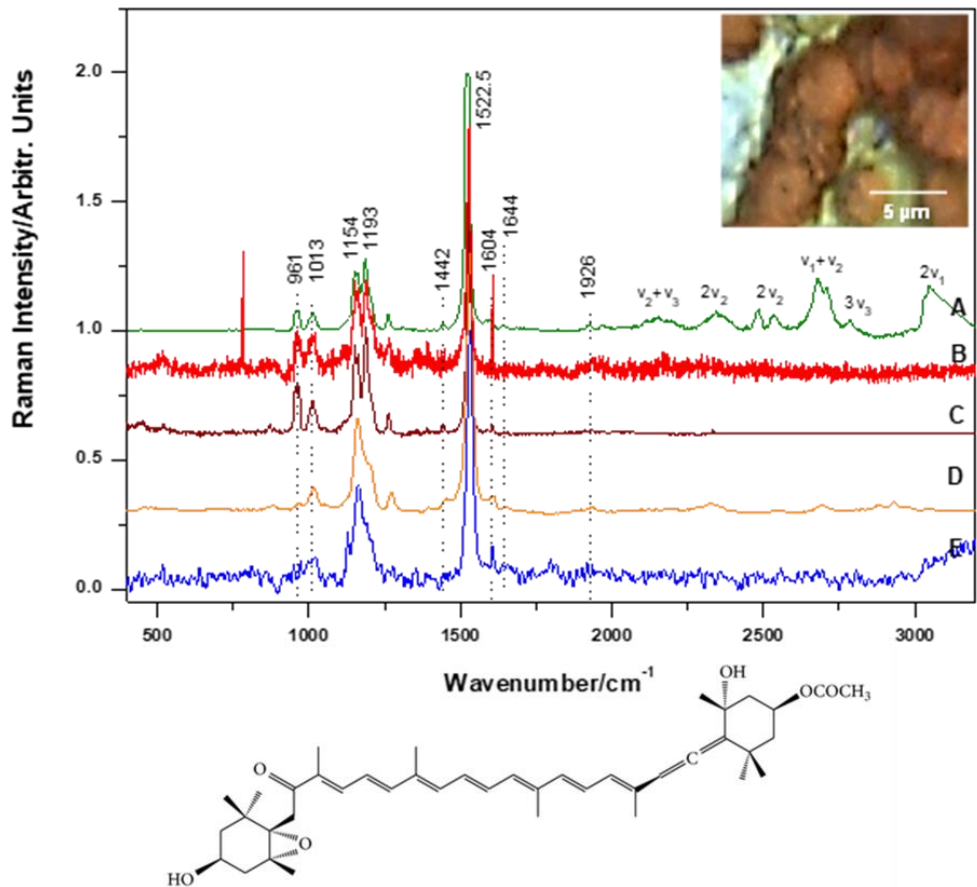


Figura 5. Spectrele Raman ale fucoxantinei standard. Cristale organice (A-C) sub excitație (A) 532 nm, (B) 632,8 și (C) 785 nm. (D) 3,063 mmol l⁻¹ soluție de etanol și (E) 12,008 μmol l⁻¹ soluție SERS sub 532 nm. Micrografia din inserție prezintă cristale organice de fucoxantin (100x). Schema de mai jos prezintă structura chimică a fucoxantinei. Pozițiile benzilor plotate se referă la spectrul (A).

Scăderea intensității semnalului Raman al fucoxantinei dizolvate în etanol cu concentrația este prezentată în Figura 6a. Semnalul relativ de fucoxantină, reprezentat ca raport între benzile la 1531 cm⁻¹ (v₁) și 2930 cm⁻¹ (etanol), prezintă o tendință liniară peste intervalul de concentrație testat, descris de funcția $y = 0,045 + 0,032x$.

Relația intensitate concentrație-semnal este prezentată în Figura 6b. Relația dintre benzi la 1527 cm⁻¹ (v₁) și 3168 cm⁻¹ (apă) este descrisă de raportul de intensitate $R = I_{1527} / I_{3168}$ și urmează o fitare polinomială de ordinul 3 cu funcția $y = 2,91 + 0,12 (x_1) + 1,137 (x_2) + 0,545 (x_3)$ în intervalul de concentrație testat. Interesant este faptul că intensitatea benzilor la 1128 și 1606 cm⁻¹ nu a prezentat o dependență clară de concentrație în intervalul de concentrații testat.

Table 1. Pozițiile și atribuțiile benzilor Raman ale fucoxantinei obținute cu trei linii de excitație în diferite stări de agregare, mediu molecular și tehnică de analiză (Raman normal, SERS, DFT, *C. closterium* viu).

Experimental bands						Calculated mode	
org. cryst., 532 nm	org. cryst., 632.8 nm	org. cryst , 785 nm	EtOH solution, 532 nm	SERS modes, 532 nm	<i>C. closterium</i> Raman 532 nm	gaseous c1 scaled	Assignment
1929	1933	1933	1933			1949	$\nu_{as}(C=C=C)$
1644			1651		1653		$\nu(C8=O)$
1602	1608	1607	1609	1607	1610	1607	$\nu(C=C)$ out of phase
1585	1590	1590					$\nu(C=C)$ centre of polyene chain*
1522.5	1529	1529.5	1532	1531	1526, 1532 (sh)	1513	$\nu(C=C)$ in phase
1441		1445	1451	1448	1444	1444	$\delta_{as}(CH_3)$
1385	1390	1390	1393	1392			sym. $\delta(CH_3)^*$
1353	1355	1355	1358				$\rho(CH_3) + \text{sym } \delta(CH_3)^*$
1311							$\nu(C=C)$ centre of polyene chain*
1260	1262	1264	1271	1267		1263	$\nu(C-C)+\beta(CH)$
	1235			1236			$\rho(C-H)^*$
1202	1212 sh	1212 sh	1205	1209	1212	1256	$\tau(CH_2)$
1184	1188	1188	1183	1191		1173	$\nu(C-C)+\beta(CH)$
			1160	1163	1158	1161	$\nu(C-C)$ $+ \delta(CCC)_{ring}$
1153	1155	1155				1154	$\nu(C-C)+\beta(CH)$
1089		1098	1110	1128			$\nu(C-C)$ cyclohexene ring*
1011	1010,1018	1010,10 18(sh)	1015	1010	1013	1023	$\delta(CCC)+\rho(CH_3)$
961	961	960	964	961	961	979	$\rho(CH_3)$

*assignments analogous to β -carotene from Cintă Pinzaru et al. (2015)

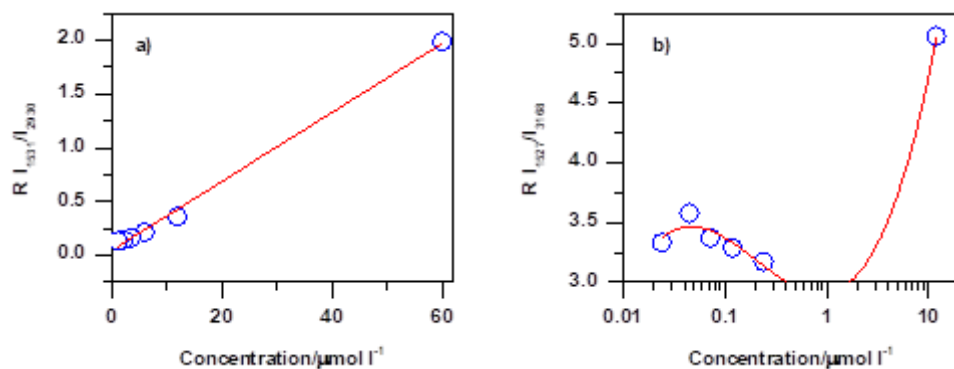


Figure 6. Graficele dependentei intensității relative a benzii Raman (a) fucoxantinei la 1531 cm^{-1} fata de modul etanol $\nu(\text{CH})$ la 2930 cm^{-1} și (b) banda SERS fucoxantină (1527 cm^{-1}) fata de banda apei (3168 cm^{-1}) care arată tendința dependentei intensității semnalului fucoxantinei în concentrațiile micromolare. Axa x din (b) este setată la scară logaritmică pentru claritate. Scaderea intensității Raman este adaptată printr-o fitare liniară ($y = 0,045 + 0,032x$) și intensitatea SERS cu o fitare polinomială de ordinul 3 [$y = 2,91 + 0,12(x_1) + 1,137(x_2) + 0,545(x_3)$].

Spectrele Raman ale fucoxantinei au fost de asemenea detectate aici in vivo din diatomea *Cylindrotheca closterium* (Figura 7).

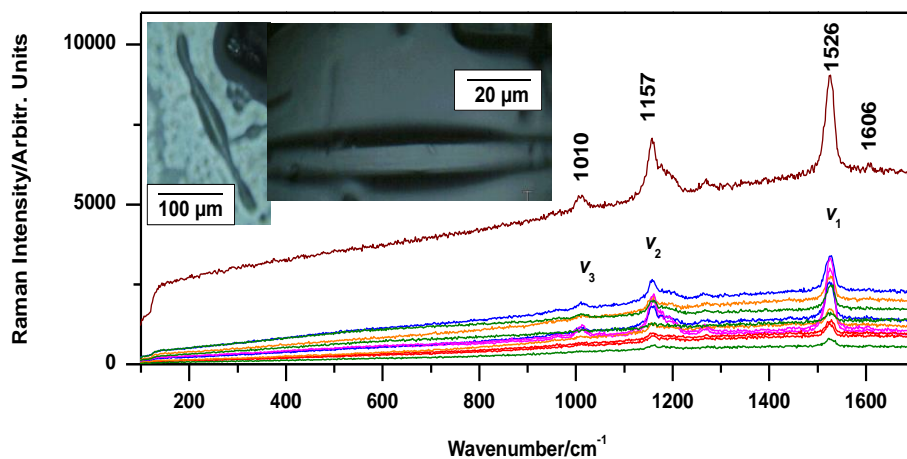


Figure 7. Spectre Raman neprocesate ale corpurilor celulare verzi ale diatomeelor *Cylindrotheca closterium*, dobândite sub excitație de 532 nm și prezentate în intervalul $150 - 1650\text{ cm}^{-1}$. Culorile diferite se referă la 6 celule diferite. Benzile carotenoizilor v_1 , v_2 și v_3 sunt plotate. Insertia prezintă micrografia celulei *C. closterium* sub $20\times$ (stânga) și $100\times$ mărire (dreapta).

3.2. Excitația ne-rezonanță a fucoxantinei în stare solidă și a β -carotenului: diferențierea carotenoizilor în biosistemele complexe

Banda experimentală ν_1 (C=C) a β -carotenului în stare solidă a fost centrată la $1513,1 \text{ cm}^{-1}$, cu o semilargime FWHM de $16,85 \text{ cm}^{-1}$. Atribuirile au fost discutate anterior de Cintă Pinzaru și colab. (2015). Analiza profilului experimental al benzii ν_1 cu fitarea multiplelor lorentziene a arătat două componente (Figura 8a), la $1512,2$ și $1520,5 \text{ cm}^{-1}$ cu raportul ariei de $7,603$ ($R^2 = 0,998$). S-au făcut calcule DFT pentru molecula de β -caroten izolată, complet relaxată. Aplicarea multi-fit lorentzian care se descrie cel mai bine forma benzii calculate, a dus la cea mai bună fitare ($R^2 = 0,999$) pentru două componente la 1517 și 1525 cm^{-1} , la fel distanțate de aproximativ 8 cm^{-1} (Figura 8b).

