MD 4253 C1 2014.05.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenţia de Stat pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4253 (13) **C1**

(51) Int.Cl: ***C07F 15/06*** (2006.01)
C07D 213/88 (2006.01)
C07D 213/50 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENŢIE

(21) Nr. depozit: a 2012 0099
(22) Data depozit: 2012.11.05

(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
2013.10.31, BOPI nr. 10/2013

(71) Solicitanţi: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD

(72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; DANILESCU Olga, MD; BULHAC Ion, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD; BOLOGA Olga, MD; RIJA Andrei, MD; MISCU Vera, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; VALUŢA Ana, MD

(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ŞI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ŞTIINŢE A MOLDOVEI, MD

(54) Sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat şi procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia

(57) Rezumat:

1

Invenţia se referă la chimie şi biotehnologie, şi anume la sinteza unui nou compus coordinativ al cobaltului(II) şi la un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia.

Conform invenţiei, se revendică un compus coordinativ – sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin(2-)cobalt(II) monometanol trihidrat.

De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*, care constă în aceea că se cultivă microalga pe un mediu nutritiv ce conţine, g/L: $NaNO_3$ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl -7,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,8; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05;

2

K_2HPO_4 - 0,2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,00027; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00002; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00005; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; $NaVO_3$ - 0,00005, compusul sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat - 0,019…0,021 g/L şi apă distilată până la 1L, avand pH-ul 6,8…7,2; la temperatura de 23…25°C, iluminarea de 2000…3000 lx/cm^2, cu agitarea lentă periodică.

Rezultatul constă în majorarea activităţii antioxidante a extractului etanolic obţinut din biomasa de microalgă.

Revendicări: 2

(54) Sulphato-bis(nicotinoylhydrazone)-2,6-diacetylpyridin-cobalt(II)

MD 4253 C1 2014.05.31

monomethanol trihydrate and process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum* with the use thereof

(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry and biotechnology, namely to the synthesis of a new coordinative compound of cobalt(II) and to a process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum* with the use thereof.

According to the invention, a coordinative compound–sulphato-bis(nicotinoylhydrazone)-2,6-diacetylpyridin-cobalt(II) monomethanol trihydrate is claimed.

Also, a process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum* is claimed, which consists in that microalga is cultivated on a nutrient medium containing, in g/L: $NaNO_3$ – 5.0; NaCl – 7.0; KCl – 7.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1.8; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ – 0.15; KBr – 0.05; KI – 0.05; K_2HPO_4 – 0.2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 0.00027;

2

$ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0.00002; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0.00005; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0.0003; H_3BO_3 – 0.0006; MoO_3 – 0.00002; $NaVO_3$ – 0.00005; the compound sulphato-bis(nicotinoylhydrazone)-2,6-diacetylpyridin-cobalt(II) monomethanol trihydrate – 0.019…0.021 g/L and distilled water up to 1L, having the pH 6.8…7.2; at the temperature of 23…25°C, the lighting of 2000…3000 lx/cm^2, with slow intermittent agitation.

The result consists in increasing the antioxidant activity of the alcoholic extract obtained from microalga biomass.

Claims: 2

(54) Сульфато-бис(никотиноилгидразон)-2,6-диацетилпиридин-кобальт(II) монометанол тригидрат и способ культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum* с его использованием

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и биотехнологии, в частности к синтезу нового координационного соединения кобальта(II) и к способу культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum* с его использованием.

Согласно изобретению, заявляется координационное соединение – сульфато-бис(никотиноилгидразон)-2,6-диацетилпиридин-кобальт(II) монометанол тригидрат.

Также, заявляется способ культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum*, который состоит в том что культивируется микроводоросль на питательной среде, которая содержит в г/л: $NaNO_3$ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,8; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ -

2

0,00027; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00002; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00005; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; $NaVO_3$ - 0,00005; соединение сульфато-бис(никотиноилгидразон)-2,6-диацетилпиридин-кобальт(II) монометанол тригидрат - 0,019 ... 0,021 г/л и дистиллированная вода до 1 л, имея pH 6,8 ... 7,2; при температуре 23 ... 25?C, освещение в 2000 ... 3000 лк/см^2, с медленным периодическим перемешиванием.

