



MD 4326 B1 2015.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4326** (13) **B1**
(51) Int.Cl.: *C07D 209/86* (2006.01)
C07C 13/47 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01)
C12R 1/89 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2013 0078 (22) Data depozit: 2013.10.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.02.28, BOPI nr. 2/2015
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: CUCICOVA Caleria, MD; RUDIC Valeriu, MD; ARICU Aculina, MD; CEPOI Liliana, MD; RUDI Liudmila, MD; SECARA Elena, MD; VALUȚA Ana, MD; BARBĂ Alic, MD; MISCU Vera, MD; VLAD Pavel, MD; CHIRIAC Tatiana, MD	
(73) Titulari: INSTITUTUL DE CHIMIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) **Compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoilamino)carbazol și procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia**

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la chimie și biotehnologie, în special la sinteza unui nou compus coordinativ cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic și la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia.

Conform invenției, se revendică compusul coordinativ N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoilamino)carbazol.

De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: KNO₃ - 0,51; K₂HPO₄ - 0,45; NaHCO₃ - 0,05; MgSO₄·7H₂O

2
- 0,1; CaCl₂ - 0,11; ZnSO₄·7H₂O - 0,0005; MnSO₄ - 0,002; H₃BO₃ - 0,0085; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O - 0,00225; FeSO₄·7H₂O - 0,004; Co(NO₃)₂·H₂O - 0,00009; EDTA - 0,00475; compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoilamino)carbazol 0,060...0,062 și apă distilată până la 1 L, la temperatura de 23...25°C și iluminarea de 2000...3000 lx.

Rezultatul constă în majorarea activității antioxidante a biomasei de cianobacterie.

Revendicări: 2

MD 4326 B1 2015.02.28

(54) N-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoylamino)carbazole compound and process for cultivation of *Nostoc linckia* cyanobacterium with its use

(57) Abstract:

1

The invention relates to chemistry and biotechnology, in particular to the synthesis of a new coordinative compound with hybrid terpenic and azaheterocyclic skeleton and to a process for cultivation of *Nostoc linckia* cyanobacterium with its use.

According to the invention, claimed is the coordinative N-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoylamino)carbazole compound.

It is also claimed a process for cultivation of *Nostoc linckia* cyanobacterium on a nutrient medium containing, g/L: KNO_3 – 0.51; K_2HPO_4 – 0.45; NaHCO_3 – 0.05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; CaCl_2 – 0.11; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.0005;

2

MnSO_4 – 0.002; H_3BO_3 – 0.0085; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.00225; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.004; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.00009; EDTA – 0.00475; N-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoylamino)carbazole compound 0.060...0.062 and distilled water up to 1 L, at a temperature of 23...25°C and illumination of 2000...3000 lx.

The result consists in increasing the antioxidant activity of cyanobacterium biomass.

Claims: 2

(54) Соединение N-($\Delta^{8,13}$ -бициклогомофарнезеноиламино)карбазол и способ культивирования цианобактерии *Nostoc linckia* с его использованием

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к химии и биотехнологии, в частности к синтезу нового координационного соединения с гибридным терпеновым и азаетероциклическим скелетом и к способу культивирования цианобактерии *Nostoc linckia* с его использованием.

Согласно изобретению, заявляется координационное соединение N-($\Delta^{8,13}$ -бициклогомофарнезеноиламино)карбазол.

Также, заявляется способ культивирования цианобактерии *Nostoc linckia* на питательной среде, которая содержит, г/л: KNO_3 – 0,51; K_2HPO_4 – 0,45;

2

NaHCO_3 – 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; CaCl_2 – 0,11; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0005; MnSO_4 – 0,002; H_3BO_3 – 0,0085; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,00225; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,004; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,00009; EDTA – 0,00475; соединение N-($\Delta^{8,13}$ -бициклогомофарнезеноиламино)карбазол 0,060...0,062 и дистиллированная вода до 1 л, при температуре 23...25°C и освещении 2000...3000 лк.