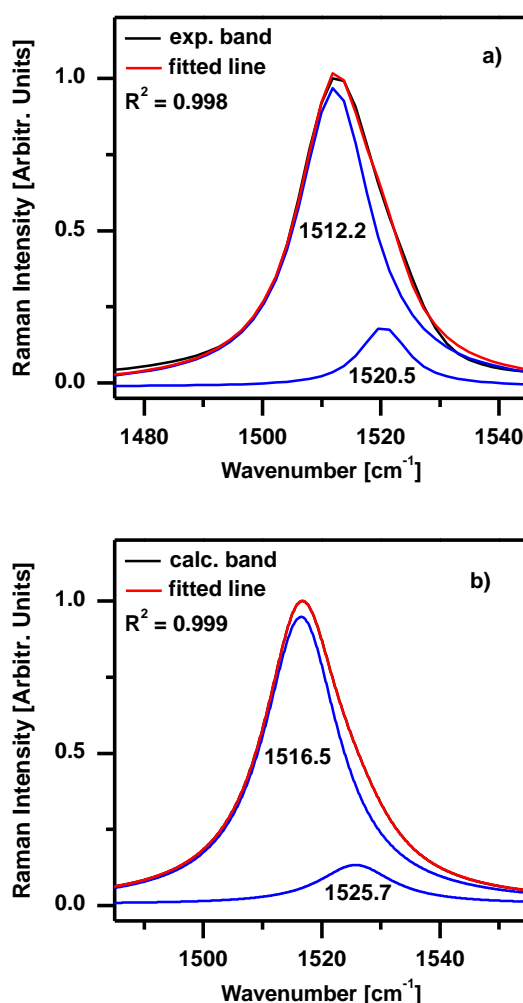


Figure 8. Deconvoluția benzii (a) experimentale și (b) teoretice β -caroten ν_1 în două componente lorentziene. Spectrele sunt normalizate la intensitatea ν_1 (C = C).

S-au făcut calcule teoretice pentru 3 conformeri ai moleculei de fucoxantină în vid, c1, c2 și c3, cu populații Boltzmann precise de 62, 35 și respectiv 3%. Spectrele

experimentale arată că linia laser de 532 nm, deși nu se apropie de maximul de absorbție, promovează totuși tranziții electronice în fucoxantina solidă, așa cum se observă prin supratonii proeminente în intervalul 2400-3200 cm^{-1} , în timp ce liniile 632,8 și 785 nm nu. Deși c1 se prezice a fi cel mai abundent conformer în vid, spectrul experimental al solidului prezintă cele mai multe asemănări cu c3, în ceea ce privește lățimea ν_1 (C=C) și forma regiunilor ν_2 și ν_3 .

Multi-componentele lorentziene fitate ale benzii ν_1 obținute *in situ* de la *C. closterium* au relevat patru componente (Figura 9). Cel de la 1531 cm^{-1} este atribuit fucoxantinei (Fx, red) în cadrul FCP, în conformitate cu Premvardhan și colab. (2009). Cea mai intensă componentă la 1525 cm^{-1} reflectă probabil și contribuția fucoxantinei, dar nu se potrivește cu frecvența obișnuită a frecvenței FCP. Cu toate acestea, se apropie de poziția cristalelor organice fucoxantice excitate cu același laser, prin urmare este provizoriu atribuită aici unei posibile populații de fucoxantină care nu este legată în FCP. Aceste două componente reprezintă 62% din suprafața ν_1 totală. Cîntă Pinzaru și colab. (2016a) banda înregistrată anterior RR ν_1 (C = C) de la *C. closterium* la 1528 cm^{-1} ; totuși, acel studiu l-a considerat ca un singur mod.

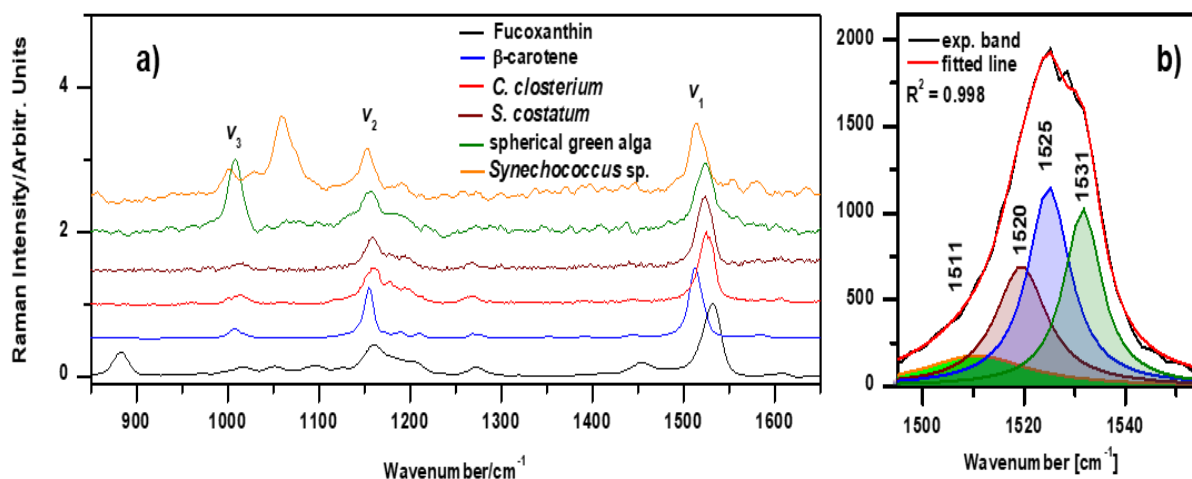


Figura 9. a) Spectre micro-Raman obținute de la microorganisme fotosintetice unicelulare și ale carotenoizilor de referință, după cum este indicat; b) Multi-peaks lorentziene fitate ale anvelopei benzii ν_1 din diatomee *C. closterium* din (a), arătând contribuțiile bazinelor individuale ale diferitelor specii de carotenoizi.

3.3. Efectul agresiunii nanoparticulelor metalice asupra cyanobacteriilor măsurat prin semnalului Raman al carotenoizilor la nivel celular

Spectrul tipic Raman al celulelor native *C. pusillum*, înregistrat sub excitație de 532 nm, prezintă cele mai intense trei benzi ale carotenoizilor la 1515, 1154 și 1002 cm^{-1} , deasupra unui fundal de fluorescență ridicată care apare probabil din datorita abundenței clorofilei (Figura 10). S-a încercat analiza unui număr mai mare de celule, cu toate acestea, în majoritatea cazurilor, nivelul de fluorescență a depășit limita de detecție și a suprasaturat detectorul CCD, prin urmare, au fost salvate doar

5 până la 6 spectre micro-Raman din celule diferite, din fiecare grup (control și tratat) la fiecare punct al analizei. Scăderea fundalului are ca rezultat un semnal carotenoid de calitate scăzută, cu o amplitudine mare a zgomotului. Acest tip de semnal este în concordanță cu rapoartele anterioare ale analizelor micro-Raman a celulelor (cianobacterii), conținând o cantitate relativ mică de pigment responsabil pentru împrăștierea Raman (Cintă Pinzaru și colab., 2016b). Cu toate acestea, aceste rezultate reprezintă prima detectare in situ a carotenoidelor din tulpina cianobacteriei *C. pusillum* AICB 1012.

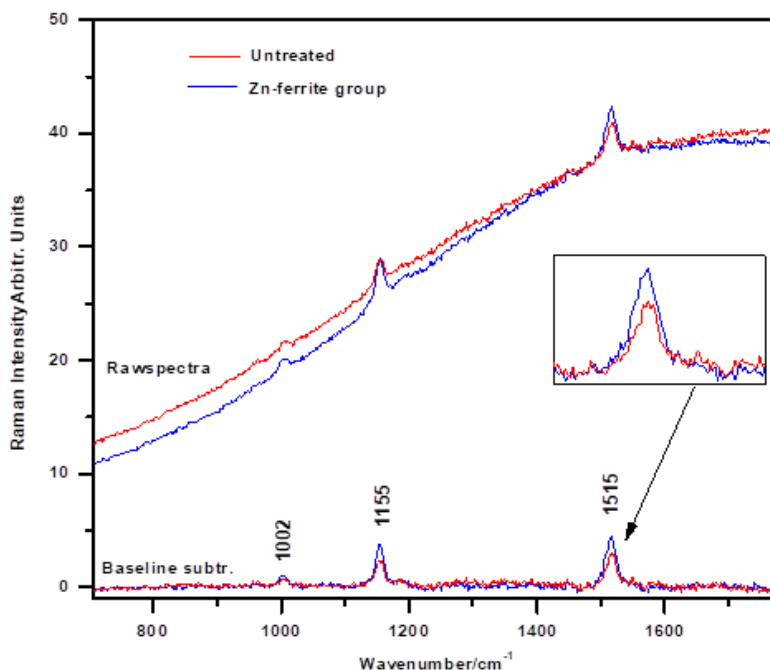


Figura 10. Detalii ale spectrelor Raman procesate obținute de la o singură celulă (cianobacterii *Coelomoron pusillum* AICB 1012), din grupului de control, respectiv tratate timp de 24 de ore cu nanoparticule de Zn-ferrită. Spectrele brute sunt date pentru comparative (background ridicat).

Au fost calculate cinci până la șase spectre din fiecare etapă de măsurare, iar intensitatea relativă a benzii carotenoizilor ν_1 cu intensitatea de fond la 1515 cm^{-1} (sub centrul benzii) a fost exprimată ca un raport, $R = I_{\text{carotenoid}}(1515) / I_{\text{fundal}}(1515)$ (Figura 11). Fluorescența clorofilei (fundalul) nu este măsurată direct în spectroscopia Raman; cu toate acestea, fundalul poate conține în continuare informații valoroase despre eșantion.

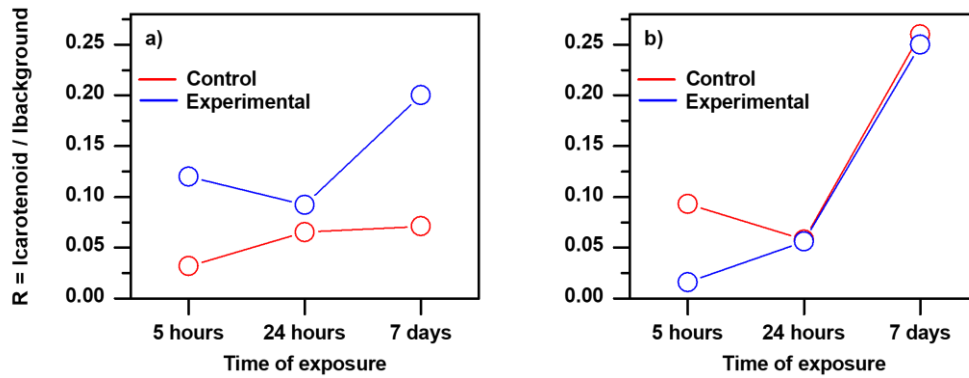


Figure 11. Diagrama evoluției raportului R [$R = I_{\text{carotenoid}}(1515) / I_{\text{fundal}}(1515)$] în punctele de eșantionare la 5 și 24 de ore și 7 zile de expunere la nanoparticule de Zn-ferita (a) și Mn-Zn-ferita (b) a cianobacteriilor.

3.4. Nanoparticule de Zn-Mn-ferită și spectroscopia lor Raman - articol de cercetare original

- *Publicat in Journal of Raman Spectroscopy, on 12. February 2020, Impact factor (2018) = 2.80*
 - Citation: Nekvapil, F., Bunge, A., Radu, T., Cinta Pinzaru, S, Turcu, R. Raman spectra tell us so much more: Raman features and saturation magnetization for efficient analysis of manganese zinc ferrite nanoparticles. J. Raman Spectrosc. 2020b, 51(6): 959-968. DOI: 10.1002/jrs.5852
- *Prezentat oral la 12th International conference "Processes in Isotopes and Molecules, Cluj-Napoca (Romania), 25th -27th September 2019*
 - Citation: Nekvapil, F., Bunge, A., Radu, T., Cinta Pinzaru, S., Turcu, R. Raman spectroscopy analysis of metal-ferrite nanoparticles: towards precise interpretation and extraction of structural information. In: Book of Abstracts of the 12th International Conference Processes in Isotopes and Molecules. National Institute for Research and Development of Isotopic and Molecular Technologies, Cluj-Napoca, 25th - 27th September 2019, p. 17.

