



MD 4084 B1 2010.12.31

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4084** (13) **B1**

(51) Int. Cl.: *C07J 9/00* (2006.01)  
*C07H 3/06* (2006.01)  
*A01N 45/00* (2006.01)  
*A01P 21/00* (2006.01)  
*A01G 1/00* (2006.01)  
*A01C 1/00* (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

**Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi  
revocată în termen de 6 luni de la data publicării**

(21) Nr. depozit: a 2010 0080  
(22) Data depozit: 2010.07.01

(45) Data publicării hotărârii de  
acordare a brevetului:  
2010.12.31, BOPI nr. 12/2010

(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE  
ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(72) Inventatori: ȘVEȚ Stepan, MD; SĂROMEATNICOV Iulia, MD; CHINTEA Pavel, MD; COTENCO  
Eugenia, MD; MARCENCO Alexandra, MD

(73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE  
ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(54) **3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopirano-  
zidă-(25R)-5 $\alpha$ -coleston,22-keto,3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,26-triol-[26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidă]  
în calitate de compus ce sporește productivitatea și calitatea fructelor de  
tomate**

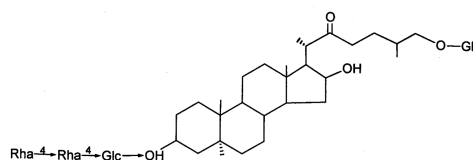
(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la o substanță biologică activă nouă din clasa glicozidelor steroidice care poate fi aplicată în agricultură, pentru sporirea productivității și a calității fructelor de tomate.

Se propune o glicozidă steroidică nouă din șirul colestonic 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranozidă-(25R)-5 $\alpha$ -coleston, 22-keto,3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,26-triol-[26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidă] (rusticozidă G<sub>1</sub>) cu formula structurală:

2



5

10

unde: Glc – glucoză, Rha – ramnoză  
în calitate de compus ce sporește productivitatea  
și calitatea fructelor de tomate.

Revendicări: 1

15

MD 4084 B1 2010.12.31

**Descriere:**

Invenția se referă la o substanță biologic activă nouă din clasa glicozidelor steroidice care poate fi aplicată în agricultură, pentru sporirea productivității și a calității fructelor de tomate.

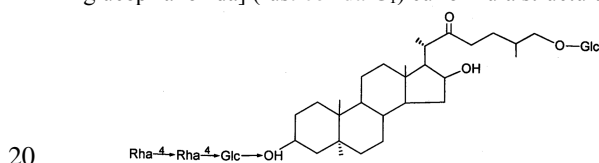
5 Este cunoscută utilizarea glicozidei steroidice 3-O-[[β-D-glucopiranozil(1→2)]-β-D-glucopiranozil(1→3)]-β-D-glucopiranozil(1→4)-β-D-galactopiranozil(1→3)-β-D-glucopiranozidă}-(25R)-5α-furostan,22α,3β,22α,26-tetraol-[26-O-β-D-glucopiranozidă] (Moldstim) (analog structural) pentru tratarea semințelor de tomate înainte de semănat, în rezultatul căreia crește energia de germinare, germinarea semințelor, puterea de creștere inițială a plantelor și productivitatea. Însă stimulatorul cunoscut nu posedă eficacitate suficient de înaltă [1].

10 Este cunoscută glicozida steroidică cu structura 3-O-α-L-ramnopiranozil(1→4)-α-L-ramnopiranozil(1→4)-β-D-glucopiranozidă-(25R)-5α-furostan,22-keto,3β,16β,26-triol-[26-O-β-D-glucopiranozidă]- rusticozida G [2].

Totuși, activitatea biologică a compusului menționat nu a fost studiată din cauza conținutului lui nesemnificativ în semințe de *Nicotiana rustica* L.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în lărgirea asortimentului de substanțe biologic active cu efect major asupra productivității și calității plantelor de tomate.

Se propune o glicozidă steroidică nouă din șirul colestanic 3-O-α-L-ramnopiranozil(1→4)-α-L-ramnopiranozil(1→4)-β-D-glucopiranozidă-(25R)-5α-colestan,22-keto,3α,16β,26-triol-[26-O-β-D-glucopiranozidă] (rusticozida G<sub>1</sub>) cu formula structurală:



unde: Glc – glucoză, Rha – ramnoză

în calitate de compus ce sporește productivitatea și calitatea fructelor de tomate.

