



MD 1204 G2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1204<sup>(13)</sup> G2  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: C 07 J 71/00;  
C 07 H 3/06

(12) BREVET DE INVENȚIE

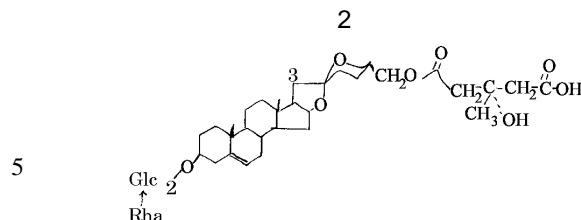
(21) Nr. depozit: 98-0187 (22) Data depozit: 01.09.1998	(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 30.04.1999, BOPI nr. 4/99
(71) Solicitant: Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD	
(72) Inventatori: Chintea Pavel, MD; Goreanu Gheorghe, MD; Lupașcu Galina, MD; Maliarciuc Galina, MD	
(73) Titular: Institutul de Genetică al Academiei de Științe a Republicii Moldova, MD	

(54) Biozidă (25R)-spirost-5-en-3?, 27-diol-27-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)  
ce posedă proprietăți fungicide

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la o nouă substanță biologic activă din clasa glicozidelor steroidice posedand proprietăți fungicide și poate fi utilizată în agricultură.

Esența invenției constă în obținerea biozidei (25R)-spirost-5-en-3?, 27-diol-27-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil) cu formula



în care Glc este glucoză, Rha este ramnoză, ce posedă proprietăți fungicide.

Revendicări: 1

MD 1204 G2

## MD 1204 G2

3

### Descriere:

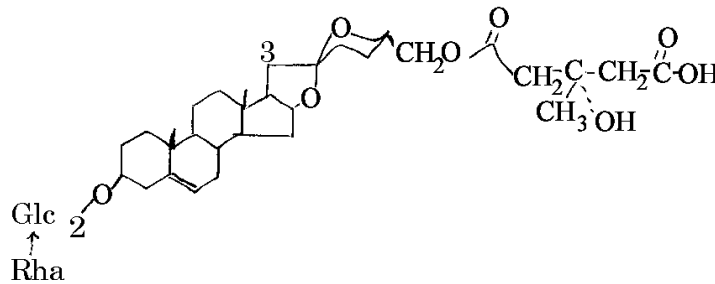
Invenția se referă la substanțele biologic active din clasa glicozidelor steroidice, și anume biozida (25R) - spirost-5-en-3 $\beta$ ,27-diol-27-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil), care poate fi aplicată în agricultură în calitate de substanță fungicidă.

Este cunoscută glicozida steroidică *Lilioglicozida G.*, care manifestă proprietăți fungicide [1].

*Lilioglicozida G.* se caracterizează printr-o activitate fungicidă limitată.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unei glicozide steroidice noi cu activitate fungicidă.

Esența invenției constă în aceea că se propune o glicozidă steroidică nouă, și anume biozida (25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ ,27-diol-27-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil), care manifestă proprietăți fungicide cu următoarea formulă de structură



unde Glc este glucoză, Rha este ramnoză.

Biozida (25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ ,27-diol-27-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil) poate fi obținută prin următorul procedeu: bulbii de *Lilium henry* sunt supuși extracției cu etanol de 70%, soluția obținută se concentrează până la rest apos, se face extracția cu alcool butilic, după care are loc cromatografierea pe silicagel L 40/100  $\mu$ , în sistemul cloroform-metanol-apă.

Rezultatul tehnic al invenției constă în aceea că biozida (25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ ,27-diol-27-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil) manifestă proprietăți fungicide sporite față de ciupercile din genul *Fusarium oxysporum var. lycopersici* și *Fusarium oxysporum* în comparație cu analogul structural. În acest mod se contribuie la lărgirea arsenalului de glicozide steroidice care pot fi utilizate în agricultură.

