

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI"  
DIN IAȘI**



**CERCETĂRI PRIVIND CONVERSIA BIOMASEI  
MACROALGELOR MARINE UTILIZÂND PROCESSE SI TEHNICI  
DE BIORAFINARE**

**Biol. Cătălina Filote**

**Conducător de doctorat : Prof. univ. dr. habil. ing. Irina Volf**

IAȘI, 2023

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI**  
**RECTORATUL**

Către

---

---

Vă facem cunoscut că, în ziua de 13.09.2023 la ora 10:00 în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului "Cristofor Simionescu", va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**" Cercetări privind conversia biomasei macroalgelor marine utilizând principii și tehnici de biorafinare"**

elaborate de domnișoara biolog **Cătălina FILOTE** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- |   |                        |
|---|------------------------|
| 1. Prof. univ. dr. ing. <b>Hurdac Nicolae</b> ,<br>Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași           | președinte             |
| 2. Prof. univ. dr. habil. ing. <b>Volf Irina</b> ,<br>Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași        | conducător de doctorat |
| 3. Prof. univ. dr. ing. <b>Micle Valer</b> ,<br>Universitatea Tehnică din Cluj-Napoca                         | referent oficial       |
| 4. Prof. univ. dr. <b>Tănase Cătălin</b> ,<br>Universitatea „Alexandru Ioan Cuza” din Iași                    | referent oficial       |
| 5. Prof. univ. emerit. dr. ing. <b>Popa I. Valentin</b> ,<br>Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | referent oficial       |

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,



Secretar universitate,

---

## **Mulțumiri**

În primul rând, mulțumesc lui Dumnezeu și Universului pentru că mi-au dăruit lecții de viață, credință, răbdare, cumpătate, empatie și reziliență, precum și despre cum să privesc dincolo de ceea ce există deja pentru a crea ceva nou prin această teză de doctorat. Sunt recunoscătoare pentru ceea ce am dobândit atât la nivel profesional, cât și personal pe parcursul acestor ani pe care nu îi voi uita niciodată. Am înțeles în nenumărate moduri de ce am avut de parcurs această călătorie a studiilor doctorale și cum m-a ajutat în evoluția mea ca om.

În mod deosebit, îmi exprim întreaga recunoștință și adresez mulțumiri pentru sprijinul și contribuția semnificativă la formarea mea ca specialist în ingineria mediului doamnei **Prof. dr. habil. ing. Irina Volf**. Mulțumesc pentru spiritul de echipă transmis în colectivul nostru de doctoranzi, pentru încrederea, răbdarea și deschiderea oferite. Apreciez colaborarea doctorand-conducător de doctorat creată, viziunea doamnei profesor asupra tezei de doctorat și eforturile realizate pentru îndrumarea mea spre excelență.

Adresez cuvinte de mulțumire comisiei de îndrumare formată din domnul **Prof. univ. dr. ing. Valentin Popa**, domnul **Prof. univ. dr. ing. Teodor Măluțan** și doamna **Conf. univ. dr. habil. ing. Carmen Zaharia**. Sunt recunoscătoare pentru sprijinul, sugestiile, ideile inovative și soluțiile oferite pe parcursul realizării tezei de doctorat.

Aduc mulțumiri distinșilor referenți oficiali din Comisia de evaluare și susținere a tezei de doctorat prezidată de domnul **Prof. univ. dr. ing. Nicolae Hurduc**, domnului **Prof. univ. dr. ing. Valer Micle**, domnului **Prof. univ. dr. Cătălin Tănase** și domnului **Prof. univ. emerit. dr. ing. Valentin I. Popa** pentru onoarea acordată de a recenza teza de doctorat.

Domnului **Prof. univ. emerit. dr. ing. Valentin Popa** îi adresez recunoștința și respectul profund pentru inspirația și dedicarea oferite ca profesor și om de știință, pentru motivația acordată, sfaturile, împărtășirea bucuriei și pasiunii pentru cercetare și inovare.

Cu deosebită prețuire mulțumesc și doamnei **Prof. Cidália Botelho** și doamnei **Silvia Santos** pentru că mi-au oferit susținerea, resursele și locul în cadrul stagiului de plasament desfășurat în cadrul Facultății de Inginerie de la Universitatea din Porto, Portugalia. Le sunt profund recunoscătoare pentru generozitatea, inspirația și deschiderea cu care m-au primit.

Mulțumiri și doamnei **dr. ing. Gabriela Ungureanu** pentru răbdarea și eforturile realizate pentru transmiterea experienței și cunoștințelor valoroase în ceea ce privește procesele de sorbție-desorbție și pregătirea îndeaproape pentru stagiile pe care le-am urmat la Universitatea din Porto, Portugalia.

Colegelor mele din **colectivul doctorandelor îndrumate de dna. Prof. habil. dr. ing. Irina Volf** le mulțumesc pentru timpul petrecut împreună, susținerea reciprocă, gândurile bune, înțelegerea, spiritul de echipă și comunicarea deschisă și frumoasă dintre noi. Sunt recunoscătoare pentru bucuriile, cât și provocările trăite împreună ca studente la doctorat.

Mulțumesc din toată inima **familiei și prietenilor care îmi sunt ca o familie** pentru încurajările, aprecierea, înțelegerea, încrederea și faptul că s-au bucurat alături de mine de pașii realizați pe parcursul studiilor de doctorat. În mod special, **dedic această teză mamei mele** și îi sunt înfinit recunoscătoare pentru iubirea necondiționată, pentru modelul de perseverență oferit, răbdarea și susținerea dăruite.

RECUNOȘTINȚĂ

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>1</b>
<b>Capitolul 1. Stadiul actual al cercetărilor în domeniul valorificării resurselor de macroalge marine.....</b>	<b>7</b>
1.1. Macroalgele marine ca sursă de materii prime pentru biorafinare. Surse naturale și cultivate.....	7
1.2. Compoziția biomasei macroalgelor marine.....	10
1.2.1. Polizaharide .....	10
1.2.2. Polifenoli.....	12
1.3. Procedee folosite pentru obținerea de compuși activi din macroalgele marine.....	14
1.3.1. Metode de extracție pentru separarea polizaharidelor.....	14
1.3.1.1. Metode convenționale de extracție .....	14
1.3.1.2. Metode neconvenționale de extracție .....	17
1.3.2. Metode de extracție pentru separarea compușilor polifenolici.....	21
1.3.2.1. Metode convenționale de extracție.....	21
1.3.2.2. Metode neconvenționale de extracție.....	25
1.4. Metode de caracterizare a compușilor izolați din macroalge.....	27
1.4.1. Metode de caracterizare a extractelor polizaharidice din biomasa macroalgelor marine.....	29
1.4.2. Metode de caracterizare a extractelor polifenolice din biomasa macroalgelor marine.....	30
1.5. Proprietăți bioactive ale unor compuși separați din biomasa macroalgelor marine.....	31
1.5.1. Activitatea antifungică.....	31
1.5.2. Activitatea anticancerigenă.....	32
1.5.3. Activitatea antioxidantă.....	33
<b>Capitolul 2. Materiale și tehnici experimentale.....</b>	<b>36</b>
2.1. Metode aplicate pentru caracterizarea materialului algal.....	36
2.1.1. Determinarea umidității totale .....	36
2.1.2. Determinarea cenușii totale .....	36
2.1.3. Determinarea conținutului de zaharuri reducătoare (metoda DNS).....	36
2.1.4. Determinarea conținutului total de proteine (metoda Kjeldahl).....	37
2.1.5. Determinarea conținutului total de polifenoli.....	38
2.1.6. Determinarea conținutului de ioni de metale grele (metoda spectrometriei de absorbție atomică).....	38
2.2. Metode aplicate pentru extracția și separarea compușilor de interes din biomasa macroalgelor.....	38
2.2.1. Extracția compușilor polifenolici.....	38
2.2.2. Extracția polizaharidelor.....	39
2.3. Metode de caracterizare cantitativă și calitativă a extractelor obținute.....	39
2.3.1. Caracterizarea extractelor polifenolice.....	39
2.3.1.1. Analiza cromatografică HPTLC.....	39
2.3.2. Caracterizarea extractelor polizaharidice.....	39
2.3.2.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR.....	39
2.3.2.2. Caracterizarea extractelor prin spectroscopia de Rezonanță	

Magnetică Nucleară .....	40
2.3.2.3. Analiza elementală a extractelor.....	40
2.4. Metode de evaluare a proprietăților bioactive.....	40
2.4.1. Activitatea antifungică.....	40
2.4.2. Activitatea anticancerigenă .....	40
2.4.3. Activitatea antioxidantă .....	42
2.4.3.1. Testul radicalului anion superoxid.....	42
2.4.3.2. Testul DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	42
2.5. Metode de evaluare a capacității sorbtive.....	43
2.5.1. Metoda de biosorbție.....	43
2.5.2. Teste de sorbție-desorbție.....	45
<b>Capitolul 3. Valorificarea sustenabilă a resurselor de macroalge marine prin procesul de biorafinare.....</b>	<b>47</b>
3.1. Colectarea și pretratarea biomasei algale.....	49
3.2. Caracterizarea fizico-chimică și structurală a biomasei algale.....	49
3.3. Elaborarea unei scheme de biorafinare propusă pentru valorificarea sustenabilă a biomasei macroalgei <i>Fucus spiralis</i> .....	53
<b>Capitolul 4. Separarea și caracterizarea extractelor obținute.....</b>	<b>63</b>
4.1. Extracția și caracterizarea compușilor polifenolici.....	63
4.2. Separarea și caracterizarea extractelor ce conțin fucoidan.....	73
4.3. Separarea și caracterizarea extractelor cu alginat.....	78
<b>Capitolul 5. Evaluarea proprietăților bioactive ale compușilor studiați și propunerea unor direcții de aplicare a acestora.....</b>	<b>85</b>
5.1. Activitatea antifungică.....	85
5.2. Activitatea anticancerigenă.....	88
5.2.1. Studiu de interacțiune a moleculei de ADN cu compușii bioactivi prin metodă electrochimică.....	89
5.2.2. Studiu de interacțiune a moleculei de ADN cu compușii bioactivi prin spectroscopie electronică.....	95
5.3. Activitatea antioxidantă.....	97
5.3.1. Analiza ionului superoxid.....	97
5.3.2. Analiza interacțiunii cu ionul superoxid prin metoda electrochimică.....	98
5.3.3. Analiza radicalului DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) .....	102
<b>Capitolul 6. Valorificarea deșeurilor macroalgale.....</b>	<b>107</b>
6.1. Teste de biosorbție.....	107
6.1.1. Pregătirea și pre-tratarea biosorbentului.....	107
6.1.2. Caracterizarea chimică a biosorbentului.....	107
6.1.3. Influența dozei de material sorbant.....	113
6.1.4. Influența pH-ului.....	114
6.1.5. Modelarea cinetică a procesului de biosorbție.....	116
6.1.6. Modelarea matematică a izotermei de echilibru.....	118
6.1.7. Interferența ionilor asupra procesului de biosorbție.....	123
6.2. Teste de sorbție-desorbție.....	124
<b>Capitolul 7. Considerații privind sustenabilitatea biorafinării algei brune <i>Fucus spiralis</i>.....</b>	<b>130</b>
7.1. Sustenabilitatea proceselor de obținere a biomasei macroalgei marine.....	131

7.2. Sustenabilitatea procesării în sistem de biorafinare a biomasei algale.....	136
<b>CONCLUZII GENERALE</b> .....	149
<b>BIBLIOGRAFIE</b> .....	154
<b>ACTIVITATE ȘTIINȚIFICĂ</b> .....	192
<b>ANEXE</b> .....	195

## INTRODUCERE

Dezvoltarea accelerată a industriei din ultimul secol a condus la o degradare constantă a calității mediului, un consum din ce în ce mai ridicat al resurselor și instabilitate climatică. Previțiunile privind epuizarea resurselor fosile se află la baza schimbării de paradigmă din ultimii ani pentru identificarea de alternative viabile (Popa, 2018). Astfel, identificarea unor soluții pe termen lung și inovarea în modul de obținere și valorificare a biomasei au devenit de importanță majoră atât din prisma asigurării necesarului de materie primă pentru industrie, cât și cel al reducerii deșeurilor obținute din procesarea acesteia. Prin urmare, acest context a determinat dezvoltarea conceptului de biorafinare, concept ce susține dezvoltarea bioeconomiei, cât și a economiei circulare. Biorafinarea este definită ca fiind obținerea integrată de biocombustibili, energie, precum și de compuși bioactivi, substanțe chimice și alte materiale din biomasă, facilitând valorificarea acesteia cu un minim de deșeuri generate (Cherubini, 2010; Jin ș.a., 2018).

Având în vedere compoziția chimică extrem de valoroasă și diversă a macroalgelor marine, precum și necesitatea asigurării unei cantități considerabile de biomasă pentru dezvoltarea bioeconomiei, tot mai multe grupuri de cercetare din lume încearcă să dezvolte tehnici de biorafinare pentru producerea integrată de produse și energie din biomasa macroalgelor (Bruton ș.a., 2009; Trivedi ș.a., 2015; Masarin ș.a., 2016; Kostas ș.a., 2021). Utilizarea pe scară largă a compușilor de sinteză în procesele de producție industriale cu impact asupra sănătății mediului și a populației au determinat o preocupare crescândă a factorilor de decizie pentru înlocuirea acestora cu compuși bioactivi naturali de calitate și pentru dezvoltarea unor metode de obținere care să genereze randamente bune și un impact minim asupra mediului (Goto ș.a., 2015). Biorafinarea implică de asemenea, utilizarea unor tehnici “verzi” pentru conversia chimică în compuși, fiind facilitată astfel o reducere considerabilă a amprente ecologice (Pollet ș.a., 2014). Acest aspect este demonstrat și de numărul tot mai mare de lucrări dedicate aplicării de tehnologii verzi pentru extracția, separarea și prelucrarea unor constituenți valoroși din biomasa marină (Grosso ș.a., 2015; Michalak și Chojnacka, 2014; Kadam și Kumar, 2013).

Macroalgele marine au fost folosite cu precădere în industria alimentară sau pentru obținerea de hidrocoloizi (alginat, carageenan și agar). Astfel, 83-90% din valoarea globală actuală a industriei prelucrătoare de macroalge marine este bazată pe utilizarea acestora ca produse alimentare (Jung ș.a., 2013). Cu toate acestea, această resursă regenerabilă încă nu este utilizată la adevăratul ei potențial.

Biomasa macroalgelor este considerată ca valoroasă deoarece spre deosebire de cea terestră, nu concurează cu plantele cultivate pentru obținerea de hrană, întrucât nu necesită terenuri sau resurse de apă dulce. Macroalgele prezintă și alte avantaje importante. Acestea au o rată mai ridicată de sechestrare a CO<sub>2</sub> (prin procese de fotosinteză) (Popa ș.a., 1974), prezentând astfel un potențial efect pozitiv în diminuarea concentrațiilor gazelor cu efect de seră și implicit a schimbărilor climatice. De asemenea, nu prezintă lignina ce se regăsește în compoziția chimică a plantelor terestre, fiind astfel mai ușor de valorificat în cadrul proceselor de biorafinare. Numeroase studii au evidențiat diversitatea compușilor chimici macroalgali ce ar putea fi utilizați pentru obținerea de produse cu valoare adăugată ca alternativă la cele generate de industria petrochimică, dar și de biocombustibili (de Quirós ș.a., 2010; Jung ș.a., 2013; Michalak ș.a., 2015a; Sathya ș.a., 2017; Mhatre ș.a., 2019; Hentati ș.a., 2020). De asemenea, macroalgele conțin o serie importantă de molecule bioactive, multe dintre acestea unice în lumea naturală, și care ar putea fi utilizate pentru realizarea de produse cosmetice și farmaceutice (Atashrazm ș.a., 2015; Barbosa ș.a., 2019).

În acest context, teza de doctorat intitulată *Cercetări privind conversia biomasei macroalgelor marine utilizând principii și tehnici de biorafinare* își propune elaborarea unei succesiuni de operații unitare și procese prin care biomasa macroalgă studiată să fie transformată în bioproduse într-un mod sustenabil, eficient, cu un impact minim asupra mediului și cu obiectivul ambițios de a nu genera deșeuri vegetale. Prin aplicarea tehnologiilor verzi și separarea secvențială a compușilor cu potențial comercial se urmărește nu doar reducerea consumului de resurse, ci și de energie și timp implicate în prelucrarea biomasei.

**Obiectivul general** al tezei intitulate “Cercetări privind conversia biomasei macroalgelor marine utilizând principii și tehnici de biorafinare” este așadar, elaborarea unei scheme de biorafinare a macroalgelor marine prin conversie eficientă, sustenabilă și integrală, cu obținerea de bioproduse, prin aplicarea de tehnologii verzi.

Atingerea obiectivului principal al activității de cercetare presupune îndeplinirea următoarelor obiective specifice:

- Analiza potențialului de valorificare și selectarea unei specii de algă marină pentru biorafinare;
- Obținerea de bioproduse cu valoare adăugată din biomasa macroalgelor marine;
- Analiza potențialului de valorificare completă a deșeurii vegetale rezultat în urma separării bioproduselor;
- Validarea schemei de biorafinare a biomasei macroalgale prin analiza sustenabilității procesului, cu ajutorul metodei LCA.