În acest studiu, ne-am propus să obținem cunoștințe solide și detaliate prin intermediul spectroscopiei Raman a nanoparticulelor de ferită utilizate în studiul toxicologic asupra cianobacteriilor descris în secțiunea 3.3. După cum este subliniat în liniile introductive ale secțiunii 3.3. și din următoarea publicație, multe tipuri de

nanoparticule cu compoziție, structură și proprietăți diferite sunt fabricate pentru a îndeplini diferite scopuri, care pot ajunge în cele din urmă în mediu acvatic sau alte medii naturale. În urma acestui studiu, nanoparticulele de mangan-zinc-ferită ($Mn_{0.8}Zn_{0.2}Fe_3O_4$) pot fi identificate prin spectroscopie Raman și proprietățile lor magnetice, adică cantitatea de defecte de rețea poate fi descrisă prin banda de 713 cm^{-1} . Prin urmare, tipul de nanoparticule și proprietățile magnetice pot fi corelate corespunzător cu semnalul Raman al carotenoizilor rezultat din interacțiunea celulelor cu nanoparticulele (secțiunea 3.3.3.). O astfel de corelație contribuie la scopul mai larg al tezei de extindere a aplicațiilor Raman în domeniul mediului inconjurător.

3.5. Capitolul 3. Concluzii

Specificitatea fucoxantinei Raman și semnalul SERS și forma complexă a benzii $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ au fost abordate prin tehnici Raman experimentale de înaltă precizie și calcule teoretice, iar perspectivele pentru interpretarea spectrală detaliată, identificarea și cuantificarea acestui carotenoid au fost prezentate.

Sub excitație Raman normală, intensitatea semnalului fucoxantinei, exprimată ca intensitatea benzii $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ în raport cu intensitatea benzii etanol $\nu(\text{CH})$, crește liniar în intervalul de concentrație $1,201 - 60,042\ \mu\text{mol l}^{-1}$, în timp ce semnalul SERS, exprimat ca intensitatea benzii $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ în raport cu banda $\nu(\text{OH})$ a apei urmează o tendință polinomică de ordinul III în intervalul $0,024 - 12,008\ \mu\text{mol l}^{-1}$.

Afirmațiile care susțin ambiguitatea capacității spectroscopiei Raman de a determina profilul carotenoizilor în sisteme biologice, găsite într-o literatură consistentă, apar din interpretarea superficială a spectrelor, și anume luând în considerare doar frecvența benzilor ν_1 , ν_2 și ν_3 (Jehlička și colab. 2014; de Oliveira și colab., 2010). Această teză arată că o analiză atentă a deconvoluției lorentziene multi-peak (sau chiar fitarea cu un singur profil, atunci când este relevant) a formei benzii ν_1 , ținând cont de efectul relației frecvență-semilargime (FWHM) - linie laser, permite diferențierea și identificarea carotenoizilor.

Spectroscopia micro-Raman pe o singură celulă poate fi utilizată pentru a testa ușoare modificări ale conținutului de carotenoizi din cianobacteriile tratate cu nanoparticule de ferită, relativ la cultura netratată. Răspunsul fiziologic al cianobacteriilor este observat în ceea ce privește poziția benzii ν_1 și raportul de intensitate al benzii ν_1 și nivelul de fundal al fluorescenței sub bandă. Caracterul coloidal al AgNPs determină extinderea mai mare a acoperirii celulelor, în timp ce caracterul magnetic al NP-urilor de ferită le determină să se aglomereze între ele, mai degrabă decât să adere la celule, după cum se dovedește prin microscopia electronică.

Combinarea spectroscopiei micro-Raman și electronice, care nu a necesitat aproape nicio pregătire a probei în cazul prezentat, arată potențialul testării

ecotoxicologice rapide a efectului fiziologic al NP asupra cianobacteriilor și vizualizarea interacțiunii acestora. Cu toate acestea, metoda prezintă un potențial imens pentru îmbunătățiri suplimentare.

4. ANALIZA COMPARATIVĂ A ȚESUTURILOR, DETECTAREA *IN SITU* ȘI ROLURILE BIOCHIMICE ALE CAROTENOIZILOR STUDIATI PRIN SPECTROSCOPIE REZONANTĂ RAMAN ȘI SERS; PREPARAREA ȘI CONSERVAREA DELICATĂ A ȚESUTURILOR PENTRU ANALIZA RAMAN

Tehnicile de spectroscopie Raman recunoscute în general ca deținând potențialul de analiză de înaltă sensibilitate și precizie în domeniile biologiei marine, biotehnologiei și biofizicii, sunt aplicate într-un număr mare de studii axate pe microorganisme. Cu toate acestea, studiile aprofundate care aplică spectroscopia Raman pentru analiza carotenoidelor din țesuturile native și din extractele de țesuturi ale organismelor marine multiceulare, care demonstrează de fapt acest potențial analitic cu relevanță în lumea reală, sunt rare în literatura existentă. De asemenea, se știe puțin despre pregătirea corectă și eficientă a probelor pentru analiza Raman *in vivo* sau cât mai aproape de starea sistemului nativ posibil.

În acest capitol, am folosit comparativ spectroscopia de rezonanță Raman și SERS pentru a demonstra detectarea, identificarea și metabolismul carotenoizilor și pentru a studia rolul lor în protecția celulară și răspunsul la stres în diferite țesuturi de arici de mare, considerate modele de animale nevertebrate. Pe lângă interesul față de aceste modele animale în studii de mai bine de un secol de tradiție de cercetare, considerate modele biologice și toxicologice (di Bernanrdo și di Carlo, 2017), gonadele lor prezintă un produs alimentar de lux, cu o cifră de afaceri semnificativă pe piață în zonele de coastă și pe piețele renumite ale fructelor de mare, datorită carotenoidului ridicat. conținut (McBride și colab., 2004).

Carotenoizii au fost analizați comparativ 1) în țesuturile din aceeași specie, 2) între țesuturile corespunzătoare a două specii de arici de mare și 3) între lichidul celomic al corpului de arici de mare și apa de mare din jur. Am efectuat analize Raman pe țesuturi native, acolo unde a fost posibil. În cazurile în care carotenoizii trebuiau extrași, am folosit un tratament cât mai simplu și minim posibil al eșantionului, pentru a prospecta analiza carotenoizilor având în vedere eficiența costurilor și a forței de muncă. Mai mult, deducem rolurile de răspuns la stres ale carotenoizilor pe baza semnalului lor Raman în condiții de excitație de rezonanță și SERS, precum și caracteristicile anumitor carotenoizi cunoscuți din literatură.

4.1. Studiu comparativ al metabolismului carotenoizilor la echimoderme studiat prin spectroscopie de rezonanță Raman și tehnici SERS

Acceptată ca prezentare orală la *International Conference of Raman Spectroscopy, ICORS 2020, Rome, postponed to 1.-6. August 202.*

4.1.1. Detectarea și caracterizarea carotenoizilor la echinoderme

Această secțiune prezintă o colecție de studii comparative ale conținutului de carotenoizi tisulari ai celor două specii de arici de mare, ariciul pietros *Paracentrotus lividus* și ariciul de mare negru *Arbacia lixula*, cu scopul de a prospecta asemănările și diferențele în producția și metabolizarea carotenoizilor în țesutul specific.

Ipoteza inițială susține că țesuturile lor vor conține carotenoizi diferiți, reflectând diferitele profiluri ale carotenoizilor din sursele de hrană diferite ale celor două specii. Spectroscopia Raman și tehnicile sale (Rezonanță Raman, SERS) se dovedeste a fi eficientă pentru sondarea acestei ipoteze. În plus față de constatarea principală, sunt trase alte câteva concluzii cu privire la aspectele practice ale pregătirii eșantioanelor de țesut și abordării analitice.

4.1.2. Proceduri generale de prelevare a probelor

Echinodermele au fost colectate de pe un debarcader superficial în Golful Gruž, orașul Dubrovnik în mai multe ocazii în perioada 2017 - 2019. S-a observat că *P. lividus* se găsește de obicei pe rocile de pe fundul mării, la mică adâncime, în timp ce *A. lixula* era atașat la suprafețe verticale de beton ale malurilor. Animalele au fost colectate manual cu ajutorul unei plase de pescuit și transportate în recipient cu apă de mare filtrată la Laboratorul de Biologie de la Universitatea din Dubrovnik în apropierea locului de colectare pentru pregătirea inițială a probei. Fiecare țesut a necesitat diferite proceduri de conservare / extracție, care au fost stabilite în prealabil prin câțiva ani de colaborare a Laboratorului Raman-AFM (Universitatea Babeș-Bolyai) și a Departamentului de Acvacultură (Universitatea din Dubrovnik), și vor fi discutate în următoarele secțiuni.

4.1.3. Detectia SERS a carotenoizilor din extractele sistemului digestiv

În Figura 4.1.1.d (Teză completă) se prezintă o fitare multi-peaks Lorentziană a benzii ν_1 (C=C) din spectrul 2 care prezintă cea mai clară bandă. Fitarea a dezvăluit o componentă intensă la 1532 cm^{-1} , atribuită aici fucoxantinei/fucoxantinolului (spectrul de referință inclus în Figura 4.1.1.c), și o altă

componentă puternică la 1523 cm^{-1} , care este atribuită provizoriu aici canthaxantinei, luteinei sau α -caroten (Bernstein și colab., 2002), despre care se știe că apar la anumite specii de alge verzi și brune (Abd El Baky și colab. 2008; Casazza și Mazzella, 2002). Ultima și cea mai slabă componentă la 1513 cm^{-1} se potrivește bine cu caracteristica ν_1 a β -carotenului în stare solidă (Cintă Pinzaru și colab., 2015; Secțiunea 3.2.).

4.1.4. Detecția SERS a carotenoizilor din fluidul celomic

Cele patru benzi principale ale carotenoizilor, la 956 , 1010 , 1157 și 1525 cm^{-1} , au fost înregistrate din extractul etanolic fluid al lichidului celomic din *P. lividus*, deși cu variații mari de intensitate. Pe de altă parte, eșantioanele de *A. lixula* au prezentat semnale multiple de material organic, dar nu au semnale clare de carotenoid; Rygula și colab. (2013) și Czamara și colab. (2014) au prezentat recenzii detaliate ale benzilor Raman ale proteinelor și respectiv lipidelor. Domeniul spectral de $1400 - 1600\text{ cm}^{-1}$ din spectrul obținut de la *P. lividus* a fost prea complex pentru scăderea precisă a liniei de bază și fitarea cu componente lorentziene. Cu toate acestea, s-au observat anumite diferențe: banda principală C=C în plan s-a deplasat de la 1527 cm^{-1} în sistemul digestiv la 1525 cm^{-1} în fluidul celomic, iar benzile C=C în afara planului au apărut la 1580 și 1602 cm^{-1} , indicând procese metabolice suplimentare care au loc probabil în peretele intestinal.

4.1.5. Echinononă și β -caroten -specii moleculare acumulate in gonadele echinodermelor - efectul mediului molecular asupra benzilor Raman ale carotenoizilor

Spectrele SERS obținute din extracte etanolice ale tesuturilor de gonade de la 7 femele de *P. lividus* a prezentat semnalul bine recunoscut al carotenoidelor, inclusiv ν_1 la 1520 cm^{-1} , ν_2 la 1154 cm^{-1} , ν_3 la 1004 cm^{-1} și benzile la 1366 , 1585 și 1615 cm^{-1} care sunt amplificate ca urmare a interacțiunii carotenoizilor cu nanoparticulele de argint (AgNPs)(Cintă Pinzaru și colab., 2015). Când se analizează câteva zeci de spectre SERS, se poate observa o variație a frecvenței ν_1 între 1518 și 1522 cm^{-1} . Această variație a fost atribuită de Nekvapil și colab. (2019) la variația conținutului relativ de β -caroten (1512 cm^{-1}) și echinenonă (1521 cm^{-1}) de-a lungul ciclului reproductiv al aricilor de mare. Această problemă este discutată mai detaliat în secțiunea 4.3.

