

Invenția se referă la chimia coordinativă și biotehnologie, și anume la un compus coordinativ al manganului(II) pe baza de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină, care posedă proprietăți pronunțate de biostimulator, fapt stabilit prin testarea efectului exercitat asupra activității proteazelor exocelulare la tulpina de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 – producător cu semnificație biotehnologică.

Este cunoscut că ligandul 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină (tpt) conține atomi de azot, iar acesta prezintă diferite activități farmacologice cum ar fi antivirale, antitumorale, analgezice, antioxidante, antidepresive și antibacteriene (R. Kumar, N. Kumar, R.K. Roy, A. Singh. Triazines – A comprehensive review of their synthesis and diverse biological importance. *Current Medical and Drug Research*, 2017, 1(1), 1-12, Article ID 173). În plus, posedă activități catalitice în unele procese de polimerizare și oxidare și este utilizat ca reactiv analitic în determinarea spectrofotometrică și farmaceutică. Utilizarea compușilor coordinativi cu acest ligand în calitate de biostimulatori nu este descrisă în literatura de specialitate.

Dintre compușii coordinativi ai manganului(II) cu liganzi pe baza 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazinei se cunoaște compusul diacetato-aqua(2,4,6-tri-2-piridil-1,3,5-triazină)mangan(II) monohidrat [1] cu formula  $[Mn(O_2CCH_3)_2(H_2O)(tpt)] \cdot H_2O$ .

Utilizarea acestui compus coordinativ în calitate de stimulator al procesului de enzimogeneză la microorganisme nu este descrisă în literatura de specialitate.

Cea mai apropiată soluție de invenția propusă pot fi considerați compușii coordinativi ai Fe(III) cu liganzi pe baza izo- și nicotinoilhidrazonelor: azotat de (2,3-butandionă-bis(izonicotinoilhidrazonă)-tris-aqua) Fe(III) dihidrat cu formula  $[Fe(H_2L^1)(H_2O)_3](NO_3)_3 \cdot 2H_2O$  și azotat de (2,3-butandionă-bis(nicotinoilhidrazonă)-tris-aqua) Fe(III) dihidrat cu formula  $[Fe(H_2L^2)(H_2O)_3](NO_3)_3 \cdot 2H_2O$ , care sporesc activitatea proteolitică la tulpina de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 [2].

Dezavantajul compușilor menționați constă în faptul că concentrația maximă admisibilă de aplicare a compușilor pentru tulpina producător nu asigură realizarea maximă de biosinteză a proteazelor neutre - componentul principal al complexului sintetizat de tulpina dată.

Scopul prezentei invenții este sinteza compusului coordinativ izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula  $[Mn(is)(Cl)(tpt)(CH_3OH)] \cdot CH_3OH$  cu proprietăți pronunțate de stimulator al activității proteolitice la tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12.

Conform invenției, se revendică compusul mononuclear cu formula  $[Mn(is)(Cl)(tpt)(CH_3OH)] \cdot CH_3OH$ , care manifestă proprietăți de stimulator al activității proteolitice la tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12.

Rezultatul invenției constă în crearea unui compus nou  $[Mn(is)(Cl)(tpt)(CH_3OH)] \cdot CH_3OH$  cu proprietăți de biostimulator. Compusul revendicat, structura și proprietățile lui nu sunt descrise în literatura de specialitate.

La interacțiunea izobutiratului de Mn(II) cu 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină în prezența a 2-[bis(2-hidroxietyl)amino]acetonitril clorhidrat în metanol se obține compusul mononuclear neutru  $[Mn(is)(Cl)(tpt)(CH_3OH)] \cdot CH_3OH$ .

Procedeele de obținere al acestui compus este simplu în executare, substanțele inițiale accesibile, randamentul constituie 55% față de cel teoretic calculat (pe baza tpt), sinteza sonochimică este utilizată ca metodă verde de sinteză („green synthesis”). Compusul revendicat este stabil în contact cu aerul, puțin solubil în etanol, bine solubil în apă, dimetilformamidă și dimetilsulfoxidă.

Invenția se explică cu ajutorul figurii, care reprezintă structura moleculară a complexului.

