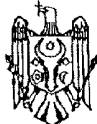




MD 2719 G2 2005.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **2719** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) **Int. Cl.⁷**: A 01 N 43/90, 45/00;
C 07 J 71/00;
C 07 H 3/06

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2004 0089 (22) Data depozit: 2004.04.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2005.03.31, BOPI nr. 3/2005
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: ȘVEȚ Ștefan, MD; CHINTEA Pavel, MD; LUPAȘCU Galina, MD; SAȘCO Elena, MD (73) Titular: INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) **Compus ce posedă proprietăți fungitoxice**

(57) **Rezumat:**

1
Invenția se referă la agricultură, în particular la un compus ce posedă proprietăți fungitoxice și poate fi utilizată pentru protecția plantelor de patogeni fungici.

Se propune aplicarea 3-O-β-D-glucopiranozil (1→2)-β-D-glucopiranozil (1→4)-β-D-galactopira-

2
5 nozidă-(25R)-spirost-5-en-3β-olului în calitate de compus ce posedă proprietăți fungitoxice.
Revendicări: 1

10

MD 2719 G2 2005.03.31

MD 2719 G2 2005.03.31

3

Descriere:

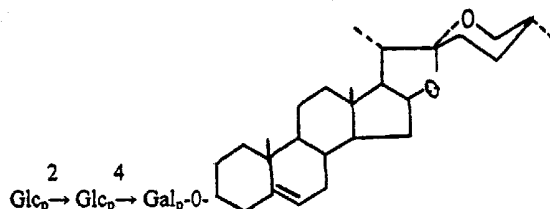
Invenția se referă la agricultură, în particular la un compus ce posedă proprietăți fungitoxice și poate fi utilizată pentru protecția plantelor de patogeni fungici.

Se cunosc glicozide steroidice cu acțiune reprimantă pentru ciupercile imperfecte [1], și anume *Fusarium Link.* și *Phomopsis sojae Lehm.* Dezavantajul acestor compuși constă în aceea că prețul de cost al materiei prime vegetale este mare.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în lărgirea spectrului de substanțe biologice active naturale din clasa glicozidelor steroidice cu efect fungitoxic pentru ciupercile *Fusarium Link.* și *Phomopsis sojae.*

Problema se soluționează prin aceea că se propune aplicarea 3-O-β-D-glucopiranozil (1→2)-β-D-glucopiranozil (1→4)-β-D-galactopiranozidă-(25R)-spirost-5-en-3β-olului în calitate de compus ce posedă proprietăți fungitoxice.

Substanța menționată (Atropozida F) are următoarea formulă de structură:



in care Glc_p – glucopiranozil, Gal_p – galactopiranozidă.

Metoda de obținere a glicozidei steroidice Atropozida F este descrisă în (Shvets S.A., Latsterdis N.V., Kintia P.K. A chemical study on the steroidal glycosides from *Atropa belladonna* L. seeds. Saponins used in Traditional and Modern Medicine, New York, London, Washington, D.C., Boston – Plenum Press, 1996, p. 475...483), însă aplicarea practică a substanței nu este cunoscută și proprietățile biologice nu sunt descrise.

Rezultatul invenției constă în detectarea unei glicozide steroidice cu activitate fungitoxică pronunțată pentru unii patogeni cu impact negativ pentru culturile agricole.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Pentru obținerea glicozidelor spirostanice sumare a fost elaborată o metodă rațională de extragere, conform căreia, semințele mărunțite de *Atropa belladonna* L. au fost supuse extragerii cu amestec de cloroform și metanol în raportul de 2:1. Extractul obținut a fost diluat cu apă. Stratul metanolic apos a fost separat în pâlnia de decantare, apoi concentrat în vid până la rest uscat. Glicozidele steroidice sumare au fost supuse cromatografierii multiple pe coloana cu silicagel utilizând diverse raporturi ale solventilor (cloroform, etanol, apă) și s-au extras 4 fracții cromatografic individuale diferite după polaritate ce conțin glicozide steroidice ale șirului spirostanic. Conform datelor spectrelor RMN^{13}C , în fiecare fracție cromatografic individuală se conțin 2 GS cu același lanț glucidic, dar cu diferiți agliconi – diosgenină și tigogenină. Pentru separarea acestui amestec glicozidele din fracția a treia ce conțin 3 monozaharide în lanțul glucidic au fost acetilate, lanțul dublu fiind epoxidat la unul din agliconi cu acid metaclorbenzoic. Ca rezultat s-a obținut derivatul glicozidei diosgeninei – oxipanolul, ușor separat de glicozida tigogeninei prin cromatografiere pe coloana cu silicagel. Pentru separarea grupei epoxidice peracetatul glicozidei - oxipanol diosgeninei, a fost tratat cu trimetilclorsilan și NaI (iodură de sodiu) în acetonitril. Peracetatul glicozidei diosgeninei obținut prin acest procedeu era saponificat, ceea ce a condus la obținerea glicozidei individuale – Atropozida F, care se caracterizează prin următorii parametri: punctul de topire 291°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 70^\circ$ (C 1,0, Py), spectrul IF: 968, 920 < 900, 865 cm^{-1} . Prezența benzilor de absorbție 900 > 920 pune în evidență gruparea spirocetalică a șirului (25R). Ca rezultat al hidrolizei acide complete a Atropozidei F, în calitate de aglicon a fost identificată diosgenina cu următorii parametri fizico-chimici: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 120^\circ$ (C 1,0; CHCl_3) M^+414 , $\text{RF} = 0,42$ (pe plăci cu silicagel impregnat cu AgNO_3 de 2%). Spectrul RMN^{13} al agliconului confirmă datele din literatură pentru diosgenină. În regiunea oligozaharidică a Atropozidei F au fost identificate, cu ajutorul cromatografierii pe hârtie, glucoza și galactoza, iar prin cromatografiere gaz-lichidă a acetaților derivaților aldonitrilici ai zaharurilor obținuți anterior – glucoza și galactoza în raportul de 2:1.

