

Invenția se referă la chimie și biotehnologie, în special la sinteza unui nou compus coordinativ al fierului(II) 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.

Compusul coordinativ este propus spre aplicare în biotehnologiile de tip intensiv în scopul obținerii de biomasă cu un potențial antioxidant sporit. Biomasă obținută este utilizată în calitate de materie primă pentru obținerea produselor antioxidante, care pot fi utilizate în procesarea produselor alimentare și în scopuri medicale în calitate de antioxidanți (Rudic Valeriu ș.a. Ficobiotehnologie - cercetări fundamentale și realizări practice. Tipografia "Elena V.I." SRL, Chișinău, 2007, 365 p.).

Este cunoscut procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* pe mediul mineral nutritiv ce conține, g/L:  $\text{NaNO}_3$  - 5,0;  $\text{NaCl}$  - 7,0;  $\text{KCl}$  - 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;  $\text{KBr}$  - 0,05;  $\text{KI}$  - 0,05;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 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;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,0006;  $\text{MoO}_3$  - 0,00002;  $\text{NaVO}_3$  - 0,00005 și apă distilată până la 1 litru; având pH-ul 6,8...7,2, la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx, 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 concentrația de 0,001 g/L. Conținutul de fenoli în biomasă de *Porphyridium* constituie 10,6...11,8 echivalent mg acid galic/g biomasă [1].

Neajunsul compusului și al procedurii cunoscut constă în conținutul redus de fenoli în biomasă de *Porphyridium*.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în sinteza unui compus nou și în elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de sporire a conținutului de fenoli în biomasă de *Porphyridium cruentum* CNMN-AR-01.

Esența invenției constă în faptul că se propune un compus coordinativ nou - bis[1-fenil-3-metil-6-(piridinium-4-il)-4,5-diaza-hexa-1,3-dien-1-hidroxi-6-olato(-2)- $\text{O}^1, \text{N}^4, \text{O}^6$ ] fier(II) sulfat tetrahidrat, obținut prin interacțiunea izonicotinoilhidrazoni 1-fenil-1,3-butandionei și a sulfatului de fier(II) în raport molar de 2:1 ( $[\text{Fe}(\text{L})_2]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).

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:  $\text{NaNO}_3$  - 5,0;  $\text{NaCl}$  - 7,0;  $\text{KCl}$  - 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;  $\text{KBr}$  - 0,05;  $\text{KI}$  - 0,05;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 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;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,0006;  $\text{MoO}_3$  - 0,00002;  $\text{NaVO}_3$  - 0,00005, suplimentat cu compusul bis[1-fenil-3-metil-6-(piridinium-4-il)-4,5-diaza-hexa-1,3-dien-1-hidroxi-6-olato(-2)- $\text{O}^1, \text{N}^4, \text{O}^6$ ] fier(II) sulfat tetrahidrat - 0,011...0,012 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/cm<sup>2</sup>, cu agitare lentă periodică.

Conținutul de fenoli, determinat prin metoda Folin-Ciocalteu, în biomasă de *Porphyridium* este de 13,6...13,8 echivalent mg acid galic /g biomasă.

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

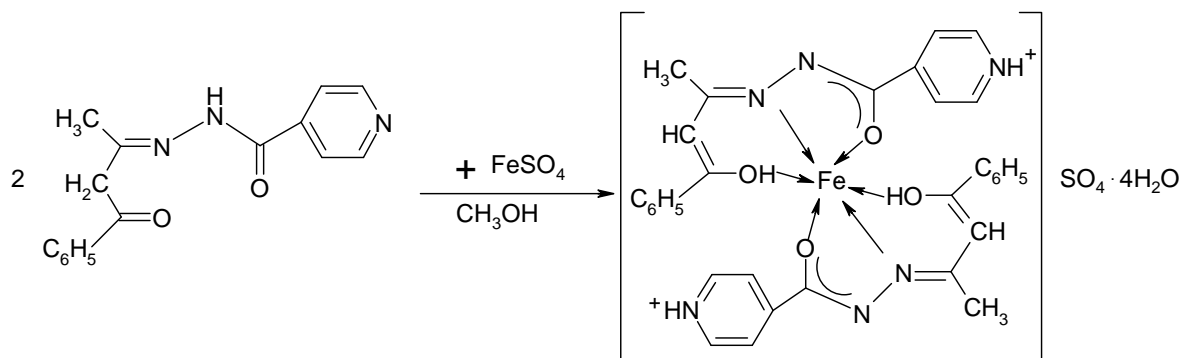
Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea conținutului de fenoli în biomasă microalgei *Porphyridium cruentum* cu 15...17% față de cea mai apropiată soluție. Administrarea compusului din prima zi de cultivare stimulează acumularea componentelor fenolice în biomasă microalgei, care sporesc valoarea biomasei de *Porphyridium* în calitate de producător de antioxidanți.