Prezenta lucrare este structurată în două părți organizate astfel:



➤ **partea întâi** alcătuită din primele două capitole include stadiul actual al cercetărilor în ceea ce privește modalitățile de obținere a biomasei algale, potențialul de valorificare a acesteia, modalitățile de separare ale compușilor bioactivi și direcții de utilizare a acestora, precum și materialele și metodele de cercetare aplicate în prezentul studiu;

➤ **partea a doua** include cinci capitole ce prezintă contribuțiile originale realizate privind potențialul de valorificare al macroalgelor marine, elaborarea unei scheme de biorafinare a macroalgei marine brune *Fucus spiralis* pentru conversia completă și sustenabilă a acesteia, evidențierea proprietăților bioactive ale extractelor algale obținute, identificarea unei metode de reutilizare a deșeurilor vegetale obținute după procesele de separare a compușilor bioactivi din specia *Fucus sp.* și evaluarea sustenabilității procesului de biorafinare a macroalgelor marine brune.

**Capitolul 1** intitulat **Stadiul actual al cercetărilor în domeniul valorificării resurselor de macroalge marine** cuprinde o sinteză de literatură privind sursele de obținere a biomasei algale, compoziția chimică a macroalgelor marine (cu accent pe polizaharide și polifenoli), precum și o analiză detaliată a metodelor de extracție și de caracterizare ale compușilor bioactivi și proprietățile bioactive ale acestora.

**Capitolul 2** intitulat **Materiale și tehnici experimentale** descrie materialele, metodele și tehnicile utilizate pentru realizarea planului experimental în scopul conversiei integrate a biomasei algale. Astfel, sunt prezentate mai întâi metodele de caracterizare (proximate and ultimate analysis) a biomasei. După tehnicile de analiză a compoziției chimice a algelor, sunt prezentate și adaptate metodele utilizate pentru obținerea compușilor de interes (polizaharide și polifenoli) din structura biomasei marine considerând atât metodele convenționale, cât și cele neconvenționale. Acest capitol include de asemenea metodele aplicate pentru evaluarea bioactivității extractelor obținute: evaluarea activității antioxidante a polifenolilor prin testul cu DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), respectiv analiza activităților antimicrobiene, anticancerigene și antioxidante a polizaharidelor algale. De asemenea, în capitolul 2 sunt descrise metodele utilizate pentru realizarea testelor de sorbție-desorbție utilizând ca biosorbent deșeurile algal rezultat în urma separării extractelor bioactive.

**Capitolul 3** intitulat **Valorificarea sustenabilă a resurselor de macroalge marine prin procese de biorafinare** prezintă rezultatele obținute privind biorafinarea macroalgei marine *Fucus spiralis*. Considerând caracteristicile chimice ale macroalgelor studiate, s-a elaborat o schemă de biorafinare ce permite obținerea de compuși valoroși ce pot fi utilizați în industrie datorită proprietăților lor. Schema propusă include de asemenea o posibilitate de utilizare a deșeurilor macroalgal rezultat ca biosorbent eficient în remedierea contaminării cu metale grele a unor efluenți lichizi, urmărindu-se astfel conversia integrală a biomasei studiate. Sunt prezentate etapele secvențiale aplicate împreună cu parametrii de proces.

**Capitolul 4** intitulat **Separarea și caracterizarea extractelor obținute** include prezentarea secvențelor de separare ale compușilor de interes (polifenoli și polizaharide), precum și evidențierea profilului chimic al acestora. Extractele separate din macroalga marină conform secvențelor stabilite în cadrul schemei de biorafinare, au fost în continuare caracterizate prin metode calitative și cantitative, spectrofotochimice și cromatografice. De asemenea, se prezintă rezultatele obținute prin utilizarea spectroscopiei IR și  $^1\text{H}$  RMN care au facilitat identificarea grupărilor funcționale caracteristice compușilor vizați pentru separare.

**Capitolul 5** intitulat **Evaluarea proprietăților bioactive ale compușilor studiați și propunerea unor direcții de aplicare a acestora** cuprinde rezultatele obținute în evaluarea activității antimicotice, antioxidante și anticancerigene a polizaharidelor separate din biomasa macroalgei *Fucus spiralis*. Astfel, pentru a evalua activitatea antimicrobiană, s-a determinat concentrația minimă inhibitorie (CMI) pentru specia fungică *Aspergillus flavus* urmărind și efectul sinergic dintre o substanță antimicotică standard (fluconazol) și fucoidan, respectiv alginat, precum și cel individual al celor două polizaharide izolate din biomasa algală. Rezultatele obținute privind activitatea antifungică dovedesc că cele două polizaharide separate au efecte diametral opuse asupra speciei de *Aspergillus flavus*. Astfel, în timp ce extractul alginat de concentrație 6,25 mg/mL și 1,5 mg/mL prezintă efect de inhibare a dezvoltării culturii de *A. flavus*, concentrația minimă inhibitorie fiind înregistrată pentru o concentrație de 12,5 mg/mL, extractul cu fucoidan manifestă efect de stimulare a creșterii, dezvoltării și sporulării tulpinii de *A. flavus* în concentrație directă cu concentrația testată. Mai mult decât atât, ambele extracte polizaharidice manifestă acțiune sinergică cu un antimicotic comercializat (fluconazol) utilizat în practica farmaceutică pentru evitarea contaminării fungice. În ceea ce privește activitatea anticancerigenă, acest capitol include un studiu electrochimic de interacțiune a celor două polizaharide algale cu molecule de ADN. De asemenea, sunt prezentate rezultatele privind activitatea antioxidantă a fucoidanului și alginatului, evaluată cu ajutorul a două metode consacrate: testul cu DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) și testul cu radicalul  $\text{O}_2^-$  (ionul superoxid).

**Capitolul 6** intitulat **Valorificarea deșeurii macroalgal** cuprinde rezultatele studiului de biosorbție recuperativă a ionilor de Pb(II) din soluții apoase obținute utilizând ca biosorbent deșeurii algal epuizate rezultat în urma separării compușilor cu proprietăți bioactive. Materialul biosorbent utilizat în acest studiu a fost generat din deșeurii algal epuizate în urma unor spălări succesive cu apă distilată și soluție de HCl 1M, urmate de uscarea la etuvă și caracterizarea fizico-chimică și structurală a acestuia. Rezultatele favorabile obținute în testele preliminare au permis conducerea studiului până la modelarea cinetică a procesului studiat. Modelele matematice aplicate (modelul pseudo I și modelul pseudo II) au indicat un proces de sorbție cu durată de desfășurare scurtă și

eficiență ridicată. De asemenea, acest capitol include studiul influenței unor ioni competitivi de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  și  $\text{Mg}^{2+}$  asupra biosorbției poluantului. Acest aspect este important de analizat întrucât, compoziția chimică a apelor uzate industriale include de obicei mai multe tipuri de ioni ce pot determina un efect de interferență. În cele din urmă, capitolul 6 cuprinde rezultatele testelor de sorbție-desorbție pentru a evalua numărul de cicluri de reutilizare a biosorbentului.

**Capitolul 7** intitulat **Considerații privind sustenabilitatea biorafinării algei brune *Fucus spiralis*** prezintă evaluarea impactului valorificării biomasei marine conform metodei estimării ciclului de viață (LCSA) cu accent pe evaluarea impactului de mediu (E-LCA). Rezultatele obținute oferă o perspectivă asupra posibilităților de îndeplinire a celor trei dimensiuni ale conceptului de sustenabilitate pentru sistemul de biorafinare aplicat în prezentul studiu. Analiza impactului asupra biodiversității și importanța serviciilor de ecosistem furnizate de biomasa algală sunt de asemenea considerate în cadrul acestui capitol.

Întrucât scopul și obiectivele cercetărilor propuse vizează separarea unor compuși valoroși, comcomitent cu aplicarea unor tehnici ecologice și reducerea cantității de deșeuri generate în urma proceselor de biorafinare, tema de cercetare abordată se încadrează în domeniile prioritare de specializare inteligentă Energie, mediu și schimbări climatice (Direcția de cercetare: modalități și mecanisme pentru reducerea poluării mediului), precum și Bioeconomie.

Rezultatele prezentate în teza de doctorat au fost obținute în urma activității de cercetare desfășurată în perioada 2015-2019, în cadrul Departamentului Ingineria și Managementul Mediului, Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului „Cristofor Simionescu”, Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași. O parte a studiilor prevăzute în programul experimental s-au realizat în Laboratorul de Inginerie a Separării și Reacțiilor–Laboratorul de Cataliză și Materiale (LSRE-LCM) din cadrul Universității din Porto, Facultatea de Inginerie a Universității din Porto. Studiile realizate la Universitatea din Porto au fost posibile datorită stagiului de plasament efectuat în cadrul Programului ERASMUS+ (noiembrie 2016-iunie 2017).

Datele originale obținute au fost diseminate prin publicare în reviste cotate ISI, în reviste indexate în baze de date internaționale BDI, precum și prin comunicare la manifestări științifice naționale și internaționale. Lucrările publicate în reviste cotate ISI aparțin fluxului principal de publicații toate fiind încadrate în quatila Q1.

Gabriela Ungureanu, **Catalina Filote**, Sílvia C.R. Santos, Rui A.R. Boaventura, Irina Volf, Cidália M.S. Botelho, Antimony oxyanions uptake by green marine macroalgae, Journal of Environmental Chemical Engineering, 4(3), 3441-3450 (2016) (**IF 7.968**).

**Catalina Filote**, Gabriela Ungureanu, Rui Boaventura, Sílvia Santos, Irina Volf, Cidália Botelho, Green macroalgae from the Romanian coast of Black Sea: Physico-chemical

characterization and future perspectives on their use as metal anions biosorbents, *Process Safety and Environmental Protection*, 108, 34-43, <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.06.002> (2017) (IF 7.926).

**Catalina Filote**, Irina Volf, Sílvia C.R. Santos, Cidália M.S. Botelho Bioadsorptive removal of Pb(II) from aqueous solution by the biorefinery waste of *Fucus spiralis*, , *Science of The Total Environment*, 648, 1201-1209, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.210> (2019) (IF 10.754).

**Catalina Filote**, Sílvia C.R. Santos, Valentin I. Popa, Cidália M.S. Botelho, Irina Volf, Biorefinery of marine macroalgae into high-tech bioproducts: a review, *Environmental Chemistry Letters*, 19, 969-1000, <http://doi.org/10.1007/s10311-020-01124-4> (2021) (IF 13.615)

**Catalina Filote**, Elhafnaoui Lanez, Valentin I. Popa, Touhami Lanez, Irina Volf Characterization and bioactivity of polysaccharides separated through a (sequential) biorefinery process from *Fucus spiralis* brown macroalgae, *Polymers*, 14, 4106.

<https://doi.org/10.3390/polym14194106> (2022) (IF 4.967).

Celelalte publicații și activități de diseminare a rezultatelor obținute în timpul programului de pregătire prin doctorat sunt detaliate în anexa 1 la pagina 193.

## CAPITOLUL 2

### MATERIALE ȘI TEHNICI EXPERIMENTALE

#### 2.1. Metode aplicate pentru caracterizarea materialului algal

##### 2.1.1. Determinarea umidității totale

Pentru determinarea umidității totale, trei probe de aproximativ 1 g de material algal au fost cântărite și introduse într-o etuvă (BinderED 23) la 105 °C până la atingerea masei constante. Metoda a fost adaptată după standardul NREL pentru determinarea conținutului total de substanțe solide și cenușă din biomasa algelor (Van Wychen and Laurens, 2015).

##### 2.1.2. Determinarea cenușii totale

Determinarea conținutului total de cenușă s-a realizat într-un cuptor de calcinare (Nabertherm L3/11/B170), pe baza protocolului raportat de Van Wychen and Laurens, (2015). Analiza s-a efectuat în triplicat cu probe de 1 g de material algal introduse în creuzete de porțelan. Probele au fost calcinate la o temperatură de 550 °C, timp de 16 ore.

##### 2.1.3. Determinarea conținutului de zaharuri reducătoare (metoda DNS)

Pentru determinarea conținutului total de zaharuri reducătoare, 2,5 g de material vegetal s-au introdus într-un balon de 250 mL, peste care s-au adăugat 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de concentrație 2,5%. Biomasa a fost hidrolizată prin fierbere, timp de 4 h, cu refrigerent ascendent. Concentrația substanțelor reducătoare s-a stabilit utilizând metoda cu acid dinitrosalicilic (DNS) descrisă de Ghose (1987) și Uniunea Internațională de Chimie Pură și Aplicată (IUPAC).

##### 2.1.4. Determinarea conținutului total de proteine (metoda Kjeldahl)

Conținutul total de proteine din biomasa macroalgelor studiate s-a stabilit folosind metoda Kjeldahl (Kjeldahl, 1883). Astfel, s-a determinat conținutul procentual de N, prin dozarea azotului total, și înmulțirea acestuia cu indicele de transformare al azotului în proteină, respectiv 6,25 (Huang ș.a., 2016; Lorenzo ș.a., 2017).

### **2.1.5. Determinarea conținutului total de polifenoli**

Conținutul total de polifenoli (TPC) s-a determinat utilizând metoda Folin-Ciocalteu (Singleton ș.a., 1999). Conținutul total de polifenoli (mg echivalenți acid galic, GAE, per gram de biomasă) s-a determinat în funcție de absorbanta măsurată la lungimea de undă de 765 nm, utilizând un spectrofotometru UV-VIS Avanta, pe baza curbei de calibrare trasate cu acid galic ca standard.

### **2.1.6. Determinarea conținutului de ioni de metale grele (metoda spectrometriei de absorbție atomică)**

Pentru a analiza conținutul de metale din compoziția macroalgelor marine, s-a efectuat mineralizarea materialului algal în tuburi de sticlă la 120 °C, timp de 2 ore. După mineralizare, probele au fost filtrate utilizând membrane filtrante din acetat de celuloză Sartorius Stedim de porozitate 0,45 μm, au fost diluate la 100 mL și au fost analizate la spectrofotometrul de absorbție atomică (AAS) (în flacără sau în cuptorul de grafit, în funcție de concentrația metalului). Această metodă a fost adaptată după cea raportată de Ungureanu ș.a. (2015).

## **2.2. Metode aplicate pentru extracția și separarea compușilor de interes din biomasa macroalgelor**

### **2.2.1. Extracția compușilor polifenolici**

Extracția compușilor polifenolici s-a realizat pe baza metodei raportate de Lazar ș.a., (2016). Procesul de extracție s-a efectuat utilizând o baie de ultrasonare Elmasonic 120 (H) (model LAUDA DR. R Wobser GmbH & Co. KG, Lauda Konigshofen, Germany).

### **2.2.2. Extracția polizaharidelor**

S-au extras două tipuri de polizaharide: fucoidan, respectiv alginat. Metodele aplicate au fost adaptate după cea utilizată de Yuan și Macquarrie, (2015a). Mai întâi, extracția fucoidanului a fost efectuată printr-o metodă convențională utilizând HCl 0,1 M ca solvent, un raport solid/lichid (S/L) de 1:10, temperatură de extracție 40 °C și durată de 20 min. Extracția alginatului s-a realizat cu o soluție de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 4%, un raport solid/lichid (S/L) de 1:10, procesul având loc la o temperatură de 25 °C, timp de 3 h.

## **2.3. Metode de caracterizare cantitativă și calitativă a extractelor obținute**

### **2.3.1. Caracterizarea extractelor polifenolice**

#### **2.3.1.1. Analiza cromatografică HPTLC**

În acest studiu s-a utilizat un sistem de cromatografie în strat subțire CAMAG, având următoarele componente: plăci HPTLC cromatografice silica-gel Merck, vase cromatografice din sticlă, sistem de documentare REPROSTAR 3, aplicator, pulverizator, lampă UV, solvenți și substanțe etalon cu grad de puritate cromatografică. În ceea ce privește metoda de lucru, înainte de înregistrarea cromatografică, vasul cromatografic din sticlă a fost saturat cu developantul utilizat timp de 30 de min la o temperatură de 20-25 °C.

### **2.3.2. Caracterizarea extractelor polizaharidice**

#### **2.3.2.1. Caracterizarea prin spectroscopie FTIR**

Extractele care conțin fucoidan, respectiv alginat din alga *Fucus spiralis* au fost caracterizate prin metoda FTIR pentru a identifica grupările funcționale caracteristice celor doi compuși și eventuale grupări chimice ce aparțin impurităților. Spectrele IR au fost înregistrate într-un interval de lungime de undă de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , folosind un spectrofotometru Digilab SCIMITAR Series IR și au fost interpretate utilizând software-ul KnowItAll Academic Edition și literatura de specialitate.

#### **2.3.2.2. Caracterizarea extractelor prin spectroscopia de Rezonanță Magnetică Nucleară**

Spectrele de rezonanță magnetică nucleară ( $^1\text{H}$  RMN) au fost înregistrate utilizând un spectrometru Bruker Avance DRX 400 MHz (Germany) folosind apă deuterată ca solvent și tetrametil silan ca standard intern. Pentru prepararea probei, 5 mg alginat, respectiv fucoidan (extract uscat) au fost dizolvate în 800  $\mu\text{L}$  de apă deuterată ( $\text{D}_2\text{O}$ ).

#### **2.3.2.3. Analiza elementală a extractelor**

Analiza elementală s-a realizat aplicând metoda Pregl (Pregl și Roth, 1923) pentru carbon și hidrogen, metoda Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) pentru azot, respectiv metoda Schöniger (Schöniger, 1955; Schöniger, 1956) pentru sulf.

## **2.4. Metode de evaluare a proprietăților bioactive**

#### 2.4.1. Activitatea antifungică

Activitatea antifungică a fost determinată prin metoda microdiluțiilor (Ohikhenă ș.a., 2017), utilizând tulpina test *Aspergillus flavus* (cod tulpină CMD00170).