Результат состоит в повышении антиоксидантной активности спиртового экстракта полученного из биомассы микроводоросли.

П. формулы: 2

Descriere:

Invenţia se referă la chimie şi biotehnologie, şi anume la sinteza unui nou compus coordinativ al cobaltului(II) şi la un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia în scopul majorării activităţii antioxidante a extractului etanolic, obţinut în baza biomasei de porfiridium.

Este cunoscut procedeul de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* pe mediul nutritiv mineral ce conţine, g/L: $NaNO_3$ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,8; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,00027; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00002; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00005; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; $NaVO_3$ - 0,00005 şi apă distilată până la 1L; pH-ul 6,8…7,2; la temperatura de 23…25°C, iluminarea de 2000…3000 lx/cm^2, la agitare lentă periodică. Din biomasa obţinută se prepară extractul etanolic. Valoarea activităţii antioxidante a extractului etanolic este de 29% inhibiţie $ABTS^{\cdot+}$ [1].

Neajunsul acestui procedeu constă în activitatea antioxidantă joasă a extractului etanolic, obţinut din biomasa de *Porphyridium cruentum* (29% inhibiţie $ABTS^{\cdot+}$).

Este cunoscut compusul coordinativ tiocianat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-(izotiocianato)(aqua)cobalt(II) cu formula $[Co^{II}(L)(NCS)(H_2O)]NCS$, structura moleculară a căruia a fost stabilită prin metoda difracţiei cu raze X [2].

Neajunsul acestui complex constă în faptul că, în virtutea structurii lui, la aplicare în calitate de adaos la cultivarea microalgei *Porphyridium cruentum,* conform procedeului expus mai sus, asigură un spor neînsemnat al activităţii antioxidante. Astfel, în urma testelor efectuate, activitatea antioxidantă a extractului etanolic, obţinut din biomasa de *Porphyridium cruentum,* cultivată conform procedeului descris cu adaos de 0,021 g/L compus, a constituit 33% inhibiţie $ABTS^{\cdot+}$ (date nepublicate).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenţie constă în elaborarea unui procedeu eficient şi reproductibil de sporire a activităţii antioxidante a extractului etanolic, obţinut in baza biomasei de *Porphyridium cruentum.*

Esenţa invenţiei constă în faptul că se propune un compus coordinativ nou – sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat cu formula $Co(H_2L)SO_4 \cdot CH_3OH \cdot 3H_2O$.

De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*, care constă în aceea că se cultivă microalga pe un mediu nutritiv ce conţine, g/L: $NaNO_3$ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,8; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,00027; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00002; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00005; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; $NaVO_3$ - 0,00005 şi apă distilată până la 1L, având pH-ul 6,8…7,2, la temperatura de 23…25°C, iluminarea de 2000…3000 lx/cm^2, cu agitarea lentă periodică, totodată mediul conţine suplimentar compusul sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat, în concentraţia de 0,019…0,021 g/L.

Compusul menţionat, proprietăţile lui şi procedeul de obţinere nu sunt descrise in literatură.

Rezultatul tehnic al invenţiei constă în majorarea activităţii antioxidante a extractului etanolic, obţinut în baza biomasei microalgei *Porphyridium cruentum,* cu 17,8…18,2%, faţă de cea mai apropiată soluţie. Administrarea compusului in prima zi de cultivare stimulează acumularea componentelor antioxidante în biomasa microalgei, care ulterior se extrag in alcool etilic de 96%.

Rezultatul invenţiei este condiţionat de utilizarea, pentru prima dată, a compusului sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat in calitate de stimulator al acumulării componentelor antioxidante care determină activitatea antioxidantă a extractului etanolic, obţinut în baza biomasei de *Porphyridium cruentum*. Compusul dat are proprietatea de a stimula acumularea in biomasa microalgei de *Porphyridium cruentum* a componentelor extractibile în etanol, care participă în reacţiile de reducere a radicalilor in calitate de donor de electroni sau de hidrogen.

Compusul revendicat se obţine ca rezultat al reacţiei pe matrice de cobalt la interacţiunea sulfatului de cobalt(II) heptahidrat, 2,6-diacetilpiridinei şi a hidrazidei acidului nicotinic in mediu metanol-etanolic la temperatura de 65…70°C.