Результат состоит в повышении антиоксидантной активности биомассы цианобактерии.

П. формулы: 2

Descriere:

Invenția se referă la chimie și biotehnologie, în special la sinteza unui nou compus coordinativ cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic și la un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia.

Este cunoscut procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* pe mediul nutritiv mineral ce conține, g/L: KNO₃ - 0,51; K₂HPO₄ - 0,45; NaHCO₃ - 0,05; MgSO₄·7H₂O - 0,1, CaCl₂ - 0,11; ZnSO₄·7H₂O - 0,0005; MnSO₄ - 0,002; H₃BO₃ - 0,0085; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O - 0,00225; FeSO₄·7H₂O - 0,004; Co(NO₃)₂·H₂O - 0,00009; EDTA - 0,00475 și apă distilată până la 1L la temperatura de 23...25°C și iluminarea de 2000...3000 lx. Din biomasa liofilizată obținută se prepară extractul etanolic de 70% cu concentrația de 1 mg/mL substanță activă. Valoarea activității antioxidante a extractului etanolic de 70% este de 52% inhibiție DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidrazil radical) [1].

Neajunsul acestui procedeu constă în activitatea antioxidantă joasă a extractului etanolic de 70%, obținut din biomasa de *Nostoc linckia* (52% inhibiție DPPH).

Este cunoscut compusul coordinativ tiocianat de bis(nicotinoilhidrazon)-2,6-diacetilpiridină-(izotiocianato)(aqua)cobalt(II) cu formula [Co^{II}(L)(NCS)(H₂O)]NCS [2].

Neajunsul acestui compus constă în faptul că, în virtutea acțiunii în calitate de stimulator al activității antioxidante, la aplicare în calitate de adaos la cultivarea cianobacteriei *Nostoc linckia*, conform procedurii expus mai sus, asigură un spor neînsemnat al activității antioxidante. Astfel, în baza testelor efectuate, activitatea antioxidantă a extractului etanolic, din biomasa de *Nostoc linckia*, cultivată conform procedurii descris cu adaos de 0,062 g/L compus, a constituit 58% inhibiție DPPH (date nepublicate).

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu eficient și reproductibil de sporire a activității antioxidante a extractului etanolic de 70%, obținut în baza biomasei de *Nostoc linckia*.

Esența invenției constă în faptul că se propune aplicarea în componența mediului nutritiv a unui compus nou cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic N-(Δ^{8,13}-biciclohomofarnesenoilamino)-carbazol.

Se propune, de asemenea, un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia*, care constă în aceea că se cultivă cianobacteria pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: KNO₃ - 0,51; K₂HPO₄ - 0,45; NaHCO₃ - 0,05; MgSO₄·7H₂O - 0,1; CaCl₂ - 0,11; ZnSO₄·7H₂O - 0,0005; MnSO₄ - 0,002; H₃BO₃ - 0,0085; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O - 0,00225; FeSO₄·7H₂O - 0,004; Co(NO₃)₂·H₂O - 0,00009; EDTA - 0,00475 și apă distilată; la iluminarea de 2000...3000 lx și temperatura de 23...25°C, totodată mediul conține suplimentar compusul N-(Δ^{8,13}-biciclohomofarnesenoilamino)carbazol, în concentrație de 0,060...0,062 g/L.

Activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 70% cu concentrația de 1 mg/mL, obținut în baza biomasei liofilizate de *Nostoc linckia* prin aplicarea procedurii dat, este de 70...74% inhibiție DPPH.