#### 2.4.2. Activitatea anticancerigenă

Spectroscopia de absorbție și valoarea coeficientului de absorbție molară de  $6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  la 260 nm, au fost utilizate pentru a determina concentrația ADN (Shah ș.a., 2010).

Metoda titrării prin spectroscopia electronică a fost utilizată ca metodă complementară tehnicilor de voltametrie pentru a studia interacțiunea dintre  $E_2$ , respectiv  $E_3$  cu ADN-ul în soluție tampon de fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) la  $\text{pH}=7,2$ .

#### 2.4.3. Activitatea antioxidantă

##### 2.4.3.1. Testul radicalului anion superoxid

Măsurătorile de voltametrie ciclică au fost realizate cu un electrod de platină la  $100 \text{ mVs}^{-1}$  utilizând un voltmetru PGZ301 care rulează pe software-ul VoltaMaster 4 V 7.08 software, (Radiometer Analytical SAS, France). Capacitatea antioxidantă a  $E_2$  și  $E_3$  a fost exprimată ca  $\text{IC}_{50}$ . Valoarea  $\text{IC}_{50}$  a fost definită ca fiind concentrația (mg/mL) a probelor care inhibă formarea radicalilor  $\text{O}_2^-$  cu 50%.

##### 2.4.3.2. Testul cu DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Capacitatea antioxidantă a extractelor algale analizate a fost exprimată ca  $\text{IC}_{50}$  (capacitatea extractului de a reduce cu 50% activitatea radicalului DPPH) (Huang ș.a., 2016). De asemenea, s-au efectuat studii spectrofotometrice pentru a măsura activitatea antioxidantă a probelor  $E_2$  și  $E_3$  folosind radicalul liber DPPH.

### 2.5. Metode de evaluare a capacității sorbtive

#### 2.5.1. Metoda de sorbție

Determinarea capacității sorbtive a materialului algal s-a realizat utilizând metoda spectrometriei de absorbție atomică.



### 2.5.2. Teste de sorbție-desorbție

Ciclurile de sorbție-desorbție presupun repetarea succesiunii de procese de captare a poluantului urmată de recuperarea acestuia. Astfel, sorbentul utilizat poate fi reutilizat, iar metalul recuperat, atât timp cât este utilizat un agent de desorbție ce nu afectează aceste două componente (Hlihor ș.a., 2014).

## CAPITOLUL 3

### Valorificarea sustenabilă a resurselor de macroalge marine prin procesul de biorafinare

#### 3.1. Colectarea și pretratarea biomasei algale

Toate cele șapte specii de alge marine au fost considerate datorită cantităților mari disponibile în anumite areale geografice. Astfel, *Ulva rigida*, *Ceramium rubrum* și *Cystoseira barbata* au fost colectate de pe coasta românească a Mării Negre (Fig. 2. - a și b), în timp ce speciile *Ascophyllum nodosum*, *Fucus spiralis*, *Laminaria digitata* și *Laminaria sp.* au fost colectate de pe coasta portugheză a Oceanului Atlantic (Fig. 2 – c, d și e).

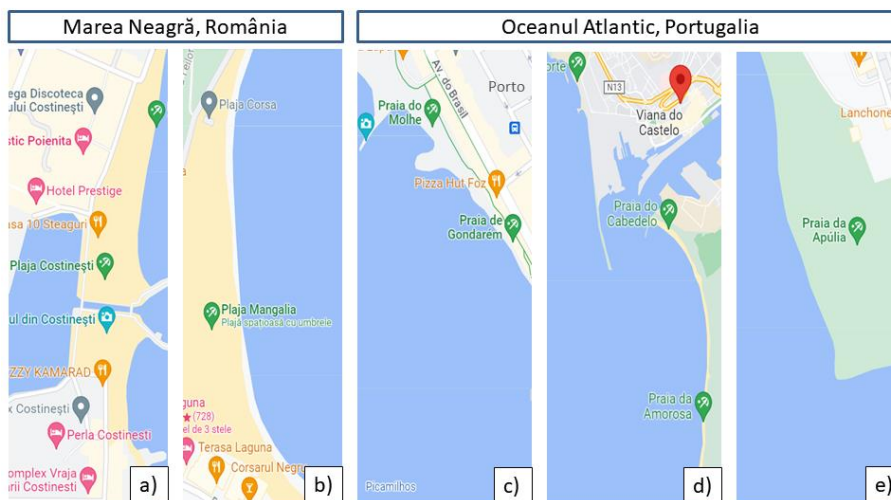


Fig. 2. Zonele din care s-au colectat algele din România (a și b) și din Portugalia (c, d și e).

#### 3.2. Caracterizarea fizico-chimică și structurală a biomasei algale

Pentru a obține o imagine cât mai clară asupra potențialului chimic a macroalgei studiate caracterizarea a urmărit toate etapele specifice de determinare a principalelor proprietăți. Astfel, au fost abordate investigații referitoare la conținutul în umiditate (%) și de cenușă (la 550 °C) (%) (proximate analysis), determinarea macroelementelor constitutive (carbon, hidrogen, azot și sulf),

cât și a componentilor posibil prezenți în cantități mici sau sub formă de urme ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , dar și a ionilor de metale grele  $\text{Al}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  și  $\text{Pb}^{2+}$ ) (ultimate analysis). Pe lângă aceste determinări s-au mai abordat și analize biochimice ce au vizat componentii de interes precum: carbohidrați, polifenoli, conținutul de proteine și azotul total.

Valorile obținute privind conținutul de polizaharide pentru *Laminaria sp.*, respectiv *Fucus spiralis*, sunt la limita inferioară a conținutului raportat în general pentru algele brune (Jung ș.a., 2013). Rezultatele caracterizării chimice au indicat valoarea TPC cea mai ridicată în cazul macroalgei *Fucus spiralis*. În cazul celorlalte macroalge marine valorile calculate sunt de până la 2-3 ori mai scăzute. În ceea ce privește conținutul de proteine din compoziția macroalgelor studiate, s-a remarcat o concentrație mai mare de substanțe proteice în specia de algă verde *Ulva rigida*, respectiv în compoziția algei roșii *Ceramium rubrum*.

### **3.3. Elaborarea unei scheme de biorafinare propusă pentru valorificarea sustenabilă a biomasei macroalgei *Fucus spiralis***

Considerând rezultatele obținute în etapa de caracterizare chimică și studiile disponibile privind separările succesive ale compușilor macroalgali, s-a propus o schemă de biorafinare pentru macroalga *Fucus spiralis* (Fig. 5).

Polifenolii și fucoidanul sunt de obicei separați în etapa de pre-tratare realizată înaintea separării alginatului (Hahn ș.a., 2012; Lorbeer ș.a., 2015b). Extracția polifenolilor în secvența inițială din schema de biorafinare este recomandată pentru a evita contaminarea compușilor separați mai apoi, precum și pentru a nu inhiba procesul de fermentație în cazul producerii de bioenergie (Bruton ș.a., 2009). Totodată, genul *Fucus* este unul dintre genurile de macroalge brune cu cel mai mare conținut de compuși polifenolici (1-14% s.u.) (Agregán ș.a., 2018).

Solvenții și metodele incluse în schema de biorafinare au fost selectate luând în considerare principiile chimiei verzi și ale economiei circulare, prelucrării în sistem de biorafinare și economiei circulare. Astfel, a fost considerată o abordare durabilă, eficientă și cu generare minimă a deșeurilor.

Separarea polifenolilor din biomasa macroalgelor marine înainte de cea a alginatului se realizează de obicei folosind aldehidă formică care permite scindarea legăturilor stabilite între strânse compuși polifenolici și polizaharidele macroalgale (Jothisarawathi ș.a., 2006; Fernando ș.a., 2019).

În ceea ce privește condițiile de operare, s-au ales temperaturi moderate de lucru pentru a evita degradarea compușilor extrași (Hahn ș.a., 2012; Lorbeer ș.a., 2015a; Catarino ș.a., 2018).

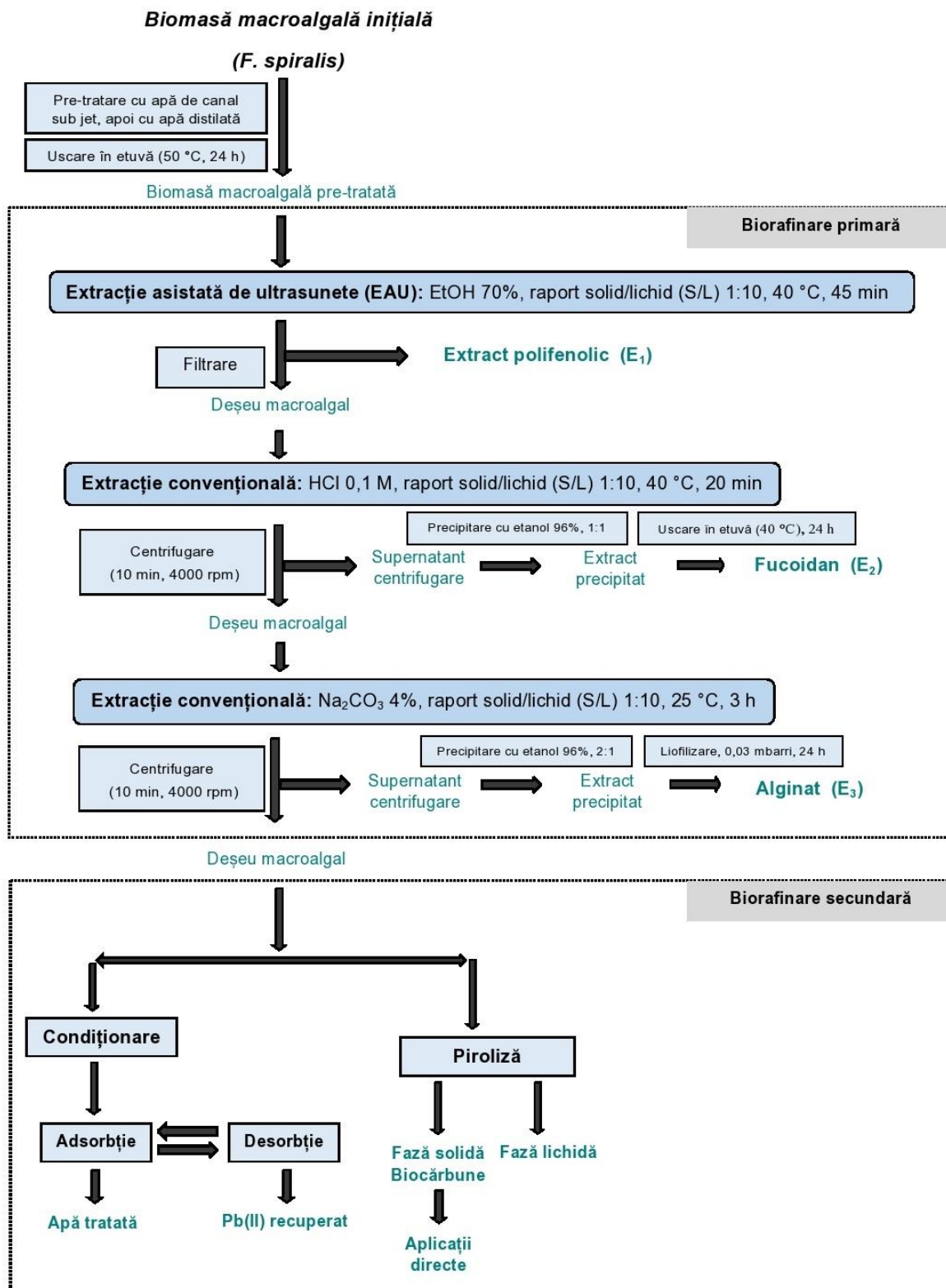


Fig. 5. Schemă de biorafinare propusă pentru valorificarea biomasei macroalgei brune

*Fucus spiralis*.

Un număr mare de studii s-au referit la utilizarea macroalgelor pentru îndepărtarea poluanților din apele uzate datorită eficienței acestora chiar pentru concentrații mici ale poluanților și a costurilor reduse în comparație cu sorbenții convenționali (Freitas ș.a., 2008; Santos ș.a., 2018). Astfel, în ceea ce privește găsirea aplicațiilor pentru deșeurile macroalgale generate după separarea compușilor bioactivi, se propune în studiul de față utilizarea deșeurii reziduală solid *Fucus spiralis* ca biosorbent în procese de sorbție-desorbție.

Literatura științifică a evidențiat faptul că macroalgele brune reprezintă biosorbenți foarte eficienți în comparație cu alte tipuri de biomasă și prezintă capacități de reținere a poluanților mai bune comparativ cu algele roșii și verzi (Romera ș.a., 2008; Mazur ș.a., 2018).

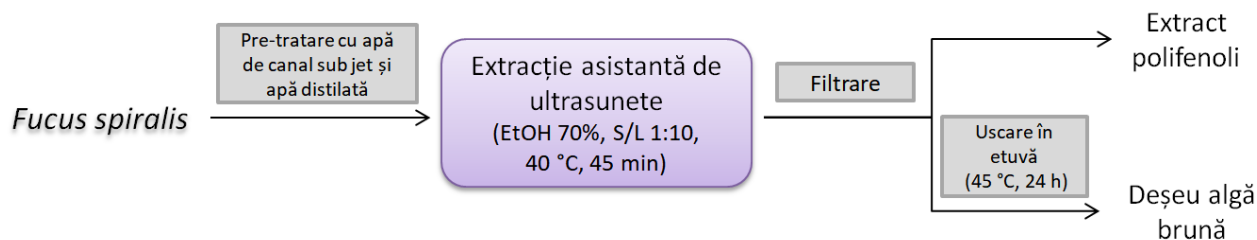
Având în vedere toate aceste aspecte, schema de biorafinare propusă a fost considerată o opțiune viabilă pentru prelucrarea biomasei *Fucus spiralis* și a fost prin urmare aplicată în continuare în acest studiu.

## CAPITOLUL 4

### Separarea și caracterizarea extractelor obținute

#### 4.1. Extracția și caracterizarea compușilor polifenolici

Conținutul total de polifenoli s-a determinat aplicând aceleași procedee și metode folosite pentru caracterizarea biomasei algale inițiale. Astfel, în mod similar, s-a realizat o extracție asistată de ultrasunete (UAE) (Lazar ș.a., 2016), utilizând ca solvent etanol 70%, raport solid/lichid (S/L) de 1:10, temperatura de 40 °C, respectiv 45 min timpul de extracție (Fig. 6). Probele au fost preparate în duplicat, utilizând 5 g de biomasă macroalgă inițială. Extractul obținut s-a filtrat, după care, deșeurii vegetale rezultate au fost spălate cu apă distilată și uscate în etuvă la 45 °C.

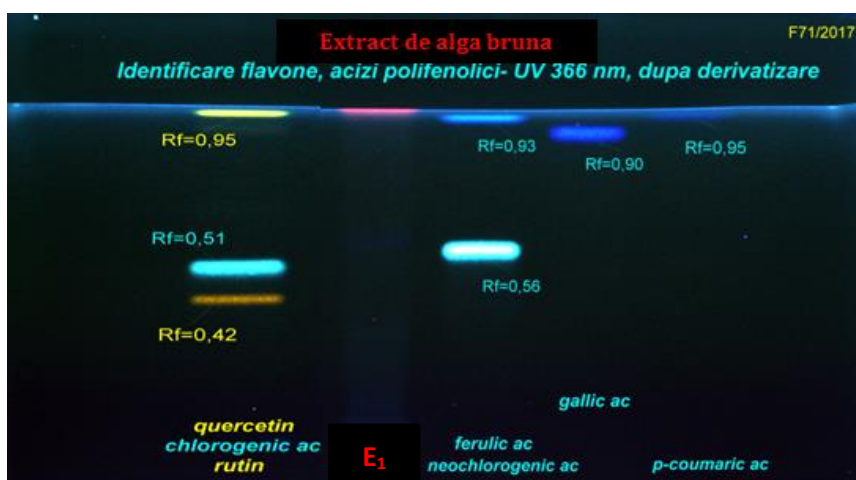


**Fig. 6.** Secvența de procese aplicate pentru separarea extractului cu polifenoli din biomasa algei brune *Fucus spiralis* (Lazar ș.a., 2016).

Extractul obținut din *Fucus spiralis* s-a caracterizat printr-un conținut total în polifenoli (TPC) de  $3,4 \pm 0,0$  mg GAE g<sup>-1</sup>. Astfel, extractul obținut din *Fucus spiralis* a înregistrat o capacitate inhibitorie a radicalului DPPH de 22,2%, valoare asemănătoare cu cea obținută într-un alt studiu (O'Sullivan ș.a., 2011) pentru *Fucus vesiculosus* (31,2%), respectiv pentru *Ascophyllum nodosum* (25,6%), la o concentrație a extractului polifenolic de 5 mg/mL.

Analiza calitativă a compușilor polifenolici din materialul algal s-a realizat utilizând metoda cromatografică în strat subțire (HPTLC), cea mai specifică metodă de analiză calitativă pentru plantele medicinale și aromatice, metodă indicată de referențialele de bază: Farmacopeea Europeană, ed. V cu adendumurile de la 1 la 8, ed.VI și Farmacopeea Română, ed. X.

În ceea ce privește rezultatele obținute, benzile albastre/albastru fluorescent din probele analizate la 366 nm indică prezența polifenolilor, iar benzile galbene, în aceleași probe și aceleași condiții cromatografice, la diferite valori ale *R<sub>f</sub>*-ului, indică prezența flavonoidelor (Fig. 7). În urma vizualizării la 366 nm după pulverizarea cu reactivul de identificare, nu au fost identificați constituenții specifici extractului analizat prin raportare la substanțele de referință (Fig. 7). Screeningul la 254 nm, efectuat după dezvoltare în vederea evaluării cantitative a constituenților, a indicat faptul că standardele de referință aplicate nu au putut fi atribuite nici uneia din probe.



