Procedee de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de cupru legat organic

cerc. șt. **Ludmila BATÎR**,
lab. Colecția Națională de Microorganisme Nepatogene,
Institutul de Microbiologie și Biotehnologie, AȘM,
cerc. șt. sup. **Liliana ZOSIM**,
laboratorul Ficobiotehnologie, USM,
lector sup., **Daniela ELENCIUC**,
catedra Biologie, Universitatea AȘM,
conf. univ. **Victor ȚAPCOV**,
catedra Chimie Anorganică și Fizică, USM,
acad., prof. univ. **Aurelian GULEA**,
șef catedră Chimie Anorganică și Fizică, USM,
acad. **Valeriu RUDIC**,
director al Institutului de Microbiologie și Biotehnologie, AȘM

Obținerea biomasei de spirulină cu conținut sporit de cupru legat cu compuși organici poate servi drept materie primă pentru fabricarea produselor și preparatelor cuprucomponente cu acțiune antimicrobiană și antifungică.

Cianobacteriile reprezintă un obiect promițător pentru cultivarea industrială în vederea extinderii proceselor de cultivare dirijată a lor, și producerea de biomasă cu conținut prognozat de principii bioactive calitative. Obținerea biomasei cu conținut sporit de principii bioactive și microelemente poate fi reglată prin modificarea componenței mediului nutritiv, a parametrilor de cultivare sau administrarea reglatorilor chimici, cum ar fi compușii coordinativi ai diferitor microelemente.

În ultimii ani, se acordă o deosebită atenție obținerii noilor medicamente împotriva cancerului în baza metalelor, pentru a îmbunătăți eficacitatea clinică, reducerea toxicității și de a lărgi spectrul de activitate. Varietatea funcțiilor biologice ale ionilor metalelor au determinat dezvoltarea noilor metalopreparate. S-a stabilit că proprietățile compușilor cuprului sunt coordonate și determinate în mare măsură de natura liganzilor și de atomii donatori ce leagă ionii metalici. Însă, până în prezent nu sunt cunoscute mecanismele care stau la baza activității antitumorale a diferitor clase de complecși ai Cu(II) [1].

Studiile antibacteriene și antifungice efectuate asupra tulpinilor *Streptococcus aureus, Echerichia coli* și *Aspergilus niger* au demonstrat că complexul Cu(II) $[C_{20}H_{22}N_8S_2Cu]Cl_2$ manifestă o activitate intensă împotriva acestor tulpini și inhibă creșterea lor [2, 3]. Interesul amplu pe care îl prezintă complecșii Cu(II) a dus la investigarea proprietăților farmacologice a complecșilor carboxiloți ai Cu(II) mono- și binucleari, precum și a complecșilor ce conțin baza Schiff de tipul N-salicilideneaminoalcanoat, privind activitățile antiradicalice și antiinflamatoare. Acești compuși s-au dovedit a fi benefici în afectarea proceselor inflamatorii. Analiza comparativă a datelor obținute asupra activității antitumorale a complecșilor coordinativi ai cuprului și a celor anorganici a permis de a elucida faptul că, în cazul tratării cu compus coordinativ, supraviețuiesc 25-55 de celule tumorale, iar în cazul tratării cu $[CuCl_2 \cdot 2H_2O]$ supraviețuiesc până la 200 de celule. Astfel, s-a demonstrat că compușii coordinativi ai cuprului sunt mult mai eficienți și posedă activitate mai înaltă decât compușii anorganici [4].

Compușii coordinativi ai nitratului și sulfatului de cupru cu tiosemicarbazonele aldehidei salicilice substituite, de asemenea, posedă activitate an-

ticanceroasă asupra celulelor HL-60 ale leucemiei mieloide umane, inhibând creşterea acestora în concentraţie de 10^{-5} – 10^{-6} mol/L [5]. Tiosemicarbazonele mai sunt cunoscute şi pentru capacitatea lor de a acţiona ca liganzi polidentaţi şi pentru activitatea biologică pe care o posedă. În multe cazuri, coordonarea lor cu ionii metalelor de tranziţie este mult mai eficientă decât liganzii liberi [6]. Alte rezultate efectuate şi descrise în literatura de specialitate se referă la activitatea antimicrobiană, antifungică şi algicidă a compuşilor cuprului [7, 8].