În baza rezultatelor metilării și hidrolizei parțiale a Atropozidei F s-a demonstrat că lanțul glucidic al glicozidei este liniar, iar glucoza terminală este unită la a doua moleculă de glucoză prin legătura 1→2, care este unită la galactoza nemijlocit cu agliconul prin legătura 1→4. Spectrul

MD 2719 G2 2005.03.31

4

bidimensional heteronuclear $^{13}\text{C}^1\text{H}$ COSY al glicozidei a confirmat tipul de substituție în resturile monozaharidice. Semnalele polare slabe ale C-4 galactozei și C-2 glucozei în comparație cu resturile nesubstituite corespunzătoare denotă substituția acestora la atomii indicați de carbon. În baza celor menționate, s-a conchis că structura chimică a Atropozidei F este următoarea: S-O-β-D-glucopiranozil (1→2)-β-D-glucopiranozil (1→4)- β-D-galactopiranozidă-(25R)-spirost-5-en-3β-ol.

Exemplul 2

Acțiunea fungitoxică a Atropozidei F a fost cercetată prin cultivarea ciupercilor *F.oxysporum* și *Ph. sojae*, izolate din plante bolnave de grau comun și respectiv de soia, pe mediul must-agar ce conține Atropozidă F în concentrațiile 10^{-6} ... $10^{-2}\%$. Ca martor a servit mediul must-agar nesuplementat cu Atropozidă F, iar ca analog de structură – glicozida steroidică omologată pentru utilizare largă în agricultură, cu denumirea oficială Moldstim (denumirea anterioară Capsicozidă). Efectul glicozidelor steroidice asupra creșterii ciupercilor a fost stabilit după diametrul coloniilor de ciuperci (mm) la a 3-a și a 5-a zi de cultivare la temperatura de 20...22°C. Experimentul a fost efectuat în 10 repetări. Rezultatele au fost prelucrate statistic în pachetul soft STATISTICA. Veridicitatea deosebirilor între variante a fost supusă testului t. Rezultatele obținute sunt incluse în tab. 1 și 2.

După cum se vede din datele prezentate (tab. 1,2), Atropozida F și Moldstimul au manifestat acțiune reprimantă diferită asupra creșterii liniare a ciupercilor *F.oxysporum* și *Ph. sojae* aflate în studiu, fenomenul fiind determinat în mare parte de concentrația substanței. Astfel, pentru ciuperca *F.oxysporum* Atropozida F a manifestat acțiune fungitoxică în concentrațiile 10^{-5} ... $10^{-2}\%$, nivelul de reprimare fiind de 11,3...23,0% și 8,7...22,8% la a 3-a și a 5-a zi, corespunzător. Pentru aceeași ciupercă Moldstimul a manifestat acțiune fungitoxică doar în concentrația maximă: $10^{-2}\%$, nivelul de reprimare fiind de 22,2% la a 3-a zi și de 19,7% la a 5-a zi.

