



MD 4255 B1 2013.10.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4255** (13) **B1**
(51) Int.Cl.: *C07F 15/06* (2006.01)
C07C 331/16 (2006.01)
C07D 213/88 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2012 0101 (22) Data depozit: 2012.11.05	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2013.10.31, BOPI nr. 10/2013
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: RUDIC Valeriu, MD; DANILESCU Olga, MD; BULHAC Ion, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD; MITINA Tatiana, MD; RIJA Andrei, MD; MISCU Vera, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; SADOVNIC Daniela, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol (metanol)(acva)cobalt(II) și procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia**

(57) Rezumat:

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

Conform invenției, se revendică un compus coordinativ – tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol (metanol)(acva)cobalt(II).

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 conține, g/L: NaNO₃ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; MgSO₄·7H₂O - 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05;

2
K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,00027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002; CuSO₄·5H₂O - 0,00005; 5 MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005, compusul tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol (metanol)(acva)cobalt(II) - 0,021...0,023 g/L și apă distilată până 10 la 1 L, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică.

15 Rezultatul constă în majorarea activității antioxidante a extractului etanolic obținut din biomasa de microalgă.

Revendicări: 2

MD 4255 B1 2013.10.31

(54) Tetraisothiocyanatocobaltate of bis(nicotinoylhydrazone)-2,6-diformil-4-methylphenol(methanol)(aqua)cobalt(II) and process for cultivation of microalga *Porphyridium cruentum* with the use thereof

(57) Abstract:

1
The invention relates to chemistry and biotechnology, in particular 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 – tetraisothiocyanatocobaltate of bis(nicotinoylhydrazone)-2,6-diformil-4-methylphenol(methanol)(aqua)cobalt(II) 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, g/L: NaNO₃ – 5.0; NaCl – 7.0; KCl – 7.5; MgSO₄·7H₂O – 1.8; Ca(NO₃)₂·4H₂O – 0.15; KBr – 0.05; KI – 0.05; K₂HPO₄ – 0.2; FeCl₃·6H₂O –

2
0.00027; ZnSO₄·5H₂O – 0.00002; CuSO₄·5H₂O – 0.00005; MnSO₄·5H₂O – 0.0003; H₃BO₃ – 0.0006; MoO₃ – 0.00002; NaVO₃ – 0.00005; the compound tetraisothiocyanatocobaltate of bis(nicotinoylhydrazone)-2,6-diformil-4-methylphenol(methanol)(aqua)cobalt(II) – 0.021...0.023 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/cm², with slow intermittent agitation.

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

Claims: 2

(54) Тетраизоотицианатокобальтат бис(никотиноилгидразона)-2,6-диформил-4-метилфенол(метанол)(аква)кобальт(II) 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 – тетраизоотицианатокобальтат бис(никотиноилгидразона)-2,6-диформил-4-метилфенол(метанол)(аква)кобальт(II).

Также, заявляется способ культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum*, который состоит в том, что культивируется микроводоросль на питательной среде, которая содержит, г/л: NaNO₃ – 5,0; NaCl – 7,0; KCl – 7,5; MgSO₄ · 7H₂O – 1,8; Ca (NO₃)₂ · 4H₂O – 0,15;

2
KBr – 0,05; KI – 0,05; K₂HPO₄ – 0,2; FeCl₃ · 6H₂O – 0,00027; ZnSO₄ · 5H₂O – 0,00002; CuSO₄ · 5H₂O – 0,00005; MnSO₄ · 5H₂O – 0,0003; H₃BO₃ – 0,0006; MoO₃ – 0,00002; NaVO₃ – 0,00005; соединение тетраизоотицианатокобальтат бис(никотиноилгидразона)-2,6-диформил-4-метилфенол(метанол)(аква)кобальт(II) – 0,021...0,023 г/л и дистиллированную воду до 1 л, имея pH 6,8...7,2; при температуре 23...25°C, освещении 2000...3000 лк/см², с медленным периодическим перемешиванием.

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

П. формулы: 2

Descriere:

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

5 Este cunoscut procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* pe mediul nutritiv mineral ce conține, g/L: NaNO₃ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; MgSO₄·7H₂O - 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,00027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002; CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005 și apă distilată până la
10 1L; având pH-ul 6,8...7,2, la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică. Din biomasa obținută se prepară extractul etanolic. Valoarea activității antioxidante a extractului etanolic este de 29% inhibiție ABTS⁺ [1].

15 Neajunsul acestui procedeu constă în activitatea antioxidantă joasă a extractului etanolic, obținut din biomasa de *Porphyridium cruentum* (29% inhibiție ABTS⁺).

Este cunoscut compusul coordinativ tiocianat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridină-(izotiocianato)(acva)cobalt(II) cu formula [Co^{II}(L)(NCS)(H₂O)]NCS, structura moleculară a căruia a fost stabilită prin metoda difracției cu raze X [2].