Este evidentă şi importanţa cuprului pentru organismul uman, deoarece acest microelement intră în componenţa unor enzime ca citocromooxidaza, uricaza, aldolaza, catalaza, succidehidrogenaza, ce influenţează procesele de oxidoreducere celulare, intensificându-le acţiunea lor şi condiţionând procesele bioenergetice şi fenomenele de sinteză la nivel celular [9]. Cuprul are şi rol de coenzimă în sistemul enzimatic, intră în componenţa proteinelor, măreşte acţiunea hipoglicemică a insulinei şi participă în metabolismul fierului, serveşte ca şi catalizator în formarea eritrocitelor şi în sinteza hemoglobinei. De asemenea, cuprul intervine în metabolismul glucidic, iar când se află în raport optim cu fierul stimulează sinteza vitaminelor din complexul B şi A [9, 10].

Cercetările efectuate asupra acumulării cuprului în biomasa de spirulină, la cultivare în prezenţa unor compuşi coordinativi ai Cu(II), au demonstrat că cianobacteria *Spirulina platensis CNM-CB-02* se prezintă ca o sursă de perspectivă pentru obţinerea biomasei cu conţinut sporit de cupru legat cu compuşi organici componenţi ai biomasei, de aceea neam propus să elaborăm procedee noi de obţinere a biomasei de spirulină cu conţinut sporit de cupru.

Obţinerea biomasei de spirulină cu conţinut sporit şi prognozat de cupru legat cu compuşi organici ar putea fi utilizată ca sursă de biomasă pentru obţinerea preparatelor cu acţiune antimicrobiană şi antifungică.

MATERIALE ŞI METODE DE CERCETARE

Drept obiect al cercetărilor a servit tulpina cianobacteriei *Spirulina platensis CNM-CB-02* – sursă de substanţe bioactive, depozitată în Colecţia Naţională de Microorganisme Nepatogene din cadrul Institutului de Microbiologie şi Biotehnologie al AŞM. Cultura de *Spirulina platensis CNM-CB-02* a fost cultivată în mediul lichid *SP-1* cu o componenţă echilibrată de macro- şi microelemente [11]. În calitate de stimulatori în vederea modificării dirijate a conţinutului de cupru în biomasa de spirulină au fost utilizaţi doi compuşi coordinativi noi ai Cu(II): acetato-N-[2-(2-hidroxietilamino)-etil]-salicilidenimino(1-)cupru ([Cu(L-H)]) şi bromo-{3-[(2-hidroxi-5-nitro-benziliden)-amino]-propan-1,2-diolo}(1-)-cupru ([Cu(L-H)Br]), administraţi la mediu în a doua zi de cultivare, în concentraţie de respectiv 2,0 şi 6,0 mg/L. Durata cultivării – 7 zile.

Conţinutul de cupru în biomasă a fost determinat prin metoda fotocolorimetrică bazată pe formarea compusului complex al cuprului cu reactivul dietilditiocarbamat de natriu de culoare galbenă. Densitatea optică se măsoara la 453 nm, iar intensitatea culorii este direct proporţională cu concentraţia cuprului, cantitatea de cupru se determină după curba de calibrare [12]. Metoda de determinare a cuprului are o sensibilitate înaltă şi permite de a determina 1,0 mgCu/L.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În literatura de specialitate este descris un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Spirulina platensis* pe mediul nutritiv Zarrouk, iluminarea 40W, temperatura 28-32^{0}C, durata de cultivare 30 de zile, în a 16-a zi la acest mediu se adaugă 1,0–3,0 mg/L de Cu^{2+} [13]. Faptul că cultivarea spirulinei conform procedeului descris durează o perioadă îndelungată de 30 de zile, iar administrarea Cu^{2+} are loc în a 16-a zi de la cultivare, când spirulina este în perioada latentă de creştere, are drept consecinţă neasigurarea acumulării cuprului în biomasă, acesta acumulându-se doar pe peretele celular, ceea ce constituie un dezavantaj al procedeului.

Cercetările efectuate asupra acumulării cuprului în biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis CNM-CB-02* la cultivare în prezenţa unor compuşi coordinativi noi ai Cu(II) au demonstrat capacitatea spirulinei de a lega cuprul intracelular cu componentele organice din cadrul celulei. În rezultatul cercetărilor efectuate, au fost elaborate două procedee de obţinere a biomasei de spirulină cu conţinut majorat de cupru legat cu compuşi organici componenţi ai biomasei [14, 15]. Procedeele constau în:

Procedeul I

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următorul conținut al ingredientelor (g/L): $NaNO_3$ – 2,5; $NaHCO_3$ – 16,8; NaCl – 1,0; K_2SO_4– 1,0; K_2HPO_4– 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,04; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; EDTA – 0,08; H_3BO_3 – 0,00286; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,00181; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,00022; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,00008; MoO_3 – 0,000015 și apă distilată pînă la 1L. La mediul preparat se adaugă suspensia de *Spirulina platensis* în cantitate de 0,4 g/L. În a doua zi de cultivare, la suspensia de spirulină, în calitate de reglator al conținutului de cupru în biomasă, se suplimentează 2,0 mg/L de acetato-N-[2-(2-hidroxietilamino)-etil]-salicilidenimino(1-)cupru. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 100 mL suspensie, iluminarea de 2000 – 3000 lx, la pH 9,5-10,0 și temperatura de 30°C. În ziua a șaptea biomasa se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se determină conținutul de cupru, care constituie 10,63 mg%.