**Fig. 7.** Cromatograma de identificare a flavonoidelor și polifenolilor în extractul de algă brună la UV 366 nm, după derivatizare.

Track-uri: 1- S1 (rutină, acid clorogenic, quercetină); 2 – E<sub>1</sub> (extract etanolic din algă brună); 3 – S2 (acid neochlorogenic, acid ferulic); 4 – S3 (acid galic); 5 – S4 (acid p-cumaric).

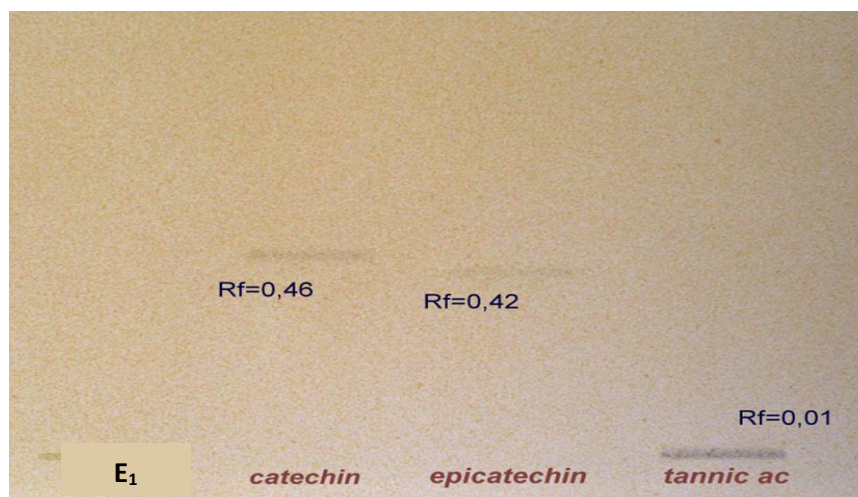
Amprenta cromatografică înregistrată în condiții analitice și cromatografice specifice - examinare și documentare la UV 366, după derivatizare nu a evidențiat prezența flavonelor și polifenolilor în extractul etanolic din algă brună.

Screeningul fitochimic la 254 nm a scos în evidență că standardele de referință aplicate, respectiv rutin, acid clorogenic, quercetină, acid neoclorogenic, acid ferulic, acid galic, acid p-cumaric, nu pot fi atribuite în proba aplicată ( $E_1$ ).

Astfel, studiul fitochimic calitativ efectuat prin cromatografie pe strat subțire a evidențiat că extractul obținut din alga brună *Fucus spiralis*, prin extracție cu ultrasunete, utilizând ca solvent etanol 70% v/v are un profil cromatografic inexistent pentru polifenoli și flavone.

Identificarea cromatografică a taninurilor din extractul etanolic 70% de algă brună ( $E_1$ ), obținut prin extracție cu ultrasunete a fost de asemenea efectuată, utilizând ca referințe catehina (S1), epicatehina (S2), respectiv acidul tanic (S3). Identificarea s-a realizat în urma tratării cromatoplăcii cu reactivul de identificare specific. Prin metoda aplicată, în funcție de structura compușilor analizați, apare o culoare albastru-cenușie sau verde-cenușie. După pulverizarea cu reactiv de identificare, clorură ferică, prin raportarea la substanțele de referință nu au fost identificați constituenții specifici produselor vegetale analizate în domeniul vizibil.

Studiul fitochimic calitativ realizat cu ajutorul cromatografiei în strat subțire a arătat faptul că extractul din algă brună, utilizând ca solvent de extracție etanol 70% v/v, are un profil cromatografic inexistent pentru taninuri (Fig. 9), însă analizarea screeningului fitochimic la 254 nm a avut ca rezultat identificarea acidului tanic în extractul etanolic din alga brună *Fucus spiralis*.



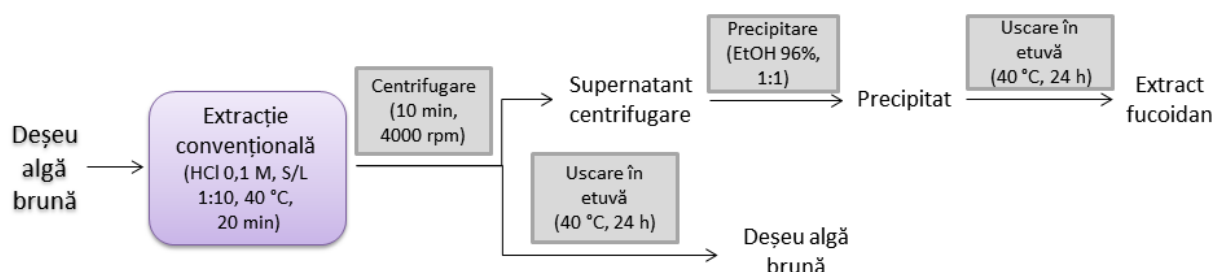
**Fig. 9.** Cromatograma de identificare a taninurilor în extractul de algă brună.

Track-uri: 1 –  $E_1$  (extract etanolic din alga brună); 2 - S1 (catehină); 43 – S2 (epicatehină); 4 – S3(acid tanic).

#### 4.2. Separarea și caracterizarea extractelor ce conțin fucoidan

Procedura utilizată pentru separarea extractului cu fucoidan din deșeurile de algă brună a fost adaptată după secvența prevăzută în studiul realizat de Imbs ș.a., (2015) și este redată în Fig. 11.

Procesul de extracție aplicat a condus la un randament relativ similar cu valorile raportate în literatura științifică pentru fucoidan obținut din macroalgele brune prin metode convenționale și, în unele cazuri, chiar și prin metode alternative. Astfel, randamentul extractului rezultat în acest studiu ( $1,35 \pm 0,1\%$ ) este similar cu cel semnalat pentru alga brună *Ecklonia radiata* (3,75%) prin separarea secvențială în scopul biorafinării (Lorbeer ș.a., 2015b).



**Fig. 11.** Secvența de procese aplicate pentru separarea extractului cu fucoidan din biomasa algei brune *Fucus spiralis* (Imbs ș.a., 2015).

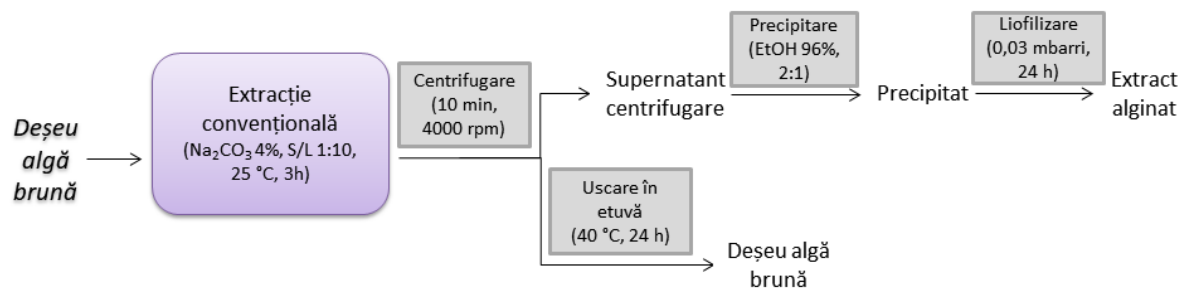
În ceea ce privește compoziția chimică, analiza elementală indică prezența sulfurii în extract care semnifică existența fucoidanului. Cu toate acestea, cantitatea detectată este mult mai mică decât cea obținută din *Fucus vesiculosus* (aproximativ 9-12%) sau comparativ cu fucoidanul de referință utilizat într-un studiu de caracterizare chimică (Zayed ș.a., 2016). Nivelul de carbon al algei *Fucus* în acest studiu este semnificativ mai mare decât cele semnalate în același studiu de referință.

Spectrul FTIR corespunzător fucoidanului separat din *Fucus spiralis* (Fig. 12) indică prezența grupărilor carboxil și carbonil la o lungime de undă de  $1718 \text{ cm}^{-1}$  (Sellimi ș.a., 2015). Prin analiza spectrală, picul de la o lungime de undă de  $1226 \text{ cm}^{-1}$  a fost asociat prezenței grupării funcționale sulfat S=O (Balboa ș.a., 2013; Zayed ș.a., 2016). Alte două grupări, una caracteristică sulfonamidelor N=S=O (Palanisamy ș.a., 2017) și asociată unui pic mai intens decât în cazul S=O, și C-O-SO<sub>3</sub>, au fost observate la lungimile de undă  $1136 \text{ cm}^{-1}$ , respectiv  $1024 \text{ cm}^{-1}$ . Grupările ce conțin sulf (S) au un rol important în determinarea proprietăților bioactive ale polimerului (Hahn ș.a., 2012).

### 4.3. Separarea și caracterizarea extractelor cu alginat

Procedura utilizată pentru separarea extractului cu alginat din deșeurile de algă brună obținut în cadrul studiului prezent în urma separării fucoidanului a fost adaptată după secvența prevăzută în studiile realizate de Fawzy ș.a., (2017), Vauchel ș.a., (2009) și Saji ș.a., (2022) și este redată în Fig.

15. Alginatul reprezintă al treilea bioproduct separat prin aplicarea schemei de biorafinare propuse, fiind obținut un randament de  $47,0 \pm 1,0$  %.



**Fig. 15.** Secvența de procese aplicate pentru separarea extractului cu alginat din biomasa algei brune *Fucus spiralis* (Vauchel ș.a., 2009; Fawzy ș.a., 2017; Saji ș.a., 2022).

În ceea ce privește compoziția chimică, analiza elementală a alginatului indică un conținut de carbon, respectiv hidrogen, similar cu valorile din literatura științifică. Pentru alginatul separat din alga brună *Laminaria digitata* s-a înregistrat o valoare de 33,95 (s.u.%) de carbon, 3,72 (s.u.%) de hidrogen și 0 (s.u.%) azot (Rowbotham ș.a., 2013).

Structura chimică a extractului a fost de asemenea caracterizată prin spectroscopie IR (Fig. 16). Aceasta a permis identificarea unităților guluronice la lungimea de undă  $1017 \text{ cm}^{-1}$  (Balboa ș.a., 2013; Sellimi ș.a., 2015; Khajouei ș.a., 2018), precum și a unităților manuronice la lungimile de undă 872, respectiv  $812 \text{ cm}^{-1}$  (Balboa ș.a., 2013; Khajouei ș.a., 2018). Aceste structuri confirmă separarea alginatului din biomasa algală.

## CAPITOLUL 5

### Evaluarea proprietăților bioactive ale compușilor studiați și propunerea unor direcții de aplicare a acestora

#### 5.1. Activitatea antifungică

Metodele ce pot fi utilizate pentru determinarea activității antifungice a substanțelor sunt metoda macrodiluțiilor, testul difuziei pe disc, tehnica diluțiilor în agar și metoda microdiluțiilor. Aceasta din urmă este însă mai puțin consumatoare de timp, cu o complexitate redusă, costuri mai mici și o acuratețe mai mare (Zgoda și Porter, 2001; Elshikh ș.a., 2016).

Metoda microdiluțiilor presupune punerea în contact a unui microorganism cu un agent cu proprietăți antimicrobiene prezent în concentrații crescânde. Astfel, extractele algele au fost diluate și testate la concentrații finale cuprinse între 50 – 0,195 mg/mL (5 – 0,018 %). Fluconazolul a fost utilizat drept control pentru activitatea antifungică, fiind testat la concentrații de 0,25 – 0,0019



mg/mL. Determinarea efectului sinergic, de potențare a activității substanței antifungice (fluconazol) de către extractele algale, a fost efectuată prin amestecul fiecărei substanțe de testat cu fluconazolul, la concentrații care nu au prezentat activitate antifungică, în experimentul inițial, și anume: substanțele de testat (1,5 mg/mL, respectiv 6,25 mg/mL) și trei concentrații succesive minime de fluconazol (0.0315 – 0.01562 – 0.0078 mg/mL). În experiment au fost montate două variante control, și anume: mediu de cultură neinoculat (controlul sterilității), precum și mediu de cultură inoculat (creșterea tulpinii fungice).

Aprecierea activității antifungice (determinare CMI – concentrație minimă inhibitorie) a substanțelor de testat, a fluconazolului, precum și a efectului sinergic fluconazol/extract algal a fost realizată prin observații la stereomicroscop, după 48 ore de incubare la 28 °C. Astfel, cea mai mică concentrație a substanțelor și amestecurilor testate care a inhibat creșterea fungală este definită drept concentrație minimă inhibitorie (CMI). Efectul sinergic al combinațiilor testate a fost determinat pe baza indicelui de concentrare inhibitor fracțional (ICIF; Odds ș.a., 2003, Tøndervik ș.a., 2014), o valoare ICIF  $\leq 0,5$  indicând prezența unui efect sinergic.

Observațiile realizate la stereomicroscop au indicat faptul că extractul cu alginat manifestă activitate antifungică față de tulpina *Aspergillus flavus*, la concentrații mari, determinându-se valoarea CMI la o concentrație a produsului A<sub>1</sub> de 12,5 mg/mL. În cazul extractului cu fucoidan, acesta manifestă efect de stimulare a creșterii, dezvoltării și sporulării ciupercii *Aspergillus flavus*, în corelație directă cu concentrația testată.

Produsul A<sub>1</sub> are efect de potențare a activității antifungice a fluconazolului, prin acțiunea sinergică dovedită (valoarea ICIF  $\leq 0,252$ ). Astfel, s-a constatat diminuarea valorii CMI pentru fluconazol de până la 16 ori, de la 0,125 mg/mL la 0,0315 mg/mL (A<sub>1</sub>- 1,5 mg/mL/ Fluconazol), precum și la 0,0078 mg/mL (valoarea ICIF  $\leq 0,062$ ), în cazul utilizării unei concentrații mai mari de alginat (A<sub>1</sub> – 6,25 mg/mL/ Fluconazol).

Utilizarea amestecurilor sinergice în acest mod poate determina potențarea efectului antimicotic a unor substanțe cu activitate scăzută și contribuie la combaterea problemei privind rezistența la antimicotice. De asemenea, prin scăderea concentrației substanțelor antimicotice standard, se reduc și efectele toxice ale acestora, un aspect de importanță majoră la momentul actual.

Valorile CMI ale bioproduselor obținute în cadrul prezentului studiu din alga brună *Fucus spiralis*, a substanței antimicotice utilizate ca martor, fluconazol, precum și a amestecurilor sinergice dintre acestea au fost sistematizate în tabelul 17.

**Tabel 17.** Concentrațiile produselor testate individual, respectiv în amestec sinergic pentru care s-au determinat valorile CMI.

Produsul testat	Testare individuală		Testare în amestec sinergic	
A <sub>1</sub>	12,5 mg/mL	6,25 mg/mL	1,5 mg/mL	
A <sub>2</sub>	-	-	-	
Fluconazol	0,125 mg/mL	0,0078 mg/mL	0,0315 mg/mL	

## 5.2. Activitatea anticancerigenă

În desfășurarea bolilor cancerigene macromolecula de acid deoxiribonucleic (ADN) se replică într-un mod excesiv conducând la înmulțirea necontrolată și dăunătoare a celulelor. Principiul de acțiune al substanțelor anticancerigene se bazează pe rolul pe care acestea îl au în reglarea activității ADN-ului. Există un interes ridicat pentru identificarea și testarea unor astfel de compuși, dar care, spre deosebire de ceea ce s-a utilizat cu precădere în terapie, să fie lipsiți de efectele toxice secundare (Arshad ș.a., 2018). Metodele existente pentru caracterizarea moleculelor de ADN așa cum sunt PCR (identificarea secvenței ADN sau ARN corespunzătoare unui patogen sau unei celule neoplazice) și hibridizarea sunt tehnici laborioase, relativ scumpe, ce necesită echipamente și operatori foarte specializați. Această teză de doctorat propune o alternativă și anume utilizarea senzorilor și a unei metode electrochimice care oferă mai multe avantaje: costuri reduse, complexitate scăzută, precum și viteză mai mare de analiză. Principiul de bază al funcționării acestei metode electrochimice presupune capacitatea electrozilor de a detecta semnalul redox al substanțelor analizate conținând ADN monocatenar și eventualele componente asociate ce se acumulează la suprafața electrodului (Asrat ș.a., 2021).

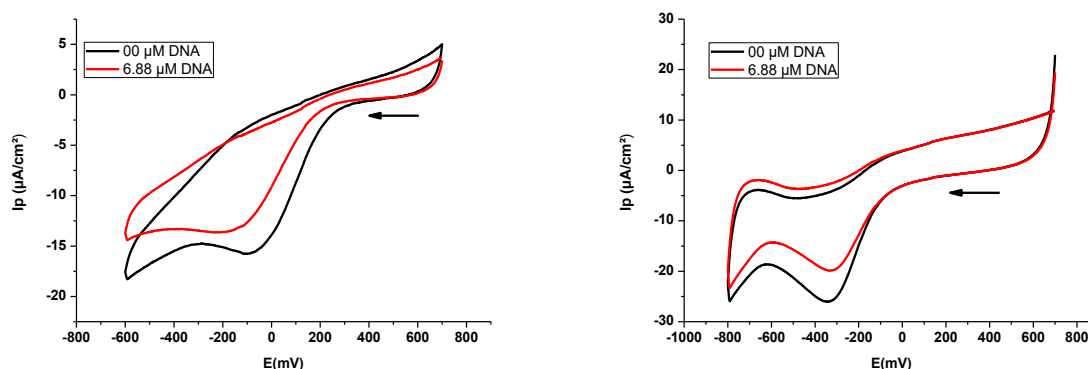
### 5.2.1. Studiu de interacțiune a moleculei de ADN cu compșii bioactivi prin metodă electrochimică

În absența ADN-ului, voltamogramele ciclice ale probelor E<sub>2</sub> și E<sub>3</sub> înregistrate în soluție tampon de fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) indică prezența picului catodic de reducere la valorile potențialelor de electrod de -94, respectiv -342 mV. În prezența unei concentrații de 6,88 μM de ADN, potențialul picului corespunzător extractului reducerii E<sub>2</sub> s-a deplasat la valori mai negative, de -173 mV, iar potențialul picului corespunzător reducerii extractului E<sub>3</sub> s-a deplasat la valori mai puțin negative (Fig. 20).

