

Invenția se referă la chimie, în special la enotaninuri clorurate cu proprietăți antimicrobiene pentru aplicare în agricultură împotriva bacteriilor și fungilor fitopatogeni.

Este cunoscut compusul Enoxil, obținut prin hidrosolubilizarea taninurilor extrase din semințe de struguri, inițial insolubile, cu peroxid de hidrogen în raport masic de, respectiv 1:(3...6), timp de 7...15 min, la temperatura de 70...100°C, evaporarea și uscarea la temperatura de 40...65°C până la o masă constantă, pentru utilizare în calitate de remediu antibacterian și antifungic [1].

Dezavantajul acestui compus constă în faptul că el nu manifestă proprietăți antibacteriene și antifungice la un nivel suficient de înalt.

Problema soluționată de invenție constă în extinderea gamei de produse de origine naturală modificate chimic cu potențial antimicrobian înalt.

Esența invenției constă în elaborarea unor enotaninuri clorurate, obținute prin interacțiunea enotaninurilor cu clorul gazos, în raport de 4...6 g de enotaninuri, dizolvate în 40...60 mL de alcool metilic, la 1,5...2,0 L de clor gazos, timp de 10...20 min.

Enotaninurile clorurate pot fi aplicate în calitate de remediu împotriva bacteriilor și fungilor fitopatogeni.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea activității antimicrobiene a enotaninurilor clorurate în raport cu cea mai apropiată soluție de 8...17 ori față de bacterii și de 2...3,7 ori față de fungii fitopatogeni.

Invenția este expusă în figurile 1-5, care reprezintă:

Fig. 1, Schema reactorului de laborator pentru clorurarea enotaninurilor: 1 - permanganat de potasiu; 2 - soluția de acid clorhidric concentrat; 3 - spațiu cu clor în stare gazoasă; 4 - tub de sticlă pentru transportarea clorului; 5 - termostat; 6 - reactorul în care se obține clorul gazos; 7 - dispozitiv pentru purificarea clorului; 8 - camera de interacțiune a clorului cu enotaninurile; 9 - dispozitiv pentru reglarea temperaturii;

Fig. 2, Spectrele FT-IR ale enotaninurilor inițiale (ETN) și clorurate (T-Cl);

Fig. 3, Spectrele FT-IR ale epicatechinei inițiale (1) și clorurate (2);

Fig. 4, Spectrele RMN ale epicatechinei inițiale;

Fig. 5 Spectrul RMN ale epicatechinei clorurate.

Exemplu de realizare a invenției

O cantitate de 5 g de enotaninuri marca standard, obținute din semințe de struguri prin extracție cu alcool etilic de 50%, au fost dizolvate în 50 mL de alcool metilic. Soluția omogenă obținută a fost trecută în camera de interacțiune a clorului cu enotaninurile 8 (fig. 1). În reactorul 6 au fost trecute 5 g de permanganat de potasiu. Temperatura în reactor a fost de 0°C. În reactorul 6 s-au introdus 60 g de soluție de acid clorhidric de 30%, răcit la 0°C. Cu ajutorul dispozitivului de reglare a temperaturii s-a dirijat viteza reacției astfel, ca reacția de clorurare să se desfășoare timp de 15 min. În rezultatul reacției de clorurare, culoarea soluției de enotaninuri s-a schimbat din brună închisă în bordo-oranj. Temperatura soluției s-a mărit până la 60°C. Schimbarea culorii soluției și mărirea temperaturii soluției de enotaninuri ne vorbește despre producerea unui proces chimic. Soluția de enotaninuri a fost supusă evaporării în vid la un rotor la temperatura de 50°C până la o consistență asemănătoare cu mierea. Conținutul în continuare a fost supus uscării într-o etuvă electrică la temperatura de 50°C până la o masă constantă. În rezultat s-au obținut 6,5 g de enotaninuri clorurate. Mărirea masei produsului finit se datorează procesului de înlocuire a atomilor de hidrogen cu atomi de clor, care au o masă de 35,5 ori mai mare. Masa produsului finit a alcătuit 6,3...6,7 g.

