



MD 4303 C1 2015.04.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4303** (13) **C1**
(51) Int.Cl.: *C07F 15/06* (2006.01)
C07D 213/88 (2006.01)
C07D 251/70 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

<p>(21) Nr. depozit: a 2013 0041 (22) Data depozit: 2013.07.05</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2014.09.30, BOPI nr. 9/2014</p>
<p>(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p> <p>(72) Inventatori: GUSINA Liudmila, MD; RUDIC Valeriu, MD; DRAGANCEA Diana, MD; CEPOI Liliana, MD; BULHAC Ion, MD; RUDI Liudmila, MD; MISCU Vera, MD; CHIRIAC Tatiana, MD; SADOVNIC Daniela, MD</p> <p>(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD</p>	

(54) **Bis(dimetilgloximato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III) și procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* cu utilizarea acestuia**

(57) Rezumat:

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

Conform invenției, se revendică un compus coordinativ – bis(dimetilgloximato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III).

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;

K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,0027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002; CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005; compusul bis(dimetilgloximato) cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III) - 0,010...0,014 g/L 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.

Rezultatul constă în majorarea conținutului de lipide și de acid eicosapentaenoic în biomasa absolut uscată de microalgă.

Revendicări: 2

MD 4303 C1 2015.04.30

(54) Bis(dimethylglyoximato)chloro(isonicotinoylhydrazone-2-hydroxy-1-naphthaldehyde)cobalt(III) and process for cultivation of *Porphyridium cruentum* microalga 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(III) and a process for cultivation of *Porphyridium cruentum* microalga with the use thereof.

According to the invention, a coordinative compound – bis(dimethylglyoximato)chloro(isonicotinoylhydrazone-2-hydroxy-1-naphthaldehyde)cobalt(III) is claimed.

It is also claimed a process for cultivation of *Porphyridium cruentum* microalga, consisting in that microalga is cultivated on a nutrient medium, comprising in 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 –

2
0.05; K_2HPO_4 – 0.2; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.0027; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 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; bis(dimethylglyoximato)chloro(isonicotinoylhydrazone-2-hydroxy-1-naphthaldehyde)cobalt(III) compound – 0.010...0.014 g/L and distilled water up to 1 L, having a pH of 6.8...7.2; at the temperature of 23...25°C and the lighting of 2000...3000 lx/cm².

The result is to increase the amount of lipids and eicosapentaenoic acid in the absolutely dry biomass of microalga.

Claims: 2

(54) Бис(диметилглиоксимато)хлоро(изоникотиноилгидразон-2-гидрокси-1-нафтальдегид)кобальта(III) 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(III) и к способу культивирования микроводоросли *Porphyridium cruentum* с его использованием.

Согласно изобретению, заявляется координационное соединение – бис(диметилглиоксимато)хлоро(изоникотиноилгидразон-2-гидрокси-1-нафтальдегид)кобальта(III).

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; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,8; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,15;

2
 KBr – 0,05; KI – 0,05; K_2HPO_4 – 0,2; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0027; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 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; соединение бис(диметилглиоксимато)хлоро(изоникотиноилгидразон-2-гидрокси-1-нафтальдегид)кобальта(III) – 0,010 ... 0,014 г/л и дистиллированная вода до 1 л, имея pH 6,8 ... 7,2; при температуре 23 ... 25°C, освещении в 2000 ... 3000 лк/см².

Результат состоит в повышении количества липидов и ейкосапентаеновой кислоты в абсолютно сухой биомассы микроводоросли.

П. формулы: 2

Descriere:

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

5 Este cunoscut procedeu de cultivare a microalgei *Porphyridium cruentum* pe un mediu 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; 1,0 mL de soluție de microelemente care conține în g/L: FeCl₃·6H₂O - 2,7; ZnSO₄·5H₂O - 0,02; CuSO₄·5H₂O - 0,05; MnSO₄·5H₂O - 0,3; H₃BO₃ - 0,6; MoO₃ - 0,02; NaVO₃ - 0,05 și apă distilată până la 1 L; cu pH-ul 6,8...7,2, la temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm². De asemenea este cunoscut compusul 10 1,2[Co(NH₃)Bren₂]S₂O₆ care se suplimentează în mediul mineral menționat în calitate de stimulator al conținutului de lipide și de acid eicosapentaenoic [1].

15 Neajunsul acestui procedeu și al compusului suplimentat constă în conținutul redus al lipidelor și al acidului eicosapentaenoic în biomasa absolut uscată (BAU) de *Porphyridium cruentum*.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui compus și a unui procedeu eficient și reproductibil pentru sporirea conținutului de lipide și de acid eicosapentaenoic în biomasa de *Porphyridium cruentum*.

20 Esența invenției constă în faptul că se propune un compus coordinativ – bis(dimetilglioximato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III).

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; K₂HPO₄ - 0,2; FeCl₃·6H₂O - 0,0027; ZnSO₄·5H₂O - 0,00002; CuSO₄·5H₂O - 0,00005; MnSO₄·5H₂O - 0,0003; 25 H₃BO₃ - 0,0006; MoO₃ - 0,00002; NaVO₃ - 0,00005; compusul bis(dimetilglioximato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III) - 0,010...0,014 g/L și apă distilată până la 1 L, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C și iluminarea de 2000...3000 lx/cm².