*Exemplu de obținere a izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat,  $[Mn(is)(Cl)(tpt)(CH_3OH)] \cdot CH_3OH$ .*

S-a adăugat izobutirat de Mn(II) (0,1 g, 0,43 mmoli), clorhidrat de 2-[bis(2-hidroxietyl)amino]acetonitril (0,11 g, 0,61 mmoli) și 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină (0,06 g, 0,19 mmoli) în 8 mL metanol. Soluția obținută a fost pusă la ultrasunet (Wise Clean baie cu ultrasunete funcționând la 40 kHz cu o putere maximă de 140 W) timp de 30 min, filtrată și lăsată într-un flacon acoperit, timp de 4 zile. Cristalele de culoare cafenie, aciforme au fost filtrate și spălate cu metanol și uscate în aer.

S-a determinat, %: C-51,84; H-5,02; N-15,39. Pentru  $[Mn(is)(Cl)(tpt)(CH_3OH)] \cdot CH_3OH$ ,  $C_{24}H_{27}ClMnN_6O_4$ , s-a calculat, %: C-52,04; H-4,91; N-15,17. Spectrul infraroșu pentru compusul revendicat: FT/IR ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3352 br/m, 3068m, 2963 br/m, 2929 m, 2861 w, 2560 w, 1651 sh, 1596 v/s, 1572 s, 1544s, 1531 v/s, 1434 s, 1426 v/s, 1376 v/s, 1299 v/s, 1259 s, 1161 w, 1092 s, 1047 m, 1006 m, 924 w, 858 w, 850 w, 771 m, 676 w, 667 w.

Structura moleculară și cristalină a  $[Mn(is)(Cl)(tpt)(CH_3OH)] \cdot CH_3OH$  a fost determinată, aplicând difracția razelor X și este prezentată în figură.

Compusul  $[Mn(is)(Cl)(tpt)(CH_3OH)] \cdot CH_3OH$  se cristalizează în grupul spațial triclinic *P*-1 având parametrii  $a = 8,8127(6)$ ,  $b = 10,9546(5)$ ,  $c = 15,1293(6)$  Å,  $\alpha = 71,115(4)$ ,  $\beta = 81,894(4)$ ,  $\gamma = 68,777(5)^\circ$ ,  $Z = 2$ ,  $V = 1287,75(12)$  Å<sup>3</sup> (Tabelul 1).

În complex molecula de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină servește ca un ligand tridentat NNN care formează două metalocicluri cu distanțele Mn–N de 2,295 – 2,412 Å. Adițional, atomul de mangan coordonează cu anionii de clor și izobutirat și moleculele de metanol, rezultând o bipiramidă pentagonală în jurul atomului de metal. În complex anionii de izobutirat coordonează într-un mod bidentat cu distanțele de Mn–O care iau valorile 2,226 și 2,308 Å. Distanțele dintre Mn–Cl = 2,486 Å, iar Mn–O ( $CH_3OH$ ) = 2,294 Å.

Compusul coordinativ izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$  posedă proprietăți pronunțate de stimulator al activității proteolitice la tulpina de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 (Brevet de invenție MD 4186 B1 2012.11.30. Tulpină de funghi *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12-productoare de proteaze acide și neutre, xilanaze și  $\beta$ -glucozidaze).

Adăugarea compusului coordinativ izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$  în mediul nutritiv de cultivare a tulpinii de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 în concentrații de 0,0005...0,0015% sporește activitatea proteazelor acide a complexului enzimatic sintetizat de tulpină cu 67,5% și cu 49,2...92,4% activitatea proteazelor neutre.

#### Exemplu de realizare a invenției

Tulpina *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 s-a cultivat în baloane Erlenmayer cu capacitatea de 0,75 L, care conțineau 0,2 L mediu nutritiv cu următoarea compoziție, %: făină de porumb - 2,0; făină de soia - 1,0;  $\text{CaCO}_3$  - 0,2;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1;  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$  - 0,0005-0,0015; restul apă de robinet; pH-ul inițial al mediului 6,25. Mediul nutritiv se însămânțează cu suspensie de spori și miceliu în cantitate de 5% v/v, obținută prin spălare cu apă distilată sterilă a culturii de 12-14 zile, crescută pe suprafețe înclinate de malț-agar. Cultivarea s-a realizat în condiții de agitare continuă (200 rot.  $\text{min}^{-1}$ ), timp de 144 ore, la temperatura de 28°C.

