

Invenția se referă la chimie și biotehnologie, în special la sinteza unui nou compus coordinativ al fierului(III) cu proprietăți antioxidante, care poate fi utilizat în industria alimentară și în medicină, și la un procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia.

Este cunoscut procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* pe mediul nutritiv mineral ce conține, 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; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 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; având pH-ul 6,8...7,2, la temperatura de 23...25°C și iluminarea de 2000...3000 lx/cm² cu agitare lentă periodică. În prima zi de cultivare, mediul este suplimentat cu compusul $[\text{Fe}_3\text{O}(\text{Gly})_6(\text{H}_2\text{O})_3](\text{NO}_3)_7 \cdot 3,5\text{H}_2\text{O}$ în concentrație de 0,01 g/L. Conținutul fenolilor în biomasa de *Porfiridium* constituie 10,6...11,8 echivalent mg acid galic /g biomasă (cea mai apropiată soluție) [1].

Neajunsul acestui compus și al procedurii cunoscut constă în conținutul redus de fenoli în biomasa de *Porfiridium*. Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în obținerea unui compus nou și elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de sporire a conținutului de fenoli în biomasa de *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01, depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neptogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM la data de 09.08.2004.

Esența invenției constă în faptul că se propune un compus coordinativ nou din clasa compușilor coordinativi ai fierului(III) cu baze Schiff - bis[N'-(2-hidroxi-κO-benziliden)piridin-4-carbohidrazidat(-1)-κ²N',O]fier(III) nitrat - apă (2/3), care sporește conținutul de fenoli în biomasa de *Porphyridium cruentum*.

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: 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; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 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, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C și iluminarea de 2000...3000 lx/cm², cu agitare periodică, totodată mediul conține suplimentar compusul bis[N'-(2-hidroxi-κO-benziliden)piridin-4-carbohidrazidat(-1)-κ²N',O]fier(III) nitrat - apă (2/3) în concentrație de 0,01...0,012 g/L.

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

Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea conținutului de fenoli în biomasa microalgei *Porphyridium cruentum* cu 17...18% față de cea mai apropiată soluție. Administrarea compusului din prima zi de cultivare stimulează acumularea componentelor fenolice în biomasa microalgei, care sporesc valoarea biomasei de *Porfiridium* în calitate de producător de antioxidanți.

Rezultatul invenției este condiționat de aplicarea, pentru prima dată, a compusului bis[N'-(2-hidroxi-κO-benziliden)piridin-4-carbohidrazidat(-1)-κ²N',O]fier(III) nitrat - apă (2/3) în calitate de stimulator al biosintezei componentelor fenolice, care se determină în biomasa de *Porphyridium cruentum*. Compusul revendicat se obține la agitarea amestecului ce conține sarea $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ și ligandul izonicotinoilhidrazona-2-hidroxi-benzaldehidă (H_2L) în raport molar de 1:2 în etanol. Reacția decurge timp de jumătate de oră.

Procedeu de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile, randamentul constituie 70%. Compusul este stabil la contact cu aerul, solubil în etanol la încălzire, acetonitril, practic insolubil în apă.

Exemplu de obținere a compusului bis[N'-(2-hidroxi-κO-benziliden)piridin-4-carbohidrazidat(-1)-κ²N',O]fier(III) nitrat - apă (2/3).

La soluția de 0,10 g (0,25 mmol) de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ în 20 ml de etanol se adaugă 0,12 g (0,5 mmol) de izonicotinoilhidrazona-2-hidroxi-benzaldehidă (H_2L). Amestecul obținut se încălzește la baia marină cu agitare permanentă timp de 30 min. La răcire, din soluția de culoare cafenie-închisă se obține un precipitat fin de culoare neagră, care se separă, se spală cu etanol, eter dietilic și se usucă în aer. Randamentul este de 0,11 g (70%).

S-a determinat, %: C 50,03; H 4,90; N 15,78. Pentru $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{FeN}_7\text{O}_{8,5}$ s-a calculat, %: C 49,94; H 3,71; N 15,68.

Cercetarea sub microscop a compusului coordinativ sintetizat demonstrează că acesta posedă omogenitate fazică. Pentru a elucidă compoziția și structura lui s-a aplicat metoda analizei elementelor și spectroscopia în IR.

În spectrul IR al ligandului necoordinat se observă o bandă pronunțată la 1678 cm⁻¹, care corespunde oscilațiilor de valență ale grupei ν(C=O). În spectrul complexului această bandă dispăre în urma fenomenului de enolizare. De asemenea, în spectrul compusului fierului dispăre banda de absorbție ν(NH), însă apar benzi de absorbție noi, și anume: la 2567 și 2118 cm⁻¹ caracteristice pentru oscilațiile PyH^+ , apărute în urma transferului protonului de la grupa NH la azotul heterociclic, formând PyH^+ (S. B. Kalia, K. Lumba, G. Kaushal, M. Sharma. Indian J. Chem., 2007, 46A, 1233-1239; J.-X. Wang, X.-Z. Li, L.-N. Zhu, J.-Y. Wang, H. Qu. J. Chem. Crystallogr., 2010, V40, 726-730; Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. Изд-во Иностранной литературы. Москва, 1963, 590 p.).