Procedeul de obţinere a compusului revendicat este simplu în executare, substanţele iniţiale sunt accesibile, randamentul constituie 50%. Compusul este stabil în aerul atmosferic şi la temperatura camerei, solubil în dimetilformamidă (DMFA), dimetilsulfoxid (DMSO), alcooli.

Exemplu de obţinere a $Co(L_1)SO_4 \cdot CH_3OH \cdot 3H_2O$

$CoSO_4 \cdot 7H_2O$ cu masa de 0,28 g (1 mmol) se dizolvă într-un amestec compus din 10 ml de etanol şi 15 ml de metanol. Amestecul din 0,16 g (1mmol) de 2,6-diacetilpiridină şi 0,28 g (2 mmol) de hidrazidă a acidului nicotinic se dizolvă în 27 ml de metanol. Soluţia agenţilor coordinativi se adaugă la cea de sulfat de cobalt, după care soluţia obţinută se refluxează timp de 2 ore. Culoarea soluţiei treptat trece din roz-zmeuriu in oranj intens, din care se sedimentează un produs omogen cristalin de culoare oranj, care se separă prin filtrare, se spală cu metanol, apoi cu eter dietilic şi se usucă în aer liber. Masa substanţei este de 0,32 g, ce constituie 50% din cea teoretică.

Substanţa este solubilă în DMFA, DMSO, mai puţin solubilă în alcooli, slab solubilă în apă, practic insolubilă în eter dietilic.

Rezultatele analizei elementelor

Determinat, %: Co 8,87; C 40,84; H 4,30; N 15,47.

Pentru $CoC_{22}H_{29}N_7O_{10}S$

Calculat, %: Co 9,17; C 41,13; H 4,55; N 15,26.

Unele benzi mai importante in spectrul IR: 3500...2800 cm^{-1}, bandă lată compusă din ν(OH), ν(NH), ν(CH); 1643 cm^{-1} (ν(C=O))coordinată, ν(>C=N-N=C<); 1630 cm^{-1} (ν(C=N)); 1599, 1583, 1517 cm^{-1} (inelul Py); 1440 cm^{-1} ($\delta_{as}(CH_3)$); 1365 cm^{-1} ($\delta_s(CH_3)$); 1170, 1097, 1045 cm^{-1} ($\nu_3(SO_4)$); 996 cm^{-1} ($\nu_1(SO_4)$); 645, 599, 586 cm^{-1} ($\nu_4(SO_4)$); 456 cm^{-1} ($\nu_2(SO_4)$).

Din datele spectrului IR se poate presupune cu o doză mare de probabilitate că grupele SO_4^{2-} coordinează ca ligand-punte bidentat (K. Накамото. ИК спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений. Перевод с английского. Москва, «Мир» 1991, 536 p.).

Exemple de utilizare a sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanolului trihidrat în calitate de stimulator al activităţii antioxidante a extractului etanolic, obţinut în baza biomasei microalgei *Porphyridium cruentum.*

Exemplul 1

Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conţinut al componentelor (g/L): $NaNO_3$ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,8; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,00027; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00002; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00005; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; $NaVO_3$ - 0,00005 şi apă distilată până la 1L. În prima zi de cultivare, la suspensia de porfiridium, in calitate de stimulator al activităţii antioxidante se adaugă compusul sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat in concentraţie de 0,019 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 100 ml cu 50 ml suspensie în următoarele condiţii: pH-ul 6,8…7,2, temperatura de 23…25°C, iluminarea de 2000…3000 lx/cm^2, cu agitare lentă periodică. La ziua a zecea, biomasa de porfiridium se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării şi se prepară extractul etanolic, în care se determină activitatea antioxidantă cu aplicarea testului $ABTS^{\cdot+}$.

Extractul etanolic are activitatea antioxidantă de 37,7±1,04% inhibiţie $ABTS^{\cdot+}$, faţă de 32% inhibiţie $ABTS^{\cdot+}$ în cazul celei mai apropiate soluţii (vezi tabelul). Sporul activităţii antioxidante este de 17,8%.