Substanța obținută reprezintă o pulbere de culoare galbenă-deschisă cu punctul de topire 236-238°C,  $[\alpha]_D^{20}$  -75 (CH<sub>3</sub>OH, C=1,0).

Formula bruto este C<sub>45</sub>H<sub>70</sub>O<sub>18</sub>, R<sub>f</sub>=0,27 (în sistemul cloroform-metanol-apă (65:35:5)). Substanța este ușor solubilă în metanol, etanol, este hidrosopică.

Structura biozidei este confirmată cu ajutorul hidrolizei acide, metilării cu metanoliză ulterioară, oxidării periodate.

Produsele obținute au fost studiate prin cromatografiere în strat subțire (CSS), cromatografiere pe hartie (CH), cromatografiere în gaz-lichid (CGL), spectroscopie în infraroșu (SIR), spectrometria de masă și rezonanța nuclear-magnetică (RNM C<sup>13</sup>).

În urma hidrolizei acide complete a biozidei a fost identificat agliconul steroidic - nartogenina, cu punctul de topire P.t. 213-216°C,  $[\alpha]_D^{20}$  - 110 (CH<sub>3</sub>OH), R<sub>f</sub> - 0,55 în sistemul cloroform-metanol

(9:1).

Banda de absorbție 1725 cm<sup>-1</sup> din spectrul IR (grupa carbonil din ester) și picul ionului cu masa de 574 u.c. prezent în spectrul de masă al biozidei demonstrează că anume aceasta este masa esterului (25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ ,27-diol-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil), care și este agliconul biozidei studiate.

Prin metoda CGL în hidrolizat a fost detectat amestecul de ramnoză și glucoză în raportul 1:1 sub formă de derivați acetici ai aldonitriților.

Poziția de joncțiune a monozaharidelor între ele în molecula biozidei a fost inițial determinată prin analiza produselor oxidării glicozidelor cu periodat de sodiu (NaIO<sub>4</sub>), în care nu s-au păstrat monozaharide neoxidate în catena hidrocarbonică. Astfel a fost exclusă varianta locului de joncțiune

## MD 1204 G2

4

în poziția C-3 a uneia din monozaharide. Analiza metilglicozidelor metilate obținute în urma metanolizei produsului permetilat al biozidei a permis identificarea a două derivate metilice ale glucozei: metil-3,4,6-trei-O-metilglucopiranozidă și ramnopiranozidă permetilată. Deci, molecula de ramnoză este unită cu poziția C-2 a glucozei. Ținând cont de faptul că nartogenina are grupul hidroxil din poziția C-27 ocupat pentru formarea legăturii esterice, rămâne o singură posibilitate de a forma legătura cu partea glucidică a glicozidei cu poziția C-3.

### Exemplul 1

Un kilogram de bulbi proaspeți de *Lilium henry* s-a mărunțit, după aceasta a fost supus extracției cu etanol de 70% de 4 ori câte 5 ore la temperatura de fierbere a extragentului, folosind câte un litru alcool. Extractul obținut s-a concentrat prin evaporare până la rest apos, care a fost decantat în alcool butilic normal de 3 ori câte 200 ml de solvent. Frațiile butanolice au fost concentrate prin evaporare și cromatografiate pe coloană cu silicagel L 40/100  $\mu$ , fracțiile obținute au fost colectate câte 10 ml. Controlul asupra separării a fost efectuat în CSS în sistemul cloroform-metanol-apă (65:35:5). Produsul din eprubetele cuprinse între numerele 21 și 28 a fost adunat și supus concentrării prin evaporare, obținându-se 1,18 g de biozidă. În așa mod s-a obținut biozida, care prezintă 0,118 din greutatea produsului vegetal inițial.