Enotaninurile inițiale (ETN) și enotaninurile clorurate au fost supuse analizei elementale. Rezultatele obținute sunt prezentate mai jos.

Enotaninuri inițiale: C = 50,13%, H = 5,40%, N- lipsă, Cl- lipsă.

Enotaninuri clorurate: C = 28,91%, H = 4,51%, N- lipsă, Cl = 28,71%.

Datele prezentate mai sus ne confirmă că în rezultatul clorurării enotaninurilor concentrația elementelor carbon și a hidrogenului se micșorează, în schimb apare un conținut considerabil de clor în produsul finit.

Componența proantocianinelor din enotaninuri din semințele de struguri este foarte complexă. Unitățile structurale care stau la baza acestei complexități sunt doi izomeri optici cu nume de catechină și izomerul ei optic epicatechina.

În vederea stabilirii mecanismului procesului de clorurare a enotaninurilor a fost clorurată catechina hidratată.

Enotaninurile intacte și cele clorurate, precum și epicatechina intactă și clorurată au fost testate spectral prin metoda FT-IR și RMN. Analiza spectrelor respective ale substanțelor enumerate mai sus ne permite să concluzionăm:

Spectrele FT-IR ale enotaninurilor inițiale, clorurate, precum și a catechinei intacte și clorurate sunt prezentate în fig. 2, 3.

Spectrele FT-IR ale enotaninurilor inițiale (ETN) și clorurate (T-Cl) în regiunea 4000...1800 cm<sup>-1</sup> sunt identice. În ambele produse în regiunea 3600...2800 cm<sup>-1</sup> se manifestă benzi de intensitate înaltă caracteristice pentru oscilațiile ν(OH) cu caracter asociat, inclusiv și a apei.

În spectrul T-Cl, spre deosebire de ETN, apare o bandă lată compusă de intensitate medie la 1713 cm<sup>-1</sup>, fapt care vorbește despre realizarea proceselor de oxidare cu formarea la clorurarea ETN a grupelor carbonilice C=O și carboxilice -COOH.

Spectrele IR ale ETN și T-Cl sunt identice și în regiunea 1650-400 cm<sup>-1</sup> (spectrele înregistrate în ulei de vazelină), de aceea despre formarea legăturilor C-Cl în procesul de clorurare este greu de afirmat. Legăturile C-Hal (F, Cl, Br) se manifestă în formă de benzi intensive și foarte intensive în regiunea 1400-500 cm<sup>-1</sup>, iar concret pentru C-Cl – la 800-600 cm<sup>-1</sup>, o bandă intensivă (К. Наканиси. Инфракрасные спектры и строение органических соединений).

M. Изд.во «Мир», 1965, p. 69.). Deși prezența clorului în T-Cl este dovedită prin analiză chimică ( $\Omega_{(Cl)} = 28,71\%$ ), caracterul clorului în produsul clorurat nu poate fi identificat cu spectroscopia în IR.

Pentru facilitarea interpretării spectrelor IR s-a supus reacției de clorurare și compusul-model epicatechina, fragmentul căreia face parte din structura enotaninurilor.

Privitor la epicatechina inițială și epicatechina clorurată situația este alta. La clorurare spectrul suferă schimbări mai profunde. În regiunea  $4000...2800\text{ cm}^{-1}$  se manifestă benzi intensive și late, ce caracterizează prezența grupelor OH: în spectrul epicatechinei hidrat  $\nu(\text{OH}) = 3153\text{ cm}^{-1}$ , iar în spectrul epicatechinei hidrat clorurate -  $3380\text{ cm}^{-1}$ . Aceasta înseamnă că grupele OH în epicatechina hidratată sunt mai puternic asociate decât în cea clorurată.

Procesul de oxidare decurge mult mai pronunțat decât în cazul ETN. Deși poziția benzilor  $\text{C}=\text{O}$  și carboxilice  $\text{-COOH}$  se manifestă aproximativ în aceeași regiune ( $1752$  și  $1700\text{ cm}^{-1}$ ) ca și în cazul ETN, acestea sunt de o intensitate esențial mai mare, banda de la  $1700\text{ cm}^{-1}$  este a doua după intensitate din spectru.