Procedeul II

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următorul conținut al ingredientelor (g/L): $NaNO_3$ – 2,5; $NaHCO_3$ – 16,8; NaCl – 1,0; K_2SO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,04; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; EDTA – 0,08; H_3BO_3 – 0,00286; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,00181; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,00022; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,00008; MoO_3 – 0,000015 și apă distilată pînă la 1L. La mediul preparat se adaugă suspensia de Spirulina platensis în cantitate de 0,4 g/L. În a doua zi de cultivare, la suspensia de spirulină, în calitate de reglator al conținutului de cupru, se suplimentează 6,0 mg/L de bromo-{3-[(2-hidroxi-5-nitrobenziliden)-amino]-propan-1,2-diolo}(1-)cupru. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmeyer a câte 100 mL suspensie, iluminarea de 2000–3000 lx, la pH 9,5-10,0 și temperatura 32°C. În ziua a șaptea biomasa se separă de lichidul cultural, se demineralizează și se determină conținutul de cupru, ce constituie 11,14 mg%.

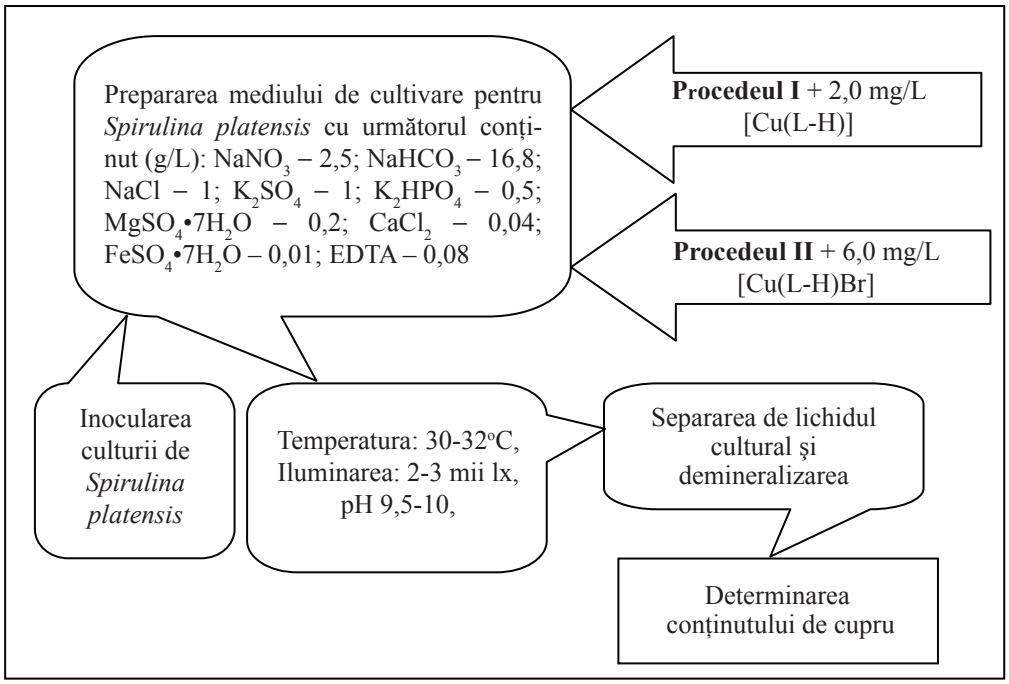

Fig. 1. ***Schema de realizare a procedeelor de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de cupru legat cu compuși organici***