20 Neajunsul acestui complex constă în faptul că, în virtutea structurii lui, la aplicarea în calitate de adaos la cultivarea microalgei *Porphyridium cruentum*, conform procedurii expus mai sus, asigură un spor neînsemnat al activității antioxidante. Astfel, în urma testelor efectuate, activitatea antioxidantă a extractului etanolic, obținut din biomasa de *Porphyridium cruentum*, cultivată conform procedurii descris cu adaos de 0,023 g/L compus, a constituit 33% inhibiție ABTS⁺ (date nepublicate).

25 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de sporire a activității antioxidante a extractului etanolic, obținut în baza biomasei de *Porphyridium cruentum*.

30 Esența invenției constă în faptul că se propune un compus coordinativ nou – tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol(metanol)(acva)cobalt(II) cu formula [Co(H₂L)(CH₃OH)(H₂O)][Co(NCS)₄].

De asemenea, se propune un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*, care constă în aceea că se cultivă microalga pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO₃ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; MgSO₄·7H₂O - 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,00027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002;
35 CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005 și apă distilată până la 1 L, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică, totodată mediul conține suplimentar compusul tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol (metanol)(acva)cobalt(II) în concentrație de
40 0,021...0,023 g/L.

Compusul revendicat, proprietățile lui și procedeu de obținere nu sunt descrise în literatură.

45 Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea activității antioxidante a extractului etanolic, obținut în baza biomasei microalgei *Porphyridium cruentum*, cu 27,2...32,7% față de cea mai apropiată soluție. Administrarea compusului din prima zi de cultivare stimulează acumularea componentelor antioxidante în biomasa microalgei, care ulterior se extrag cu alcool etilic de 96%.

50 Rezultatul invenției este condiționat de utilizarea, pentru prima dată, a compusului tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol(metanol)(acva)cobalt(II) în calitate de stimulator al acumulării componentelor antioxidante care determină activitatea antioxidantă a extractului etanolic obținut în baza biomasei de *Porphyridium cruentum*. Compusul dat are proprietatea de a stimula acumularea în biomasa microalgei de *Porphyridium cruentum* a componentelor extractibile în etanol și care participă în reacțiile de reducere a radicalilor în calitate de donor de electroni sau de hidrogen.
55

Compusul revendicat se obține ca rezultat al reacției pe matrice de cobalt între tiocianatul de cobalt(II) trihidrat, 2,6-diformil-4-metilfenol și hidrazida acidului nicotinic în raport molar de 1:1:2 în mediu metanol-etanolic prin refluxarea masei reactante timp de 2 ore la temperatura de 60...70°C.

5 Procedeu de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile, randamentul constituie 75%. Compusul este stabil la păstrarea în aer, solubil în DMSO, DMFA, metanol, acetonitril.

Exemplu de obținere a compusului $[\text{Co}(\text{H}_2\text{L})(\text{CH}_3\text{OH})(\text{H}_2\text{O})][\text{Co}(\text{NCS})_4]$

10 $\text{Co}(\text{SCN})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ cu masa de 0,12 g (0,5 mmol) se dizolvă în 10 ml de metanol. Aparte, 0,08 g (0,5 mmol) de 2,6-diformil-4-metilfenol se dizolvă în 10 ml de metanol și 0,14 g de hidrazidă a acidului nicotinic – în 20 ml de etanol. Ambele soluții ale agenților coordinativi se filtrează, apoi se amestecă și se adaugă la soluția sării de cobalt la agitare continuă, după care masa reactantă se refluxează timp de 2 ore. În timpul refluxării culoarea acesteia trece treptat din violet-zmeuriu în verde, din care se precipită un produs cristalin omogen de aceeași culoare. Produsul se separă prin filtrare, se spală cu metanol, eter dietilic și se usucă în aer liber. S-au obținut 0,15 g, randamentul fiind de 75%. Substanța este solubilă în DMSO, DMFA, metanol, acetonitril, mai puțin solubilă în apă, practic este insolubilă în eter dietilic.

Rezultatele analizei elementelor

20 Găsit, %: Co 15,15; C 39,22; H 3,24; N 17,53.

Pentru $\text{Co}_2\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_{10}\text{O}_5\text{S}_4$

Calculat, %: Co 14,68; C 38,91; H 3,01; N 17,45.

25 Unele benzi mai importante în spectrul în IR: 3400 cm^{-1} ($\nu(\text{OH})$); 3174 cm^{-1} ($\nu(\text{NH})$); 3012 cm^{-1} ($\nu(\text{CH})_{\text{arom.}}$); 2845 cm^{-1} ($\nu(\text{CH})_{\text{ald.}}$); 2051 cm^{-1} ($\nu(\text{C}\equiv\text{N})$); 1620 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{coord.}}$, $\nu(\text{C}=\text{N})$); $1598, 1478\text{ cm}^{-1}$ (in.aromatic); 1423 cm^{-1} ($\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$); $1384, 1377\text{ cm}^{-1}$ ($\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$); 825 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{S})$); 478 cm^{-1} ($\delta(\text{NCS})$).

30 Exemple de utilizare a tetraizotiocianatocobaltului de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol(metanol)(acva)cobalt(II) în calitate de stimulator al activității antioxidante a extractului etanolic de 96%, obținut în baza biomasei microalgei *Porphyridium cruentum*.