Aceste rezultate indică faptul că E<sub>2</sub> interacționează cu ADN-ul prin efecte electrostatice (Oleksi ș.a., 2006; Shah ș.a., 2010), în timp ce deplasările în sens pozitiv evidente ale potențialului

picului reducerii  $E_3$  indică faptul că modul de interacțiune poate fi intercalat între  $E_3$  și ADN (Ibrahim ș.a., 2012).

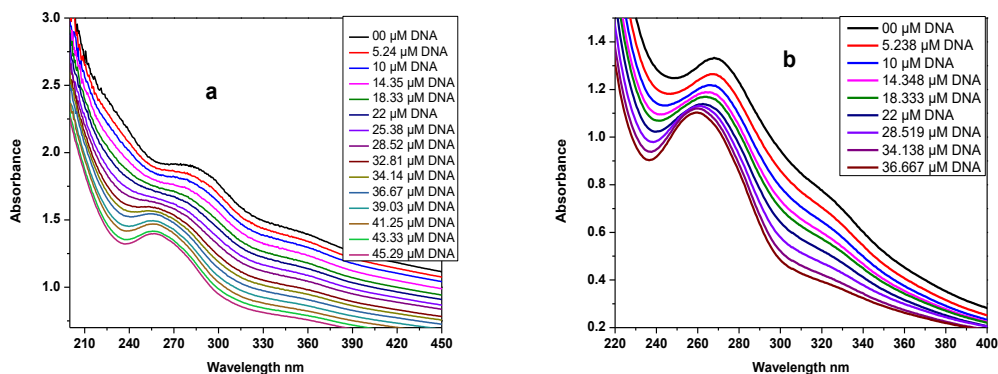
Deplasarea în sens negativ al potențialului picului catodic cauzat de adăugarea ADN-ului la  $E_2$  s-ar putea datora interacțiunilor electrostatice ale substanței anionice cu structura ADN (Shah ș.a., 2010; Jamil ș.a., 2013). Această deplasare în sens negativ a potențialului picului indică în continuare faptul că extractul  $E_2$  este mai greu de redus în prezența mediului negativ al ADN-ului. În contrast, deplasarea în sens pozitiv observată pentru potențialul picului catodic determinată de adăugarea ADN-ului la  $E_3$  poate fi explicată prin modul de interacționare intercalat dintre  $E_3$  și ADN (Ibrahim ș.a., 2012). Această deplasare indică astfel faptul că aductul format ADN- $E_3$  poate fi redus electrochimic mai greu decât  $E_3$ .



**Fig. 20.** Voltamogramele ciclice ale extractelor  $E_2$  (65 mg) și  $E_3$  (60 mg) în 12 ml de 0,1 M soluție tampon de fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH=7,2) înregistrate la  $0,1 \text{ V s}^{-1}$  pe electrodul discului de platină (298K), în absența și prezența a  $6,88 \mu\text{M}$  de ADN, respectiv cu electrolitul de suport  $0,1 \text{ M Bu}_4\text{NBF}_4$ .

### 5.2.2. Studiu de interacțiune a moleculei de ADN cu compușii bioactivi prin spectroscopie electronică

Spectrele extractelor  $E_2$  și  $E_3$  în absența și prezența unei concentrații în creștere de soluție stoc de ADN sunt ilustrate în Fig. 26. În domeniul ultraviolet, s-a observat prezența picului corespunzător extractului  $E_2$  la 281 nm, (Fig. 26a) și a picului corespunzător extractului  $E_3$  la 268 nm, (Fig. 26b). De asemenea, la adăugarea ADN-ului, o hipocromicitate semnificativă s-a remarcat fără o schimbare vizibilă privind poziția picului de absorbție maximă care indică în mod clar formarea aducțiilor  $E_2$ -ADN și  $E_3$ -ADN, hipocromicitatea sugerând în continuare în principal proprietatea de legare a compușilor  $E_2$  și  $E_3$  la ADN-ul dublu catenar (Shahabadi ș.a., 2011).

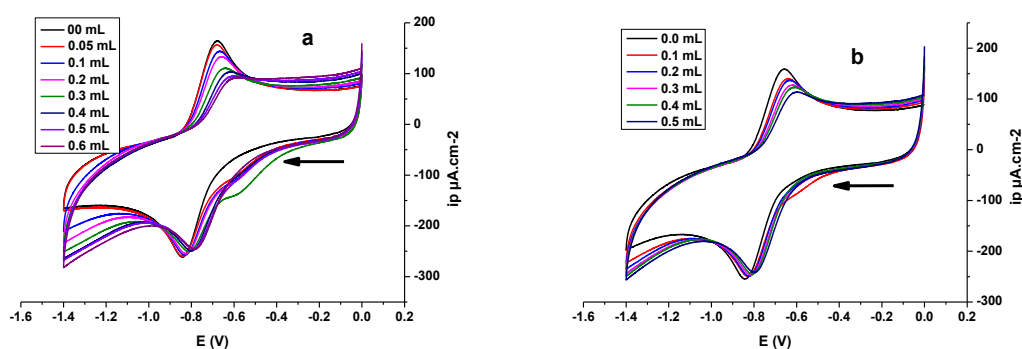


**Fig. 26.** Spectrul UV a 2 mg de  $E_2$  (a) și 6 mg  $E_3$  (b) în prezența unei concentrații crescânde de ADN, în 0,1 M soluție tampon de fosfat ( $KH_2PO_4/K_2HPO_4$ ), la pH = 7,2 și 298K.

### 5.3. Activitatea antioxidantă

#### 5.3.1. Analiza influenței asupra ionului superoxid

Reducerea unui electron din oxigenul molecular ( $O_2$ ) generează radicalul anion superoxid. Speciile reactive de oxigen determină degradarea celulară și conduc la îmbătrânire și diferite boli (Benabdesselam ș.a., 2015). În acest caz, antioxidanții naturali sau sintetici joacă un rol important în prevenirea acestor consecințe. Fig. 28 indică scăderea potențialului picului anodic al voltamogramelor radicalului  $O_2^{\cdot-}$  în prezența concentrațiilor diferite de  $E_2$  și  $E_3$ .



**Fig. 28.** Voltamogramele ciclice înregistrate în DMSO/0,1 M  $Bu_4NBF_4$  saturat cu oxigen pe electrod de Pt în absența și prezența diferitelor concentrații de  $E_2$  (24,5 mg/mL) (a) și  $E_3$  (13 mg/mL) (b) la viteza de scanare 100 mV/s.

Valoarea  $IC_{50}$  a fost definită ca fiind concentrația (mg/mL) probelor care inhibă formarea radicalilor  $O_2^{\cdot-}$  cu 50%. Rezultatele obținute indică faptul că activitatea de eliminare a radicalului  $O_2^{\cdot-}$  a probei  $E_2$  este un pic mai ridicată în comparație cu cea a  $E_3$  și ambele sunt mai mari decât cea a standardului  $\alpha$ -tocoferol.

**Tabel 23.** Valorile  $IC_{50}$  (mg/mL) obținute utilizând activitatea de reducere a radicalului  $O_2^{\cdot-}$ .

Probă	Ecuatie	$R^2$	$IC_{50}$
$E_2$	$y = 3,21057x + 0,08397$	0,918	0,13
$E_3$	$y = 2,3336x + 0,0658$	0,984	0,19
$\alpha$ -tocoferol	$y = 15,99x + 1,37$	0,950	3,04

### 5.3.2. Analiza interacțiunii cu ionul superoxid prin metoda electrochimică

În prezența extractelor  $E_2$  și  $E_3$  potențialele picului anodic al cuplului redox  $O_2 / O_2^{\cdot-}$  s-au deplasat spre valori mai puțin negative. Această deplasare este asociată cu o scădere semnificativă a densității de curent corespunzătoare picului anodic. Scăderea semnificativă a densității de curent se poate datora scăderii concentrației radicalului  $O_2^{\cdot-}$  datorită formării complexelor  $E_2-O_2^{\cdot-}$  și  $E_3-O_2^{\cdot-}$  cu difuzie lentă (mai degrabă datorită consumului de  $O_2^{\cdot-}$  de către  $E_2$  și  $E_3$ ).

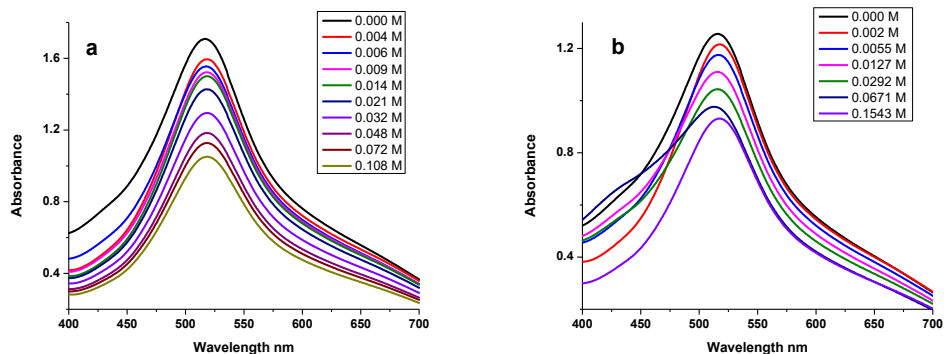
### 5.3.3. Analiza radicalului DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Activitatea antioxidantă a extractelor din macroalga *Fucus spiralis* a fost evaluată utilizând DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Cu cât valoarea  $IC_{50}$  a unei substanțe este mai scăzută, cu atât aceasta are proprietăți antioxidante mai mari (Olugbami ș.a., 2014). Rezultatele obținute din Tabelul 26 arată că  $E_2$  are cea mai mare activitate antioxidantă dintre cele două extracte separate din macroalge. De asemenea, atât  $E_3$ , cât și  $E_2$  au activitate de reducere a radicalului DPPH aproximativ egală cu cea a antioxidantului standard  $\alpha$ -tocoferol.

**Tabel 26.** Valorile  $IC_{50}$  (mg/mL) obținute utilizând activitatea de reducere a radicalului DPPH.

Compus	Ecuatie	$R^2$	$IC_{50}$
$E_2$	$y = 0,114x - 0,0123$	0,997	4,49
$E_3$	$y = 0,1051x - 0,0081$	0,998	4,83
$\alpha$ -tocoferol	$y = 1,5646x + 29,093$	0,996	4,81

Independența absorbanței la adăugarea unei soluții cu concentrații modificate gradual de  $E_2$  și  $E_3$  la soluția DPPH este prezentată în Fig. 33. Figura indică în mod clar scăderea absorbăției în urma adăugării compușilor analizați.



**Fig. 33.** Spectrele de absorbție în UV ale soluției de DPPH (2 mg) în 10 mL acetonitril, în prezența unei concentrații crescânde de  $E_2$  (a) și  $E_3$  (b) în acetonitril, la 298K.

## CAPITOLUL 6

### Valorificarea deșeurii macroalgal

#### 6.1. Teste de biosorbție

##### 6.1.1. Pregătirea și pre-tratarea biosorbentului

Pentru a genera un material cu proprietăți biosorbitive, deșeurii vegetale epuizate în etapele de extracție succesive ale polizaharidelor a fost minim pretratată printr-un ciclu de spălare cu HCl 1M, 6 cicluri de spălare cu apă distilată și uscare.

##### 6.1.2. Caracterizarea chimică a biosorbentului

Pentru a evalua capacitatea de utilizare a deșeurii algal ca biosorbent, s-a determinat concentrația totală a unor metale utilizând stectrometria de absorbție atomică (AAS) după hidroliza cu acidă a materialului vegetal.

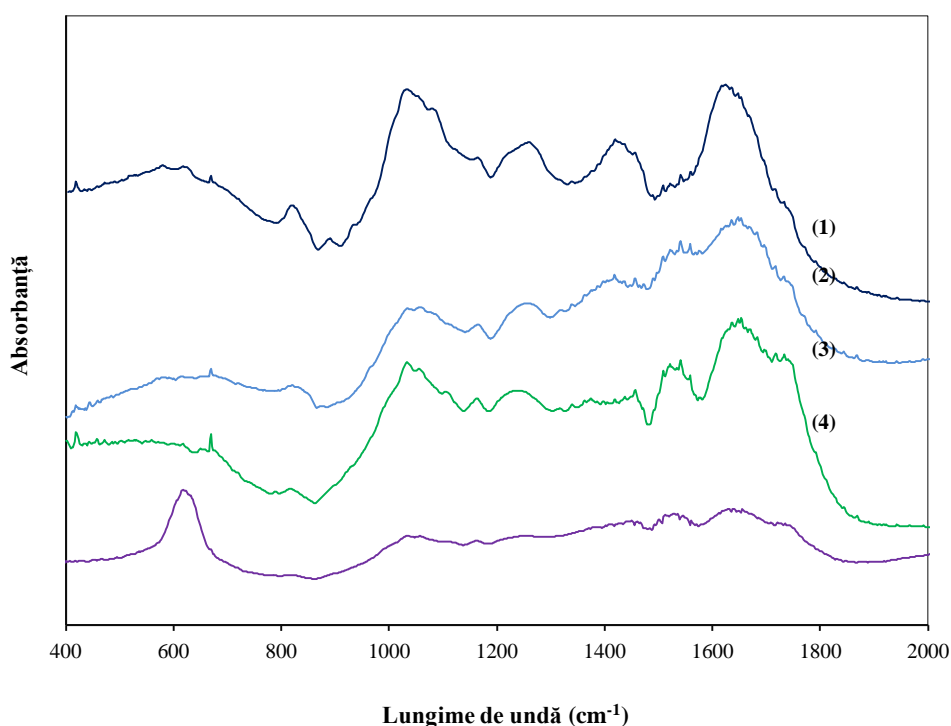
Valorile concentrațiilor obținute pentru metalele analizate sunt prezentate în Tabelul 30. Această evaluare a fost aplicată atât biomasei inițiale de *Fucus spiralis*, cât și deșeurii vegetale pentru a stabili dacă cele două tipuri de materiale vegetale pot fi utilizate în procese de biosorbție neavând în structura lor metale grele.

**Tabel 30.** Analiza comparativă a metalelor din biomasa inițială (*F. spiralis*) și deșeurile algal obținute (valori  $\pm$  deviația standard).

	Biomasă inițială ( <i>F. spiralis</i> )	Deșeu macroalgal
Al (mg/g)	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01
Fe (mg/g)	0,18 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,04
K (mg/g)	30 $\pm$ 4	<0,05
Mg (mg/g)	6,3 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 0,3
Na (mg/g)	27 $\pm$ 3	<2,0
Ca (mg/g)	7 $\pm$ 1	1,4 $\pm$ 0,2
Zn (mg/g)	0,14 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02
Pb ( $\mu$ g/g)	<0,004	<0,004

Determinarea grupărilor funcționale prezente pe suprafața unui biosorbent joacă un rol important în identificarea potențialelor situri de legare pentru sorbat și în mecanismul general de biosorbție. Fig. 35 prezintă spectrele FTIR suprapuse ale biomasei inițiale *F. spiralis*, ale biomasei reziduale obținută după extracția polizaharidelor precum și a biosorbentului pregătit pentru testele de biosorbție.

Toate grupările funcționale identificate sunt rezumate în Tabelul 31.



**Fig. 35.** Spectrele FTIR obținute pentru: (1) biomasa inițială *F. spiralis*, (2) deșeurile de biomasă *F. spiralis* (obținute după extracția polizaharidelor), (3) materialul pregătit ca biosorbent și (4) biosorbent după reținerea ionilor de Pb (II).

**Tabel 31.** Analiza structurală FTIR a biomasei inițiale *Fucus spiralis*, deșeurii algal (biosorbent) și a biosorbentului încărcat cu ioni de Pb.

