



MD 4026 C2 2010.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4026⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 47/56 (2006.01)
C07C 215/12 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

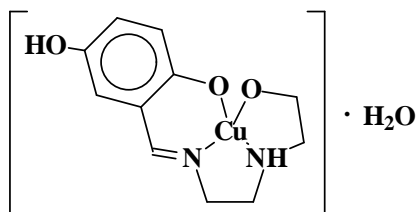
<p>(21) Nr. depozit: a 2009 0119 (22) Data depozit: 2009.11.13</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.03.31, BOPI nr. 3/2010</p>
<p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GRAUR Vasile, MD; BATÎR Liudmila, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULMAGA Valentina, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p>	

(54) Hidrat-2-[[2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino]-metil]-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)cupru și procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la un compus coordinativ nou din clasa salicilidenaminoalcoolaților metalelor de tranziție și la un procedeu de utilizare a acestuia în calitate de compus ce sporește conținutul de ficobiliproteine la cianobacteria *Spirulina platensis*.

Se revendică un compus coordinativ, hidrat-2-[[2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino]-metil]-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)cupru cu formula:



De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care

2
include cultivarea pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 0,20; MgSO₄·7H₂O – 0,20; CaCl₂·6H₂O – 0,04; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015; 1 mL soluție FeHEDTA 0,09 M și apă distilată până la 1L, la pH 9,5...10,0, la o temperatură de 30...32°C, iluminarea de 2000...3000 lx în primele 2 zile și de 3000...4000 lx în următoarele zile ale cultivării, totodată la a 2-a zi de cultivare se adaugă hidratul de 2-[[2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino]-metil]-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)cupru, în concentrație de 0,002...0,004 g/L.

15
Revendicări: 2

MD 4026 C2 2010.03.31

Descriere:

Invenția se referă la un compus coordinativ nou din clasa salicilidenaminoalcoolaților metalelor de tranziție și la un procedeu de utilizare a acestuia în calitate de compus ce sporește conținutul de ficobiliproteine la cianobacteria *Spirulina platensis*.

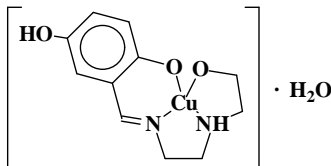
5 Din compușii coordinativi descriși în literatură, care reglează creșterea cianobacteriei *Spirulina platensis*, cel mai înalt efect stimulator a fost obținut în cazul trihidratului azotatului de hexa- μ -glicinato(O,O')- μ_3 -oxotriaquatrifier(III) – $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Complexul dat stimulează creșterea cianobacteriei *Spirulina platensis* la concentrația 10 mg/L.

10 În baza compusului dat a fost elaborat un procedeu de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* cu un conținut sporit de ficobiliproteine, care include etapele: cultivarea ei pe mediul nutritiv cu următorul conținut al ingredientelor (g/L): $\text{NaHCO}_3 - 16,6$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,0$; $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{NaCl} - 1,0$; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{MoO}_3 - 0,000015$. În a treia zi de cultivare în acest mediu se adaugă $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ în cantitate de 5...10 mg/L, cultivarea timp de 6 zile, temperatura 30...35°C și iluminarea de 3000...4000 lx [1].

15 Dezavantajul trihidratului azotatului de hexa- μ -glicinato(O,O')- μ_3 -oxotriaquatrifier(III) și a procedurii de obținere a biomasei de *Spirulina platensis* cunoscut constă în faptul că compusul utilizat în calitate de regulator al conținutului de ficobiliproteine nu asigură o activitate stimuloare suficient de înaltă, mărind conținutul lor doar până la 21,68 \pm 0,58% din biomasa absolut uscată (BAU).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de regulatori ai conținutului de ficobiliproteine la cianobacteria *Spirulina platensis* și elaborarea unui procedeu de cultivare a spirulinei.

