



MD 4084 B1 2010.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 4084 (13) B1

(51) Int. Cl.: C07J 9/00 (2006.01)
C07H 3/06 (2006.01)
A01N 45/00 (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01)
A01G 1/00 (2006.01)
A01C 1/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi
revocată în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. depozit: a 2010 0080
(22) Data depozit: 2010.07.01

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2010.12.31, BOP nr. 12/2010

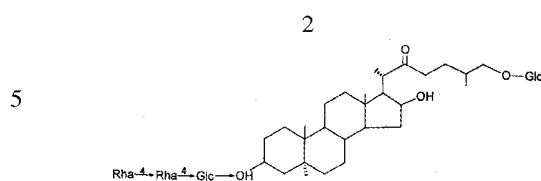
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE
ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD
(72) Inventatori: ȘVET Stepan, MD; SÂROMEATNICOV Iulia, MD; CHINTEA Pavel, MD; COTENCO
Eugenia, MD; MARCENCO Alexandra, MD
(73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE
ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(54) 3-O- α -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopirano-
zidă-(25R)-5 α -coleston,22-keto,3 α ,16 β ,26-triol-[26-O- β -D-glucopiranozidă]
în calitate de compus ce sporește productivitatea și calitatea fructelor de
tomate

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la o substanță biologic activă
nouă din clasa glicozidelor steroidice care poate fi
aplicată în agricultură, pentru sporirea productivității
și a calității fructelor de tomate.

Se propune o glicozidă steroidică nouă din șirul
colestonic 3-O- α -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-ram-
nopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopiranozidă-(25R)-5 α -
coleston, 22-keto,3 α ,16 β ,26-triol-[26-O- β -D-gluco-
piranozidă] (rusticozidă G₁) cu formula structurală:



10 unde: Glc – glucoză, Rha – ramnoză
în calitate de compus ce sporește productivitatea
și calitatea fructelor de tomate.
Revendicări: 1

Descriere:

Invenția se referă la o substanță biologic activă nouă din clasa glicozidelor steroidice care poate fi aplicată în agricultură, pentru sporirea productivității și a calității fructelor de tomate.

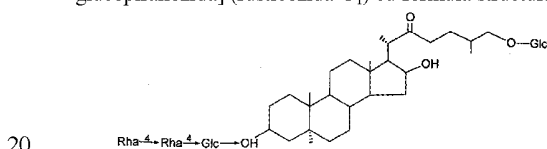
Este cunoscută utilizarea glicozidei steroidice 3-O-[[β-D-glucopiranozil(1→2)]-β-D-glucopiranozil(1→3)]-β-D-glucopiranozil(1→4)-β-D-galactopiranozil(1→3)-β-D-glucopiranozidă}-(25R)-5α-furostan,22α,3β,22α,26-tetraol-[26-O-β-D-glucopiranozidă] (Moldstim) (analog structural) pentru tratarea semințelor de tomate înainte de semănat, în rezultatul căreia crește energia de germinare, germinarea semințelor, puterea de creștere inițială a plantelor și productivitatea. Însă stimulatorul cunoscut nu posedă eficacitate suficient de înaltă [1].

Este cunoscută glicozida steroidică cu structura 3-O-α-L-ramnopiranozil(1→4)-α-L-ramnopiranozil(1→4)-β-D-glucopiranozidă-(25R)-5α-furostan,22-keto,3β,16β,26-triol-[26-O-β-D-glucopiranozidă]-rusticozida G [2].

Totuși, activitatea biologică a compusului menționat nu a fost studiată din cauza conținutului lui nesemnificativ în semințe de *Nicotiana rustica* L.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în lărgirea asortimentului de substanțe biologic active cu efect major asupra productivității și calității plantelor de tomate.

Se propune o glicozidă steroidică nouă din șirul colestanic 3-O-α-L-ramnopiranozil(1→4)-α-L-ramnopiranozil(1→4)-β-D-glucopiranozidă-(25R)-5α-colestan,22-keto,3α,16β,26-triol-[26-O-β-D-glucopiranozidă] (rusticozida G₁) cu formula structurală:



unde: Glc – glucoză, Rha – ramnoză

în calitate de compus ce sporește productivitatea și calitatea fructelor de tomate.

