



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00923**

(22) Data de depozit: **27/11/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/06/2019** BOPI nr. **6/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. **5/2017**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE- DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SESAN TĂTIANA EUGENIA,
BD. IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **JECU MARIA-LUIZA,
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRITA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **VLĂSCLEANU GABRIELA ANTOANETA,
ALEEA DUMBRĂVIȚA NR. 2, BL. 28, SC. 2,
ET. 5, AP. 65, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **NEGRU GEORGETA, STR. SOVEJA
NR. 44, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MANEA ȘTEFAN, CALEA MOȘILOR
NR.209, ET.2, AP.6, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **OANCEA ANCA, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**WO 2015/072872 A1; WO 2014/185794 A1;
EP 1517874 B1**

(54) **COMPOZIȚIE BIOSTIMULANTĂ PE BAZĂ DE SILICIU,
PENTRU APLICARE FOLIARĂ**



RO 131869 B1

1 Prezenta invenție se referă la o compoziție biostimulantă pe bază de siliciu, destinată
tratamentului foliar, pentru creșterea rezistenței plantelor la stresurile biotice și abiotice, și
3 favorizarea acumulării de compuși biologic activi în culturile de plante nutraceutice, având
aplicații în agricultură.

5 Sunt cunoscute o serie de compoziții pe bază de siliciu, destinate aplicării foliare la
plantele cultivate.

7 Cererea de brevet **WO 2015/072872 A1** se referă la o compoziție destinată limitării
producerii de micotoxine, și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția utilizată în
9 diferite substraturi, inclusiv în cerealele depozitate, este alcătuită din: 42,1 părți de esteri
etilici ai acizilor grași din ulei de in, 15 părți lecitină, 13,7 părți alcool etilic, 6 părți ulei esențial
11 de muguri florali de *Syzygium aromaticum*, 6 părți ulei esențial de flori de *Ageratum*
houstonianum, 5,6 părți săruri de potasiu ale acizilor grași exprimate ca oleat, 3,9 părți
13 glicerol, 3,3 părți trigliceride, 3 părți maltol, 0,5 părți apă, diferența până la 100 părți fiind
substanțe nesaponificabile și săruri.

15 Cererea de brevet **WO 2014185794 A1** descrie o compoziție pe bază de siliciu,
pentru stimularea creșterii plantelor, care conține un compus solubil al siliciului, în proporție
17 de 0,5...60% (calculat ca SiO₂), dizolvat într-un mediu apos în prezență de polizaharide,
polioli, acizi fulvici sau un amestec al acestora. Compoziția include și cel puțin unul sau mai
19 mulți macro- și/sau micro-nutrienți ca, de exemplu, azot, fosfor, potasiu, magneziu, calciu,
sulf, bor, cupru, fier, mangan, molibden, zinc, cobalt. Compușii solubili ai siliciului sunt acizii
21 silicici, silicați de sodiu sau potasiu, sau un amestec al acestora, la un pH cuprins între 2 și
13. Compoziția este exemplificată cu manitol, sorbitol, betaină, metionină, glicină și/sau un
23 amestec al acestora, în proporție de 0,1 la 10%.

25 Brevetul **EP 1517874 B1** se referă la o soluție apoasă ce conține acid boric și acid
silicic ne-coloidal, precum și un aditiv de absorbție a apei, o metodă de obținere și o metodă
de utilizarea a respectivei soluții prin pulverizarea pe frunzele plantelor sau direct pe sol.
27 Soluția conține 0,01...2% în greutate siliciu (sub formă de acid silicic) și 0,0001...4% în
greutate bor (sub formă de acid boric), are un pH mai mic de 2, cel puțin 30% aditiv de
29 absorbție a apei, cum ar fi polisorbit, gumă vegetală, celuloză substituită, glicerină și
poliester de acid gras, polietilenglicol, polidextroză, propilenglicol, alginat de propilenglicol,
31 ester de polioxietilenglicol, amidat pectină, zaharoză și ester de acid gras, amidon acetilat
sau hidroxipropil, fosfați de amidon, uree, sorbitol, vitaminele sau amestecurile acestora.
33 Produsul este utilizat pentru creșterea rezistenței plantelor împotriva infecțiilor microbiene,
insectelor, dăunătorilor, fungilor sau a condițiilor fizice extreme.