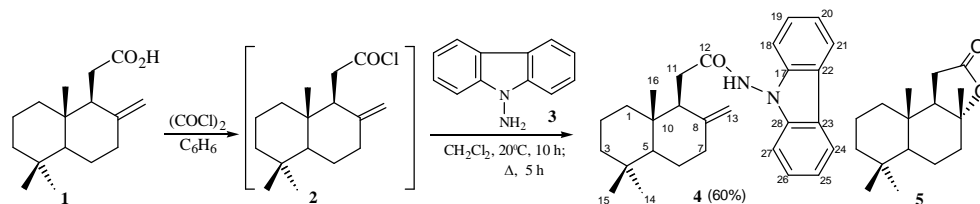
Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea activității antioxidante a extractului etanolic de 70%, obținut în baza biomasei liofilizate a cianobacteriei *Nostoc linckia*, cu 16% față de cea mai apropiată soluție. Administrarea compusului din prima zi de cultivare stimulează acumularea componentelor antioxidante în biomasa cianobacteriei, care ulterior se extrag în alcool etilic de 70%.

Rezultatul invenției este condiționat de aplicarea, pentru prima dată, a compusului N-(Δ^{8,13}-biciclohomofarnesenoilamino)carbazol în calitate de stimulator al acumulării componentelor antioxidante care determină activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 70% obținut în baza biomasei liofilizate de *Nostoc linckia*.

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

În calitate de compus inițial pentru sinteza N-(Δ^{8,13}-biciclohomofarnesenoilamino)carbazolului (4) a servit acidul Δ^{8,13}-biciclohomofarnesenic (1), care a fost obținut din sclareolida (5) comercial accesibilă, cu un randament total de 60% (C. Cucicova., Aricu A., Ungur N., Vlad P., Secara E., Sova S., Zbancioc G., Mangalagiu I. Synlett, 2013, 24, p. 697-700). La tratarea acidului (1) cu clorura de oxalil (COCl)₂ a fost sintetizată *in situ* cloranhidrida (2), care a fost introdusă în reacție cu N-aminocarbazolul

(3), în rezultatul căreia a fost obținut N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoilamino)carbazolul (4) cu un randament de 60% (Schema 1).



5

Schema 1

Procedeul de obținere a compusului este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 60% față de cel teoretic calculat. Compusul este stabil în contact cu aerul, insolubil în alcoolii și apă, bine solubil în dimetilsulfoxid, acetonitril, cloroform și acetona.

10

Exemplu de obținere a N-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoilamino)carbazolului (4)

La soluția din 102 mg (0,41 mmoli) acid $\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenic (1) în 2 mL benzen absolut se adaugă soluția (COCl)₂ (0,4 mL, 0,58 g, 4,58 mmoli) în 1 mL benzen absolut. Amestecul de reacție se agită 1 oră la temperatura camerei și se refluxează 1 oră. Benzenul și excesul de (COCl)₂ se înlătură la presiune scăzută. La reziduu se adaugă 10 mL CH₂Cl₂ și 150 mg (0,82 mmoli) N-amino-carbazol (3) și se agită 10 ore la temperatura camerei și 5 ore la reflux. Precipitatul se filtrează, se spală cu CH₂Cl₂ și filtratul se distilează. Reziduu (215 mg) se dizolvă în 15 mL eter de petrol. Cristalele se filtrează, se spală cu eter de petrol, obținându-se 152 mg de un amestec al amidei (4) și N-aminocarbazolului (3) inițial. Prin recristalizarea fracționată a amestecului din CH₃CN se obțin 104 mg (61%) amidă (4).

15

20

Procedeul de obținere a compusului este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 60% față de cel teoretic calculat.

Cristale albe, t.top. 276...277°C (CH₃CN). [α]_D²² 8,97 (c 0,73, CHCl₃).

25

Structura compusului a fost confirmată în baza studiului IR, RMN.

Spectrul IR (cm⁻¹): 720, 742, 1149, 1231, 1316, 1451, 1486 (carbazol), 893, 1643, 3021(>=CH₂), 1536, 1678(NH-CO), 3241(NH).