4.1.6. Detectarea micro-Raman rezonantă a carotenoizilor în ouăle native ale echinodermelor

Ovocitele native, netratate, colectate de la *P. lividus* și *A. lixula* depuse pe o placă reflectorizantă, hidrofobă SpectRIM sunt convenabile pentru analiza convențională micro-Raman, prezentând un semnal puternic al carotenoizilor atât sub excitație rezonantă, cât și non-rezonantă (Nekvapil și colab., 2019). Semnalul de la carotenoid este proeminent, și constă din contribuții de la echinenonă și β -caroten; a fost înregistrat din orice punct din ovocite, iar distribuția lor pare a fi uniformă în întreaga celulă (Nekvapil și colab., 2019). Pe de altă parte, ouăle de *A. lixula* conțineau mai multe regiuni cu un model spectral diferit: 1) semnalul din regiunile mai întunecate din perimetrul celulei conținea doar semnalele lipidelor și proteinelor, 2) regiunile gălbui din ouă aveau un semnal slab carotenoid și 3) benzile principale bine recunoscute ale carotenoidelor ar putea fi înregistrate din „rezervoare” roșiatice cu un conținut de carotenoizi probabil mai mare.

4.1.7. Localizarea prin rezonanță micro-Raman a semnalului carotenoid în larve

Semnalul specific de carotenoid ar fi putut fi înregistrat la tijele scheletale de la ambele specii, în timp ce la larvele *P. lividus* semnalul a fost înregistrat și din granule de pigment roșu viu (Figura 12c). La ambele specii, benzile ν_3 și ν_2 au fost înregistrate la 1004 și, respectiv, 1154 cm^{-1} , în timp ce ν_1 a fost înregistrat la 1514 cm^{-1} în *P. lividus* și la 1517 cm^{-1} în *A. lixula*. Analiza profilului de bandă prin fitarea lorenziană multi-peak arată că ν_1 conține la ambele specii o contribuție puternică de β -caroten (1512 cm^{-1}) și echinenonă (1521 cm^{-1}). Cu toate acestea, la *P. lividus*, modul β -caroten este notabil mai puternic ($\text{aria}_{\beta\text{-caroten}} / \text{aria}_{\text{echinenone}} = 4,29$), în timp ce în *A. lixula* cele două moduri au fost de intensitate similară ($\text{aria}_{\beta\text{-caroten}} / \text{aria}_{\text{echinenone}} = 1,33$), de unde rezultă schimbarea poziției de maxim în spectrele brute.

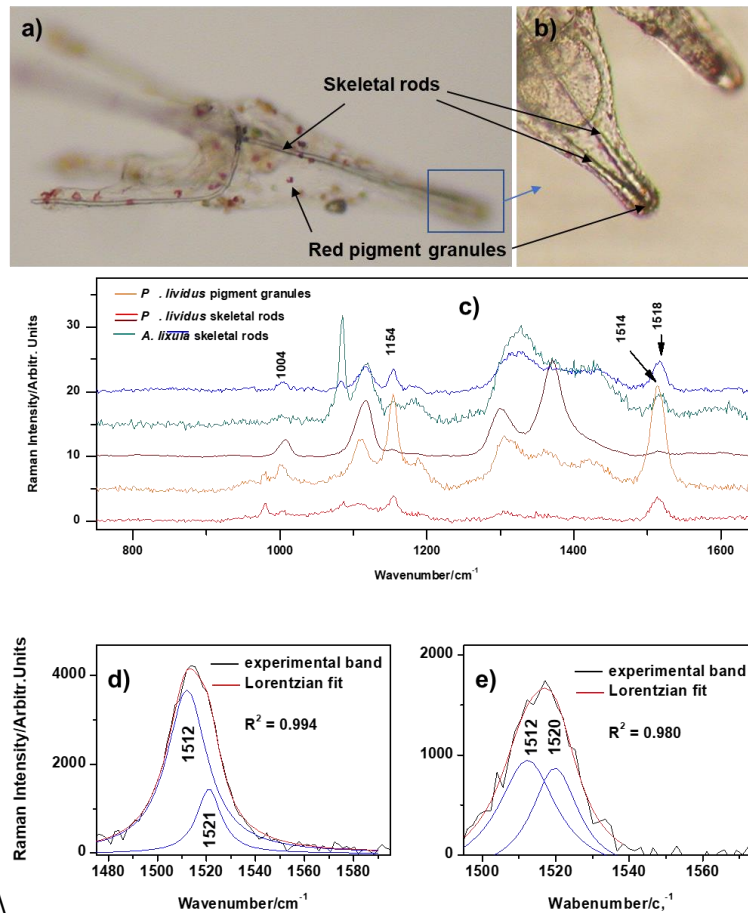


Figura 12. Micrografia unei larve de arici de mare *Paracentrotus lividus* în stadiul de *pluteus* cu 4 brațe, cu tije scheletale și granule de pigment indicate; (b) vedere mărită a vârfurilor de creștere ale tijelor scheletale de pe partea posterioară a unei alte larve; (c) afișarea comparativă a spectrelor micro-Raman obținute din granulele de pigment și din tije scheletale ale larvelor aricilor de mare *P. lividus* și *Arbacia lixula*. Fitașele loreziene multi-peak ale regiunii $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ sunt de asemenea, prezentate pentru un spectru obținut de la tija scheletală *P. lividus* (b) și *A. lixula* (c).

4.2. Studiu Raman comparativ al fluidului celomic al echinodermelor și a apei de mare nativă a acestora: perspectivă pentru un potențial indicator al agresiunii sau modificărilor mediului

- Publicat că *in-extenso* proceeding la conferința internațională “Air and Water Components of the Environment”, Sovata, cuplat cu prezentarea orală
 - Citation: Nekvapil, F., Tomšić, S., Cintă Pinzaru, S. Comparative Raman spectroscopy study of the coelomic fluid of grazing sea urchins and their native seawater: prospect for a potential indicator of environmental aggression. In: Șerban, G., Bătinaș, R., Tudose, T., Horváth, Cs., Croitoru, A., Holobăcă, J. (eds.) Air and water

Abstract

Echinodermele au capacitate limitată de mișcare și folosesc sistemul de circulație vasculară pentru a pompa apa de mare din jur pentru a pune în mișcare părțile corpului. Prin urmare, se crede că lichidul celomic, un fluid corporal din ariciul de mare, care acționează ca transport intern și potentează sistemul imunitar, conține poluanți metabolizați. În studiul de față, am dezvoltat o metodă de detectare a carotenoizilor din fluidul celomic prin spectroscopie Raman. Carotenoizii au fost obținuți din fluidul celomic prin extracție cu etanol și rezonanța lor selectivă a semnalului Raman a fost amplificată folosind tehnica de împrăștiere Raman amplificat de suprafață (SERS). Carotenoizii sunt ingerati de arici de mare prin dieta lor pe bază de plante, metabolizate și transportate în fluidul celomic, unde au fost detectate pentru prima dată prin intermediul SERS. Am investigat în continuare corelațiile carotenoizilor care semnalizează din fluidul celomic cu apa locală de mare pentru a prospecta o potențială legătură cu modificările sau agresiunea mediului. Rolul antioxidant și imunomodulator al carotenoizilor, în special al β -carotenului, a fost studiat pe larg la vertebrate (Chew și Park, 2004). Apărarea biologică și creșterea activității antioxidante sunt asociate cu un nivel crescut de carotenoizi și / sau o schimbare a echilibrului speciilor lor la arici de mare nativi. În plus, am comparat concentrația relativă a ionului sulfat a lichidului celomic din arici cu apă de mare locală folosind tehnica FT-Raman. Discutăm despre posibilitatea dezvoltării metodelor de monitorizare rapidă și rentabilă a apelor de mediu native prin carotenoizi detectati direct in arici de mare. Alți poluanți coexistenți care pot pătrunde în lichidul celomic prin sistemul digestiv sau prin sistemul vascular de apă al aricilor de mare se așteaptă să se coreleze cu răspunsul animalului printr-o activitate antioxidantă crescută datorită carotenoizilor. Astfel, ariciul de mare se poate dovedi a fi un bun semnalizator al schimbărilor mediului apos in care traiesc, prin semnalizarea carotenoizilor lor.

Cuvinte cheie: apă de mare, mediu marin, poluanți, arici de mare, carotenoizi, spectroscopie Raman.

4.3. Pachete de microsferă de carotenoizi: icre intacte de arici de mare monitorizate prin instrumentele spectroscopiei Raman - articol de cercetare original

- *Publicat in Photochemical & Photobiological Sciences, on 23. May 2019, Impact factor = 2.40*

- Citation: Nekvapil, F., Brezeştean, I., Tomšić, S., Müller, Cs., Chiş, V., Cintă Pinzaru, S. Microsphere packages of carotenoids: intact sea urchin eggs tracked by Raman spectroscopy tools. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2019a, 18: 1933-1944. DOI: 10.1039/c9pp00181f.
- *Prezentat oral la 18th International conference Prospects for 3rd Millennium Agriculture, Cluj-Napoca (Romania), 27th - 29th September 2018*
 - Citation: Nekvapil, F., Brezeştean, I., Tomsic, S., Muller, Cs., Chis, V., Cintă Pinzaru, S. Rapid and cost effective tracking carotenoids in native sea urchin eggs by multi-laser Raman spectroscopy. In: Vodnar, D.C. (ed.) *Book of Abstracts. Faculty of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Cluj-Napoca, 2018.*

Carotenoizii sunt un factor determinant important al valorii de piaţă a gonadelor, contribuind la culoarea şi proprietăţile organoleptice ale acestora (McBride şi colab., 2004). În lucrarea următoare am folosit rezonanţă Raman (532 nm) pentru analiza *in situ* a icrelor native şi a extractelor de gonadă şi NIR-Raman (785 nm) numai pentru icre, pentru a studia profilul carotenoizilor şi compoziţia chimică generală a icrelor. Aici am arătat că semnalul RRS al icrelor native poate dezvălui conţinutul carotenoizilor (echinenone, β -caroten şi alte specii minore) după o deconvoluţie Lorentziană multi-peak simplă, oferind astfel o metodă rapidă pentru evaluarea carotenoizilor din icre. Deoarece icrele sunt principalul constituent al gonadelor mature, pre-depunerea icrelor, analiza *in situ* a celulelor native prin RRS este o metodă mai simplă şi mai rapidă decât extracţia ţesutului gonadului în volum şi analiza ulterioară a extractelor. Dezvoltarea ulterioară a spectrometrelor portabile Raman permite implementarea reală la faţa locului, a controlului calităţii gonadelor în zonele de exploatare economică şi comercializare a acestor produse marine. Acest lucru va permite extinderea aplicabilităţii instrumentelor spectroscopice Raman atât în cercetarea biologică, cât şi pe piaţa fructelor de mare, susţinând astfel obiectivele tezei.

4.4. Explorarea rolului de protecţie biologică a carotenoizilor prin spectroscopie Raman: stresul mecanic al celulelor - articol de cercetare original

- *Publicat in Studia Universitatis Babeş-Bolyai Physica, on 30. December 2019*
 - Citation: Nekvapil, F., Molnar Muller, Cs., Tomsic, S., Cintă Pinzaru, S. Exploring the biological protective role of carotenoids by Raman spectroscopy: mechanical stress of cells. *Studia UBB Physica* 2019b, 64: 75-82. DOI: 10.24193/subbphys.2019.08

Există numeroase sugestii că carotenoizii contribuie la apărarea chimică celulară prin activitatea lor de eliminare a radicalilor liberi (discutată în secţiunea

4.3.). Cu toate acestea, următoarea lucrare a urmărit să elucideze dacă carotenoizii joacă un rol și în medierea unui stres fizic în icrele de arici de mare, adică dacă se poate observa orice diferență în semnalul de rezonanță specific carotenoizilor prin spectroscopie Raman (și SERS) între celulele expuse la stress mecanic (ușor centrifugate) față de cele netratate. Creșterea clară a semnalului SERS a carotenoizilor a fost localizată în apropierea periferiei oului sub abordarea SERS, indicând faptul că carotenoizii au fost într-adevăr mobilizați ca răspuns la acest stres fizic. Prin urmare, cunoașterea comportamentului carotenoizilor sub stresul fizic și protecția inerentă a celulelor este extinsă, în conformitate cu scopul capitolului 4 privind investigarea ulterioară a funcțiilor biologice ale carotenoizilor.