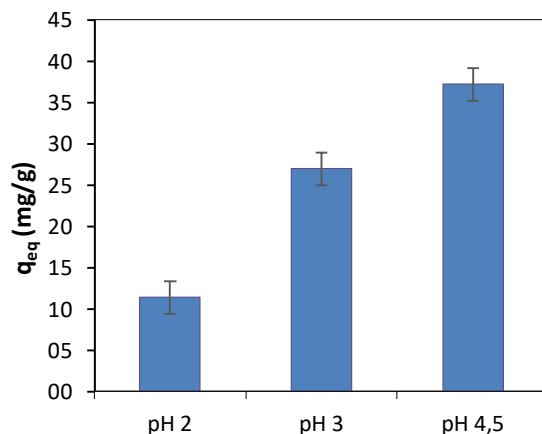
Lungime de undă (cm <sup>-1</sup> )	Grupare funcțională	Lungimea de undă asociată (cm <sup>-1</sup> )		
		Biomasa inițială <i>F.spiralis</i>	Deșeurii algal din <i>F. spiralis</i>	Deșeu algal <i>F. spiralis</i> (cu Pb)
1720-1740	C=O, carboxi-acizi	-	1734	1736
1600-1690	C=O, amidă I	1622	1649	1630
1480-1575	N-H, amidă II	-	1531	1531, 1545, 1512
1400-1500	C=N, azot heteroaromatic	-	1454	1493, 1460
1400-1420	C-N, amidă III	1422	-	1402
1220-1260	S=O, grupări de ester de sulfat	1260	1240	1250
1110-1180	N=S=O, compuși sulfurici	1163	1163	1163
1037-1071	Grupări C-O, C-O-SO <sub>3</sub>	1034	1034	1059, 1036
808	Unități M ale alginatului	889, 820	816	818
640-800	Vibrații de deformare ale grupării NH în afara planului, amidă V	-	669	-
625-767	Vibrații de deformare ale grupării OCN, amidă IV	619	-	621
537-606	Vibrații de deformare ale grupării C=O în afara planului, amidă VI	581	-	-

#### 6.1.4. Influența pH-ului asupra procesului de biosorbție

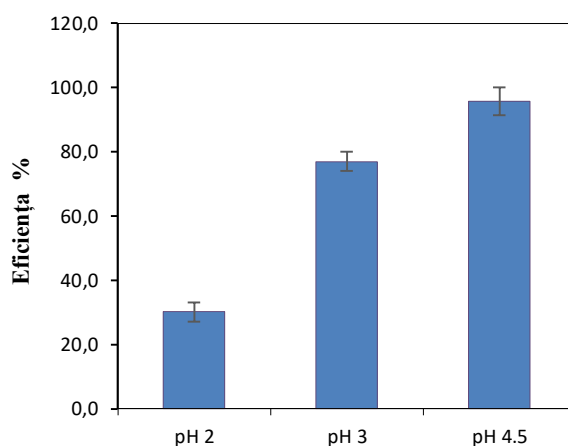
Valoarea pH-ului este un factor important care influențează procesul de biosorbție (Luo ș.a., 2006), întrucât influențează procesul de protonare/deprotonare a grupărilor funcționale și capacitatea acestora de a stabili legături. În prezentul studiu, efectul pH-ului asupra procesului de biosorbție a ionilor de Pb(II) s-a analizat în condiții stabilite anterior, mai exact: 20 mg dm<sup>-3</sup> concentrație inițială a soluției de ioni metalici, temperatură 20 °C și 4 ore timpul de contact. Astfel, pe parcursul realizării experimentelor, influența pH-ului a fost testată la valorile 2,0±0,1, 3,0±0,5,



respectiv  $4,5 \pm 0,5$ . Cea mai mare eficiență de biosorbție ( $96 \pm 4\%$ ) și cea mai mare cantitate de Pb(II) reținută ( $37 \pm 2$  mg/g) au fost determinate la pH 4,5 (Fig. 38, respectiv Fig. 39).



**Fig. 38.** Cantitatea de ioni de Pb(II) reținuți de către biosorbentul obținut din deșeurile de biorafinare utilizând 20 mg/L concentrația soluției și 0,5 g/L doza de biosorbent, diferite valori ale pH-ului și temperatură 20 °C.



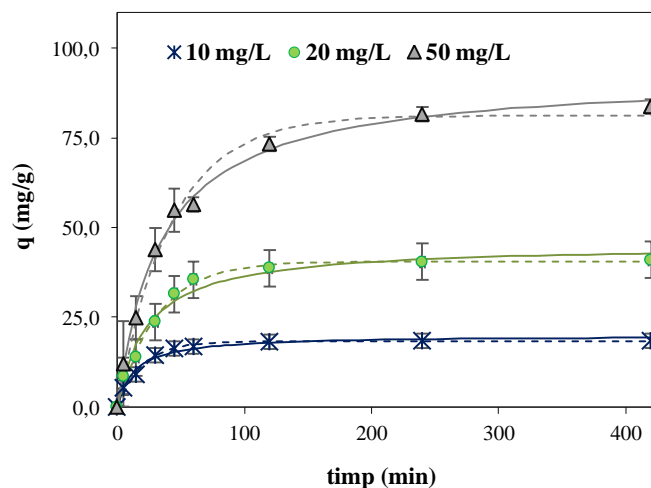
**Fig. 39.** Eficiența de biosorbție a ionilor de Pb(II) de către biosorbentul obținut din deșeurile de biorafinare utilizând 0,5 g/L doza de biosorbent, diferite valori ale pH-ului și temperatură 20 °C.

#### 6.1.5. Modelarea cinetică a procesului de biosorbție

Studiul cinetic s-a realizat utilizând diferite concentrații ale Pb(II): 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L. Soluțiile de ioni de Pb (500 mL) au fost puse în contact cu deșeurile algal (250 mg) sub agitare (350-400 ppm) timp de 7 ore, la 20 °C. Probele au fost extrase la diferite intervale de timp, iar cantitatea de ioni metalici biosorbită s-a evaluat în funcție de timpul de contact și concentrația ionului metalic.

Pentru o concentrație inițială de metal de 10 mg/L, modelele matematice verificate (modelul pseudo1 și modelul de reacție pseudo 2) au generat aceeași valoare pentru factorul de corelație, iar procesul de biosorbție s-a derulat foarte rapid cu o eliminare aproape completă (100%) a Pb(II) în

primele 60 de minute ale experimentului. Momentul de echilibru a fost atins la aproximativ 2 h. În cazul celorlalte concentrații utilizate, timpul necesar pentru atingerea punctului de echilibru a crescut gradual până la o durată de 4h în cazul concentrației inițiale de 50 mg/L. În acest caz s-a obținut o eficiență de îndepărtare a ionilor de Pb(II) de aproximativ 96%.



**Fig. 40.** Influența timpului de contact în reținerea ionilor de Pb(II) utilizând biosorbentul obținut din deșeurile de biorafinare, pentru diferite concentrații ale soluției de metal, pH  $4,5\pm 0,5$ , doza de biosorbent 0,5 g/L, temperatură 20 °C (modelul pseudo I - - -; modelul pseudo II —).

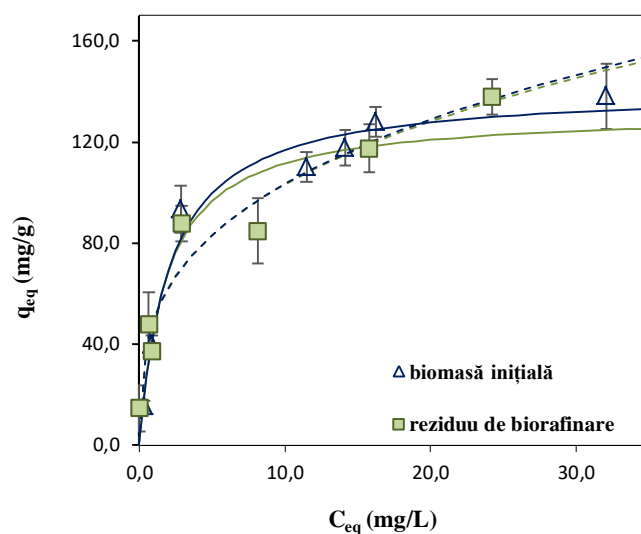
Totodată, modelul de ordin pseudo I se potrivește mai bine pentru calculul vitezei de biosorbție a ionilor de Pb(II) la o concentrație de 10, respectiv 20 mg/L, în timp ce pentru o concentrație de 50 mg/L soluție de Pb, procesul este caracterizat mai eficient prin modelul cinetic de ordin pseudo II.

#### 6.1.6. Modelarea matematică a izotermei de echilibru

Testele experimentale s-au realizat cu 50 mL de soluție de Pb(II), 25 mg biosorbent, la 20 °C, cu pH-ul menținut la valoarea constantă de  $4,5\pm 0,5$ . Concentrațiile ionilor de Pb (II) au fost cuprinse în intervalul 10-100 mg/L. Experimentele realizate pentru analiza izotermei de echilibru s-au aplicat luând în considerare un timp de contact de 6h, mai mult decât timpul de contact necesar determinat în studiul cinetic, pentru a garanta că punctul de echilibru a fost atins pentru fiecare concentrație.

Pe baza coeficienților de corelație calculați ( $R^2$ ), se poate concluziona că biosorbția ionilor de Pb(II) este bine caracterizată de ambele modele. Totuși, modelul Freundlich descrie mai bine procesul de biosorbție a ionilor de Pb(II) de către biosorbentul obținut din deșeurile de biorafinare, iar

modelul Langmuir caracterizează mai eficient biosorbția Pb(II) prin utilizarea biomasei inițiale. Acest lucru poate fi observat și din reprezentarea grafică a rezultatelor experimentale și a celor modelate (Fig. 41).



**Fig. 41.** Izoterma de echilibru pentru biosorbția ionilor de Pb(II) utilizând biosorbentul obținut din deșeurile de biorafinare în comparație cu biomasa inițială (pH  $4,5 \pm 0,5$ ,  $0,5$  g/L doza de biosorbent,  $20$  °C): date experimentale și modelare.

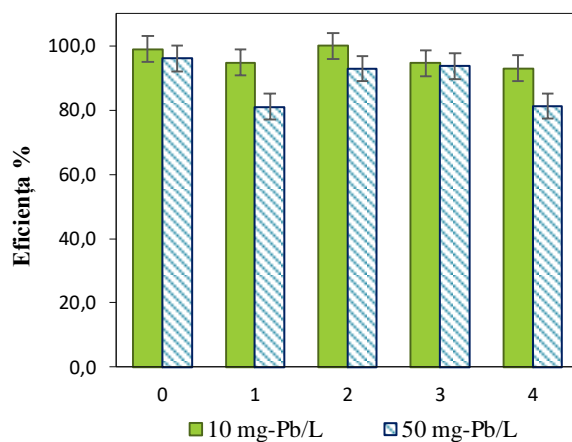
#### 6.1.7. Interferența ionilor interferenți asupra procesului de biosorbție

Speciile care coexistă într-o soluție apoasă pot interfera cu sorbatul țintă în procesul de biosorbție, scăzând sau chiar suprimând capacitatea de biosorbție.

Astfel, în acest studiu, s-a preparat o soluție sintetică care simulează apele uzate din fabricarea bateriilor la două concentrații diferite ale soluției de Pb(II) ( $10$  mg/L și  $50$  mg/L). Pentru a evalua efectul competitiv individual și combinat al acestor compuși coexistenți asupra biosorbției plumbului, s-au preparat soluții bicomponente (1-3) și multicomponente (4) de Pb(II) conținând  $10$  mg-Pb/L și respectiv  $50$  mg-Pb/L și următorii ioni competitivi sau interferenți: (1)  $75$  mg/L de ioni de calciu (furnizați prin dizolvarea azotatului de calciu), (2)  $280$  mg/L de ioni sulfat (furnizat prin adăugare de acid sulfuric), (3)  $12$  mg/L de ioni de magneziu (din azotat de magneziu) și (4)  $75$  mg/L de ioni de calciu,  $280$  mg/L de ioni sulfat și  $12$  mg/L de ioni de magneziu.

Rezultatele obținute sunt ilustrate în Fig. 42. După cum se poate observa, plumbul este practic îndepărtat din soluțiile de  $10$  mg/L, iar efectul ionilor competitori, la această concentrație, este practic inexistent. Cea mai mică eficiență de reținere a fost calculată pentru soluția multicomponentă ( $93 \pm 2\%$ ). În ceea ce privește soluțiile de  $50$  mg-Pb/L, calciul este ionul cu cea mai mare interferență, fiind responsabil pentru o scădere a procentului de îndepărtare de la  $96 \pm 2\%$  (în experimentul de control) la  $81 \pm 2\%$ . Efectul  $Ca^{2+}$  a fost mai pronunțat decât al  $Mg^{2+}$ , deoarece este

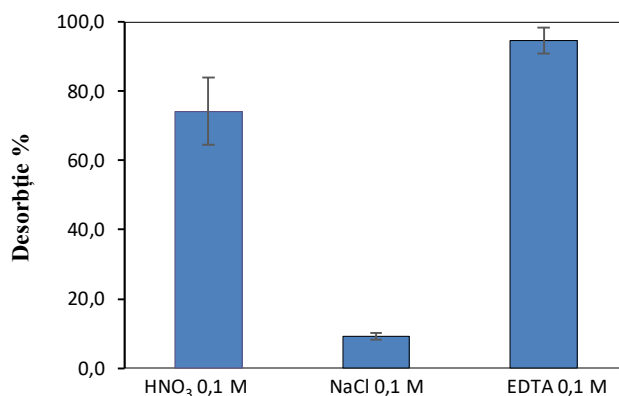
prezent la o concentrație mai mare și, de asemenea, datorită afinității mai mari a materialului algal pentru ioni de calciu (Santos ș.a., 2018).



**Fig. 42.** Influența ionilor prezenți în mod obișnuit în apele uzate din industria bateriilor asupra reținerii Pb(II) (la pH=4,  $Pb^{2+}$  în mediu apos reducător și  $PbSO_4$  în mediu apos oxidant) de către biosorbentul obținut din deșeurile de biorafinare (pH  $4,5 \pm 0,5$ , S/L=0,5 g/L, 20 °C, concentrații de 10, respectiv 50 mg/L ale soluției de Pb(II): (0) experimentul de control; (1) 75 mg- $Ca^{2+}$ /L, (2) 280 mg- $SO_4^{2-}$ /L, (3) 12 mg- $Mg^{2+}$ /L și (4) soluția multi-component).

## 6.2. Teste de sorbție-desorbție

În această lucrare, după efectuarea testelor de biosorbție, biosorbentul obținut din deșeurile de biorafinare a fost utilizat în testele de desorbție pentru a analiza gradul de reciclabilitate al biosorbentului și potențialul de recuperare al metalului studiat.



**Fig. 43.** Capacitatea de desorbție a celor trei eluenți aplicați pentru recuperarea ionilor de Pb(II) din biosorbentul obținut din deșeurile de biorafinare.

Capacitatea de desorbție a biosorbentului obținut din deșeurile de biorafinare saturat cu 100 mg/L soluție de Pb(II), a fost testată folosind un raport solid/lichid de 2 g/L și s-a analizat după agitare timp de 15 ore. După cum indică graficul din Fig. 43, cea mai bună recuperare a plumbului sorbit a fost obținută prin tratare cu soluție de EDTA 0,1 M ( $95 \pm 4\%$ ), urmat de tratare cu soluție de HNO<sub>3</sub> 0,1 M ( $74 \pm 10\%$ ).

## CAPITOLUL 7.

### Considerații privind sustenabilitatea biorafinării algei brune

#### *Fucus spiralis*

Conform definiției sustenabilității, pentru ca un proces să fie considerat sustenabil, trebuie să fie îndeplinite concomitent trei componente principale: sustenabilitatea economică, sustenabilitatea de mediu, respectiv cea socială (Purvis, 2018).

#### 7.1. Sustenabilitatea proceselor de obținere a biomasei macroalgei marine

Asigurarea sustenabilității din punct de vedere economic, cât și al impactului minim asupra mediului pentru conversia biomasei macroalgale în sistem de biorafinare, pornește de la modalitatea de obținere a acestei resurse acvatice. Astfel, sursele de macroalge marine disponibile sunt cele provenite din apa mărilor și oceanelor și aduse în mod natural (valuri și marea), respectiv cele cultivate. Cantitățile de macroalge marine ce se dezvoltă natural nu pot asigura însă sustenabilitatea economică a industriilor asociate (Zhang ș.a., 2021). Soluția principală se regăsește așadar în obținerea biomasei macroalgale prin cultivare. De altfel, în prezent, resursele de macroalge marine utilizate pentru separarea de bioproduse și biocombustibili sunt în marea lor majoritate cele produse prin procese de cultivare. Pe de altă parte însă, majoritatea studiilor realizate privind posibilitățile de valorificare a biomasei macroalgale au fost efectuate cu resurse spontane, colectate de la malul mărilor și oceanelor, sau din cantitățile eșuate pe plaje.

Astfel, un aspect important ce trebuie abordat pentru a putea formula concluzii privind sustenabilitatea utilizării macroalgei marine *Fucus spiralis* în procese de biorafinare constă în evaluarea **serviciilor de ecosistem** pe care le asigură această specie în mediu marin, precum și influența cultivării acesteia asupra integrității serviciilor furnizate de ecosistemul în care se regăsește. În orice ecosistem, fiecare organism are un rol bine definit, strâns legat de celelalte componente ale mediului de proveniență. Pe parcursul ciclului lor de viață, organismele vii asigură o serie de funcții, de avantaje, cunoscute sub numele de servicii de ecosistem.

Atât pentru sustenabilitatea ecosistemului în care urmează să fie cultivată o specie de macroalgă marină, cât și pentru menținerea viabilității speciei de algă cultivată, trebuie îndeplinite o serie de condiții. Astfel, ca și în cazul altor specii de macroalge marine, pentru sustenabilitatea cultivării macroalgei *Fucus spiralis*, trebuie să se analizeze speciile de plante acvatice, animale nevertebrate și vertebrate marine, dar și specii de păsări care pot depinde pentru supraviețuire de existența macroalgei.

Întrucât specia *Fucus spiralis* este o specie de algă marină de talie mică ce se dezvoltă în proximitatea zonei costiere și depinde de existența substratului marin, reziliența acestei specii în raport cu activitățile antropice este necesară a fi analizată cu atenție. Speciile genului *Fucus* sunt expuse impactului antropic din zonele marine costiere, fiind sensibile față de eutrofizare.

Un alt aspect ce ar trebui analizat este **impactul biorafinării algelor asupra biodiversității**, considerând faptul că biodiversitatea a fost extrem de afectată de dezvoltarea industrială (Cabral ș.a., 2016).