Rezultatul invenției este condiționat de aplicarea pentru prima dată a compusului bis[1-fenil-3-metil-6-(piridinium-4-il)-4,5-diaza-hexa-1,3-dien-1-hidroxi-6-olato(-2)- $\text{O}^1, \text{N}^4, \text{O}^6$ ] fier(II) sulfat tetrahidrat în calitate de stimulator al biosintezei componentelor fenolice de către microalga *Porphyridium cruentum*.

#### Exemplu de realizare a invenției

Metodă de obținere a compusului revendicat

În urma reacției dintre izonicotinoilhidrazona 1-fenil-1,3-butandionei și sulfatul de fier(II) în raport molar de 2:1, la agitare în atmosferă inertă, se obține combinația complexă sub formă de cristale de culoare verde, care decurge conform schemei:



Schema I. Obținerea compusului  $[\text{Fe}(\text{L})_2]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Structura ligandului necoordinat stabilită cu raze X este prezentată în figură, în care la împachetarea cristalină are loc formarea legăturilor de hidrogen cu participarea grupelor C=O și NH. În spectrul IR al ligandului liber se manifestă benzile  $\nu(\text{NH})=3218 \text{ cm}^{-1}$  și  $\nu(\text{C=O})=1664 \text{ cm}^{-1}$ .

Compusul obținut a fost apreciat prin analiza chimică elementală și spectrele IR înregistrate în domeniul 4000...400  $\text{cm}^{-1}$ .

Spectrul în IR se caracterizează prin prezența a două benzi late în regiunea 3500...3200  $\text{cm}^{-1}$ , care pot fi atribuite  $\nu(\text{OH})$  asociate, absorbție largă în regiunea 3100...3000  $\text{cm}^{-1}$ , care conține câteva benzi  $\nu(\text{CH})$  ale inelelor benzenic și heterociclic, 2930...2850  $\text{cm}^{-1}$   $\nu(\text{CH}_3)$ , două benzi late de intensitate slabă la 2612 și 2148  $\text{cm}^{-1}$ , care pot fi atribuite oscilațiilor  $=\text{NH}^+$  (azotul heterociclic protonat) (Беллами Л. Инфракрасные спектры сложных молекул. Издательство иностранной литературы, Москва, 1963, 592 p., Накамото К. ИК спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений. Москва, Мир, 1991, 536 p., Тарасевич Б. Н. ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы, Москва, 2012, 54 p.).

Dispariția benzii de absorbție  $\nu(\text{C=O})$  a fragmentului hidrazidei acidului izonicotinic și manifestarea unei benzi intensive la 1303  $\text{cm}^{-1}$  confirmă faptul că ligandul coordinează la atomul de fier în formă enolică. Banda de intensitate medie la 1631  $\text{cm}^{-1}$  este atribuită oscilațiilor  $\nu(\text{C=N})$  și  $\nu(\text{C=C})$ . Oscilațiile  $\nu(\text{N-N})$  se manifestă printr-o bandă de intensitate medie la 841  $\text{cm}^{-1}$ . Prezența celei mai intensive benzi de absorbție la 1079  $\text{cm}^{-1}$  indică cu siguranță prezența anionului  $\text{SO}_4^{2-}$  în complex.

Conform datelor analizei elementale și spectroscopiei IR pentru complexul dat se propune formula  $[\text{Fe}(\text{L})_2]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

Datele structurale ale ligandului necoordinat și cele spectrale ale ligandului și complexului fierului conduc la concluzia că ligandul coordinează la metal ca unul tridentat (setul de atomi ONO) și nedeprorat cu delocalizarea electronilor pe legăturile N-C-O ale fragmentului amidic și migrația protonului de la grupa N-H a acestui fragment la atomul de azot heterociclic, confirmând componența complexului  $[\text{Fe}(\text{L})_2]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Jin-Xiu Wang, Xiao-Zeng Li, Li-Na Zhu, Ji-Yao Wang, Hao Qu. Synthesis and Crystal Structure of a Fe(III) Complex with an Isonicotinyl Ligand,  $[\text{Fe}(\text{N-Isonicotinamidosalicylaldehyde})\text{Cl}_2]$ . J. Chem. Crystallogr. (2010) 40: 726-730 DOI 10.1007/s10870-010-9726-6).

Metodă de obținere a  $[\text{Fe}(\text{L})_2]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Reacția are loc în atmosferă inertă, prin barbotare cu argon.

0,2 g de izonicotinoilhidrazona 1-fenil-1,3-butandionei se dizolvă în 10 ml metanol. La soluția obținută se adaugă soluția formată din 0,1 g  $\text{FeSO}_4$  dizolvat în 5 ml de apă. Din soluția obținută de culoare neagră cad cristale mărunte de culoare cafenie, care se separă de soluția-mamă prin filtrare, se spală cu metanol și eter dietilic și se usucă la aer. Se obțin 0,14 g (randamentul reacției este de 44,6%).

