

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:  $\text{KNO}_3$  - 0,51;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,45;  $\text{NaHCO}_3$  - 0,05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{CaCl}_2$  - 0,11;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,0005;  $\text{MnSO}_4$  - 0,002;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 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 la temperatura de 23...25°C și iluminarea de 2000...3000 lx. Din biomasa obținută liofilizată se prepară extractul etanolic de 70% cu concentrația de 1mg/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  $[\text{Co}^{\text{II}}(\text{L})(\text{NCS})(\text{H}_2\text{O})]\text{NCS}$  [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 0,064 g/L compus, a constituit 57% 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 un compus nou cu schelet hibrid terpenic și azaheterociclic 1-( $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol.

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:  $\text{KNO}_3$  - 0,51;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,45;  $\text{NaHCO}_3$  - 0,05;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{CaCl}_2$  - 0,11;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,0005;  $\text{MnSO}_4$  - 0,002;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 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; la iluminarea de 2000...3000 lx și temperatura de 23...25°C, totodată mediul nutritiv conține suplimentar compusul 1-( $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol definit anterior, în concentrație de 0,062...0,064 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 64...66% inhibiție DPPH.

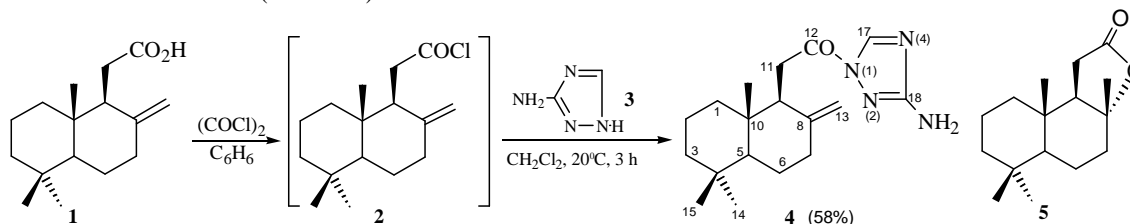
Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea activității antioxidante a extractului etanolic de 70%, obținut în baza biomasei liofilizate a cianobacteriei *Nostoc linckia*, cu 23...27% față de cea mai apropiată soluție. Administrarea compusului din prima zi de cultivare stimulează acumularea componentelor antioxidante în biomasa cianobacteriei, care ulterior se extrag cu alcool etilic de 70%.

Rezultatul invenției este condiționat de aplicarea, pentru prima dată, a compusului 1-( $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol 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 1-( $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazolului (4) a servit acidul  $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenic (1), care a fost obținut din sclareolida (5) comercial accesibilă, cu un randament total de 60% (C. Cucicova, A. Aricu, N. Ungur, P. F.Vlad, E. Secara, S. Sova, Gh. Zbancioc, Ionel Mangalagiu. Synlett, 2013, 24, p. 697-700).

La tratarea acidului (1) cu clorura de oxalil ( $\text{COCl}_2$ ) a fost sintetizată in situ cloranhidrida (2), care a fost introdusă în reacție cu 3-amino-1,2,4-triazolul (3), în rezultatul căreia a fost obținută amida acidului biciclohomofarnesenic (4) cu un randament de 58% (Schema 1).



Schema 1

Procedeu de obținere a compusului este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 58% față de cel teoretic calculat. Compusul este stabil în contact cu aerul, insolubil în alcoolii și apă, bine solubil în dimetilsulfoxid, acetonitril, cloroform și acetonă.

#### Exemplu de obținere a 1-( $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazolului (4)

La soluția din 115 mg (0,46 mmoli) acid  $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenic (1) în 2,5 mL benzen absolut se adaugă soluția ( $\text{COCl}_2$ ) (0,5 mL, 0,73 g, 5,75 mmoli) în 1,5 mL benzen absolut. Amestecul de reacție se agită 1 oră la temperatura camerei și se refluxează 1 oră. Benzenul și excesul de ( $\text{COCl}_2$ ) se înlătură la presiune scăzută. La reziduu se adaugă

4,5 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> și 60 mg (0,71 mmoli) 3-amino-1,2,4-triazol (3) și se agită 3 ore la temperatura camerei. Precipitatul se filtrează, se spală cu CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> și filtratul se distilează. Reziuduul (152 mg) se dizolvă în 1,5 mL CHCl<sub>3</sub> și se cromatografiază pe coloană cu silicagel L100/400 μm (4,5 g). Cu cloroform se eluează inițial 49 mg amestec de acid biciclohomofarnesenic (1) inițial și amida (4), ulterior 53 mg ale amidei (4), p.t. 144...145°C (CH<sub>3</sub>CN). La recristalizarea amestecului acidului (1) și amidei (4) din CH<sub>3</sub>CN se obțin încă 10 mg amidă. După înlăturarea cristalelor amidei, filtratul se distilează, iar reziuduul (39 mg) se cromatografiază pe coloană cu silicagel (1.2 g). Cu amestec eter de petrol : eter etilic (4:1) se eluează 7 mg (6%) acid (1), cu amestecul eter de petrol : eter etilic (1:1) se eluează 22 mg amidă (4). Randamentul amidei (4) constituie 58% (85 mg).