Activitatea proteazelor acide (pH 3,6) ale miromicetei *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12, în variantele experimentale ale mediului, determinată în lichidul cultural (prin metoda Anson după acțiunea asupra cazienatului de sodiu) în ziua a 5-a de cultivare (ziua manifestării maxime de biosinteză în varianta martor) constituie 34,97 U/mL la concentrația complexului de 0,0005% față de 20,88 U/mL în varianta martor, sporul activității constituind 67,5% (Tabelul 2).

Activitatea proteazelor neutre (pH 7,4) determinată similar, în variantele experimentale variază în limitele 49,25...63,41 U/mL în funcție de concentrația aplicată a compusului coordinativ cu manifestarea maxime (63,41 U/mL) la concentrația de 0,0010% față de 33,01 U/mL în varianta martor, sporul activității constituind 49,2...92,4% pentru acest complex.

Avantaje oferite:

- creșterea producerii de proteaze;
- diversificarea preparatelor proteolitice după ponderea componentelor complexului enzimatic (proteaze acide, neutre și alcaline), în funcție de cerințele specifice ale domeniului de aplicare.

Compusul coordinativ izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat cu formula  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$ , datorită proprietăților care le manifestă prezintă interes pentru biotehnologii în calitate de stimulator, în particular pentru stimularea activității proteolitice la tulpina de funghi miceliali *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12.

Tabelul 1

Datele cristalografice și parametrii de structură pentru compusul  $[\text{Mn}(\text{is})(\text{Cl})(\text{tpt})(\text{CH}_3\text{OH})]\cdot\text{CH}_3\text{OH}$  (I) revendicat.

	<b>I</b>
Formula	$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{ClMnN}_6\text{O}_4$
$M_r$	553,90
Dimensiunea cristal, $\text{mm}^3$	0,530 x 0,200 x 0,080
Temperatura, K	293(2)
Singonia	triclinic
Grupul spațial	<i>P</i> -1
$a$ , (Å)	8,8127(6)
$b$ , (Å)	10,9546(5)
$c$ , (Å)	15,1293(6)
$\alpha$ , grad	71,115(4)
$\beta$ , grad	81,894(4)
$\gamma$ , grad	68,777(5)
$V$ , (Å <sup>3</sup> )	1287,75(12)
$Z$	2
$D_{\text{calc}}$ (g/cm <sup>-3</sup> )	1,429
$\mu$ , $\text{mm}^{-1}$	0,658
$F(000)$	574
Numărul reflexelor colectate	7205
Date / restricții / parametri	4782 / 0 / 330
$R_1$ , $wR_2$ [ $I > 2\sigma(I)$ ]	0,0490, 0,1186
$R_1$ , $wR_2$ (pentru toate datele)	0,0687, 0,1351

Tabelul 2

Modificarea activității proteolitice a micromicetei *Fusarium gibbosum* CNMN FD 12 sub influența compusului coordinativ izobutirato-cloro-metoxo-(2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină)-mangan(II) metanol solvat [Mn(is)(Cl)(tpt)(CH<sub>3</sub>OH)]·CH<sub>3</sub>OH (I).

Comp. coord.	Conț., %	Proteaze acide (pH 3,6)				Proteaze neutre (pH 7,4)			
		ziua a 5-a		ziua a 6-a		ziua a 5-a		ziua a 6-a	
		U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%	U/mL	%
<b>I</b>	0,0005	34,97	167,5	18,02	126,3	22,48	124,8	49,25	149,2
	0,0010	15,39	73,7	16,42	115,1	23,91	132,0	63,41	192,4
	0,0015	15,39	73,7	6,07	42,5	21,05	116,8	56,51	172,2
Martor	-	20,88	100,0	14,27	100	18,02	100,0	33,01	100,0