25 Rusticozida G<sub>1</sub> reprezintă o glicozidă steroidică nouă din șirul colestanic, care nu a fost descrisă anterior în literatura de specialitate. Formula brutto C<sub>51</sub>H<sub>88</sub>O<sub>22</sub>, masa moleculară 1050 g/mol, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> – 79° (c 0,5; H<sub>2</sub>O), t<sub>op.</sub>=176°C.

Rusticozida G<sub>1</sub> reprezintă un praf de culoare albă, bine solubil în apă, alcoolii etilic, metilic, butilic, nu este solubil în cloroform, eter dietilic, acetona.

30 După hidroliza acidă totală a rusticozidei G<sub>1</sub> în calitate de genină după metodele fizico-chimice a fost identificat (25R)-5α-colestan,22-keto,3α,16β,26-triol, numit rusticogenină. Formula brutto C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>4</sub>.

<sup>13</sup>C RMN (ppm): 38.1 (C-1), 30.2 (C-2), 75.1 (C-3), 35.1 (C-4), 46.0 (C-5), 33.0 (C-6), 31.9 (C-7), 36.1 (C-8), 55.6 (C-9), 36.4 (C-10), 21.9 (C-11), 41.1 (C-12), 45.5 (C-13), 54.5 (C-14), 54.5 (C-15), 76.8 (C-16), 63.9 (C-17), 13.6 (C-18), 12.2 (C-19), 49.9 (C-20), 16.8 (C-21), 218.6 (C-22), 39.6 (C-23), 28.3 (C-24), 33.8 (C-25), 70.3 (C-26), 17.4 (C-27).

35 Cu ajutorul cromatografiei în strat subțire și pe hârtie în partea oligozaharidă au fost identificate glucoza și ramnoza.

<sup>13</sup>C RMN spectrul rusticozidei G<sub>1</sub> a relevat semnalele ale patru atomi anomerici la 102,0; 102,3; 102,9 și 102,4 ppm. Analiza spectrală a datelor 1D-TOCSY și DQF-COSY a lanțului oligozaharidic a evidențiat două resturi de β-glucopiranozidă (δ 4.43 și 4.26 ppm) și două resturi de α-ramnopiranoză (δ 4.87 și 5.21 ppm).

45 Spectrul HMBC conține picurile-cheie de corelare între semnalul protonului la δ 4.43 ppm (H-1 al glucozei) și rezonanța carbonică la 79.0 ppm (C-3 al geninei), semnalul protonului la δ 4.87 ppm (H-1 al ramnozei I) și rezonanței carbonice la 79.2 ppm (C-4 al glucozei), semnalul protonului la δ 5.21 ppm (H-1 al ramnozei II) și rezonanței carbonice la 80.6 ppm (C-4 al ramnozei I).

Caracterul scindării și constantele de interacțiune spin-spin ale tuturor protonilor resturilor glucidice ai glicozidelor total corespund configurațiilor monozaharidice în formele piranoze. Din constantele interacțiunilor spin-spin rezultă β-configurația centrelor glicozidice ale glicozidelor și α-configurația resturilor de ramnoze.

50 Tipurile de substituție în resturile monozaharidice și în genină și consecutivitatea legării lor au fost stabilite prin analiza spectrală dublă a efectelor Overhauser în sistemul de rotație a coordonatelor (ROESY).

In spectrul rusticozidei G<sub>1</sub> sunt stabilite picurile de corelare în coordonatele deplasărilor chimice ale H-1 al glucopiranozei și H-3 al geninei, H-1 al primei ramnopiranoze și H-4 al glucopiranozei, H-1 al ramnopiranozei II și H-4 al primei ramnopiranoze, H-1 al glucopiranozei II și H-26 al geninei.

55 La compararea spectrelor <sup>13</sup>C RMN ale rusticogeninei și rusticozidei G<sub>1</sub> se observă că semnalul atomului de genină la C-3 și C-26 în fiecare caz este deplasat în câmpul slab cu 3.9 ppm și cu 5.4 ppm,

corespunzător, ce se explică prin efectul de glicozilare. Deplasările chimice ale resturilor de atomi carbonici ale geninei rămân fără schimbări.

5 Rezultatul invenției constă în aceea că a fost obținută o glicozidă steroidică nouă din șirul colestanic care sporește productivitatea generală a tomatelor și calitatea comercială a fructelor; concomitent contribuie la extinderea asortimentului de glicozide steroidice care pot fi utilizate în agricultură în calitate de substanțe biologice active de proveniență naturală.