Diferența compoziției peretelui celular la diferite grupe de microorganisme, alge, bacterii, cianobacterii și fungi duce la o diferență semnificativă privind legarea metalelor cu componentele celulare. Prima etapă de pătrundere a microelementelor în celulă este absorbția pasivă, care prezintă un metabolism independent ce duce la legarea metalelor prin: formarea legăturilor coordinative, complexare, schimbul de ioni, adsorbția fizică sau microprecipitarea anorganică. A doua etapă o constituie absorbția activă, când ionii metalelor penetrează membrana celulară și intră în interiorul celulei [16, 17]. În rezultatul pătrunderii în interiorul celulelor cianobacteriene, majoritatea microelementelor formează legături cu moleculele compușilor organici – proteinele, lipidele, polizaharidele, aminoacizii etc. De regulă, stocarea și neutralizarea excesului metalelor are loc prin implicarea în special a peptidelor de tipul fitochelatinelor și metalotioninelor. Cercetările descrise în literatura de specialitate arată că absorbția microelementelor este datorată grupurilor funcționale prezente pe suprafața celulelor, în special a grupelor proteice $-COO^-$ și lanțurilor funcționale secundare ale aminoacizilor – histidina, cisteina, acidul aspartic și acidul glutamic [20].

În rezultatul depistării capacității spirulinei de acumulare intracelulară a cuprului, a prezentat interes și studiul distribuirii cuprului în diferite fracții organice extrase din biomasa de spirulină cultivată în prezența compușilor coordinativi ai Cu(II).

În urma fracționării biomasei de spirulină cultivată în prezența metalocomplecșilor [Cu(L-2H)] și [Cu(L-H)Br] în concentrație de, respectiv, 2,0 și 6,0 mg/L, am depistat că din cantitatea totală de cupru acumulat ponderea cea mai importantă a cuprului revine fracției de glucide și a celei de peptide cu aminoacizi (Figura 2).

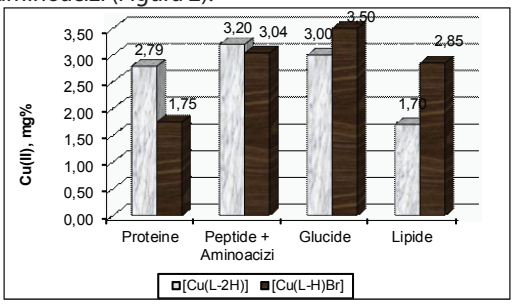

Fig. 2. ***Repartizarea cuprului în fracțiile extrase din biomasa de spirulină cultivată în prezența compușilor coordinativi ai Cu(II)***

În urma fracționării biomasei de spirulină cultivată în prezența compusului [Cu(L-2H)], s-a stabilit că din cantitatea totală de cupru acumulat, ponderea cea mai mare îi revine fracției de oligopeptide și aminoacizi – 30,10% (3,20 mg%) și fracției glucidice – 28,22% (3,00 mg%). Cuprul incorporat în moleculele de proteine constituie 26,25% din cuprul total, iar cel mai diminuat conținut a fost depistat în fracția de lipide și constituie cca 15,99% din conținutul total de cupru.

Datele referitoare la repartizarea cuprului în diferite fracții extrase din biomasa de spirulină cultivată în prezența compusului coordinativ [Cu(L-H)Br] arată că, la fel ca și în cazul compusului [Cu(L-2H)], ponderea maximă a cuprului revine fracției glucidice și celei de oligopeptide cu aminoacizi, constituind 31,42% (3,5 mg%) și 27,29% (3,04 mg%), respectiv, din cuprul total, urmată de fracția lipidică – 25,58% (2,85 mg%). În cazul cultivării spirulinei în prezența compusului dat, moleculele de proteine din biomasa de spirulină leagă un conținut de cupru mai mic față de compusul precedent și constituie 15,71% (1,75 mg%) din cuprul total.

În virtutea celor expuse mai sus, putem concluziona că: au fost elaborate două procedee de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de cupru legat cu compuși organici componenți ai biomasei de spirulină – sursă de substanțe bioactive utilizate în industria farmaceutică, medicina clinică și experimentală.

REFERINȚE

1. MARZANO, C., PELLEI, M., TISATO, F. *Copper Complexes as Anticancer Agents*. In: Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2009, vol. 9, nr 2, p. 185-211

2. OZDEMIR, G., KARABAY, N., DALAY, M. *Antibacterial activity of volatile component and various extracts of Spirulina platensis*. In: Phytoher. Res., 2004, vol. 18, nr 9, p. 754-757

3. FARUKH, A., BHAWANA, M., SHAMIM, A. *Synthesis, antibacterial, antifungal activity and interaction of CT-DNA with a new benzimidazole derived Cu(II) complex*. In: European J. of Med. Chem., 2005, vol. 40, p. 1103-1110