Exemplul 1

35 Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conținut al componentelor (g/L): NaNO_3 - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,8; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K_2HPO_4 - 0,2; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,00027; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,00002; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,00005; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,0003; H_3BO_3 - 0,0006; MoO_3 - 0,00002; NaVO_3 - 0,00005 și apă distilată până la 1L. În prima zi de cultivare, la suspensia de porfiridium, în calitate de stimulator al activității antioxidante, se adaugă compusul tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol(metanol)(acva)cobalt(II) în concentrație de 0,021 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 100 ml cu 50 ml suspensie în următoarele condiții: pH-ul 6,8...7,2, la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică. La ziua a 10-a, biomasa de porfiridium se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se prepară extractul etanolic în care se determină activitatea antioxidantă cu aplicarea testului ABTS⁺.

45 Extractul etanolic are activitatea antioxidantă de 40,7±1,04% inhibiție ABTS⁺, față de 32% inhibiție ABTS⁺ în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul, conform procedurii descris [1] cu suplimentarea $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})]\text{NCS}$). Sporul activității antioxidante este de 27,2%.

Exemplul 2

Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conținut al componentelor (g/L):
 NaNO₃ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; MgSO₄·7H₂O - 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 0,15; KBr -
 5 0,05; KI - 0,05; K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,00027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002;
 CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002;
 NaVO₃ - 0,00005 și apă distilată până la 1L. În prima zi de cultivare, la suspensia de
 10 porfiridium, în calitate de stimulator al activității antioxidante, se adaugă compusul
 tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol(meta-
 nol)(acva)cobalt(II) în concentrație de 0,023 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane
 Erlenmayer a câte 100 ml cu 50 ml suspensie în următoarele condiții: pH-ul 6,8...7,2,
 temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă
 periodică. La ziua a 10-a, biomasa de porfiridium se separă de lichidul cultural, se
 15 supune demineralizării și se prepară extractul etanolic, în care se determină activitatea
 antioxidantă cu aplicarea testului ABTS⁺.

Extractul etanolic are activitatea antioxidantă de 43,8±0,84% inhibiție ABTS⁺,
 față de 33% inhibiție ABTS⁺ în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul
 activității antioxidante este de 32,7%.

Tabel

20

Activitatea antioxidantă a extractului etanolic în baza biomasei de *Porphyridium
 cruentum*, cultivată conform procedurii revendicat și celei mai apropiate soluții

Procedeu utilizat	Concentrația compusului, g/L	Activitatea antioxidantă, % inhibiție ABTS ⁺
Procedeu cunoscut	-	29±0,14
Procedeu cunoscut + [Co ^{II} (L)(NCS)(H ₂ O)]NCS	0,021	32±0,81
	0,023	33±0,12
Procedeu revendicat (cu compusul [Co(H ₂ L)(CH ₃ OH)(H ₂ O)][Co(NCS) ₄]	0,021	40,7±1,04
	0,023	43,8±0,84

25

Datele din tabel demonstrează o creștere a activității antioxidante a extractului
 etanolic, obținut în baza biomasei de *Porphyridium cruentum*, conform procedurii
 revendicat, cu 27,2...32,7%, față de soluția cea mai apropiată. Biomasa microalgei
Porphyridium cruentum reprezintă o sursă de substanțe antioxidante, iată de ce sporul
 30 activității antioxidante a extractului etanolic, obținut în baza biomasei de porfiridium,
 crește valoarea ei în calitate de producător de substanțe antioxidante.

30

Proprietățile compusului tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-
 diformil-4-metilfenol (metanol)(acva)cobalt(II) prezintă interes pentru biotehnologie
 în calitate de stimulator al activității antioxidante a biomasei microalgei *Porphyridium
 cruentum*.

35

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Rudi L., Cepoi L., Miscu V., Cojocari A., Chiriac T., Sadovnic D., Rudic V. Aprecierea activității antioxidante și antiradicalice a extractelor din *Porphyridium cruentum* prin aplicarea metodelor non-specifice. Buletinul AȘM, seria Științele vieții, nr. 3(312), 2010, p. 114-120
2. Bulhac I., Sova S., Novîchi 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, Calimanesti-Caciulata, Romania, 3-5 October 2012: Book of abstr., P.S.II.-12, p. 12

(57) Revendicări:

1. Compusul tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol (metanol)(acva)cobalt(II).

2. Procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum*, care constă în aceea că se cultivă microalga pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: NaNO₃ - 5,0; NaCl - 7,0; KCl - 7,5; MgSO₄·7H₂O - 1,8; Ca(NO₃)₂·4H₂O - 0,15; KBr - 0,05; KI - 0,05; K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,00027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002; CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005 și apă distilată până la 1 L, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare lentă periodică, **caracterizat prin aceea că** mediul conține suplimentar compusul tetraizotiocianatocobaltat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diformil-4-metilfenol (metanol)(acva)cobalt(II) în concentrație de 0,021...0,023 g/L.

Șef Secție:	IUSTIN Viorel
Examinator:	LUPAȘCU Lucian
Redactor:	LOZOVANU Maria