*Procesul de obținere a rusticozidei G<sub>1</sub>*

10 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranozidă-(25R)-5 $\alpha$ -colestan,22-keto,3 $\alpha$ ,16 $\beta$ ,26-triol-[26-O- $\beta$ -D-glucopiranozida] se obține prin următorul procedeu: semințele de *Nicotiana rustica* L. (1 kg) uscate la aer liber sunt mărunțite, degresate cu amestec de solvenți cloroform:metanol în raport de 2:1 (v/v) la încălzire (3 ori x 2,5 litri). Extractele obținute se dizolvă în apă, stratul metanolic apos se separă în pâlnia de separare și se concentrează în vid până la uscat. Reziudul obținut se dizolvă în 50 ml de alcool metilic, din soluția obținută sunt precipitate glicozidele sumare cu acetonă, sedimentul se filtrează și se usucă în vid. Se obțin 27 g de glicozide sumare ce reprezintă 2,7% din masa materiei prime inițiale. Prin aplicarea filtrării pe gel pe Sephadex G-25 și cromatografierii pe coloană cu silicagel L 40/100  $\mu$ m se obțin 0,85 g de amestec de rusticozida G și rusticozida G<sub>1</sub>. Această fracție este supusă multiplu cromatografiei lichide de performanță înaltă (HPLC) în mod preparativ cu utilizarea coloanei de C-18  $\mu$ -Bondapack (30 cm x 7,8 i.d., viteza de curgere 2,0 ml/min) cu utilizarea sistemului MeOH:H<sub>2</sub>O în raport de 85:15 (condiții izocratice). În rezultatul HPLC sunt obținute 620 mg de rusticozida G<sub>1</sub> și 18 mg de rusticozida G. Controlul asupra separării rusticozidei G<sub>1</sub> și rusticozidei G este efectuat prin cromatografierea în strat subțire de silicagel și revelarea componentelor cu reactive Sanie și H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrat.

25 Moldstim (capsicozida) a fost obținut din semințe de ardei dulce (Tschesche R., Gutwinski H. Capsicosid, ein bisdesmosidesches 22-hydroxy-furostanol-glycosid aus dem Samen von Capsicum annum L. Chem.Ber., 1975, 108, 265-272).

*Exemplu de realizare a invenției*

Cercetările s-au efectuat în condiții de laborator, seră și de câmp. Ca obiect de studiu au servit plantele de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. soiul „Fakel”.

30 Pentru înmuierea semințelor de tomate înainte de semănat și pentru tratarea florilor de inflorescențe ale primelor trei raceme ale plantelor se utilizează o nouă glicozidă steroidică din șirul colestanic – rusticozida.

Înainte de semănat o parte de semințe a fost înmuiată timp de 24 de ore în soluție apoasă de rusticozida G<sub>1</sub> în concentrație de 0,005%, 0,01% și 0,05% (invenția propusă). Altă parte de semințe a fost înmuiată timp de 24 de ore în soluție apoasă de Moldstim în concentrație de 0,08% (cea mai apropiată soluție). Ca martor au servit semințele înmuiate în apă distilată. În fiecare variantă au fost luate în studiu câte 100 de semințe în 4 repetări.

40 Apoi semințele au fost scoase din soluții, uscate și semăntate în seră pentru obținerea răsadului. Suprafața unei parcele constituie 1 m<sup>2</sup> în 4 repetări pentru fiecare variantă. Răsadul s-a stropit în faza de 3-4 frunze cu soluție apoasă de rusticozida G<sub>1</sub> (invenția propusă), Moldstim (cea mai apropiată soluție) și apa distilată (martor) până la umectarea frunzelor (0,5 L/m<sup>2</sup>).

Când răsadul a atins înălțimea de 15...20 cm și numărul de frunze de 5...7, el a fost plantat în câmp. Suprafața unei parcele în câmp este de 6,0 m<sup>2</sup>, plantarea a fost efectuată în 4 repetări.

45 În fazele de înflorire după apariția inflorescențelor la primul racem, apoi la al doilea și al treilea racem al plantelor ele au fost stropite (de 3 ori) cu soluție apoasă de rusticozida G<sub>1</sub>, Moldstim și apa distilată.