4. MALON, M., TRAVNICEK, Z. *Synthesis, characterization and antitumour activity of copper(II)6-(4-chlorobenzylamino)purine complexes. X-ray structure*

of 6-(4-chlorobenzylamino)purinium perchlorate. In: Transition Metal Chemistry, 2002, nr. 27, p. 580-586

5. GULEA, A., ROȘU, T., COTOVAIA, A. ș.a. *Inhibitor al leucemiei mieloide umane în bază de bis(2-hidroxi-8-fenil-triciclo/7.3.1.0.2,7/tridecan-13-on-tiosemicarbazonato) cupru*. // Brevet de invenție MD nr. 3655, BOPI nr. 7/2008, p. 36-37

6. ROȘU, T., GULEA, A., NICOLAE, A. *Complexes of 3d^n Metal Ions with Thiosemicarbazones: Synthesis and Antimicrobial Activity*. In: Molecules, 2007, vol. 12, p. 782-796

7. BLAHOVA, M. *Anti-inflammatory activity of aqua(chlorophenoxyacetato) copper(II) complexes*. In: Acta facultatis pharmaceuticae universitatis comenianae, 2003, p. 24-29

8. MUHAMMAD, F., FAZAL, U., GUL, M. *Antifungal, Insecticidal, Cytotoxicity, and Phytotoxicity Studies of Binuclear Ni(II) and Cu(II) Complexes of Diclofenac*. In: American Laboratory, 2009, vol. 41, nr 6, p. 46-49

9. BURKHEAD, J., GOGOLIN-REYNOLDS, K., ABDEL-GHANY, S. *Copper homeostasis*. In: New Phytologist, 2009, vol. 182, p. 799-816

10. NALIMOVA, A., POPOVA, V. *The Effects of Copper and Zinc on Spirulina platensis Growth and Heavy Metal Accumulation in Its Cells*. In: Russian Journal of Plant Physiology, 2005, vol. 52, nr 2, p. 229-234

11. RUDIC, V. *Aspecte noi ale biotehnologiei moderne*. Chişinău, 1993. 140 p.

12. Практикум по технологии косметических средств „биологически активные вещества в косметике" под редакцией Т.В. Пучковой, издательство «Школа косметических химиков», Москва, 2004, стр. 119

13. GANNIKAR, D. *Accumulation of Copper, Mercury and Lead in Spirulina platensis studied in Zarrouk's Medium*. In: J. of KMITNB., vol. 12, nr. 4, 2002

14. GULEA, A., ȚAPCOV, V., GRAUR, V., BATÎR, L., RUDIC, V., BULIMAGA, V., ELENCIUC, D. *Acetato-N-[2-(2-hidroxietilamino)-etil]-salicilidenimino(1-)cupru și procedeu de cultivare a Spirulinei platensis cu utilizarea acestuia*. // Brevet de invenție MD 4043, BOPI nr. 5/2010, p. 25-26

15. GULEA, A., ȚAPCOV, V., GRAUR, V., GÎNJU, D., BATÎR, L., RUDIC, V. ZOSIM, L. *Bromo-{3-[(2-hidroxi-5-nitro-benziliden)-amino]-propan-1,2-diolo}(1-)cupru și procedeu de utilizare a acestuia ca reglator al conținutului de cupru în biomasa de spirulină*. // Brevet de invenție MD nr. 4069, BOPI nr. 9/2010, p. 19-20

16. NILANJANA, D., VIMALA, R., KARTHIKA, P. *Biosorption of heavy metals*. In: Indian Journal of Biotechnology, 2008, vol. 7, p. 159-169

17. NIRMAL, K., OOMMEN, C., KUMAR, R. *Biosorption of Heavy Metals from Aqueous Solution by Green Marine Macroalgae from Okha Port, Gulf of Kutch, India*. In: Amer.-Euras. J. Agric.&Environ. Sci., 2009, vol. 6, p. 317-323

18. CONVERTI, A., LODI, A., SOLISIO, C. *Spirulina platensis* biomass as adsorbent for copper removal. In: Ciencia y Tecnologia Alimentaria, 2006, vol. 5, p. 85-88

REZUMAT

În prezentul articol este descrisă elaborarea a două procedee de obținere a biomasei de spirulină cu conținut sporit de cupru legat cu compuși organici componenți ai biomasei (proteine, oligopeptide, aminoacizi, lipide, glucide), utilizându-se în calitate de reglatori compușii coordinativi ai Cu(II).

ABSTRACT

The elaboration of two processes for obtaining of spirulina biomass with high content of copper bound to organic compounds of biomass components (proteins, oligopeptides, amino acids, lipids, carbohydrates), using as regulators some coordination compounds of Cu(II) is described in the present article.