La clorurarea epicatechinei hidrat dispar sau își micșorează esențial intensitatea o serie de benzi din regiunea  $1500-1000\text{ cm}^{-1}$ :  $1519$  dispăre,  $1464$  dispăre,  $1371$  scade în intensitate,  $1283$  scade în intensitate,  $1238$  dispăre,  $1196$  dispăre,  $1143$  scade în intensitate,  $1018$  dispăre. Totodată în această regiune apare o serie de benzi noi:  $1324\text{ cm}^{-1}$ ,  $1255\text{ cm}^{-1}$ ,  $1185\text{ cm}^{-1}$ ,  $1064\text{ cm}^{-1}$  (cea mai intensivă bandă din spectru). Aceste schimbări spectrale vorbesc despre restructurarea esențială a moleculei de epicatechină hidrat la clorurare, care se referă și la inelele aromatice din moleculă.

Spre deosebire de ETN, în spectrul produsului clorurat al epicatechinei hidrat apar două benzi noi de intensitate medie  $710$  și  $697\text{ cm}^{-1}$ , care pot fi atribuite oscilațiilor C-Cl, ceea ce ar permite de a presupune că are loc clorurarea moleculei de catechină cu o probabilitate rezonabilă a inelelor aromatice ale acesteia.

Chimismul de clorurare a enotaninurilor stabilit prin intermediul epicatechinei intacte și clorurate poate fi dedus într-o oarecare măsură din spectrele RMN ale catechinei inițiale și celei clorurate (fig. 4 și 5).

Analiza comparativă a spectrelor  $^{13}\text{C}$  ale epicatechinei și ale produsului de clorurare a acesteia a permis formularea următoarelor concluzii:

În produsul clorurat apar grupe  $\text{CH}_2$  în regiunea  $25, 29, 34, 46, 47, 49\text{ ppm}$  (vizibile în experiențele DEPT- $135^\circ$ , în care deosebim atomii de carbon cu grad diferit de protonare, de ex.  $\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}$ ). Datele modelării moleculare cu optimizarea structurii geometrice și prezicerea caracteristicilor  $^1\text{H}$  și  $^{13}\text{C}$  RMN (soft-ul PERCH NMR Tools, 2014.1) indică asupra grupei  $\text{CH}_2$  din inelul C (molecula de tip 24, cu ruperea inelului B, sau tip 25 cu inel B intact, pentru valoare apropiată de  $25\text{ ppm}$  a grupei  $\text{CH}_2$ ). Valorile  $29$  și  $34\text{ ppm}$  indică asupra grupei  $\text{CH}_2$  din inelul B, aparținând unei molecule de tip 22 sau 3 sau 25, adică cu păstrarea intactă a inelului B. Valorile  $46, 47, 49\text{ ppm}$  indică asupra distrugerii inelului B cu formarea grupei  $\text{CH}_2\text{Cl}$  terminale în diferiți compuși clorurați, molecule de tip 18 sau 24.

Semnalele la  $62-69\text{ ppm}$  indică asupra păstrării atomilor de carbon carbinolici (grupe metinice, atomi de carbon cu hibridizare  $\text{sp}^3$ ) din inelul B intact, de ex. molecule de tip 3, 22 sau 25.

Semnalele din regiunea  $75-84\text{ ppm}$  sunt prezente, conform datelor modelării moleculare, atât în compușii cu inel B intact (molecule de tip 2, 25), cât și în molecule cu inel B rupt (de tip 18). Acestea reprezintă grupe metinice, atomi de carbon cu hibridizare  $\text{sp}^3$  (CH legat cu oxigenul piranic).