Rusticozida G₁ reprezintă o glicozidă steroidică nouă din șirul colestanic, care nu a fost descrisă anterior în literatura de specialitate. Formula brutto C₅₁H₈₈O₂₂, masa moleculară 1050 g/mol, [α]_D²⁰ – 79° (c 0,5; H₂O), t_{top} = 176°C.

Rusticozida G₁ reprezintă un praf de culoare albă, bine solubil în apă, alcoolii etilic, metilic, butilic, nu este solubil în cloroform, eter dietilic, acetona.

După hidroliza acidă totală a rusticozidei G₁ în calitate de genină după metodele fizico-chimice a fost identificat (25R)-5α-colestan,22-keto,3α,16β,26-triol, numit rusticogenină. Formula brutto C₂₇H₄₆O₄.

¹³C RMN (ppm): 38.1 (C-1), 30.2 (C-2), 75.1 (C-3), 35.1 (C-4), 46.0 (C-5), 33.0 (C-6), 31.9 (C-7), 36.1 (C-8), 55.6 (C-9), 36.4 (C-10), 21.9 (C-11), 41.1 (C-12), 45.5 (C-13), 54.5 (C-14), 54.5 (C-15), 76.8 (C-16), 63.9 (C-17), 13.6 (C-18), 12.2 (C-19), 49.9 (C-20), 16.8 (C-21), 218.6 (C-22), 39.6 (C-23), 28.3 (C-24), 33.8 (C-25), 70.3 (C-26), 17.4 (C-27).

Cu ajutorul cromatografiei în strat subțire și pe hârtie în partea oligozaharidă au fost identificate glucoza și ramnoza.

¹³C RMN spectrul rusticozidei G₁ a relevat semnalele ale patru atomi anomerici la 102,0; 102,3; 102,9 și 102,4 ppm. Analiza spectrală a datelor 1D-TOCSY și DQF-COSY a lanțului oligozaharidic a evidențiat două resturi de β-glucopiranozidă (δ 4.43 și 4.26 ppm) și două resturi de α-ramnopiranoză (δ 4.87 și 5.21 ppm).

Spectrul HMBC conține picurile-cheie de corelare între semnalul protonului la δ 4.43 ppm (H-1 al glucozei) și rezonanța carbonică la 79.0 ppm (C-3 al geninei), semnalul protonului la δ 4.87 ppm (H-1 al ramnozei I) și rezonanței carbonice la 79.2 ppm (C-4 al glucozei), semnalul protonului la δ 5.21 ppm (H-1 al ramnozei II) și rezonanței carbonice la 80.6 ppm (C-4 al ramnozei I).

Caracterul scindării și constantele de interacțiune spin-spin ale tuturor protonilor resturilor glucidice ai glicozidelor total corespund configurațiilor monozaharidice în formele piranoze. Din constantele interacțiunilor spin-spin rezultă β-configurația centrelor glicozidice ale glucozidelor și α-configurația resturilor de ramnoze.

Tipurile de substituție în resturile monozaharidice și în genină și consecutivitatea legării lor au fost stabilite prin analiza spectrală dublă a efectelor Overhauser în sistemul de rotație a coordonatelor (ROESY).

În spectrul rusticozidei G₁ sunt stabilite picurile de corelare în coordonatele deplasărilor chimice ale H-1 al glucopiranozei și H-3 al geninei, H-1 al primei ramnopiranoze și H-4 al glucopiranozei, H-1 al ramnopiranozei II și H-4 al primei ramnopiranoze, H-1 al glucopiranozei II și H-26 al geninei.

La compararea spectrelor ¹³C RMN ale rusticogeninei și rusticozidei G₁ se observă că semnalul atomului de genină la C-3 și C-26 în fiecare caz este deplasat în câmpul slab cu 3.9 ppm și cu 5.4 ppm,

corespunzător, ce se explică prin efectul de glicozilare. Deplasările chimice ale resturilor de atomi carbonici ale geninei rămân fără schimbări.