50 Așadar, schema experienței este: semințele înainte de semănat și plantele în fazele de 3...4 frunze și de înflorire a primului, al doilea și al treilea racem ale inflorescențelor (în total de 4 ori) se tratează cu soluție apoasă de rusticozida G<sub>1</sub> în concentrație de 0,005%, 0,01% și 0,05% (invenția propusă), de Moldstim în concentrație de 0,08% (cea mai apropiată soluție) și cu apă distilată (martor). Consumul total este de 0,05 L/m<sup>2</sup>.

În faza timpurie de vegetație au fost efectuate cercetările fenologice, începând cu germinarea semințelor, evidența vitezei de germinare, creșterea și dezvoltarea plantelor.

55 După plantarea răsadului în câmp pe parcursul vegetației au fost cercetate legarea fructelor, productivitatea și cantitatea lor.

Conform rezultatelor cercetărilor efectuate a fost depistat că tratarea semințelor de tomate înainte de semănat cu soluția rusticozidei G<sub>1</sub> sporește energia de germinare a lor cu 5,8%, încolțirea cu 4,7%, iar lungimea rădăcinii cu 54,8% (în comparație cu varianta martor), și la tratarea suplimentară a răsadului se mărește randamentul răsadului standard cu 17,9%.

60 Tratarea inflorescențelor de tomate cu soluția de rusticozida G<sub>1</sub> contribuie la legarea mai bună a fructelor (cu 24,1%), accelerarea coacerii lor, mărirea cantității și masei lor, ce duce la sporirea productivității totale și a calității comerciale a fructelor de tomate (vezi datele din tabel).

Influența rusticozidei G<sub>1</sub> la creșterea, dezvoltarea și productivitatea fructelor de tomate, soiul „Fakel”

Variantele experimentului	Energia de germinare, %	Germinarea, %	Lungimea rădăcinii, cm	Cantitatea răsadului standard, %	Legarea fructelor, %	Productivitatea, q/ha			
						totală	% față de martor	comercială	% față de martor
Apă (martor)	94,5	95,5	3,1	100,0	100,0	464,9	100,0	363,6	100,0
Moldstim 0,08% (cea mai apropiată soluție)	97,8	98,6	4,1	111,5	109,4	589,7	126,8	535,9	147,4
Rusticozida G <sub>1</sub> 0,05%	98,3	98,5	4,6	112,8	109,9	579,6	124,7	558,8	153,6
Rusticozida G <sub>1</sub> 0,01%	100,0	100,0	4,8	117,9	124,1	691,0	148,6	631,2	173,6
Rusticozida G <sub>1</sub> 0,005%	99,1	99,3	4,5	115,3	111,4	584,4	125,7	537,7	147,9

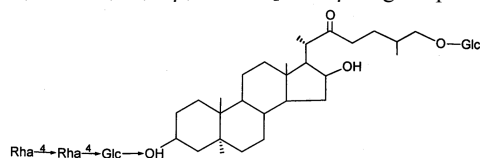
5

Așadar, tratarea organelor generative ai plantelor de tomate (semințelor, plantelor în faza de 3...4 frunze și faza de înflorire a I, II și III raceme) prin metoda propusă permite de a spori productivitatea totală a fructelor de tomate cu 48,6% și comercială cu 73,6% în comparație cu varianta martor; în comparație cu cea mai apropiată soluție – totală cu 17,3%, comercială cu 17,8%.

10

**(57) Revendicări:**

15 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranozidă-(25R)-5 $\alpha$ -coleston, 22-keto, 3 $\alpha$ , 16 $\beta$ , 26-triol-[26-O- $\beta$ -D-glucopiranozidă] cu formula structurală:



unde: Glc – glucoză, Rha – ramnoză

în calitate de compus ce sporește productivitatea și calitatea fructelor de tomate.

**(56) Referințe bibliografice:**

1. S.Shvets, P.Kintia, I.Lunga, C.Bassarello, S.Piacente, C. Pizza. Steroidal glycosides from the seeds of *Nicotiana rustica*. Structure of rusticozide G. *Planta Medica*, Issue 09, Vol.74, 2008, PB 57
2. Registru de stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizanților, permise pentru utilizare în Republica Moldova, Chișinău, 2009 “Tipografia centrală”, p.323

**Șef Secție:**

COLESNIC Inesa

**Examinator:**

GORDIENCO Maria

**Redactor:**

LOZOVANU Maria