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și cercetărilor spectroscopice a fost stabilită compoziția și structura compusului revendicat. Ionul de fier(III) manifestă numărul de coordinare 6 cu două molecule de ligand tridentat ONO și are o configurație spațială octaedrică cu ionul nitrat în sfera externă. Structura propusă pentru compusul coordinativ: bis[N'-(2-hidroxi-κO-benziliden)piridin-4-carbohidrazidat(1)-κ²N',O]fier(III) nitrat - apă (2/3) este prezentată în figură.

Exemple de aplicare a compusului bis[N¹-(2-hidroxi-κO-benziliden)piridin-4-carbohidrazidat(-1)-κ²N¹,O]fier(III) nitrat – apă (2/3) în calitate de biostimulator al sintezei componentelor fenolice în biomasa microalgei *Porphyridium cruentum*.

Exemplul 1

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 - 0,05; KI - 0,05; K₂HPO₄ - 0,2; 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 *Porfiridium*, în calitate de biostimulator al sintezei fenolilor, se adaugă compusul bis[N¹-(2-hidroxi-κO-benziliden)piridin-4-carbohidrazidat(-1)-κ²N¹,O]fier(III) nitrat – apă (2/3) în concentrație de 0,01 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 1000 ml cu 500 ml suspensie în următoarele condiții: pH-ul 6,8...7,2, temperatura de 23...25°C, iluminare 2000...3000 lx, cu agitare lentă periodică. La ziua a 10-a, biomasa de *Porfiridium* se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se standardizează după biomasă. În biomasa obținută se determină conținutul fenolilor cu aplicarea metodei Folin-Ciocalteu.

Biomasa de *Porfiridium* conține 13,8±0,04 (p<0,5) mg acid galic echivalent/g biomasă, față de 11,8 mg acid galic echivalent/g biomasă în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul conținutului de fenoli este de 17%.

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 - 0,05; KI - 0,05; K₂HPO₄ - 0,2; 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 *Porfiridium*, în calitate de biostimulator al sintezei fenolilor, se adaugă compusul bis[N¹-(2-hidroxi-κO-benziliden)piridin-4-carbohidrazidat(-1)-κ²N¹,O]fier(III) nitrat – apă (2/3) în concentrația de 0,012 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 1000 ml cu 500 ml suspensie în următoarele condiții: pH-ul 6,8...7,2, temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx, cu agitare lentă periodică. La ziua a 10-a, biomasa de *Porfiridium* se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se standardizează după biomasă. În biomasa obținută se determină conținutul fenolilor cu aplicarea metodei Folin-Ciocalteu.

Biomasa de *Porfiridium* conține 14,0±0,05 (p<0,5) mg acid galic echivalent/g biomasă, față de 11,8 mg acid galic echivalent/g biomasă în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul conținutului de fenoli este de 18%.

Tabel

Conținutul fenolilor în extractul etanolic de 96%, obținut în baza biomasei de *Porphyridium cruentum*, la cultivarea conform procedurii revendicate și celei mai apropiate soluții

Procedeu aplicat	Concentrația compusului, g/L	Conținutul fenolilor, echivalent mg acid galic /g biomasă
Conform celei mai apropiate soluții [Fe ₃ O(Gly) ₆ (H ₂ O) ₃](NO ₃) ₇ ·3,5H ₂ O	0,01	10,6...11,8
Conform soluției revendicate	0,01	13,8±0,04
	0,012	14,0±0,05

Datele din tabel demonstrează o creștere a conținutului de fenoli în biomasa de *Porphyridium cruentum* cu 17...18% conform procedurii revendicate, față de procedeu din cea mai apropiată soluție. Biomasa microalgei *Porphyridium cruentum* reprezintă o sursă modernă de substanțe antioxidante, iată de ce sporul conținutului de fenoli este un factor al creșterii valorii microalgei în calitate de producător de substanțe cu efect antioxidant.

Proprietățile compusului bis[N¹-(2-hidroxi-κO-benziliden)piridin-4-carbohidrazidat(-1)-κ²N¹,O]fier(III) nitrat – apă (2/3) prezintă interes pentru biotehnologie în calitate de biostimulator al sintezei fenolilor, compuși cu proprietăți antioxidante, în biomasa microalgei *Porphyridium cruentum*.