Determinarea activității biologice a biozidei (25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ ,27-diol-27-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil) a fost efectuată prin testarea creșterii și dezvoltării culturilor pure ale ciupercilor *Fusarium oxysporum* Schlecht var. *licopersici* (Brushi) Wr. (n.2) și *Fusarium oxysporum* (Schlecht) Snyd. et Hans (n. 309) (unii din provocatorii traheomicozei și putregaiului de rădăcină la tomate și triticales) pe mediu nutritiv must-agar, ce conținea diferite cantități de biozidă. Cercetarea a fost efectuată conform metodicii descrise [2]. În calitate de test-parametri s-au utilizat creșterea liniară a coloniilor și densitatea miceliului - indici destul de informativi pentru creșterea și dezvoltarea ciupercilor. Densitatea miceliului a fost determinată după scara de 3 trepte:

3 - dezvoltare normală, 2 - medie, 1 - slabă. Rezultatele testării sunt prezentate în tabel. Datele obținute indică asupra faptului că biozida a manifestat o activitate inhibitoare asupra ambelor ciuperci. În intervalul de concentrații 0,01-0,05%-în a 5-a zi biozida a inhibat creșterea ciupercii *F.oxysporum* var. *licopersici* cu 21,8-24,6%. După activitate biozida a depășit analogul structural (*Lilioglicozida G.*). De exemplu, la concentrația 0,05% diametrul coloniilor pe mediul cu biozida era cu 24,6% mai mic decât pe mediul martor, iar pe mediul cu *Lilioglicozida G.* în aceeași concentrație - cu 7,9%. Efectul inhibitor al biozidei s-a constatat și în cazul densității miceliului. Acest indice era de 2 grade în cazul celui mai apropiat analog structural, iar în cel al biozidei - de 1 grad cu cele mai eficiente concentrații (0,01-0,05%).

În intervalul de concentrații 0,002-0,05% biozida a manifestat activitate fungicidă și față și ciuperca *F.oxysporum* (n. 309). În varianta cu analogul structural diametrul coloniilor în a 5-a zi era cu 11,1% mai mic față de control, densitatea miceliului - la nivelul de 2,5 grade, iar pe mediul cu biozida la concentrațiile 0,002-0,05% primul parametru era cu 34,1-23,8% mai jos față de martor, iar al doilea - la nivelul de 1-1,5 grade.

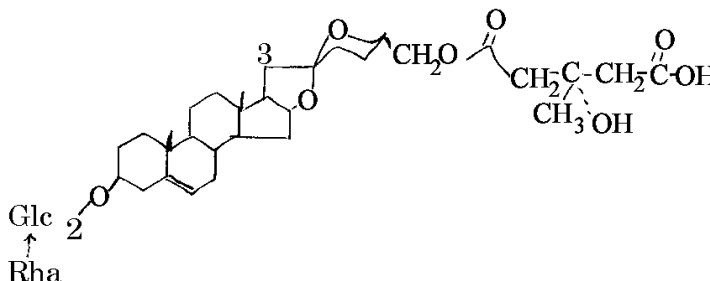
În baza rezultatelor obținute putem conchide că biozida având un efect vădit inhibitor asupra ciupercilor *F.oxysporum* var. *licopersici* și *F.oxysporum* poate fi utilizată în cadrul măsurilor de protecție a culturilor de tomate și triticales de traheomicoză și putregai de rădăcină.

## MD 1204 G2

5

**(57) Revendicare:**

Biozidă (25R)-spirost-5-en-3 $\beta$ , 27-diol-27-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil) cu formula



în care Glc este glucoză, Rha este ramnoză, ce posedă proprietăți fungicide.

**(56) Referințe bibliografice:**

1. Guriev, A. Structura chimică a glicozidelor steroidice izolate din bulbii de *Lilium regale wilis* și activitatea lor biologică. Autoreferatul tezei de doctor în științe chimice. Chișinău, Institutul de chimie al Academiei de Științe a Republicii Moldova, 1996, 23 p.
2. Методы экспериментальной микологии. Киев, Наукова думка, 1982, с. 550

Șef secție:	CRECETOV Veaceslav
Examinator:	BAZARENCO Tatiana
Redactor:	CANȚER Svetlana