Cristale albe, t.top. 144-145 °C (CH<sub>3</sub>CN). [α]<sub>D</sub><sup>24</sup> 39.6 (c 0.67, CHCl<sub>3</sub>). Structura compusului a fost confirmată în baza studiului IR, RMN.

Spectrul IR (cm<sup>-1</sup>): 3446, 3296, 3200, 1662 (NH<sub>2</sub>), 3116, 893 (>=CH<sub>2</sub>), 1724 (CO), 1638, 1547, 1520, 1210, 1000, 737 (1,2,4-triazol).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, p.m.): 0,78 (3H, s, C<sub>16</sub>-CH<sub>3</sub>); 0,89 (3H, s, C<sub>15</sub>-CH<sub>3</sub>); 0,91 (3H, s, C<sub>14</sub>-CH<sub>3</sub>); 1,25 (1H, overlap, H-5); 2,14 (1H, dt, J=13.0, 4.9 Hz, Ha-7); 2,43 (1H, dm, J=13.0, H<sub>b</sub>-7), 2,56 (1H, br.d, J=10.9 Hz, H-9), 2,97 (1H, dd, J-17.4, 3.2 Hz, Ha-11), 3,39 (1H, dd, J=17.4, 10.9 Hz, He-11), 4,42(1H, s, Ha-13), 4,76(1H, s, H<sub>b</sub>-13), 6.64(2H, br.s, NH<sub>2</sub>), 7.47(1H, s, H-17).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, p.m.): 14,62 (C(16)); 19,25 (C(2)); 21,70 (C(15)); 23,97 (C(6)); 31,10 (C(11)); 33,53 (C(4)); 33,55 (C(14)); 37,48 (C(7)); 39,05 (C(10)); 39,11 (C(1)); 41,98 (C(3)); 51,74 (C(9)); 55,15 (C(5)); 106,55 (C(13)); 146,73 (C(8)); 150,41 (C(17)); 156,83 (C(18)), 174.8 (C(12)).

<sup>15</sup>N RMN (CDCl<sub>3</sub>):212 (N<sub>(1)</sub> și N<sub>(2)</sub> ciclul triazolic, 208 (N<sub>(4)</sub> ciclul triazolic), 62 (NH<sub>2</sub>).

*Exemple de utilizare a 1-(Δ<sup>8,13</sup>-biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazolului în calitate de stimulator al activității antioxidante a extractului etanolic de 70% obținut în baza biomasei liofilizate de Nostoc linckia.*

#### Exemplul 1

Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conținut al componentelor (g/L): KNO<sub>3</sub>- 0,51; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,45; NaHCO<sub>3</sub> - 0,05; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,1; CaCl<sub>2</sub> - 0,11; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,0005; MnSO<sub>4</sub> - 0,002; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0,0085; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O - 0,00225; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,004; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O - 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 1-(Δ<sup>8,13</sup>-biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazolul în concentrația de 0,062 g/L. Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 100 mL în 50 mL de 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.

Extractul etanolic are activitatea antioxidantă de 64±1,02% inhibiție DPPH, față de 54% inhibiție DPPH în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul activității antioxidante este de 10%.

#### Exemplul 2

Se prepară mediul nutritiv mineral cu următorul conținut al componentelor (g/L): KNO<sub>3</sub> - 0,51; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,45; NaHCO<sub>3</sub> - 0,05; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,1; CaCl<sub>2</sub> - 0,11; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,0005; MnSO<sub>4</sub> - 0,002; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 0,0085; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O - 0,00225; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O - 0,004; Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O - 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 compusul 1-(Δ<sup>8,13</sup>-biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol în concentrația de 0,064 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% alcool etilic care se standardizează după substanța activă, concentrația finală fiind de 1 mg/mL. În extractul obținut se determină activitatea antioxidantă cu aplicarea testului DPPH.

Extractul etanolic are activitatea antioxidantă de 66±0,85% inhibiție DPPH, față de 57% inhibiție DPPH în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul activității antioxidante este de 9%.

#### Tabel

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

Procedeul utilizat	Concentrația compusului g/L	Activitatea antioxidantă, % inhibiție DPPH
Conform procedurii descris [1]	-	52
Conform procedurii descris [1] plus [Co <sup>II</sup> (L)(NCS)(H <sub>2</sub> O)]NCS	0,062	54±0,60
	0,064	57±0,28
Conform soluției revendicate (cu compusul 1-(Δ <sup>8,13</sup> -biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol)	0,062	64±1,02
	0,064	66±0,85

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, cu 9...10% conform procedurii revendicate față de procedeul cel mai apropiat. Biomasa cianobacteriei *Nostoc linckia* reprezintă o sursă importantă de substanțe antioxidante, iar de ce cu sporul activității antioxidante a extractului etanolic de 70%, obținut în baza biomasei liofilizate de *Nostoc linckia*, crește valoarea ei în calitate de producător de substanțe antioxidante.

Proprietățile compusului 1-( $\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenol)-3-amino-1,2,4-triazol prezintă interes pentru biotehnologie în calitate de stimulator al activității antioxidante a biomasei cianobacteriei *Nostoc linckia*.