35 Cererea de brevet **US 5183477 A** descrie o compoziție destinată tratamentelor
foliare, pentru protecția plantelor împotriva agenților fitopatogeni și a daunelor produse de
37 aceștia, în care ingredientul activ este reprezentat de silicați alcalini de sodiu sau de potasiu.
Penetrarea cuticulei hidrofobe care acoperă frunzele de către silicații hidrofilii este favorizată
39 de pH-ul puternic alcalin al soluțiilor de silicați de sodiu sau de potasiu, care determină o
hidroliză locală a cerurilor din componența cuticulei.

41 Un dezavantaj al unor astfel de compoziții, care conțin numai silicați, este determinat
de reducerea bio-disponibilității, ca urmare a tendinței de precipitare, inclusiv din cauza
43 policondensării acidului silicic eliberat din silicați.

Brevetul **EP 2371220 B1** se referă la o compoziție în care silicații alcalini sunt sta-
45 bilizați prin adăugare de osmoliți din trei categorii: (1) uree și polioli glucidici; (2) compuși N-
metilați, și (3) compuși selectați din grupul reprezentat de taurină, creatină, sulfat de colină,
47 glicerofosforilcolină, diglicerol-fosfat, analogi sulfonici ai trimetilglicinei, dimetilsulfoniopro-
pionat, ectoină, hidroxil-ectoină, prolină, valină, acid aspartic, izoleucină, glicină, alanină,

glutamat, zaharoză, mio-inozitol, fructoză, maltoză, trehaloză, putresceină, spermidină, spermină, cadaverină, sau combinații ale acestora sau ale sărurilor acestora. Compoziția include sub 10 mM ioni de metale multivalente, are un pH mai mare de 10,8 și o concentrație de siliciu cuprinsă între 0,02 M și 1,6 M. 1
3

Siliciul nu este încă considerat un element esențial pentru plante, ci doar unul cu efecte benefice (Richmond și Sussman, 2003, *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 268-272), Studiile recente au dovedit că siliciul solubil este unul dintre puținii elicitori care amor-sează în mod echilibrat diferitele căi metabolice implicate în răspunsul de apărare din plante (Van Bockhaven et al. 2013. *Journal of experimental botany*, 64:1281-1293). Acțiunea siliciului solubil nu se limitează doar la orchestrarea căilor metabolice implicate în apărarea plantelor față de atacul patogenilor și al dăunătorilor, ci are efecte și de creștere a eficienței de utilizare a nutrienților, reducere a toxicității metalelor grele, limitare a efectelor stresului hidric (salin, secetă) și a stresului termic - îngheț, temperatură excesivă (Liang et al. 2015, *Silicon in Agriculture, Springer Netherlands, Dordrecht*, 235 p.). Siliciul solubil are deci toate caracteristicile unui biostimulant pentru plante (Savvas și Ntatsi 2015, *Scientia horticulturae*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.010>). 5
7
9
11
13
15

În plante, însă, siliciul îndeplinește două funcții majore: una structurală și cealaltă fiziologică/biochimică (de biostimulant). Funcția structurală este asociată răspunsului inteligent al apoplastului (Nishitani și Demura 2015, *Plant and cell physiology*, 56, 177-179) și implică, în cazul plantelor care acumulează siliciu, și formarea de fitolite cu rol analog unui endo-schelet (Schoelynck et al. 2014, *Journal of vegetation science*, 25: 301-313). Această funcție structurală are și un rol de apărare împotriva atacului de boli și dăunători, generând diferite bariere care limitează pătrunderea fitopatogenilor, și au un efect repelent asupra dăunătorilor. Funcția fiziologică, implicată în reglarea fină/orchestrarea căilor metabolice specifice răspunsului de apărare din plante, necesită transportul acidului ortosilicic (H_4SiO_4) prin simplast, și implică un sistem co-operat, prezent doar în rădăcini, format din acvaporine (proteine membranare care constituie canale pentru transportul facilitat al apei și al moleculelor mici, neutre/neionizate), din subfamilia NIP-26 (nodulin-26-like proteins), denumite și metaloido-porine (Pommerrenig et al. 2015. *Plant science*, 238: 212-22), și proteine de transport activ/„pompe” moleculare de siliciu, care transferă acidul ortosilicic în xilem (Ma și Yamaji 2015, *Trends in plant science*, 20: 435-442). 17
19
21
23
25
27
29
31