4.5. Capitolul 4. Concluzii

Sunt obținute concluzii suplimentare cu privire la detectarea și comportamentul semnalului Raman al carotenoizilor legat de cercetarea biochimiei marine:

- *Surface-enhanced Raman scattering* (SERS) a permis detectarea semnalului carotenoid în extrasele de țesut unde numai semnalul solventului sau fluorescența ar fi putut fi înregistrat sub împrăștiere normală Raman.
- Tehnica Raman rezonanta combinata cu micro-spectroscopia a permis detectarea *in situ* a semnalului carotenoizilor din extractu de gonade, icre și țesuturile larvare. Sub excitație ne-rezonanță, aceste țesuturi prezintă semnale relativ mai puternice ale compușilor ne-țintă (proteine și lipide), după cum arată Nekvapil și colab. (2019).
- Deconvoluția Lorentziana multi-peaks a benzii carotenoizilor $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ cu numărul relevant de (2 - 4) componente cu poziții și lățimi semnificative permite diferențierea contribuțiilor rezervoarelor de carotenoizi individuali (derivați fucoxantini, echinenonă, β -caroten, astaxantină etc.). Procedura de descompunere produce rezultate mai precise decât considerațiile numai pentru proprietățile anvelopei benzii globale. Structura benzii este asadar cheia unor analize semnificative.
- Instrumentația de spectroscopie Raman, rezonanța Raman și SERS, sunt indicate aici pentru a fi potrivite pentru sondarea funcțiilor biochimice ale carotenoizilor din țesuturile nevertebrate: Secțiunea 4.2. sugerează că profilul carotenoid al lichidului celomic de arici de mare, obținut prin măsurători SERS, se poate modifica ca răspuns la agresiunea mediului, similar cu creșterea presupusă a semnalului β -caroten în cianobacteriile expuse nanoparticulelor de ferită (secțiunea 3.4.); Detectia Raman rezonantă a acumulării unor cantități mai mari de echinenonă și β -caroten în icrele native (Secțiunea 4.3.) a indicat rolul lor ca rezervă antioxidantă celulară; localizarea carotenoizilor la periferia celulelor determinată de combinația SERS și RRS, indică faptul că carotenoizii sunt, de asemenea, mobilizați ca răspuns la stresul fizic.

5. MODIFICAREA PROPRIETĂȚILOR OPTICE ALE CAROTENOIZILOR LA LEGAREA DE PROTEINELE CRUSTACIANINE INVESTIGATE PRIN REZONANȚĂ RAMAN CU MAI MULTE LINII LASER ȘI PRIN DFT; SIMILITUDINI ALE SEMNALULUI LOR CU POLIENELE NESATURATE; APLICAREA SPECTROSCOPIEI RAMAN ÎN BIOECONOMIE ALBASTRĂ ȘI ECONOMIE CIRCULARĂ

După legarea în complexul de crustacianină, astaxantina suferă o schimbare bathocromică proeminentă a spectrului său de absorbție și a semnalului Raman, deplasând maximul absorbției de la intervalul 460 - 470 la 580 - 630 nm și respectiv de la 1514 la 1490 - 1498 cm^{-1} . Ambele tipuri de pigmenți (astaxantină liberă și legată non-covalent în complexul astaxantin-crustacianin) au fost dovedite anterior prin spectroscopie de rezonanță Raman *in vivo* numai în carapacea de homar (Salares și colab., 1977), de aceea se crede în mod obișnuit că pigmentul α -crustacianină este specific acestui crustaceu purpuriu.

Mecanismul acestei modificari moleculare relevate spectroscopic a fost studiat de mai multe ori prin tehnici de calcul theoretic, fiecare studiu explicând doar o parte a motivului schimbării, dar nu întregul comportament. Aceste puncte de vedere au ridicat unele controverse în literatură de specialitate, iar mecanismul schimbării bathocromice nu este încă pe deplin explicat.

Pentru a contribui la dezlegarea acestei problemei, am realizat o serie de studii de rezonanță *in situ* Raman (532 nm pentru astaxantin, 632 nm pentru crustacianină, 785 nm fără rezonanță) pentru a detecta cele două tipuri de pigmenți în cochiliile de crustacee de diferite culori. Detectarea ambilor pigmenți în cochiliile din aproape toate speciile a indicat la prima vedere că crustacianina nu este specifică numai cochiliei de culoare albastră, așa cum se credea anterior (secțiunile 5.1., 5.2. și 5.3.).

De asemenea, am efectuat calcule DFT pe astaxantină izolată (simulând carotenoidul în forma sa liberă) și pe astaxantină în prezența unei molecule de apă (simulând legarea necovalentă la crustacianină), calculând deplasarea Raman a astaxantinei $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ componentă de la 1508 cm^{-1} (formă liberă) la 1494 cm^{-1} (formă legată necovalent) (secțiunea 5.3.).

În plus, microscopia electronică de scanare a dezvăluit porozitatea specifică culorii crustei, la scară nano, ceea ce ne-a stârnit interesul de a investiga culoarea structurală a crustei de crab (secțiunile 5.2. și 5.3.) și de a promova aceste materiale pentru obținerea de produse noi, cu valoare adăugată. Cochiliile de crustacee ca parte a componentelor necomestibile din exploatarea economică a crustaceelor, în mod uzual, sunt considerate deseuri ale industriei alimentare de profil. Aici arătăm că aceste biomateriale poroase cu proprietăți nou descoperite, cu o compoziție mineral-organică interesantă pot avea o largă aplicabilitate potențială în agricultură, industrie și nanomedicină (secțiunile 5.4. și 5.5.).

5.1. Semnal de rezonanță Raman al pigmentilor crustacei localizați într-o structură poroasă de carbonat biogen - controversă și noi descoperiri privind originea culorii

Recent, Nekvapil și colab. (2020) au raportat că profilul pigmentilor Raman activi al celor două specii de crab, crabul albastru de Atlantic (*Callinectes sapidus*) și crabul verde mediteranean (*Carcinus aestuarii*) este calitativ același și este dominat de astaxantin (rosu) și crustaciaanin (albastru). Diferența de culoare se explică prin raportul diferit al abundenței cromoforului și a nanoporilor din crustă cu diametru diferit, acționând ca o super-rețea naturală cu caracteristici diferite pentru diferite culori ale crustei (roșii, albastre, albe și verzi). În acest studiu complex am utilizat abordarea prin spectroscopie micro-Raman folosind excitația prin rezonanță pentru carotenoizi liberi (532 nm) și carotenoproteine de tip crustacianină (632,8 nm), care permite studierea fiecărui grup de pigmenti separat și evidențiază diversitatea lor în cuticulele native din 13 specii de crustacee de la diferiți taxoni, cuprinzând un total de 16 părți anatomice ale cuticulelor. În plus, linia non-rezonantă de 785 nm a furnizat înregistrarea simultană a ambilor pigmenti cu nivel scăzut de fundal de fluorescență. Am arătat astfel că pigmentii activi ai crustaceului (carotenoizi) sunt diferiți de polienele nesaturate depistate anterior în cochiliile altor nevertebrate (Wade și colab., 2019; Hedegaard și colab., 2006; de Oliveira și colab., 2013) și am discutat diferențierea spectroscopică între cele patru grupuri prezumtive de pigmenti pe bază de poliene în cochiliile de nevertebrate.

Figura 13. rezumă constatările noastre asupra semnalelor carotenoizilor și carotenoproteice în urma analizei micro-Raman a cochiliilor native din 8 specii de crustacee (10 părți anatomice). Spectrele Raman din toate cochiliile de crustacee excitate sub toate cele trei linii laser (532, 632,8 și 785 nm) au prezentat cele trei benzi principale de carotenoide: ν_1 între 1490 și 1520 cm^{-1} , ν_2 în jurul valorii de 1154-1157 cm^{-1} și ν_3 în jurul 1004 cm^{-1} . Prezența benzii ν_3 și poziția ν_2 peste 1155 cm^{-1} confirmă prezența grupărilor $-\text{CH}_3$ atașate lanțului polienic, caracteristice carotenoizilor. Pe de altă parte, polienele nesaturate, în care lanțul polienic nu este complet metilat, nu ar prezenta banda ν_3 , iar ν_2 ar apărea de obicei între 1120 și 1145 cm^{-1} (Hedegaard și colab., 2006; de Oliveira și colab., 2013; Wade și colab., 2019). Diferite linii de excitație au arătat că marea variație a poziției și lățimii benzii ν_1 se datorează de fapt caracterului său bicomponent: contribuția carotenoizilor liberi este amplificată prin excitație cu linia 532 nm (1510 - 1530 cm^{-1} ; Salares et al., 1979; această teză) și contribuția carotenoproteinelor este amplificată la excitație cu linia 632,8 nm (Salares și colab., 1979; capitolul 5).

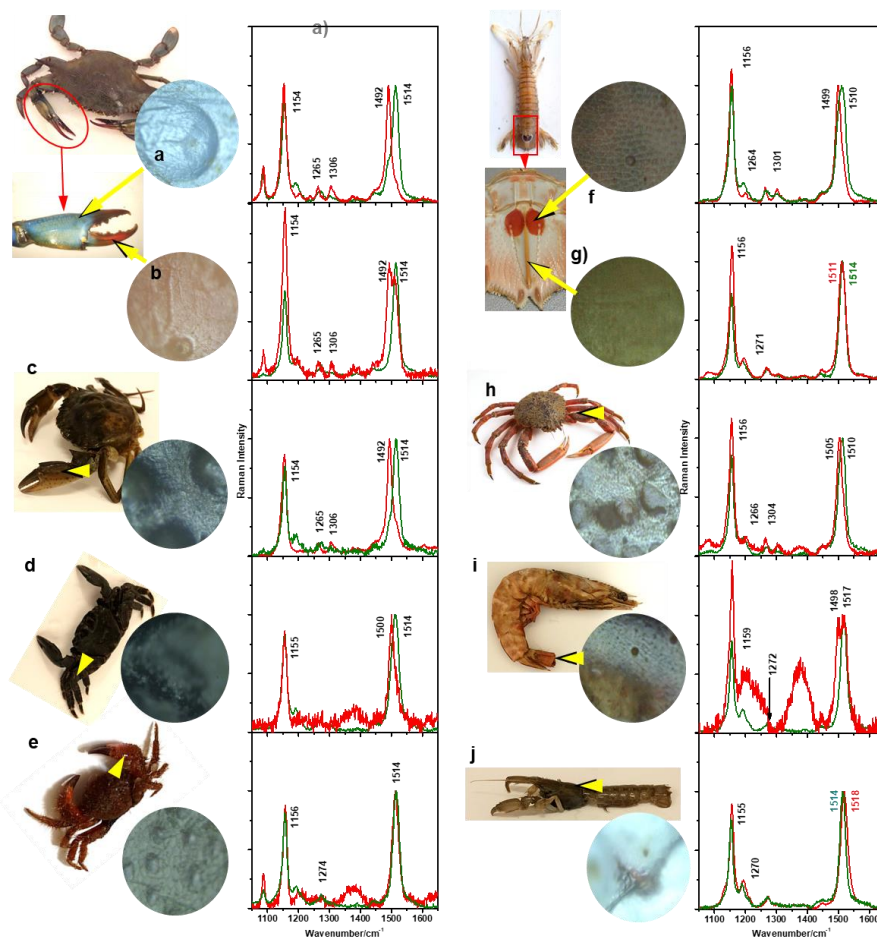


Figura 13. Spectrele Micro-Raman obținute prin excitare cu linia 532 nm (linii verzi) și 632,8 nm (linii roșii), de pe suprafața a 10 cochilii de crustacee de specii și culori diferite, după cum se arată în fotografii: (a) și (b) *Callinectes sapidus* albastru și roșu, respectiv; (c) *Carcinus aestuarii*; (d) *Pachygrapsus marmoratus*; (e) *Pilumnus* sp.; (f) și (g) *Squilla mantis* „spoturi” roșii și, respectiv, carina medial de pe telson; (h) *Maja squinado*; (i) *Melicertus kerathurus*; (j) *Upogebia pusilla* (cuticulă transparentă). Spectrele sunt normalizate la unitate pentru o comparație mai ușoară. Săgețile galbene indică punctele de achiziție a spectrelor de pe cochiliile de crab, iar micrografiile (insertii rotunde) arată culoarea suprafeței cochiliei și morfologia zonei sondate sub o mărire de 200x.