30

Spectrul ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ , p.m.): 0,77 (3H, s, C₁₆-CH₃); 0,83 (3H, s, C₁₅-CH₃); 0,88 (3H, s, C₁₄-CH₃); 1,23 (1H, dd, J=12,5; 2,2 Hz, H-5); 2,03 (1H, td, J=12,6; 4,6 Hz, Ha-7); 2,42 (1H, He-7); 2,42 (1H, dm, J=9,7 Hz, H-9); 2,59 (1H, dd, J=15,3; 9,7 Hz, Ha-11); 2,66 (1H, dd, J=15,3; 4,0 Hz, H_b-11); 4,94(1H, s, Ha-13); 4,96 (1H, s, H_b-13); 7,23 (1H, t, J=7,4 Hz, H-20), 7,23 (1H, t, J=7,4 Hz, H-25); 7,24 (1H, d, J=7,4 Hz, H-27); 7,35 (1H, d, J=7,4 Hz, H-18); 7,43 (1H, t, J=7,4 Hz, H-19); 7,43 (1H, t, J=7,4 Hz, H-26); 8,15 (1H, d, J=7,7 Hz, H-21); 8,15 (1H, d, J=7,7 Hz, H-24); 11,18 (1H, s, NH); 1,11-1,79 (8H, m).

35

Spectrul ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆, δ , p.m.): 14,97 (C(16)); 19,34 (C(2)); 22,07 (C(15)); 24,13 (C(6)); 30,02 (C(11)); 33,68 (C(4)); 33,81 (C(14)); 37,70 (C(7)); 39,01 (C(1)); 39,19 (C(10)); 42,07 (C(3)); 52,17 (C(9)); 54,97 (C(5)); 106,90 (C(13)); 109,07 (C(18)); 109,07 (C(27)); 120,33 (C(20)); 120,33 (C(25)); 120,84 (C(21)); 120,84 (C(24)); 120,97 (C(22)); 120,97 (C(23)); 126,52 (C(19)); 126,52 (C(26)); 140,33 (C(17)); 140,33 (C(28)); 149,71 (C(8)); 172,45 (C(12)).

40

Exemple de aplicare a N-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoil-amino)carbazolului (4) în calitate de stimulator al activității antioxidante a extractului etanolic de 70% obținut în baza biomasei liofilizate a cianobacteriei *Nostoc linckia*.

45

Exemplul 1

Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conținut al componentelor (g/L): KNO₃ - 0,51; K₂HPO₄ - 0,45; NaHCO₃ - 0,05; MgSO₄·7H₂O - 0,1; CaCl₂ - 0,11; ZnSO₄·7H₂O - 0,0005; MnSO₄ - 0,002; H₃BO₃ - 0,0085; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O - 0,00225; FeSO₄·7H₂O - 0,004; Co(NO₃)₂·H₂O - 0,00009; EDTA - 0,00475 și apă distilată până la 1L. În prima zi de cultivare, la suspensia de *Nostoc linckia*, în calitate de stimulator al activității antioxidante se adaugă N-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoilamino)carbazolul (4) în concentrația de 0,060 g/L.

50

Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 100 mL cu 50 mL suspensie în următoarele condiții: temperatura 23...25°C, iluminarea 2000...3000 lx. La ziua a 14-a,

biomasa de *Nostoc linckia* se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se liofilizează. Din biomasa liofilizată se prepară extractul etanolic de 70% care se standardizează după substanța activă, concentrația finală fiind de 1 mg/mL. În extractul obținut se determină activitatea antioxidantă cu aplicarea testului DPPH.

5 Extractul etanolic are activitatea antioxidantă de $70 \pm 0,48\%$ inhibiție DPPH, față de 54% inhibiție DPPH în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul activității antioxidante este de 16%.