Conform cunoștințelor actuale, siliciul aplicat foliar este translocat exclusiv prin simplast/peretele celular (Dallagnol et al. 2015, *Plant Pathology*, 64, 1085-1093; Rodrigues et al. 2015, *Silicon Control of Foliar Diseases in Monocots and Dicots, în Silicon and Plant Diseases*, pp. 67-108, Springer International, Cham) și nu-și exercită decât acțiunea de protecție datorită formării structurilor parietale implicate în apărarea față de boli și dăunători, fără efectele de biostimulant pentru plante, specifice acidului ortosilicic, H_4SiO_4 , prezent în simplast/citoplasmă. 33
35
37

În anumite situații, cum sunt și cele exemplificate ca aplicare a compoziției descrise de cererea de brevet WO 2014185794 A1, s-au evidențiat și efecte de stimulare în cazul tratamentelor foliare, dar acestea pot fi explicate și datorită scurgerilor în sol rezultate ca urmare a aplicării unor norme de stropire ridicate, pe plante cu frunze lanceolate (cereale), care favorizează astfel de scurgeri. 39
41
43

În cazul siliciului aplicat foliar, preluarea lui în simplast necesită: (i) o activare a sistemelor de apărare din plante, care să permeabilizeze suplimentar pereții celulari; (ii) o structură amfifilă a compoziției pe bază de siliciu, care să favorizeze trecerea prin barierele de permeabilitate reprezentate de celule, și (iii) eliberarea constantă în citoplasmă a unor mici cantități de acid metasilicic, H_4SiO_4 , care să-și exercite acțiunea de biostimulant pentru plante. 45
47
49

RO 131869 B1

1 Pornind de la ipoteza că siliciul formează o matrice care permite sinteza proteinelor
implicate în răspunsul plantelor la stresurile biotice și abiotice, cu scurtcircuitarea sistemului
3 genetic, autorii brevetului **US 7879127 B2** revendică o compoziție care include: una sau mai
multe substanțe cu un conținut ridicat în siliciu (A); unul sau mai mulți activatori ai sistemului
5 de apărare din plante - acid salicilic, chitină, acid abscisic (B); apă, care contribuie la
realizarea activității ingredientelor (A) și (B). Compoziția este menționată ca putând fi aplicată
7 și foliar, dar nu este exemplificată sau revendicată în această direcție.

În cazul maceratului fermentat de urzică, tradițional utilizat în agricultura organică
9 drept biostimulant pentru plante, s-a dovedit că ingredientele active sunt acidul metasilicic,
betaina, poliaminele și fragmentele de perete celular (**Petruș et al. 2015, The 2nd World
11 Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture, Florența, 16-19 noiembrie 2015,
pp. 81-82**).

În cazul compoziției descrise de brevetul **EP 2371220 B1**, osmoliții adăugați deter-
13 mină o activare a rezistenței plantelor - de exemplu, poliaminele (putresceina, cadaverina,
15 spermina, spermidina) sunt recunoscute pentru rolul lor în activarea mecanismelor de
apărare din plante (**Hussain et al. 2011, Biotechnology advances, 29, 300-311**).

Și în cazul compoziției prezentate de cererea de brevet **WO 2014 185794 A1** unii dintre
17 compuși, cum este, de exemplu, betaina, au și rol de activare a răspunsului defensiv din plante
19 (**Ashraf și Foolad 2007, Environmental and Experimental Botany, 59, 206-216**).

Este cunoscut faptul că acizii organici care au grupări funcționale cu caracteristici de
21 legare reversibilă sau de complexare a anionilor anorganici formează compuși amfifili care
pot difuza prin barierele de permeabilitate. Silicații utilizați eliberează lent mici cantități de
23 siliciu, dar cu o puternică alcalinizare a mediului, care nu este compatibilă cu pH-ul fiziologic
al citoplasmei, necesar desfășurării proceselor metabolice asociate acțiunii de biostimulant.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție care să
25 includă componente care eliberează continuu mici cantități de siliciu, la pH fiziologic și fără
27 modificarea acestuia, înglobat într-o structură amfifilă, și elicitori cu rol de permeabilizare a
peretelui celular vegetal.