5.2. Nanoarhitectura-3D naturală a biomineralului din clești de crab albastru (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) studiată prin spectroscopie Raman și microscopie electronică de scanare

- *Prezentarea orală la International Balkan Workshop on Applied Physics, Constanța 2017*

- Citation: .Nekvapil, F., Tomšić, S., Glamuzina, B., Barbu-Tudoran, L., Brezestean, I., Cintă Pinzaru, S., Natural nanoarchitecture of blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) claw studied by Raman spectroscopy and Scanning electron microscopy. In: Vladoiu, R., Mandes, A., Dinca Balan, V. (eds.) Conference proceedings. Issue 17/2017, University of Ovidius Press, p. 146 – 147.

Această secțiune prezintă rezultatele preliminare privind o investigație mai profundă a culorii crabului albastru, *C. sapidus*, în urma interesului științific inerent asupra originii complexe a culorii cochiliei de la nevertebrate, prezentate în secțiunea 5.1. Au fost folosite patru linii laser pentru a caracteriza nedistructiv semnalul de împrăștiere Raman al exoscheletului complex al cleștilor de crab albastru (*Callinectes sapidus*) (Figura 14). Patru compuși diferiți pot fi identificați și localizați în cadrul nanoarhitecturii complexe. Astaxantina (AXT), calcitul magnezian biogenic, complexul astaxantină-crustaciaanină (ACC) și chitina au fost diferențiate fără ambiguitate pentru prima dată în exoscheletul complex. Urmele de chitină au fost detectabile folosind linia din infraroșu apropiat. Informații complementare din analiza SEM-EDX, combinate cu date și imagini micro Raman, au permis să ofere pentru prima dată o caracterizare structurală completă și să abordeze critic un studiu recent (Katsikini, 2016) despre culoarea albastră a crabului, utilizând pentru caracterizare o singură linie laser, de 488 nm. În acel studiu, este concluzionat că numai cromoforul carotenoid este responsabil pentru diferitele culori și că acestea ar fi influențate de prezența Sr și Br în scheletul de calcit. Linia laser de 532 nm, care este aproape de rezonanță pentru AXT, nu este rezonantă pentru ACC, dar linia de 632 nm se încadrează în rezonanța completă a acesteia din urmă. Linia laser de 830 nm a arătat benzi Raman proeminente de calcit magnezian și nu calcit și vaterit așa cum s-a revendicat anterior și urme de chitină (Fig. 5.2.1.). Zona țintă a fost, de asemenea, examinată folosind microscopul electronic cu scanare pentru a studia nanoarhitectura naturală (Fig. 1). Acest studiu evidențiază importanța alegerii în cunoștință de cauză a liniei laser pentru a trage concluzii corecte asupra biocompozitelor naturale complexe.

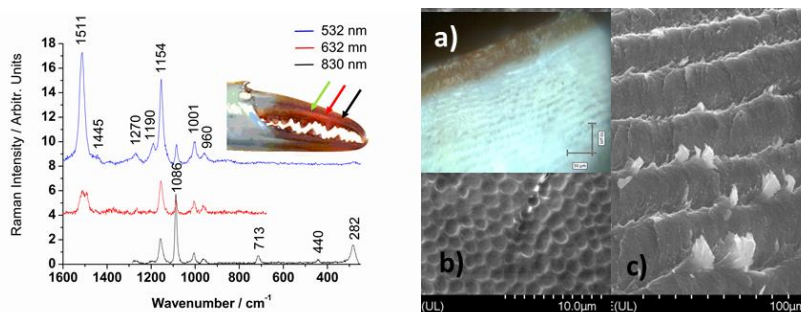


Figure 14. Spectre Raman reprezentative ale suprafeței roșii exterioare a cleștilor de crab albastru, excitate cu linia laser 532, 632 sau 830 nm, așa cum este indicat,

dezvăluind astaxantina, alfa-ACC și calcitul magnezian, respectiv cu urme de chitină; (a) Secțiune transversală, vedere la microscopie, b) și c) imagini SEM de la suprafața exterioară, roșie și nanoarhitectura straturilor.

5.3. Porozitate specifică culorii în nanoarhitecturi-3D naturale dublu pigmentate din clești de crab albastru - articol științific original

- *Publicat in Scientific Reports, on 20 February 2020, Impact factor 4.01*
 - Citation: Nekvapil, F., Cintă Pinzaru, S., Barbu-Tudoran, L., Suciu, M., Tamas, T., Chis, V. Color-specific porosity in double pigmented natural 3d-nanoarchitectures of blue crab shell. Sci. Rep. 2020b, 10: 3019. DOI: 10.1038/s41598-020-60031-4.

În acest studiu, abordăm discuția comprehensivă și problema controverselor cu privire la mecanismele care stau la baza schimbării batocromice a benzii de absorbție a astaxantinei și a deplasării spre rosii a benzii Raman $\nu_1(\text{C}=\text{C})$ la legarea la crustacyanin. Demonstrăm că banda Raman ν_1 este într-adevăr deplasată la legarea necovalentă (ncb) de crustacianină, după cum se arată prin comparația activității Raman a astaxantinei izolate și a astaxantinei în prezența unei molecule de apă. O investigație suplimentară prin rezonanță Raman utilizând mai multe linii laser a permis detectarea in situ a semnalelor de la astaxanthin atât liber cât și legat necovalent (ncb-ATX). În plus, SEM de înaltă rezoluție a permis evidențierea componentei structurale a puzzle-ului complex de origine a culorii, prin dezvăluirea nanoarhitecturii naturale compusă din canale nanometrice aranjate în mod regulat. Lucrarea prezintă noi cunoștințe valoroase despre comportamentul carotenoproteinelor în matrici naturale și deschide noi domenii de aplicații pe baza exploatării proprietăților acestui biomaterial.

5.4. De la bioeconomia albastră la economia circulară prin cercetări analitice de înaltă sensibilitate asupra materialelor biogenice considerate deșeurii din exploatarea crustaceelor (crab albastru) - articol de cercetare original

- *Publicat in ACS Sustainable Chemistry and Engineering, on 11. September 2019, Impact factor (2020) = 7.03*

- Citation: Nekvapil, F., Aluas, M., Barbu-Tudoran, L., Suci, M., Bortnic, R-A, Glamuzina, B., Cintă Pinzaru, S. From Blue Bioeconomy toward Circular Economy through High-Sensitivity Analytical Research on Waste Blue Crab Shells. *Sustainable Chem. Eng.* 2019c, 7: 16820-16827. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b04362. *Copyright* © 2019, *American Chemical Society*

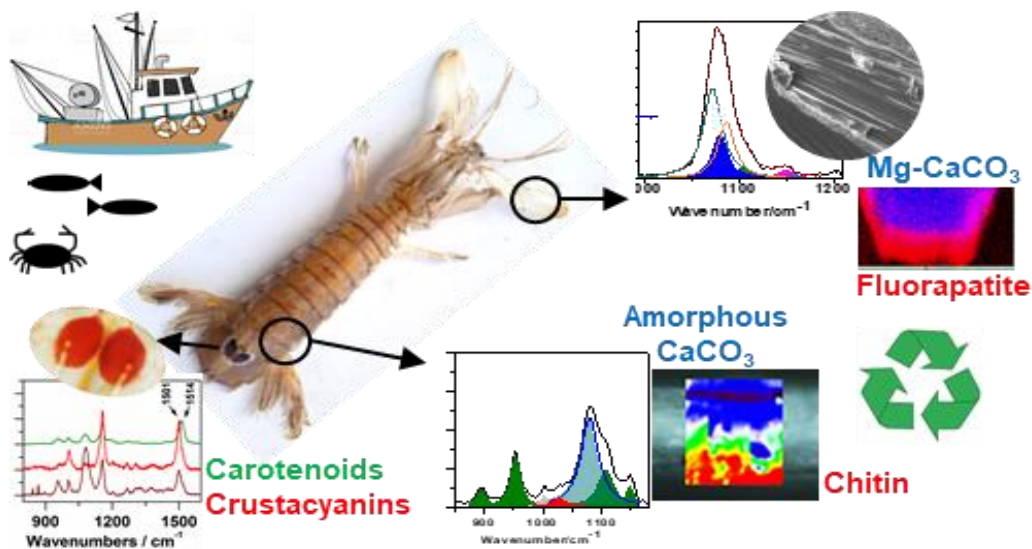
În această lucrare am folosit informații despre posibilitățile analitice ale spectroscopiei de rezonanță Raman și microscopiei electronice aplicate cochiliilor de crustacee cand acestea sunt supuse unor tratamente mecanice sau termice pentru potențiale reutilizari. Lucrarea prezintă o cercetare bazată pe sustenabilitate asupra posibilității de reutilizare a materialelor biogenice din crustacee (crab) care sunt în prezent tratate ca deșeuri. Semnalul RRS al carotenoidului și al carotenoprotinei este utilizat aici ca marker molecular sensibil, ceea ce indică indirect că compușii utili și delicati din cochilii nu sunt distrusi prin procedura de măcinare mecanică a cochiliilor. Acest studiu a arătat că semnalul de la carotenoid nu este prezent doar în probele native, ci poate fi urmărit și prin etape ulterioare de procesare a materialului, facilitând astfel caracterizarea materialului rezultat și descrierea efectelor unei anumite etape de procesare. Prin urmare, urmărind obiectivul tezei, este subliniată utilitatea semnalului Raman al carotenoizilor pentru urmărirea etapelor de procesare ale materialelor biogenice irosite și pentru reutilizarea lor în produse cu valoare adăugată în acord cu principiile economiei circulare.

5.5. Promovarea șabloanelor de design natural ascunse în cochiliile irosite ale creveților *S. mantis* într-un compozit biogenic valoros

- *Prezentarea poster a rezultatelor preliminare la 16th Confocal Raman Imaging Symposium, Ulm (Germany), 23rd - 25th September 2019*
 - Citation: Nekvapil, F., Cintă Pinzaru, S., Glamuzina, B. Hidden smart templates for blue bioeconomy: complex functional structures of marine invertebrates revealed by confocal Raman imaging. In: *Book of Abstracts of the 16th Confocal Raman Imaging Symposium, WiTec GmbH, Ulm, 23rd - 25th September 2019*, p. 61.
- *manuscris integral sub revizuire minoră pentru Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, on 20. July 2020*

După aplicarea cu succes a tehnicilor spectroscopice Raman și microscopie electronică pentru a identifica crabul albastru atlantic (*C. sapidus*) și crabul verde mediteranean (*C. aestuarii*) ca materie primă nouă, extindem în continuare această cercetare de sustenabilitate la o specie de creveți - *Squilla mantis*. Cuticula acestei specii prezintă o combinație interesantă de carbonat și fosfat biomineral. Cu toate

acestea, mai important, carotenoizii nu au fost găsiți pe tot corpul creveților, așa cum a fost cazul crabilor, dar au fost localizați pe segmentul cozii corpului creveților. Organizarea pigmentului în modele distincte poate avea un rol biologic și ecologic. Diferitele părți anatomice ale cuticulei prezintă o compoziție izbitor de diferită în termeni de fracțiune biominerală și organică, precum și conținutul de carotenoizi, după cum a relevat analiza micro-Raman. Prin urmare, propunem reciclarea diferențială a părților cuticule (irosite), în raport cu compoziția lor specifică. Prin publicarea acestor rezultate, vom avansa aplicabilitatea tehnicilor de spectroscopie Raman în cercetarea generală în serviciul conceptelor de bioeconomie și economie circulară.