Compusul este solubil în clorofom, dimetilformamidă, dimetilsulfoxidă, etanol, metanol și insolubil în apă.

Rezultatele analizei elementale pentru  $[\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_4\text{Fe}]\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ( $M = 786 \text{ g}$ ):

găsit: C, 46,45; H, 4,64; N, 10,85; Fe, 8,00.

calculat: C, 48, 58; H, 4,83; N, 10,69; Fe, 7,13.

Exemple de aplicare a compusului bis[1-fenil-3-metil-6-(piridinium-4-il)-4,5-diaza-hexa-1,3-dien-1-hidroxi-6-olato(-2)- $\text{O}^1, \text{N}^4, \text{O}^6$ ] fier(II) sulfat tetrahidrat în calitate de stimulator al acumulării componentelor fenolice în biomasa microalgei *Porphyridium cruentum*.

#### Exemplul 1

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următorul conținut al componentelor (g/L):  $\text{NaNO}_3$  - 5,0;  $\text{NaCl}$  - 7,0;  $\text{KCl}$  - 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;  $\text{KBr}$  - 0,05;  $\text{KI}$  - 0,05;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 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;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,0006;  $\text{MoO}_3$  - 0,00002;  $\text{NaVO}_3$  - 0,00005 și apă distilată până la 1 litru. În prima zi de cultivare la suspensia de *Porphyridium*, în calitate de stimulator al biosintezei fenolilor, se adaugă compusul bis[1-fenil-3-metil-6-(piridinium-4-il)-4,5-diaza-hexa-1,3-dien-1-hidroxi-6-olato(-2)- $\text{O}^1, \text{N}^4, \text{O}^6$ ] fier(II) – sulfat tetrahidrat în concentrație de 0,011 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, agitare lentă periodică. La ziua a 10-a, biomasa de *Porphyridium* se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se standardizează după biomasa. În biomasa obținută se determină conținutul de fenoli cu aplicarea metodei Folin-Ciocalteu.

Biomasa de *Porphyridium* conține  $13,6 \pm 0,06$  ( $p < 0,5$ ) mg acid galic echivalent/g biomasa, față de 11,8 mg acid galic echivalent/g biomasa în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul conținutului de fenoli este de 15%.

#### Exemplul 2

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următorul conținut al componentelor (g/L):  $\text{NaNO}_3$  - 5,0;  $\text{NaCl}$  - 7,0;  $\text{KCl}$  - 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;  $\text{KBr}$  - 0,05;  $\text{KI}$  - 0,05;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 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;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,0006;  $\text{MoO}_3$  - 0,00002;  $\text{NaVO}_3$  - 0,00005 și apă distilată până la 1 litru. În prima zi de cultivare la suspensia de *Porphyridium*, în calitate de stimulator al biosintezei fenolilor, se adaugă compusul bis[1-fenil-3-metil-6-(piridinium-4-il)-4,5-diaza-hexa-1,3-dien-1-hidroxi-6-olato(-2)- $\text{O}^1, \text{N}^4, \text{O}^6$ ] fier(II) sulfat tetrahidrat în concentrație 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, agitare lentă periodică. La ziua a 10-a, biomasa de Porphyridium se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se standardizează după biomasă. În biomasa obținută se determină conținutul de fenoli cu aplicarea metodei Folin-Ciocalteu. Biomasa de Porphyridium conține  $13,8 \pm 0,04$  ( $p < 0,5$ ) mg acid galic echivalent/g biomasă, față de  $0,88$  mg acid galic echivalent/g biomasă în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul conținutului de fenoli este de 17%.

Tabel

Conținutul de fenoli în biomasa de Porphyridium cruentum, obținută la cultivare conform procedurii revendicate și celei mai apropiate soluții

Procedeul aplicat	Concentrația compusului, g/L	Conținutul de fenoli, echivalent mg acid galic /g biomasă
Cea mai apropiată soluție	0,01	10,6...11,8
Soluția revendicată	0,011	13,6 $\pm$ 0,06
	0,012	13,8 $\pm$ 0,04

Datele din tabel demonstrează o creștere a conținutului de fenoli în biomasa de Porphyridium cruentum cu 15...17% conform procedurii revendicate, față de procedeul cel mai apropiat. Biomasa microalgei Porphyridium cruentum reprezintă o sursă modernă de substanțe antioxidante, iată de ce sporul conținutului de fenoli este un factor al creșterii valorii porfiridului în calitate de producător de substanțe cu efect antioxidant. Proprietățile compusului bis[1-fenil-3-metil-6-(piridinium-4-il)-4,5-diaza-hexa-1,3-dien-1-hidroxi-6-olato(-2)-O<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>,O<sup>6</sup>]fier(II) sulfat tetrahidrat prezintă interes pentru biotehnologie în calitate de stimulator al producerii fenolilor, compuși cu proprietăți antioxidante, în biomasa microalgei Porphyridium cruentum.