25 Esența invenției constă în faptul că se propune un compus coordinativ, hidrat-2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino}-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2)-cupru cu formula:



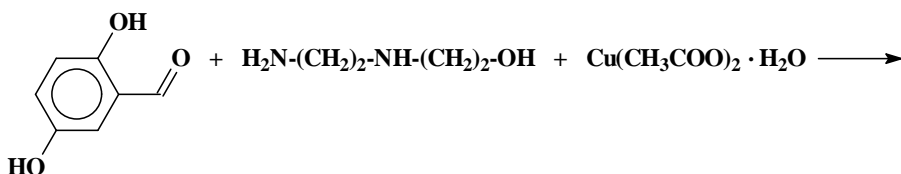
De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{NaHCO}_3 - 16,8$; $\text{NaCl} - 1,0$; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,20$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{MoO}_3 - 0,000015$; 1 mL soluție FeHEDTA 0,09 M și apă distilată până la 1L, la pH 9,5...10,0, la o temperatură de 30...32°C, iluminarea de 2000...3000 lx în primele 2 zile și de 3000...4000 lx în următoarele zile ale cultivării, totodată la a 2-a zi de cultivare se adaugă hidratul de 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino}-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2)-cupru, în concentrație de 0,002...0,004 g/L.

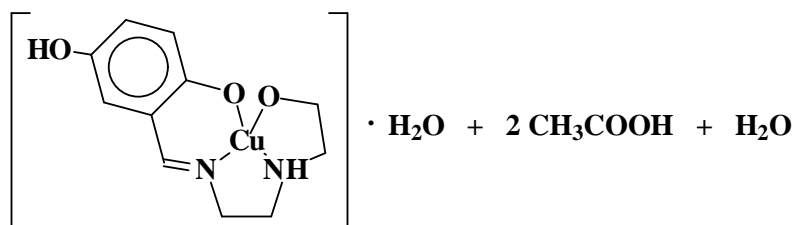
35 Complexul dat, proprietățile lui și procedeu de obținere nu sunt descrise în literatură.

Rezultatul constă în majorarea conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină de 1,2...1,25 ori.

40 Rezultatul invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de regulator al conținutului de ficobiliproteine la cianobacteria *Spirulina platensis* se propune compusul coordinativ cu formula hidrat-2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino}-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2)-cupru. Analiza comparativă a complexului revendicat cu soluția cea mai apropiată demonstrează că acestea se deosebesc printr-o combinație nouă a tipurilor de legături chimice deja cunoscute, și anume: sunt reprezentanții diferitor clase de compuși coordinativi homometalici. Datorită particularităților caracteristice compusului coordinativ revendicat, se obține un rezultat net superior în comparație cu soluția cea mai apropiată.

45 Compusul revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (50...55°C) a aldehidei 5-hidroxisalicilice (2,5-dihidroxibenzaldehidei) cu 2-(2-aminoetilamino)etanol și hidratul diacetatului de cupru, luate în raport molar de 1:1:1. Reacția decurge timp de 30...40 min conform următoarei scheme:





Mecanismul prezentei reacții este legat de faptul că în timpul sintezei în amestecul reactant în prezența ionului de cupru(2+) are loc condensarea templată a aldehidei 5-hidroxisalicilice cu 2-(2-aminoetilamino)etanol cu formarea 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino]-metil}-benzen-1,4-diolului, care cu ionul sus-numit formează compusul coordinativ final. Azometina obținută funcționează în hidratul de 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino]-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru ca ligand tetradentat-O,N,N,O dublu deprotonizat.

Procedeele de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 89% față de cel teoretic calculat. Complexul este stabil în contact cu aerul, solubil în apă și alcooli, bine solubil în dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă, practic insolubil în eter.

Exemplu de obținere a hidratului de 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino]-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru.

La suspensia etanolică, care conține 10 mmol de hidrat al acetatului de cupru în 20 mL etanol, încălzită și amestecată în permanență cu ajutorul agitatorului magnetic, se adaugă 80 mL de soluție alcoolică ce conține 10 mmol de aldehydă 5-hidroxisalicilică (2,5-dihidroxi-benzaldehidă) și 10 mmol de 2-(2-aminoetilamino)etanol. După aceasta amestecul reactant se încălzește cu refrigerent ascendent timp de 30...40 min. La răcire și evaporare lentă în soluție se depun cristale mărunte de culoare verde deschisă, care se filtrează prin filtru de sticlă, se spală cu cantități mici de etanol, eter dietilic, și se usucă la aer.