Rezultatul invenției constă în aceea că a fost obținută o glicozidă steroidică nouă din șirul colestanic care sporește productivitatea generală a tomatelor și calitatea comercială a fructelor; concomitent contribuie la extinderea asortimentului de glicozide steroidice care pot fi utilizate în agricultură în calitate de substanțe biologic active de proveniență naturală.

Procesul de obținere a rusticozidei G₁

3-O- α -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopiranozidă-(25R)-5 α -coles-tan,22-keto,3 α ,16 β ,26-triol-[26-O- β -D-glucopiranozida] se obține prin următorul procedeu: semințele de *Nicotiana rustica* L. (1 kg) uscate la aer liber sunt mărunțite, degresate cu amestec de solvenți cloroform:metanol în raport de 2:1 (v/v) la încălzire (3 ori x 2,5 litri). Extractele obținute se dizolvă în apă, stratul metanolic apos se separă în pâlnia de separare și se concentrează în vid până la uscat. Reziuul obținut se dizolvă în 50 ml de alcool metilic, din soluția obținută sunt precipitate glicozidele sumare cu acetona, sedimentul se filtrează și se usucă în vid. Se obțin 27 g de glicozide sumare ce reprezintă 2,7% din masa materiei prime inițiale. Prin aplicarea filtrării pe gel pe Sephadex G-25 și cromatografierii pe coloană cu silicagel L 40/100 μ m se obțin 0,85 g de amestec de rusticozida G și rusticozida G₁. Această fracție este supusă multiplu cromatografiei lichide de performanță înaltă (HPLC) în mod preparativ cu utilizarea coloanei de C-18 μ -Bondapack (30 cm x 7,8 i.d., viteza de curgere 2,0 ml/min) cu utilizarea sistemului MeOH:H₂O în raport de 85:15 (condiții izocratice). În rezultatul HPLC sunt obținute 620 mg de rusticozida G₁ și 18 mg de rusticozida G. Controlul asupra separării rusticozidei G₁ și rusticozidei G este efectuat prin cromatografierea în strat subțire de silicagel și revelarea componentelor cu reactivi Sanie și H₂SO₄ concentrat.

Moldstim (capsicozida) a fost obținut din semințe de ardei dulce (Tschesche R., Gutwinski H. Capsicosid, ein bisdesmosidesches 22-hydroxy-furostanol-glycosid aus dem Samen von Capsicum annum L. Chem.Ber., 1975, 108, 265-272).

Exemplu de realizare a invenției

Cercetările s-au efectuat în condiții de laborator, seră și de câmp. Ca obiect de studiu au servit plantele de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. soiul „Fakel”.

Pentru înmuierea semințelor de tomate înainte de semănat și pentru tratarea florilor de inflorescențe ale primelor trei raceme ale plantelor se utilizează o nouă glicozidă steroidică din șirul colestanic – rusticozida.

Înainte de semănat o parte de semințe a fost înmuiată timp de 24 de ore în soluție apoasă de rusticozida G₁ în concentrație de 0,005%, 0,01% și 0,05% (invenția propusă). Altă parte de semințe a fost înmuiată timp de 24 de ore în soluție apoasă de Moldstim în concentrație de 0,08% (cea mai apropiată soluție). Ca martor au servit semințele înmuiate în apă distilată. În fiecare variantă au fost luate în studiu câte 100 de semințe în 4 repetări.

Apoi semințele au fost scoase din soluții, uscate și semănate în seră pentru obținerea răsadului. Suprafața unei parcele constituie 1 m² în 4 repetări pentru fiecare variantă. Răsadul s-a stropit în faza de 3-4 frunze cu soluție apoasă de rusticozida G₁ (invenția propusă), Moldstim (cea mai apropiată soluție) și apa distilată (martor) până la umectarea frunzelor (0,5 L/m²).

Când răsadul a atins înălțimea de 15...20 cm și numărul de frunze de 5...7, el a fost plantat în câmp. Suprafața unei parcele în câmp este de 6,0 m², plantarea a fost efectuată în 4 repetări.