Graphical abstract of the submitted paper [Nekvapil et al, Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, on 20. July 2020]

5.6. Capitolul 5. Concluzii

Pot fi subliniate aspecte importante privind aplicarea spectroscopiei Raman pentru studiul pigmentilor din biomateriale de la nevertebrate:

- originea chimică a culorii crustei se datorează pigmentilor: poliene nesaturate, carotenoizi și carotenoproteine. Deseurile de crustacee conțin carotenoizi și carotenoproteine în scheletul carbonatului de calciu;
- cele 3 tipuri de pigmenți se bazează pe lanțul polienic conjugat (-C = C-); cu toate acestea, ele sunt distincte spectral față de carotenoizii liberi: polienele nesaturate au o intensitate redusă a benzii ν_3 sau nu au deloc bandă ν_3 (C-CH) (din cauza lipsei de metilare a lanțului polienic), în timp ce carotenoproteinele prezintă un ν_1 descendent (C = C) cu aproximativ 15 până

la 25 cm^{-1} și intensitate v_4 crescută (datorită legăturii non-covalente la proteine și, probabil, distorsiunii conformației lanțului polienic);

- diferențierea între carotenoizii liberi și cei care nu sunt legați covalent în complexii de proteine (de exemplu, astaxantina și crustacianina) poate fi realizată efectiv prin analiza componentelor multiple ale profilului Lorentzian al benzii v_1 , utilizând spectroscopia Raman rezonantă cu linii laser specific pentru fiecare tip de pigment (în intervalul albastru-verde pentru carotenoizi, în gama roșie pentru carotenoproteine);
- semnalul RRS de la carotenoid și carotenoproteine distinctiv poate servi, de asemenea, ca un marker molecular sensibil procesarea sub formă de pulbere a deșeurilor biogenice, indicând integritatea compușilor organici sensibili;

Microscopia electronică de scanare pe secțiunile transversale ale cochiliei native a evidențiat, de asemenea, nanoporozitatea diferențială a CaCO_3 biogenic specifică fiecărui aspect de culoare a crustei. Astfel, nanoarhitectura cochiliei poroase acționează ca o super-rețea naturală, contribuind cu o componentă structurală la culoarea aparentă.

6. CONCLUZII, IMPACT ȘI PERSPECTIVE

Carotenoizii au o valoare științifică și comercială notabilă, datorită proprietăților lor prezentate în secțiunea 1.2. În timp ce carotenoizii pot fi sintetizați artificial, analogii produși în laborator de multe ori nu prezintă aceleași proprietăți ca și carotenoizii naturali, sinteza este scumpă și nu este ușor scalabilă și, în cele din urmă, preferința consumatorului se îndreaptă spre carotenoizi din surse naturale (Lindequist, 2016).

Pe de altă parte, datorită activității lor semnificative în ce privește împrăștiere Raman, carotenoizii sunt, de asemenea, un marker biochimic util, așa cum este demonstrat în secțiunile 5.4. și 5.5. Prin urmare, carotenoizii vor juca un rol semnificativ în dezvoltarea și diversificarea în continuare a sferei bioeconomiei albastre, iar entitățile care lucrează deja în dezvoltarea metodelor analitice pentru carotenoizi pot avea avantajul competitiv al tehnicilor propuse în aceste studii, în viitorul apropiat.

Această teză a cuprins mai multe linii de investigație cu abordare experimentală diferită, cu concluziile lor specifice. Cu toate acestea, tema principală a tuturor studiilor descrise este modul inovator în care instrumentele de spectroscopie Raman au fost utilizate pentru a aborda problemele de bază ale biofizicii marine și ale cercetării de mediu dintr-o perspectivă încă neconvențională, dar fezabilă. Prin realizarea unor descoperiri specifice, înarmăm cercetarea interdisciplinară de biofizică-biologie marină cu noi cunoștințe în abordarea problemelor de detectare moleculară și a noilor concepte potențiale pentru monitorizarea mediului.

Această teză a demonstrat că tehnicile de spectroscopie Raman funcționează într-adevăr bine în detectarea semnalului carotenoid în cercetarea biologiei marine / biotehnologiei, cu capacitatea de a analiza probe native într-o gamă largă de dimensiuni și stări. Pe baza lucrărilor prezentate se pot trage mai multe concluzii specifice, așa cum au fost ele subliniate în capitolele respective, care măresc profunzimea abordării experimentale Raman și interpretarea rezultatelor:

- Rafinarea identificării carotenoizilor poate fi realizată prin analiza profilului v1 ($C = C$) cu componentele lorentziene (având în vedere numărul așteptat, poziția și lățimea profilului componentelor),
- Adăugarea AgNPs la celule sau extracte de țesut poate avea următoarele efecte: promovarea excitației SERS a carotenoizilor, reducerea fluorescenței inerente a probelor sau îmbunătățirea semnalului carotenoizilor adsorbiți în raport cu semnalele solventului,
- În cazurile în care determinarea profilului carotenoidului eșantionului este dificilă, analiza comparativă Raman a două sau mai multe eșantioane similare din probe native este o metodă puternică de a exploata diferențele subtile de la eșantion la eșantion în raport cu cunoașterea actuală din literatură; astfel se restrânge gama de considerații și se ajunge la concluzia corectă prin eliminarea ipotezelor neverosimile;
- Analiza cuprinzătoare *in situ* prin rezonanță Raman a pigmentilor naturali poate fi realizată numai prin utilizarea mai multor linii laser rezonante la diferite tipuri de pigmenti;
- Cuplarea tehnicilor experimentale Raman cu calculul DFT îmbunătățește în mod considerabil capacitatea studiilor vibraționale experimentale ale carotenoizilor;
- Cuplarea analizei Raman *in situ* cu analize prin microscopie electronică (SEM, TEM, EDX) permite studii structurale consistente precum și corelarea informațiilor oferite de tehnicile spectroscopice.

În toate studiile, spectroscopia Raman a fost utilizată ca metodă de detectare nedistructivă și directă pentru a analiza biochimia carotenoizilor eșantionului nativ, fără etape pregătitoare extinse, obținând astfel rezultatele care reprezintă starea cea mai apropiată de cea naturală posibilă. Mai mult, pe lângă microorganismele fotosintetice și cochilii de crustacee, care nu necesită o pregătire minimă sau minimă, a fost descrisă pregătirea corectă și rentabilă a probei pentru analiza spectroscopiei Raman pentru cazul țesuturilor moi și a extractelor acestora; cele mai bune metode pentru anumite țesuturi ale echinodermelor au fost descrise în secțiunea 4.1.

În cele din urmă, oferim noi abordări și informații concrete despre rolurile biologice și comportamentul carotenoizilor și, în unele cazuri, și date structurale care nu au legătură cu carotenoizii în sens restrâns, prin articolele publicate. Descoperirile concrete sunt susținute de abordările noastre avansate de interpretare a rezultatelor,

incluzând studii de profil de bandă spectrală, deconvoluțiile benzilor, intensitatea modurilor și comparațiile spectrelor obținute cu lungimi de undă de excitație multiple, ceea ce ne-a permis să ajungem la concluzii aprofundate cu privire la biochimia eșantionului natural. În plus, utilizarea combinațiilor liniare și armonicelor modurilor Raman ale carotenoizilor este utilizată pentru prima dată cu succes pentru identificarea și diferențierea corectă a speciilor de carotenoizi în probe naturale complexe.

Șase articole de cercetare originale publicate și șapte contribuții la conferințe sunt incluse în această teză. Activitatea experimentală a consolidat, de asemenea, cooperarea interinstituțională a Facultății de Fizică, Universitatea Babeș-Bolyai, cu Departamentul pentru acvacultură, Universitatea din Dubrovnik și cu Institutul Național pentru Cercetare și Dezvoltare a Tehnologiilor Izotopice și Moleculare din Cluj-Napoca.

Referințe selectate

- Abd El-Baky, H.H., El Baz, F.K., El Baroty, G.S. Evaluation of Marine Alga *Ulva lactuca* as A Source of Natural Preservative Ingredient. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 2008, 3: 434-444.
- Andrei, S., Pinteș, A., Bolos, F., Bunea, A. Comparative studies regarding antioxidant actions of oxygenated normal and retro carotenoids in mouse liver and skin. *Bulletin USAMV-CN* 2007, 64: 31-35. DOI: 10.15835/buasvmcn-vm: 64:1-2:2273.
- Casazza, G., Mazzella, L. Photosynthetic pigment composition of marine angiosperms: preliminary characterization of Mediterranean seagrasses. *Bul. Mar. Sci.* 2002, 7: 1171-1181.
- Chew, B.P., Park, J.S. Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.* 2004, 134(1): 257S–261S. DOI: 10.1093/jn/134.1.257S.
- Cintă Pinzaru, S., Müller, Cs., Tomšić, S., Venter, M.M., Cozar, B.I., Glamuzina, B. New SERS feature of β -carotene: consequences for quantitative SERS analysis. *J. Raman Spectrosc.* 2015, 46: 597-604. DOI: 10.1002/jrs.4713.
- Cintă Pinzaru, S., Müller, Cs., Tomšić, S., Venter, M.M., Brazestean, I., Ljubimir, S., Glamuzina, B. Live diatoms facing Ag nanoparticles: surface enhanced Raman scattering of bulk *Cylindrotheca closterium* pennate diatoms and of the single cells. *RSC Adv.* 2016a, 6: 42899. DOI: 10.1039/C6RA04255D.
- Cintă Pinzaru, S., Müller, Cs., Brazestean, I., Barchewitz, D., Glamuzina, B. Cyanobacteria detection and Raman spectroscopy characterization with a highly sensitive, high resolution fiber optic portable Raman system. *Studia UBB Physica* 2016b, 61: 99-108.

