



MD 4043 C1 2010.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4043⁽¹³⁾ C1

(51) Int. Cl.: C07F 1/08 (2006.01)
C07C 251/02 (2006.01)
C07C 215/12 (2006.01)
C07C 47/56 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

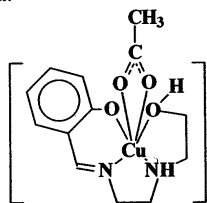
| | |
|--|---|
| <p>(21) Nr. depozit: a 2010 0006 (22) Data depozit: 2010.01.18</p> | <p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2010.05.31, BOPI nr. 5/2010</p> |
| <p>(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD (72) Inventatori: GULEA Aurelian, MD; ȚAPCOV Victor, MD; GRAUR Vasile, MD; BATÎR Ludmila, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULMAGA Valentina, MD; ELENCIUC Daniela, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DIN MOLDOVA, MD</p> | |

(54) Acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru și procedeu de
cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un compus coordinativ nou din clasa salicilidenaminoalcoolaților metalelor de tranziție și la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu utilizarea acestuia în calitate de compus ce sporește conținutul de cupru în biomasa cianobacteriei.

Se revendică un compus coordinativ, acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru cu formula:



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

include cultivarea spirulinei într-un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,2; CaCl₂ – 0,04; FeSO₄·7H₂O – 0,01; EDTA – 0,08; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015 și apă distilată până la 1L, la o temperatură de 30...32°C, la pH 9,5...10,0 și iluminarea de 2000...3000 lx. Totodată la a 2-a zi de cultivare în mediul nutritiv se adaugă acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru, în concentrație de 2...4 mg/L, în care cantitatea Cu²⁺ constituie 0,47...0,94 mg/L.

Revendicări: 2

MD 4043 C1 2010.05.31

Descriere:

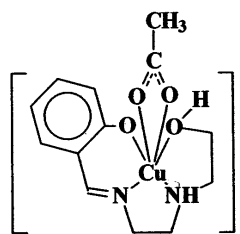
Invenția se referă la un compus coordinativ din clasa salicilidenaminoalcoolaților metalelor de tranziție și la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* cu utilizarea acestuia în scopul sporirii conținutului de cupru în biomasa cianobacteriei.

5 Este cunoscut un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediul de cultivare Zarrouk (1996), iluminarea 40W, temperatura 28...32°C, durata de cultivare 30 de zile, iar la a 16-a zi în acest mediu se adaugă soluțiile unor metale grele, printre care și Cu^{2+} [1].

Dezavantajul acestui procedeu constă în durata îndelungată de cultivare – 30 de zile, precum și în faptul că nu asigură o rată de acumulare a cuprului suficient de înaltă. La adăugarea Cu^{2+} la a 16-a zi, în timpul fazei de stopare a creșterii spirulinei are loc absorbția Cu(II) și nu acumularea lui intracelulară.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în extinderea arsenalului de reglatori asupra acumulării cuprului în biomasă și elaborarea unui procedeu de utilizare a acestuia pentru obținerea biomasei de *Spirulina platensis* cu un conținut înalt de cupru legat organic, chiar și la utilizarea unor concentrații mai mici.

15 Esența invenției constă în faptul că se propune un compus coordinativ, acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru cu formula:



20

Se revendică de asemenea și un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea spirulinei într-un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO_3 – 2,5; NaHCO_3 – 16,8; NaCl – 1,0; K_2SO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 0,04; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; EDTA – 0,08; H_3BO_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; MoO_3 – 0,000015 și apă distilată până la 1L, la o temperatură de 30...32°C, la pH 9,5...10,0 și iluminarea de 2000...3000 lx. Totodată la a 2-a zi de cultivare în mediul nutritiv se adaugă acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru, în concentrație de 2...4 mg/L, în care cantitatea de Cu^{2+} constituie 0,47...0,94 mg/L.

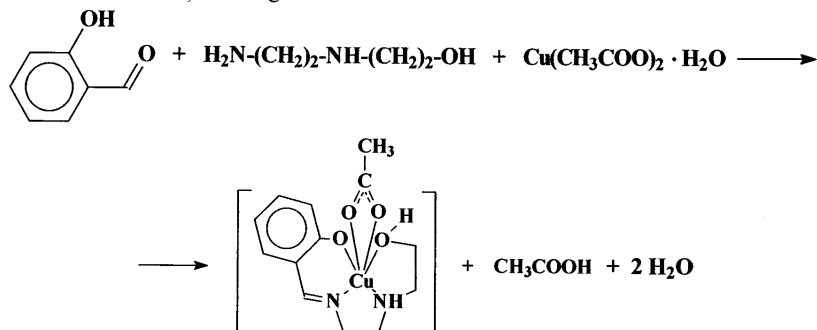
30 Compusul sus-menționat, proprietățile lui și procedeu de obținere nu sunt descrise în literatură.