În fazele de înflorire după apariția inflorescențelor la primul racem, apoi la al doilea și al treilea racem al plantelor ele au fost stropite (de 3 ori) cu soluție apoasă de rusticozida G₁, Moldstim și apa distilată.

Așadar, schema experienței este: semințele înainte de semănat și plantele în fazele de 3...4 frunze și de înflorire a primului, al doilea și al treilea racem ale inflorescențelor (în total de 4 ori) se tratează cu soluție apoasă de rusticozida G₁ în concentrație de 0,005%, 0,01% și 0,05% (invenția propusă), de Moldstim în concentrație de 0,08% (cea mai apropiată soluție) și cu apă distilată (martor). Consumul total este de 0,05 L/m².

În faza timpurie de vegetație au fost efectuate cercetările fenologice, începând cu germinarea semințelor, evidența vitezei de germinare, creșterea și dezvoltarea plantelor.

După plantarea răsadului în câmp pe parcursul vegetației au fost cercetate legarea fructelor, productivitatea și cantitatea lor.

Conform rezultatelor cercetărilor efectuate a fost depistat că tratarea semințelor de tomate înainte de semănat cu soluția rusticozidei G₁ sporește energia de germinare a lor cu 5,8%, încolțirea cu 4,7%, iar lungimea rădăcinii cu 54,8% (în comparație cu varianta martor), și la tratarea suplimentară a răsadului se mărește randamentul răsadului standard cu 17,9%.

Tratarea inflorescențelor de tomate cu soluția de rusticozida G₁ contribuie la legarea mai bună a fructelor (cu 24,1%), accelerarea coacerii lor, mărirea cantității și masei lor, ce duce la sporirea productivității totale și a calității comerciale a fructelor de tomate (vezi datele din tabel).

MD 4084 B1 2010.12.31

5

Tabel

Influența rusticozidei G₁ la creșterea, dezvoltarea și productivitatea fructelor de tomate, soiul „Fakei”

Variantele experimentului	Energia de germinare, %	Germinarea, %	Lungimea rădăcinii, cm	Cantitatea răsadului standard, %	Legarea fructelor, %	Productivitatea, q/ha			
						totală	% față de martor	comercială	% față de martor
Apă (martor)	94,5	95,5	3,1	100,0	100,0	464,9	100,0	363,6	100,0
Moldstim 0,08% (cea mai apropiată soluție)	97,8	98,6	4,1	111,5	109,4	589,7	126,8	535,9	147,4
Rusticozida G ₁ 0,05%	98,3	98,5	4,6	112,8	109,9	579,6	124,7	558,8	153,6
Rusticozida G ₁ 0,01%	100,0	100,0	4,8	117,9	124,1	691,0	148,6	631,2	173,6
Rusticozida G ₁ 0,005%	99,1	99,3	4,5	115,3	111,4	584,4	125,7	537,7	147,9

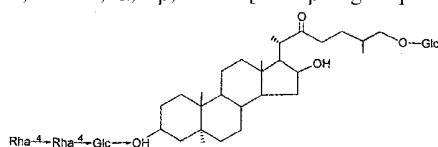
5

Așadar, tratarea organelor generative ai plantelor de tomate (semințelor, plantelor în faza de 3...4 frunze și faza de înflorire a I, II și III raceme) prin metoda propusă permite de a spori productivitatea totală a fructelor de tomate cu 48,6% și comercială cu 73,6% în comparație cu varianta martor; în comparație cu cea mai apropiată soluție – totală cu 17,3%, comercială cu 17,8%.

10

(57) Revendicări:

- 15 3-O- α -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-ramnopiranozil(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopiranozidă-(25R)-5 α -coleston, 22-keto, 3 α , 16 β , 26-triol-[26-O- β -D-glucopiranozidă] cu formula structurală:



unde: Glc – glucoză, Rha – ramnoză

în calitate de compus ce sporește productivitatea și calitatea fructelor de tomate.