S-a determinat, %: C – 43,25; H – 5,09; Cu – 20,71, N – 9,03.

Pentru C₁₁H₁₆CuN₂O₄ s-a calculat, %: C – 43,49; H – 5,31; Cu – 20,92; N – 9,22.

Cercetarea vizuală sub microscop a compusului coordinativ sintetizat demonstrează că el posedă omogenitate fazică. Din cauza dimensiunilor mici și absenței monocristalelor acestui complex, pentru determinarea individualității componenței lui și structurii au fost utilizate metode de analiză a elementelor ca spectroscopia IR, magnetochimia și termogravimetria.

Determinarea în dimetilformamidă a conductibilității electrice molare a hidratului de 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino]-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru revendicat demonstrează că el nu este un electrolit [$\kappa = 4 \text{ Ohm}^{-1}\text{cm}^2\text{mol}^{-1}$, 20° C, C_M=0,001 mol/L].

Cercetarea magnetochimică a complexului revendicat la temperatura camerei (294 K) a demonstrat, că valoarea calculată a momentului lui magnetic efectiv este apropiată de valoarea de spin pentru un electron necuplat ($\mu_{\text{ef.}} = 1,83 \text{ m. B.}$). Acest fapt ne permite să presupunem că substanța cercetată are o structură monomerică.

În scopul determinării modului de coordonare a ligandului la ionul de cupru(2+) a fost efectuată analiza comparativă a spectrelor IR ale compusului revendicat, aldehidei 5-hidroxisalicilice, 2-(2-aminoetilamino)etanolului și a complexelor metalelor 3d cu liganzii asemănători descriși în literatură. S-a stabilit, că azometina obținută pe matricea ionului de cupru(2+) în complexul revendicat se comportă ca un ligand tetradentat dublu deprotonizat, coordonându-se la ionul central prin intermediul atomilor de oxigen fenolic și alcoolice, azotului azometinic și iminic, cu formarea a două metalocicluri din cinci și unuia din șase atomi. În favoarea acestui fapt indică dispariția din spectrul IR al substanței revendicate a benzilor de absorbție $\nu(\text{NH}_2)$, care în aminoalcoolul liber se observă în domeniu 3450...3150 cm⁻¹. În spectrul complexului apare banda $\nu(\text{C}=\text{N})$, care este deplasată cu 15 cm⁻¹ spre frecvența mai mică, în complexii metalelor 3d cu liganzii asemănători, descriși în literatură, acestea se observă în domeniul 1630...1625 cm⁻¹. În afară de această, în domeniul 530...400 cm⁻¹ apar patru benzi noi de absorbție, care conform datelor din literatură corespund $\nu(\text{Cu}-\text{N}) = 521$ și 410 cm⁻¹ și $\nu(\text{Cu}-\text{O}) = 490$ și 440 cm⁻¹.

Analiza termogravimetrică a substanței sintetizate a arătat că descompunerea ei termică are loc în două etape. Pe curba DTA a complexului se observă un efect endotermic, care în concordanță cu temperatura relativ joasă (70...90°C) corespunde procesului de dehidratare. Următorul termoeffect pe curba DTA a compusului care se observă la 460°C este exotermic și legat cu destrucția termooxidativă a ligandului coordonat.

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și cercetărilor fizico-chimice a fost stabilită compoziția și structura probabilă a compusului revendicat.

MD 4026 C2 2010.03.31

5

Exemple de utilizare a hidratului 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino}-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru în calitate de regulator al conținutului de ficobiliproteine la cianobacteria *Spirulina platensis*.

Exemplul 1

5 Se prepară mediul mineral nutritiv SP-1 cu următoarea componență (g/L): NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 0,20; MgSO₄·7H₂O – 0,20; CaCl₂·6H₂O – 0,04; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015; 1 mL soluție FeHEDTA 0,09 M și apă distilată până la 1L. La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* CNM-CB-02 în cantitate de 0,4 g/L. În a doua zi de cultivare la suspensia de spirulină, în calitate de regulator al conținutului de ficobiliproteine se suplimentează 0,002 g/L de hidrat de 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino}-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 250 mL cu 100 mL suspensie în următoarele condiții: iluminarea de 2000...3000 lx în primele 2 zile și de 3000...4000 lx în următoarele zile ale cultivării, la pH 9,5...10,0 și la o temperatură de 30°C. La ziua a șaptea biomasa se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se determină conținutul de ficobiliproteine.