- Czamara, K., Majzner, K., Pacia, M.Z., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., Raman spectroscopy of lipids: a review. *J. Raman Spectrosc.* 2014, 46: 4–20. DOI: 10.1002/jrs.4607.
- di Bernardo, M., di Carlo, M. Chapter 6: The Sea Urchin Embryo: A Model for Studying Molecular Mechanisms Involved in Human Diseases and for Testing Bioactive Compounds. in: Agnello, M. (Ed.) *Sea Urchin - From Environment to Aquaculture and Biomedicine*. InTech, London, 2017. DOI: 10.5772/intechopen.70301.
- Dose, J., Matsugo, S., Yokokawa, H., Koshida, Y., Okazaki, S., Seidel, U., Eggersdorfer, M., Rimbach, G., Esatbeyoglu, T. Free radical scavenging and cellular antioxidant properties of astaxanthin. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17: 103. DOI: 10.3390/ijms17010103.
- Flores-Hidalgo, M., Torres-Rivas, F., Monzon-Bensojo, J., Escobedo-Bretado, M., Glossman-Mitnik, D., Barraza-Jimenez, D. Electronic Structure of Carotenoids in Natural and Artificial Photosynthesis. In: Cvetkovic, D.J., Nikolic, G.S. (eds.) *Carotenoids*. InTechOpen, 2017 pages Chapter DOI: 10.5772/67636.
- Gundermann, K., Büchel, C. Structure and functional heterogeneity of fucoxanthin-chlorophyll proteins. In diatoms. In *The Structural Basis of Biological Energy Generation*; Hohmann-Marriott, M. F., Ed.; Springer Science+Business Media: Dordrecht, Netherlands, 2014; pp. 21-37.
- Hedegaard, C., Bardeau, J-F., Chateigner, D. Molluscan shell pigments: an in situ Resonance Raman study. *J. Molluscan Studies* 2006, 73: 157-162. DOI: 10.1093/mollus/eyi062.
- Landrum, J.T. *Carotenoids: Physical, Chemical and Biological Functions and Properties*. CRC Press, 2010; 568 pages
- Lindequist, U. Marine-derived pharmaceuticals – challenges and opportunities. *Biomol. Ther.* 2016, 24: 561-571; DOI: 10.4062/biomolther.2016.181.
- Maoka, T. Carotenoids as natural functional pigments. *J. Nat. Med.* 2020, 74: 1-16. DOI: 10.1007/s11418-019-01364-x.
- McBride, S.C., Price, R.J., Tom, P.D., Lawrence, J.M. Comparison of gonad quality factors: Color, hardness and resilience, of *Strongylocentrotus franciscanus* between sea urchins fed prepared feed or algal diets and sea urchins harvested from the Northern California fishery. *Aquaculture* 2004, 233: 405-422. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.10.014.
- Mortensen, A., Skibsted, H.L. Importance of Carotenoid Structure in Radical-Scavenging Reactions. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45: 2970-2977. DOI: 10.1021/jf970010s.
- Nekvapil, F.**, Tomšić, S., Glamuzina, B., Barbu-Tudoran, L., Brezestean, I., Cintă Pinzaru, S., Natural nanoarchitecture of blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun,

1896) claw studied by Raman spectroscopy and Scanning electron microscopy. In: Vladioiu, R., Mandes, A., Dinca Balan, V. (eds.) Conference proceedings. Issue 17/2017, University of Ovidius Press, p. 146 – 147.

Nekvapil, F., Brezestean, I., Barchewitz, D., Glamuzina, B., Chiş, V., Cintă Pinzaru, S. Citrus Fruits Freshness Assessment Using Raman Spectroscopy. *Food Chem.* 2018a, 242: 560-567. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.09.105.

Nekvapil, F., Tomšić, S., Cintă Pinzaru, S. Comparative Raman spectroscopy study of the coelomic fluid of grazing sea urchins and their native seawater: prospect for a potential indicator of environmental aggression. In: Şerban, G., Băţinaş, R., Tudose, T., Horváth, Cs., Croitoru, A., Holobăcă, J. (eds.) *Air and water components of the environment*. University Press, Cluj-Napoca, ISSN: 2067-743. 2018b, p. 27 – 34.

Nekvapil, F., Brezeştean, I., Tomšić, S., Müller, Cs., Chiş, V., Cintă Pinzaru, S. Microsphere packages of carotenoids: intact sea urchin eggs tracked by Raman spectroscopy tools. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2019a, 18: 1933-1944. DOI: 10.1039/c9pp00181f.

Nekvapil, F., Molnar Muller, Cs., Tomsic, S., Cintă Pinzaru, S. Exploring the biological protective role of carotenoids by Raman spectroscopy: mechanical stress of cells. *Studia UBB Physica* 2019b, 64: 75-82. DOI: 10.24193/subbphys.2019.08.

Nekvapil, F., Aluas, M., Barbu-Tudoran, L., Suci, M., Bortnic, R-A, Glamuzina, B., Cintă Pinzaru, S. From Blue Bioeconomy toward Circular Economy through High-Sensitivity Analytical Research on Waste Blue Crab Shells. *Sustainable Chem. Eng.* 2019c, 7: 16820-16827. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b04362.

Nekvapil, F., Bunge, A., Radu, T., Cintă Pinzaru, S, Turcu, R. Raman spectra tell us so much more: Raman features and saturation magnetization for efficient analysis of manganese zinc ferrite nanoparticles. *J. Raman Spectrosc.* 2020a, 51: 959-968. DOI: 10.1002/jrs.5852.

Nekvapil, F., Cintă Pinzaru, S., Barbu-Tudoran, L., Suci, M., Glamuzina, B., Tamaş, T., Chiş, V. Color-specific porosity in double pigmented natural 3d-nanoarchitectures of blue crab shell. *Sci. Rep.* 2020b, 10: 3019. DOI: 10.1038/s41598-020-60031-4.

Pasteris, J.D., Wopenka, B., Freeman, J.J., Brewer, P.G., White, S.N., Peltzer, E.T., Malby, G.E. *Raman Spectroscopy in the Deep Ocean: Successes and Challenges*. *Appl. Spectrosc.* 2004, 58: 195A-208A. DOI: 10.1366/0003702041389319.

Premvardhan, L., Bordes, L., Beer, A., Büchel, C., Robert, B. Carotenoid structures and environments in trimeric and oligomeric fucoxanthin chlorophyll a/c2 proteins from resonance Raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 2009, 113: 12565-12574. DOI: 10.1021/jp903029g.

- Raman, C.V. The molecular scattering of light. Nobel Prize lecture; URL: <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/raman-lecture.pdf> (accessed 19. Jun 2020).
- Rygula, A., Majzner, K., Marzec, K.M., Kaczor, A., Pilarczyk, M., Baranska, M. Raman spectroscopy of proteins: a review. *J. Raman Spectrosc.* 2013, 44: 1061-1076. DOI: 10.1002/jrs.4335.
- Salares, V.R., Young, N.M., Bernstein, H.J., Carey, P.R. Resonance Raman Spectra of Lobster Shell Carotenoproteins and a Model Astaxanthin Aggregate. A Possible Photobiological Function for the Yellow Protein. *Biochemistry*, 1977, 16:4751-4756. DOI: 10.1021/bi00640a034.
- Salares, V.R., Young, N.M., Bernstein, H.J., Carey, P.R. Mechanisms of spectral shifts in lobster carotenoproteins The resonance raman spectra of ovoverdin and the crustacyanins. *BBA Protein Struct.* 1979, 576: 176-191. DOI: 10.1016/0005-2795(79)90496-3.
- Sefc, K.M., Brown, A.C., Clotfelter, E.D. Carotenoid-based coloration in cichlid fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 2014, 173: 42-51. DOI: 10.1016/j.cbpa.2014.03.006.
- Smith, E., Dent, G. *Modern Raman Spectroscopy - A Modern Approach*. John Wiley & Sons, Ltd. 2005; 225 pages.
- Takaichi, S. Carotenoids in Algae: Distribution, Biosyntheses and Functions. *Mar. Drugs* 2011, 9: 1101-1118. DOI: 10.3390/md9061101.
- Web of Science, Clarivate Analytics. URL: www.webofknowledge.com
- Widjaja-Adhi., M.A.K., Ramkumar, S., von Lintig, J. Protective role of carotenoids in the visual cycle. *FASEB J.* 2018, 32: 6305-6315. DOI: 10.1096/fj.201800467R.
- Zhang, X., Kirkwood, W.J., Walz, P.M., Peltzer, E.T., Brewer, P.G. A Review of Advances in Deep-Ocean Raman Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2012, 66: 237-249. DOI: 10.1366/11-06539.

Abrevieri:

AgNPs colloidal plasmonic silver nanoparticles
 BBU - Babeş - Bolyai University
 DFT - Density Functional Theory
 EC - European Comission
 EDX - electron-dispersive x-ray spectroscopy
 EPS - extracellular polymeric substance
 EU - European Union
 FT-Raman - Fourier transform Raman spectroscopy
 FWHM - full width at half-maximum
 IR - infrared
 NA - numerical aperture

NIR - near infrared
NPs - nanoparticles
SEM - scanning electron microscopy
RS - Raman spectroscopy
RRS - Resonance Raman spectroscopy
SERS - Surface-enhanced Raman scattering
SERRS - Surface-enhanced resonance Raman scattering
TEM - transmission electron microscopy
UN - United Nations
UV - ultraviolet
Vis - visible (excitation, radiation,...)
XRPD - x-ray powder diffraction

Lista publicațiilor incluse în teză:

Articole originale de cercetare

1. Citrus fruit freshness assessment using Raman spectroscopy, by Nekvapil, F., Brezestean, I., Barchewitz, D., Glamuzina, B., Chis, V., Cintă Pinzaru, S.
2. Raman spectra tell us so much more: Raman features and saturation magnetization for efficient analysis of manganese zinc ferrite nanoparticles - original research article, by Nekvapil, F., Bunge, A., Radu, T., Cinta Pinzaru, S, Turcu, R.
3. Microsphere packages of carotenoids: intact sea urchin eggs tracked by Raman spectroscopy tools, by Nekvapil, F., Brezeștean, I., Tomšić, S., Müller, Cs., Chiș, V., Cintă Pinzaru, S.
4. Exploring the biological protective role of carotenoids by Raman spectroscopy: mechanical stress of cells, by Nekvapil, F., Molnar Muller, Cs., Tomsic, S., Cintă Pinzaru, S.
5. Color-specific porosity in double pigmented natural 3d-nanoarchitectures of blue crab shell, by Citation: Nekvapil, F., Cintă Pinzaru, S., Barbu-Tudoran, L., Suci, M., Tamas, T., Chis, V.
6. From Blue bioeconomy toward Circular economy through high-sensitivity analytical research on waste Blue crab shells, by Nekvapil, F., Aluas, M., Barbu-Tudoran, L., Suci, M., Bortnic, R-A, Glamuzina, B., Cintă Pinzaru, S.

Contribuții la conferințe:

1. Are the market citrus fresh? Raman spectroscopy can promptly tell it (2017), by Nekvapil, F., Brezestean, I., Barchewitz, D., Glamuzina, B., Chis, V., Cintă Pinzaru, S., Andronie, L.

2. Raman spectroscopy analysis of metal-ferrite nanoparticles: towards precise interpretation and extraction of structural information (2019), by 1. Nekvapil, F., Bunge, A., Radu, T., Cinta Pinzaru, S., Turcu, R.
3. Raman spectroscopy in carotenoids metabolic pathways research: the example of sea urchins, by Nekvapil, F., Tomšić, S., Chiş, V., Cintă Pinzaru, S.
4. Comparative Raman spectroscopy study of the coelomic fluid of grazing sea urchins and their native seawater: prospect for a potential indicator of environmental aggression (2018), by Nekvapil, F., Tomšić, S., Cintă Pinzaru, S.
5. Rapid and cost effective tracking carotenoids in native sea urchin eggs by multi-laser Raman spectroscopy (2018), by Nekvapil, F., Brezeştean, I., Tomsic, S., Muller, Cs., Chis, V., Cintă Pinzaru, S.
6. Natural nanoarchitecture of blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) claw studied by Raman spectroscopy and Scanning electron microscopy (2017), by Nekvapil, F., Tomšić, S., Glamuzina, B., Barbu-Tudoran, L., Brezestean, I., Cintă Pinzaru, S.
7. Hidden smart templates for blue bioeconomy: complex functional structures of marine invertebrates revealed by confocal Raman imaging (2019), by Nekvapil, F., Cinta Pinzaru, S., Glamuzina, B.

Rezumat (se referă la teza completă)

- Number the pages: Main thesis (214) + Annexes (66) = 280
- Number of Annexes: 3
- Number of references used in this thesis (simple sum): 311
** Note: some references repeat in different chapters, and included published articles may contain additional references*

Number of published articles within the topic of the Thesis:

- ISI papers published: 5
- “RED” publications (Q1) as of date of publication: 4
- “YELLOW” publications (Q2) as of date of publication: 1
- Article Influence Score (AIS): 4.9

Cumulative publications:

- Accumulated AIS: 5.3
- Number of publications in conference proceedings: 15
- Number of given oral presentations: 8
- Number of created posters: 3