(56) Referințe bibliografice:

1. S.Shvets, P.Kintia, I.Lunga, C.Bassarello, S.Piacente, C. Pizza. Steroidal glycosides from the seeds of *Nicotiana rustica*. Structure of rusticozide G. Planta Medica, Issue 09, Vol.74, 2008, PB 57
2. Registrul de stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizanților, permise pentru utilizare în Republica Moldova, Chișinău, 2009 “Tipografia centrală”, p.323

Șef Secție:

COLESNIC Inesa

Examinator:

GORDIENCO Maria

Redactor:

LOZOVANU Maria

AGENTIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA INTELECTUALA A REPUBLICII MOLDOVA

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii	
(21) Nr. depozit: a 2010 0080	(32) Data de prioritate recunoscută:
(22) Data depozit: 2010.07.01	Raport de documentare internațională: ☐ da
(54) Titlul: 3-O-α-L-ramnopiranozil(1$\rightarrow$4)-α-L-ramnopiranozil(1$\rightarrow$4)-β-D-glucopiranozidă-(25R)-5α-cholestan,22-keto,3α,16β,26-triol-[26-O-β-D-glucopiranozidă in calitate de compus ce sporește productivitatea și calitatea fructelor de tomate	
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ ȘI FIZIOLOGIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(51) (Int.Cl): Int. Cl.: C07J 9/00 (2006.01) C07H 3/06 (2006.01) A01N 45/00 (2006.01) A01P 21/00 (2006.01) A01G 1/00 (2006.01) A01C 1/00 (2006.01)	
II. Condiții de unitate a invenției:	X satisface ☐ nu satisface
Note:	
III.Revendicări: claritatea, susținerea de descriere	
Note:	X satisface ☐ nu satisface
IV. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare)	
MD (Documentare Invenții (inclusiv cereri nepublicate)) – glicozid steroidic și cholestanic, rusticozid G ₁ , rusticozid G, tomate	
"Worldwide" (Espacenet) –steroidal glycoside holean series, rusticozid G ₁ , rusticozid G, tomato	
EA, CIS (Eapatis) – стероидный гликозид ряда холестана, rusticozid G ₁ , rusticozid G	
SU (nonpublic) – стероидный гликозид ряда холестана, rusticozid G ₁ , rusticozid G, томаты	
Alte BD –	
V. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate	
S.Shvets, P.Kintia, I.Lunga, C.Bassarello, S.Piacente, C. Pizza. Steroidal glycosides from the seeds of <i>Nicotiana rustica</i> . Structure of rusticozide G. Planta Medica, Issue 09, Vol.74, 2008, PB 57.	
Registru de stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizanților, permise pentru utilizare in Republica Moldova Chișinău, 2009, "Tipografia centrală") p.323	
Строение стероидных гликозидов семян <i>Nicotiana tabacum</i> L., <i>Nicotiana rustica</i> L. и их биологическая активность. < http://dissers.info/disser_175193.html >Regăsit la Internet 2010.09.15	
< http://www.cnaa.acad.md/files/institutions/ig/prof.. > regăsit la Internet 2010.09.15	
VI. Documente considerate a fi relevante	

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	<URL:http://www.cnaa.acad.md/files/institutions/ig/prof...> Regăsit la Internet 2010.09.15	1
A,C, D	Registru de stat al produselor de uz fitosanitar și al fertilizanților, permise pentru utilizare in Republica Moldova, Chișinău, 2009, “Tipografia centrală” p.323	1
A, D	S.Shvets, P.Kintia, I.Lunga, C.Bassarello, S.Piacente, C. Pizza. Steroidal glycosides from the seeds of <i>Nicotiana rustica</i> . Structure of rusticozide G. Planta Medica, Issue 09, Vol.74, 2008, PB	1
A	<URL:http://www.cnaa.acad.md/files/institutions/ig/prof...> regăsit la internet 2010.09.15	1
A	MD 805 G2 1998.05.31	1
	MD 2620 G2 2005.08.31	1
		1
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general		T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur		E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie		D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare		C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
		& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate		L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării		2010.10.01
Examinator,		GORDIENCO Maria