15 Biomasa obținută conține 27,11% ficobiliproteine din BAU față de 21,68% în cazul celei mai apropiate soluții (Tab.).

Exemplul 2

20 Se prepară mediul mineral nutritiv SP-1 cu următoarea componență (g/L): NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 0,20; MgSO₄·7H₂O – 0,20; CaCl₂·6H₂O – 0,04; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015; 1 mL soluție FeHEDTA 0,09 M și apă distilată până la 1L. La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* CNM-CB-02 în cantitate de 0,4 g/L. În a doua zi de cultivare, la suspensia de spirulină, în calitate de regulator al conținutului de ficobiliproteine se suplimentează 0,004 g/L de hidrat de 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino}-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 250 mL cu 100 mL suspensie în următoarele condiții: iluminarea de 2000...3000 lx în primele 2 zile și de 3000...4000 lx în următoarele zile ale cultivării, la pH 9,5...10,0 și la o temperatură de 32°C. La ziua a șaptea biomasa se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se determină conținutul de ficobiliproteine.

30 Biomasa obținută conține 25,82% ficobiliproteine din BAU față de 21,68% în cazul celei mai apropiate soluții.

Conținutul ficobiliproteinelor în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* CNM-CB-02 la cultivare conform procedurii propus în invenție și din soluția cea mai apropiată

Procedul utilizat	Compusul	Concentrația compusului, g/L	Conținutul ficobiliproteinelor, % din BAU
Conform celei mai apropiate soluții	[Fe ₃ O(Gly) ₆ (H ₂ O) ₃]NO ₃ ·3H ₂ O	0,005	21,68±0,58
Conform soluției propuse în invenție	Hidratul de 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino}-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru	0,002 0,004	27,11±0,13 25,82±0,11

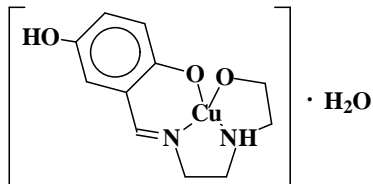
35

Datele tabelului demonstrează majorarea de 1,2...1,25 ori a conținutului de ficobiliproteine în biomasa de spirulină în procedeul propus în invenție față de procedeul cel mai apropiat.

40 Proprietățile depistate ale hidratului de 2-{{2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino}-metil}-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru prezintă interes pentru biotehnologie din punct de vedere al extinderii arsenalului de regulatori ai conținutului de ficobiliproteine la cianobacteria *Spirulina platensis*.

(57) Revendicări:

1. Hidrat de 2-[[2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino]-metil]-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru cu formula:



2. Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: $\text{NaNO}_3 - 2,5$; $\text{NaHCO}_3 - 16,8$; $\text{NaCl} - 1,0$; $\text{K}_2\text{SO}_4 - 1,0$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,20$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,20$; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 0,04$; $\text{H}_3\text{BO}_3 - 0,00286$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 0,00181$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,00022$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,00008$; $\text{MoO}_3 - 0,000015$; 1 mL soluție FeHEDTA 0,09 M și apă distilată până la 1L, la pH 9,5...10,0, la o temperatură de 30...32°C, iluminarea de 2000...3000 lx în primele 2 zile și de 3000...4000 lx în următoarele zile ale cultivării, totodată la a 2-a zi de cultivare se adaugă hidratul de 2-[[2-(2-hidroxi-etilamino)-etilimino]-metil]-benzen-1,4-dihidroxi-(2-)-cupru, definit în revendicarea 1, în concentrație de 0,002...0,004 g/L.

10

15

(56) Referințe bibliografice:

1. MD 2386 C2 2004.02.28

Șef Secție:

GROȘU Petru

Examinator:

EGOROVA Tamara

Redactor:

UNGUREANU Mihail