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

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea biomasei de *Porphyridium cruentum* cu un conținut de lipide mai mare cu 12,5...41,5% și a cantității acidului eicosapentaenoic de 2,0...2,5 ori mai mare față de cea mai apropiată soluție. Administrarea compusului din prima zi de cultivare stimulează acumularea lipidelor și a acidului eicosapentaenoic în biomasa microalgei.

35 Rezultatul invenției este condiționat de utilizarea, pentru prima dată, a compusului bis(dimetilglioximato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III) în calitate de stimulator al acumulării lipidelor și al biosintezei acidului gras eicosapentaenoic în biomasa de *Porphyridium cruentum*. Compusul dat în concentrația propusă se manifestă în calitate de stimulator al lipidogenezei la *Porphyridium cruentum*, fapt confirmat prin lipsa unui efect inhibitor asupra producerii de biomasă.

40 Compusul revendicat se obține la interacțiunea soluției apoase de [Co^{III}Cl(DmgH)₂]H₂O cu soluția de izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă (H₂L) în amestecul de solvenți etanol-dimetilformamidă (2:1 după volum) în raport molar de 1:1. Reacția decurge timp de 10 min.

45 Procedeu de obținere a compusului revendicat este simplu în executare, substanțele inițiale sunt accesibile, randamentul constituie 82%. Compusul este stabil la contactul cu aerul, solubil în dimetilsulfoxid, puțin solubil în dimetilformamidă, practic insolubil în alcoolii și în apă.

Exemplu de obținere a bis(dimetilglioximato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III).

50 Soluția de 0,10 g (0,3 mmol) de [Co^{III}Cl(DmgH)₂]H₂O în 10 mL de apă se amestecă cu soluția de 0,09 g (0,3 mmol) de izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă (H₂L) în amestecul de solvenți ce conține 10 mL etanol și 5 mL dimetilformamidă. Amestecul obținut se încălzește pe o baie la 50°C cu agitare permanentă timp de 10 min. Din soluția de culoare cafenie-închisă se obține un precipitat de culoare maro, care este separat, spălat cu etanol, eter dietilic și uscat în aer.

S-a determinat, %: Co 9,55; C 48,50; H 4,68; N 15,67. Pentru C₂₅H₂₈CoClN₇O₆ s-a calculat, %: Co 9,62; C 48,66; H 4,84; N 15,89.

55 Cercetarea sub microscop a compusului coordinativ sintetizat demonstrează că acesta posedă omogenitate fazică. Pentru a elucida compoziția și structura lui au fost utilizate metoda analizei elementelor, spectroscopia în IR și RMN.

În spectrul IR se manifestă o bandă lată la 3394 cm^{-1} , care este atribuită de grupa fenolică $\nu(\text{OH})$ ce participă la formarea legăturilor de hidrogen, 3194 cm^{-1} ($\nu(\text{NH})$), 3052 cm^{-1} ($\nu(\text{CH})$ in. arom.), 2836 cm^{-1} ($\nu(\text{CH})$ ald.), 1672 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})$), 1657 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{N})$), 1623 cm^{-1} ($\delta(\text{NH})$), 1598 , 1507 și 1467 cm^{-1} (in. arom.), 1453 și 1390 respectiv δ_{as} și δ_{s} (CH_3)dimetilgloxima, 1237 și 1085 respectiv ν_{as} și ν_{s} (NO)ionizat dioxima, 977 cm^{-1} ($\gamma(\text{CNO})$).

Din spectrele în IR este evident că atomul de cobalt(III) manifestă numărul de coordinare (6) și are o configurație spațială octaedrică distorsionată, în care doi monoanioni de dimetilgloximă, stabilizați cu două legături de hidrogen de tipul $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$, ocupă planul ecuatorial al octaedrului. Coordinata axială este ocupată de un anion de Cl, în poziția *trans* față de care coordinează

molecula de H_2L prin intermediul atomului de azot heterociclic.

Astfel, în baza rezultatelor analizei elementelor și cercetărilor spectroscopice a fost stabilită compoziția și structura probabilă a compusului revendicat, care este analogică cu structura altui compus din această clasă, $[\text{Co}^{\text{III}}(\text{DmgH})_2(\text{H}_2\text{L})\text{Cl}]$, unde H_2L este izonicotinoilhidrazona-2-hidroxi-1-benzaldehidă (Gusina L., Shova S., Bulhac I., Dragancea D. Synthesis and crystal structure of a cobalt(III) complex with dioxime and salicylaldehyde isonicotinoilhydrazone ligands. A XXXI-a Conferință Națională de Chimie, 6-8 octombrie 2010, Ramnicu Valcea, România, p. 102), structura căruia a fost descifrată cu ajutorul razelor X.