Exemplul 2

Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conţinut al componentelor (g/L): $NaNO_3$ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,8; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,00027; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00002; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00005; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; $NaVO_3$ - 0,00005 şi apă distilată până la 1L. În prima zi de cultivare, la suspensia de porfiridium, în calitate de stimulator al activităţii antioxidante, se adaugă compusul sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat in

concentraţie de 0,021 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 100 ml cu 50 ml suspensie în următoarele condiţii: pH-ul 6,8…7,2, temperatura de 23…25°C, iluminarea de 2000…3000 lx/cm^2, cu agitare lentă periodică. La ziua a 10-a, biomasa de porfiridium se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării şi se prepară extractul etanolic, în care se determină activitatea antioxidantă cu aplicarea testului $ABTS^{\cdot+}$.

Extractul etanolic are activitatea antioxidantă de 39±0,82% inhibiţie $ABTS^{\cdot+}$, faţă de 33% inhibiţie $ABTS^{\cdot+}$ în cazul celei mai apropiate soluţii (vezi tabelul). Sporul activităţii antioxidante este de 18,2%.

Tabel

Activitatea antioxidantă a extractului etanolic în baza biomasei de *Porphyridium cruentum,* obţinută la cultivare conform procedeului revendicat şi celei mai apropiate soluţii

Procedeul utilizat	Concentraţia compusului, g/L	Activitatea antioxidantă, % inhibiţie $ABTS^{\cdot+}$
Procedeul cunoscut	-	29±0,14
Procedeul cunoscut + $[Co^{II}(L)(NCS)(H_2O)]NCS$	0,019	32±0,81
	0,021	33±0,12
Procedeul revendicat (cu compusul $Co(H_2L)SO_4 \cdot CH_3OH \cdot 3H_2O$)	0,019	37,7±1,04
	0,021	39±0,82

Datele din tabel demonstrează o creştere a activităţii antioxidante a extractului etanolic, obţinut în baza biomasei de *Porphyridium cruentum* conform procedeului revendicat, cu 18% faţă de procedeul din cea mai apropiată soluţie. Biomasa microalgei *Porphyridium cruentum* reprezintă o sursă de substanţe antioxidante, iată de ce sporul activităţii antioxidante a extractului etanolic, obţinut în baza biomasei de porfiridium, creşte valoarea ei în calitate de producător de substanţe antioxidante.

Proprietăţile compusului sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat prezintă interes pentru biotehnologie in calitate de stimulator al activităţii antioxidante a biomasei microalgei *Porphyridium cruentum.*

(56) Referinţe bibliografice citate in descriere:

1. Bulhac I., Şova S., Novițchi G., Danilescu O., Rija A. Synthesis, crystal structure and magnetic properties of new Schiff base Co(II) complexes with NCS^- containing anions.In: The XXXIInd Romanian Chemistry Conference, Călimăneşti-Căciulata, Romania, 3-5 October 2012: Book of abstracts, P.S. II-12, p.12
2. Rudi L., Cepoi L., Miscu V., Cojocari A., Chiriac T., Sadovnic D., Rudic V. Aprecierea activităţii antioxidante şi antiradicalice a extractelor din *Porphyridium cruentum* prin aplicarea metodelor non-specifice. Buletinul AŞM, seria Ştiinţele vieţii, nr. 3(312), 2010, p. 114-120

(57) Revendicări:

1. Compusul sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin(2-)cobalt(II) monometanol trihidrat.

2. Procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*, care constă în aceea că se cultivă microalga pe un mediu nutritiv ce conţine, g/L: $NaNO_3$ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl -7,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 1,8; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,00027; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00002; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,00005; $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; $NaVO_3$ - 0,00005 şi apă distilată până la 1L, având pH-ul 6,8…7,2; la temperatura de 23…25°C, iluminarea de 2000…3000 lx/cm^2, cu agitarea lentă periodică, **caracterizat prin aceea că** mediul conţine suplimentar compusul sulfato-bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridin-cobalt(II) monometanol trihidrat în concentraţia de 0,019…0,021 g/L.

Şef secţie: IUSTIN Viorel

Examinator: LUPAŞCU Lucian

Redactor: LOZOVANU Maria