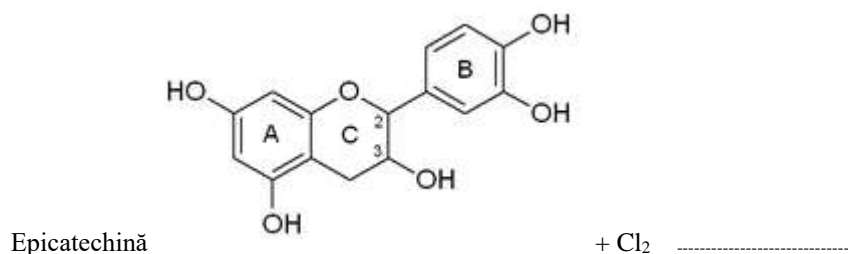
Semnalele din regiunea  $94-97.5\text{ ppm}$  indică asupra prezenței atomilor de carbon cuaternari clorurați ai inelului benzenic A, care au în poziția  $\alpha$  grupa electronoacceptoare, de ex. molecule de tip 3.

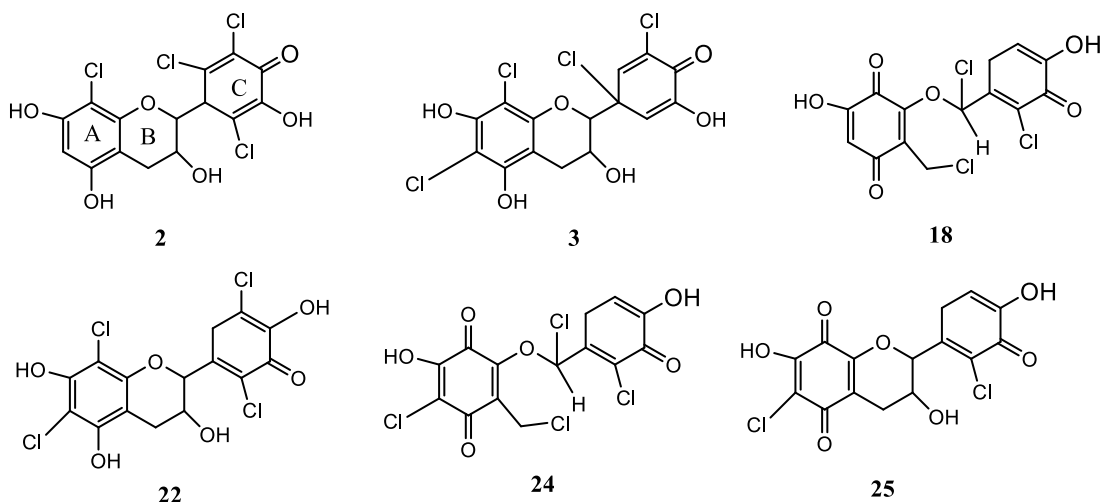
Semnalele din regiunea  $120-135\text{ ppm}$  indică asupra prezenței atomilor de carbon cuaternari clorurați ai inelului C (molecule de tip 2, 22).

Semnalele din regiunea  $142-152-163\text{ ppm}$  indică asupra prezenței atomilor de carbon cuaternari și cuaternari fenolici ai inelelor A și C (molecule de tip 2, 22, 25, 18).

Semnalele din regiunea  $169-187\text{ ppm}$  indică asupra prezenței grupelor carbonil în inelele A și C (molecule de tip 2, 22) și/sau a fragmentelor chinonice (molecule de tip 25, 18).

În rezultatul analizei spectrelor RMN ale catechinei intacte și ale catechinei clorurate obținute, procesul de clorurare poate fi realizat după cum urmează:





