

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 mineral nutritiv ce conține, g/L: KNO_3 - 0,5l, 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; temperatura de 23...25°C, iluminare 2000...3000 lx. Din biomasa liofilizată obținută 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 diphenyl-2-picryl hydrazyl radical) [1]. Neajunsul acestui procedeu constă în activitatea antioxidantă joasă a extractului etanolic de 70% alcool etilic, 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 complex 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 rezultatul testelor efectuate, activitatea antioxidantă a extractului etanolic, obținut din biomasa de *Nostoc linckia*, cultivat conform procedurii descris și cu adaos de 0,062 g/L compus, activitatea antioxidantă 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-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoilamino)-carbazon.

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: 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; la iluminarea de 2000...3000 lx și temperatura de 23...25°C, totodată mediul conține suplimentar compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoilamino)carbazon, în concentrație de 0,060...0,062 g/L.

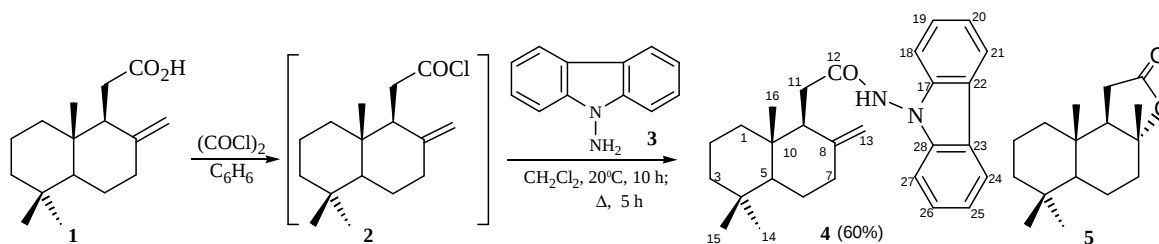
Activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 70% cu concentrația de 1 mg/ml, obținut în baza biomasei liofilizate de *Nostoc linckia* prin aplicarea procedurii dat, este de 70-74% inhibiție DPPH.

Rezultatul tehnic al invenției constă în majorarea activității antioxidante a extractului etanolic de 70% alcool etilic, 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-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoilamino)carbazon în calitate de stimulator a 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-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoilamino)carbazonului (4) a servit acidul $\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenic (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, G. Zbancioc, I. 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 N-aminocarbazonul (3), în rezultatul căreia a fost obținut N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoilamino)carbazonul (4) cu un randament de 60% (Schema 1).



Schema 1

Procedeu 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 alcooli și apă, bine solubil în dimetilsulfoxid, acetonitril, cloroform și acetona.

Exemplu de obținere a N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoil-amino)carbazonului (4)

La soluția 102 mg (0.41 mmoli) acid $\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenic (1) în 2 ml benzen absolut se adaugă soluția $(\text{COCl})_2$ (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 $(\text{COCl})_2$ se îndalătură la presiune scăzută. La reziduu se adaugă 10 ml CH_2Cl_2 și 150 mg (0.82 mmoli) N-aminocarbazol (3) și se agită 10 ore la temperatura camerei și 5 ore la

reflux. Precipitatul se filtrează, se spală cu CH_2Cl_2 și filtratul se distilează. Reziduul (215 mg) se dizolvă în 15 ml eter de petrol. Cristalele se filtrează, se spală cu eter de petrol, obținându-se 152 mg amestec a amidei (4) și a N-aminocarbazolului (3) inițial. Prin recristalizarea fracționată a amestecului din CH_3CN se obțin 104 mg (61%) amidă (4).

Procedeu 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 (CH_3CN). $[\alpha]_D^{22}$ 8.97 (c 0.73, CHCl_3).

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(>CH_2), 1536, 1678(NH-CO), 3241(NH).

Spectrul ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6 , δ , p.m.): 0,77 (3H, s, $\text{C}_{16}\text{-CH}_3$); 0,83 (3H, s, $\text{C}_{15}\text{-CH}_3$); 0,88 (3H, s, $\text{C}_{14}\text{-CH}_3$); 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, overlap, 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).

Spectrul ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6 , 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)).

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

Exemplul 1

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următorul conținut al componentelor (g/L): KNO_3 -0,5l, 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 a activității antioxidante se adaugă compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoil-amino)carbazolul (4) în concentrația de 0,060 g/L.

Cultivarea se efectuează în baloane Erlenmayer a câte 100 mL cu 50 ml suspensie în următoarele condiții: temperatura de 23...25°C, iluminare 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 standartizează 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 70±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

Se prepară mediul mineral nutritiv cu următorul conținut al componentelor (g/L): KNO_3 -0,5l, 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 a activității antioxidante se adaugă compusul N-($\Delta^{8,13}$ -biciclohomo-farnesenoil-amino)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 de 23...25°C, iluminare 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 standartizează 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 74±0,66% inhibiție DPPH, față de 58% inhibiție DPPH în cazul celei mai apropiate soluții (vezi tabelul). Sporul activității antioxidante este de 16%.

Tabel

Activitatea antioxidantă a extractului etanolic de 70% în baza biomasei liofilizate de Nostoc linckia, rezultate la cultivarea conform procedurii revendicat și celei mai apropiate soluții

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

Datele tabelului demonstrează creșterea activității antioxidante a extractului etanolic de 70% alcool etilic cu concentrația de 1 mg/ml substanța activă, obținut în baza biomasei liofilizate cu 16% conform procedeului revendicat față de procedeul cel mai apropiat. Biomasa cianobacteriei *Nostoc linckia* reprezintă o sursă modernă 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.

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