Rezultatul invenției constă în majorarea conținutului de cupru în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* până la 9,77...10,63 mg % față de soluția cea mai apropiată (5 mg%), precum și în diminuarea duratei de cultivare de la 30 până la 7 zile. Administrarea cuprului la a 2-a zi de cultivare duce la acumularea intracelulară a ionilor de cupru, ceea ce permite obținerea biomasei de spirulină îmbogățită cu cuprul legat organic – sursă de substanțe antimicrobiene și anticancerogene, cu efect mai puțin toxic asupra organismului.

Rezultatul invenției este condiționat de faptul că pentru prima dată în calitate de reglator al conținutului de cupru în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* se propune acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru, care conține o combinație nouă de legături chimice deja cunoscute.

40

Compusul revendicat se obține la interacțiunea soluțiilor etanolice fierbinți (50...55°) ale aldehidei salicilice cu 2-(2-aminoetilamino)etanol și ale hidratului diacetatului de cupru, luate în raport molar de 1:1:1. Reacția decurge în 20...30 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 salicile cu 2-(2-aminoetilamino) cu formarea saliciliden-2-(2-aminoetilamino)etanol, care formează cu ionul sus-numit compusul coordinativ final. Azometina obținută funcționează în acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru ca ligand tetradentat-O,N,N,O monodeprotonizat. Al cincilea și al șaselea loc în sfera internă îl ocupă acetat-ion bidentat.

Procedeele de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile, randamentul constituie 83% față de cel teoretic calculat. Compusul este stabil în contact cu aerul, solubil în apă și alcoolii, bine solubil în dimetilformamidă și dimetilsufoxidă, practic insolubil în eter.

Exemplu de obținere a acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru.

La suspensia etanolică ce 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 salicilică și 10 mmol de 2-(2-aminoetilamino)etanol. După aceasta amestecul reactant se încălzește cu refrigerent ascendent pe parcurs de 20...30 min; la răcire și evaporare lentă în soluție se depun cristale mărunte de culoare verde întunecată, 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 – 47,07; H – 5,37; Cu – 19,52, N – 8,30. Pentru $C_{13}H_{18}CuN_2O_4$ s-a calculat, %: C – 47,34; H – 5,50; Cu – 19,27; N – 8,49.

Cercetarea sub microscop a compusului coordinativ sintetizat demonstrează că acesta posedă omogenitate fazică. Din cauza dimensiunilor mici și absenței monocristalelor acestui compus, pentru a demonstra noutatea componenței și a structurii lui au fost utilizate metode de analiză ale elementelor, spectroscopia IR, magnetochimia și termogravimetria.

Calcularea în dimetilformamidă a conductibilității electrice molare a compusului acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru a demonstrat că acesta nu este un electrolit [$\kappa=2 \text{ Ohm}^{-1}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$, 20°C, $C_M=0,001 \text{ mol/L}$].

Cercetarea magnetochimică a compusului revendicat la temperatura camerei (293 K) a demonstrat că valoarea calculată a momentului magnetic al acestuia este apropiată efectiv de valoarea de spin pentru un electron necuplat ($\mu_{\text{ef}}=1,79 \text{ m. B}$). Acest fapt ne permite să presupunem că substanța cercetată are o structură monomerică.

În scopul determinării modului de coordonare al ligandului la ionul de cupru(2+) a fost efectuată analiza comparativă a spectrelor IR ale compusului revendicat, aldehidei salicile, 2-(2-aminoetilamino)etanol și a complexilor metalelor 3d cu liganzii asemănători, descriși în literatura de specialitate. S-a stabilit, că azometina obținută pe matricea ionului de cupru(2+) în compusul revendicat se comportă ca un ligand tetradentat monodeprotonizat, coordonându-se la ionul central prin intermediul atomilor de oxigen fenolic și alcoolic, ai azotului azometinic și iminic, cu formarea a două metalocicluri din cinci și a unuia din șase atomi. În favoarea acestui fapt indică dispariția din spectrul IR al compusului revendicat a benzilor de absorbție $\nu(\text{NH}_2)$, care în aminoalcoolul liber se observă în domeniul 3450...3150 cm^{-1} . În spectrul complexului apare banda $\nu(\text{C}=\text{N})$, care este deplasată cu 20 cm^{-1} spre frecvența mai mică. În complexii metalelor 3d cu liganzii asemănători descriși în literatură, aceasta 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 $\nu(\text{Cu}-\text{N}) = 530$ și 415 cm^{-1} și $\nu(\text{Cu}-\text{O}) = 485$ și 445 cm^{-1} . Ionul de acetat, conform datelor spectrului IR, se află în sferă internă și coordonează la atomul central bidentat ($\nu_a(\text{CH}_3\text{COO}^-) = 1525$ și $\nu_s(\text{CH}_3\text{COO}^-) = 1445 \text{ cm}^{-1}$).

Analiza termică a demonstrat că pe derivatograma compusului revendicat se observă un singur efect exotermic la 530°C, care corespunde procesului de destrucție termooxidativă a liganzilor organici în compuși.

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

Exemple de utilizare a acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru în calitate de regulator al conținutului de cupru în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*.