#### Evaluarea activității antibacteriene a compușilor inițiali și clorurați

Pentru evaluarea activității antibacteriene a compușilor obținuți prin clorurarea enotanolurilor și oxidarea lor a fost utilizată metoda diluțiilor succesive duble, care constă în aceea că la etapa inițială se iau șiruri de 10 eprubete, în care se introduc câte 1 ml de bulion peptonat. Ulterior se picură 1 mL de preparat (sol. Enoxil 2,5%, sol. enotanoluri clorurate 2,5%) în prima eprubetă (din șirul de 10 eprubete). Se pipetează amestecul obținut, după care 1 mL din acesta se transferă în eprubeta următoare, astfel procedura se repetă până la eprubeta nr. 10 a șirului. În așa mod, concentrația preparatului inițial se micșorează de 2 ori în fiecare eprubetă următoare. În același timp, se prepară culturi de 24 ore de bacterii-test. Se prepară inițial suspensii de culturi bacteriene cu densitatea optică (D.O.) de 2,0 în conformitate cu indicele McFarland. Ulterior, se transferă 1 mL de suspensie bacteriană obținută într-o eprubetă ce conține 9 mL de apă distilată sterilă. Se amestecă conținutul obținut, după care se transferă 1 mL în eprubeta cu nr. 2 din șirul de 5 eprubete ce conțin câte 9 mL de apă distilată sterilă. Din eprubeta cu nr. 5 a șirului se ia câte 0,1 mL de suspensie bacteriană, ceea ce reprezintă doza de însămânțare, și se adaugă în fiecare eprubetă care conține preparatele titrate. Ulterior, eprubetele cu preparatele titrate în care s-au introdus dozele de însămânțare ale bacteriilor se plasează în termostat la temperatura de 35°C timp de 24 ore. A 2-a zi se analizează preliminar rezultatele obținute. Ultima eprubetă din șir, în care nu se atestă o creștere vizibilă a bacteriilor, se consideră a fi concentrația minimă inhibitorie (CMI) a preparatului. Pentru aprecierea concentrației minime bactericide (CMB), conținutul eprubetelor cu CMI și a eprubetelor cu concentrații mai înalte ale preparatelor se însămânțează pe agarul peptonat din cutiile Petri cu ajutorul ansei bacteriologice. Cutiile însămânțate se plasează în termostat la temperatura de 35°C pentru 24 de ore. Concentrația preparatelor care nu permit creșterea nici a unei colonii bacteriene se consideră a fi concentrația minimă bactericidă a compusului.

Rezultatele activității antibacteriene sunt prezentate în tabelul 1.

Tabelul 1

Produs	Concentrația minimă bactericidă, %				
	<i>Bacillus subtilis</i> CNMN BB-01	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CNMN-PFB-01	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Erwinia caratovora</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
Enoxil	0,3±0,01	0,6±0,02	0,3±0,05	0,15±0,01	0,3±0,02
Enotanoluri clorurate	0,017±0,01	0,035±0,05	0,017±0,04	0,017±0,02	0,035±0,01

Conform datelor din tabel se observă că activitatea antibacteriană a enotanolurilor clorurate a fost mai mare de 8...17 ori în raport cu soluția cea mai apropiată (Enoxilul).

Screening-ul activității antifungice pe colonii de fungi fitopatogeni a enoxilului și enotanolurilor clorurate s-a efectuat prin suplimentarea acestora în concentrația de 0,002% la mediul nutritiv PDA (Potatoes Dextros Agar), aprobat pentru cultivarea fungilor necrotrofi. În calitate de martor a servit mediul PDA fără enotanoluri. În centrul cutiei Petri cu mediu solidificat, s-a însămânțat discul de miceliu cu diametrul de 5 mm, după care cutiile au fost menținute la temperatura de 23-24°C. Creșterea coloniilor s-a înregistrat în zilele 2, 4 și 6. Experiența s-a efectuat în 6 repetiții. Datele obținute au fost prelucrate în pachetul de soft STATISTICA 7 (tabelul 2).

Tabelul 2

Date comparative ale activității antifungice a Enoxilului și enotanolurilor clorurate în concentrația de 0,002%

Produs	Diametrele de creștere, mm (ziua a 6 de creștere)					
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium gibbosum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Drechslera sorokiniana</i>	<i>D. avenae</i>
Martor	70,0±0,1	74,5±0,2	87,8±0,1	62,4±0,4	51,2±0,3	65,3±0,2

Enoxil	60,0±0,1	63,3±0,4	75,0±0,2	48,5±0,3	39,0±0,2	42,8±0,3
Enotanimuri clorurate	45,0±0,2*	40,0±0,*	38,5±0,3*	22,8±0,2*	20,5±0,2*	21,0±0,1*

\*- deosebire veridică de Enoxil la nivelul  $p < 0,05$ .

Conform datelor din tabel se observă că enotanimurile clorurate au prezentat activitate antifungică față de fungii fitopatogeni de 2...3,7 ori mai înaltă decât soluția cea mai apropiată (Enoxilul).