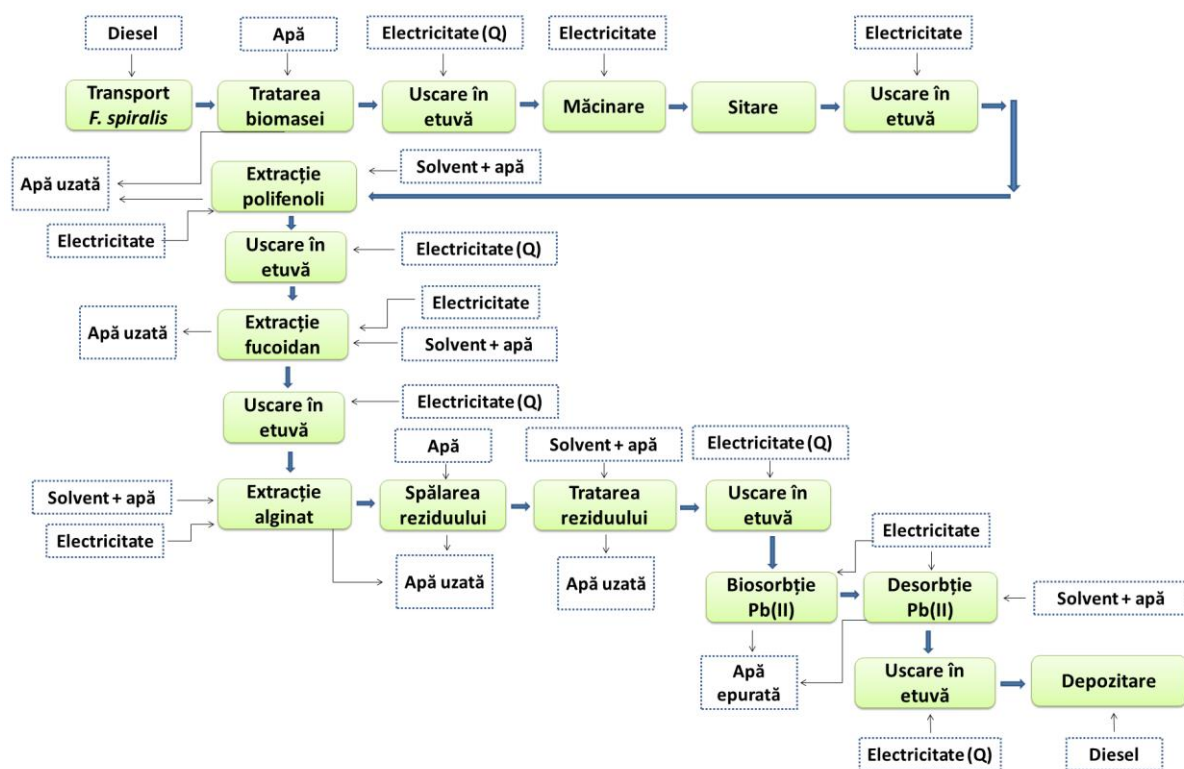
Un alt aspect important ce necesită o analiză amănunțită este reprezentat de **impactul schimbărilor climatice asupra dezvoltării și distribuției geografice a speciilor de macroalge marine**. În cazul algei brune *Fucus spiralis*, salinitatea scăzută a mărilor și oceanelor determinată de topirea ghețarilor poate afecta supraviețuirea acestei specii în anumite zone. De asemenea, creșterea temperaturii apei, chiar și timp de doar câteva zile, poate influența negativ vitalitatea acestei alge (Cairrao ș.a., 2009).

În afară de considerațiile ce rezultă din studii asupra biodiversității și a serviciilor de ecosisteme, în contextul evaluării sustenabilității obținerii biomasei algale trebuie consemnate și **studii de evaluare a ciclului de viață**. Astfel, deși majoritatea studiilor existente privind cuantificarea impactului de mediu prin metodologia LCA cuprind ca limite de sistem analizat atât producerea (cultivarea) macroalgelor marine, cât și conversia acestei biomase, în cazul cercetărilor realizate de van Oirschot ș.a., (2017), s-a evaluat impactul de mediu exclusiv pentru cultivarea macroalgelor, unitatea funcțională aleasă fiind cea de producere a unei cantități de algă uscate care să conțină o tonă de proteine.

## 7.2. Sustenabilitatea procesării în sistem de biorafinare a biomasei algale

Obiectivul general al aplicării metodologiei LCA în studiul curent este evaluarea impactului asupra mediului generat de etapele de biorafinare a biomasei macroalgei *Fucus spiralis* pentru obținerea de bioproduse și utilizarea biomasei reziduale rezultate ca biosorbent pentru bioremedierea apelor contaminate cu Pb(II).

Limitele sistemului analizat sunt redate în Fig. 47 și includ procese ce au ca scop prelevarea biomasei algale, pre-tratarea acesteia, procese de extracție pentru obținerea compușilor polifenolici și a polizaharidelor principale (fucoidan și alginat), procese de sorbție-desorbție a ionilor de Pb(II), precum și conversia finală a deșeurii vegetale obținut după procesele de bioremediere. Astfel, sistemul evaluat este unul de tip “cradle to grave” ce presupune evaluarea impactului de mediu de la etapa de obținere a produselor până la cea de depozitare finală a deșeurilor.



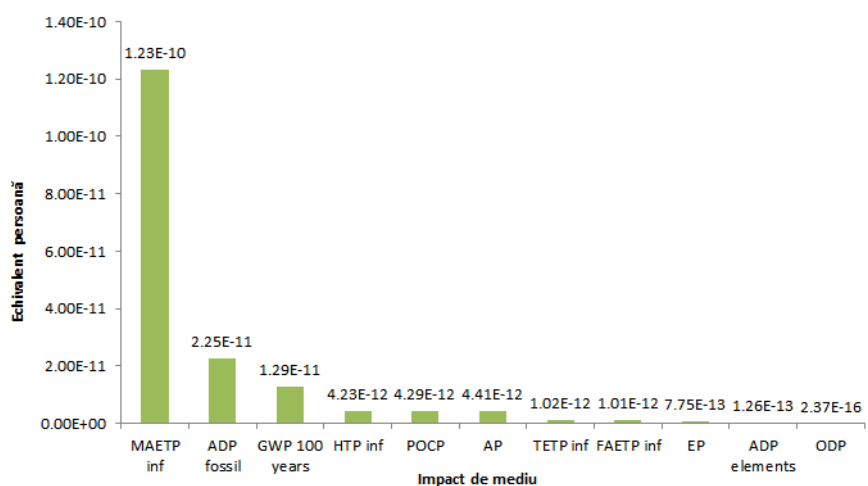
**Fig. 47.** Limitele sistemului de biorafinare a macroalgei marine *Fucus spiralis* pentru obținerea de compuși ce pot fi valorificați în industrie și folosirea deșeurii vegetale rezultat în procese de sorbție/desorbție.

Rezultatele obținute privind analiza LCA pentru biorafinarea macroalgei brune *Fucus spiralis* (Fig. 48) indică faptul că cel mai mare impact de mediu poate fi generat în cazul categoriei ecotoxicitate acvatică marină (MAETP inf) ( $1.23E-10$  echiv. pers.), aceasta fiind urmată de valoarea cuantificată pentru categoria epuizarea resurselor abiotice fosile (ADP fossil) ( $2.25E-11$  echiv. pers.).

După cum se arată în Fig. 50, cea mai însemnată contribuție la impactul de mediu total cuantificat este reprezentată de consumul de energie în cazul majorității proceselor din cadrul sistemului de biorafinare. Dintre procesele în care s-a realizat consum energetic, cea mai mare valoare a fost identificată pentru procesul de pre-tratare a biomasei algale. Cel mai mic consum energetic a fost calculat în cazul proceselor de sorbție și desorbție. De asemenea, valorile

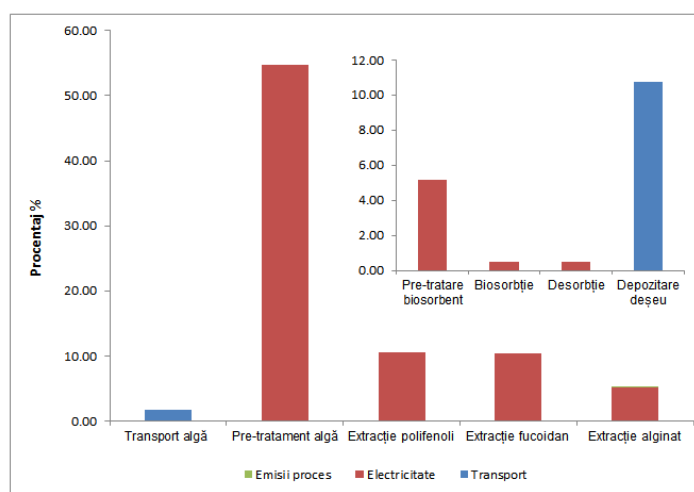
procentuale obținute pentru emisiile de proces sunt foarte scăzute. În ceea ce privește contribuția consumului de combustibili pentru transport aceasta are o pondere mult mai mică decât cea a consumului de electricitate. În cazul procesului de depozitare a deșeurilor algal, consumul de diesel este mai mare însă decât cel al electricității.

În cazul contribuției fiecărui proces în funcție de categoria de impact de mediu analizată (Fig. 51), se poate remarca faptul că pentru categoria de impact epuizarea ozonului stratosferic (ODP, steady state) impactul de mediu este determinat în cea mai mare măsură de pre-tratarea biomasei și operația de extracție pentru obținerea polifenolilor și a fucoidanului.



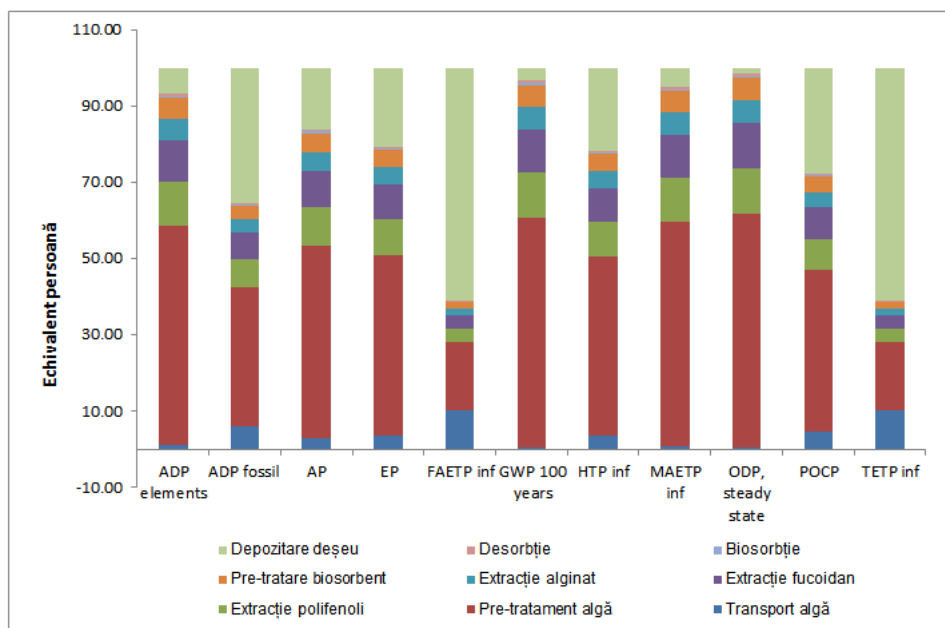
**Fig. 48.** Impactul asupra mediului al biorafinării macroalgei brune *Fucus spiralis* în funcție de categoriile de impact incluse în metodologia CML 2015.

**ADP fossil** - epuizarea resurselor abiotice fosile, **MAETP inf** - ecotoxicitate acvatică marină, **POCP** - potențialul de formare de ozon fotochimic, **GWP 100 years** - potențialul de încălzire globală, **HTP inf** - toxicitate umană, **AP** - potențialul de acidifiere, **FAETP inf** - ecotoxicitate acvatică (ape dulci), **EP** - potențialul de eutrofizare, **TETP inf** - ecotoxicitate terestră, **ADP elements** - epuizarea resurselor abiotice element și **ODP, steady state** - epuizarea ozonului stratosferic



**Fig. 50.** Contribuția procentuală a electricității, transportului, respectiv emisiilor de proces la impactul total (metoda CML2015) a biorafinării macroalgei marine *Fucus spiralis*.





**Fig. 51.** Profilul de mediu al sistemului de biorafinare a macroalgei marine *Fucus spiralis* (metoda CML 2015).

**ADP fossil** - epuizarea resurselor abiotice fosile, **MAETP inf** - ecotoxicitate acvatică marină, **POCP** - potențialul de formare de ozon fotochimic, **GWP 100 years** - potențialul de încălzire globală, **HTP inf** - toxicitate umană, **AP** - potențialul de acidifiere, **FAETP inf** - ecotoxicitate acvatică (ape dulci), **EP** - potențialul de eutrofizare, **TETP inf** - ecotoxicitate terestră, **ADP elements** - epuizarea resurselor abiotice element și **ODP, steady state** - epuizarea ozonului stratosferic

## CONCLUZII GENERALE

Consumul accelerat al resurselor de pe planetă pentru producție și dezvoltarea industrială a condus la o criză de mediu aflată în plină desfășurare. Astfel, un obiectiv important îl reprezintă managementul durabil al resurselor ce include identificarea de noi resurse cât mai ales valorificarea sustenabilă a acestora.

Macroalgele marine reprezintă o resursă de biomasă care poate fi valorificată prin diferite modalități precum extracția de compuși bioactivi, utilizare în bioremedierea factorilor de mediu și producerea de biocombustibili. Biomasa macroalgală are așadar un potențial major de aplicare în diverse industrii, precum și de reducere a carbonului din atmosferă.

Cele mai multe studii de până acum s-au axat pe analiza obținerii de biocombustibili și bioenergie din macroalgele marine, cu un accent mult mai mic pe obținerea de bioproduse, exclusiv sau în formă integrată.

Biorafinarea macroalgelor marine reprezintă un domeniu de cercetare foarte puțin abordat în literatura științifică, o direcție de studiu cu ample posibilități de explorare.

În prezentul studiu, inițial s-a analizat preliminar conținutul mai multor tipuri de alge marine: brune (*Ascophyllum nodosum*, *Fucus spiralis* și *Cystoseira barbata*), verzi (*Ulva lactuca*) și roșii (*Ceramium rubrum*). Determinarea compoziției chimice a acestora au facilitat selectarea unei specii cu potențial de biorafinare. S-a avut în vedere separarea de compuși cu proprietăți bioactive, în principal compuși ce au deja utilitate demonstrată și aplicată în industrie. Astfel, s-au aplicat succesiv extracții ale compușilor polifenolici dar și a unor polizaharide specifice precum fucoidanul și alginatul și în final, deșeurile solide obținute după separarea acestora s-au utilizat ca biosorbent pentru epurarea apelor uzate încărcate cu ioni de Pb(II).

Pentru izolarea compușilor de interes s-au utilizat atât metode convenționale adaptate, cât și tehnici avansate, anume extracția asistată de ultrasunete (UAE). S-au obținut cu succes trei tipuri de extracte (E1 polifenolic, E2 cu fucoidan și E3 alginat) care au fost evaluate chimic și biologic. Analiza cantitativă a extractului etanolic E1 a stabilit prezența unui conținut total de polifenoli (TPC) de  $3,4 \pm 0,0$  mg GAE g<sup>-1</sup>, randamentul de extracție fiind de  $14,0 \pm 0,0\%$ . Analiza calitativă realizată prin metoda HPTLC a facilitat identificarea spectrului de compuși polifenolici existenți în biomasa algei *Fucus spiralis*. De asemenea, s-a înregistrat prin testul cu DPPH o capacitate inhibitorie a radicalului de 22,2%, valoare asemănătoare cu cele menționate în literatura științifică în cazul altor extracte polifenolice din alge brune.

Separarea extractului cu fucoidan din alga brună *Fucus spiralis* s-a realizat cu o valoare a randamentului de extracție de  $1,35 \pm 0,1\%$ . Prezența polizaharidei în extractul obținut s-a identificat prin analiză elementală, spectroscopie IR și spectroscopie RMN. Conținutul de sulf, un indicator al structurilor chimice specifice fucoidanului a putut fi observat prin intermediul tuturor celor 3 metode de caracterizare chimică. Pe baza spectrului IR s-au observat gruparea funcțională sulfat S=O ( $1226\text{ cm}^{-1}$ ) și cea a sulfonamidelor N=S=O ( $1136\text{ cm}^{-1}$ ) și C-O-SO<sub>3</sub> ( $1024\text{ cm}^{-1}$ ). Totodată, analiza elementală a identificat un conținut de sulf de  $0,4 \pm 0,0\%$ . În ceea ce privește spectrul RMN, s-au evidențiat în acest caz resturi de 2-mono-O-sulfatată-L-fucopiranoză conectate α-3 (5,337 ppm), α-L-Fucoză (4,8 ppm) și resturi de 2-mono-O-sulfatată L-fucopiranoză conectate prin poziția 4 (3,68-3,88 ppm).

Randamentul obținut în cazul extracției alginatului a înregistrat o valoare mult mai mare decât în cazul celorlalte două bioproduse, anume  $47,0 \pm 1,0\%$ . Ca și în cazul fucoidanului, caracterizarea chimică a extractului s-a realizat prin spectroscopie IR, spectroscopie RMN și analiză elementală. Rezultatele obținute au identificat prezența grupărilor funcționale specifice alginatului.