Tabelul 1

25 Acțiunea Atropozidei F și a Moldstimului asupra creșterii liniare a ciupercii *F.oxysporum* în a 3-a și a 5-a zi de cultivare pe mediu nutritiv

Varianta, concentrația (%)	Diametrul coloniilor în a 3-a zi de cultivare		Diametrul coloniilor în a 5-a zi de cultivare	
	$\bar{x} \pm m_x$, mm	% față de martor	$\bar{x} \pm m_x$, mm	% față de martor
Martor (H ₂ O)	48,20±0,25	100,0	73,20±0,39	100,0
Moldstim, 10^{-5} (analog de structură)	47,40±0,22	98,3	73,00±0,26	99,7
Moldstim, 10^{-4}	46,80±0,25	97,1	71,60±0,34	97,8
Moldstim, 10^{-3}	44,80±0,41	93,0	69,50±0,62	95,0
Moldstim, 10^{-2}	37,50±0,40*	77,8	58,80±0,33*	80,3
Martor (H ₂ O)	47,9±1,2	100,0	76,0±1,2	100,0
Atropozidă F, 10^{-5}	42,5±1,1*	88,7	69,4±1,2*	91,3
Atropozidă F, 10^{-4}	39,5±0,6*	82,5	64,9±0,8*	85,4
Atropozidă F, 10^{-3}	37,3±1,0*	77,9	60,4±0,9*	79,5
Atropozidă F, 10^{-2}	36,9±0,8*	77,0	58,7±1,0*	77,2

*- diferențe de martor cu suport statistic pentru testul t

MD 2719 G2 2005.03.31

5

Tabelul 2

Acțiunea Atropozidei F și a Moldstimului asupra creșterii liniare a ciupercii *Ph.sojae* în a 3-a și a 5-a zi de cultivare pe mediu nutritiv

5

Varianta, concentrația (%)	Diametrul coloniilor în a 3-a zi de cultivare		Diametrul coloniilor în a 5-a zi de cultivare	
	$\bar{x} \pm m_x$, mm	% față de martor	$\bar{x} \pm m_x$, mm	% față de martor
Martor (H ₂ O)	31,60±0,33	100,0	47,10±0,43	100,0
Moldstim, 10 ⁻⁵ (analog de structură)	31,90±0,35	101,1	47,60±0,29	101,6
Moldstim, 10 ⁻⁴	32,00±0,29	101,3	48,20±0,36	102,3
Moldstim, 10 ⁻³	30,80±0,36	97,5	46,90±0,23	99,6
Moldstim, 10 ⁻²	28,10±0,43*	88,9	39,90±0,38*	84,7
Martor (H ₂ O)	31,3±1,7	100,0	44,3±3,0	100,0
Atropozidă F, 10 ⁻⁵	30,7±0,7	98,1	47,5±0,7	107,2
Atropozidă F, 10 ⁻⁴	28,6±1,3	91,4	44,3±0,9	100,0
Atropozidă F, 10 ⁻³	26,6±1,0*	85,0	37,7±2,0*	85,1
Atropozidă F, 10 ⁻²	27,1±0,6*	86,6	33,4±1,3*	75,4

*- diferențe de martor cu suport statistic pentru testul t

Pentru ciuperca *Ph.sojae* acțiunea reprimantă a Atropozidei F s-a manifestat la concentrațiile 10⁻³, 10⁻²%, diametrul coloniilor fiind cu 15,0...13,4% și 14,9...24,6% mai mic în a 3-a și, respectiv, a 5-a zi de cultivare în comparație cu martorul. În cazul Moldstimului acțiune reprimantă asupra creșterii ciupercii s-a stabilit doar pentru concentrații mari (10⁻²%): diametrul coloniilor fiind cu 11,1% și 15,3% mai mic decât în varianta-martor în a 3-a și, respectiv, a 5-a zi.

Deci, Atropozida F are acțiune fungitoxică pentru ciupercile *F.oxysporum* și *Ph.sojae* mult mai pronunțată decât analogul său de structură – Moldstimul și poate fi utilizată cu succes în agricultură pentru protecția grâului comun de toamnă și a soiei de fuzarioză și, respectiv, de fomopsis.

(57) Revendicare:

Aplicarea 3-O-β-D-glucopiranozil(1→2)-β-D-glucopiranozil(1→4)-β-D-galactopiranozidă-(25R)-spirost-5-en-3β-olului în calitate de compus ce posedă proprietăți fungitoxice.

(56) Referințe bibliografice:

1. SU 932667 A1

Sef Secție: GUȘAN Ala

Examinator: BANTAȘ Valentina

Redactor: LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2004 0089		(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 2004.04.13		(86) Cerere internațională PCT:
Prioritatea invocată : (31) nr.: 32) data : 33) țara : (51) ⁷ : C 07 J 71/00, C 07 H 3/06, A 01 N 43/90, 45/00 Alți indici de clasificare: Titlul : Compus ce posedă proprietăți fungitoxice (71) Solicitantul : INSTITUTUL DE GENETICĂ AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A REPUBLICII MOLDOVA, MD Termeni caracteristici: glicozide steroidice, compuși fungitoxice, atropozidă F		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
MD 1994-2004 EA 1996-2004 SU fond BRIT Int. Cl. ⁷ C 07 J 71/00, C 07 H 3/06, A 01 N 43/90, 45/00		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate și indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	SU 932667 A1	1
A	MD 1204	1
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2005.01.10
Examinatorul		Bantaș Valentina