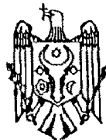




MD 4327 B1 2015.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4327** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C07D 249/14* (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 0079 (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 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazol și procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* cu utilizarea acestuia**

(57) Rezumat:

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 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazol.

De asemenea, se revendică un procedeu de cultivare a cianobacteriei *Nostoc linckia* pe un mediu nutritiv ce conține, g/L: KNO_3 - 0,51; K_2HPO_4 - 0,45; NaHCO_3 - 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2
- 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; compusul 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomofarnesenoil)-3-amino-1,2,4-triazol 0,062...0,064 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 4327 B1 2015.02.28

(54) N-($\Delta^{8,13}$ -Bicyclohomofarnesenoyl)-3-amino-1,2,4-triazole 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-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoyl)-3-amino-1,2,4-triazole 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-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoyl)-3-amino-1,2,4-triazole compound 0.062...0.064 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 1-($\Delta^{8,13}$ -бициклогомофарнезеноил)-3-амино-1,2,4-триазол 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 азагетероциклическим скелетом и к способу культивирования цианобактерии *Nostoc linckia* с его использованием.

Согласно изобретению, заявляется координационное соединение 1-($\Delta^{8,13}$ -бициклогомофарнезеноил)-3-амино-1,2,4-триазол.

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 1-($\Delta^{8,13}$ -бициклогомофарнезеноил)-3-амино-1,2,4-триазол 0,062...0,064 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:

5 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.

10 Este cunoscut procedeul 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 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].

15 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].

20 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).

25 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-($\Delta^{8,13}$ -biciclihomofarnesenoi)-3-amino-1,2,4-triazol.

30 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 35 2000...3000 lx și temperatura de 23...25°C, totodată mediul nutritiv conține suplimentar compusul 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclihomofarnesenoi)-3-amino-1,2,4-triazol, în concentrație de 0,062...0,064 g/L.

40 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.

45 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%.

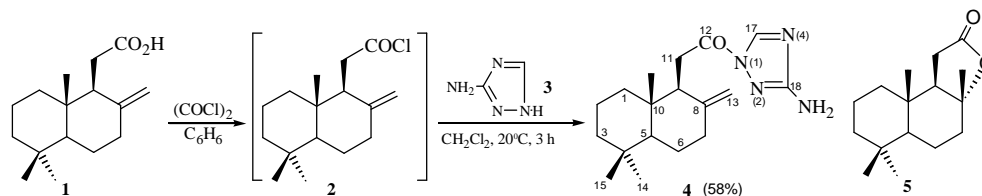
Rezultatul invenției este condiționat de aplicarea, pentru prima dată, a compusului 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclihomofarnesenoi)-3-amino-1,2,4-triazol în calitate de stimulator al acumulării componentelor antioxidante care determină activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 70% obținut în baza biomasei liofilizate de *Nostoc linckia*.

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

În calitate de compus inițial pentru sinteza 1-($\Delta^{8,13}$ -biciclihomofarnesenoi)-3-amino-1,2,4-triazolului (4) a servit acidul $\Delta^{8,13}$ -biciclihomofarnesenic (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, 55 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 3-amino-1,2,4-triazolul (3), în rezultatul căreia a fost obținută amida acidului biciclohomofarnesenic (4) cu un randament de 58% (Schema 1).

5



Schema 1

Procedul 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, clorofom și acetonă.

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

La soluția din 115 mg (0,46 mmoli) acid $\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenic (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_2Cl_2 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_2Cl_2 și filtratul se distilează. Reziduu (152 mg) se dizolvă în 1,5 mL CHCl_3 și se cromatografiază pe coloană cu silicagel L100/400 μm (4,5 g). Cu clorofom 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_3CN). La recristalizarea amestecului acidului (1) și amidei (4) din CH_3CN se obțin încă 10 mg amidă. După înlăturarea cristalelor amidei, filtratul se distilează, iar reziduu (39 mg) se cromatografiază pe coloană cu silicagel (1,2 g). Cu amestecul 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_3CN). $[\alpha]_D^{24}$ 39,6 (c 0,67, CHCl_3). Structura compusului a fost confirmată în baza studiului IR, RMN.

Spectrul IR (cm^{-1}): 3446, 3296, 3200, 1662 (NH_2), 3116, 893 (>=CH_2), 1724 (CO), 1638, 1547, 1520, 1210, 1000, 737 (1,2,4-triazol).

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ , p.m.): 0,78 (3H, s, $\text{C}_{16}\text{-CH}_3$); 0,89 (3H, s, $\text{C}_{15}\text{-CH}_3$); 0,91 (3H, s, $\text{C}_{14}\text{-CH}_3$); 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_b-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_b-13); 6,64 (2H, br.s, NH_2); 7,47 (1H, s, H-17).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , 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)).

^{15}N RMN (CDCl_3): 212 ($\text{N}_{(1)}$) și $\text{N}_{(2)}$ ciclul triazolic, 208 ($\text{N}_{(4)}$ ciclul triazolic), 62 (NH_2).

Exemple de utilizare a 1-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoi)-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_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. În prima zi de cultivare, la suspensia de *Nostoc linckia*, în calitate de stimulator al activității antioxidante, se adaugă 1-($\Delta^{8,13}$ -bicyclohomofarnesenoi)-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): 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 compusul 1-(Δ^{8,13}-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% 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

Procedul utilizat	Concentrația compusului, g/L	Activitatea antioxidantă, % inhibiție DPPH
Conform procedurii descris [1]	-	52
Conform procedurii descris [1] plus [Co ^{II} (L)(NCS)(H ₂ O)]NCS	0,062	54±0,60
	0,064	57±0,28
Conform soluției revendicate (cu compusul 1-(Δ ^{8,13} -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 procedul 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 linckia*, crește valoarea ei în calitate de producător de substanțe antioxidante.

Proprietățile compusului 1-(Δ^{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*.