Exemplul 1

Se prepară mediul mineral nutritiv Zarrouk cu următorul conținut al ingredientelor (g/L): NaNO_3 – 2,5; NaHCO_3 – 16,8; NaCl – 1,0; K_2SO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; CaCl_2 – 0,04; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; EDTA – 0,08; H_3BO_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; MoO_3 – 0,000015 și apă distilată până la 1L. La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,4 g/L. La a doua zi de cultivare, la suspensia de spirulină, în calitate de regulator al conținutului de cupru în biomasă, se adaugă 2 mg/L de acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru, unde concentrația Cu^{2+} este 0,47 mg/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 250 mL cu 100 mL suspensie în următoarele condiții: pH-ul 9,5...10,0, temperatura 30°C, iluminarea 3000 lx.

MD 4043 C1 2010.05.31

5

La ziua a șaptea, biomasa se separă de lichidul de cultură, se supune demineralizării și se calculează conținutul de cupru.

Biomasa obținută conține 10,63 mg % de cupru din biomasa absolut uscată (BAU) față de 5,0 mg % în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul).

5 *Exemplul 2*

Se prepară mediul mineral nutritiv Zarrouk cu următorul conținut al ingredientelor (g/L): NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,2; CaCl₂ – 0,04; FeSO₄·7H₂O – 0,01; EDTA – 0,08; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015 și apă distilată până la 1L. La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,4g/L. La a doua zi de cultivare, la suspensia de spirulină, în calitate de regulator al conținutului de cupru, se adaugă 4 mg/L de hidrat de acetato-N-[2-(2-hidroxiethylamino)-etil]-salicilidenimino(1-)cupru unde concentrația Cu²⁺ este 0,94 mg/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 250 mL cu 100 mL suspensie în următoarele condiții: pH-ul 9,5...10,0, temperatura 32°C, iluminarea 2000 lx.

15 La ziua a șaptea biomasa se separă de lichidul de cultură, se supune demineralizării și se calculează conținutul de cupru.

Biomasa obținută conține 9,77 mg % cupru din (BAU) față de 5,0 mg % în cazul celei mai apropiate soluții.

Tabel

20

Conținutul de cupru în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* la cultivarea conform procedurii revendicate și celei mai apropiate soluții

| Procedeele utilizate | Cu ²⁺ adăugat, mg/L | Conținutul de Cu ²⁺ acumulat în biomasă mg % |
|-------------------------------------|--------------------------------|---|
| Conform celei mai apropiate soluții | 1,00 | 5,00±0,58 |
| | 3,00 | 32,0±0,78 |
| Conform soluției revendicate | 0,47 | 10,63±0,49 |
| | 0,94 | 9,77±0,80 |

25 Datele tabelului demonstrează creșterea de 1,95 ... 2,13 ori a conținutului de cupru în biomasa de spirulină conform procedurii revendicate față de procedura cel mai apropiată. Având în vedere că la administrarea Cu(II) la a 16-a zi de cultivare, când spirulina este în faza de declin a creșterii și în celule nu sunt încă activate sistemele biochimico-moleculare de includere a ionilor în componentele intracelulare ale spirulinei, ionii de cupru sunt absorbiți la suprafața peretelui celular, datorită cărui fapt, în cea mai apropiată soluție se obține un conținut sporit de cupru la administrarea a 3 mg/L de Cu²⁺.

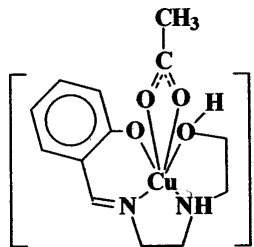
30 Proprietățile depistate ale acetato-N-[2-(2-hidroxiethylamino)-etil]-salicilidenimino(1-)cupru prezintă interes pentru biotehnologie din punct de vedere al extinderii arsenalului de regulatori ai conținutului de cupru în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*.

35

(57) Revendicări:

1. Acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru cu formula:

5



2. Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis*, care include cultivarea spirulinei într-un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO₃ – 2,5; NaHCO₃ – 16,8; NaCl – 1,0; K₂SO₄ – 1,0; K₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄·7H₂O – 0,2; CaCl₂ – 0,04; FeSO₄·7H₂O – 0,01; EDTA – 0,08; H₃BO₃ – 0,00286; MnCl₂·4H₂O – 0,00181; ZnSO₄·7H₂O – 0,00022; CuSO₄·5H₂O – 0,00008; MoO₃ – 0,000015 și apă distilată până la 1L, la o temperatură de 30...32°C, la pH 9,5...10,0, iluminarea de 2000...3000 lx, totodată la a 2-a zi de cultivare se adaugă acetato-N-[2-(2-hidroxi-etilamino)-etil]-salicilidenimino(1)-cupru definit în revendicarea 1, în concentrație de 2...4 mg/L, în care cantitatea Cu²⁺ constituie 0,47...0,94 mg/L.

20

(56) Referințe bibliografice:

1. Gannikar Disyawongs. Accumulation of Copper, Mercury and Lead in *Spirulina Platensis* studied in Zarrouk's Medium. The Journal of KMITNB, vol. 12, nr. 4, Oct-Dec. 2002, p. 33-35

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

BAZARENCO Tatiana

Redactor:

UNGUREANU Mihail