Exemplul 2

10 Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conținut al componentelor (g/L): KNO_3 - 0,51; K_2HPO_4 - 0,45; NaHCO_3 - 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; CaCl_2 - 0,11; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,0005; MnSO_4 - 0,002; H_3BO_3 - 0,0085; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,00225; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,004; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,00009; EDTA - 0,00475 și apă distilată până la 1L. In prima zi de cultivare, la suspensia de *Nostoc linckia*, in calitate de stimulator al activității antioxidante se adaugă compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoilamino)carbazolul (4) în concentrația de 0,062 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 100 mL cu 50 mL suspensie în următoarele condiții: temperatura 23...25°C, iluminarea 2000...3000 lx. La ziua a 14-a, biomasa de *Nostoc linckia* se separă de lichidul cultural, se supune demineralizării și se liofilizează. Din biomasa liofilizată se prepară extractul etanolic de 70% care se standardizează după substanța activă, concentrația finală fiind de 1 mg/mL. În extractul obținut se determină activitatea antioxidantă cu aplicarea testului DPPH.

20 Extractul etanolic are activitatea antioxidantă de $74 \pm 0,66\%$ inhibiție DPPH, față de 58% inhibiție DPPH în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul activității antioxidante este de 16%.

25

Tabel

Activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 70% în baza biomasei liofilizate de *Nostoc linckia*, cultivată conform procedeeului revendicat și celei mai apropiate soluții

Procedeul aplicat	Concentrația compusului, g/L	Activitatea antioxidantă, % inhibiție DPPH
Conform procedeeului descris [1]	-	52
Conform procedeeului descris [1] + $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})]\text{NCS}$	0,060	$54 \pm 0,22$
	0,062	$58 \pm 0,60$
Conform soluției revendicate (cu compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoilamino)carbazol)	0,060	$70 \pm 0,48$
	0,062	$74 \pm 0,66$

30 Datele din tabel demonstrează o creștere a activității antioxidante a extractului etanolic de 70% cu concentrația de 1 mg/mL substanța activă, obținut în baza biomasei liofilizate conform procedeeului revendicat, cu 16% față de procedeeul cel mai apropiat. Biomasa cianobacteriei *Nostoc linckia* reprezintă o sursă importantă de substanțe antioxidante, iată de ce cu sporul activității antioxidante a extractului etanolic de 70%, obținut în baza biomasei liofilizate de *Nostoc*, crește valoarea ei în calitate de producător de substanțe antioxidante.

35

Proprietățile N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoilamino)carbazolului(4) prezintă interes pentru biotehnologie în calitate de stimulator al activității antioxidante a biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*.

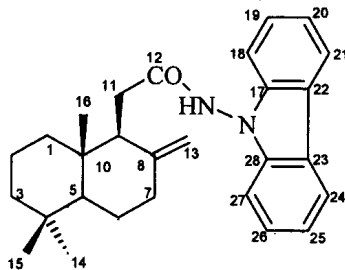
40

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Cepoi L., Rudi L., Miscu V., Cojocari A., Chiriac T., Sadovnic D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. University of Oradea, Fasc. Biology, XVI(2), 2009, p. 43-48
2. Bulhac I., Șova S., Novîchi G., Danilescu O., Rija A. Synthesis, crystal structure and magnetic properties of new Schiff base Co(II) complexes with NCS⁻ containing anions. The XXXIInd Romanian Chemistry Conference, Călimănești-Căciulata, Romania, 3-5 October 2012; Book of abstracts, P.S. II-12, p.12

(57) Revendicări:

1. Compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoilamino)carbazol cu formula:



2. Procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia*, care constă în aceea că se cultivă cianobacteria pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: KNO₃ - 0,51; K₂HPO₄ - 0,45; NaHCO₃ - 0,05; MgSO₄·7H₂O - 0,1; CaCl₂ - 0,11; ZnSO₄·7H₂O - 0,0005; MnSO₄ - 0,002; H₃BO₃ - 0,0085; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O - 0,00225; FeSO₄·7H₂O - 0,004; Co(NO₃)₂·H₂O - 0,00009; EDTA - 0,00475 și apă distilată; la iluminarea de 2000...3000 lx și temperatura de 23...25°C, **caracterizat prin aceea că** mediul conține suplimentar compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoilamino)carbazol definit în revendicarea 1, în concentrație de 0,060...0,062 g/L.

Șef Secție:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

Redactor:

LOZOVANU Maria