Exemple de utilizare a compusului bis(dimetilgloximato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III) în calitate de stimulator al lipidogenezei la microalga *Porphyridium cruentum*

Exemplul 1

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; 1,0 mL de soluție de microelemente care conține, în g/L: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 2,7; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,02; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; H_3BO_3 - 0,6; MoO_3 - 0,02; NaVO_3 - 0,05 și apă distilată până la 1L. În prima zi de cultivare, la suspensia de microalgă, în calitate de stimulator al activității antioxidante se adaugă compusul bis(dimetilgloximato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III) în concentrație de 0,010 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 100 mL cu 50 mL de suspensie în următoarele condiții: pH-ul 6,8...7,2, temperatura de 23...25°C, iluminarea de 2000...3000 lx/cm², la agitare lentă periodică. Conținutul de lipide în biomasa obținută constituie 13,50±0,64%, față de 12,0% BAU în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Conținutul acidului eicosapentaenoic este de 2,40% BAU față de 1,20% BAU în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul).

În condiții identice de cultivare, la suplimentarea mediului de cultivare cu compusul 1,2[Co(NH₃)Bren₂]S₂O₆ în concentrație de 0,01 g/L a fost obținută biomasa de *Porphyridium cruentum*. Conținutul de lipide în biomasa obținută constituie 12,0±0,22%, conținutul acidului eicosapentaenoic este de 1,20%±0,14 BAU (vezi tabelul).

Exemplul 2

Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conținut al componentelor (g/L): NaNO_3 - 5,00; 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; 1,0 ml de soluție de microelemente care conține, în g/l: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 2,7; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,02; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,3; H_3BO_3 - 0,6; MoO_3 - 0,02; NaVO_3 - 0,05 și apă distilată până la 1 L. În prima zi de cultivare, la suspensia de microalgă, în calitate de stimulator al activității antioxidante se adaugă compusul bis (dimetilgloximato) cloro (izonicotinoilhidrazonă - 2 - hidroxi - 1 - naftaldehidă) cobalt (III) în concentrație de 0,014 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, la agitare lentă periodică. Conținutul de lipide în biomasa obținută constituie 14,15±1,02%, față de 10,0% BAU în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Conținutul de acid eicosapentaenoic este de 2,02% BAU față de 0,8% BAU în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul).

În condiții identice de cultivare, la suplimentarea mediului de cultivare cu compusul 1,2[Co(NH₃)Bren₂]S₂O₆ în concentrație de 0,014 g/L a fost obinută biomasa de *Porphyridium cruentum*, în care conținutul de lipide constituie 10,0±0,6%, conținutul de acid eicosapentaenoic este de 0,8%±0,12 BAU (vezi tabelul).

Conținutul de lipide și acid eicosapentaenoic în biomasa de *Porphyridium cruentum*, obținută la cultivarea conform procedurii revendicate și celei mai apropiate soluții

Procedura utilizată	Concentrația compusului, g/L	Conținutul de lipide, % BAU/conținutul de acid eicosapentaenoic, % BAU
Procedura cunoscută + 1,2[Co(NH ₃) ₂ Bren ₂]S ₂ O ₆	0,010	12,0±0,22 / 1,2±0,14
	0,014	10,0±0,6 / 0,8±0,12
Procedura revendicată (cu compusul Co ^{III} (DmgH) ₂ (H ₂ L)Cl)	0,010	13,5±0,64 / 2,4±1,10
	0,014	14,15±1,02 / 2,02±1,02

- 5 Datele din tabel demonstrează creșterea conținutului de lipide în biomasa de *Porphyridium cruentum* cu 12,5...41,5% conform procedurii revendicate față de procedura cea mai apropiată și sporul de 2,0...2,5 ori a conținutului de acid eicosapentaenoic. Biomasa microalgei *Porphyridium cruentum* reprezintă o sursă de acid gras omega-3 și acid eicosapentaenoic, iar de ce posibilitatea sporirii biosintezei acidului eicosapentaenoic în biomasa microalgei prezintă interes pentru
- 10 ficobiotehnologie.

Proprietățile compusului bis(dimetilglioimato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III) prezintă interes pentru biotehnologie în calitate de stimulator al lipidogenezei la microalga *Porphyridium cruentum*.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Rudi L., Cepoi L., Cojocari A., Miscu V., Iațco Iu., Rudic V. Acumularea acizilor arahidonic și eicosapentaenoic de către *Porphyridium cruentum* CNM-AR-01 sub influența cobaltului. Buletinul AȘM, seria Științele vieții, nr. 1(304), 2008, p. 126-132

(57) Revendicări:

1. Compusul bis(dimetilglioimato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III).

2. Procedura 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 - 0,0027; 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, având pH-ul 6,8...7,2; la temperatura de 23...25°C și iluminarea de 2000...3000 lx/cm², caracterizat prin aceea că mediul conține suplimentar compusul bis(dimetilglioimato)cloro(izonicotinoilhidrazonă-2-hidroxi-1-naftaldehidă)cobalt(III) în concentrația de 0,010...0,014 g/L.

Director Departament:

GUȘAN Ala

Șef Secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LUPAȘCU Lucian