Astfel, pe baza spectrului IR s-au evidențiat unitățile guluronice ( $1017\text{ cm}^{-1}$ ) și unitățile manuronice ( $872$ , respectiv  $812\text{ cm}^{-1}$ ), iar spectrul RMN a permis identificarea acidului  $\alpha$ -L-guluronic ( $5,03\text{ ppm}$ ), a unităților de acid  $\beta$ -D-manuronic ( $4,62\text{ ppm}$ ) și de acid guluronic ( $4,45$ , respectiv  $4,3\text{ ppm}$ ).

Proprietățile bioactive ale polizaharidelor obținute din biomasa algei *Fucus spiralis* au fost analizate în privința activității antifungice și a celei anticancer. Activitatea antifungică s-a determinat utilizând ca tulpină test specia *Aspergillus flavus*. Extractele obținute din alga brună au fost aplicate în concentrații cuprinse între  $50 - 0,195\text{ mg/mL}$  ( $5 - 0,018\%$ ). De asemenea, s-a utilizat substanța antifungică fluconazol ca martor dar și pentru a analiza efectul de potențare a activității antifungice a extractelor algale, la diferite concentrații cuprinse între  $250 - 1,9\text{ }\mu\text{g/mL}$ . Experimentele efectuate au arătat că alginatul are efect antifungic ( $\text{CMI}=12,5\text{ mg/mL}$ ), însă fucoidanul determină dezvoltarea ciupercii. În ceea ce privește utilizarea concomitentă a fluconazolului cu alginatul, rezultatele au arătat o acțiune sinergică astfel încât valoarea CMI a fluconazolului a scăzut de până la 16 ori.

Analiza interacțiunii dintre ADN și cele două polizaharide algale studiate prin voltametrie ciclică a evidențiat o interacțiune de tip electrostatic în cazul fucoidanului și interacțiune intercalată între alginat și ADN. Valorile privind dimensiunea siturilor de legare a celor două extracte confirmă de asemenea tipul de interacțiune al acestora cu macromolecula de ADN. Totodată, valorile mai mici ale coeficienților de difuzie indică formarea aducțiilor ADN-E<sub>2</sub> și ADN-E<sub>3</sub> cu mase moleculare mari comparativ cu cele ale celor două polizaharide. Formarea aducțiilor a fost confirmată și prin spectroscopie electronică. Valorile obținute pentru constanta de legare și energia liberă prin cele două metode aplicate sunt similare, confirmând observațiile privind modul de interacțiune dintre cele două extracte algale și ADN.

Activitatea antioxidantă a extractelor obținute a fost determinată prin două modalități: testul cu DPPH și testul cu ionul superoxid. Rezultatele studiului interacțiunii cu radicalul DPPH au arătat o activitate antioxidantă foarte bună, mai mare chiar decât a standardului  $\alpha$ -tocoferol. De asemenea, activitatea antioxidantă a extractului ce conține fucoidan este mai mare decât cea a extractului cu alginat. Activitatea de eliminare a ionului superoxid este mai mare în cazul extractului cu fucoidan decât în cazul celui cu alginat, iar ambele au o valoare mai mare a activității antioxidante decât cea a standardului  $\alpha$ -tocoferol.

Biosorbentul obținut din deșeurile algal rezultate din etapa de biorafinare primară, după aplicarea unui pre-tratament compus din cicluri de spălare cu apă distilată și cicluri de spălare cu HCl 1M, a fost utilizat în teste de biosorbție recuperativă a ionilor de Pb(II). În acest sens s-au concluzionat următoarele:

Testele de caracterizare chimică au arătat că biosorbentul nu conține concentrații de metale grele ce pot interfera cu procesul de biosorbție. Principalii ioni metalici identificați în deșeurile algal sunt K, Na și Ca. În ceea ce privește rezultatele spectroscopiei IR acestea au indicat prezența grupărilor funcționale S=O ( $1220-1260\text{ cm}^{-1}$ ) caracteristice fucoidanului și ale unităților M ale alginatului ( $889\text{ cm}^{-1}$  și  $820\text{ cm}^{-1}$ ), precum și picuri caracteristice structurilor proteice precum gruparea C=O a amidei I ( $1649\text{ cm}^{-1}$ ), grupări ce pot juca un rol în biosorbția ionilor de Pb(II). Condițiile optime de utilizare a biosorbentului pentru îndepărtarea unei concentrații de Pb(II) de  $20\text{ mg/L}$  au fost determinate ca fiind pH  $4,5\pm 0,5$ , doza de biosorbent  $0,5\text{ g/L}$ , timp de contact  $4\text{ h}$ .

Efluenții proveniți din industrie conțin în general mai multe tipuri de ioni competitori. Astfel, s-au realizat teste de interferență a altor ioni asupra îndepărtării ionilor de Pb(II) (la două concentrații ale soluției de Pb(II) de  $10\text{ mg/L}$  și  $50\text{ mg/L}$ ) utilizând ape uzate sintetice cu o compoziție ce simulează pe cele rezultate la fabricarea bateriilor. În cazul concentrației de  $10\text{ mg/L}$  Pb s-a observat faptul că ioni competitori din compoziția efluentului nu au avut un efect de interferență. În cazul concentrației de  $50\text{ mg/L}$ , eficiența de îndepărtare a scăzut de la  $96\pm 2\%$  la  $81\pm 2\%$ , calciul având cea mai mare influență dintre ioni prezenți în apa uzată. Experimentul realizat arată că îndepărtarea ionilor de Pb(II) se poate realiza cu performanță ridicată și în soluție multi-componentă, aspect important pentru scalarea procesului de bioremediere la nivel pilot, și ulterior la nivel industrial.

Studiul de recuperare a ionilor de Pb reținuți de către biosorbent s-a efectuat în două cicluri de sorbție - desorbție. În urma celui de-al doilea ciclu eficiența de desorbție a scăzut considerabil, de la  $95 \pm 4\%$  la  $56\%$ . Eficiența procesului de biosorbție la cel de-al doilea ciclu a fost de asemenea cu aproximativ jumătate mai mică decât valoarea obținută în primul ciclu. Astfel, pe baza performanțelor obținute s-a concluzionat că aplicarea unui al treilea ciclu nu este justificată considerând totodată și consumul de resurse implicat.

O contribuție semnificativă a reprezentat-o analiza sustenabilității obținerii și valorificării biomasei macroalgelor marine. Astfel, s-a analizat prin metodologia LCA impactul de mediu al aplicării proceselor incluse în sistemul de biorafinare proiectat. Prin analiza limitelor de sistem de tip "cradle-to-grave" și utilizarea metodei CML au fost analizate 11 categorii de impact. Datele obținute au arătat cel mai mare impact de mediu în cazul categoriilor: potențial de ecotoxicitate acvatică marină (MAETP inf) ( $1,23\text{E}-10$  echiv. pers.), epuizarea resurselor abiotice fosile (ADP fossil) ( $2,25\text{E}-11$  echiv. pers.) și potențialul de încălzire globală pe 100 de ani (GWP 100 years) ( $1,29\text{E}-11$  echiv. pers.). În ceea ce privește operațiile și procesele din cadrul sistemului de biorafinare studiat, cea mai mare contribuție s-a datorat procesului de pre-tratare a macroalgei

(biomasă inițială), iar cea mai scăzută a fost identificată în cazul proceselor de separare a compușilor cu proprietăți bioactive și a proceselor de sorbție-desorbție.

Studiul sustenabilității obținerii biomasei de *Fucus spiralis* a evidențiat necesitatea cultivării macroalgei, precum și a macroalgelor marine în general, pentru a asigura necesarul de procesare concomitent cu evitarea degradării ecosistemelor existente. Totodată, este importantă realizarea de studii de impact asupra biodiversității ecosistemelor în care este vizată cultivarea macroalgei. Considerând condițiile de dezvoltare a macroalgei *Fucus spiralis*, s-a concluzionat faptul că aceasta necesită zone de coastă cu o transparență și calitate ridicată a apei, cu temperaturi mai scăzute. În ceea ce privește aspectul mitigării schimbărilor climatice în cazul cultivării speciei *Fucus spiralis*, se estimează o contribuție redusă în acest sens.

**Prin urmare, biomasa macroalgei marine brune *Fucus spiralis* poate fi utilizată cu succes și într-un mod sustenabil în sisteme de biorafinare doar dacă sunt rezolvate aspecte privind cultivarea acestora în cantități suficiente care să nu afecteze serviciile de ecosistem pe care acest tip de algă le asigură.**

## ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ

Rezultatele obținute de-a lungul celor trei ani de activitate de cercetare științifică au fost prezentate și concretizate prin:

- Elaborarea a 5 articole publicate în reviste cotate ISI, elaborarea a 2 articole publicate în reviste CNCSIS (B+);
- Participarea la 3 conferințe internaționale (cu o comunicare orală și două postere);
- Efectuarea unui stagiu de cercetare de 8 luni la Universitatea din Porto, Portugalia-Facultatea de Inginerie a Universității din Porto, Laboratorul de Inginerie a Separării și Reacțiilor–Laboratorul de Cataliză și Materiale (LSRE-LCM) (noiembrie 2016-iunie 2017), în cadrul programului Erasmus+.

### Lista lucrărilor publicate

#### 1. Lucrări științifice publicate în reviste cotate ISI

Gabriela Ungureanu, **Catalina Filote**, Sílvia C.R. Santos, Rui A.R. Boaventura, Irina Volf, Cidália M.S. Botelho, Antimony oxyanions uptake by green marine macroalgae, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(3), 3441-3450 (2016) **(IF 7.968)**.

**Catalina Filote**, Gabriela Ungureanu, Rui Boaventura, Sílvia Santos, Irina Volf, Cidália Botelho, Green macroalgae from the Romanian coast of Black Sea: Physico-chemical characterization and future perspectives on their use as metal anions biosorbents, *Process Safety and Environmental Protection*, 108, 34-43, <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.06.002> (2017) (**IF 7.926**).

**Catalina Filote**, Irina Volf, Sílvia C.R. Santos, Cidália M.S. Botelho, Bioadsorptive removal of Pb(II) from aqueous solution by the biorefinery waste of *Fucus spiralis*, *Science of The Total Environment*, 648, 1201-1209, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.210> (2019) (**IF 10.754**).

**Catalina Filote**, Sílvia C.R. Santos, Valentin I. Popa, Cidália M.S. Botelho, Irina Volf, Biorefinery of marine macroalgae into high-tech bioproducts: a review, *Environmental Chemistry Letters*, 19, 969-1000, <http://doi.org/10.1007/s10311-020-01124-4> (2021) (**IF 13.615**)

**Catalina Filote**, Elhafnaoui Lanez, Valentin I. Popa, Touhami Lanez, Irina Volf, Characterization and bioactivity of polysaccharides separated through a (sequential) biorefinery process from *Fucus spiralis* brown macroalgae, *Polymers*, 14, 4106. <https://doi.org/10.3390/polym14194106> (2022) (**IF 4.967**).

Lucrările publicate în reviste cotate ISI aparțin fluxului principal de publicații toate fiind încadrate în cuartila Q1.

## 2. Lucrări științifice publicate în reviste CNCSIS(B+)/include în BDI

**Cătălina Filote**, Oana Teodora Ciupercă, Irina Volf, Qualitative assessment of polyphenols extracted from *Fucus spiralis* biomass through high-performance thin-layer chromatography, *BULETINUL INSTITUTULUI POLITEHNIC DIN IAȘI* publicat de Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași, Volumul 67 (71), Numărul 2, Secția Chimie și Inginerie Chimică (2021).

## 3. Lucrări științifice publicate în volumele conferințelor

**Catalina Filote**, Valentin I. Popa, Irina Volf, Marine algae biomass potential for obtaining biofuels and bioproducts, *Strategic Sinergies in the Black Sea Basin, Proceedings of the XII<sup>th</sup> Edition of the Annual Conference “The Academic Days of A.T.S.R.”*, 6-7 October, Constanta, Romania, 2017, pp. 452-457, (2017).

**Comunicări la conferințe internaționale și naționale**

**Catalina Filote**, Irina Volf, Cidália Botelho, Sílvia Santos, Biosorption of Pb(II) by *Fucus spiralis* waste obtained through biorefinery processing, 18<sup>th</sup> European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC 2017) – Chemistry towards an infinite environment, November 26-29, Porto, Portugal (2017).

**Catalina Filote**, Valentin I. Popa, Irina Volf, Marine algae biomass potential for obtaining biofuels and bioproducts, Strategic Sinergies in the Black Sea Basin, Proceedings of the XII<sup>th</sup> Edition of the Annual Conference “The Academic Days of A.T.S.R.”, 6-7 October, Constanta, Romania, pp. 452-457, (2017).

**Catalina Filote**, Sílvia Santos, Irina Volf, Cidália Botelho, *Laminaria sp.* and *Fucus spiralis* marine macroalgae as potential biomass sources for biorefinery processing 2<sup>nd</sup> Doctoral Congress of Engineering, Faculty of Engineering, University of Porto, June 8-9, Porto, Portugal (2017).

## Bibliografie selectivă

Ale MT, Maruyama H, Tamauchi H, Mikkelsen JD, Meyer AS (2011) Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. *Mar Drugs* 9: 2605–2621. <https://doi.org/10.3390/md9122605>

Arshad N, Farooqi SI (2018) Cyclic voltammetric DNA binding investigations on some anticancer potential metal complexes: a review. *Appl Biochem Biotechnol* 186:1090-1110. <http://doi.org/10.1007/s12010-018-2818-z>

Atashrazm F, Lowenthal RM, Woods GM, Holloway AF, Dickinson JL (2015) Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Mar Drugs* 13(4): 2327–2346. <http://doi.org/10.3390/md13042327>

Balboa EM, Rivas S, Moure A, Domínguez H, Parajó JC (2013) Simultaneous extraction and depolymerization of fucoidan from *Sargassum muticum* in aqueous media. *Mar Drugs* 11: 4612–4627. <https://doi.org/10.3390/md11114612>

Balboa EM, Moure A, Domínguez H (2015) Valorization of *Sargassum muticum* biomass according to the biorefinery concept. *Mar Drugs* 13:3745–3760. <https://doi.org/10.3390/md13063745>

Barbosa M, Lopes G, Andrade PB, Valentão P (2019) Bioprospecting of brown seaweeds for biotechnological applications: Phlorotannin actions in inflammation and allergy network. *Trends Food Sci Technol* 86:153-171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.037>

Barjoveanu G, Pătrăuțanu OA, Teodosiu C, Volf I (2020) Life cycle assessment of polyphenols extraction processes from waste biomass. *Sci Rep* 10:13632. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70587-w>

Bejenari I, Hristea G, Căraușu C, Mija A, Volf I (2022) A sustainable approach on spruce bark waste valorization through hydrothermal conversion. *Processes* 10:111. <https://doi.org/10.3390/pr10010111>

Filote C, Popa VI, Volf I (2017) Marine algae biomass potential for obtaining biofuels and bioproducts. *Strategic Sinergies in the Black Sea Basin, Proceedings of the XII<sup>th</sup> Edition of the Annual Conference “The Academic Days of A.T.S.R.”* 452-457.

Filote C, Volf I, Santos SCR, Botelho CMS (2018) Bioadsorptive removal of Pb(II) from aqueous solution by the biorefinery waste of *Fucus spiralis*. *Sci Tot Environ* 648:1201-1209.



<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.210>

Filote C, Ciupercă OT, Volf I (2021) Qualitative assesment of polyphenols extracted from *Fucus spiralis* biomass through high-performance thin-layer chromatography. Buletinul Institutului Politehnic din Iași, publicat de Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași, Secția Chimie și Inginerie Chimică, Volumul 67(71), Numărul 2.

Filote C, Roșca C, Simion IM, Hlihor RM (2022) Continuous systems bioremediation of wastewaters loaded with heavy metals using microorganisms. Processes 10:1758.

<https://doi.org/10.3390/pr10091758>

Freitas O (2007) Eliminação de iões metálicos em solução aquosa por biossorção em macroalgas marinhas. Department of Chemical Engineering, University of Porto, Porto, Portugal.

Freitas OMM, Martins RJE, Delerue Matos CM, Boaventura RAR (2008) Removal of Cd(II), Zn(II) and Pb(II) from aqueous solutions by brown marine macro algae: Kinetic modelling. J Hazard Mat 153:493-501. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.08.081>

Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activity. Pure & Appl Chem 59(2):257-268.

Goto M, Kanda H, Wahyudiono, Machmudah S (2015) Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical dimethyl ether. J Supercrit Fluids 96:245–251. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.10.003>

Grosso C, Valentão P, Ferreres F, Andrade PB (2015) Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. Mar Drugs 13(5):3182–3230. <http://doi.org/10.3390/md13053182>

Hahn T, Lang S, Ulber R, Muffler K (2012) Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. Process Biochem 47(12):1691–1698. <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.016>

Hentati F, Tounsi L, Djomdi D, Pierre G, Delattre C, Ursu AV, Fendri I, Abdelkafi S, Michaud P (2020) Bioactive polysaccharides from seaweeds. Molecules 25, 3152. <http://doi.org/10.3390/molecules25143152>

Hlihor RM, Bulgariu L, Sobariu DL, Diaconu M, Tavares T, Gavrilescu M (2014) Recent advances in biosorption of heavy metals: support tools for biosorption equilibrium, kinetics and mechanism. 59(6-7):527-538.

Huang CY, Wu SJ, Yang WN, Kuan AW, Chen CY (2016) Antioxidant activities of crude extracts of fucoidan extracted from *Sargassum glaucescens* by a compressional-puffing-hydrothermal extraction process. Food Chem 197:1121-1129. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.100>