Compoziția conform invenției este alcătuită din: 20 părți dioxid coloidal de siliciu;
29 42,2 părți de esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță; 12,9 părți alcool etilic; 5,5 părți
31 glicerol, 3,4 părți trigliceride, 9,8 părți lecitină modificată, cu o balanță hidrofil - lipofilă HLB
mai mare de 8, 6,4 părți oleat de potasiu, 0,1 părți silicază bacteriană, 0,1 părți expansine
33 fungale, diferența până la 100 părți fiind reprezentată de apă și substanțe nesaponificabile.

Dioxidul de siliciu coloidal are o suprafață specifică BET cuprinsă între 270 și
35 330 m²/g, un conținut de bioxid de siliciu de minimum 98%, și generează suspensii cu un pH
de 5,5.

Preparatul de silicază din compoziția de mai sus este un extract proteic (parțial)
37 purificat din bacterii producătoare de astfel de enzime care hidrolizează legătura oxo-silicică,
39 și are o activitate de minimum 0,5 μg/ml acid ortosilicic, H₄SiO₄, eliberat din silicagel, SiO₂ ·
· nH₂O, la temperatura camerei, și la pH 7,5, timp de 1 h, per mg de proteină.

Expansinele fungale din compoziția de mai sus sunt reprezentate de un extract
41 proteic purificat din microorganismele producătoare de astfel de proteine non-catalitice, care
43 slăbesc rețeaua (ligno)celulozică, datorită desfacerii legăturilor de hidrogen, și care au o
activitate de reducere a rezistenței la rupere, în extensometru, a hârtiei de filtru Whatman nr.
45 3, cu minimum 20%.

Aplicarea prin tratament foliar a compoziției de mai sus pentru biostimularea culturilor
47 de plante nutraceutice *Passiflora incarnata L.* și *Momordica charantia L.*, în doze de
2...4 kg/ha, în două tratamente, la începutul înfloritului și la sfârșitul înfloritului, cu o normă

RO 131869 B1

de stropire de 200 l la începutul înfloritului, și de 400 l la sfârșitul înfloritului, determină o creștere a acumulării compușilor antioxidanți în frunzele de *Passiflora incarnata* de cel puțin 10%, și o creștere a acumulării unor compuși antidiabetici în frunzele de *Momordica charantia* de cel puțin 15%. 1
3

Invenția de față prezintă următoarele avantaje: 5

- asigură formarea unei compoziții cu rezistență intrinsecă la biodegradare, datorită conținutului de peste 10% alcool etilic, provenit din excesul de la reacția de trans-etilare, sau adăugat în procedeul ulterior de obținere, care menține activitatea apei sub nivelul necesar dezvoltării microorganismelor spoliatoare; 7
9

- formează suspo-emulsii stabile după diluare, datorită acțiunii combinate de emulsio-nare, exercitate de lecitină și de esterii etilici ai uleiului de rapiță, și de creștere a viscozității, datorate dioxidului coloidal de siliciu; 11

- furnizează o soluție tehnică de obținere a unor compoziții din care rezultă suspo-emulsii aplicate foliar, cu caracteristici superioare, datorită alcoolului etilic ce acționează în sinergie cu esterii acizilor grași, pentru plastifierea cuticulei plantelor, glicerolului care acționează ca agent de hidratare, reducând viteza de evaporare a apei și a compușilor activi de pe frunze, emulsifiantilor/surfactanților care îmbunătățesc capacitatea de udare și de acoperire a frunzelor, și reduc rata de formare a picăturilor fine cu grad ridicat de dispersie; 13
15
17

- eliberează constant mici cantități de siliciu, după diluare în mediu apos și creșterea activității apei, datorită activării silicazei și acțiunii acesteia asupra bioxidului de siliciu coloidal, parțial hidratat; 19
21

- determină permeabilizarea peretelui celular și eliberarea din acesta în citoplasmă a acidului silicic, datorită expansinelor microbiene care acționează asupra legăturilor de hidrogen, cu rol de stabilizare a matricei lignocelulozice; 23

- după aplicare foliară, prezintă caracteristicile unui biostimulant pentru plante, determinând creșterea eficienței de utilizare a nutrienților, activând echilibrat metabolismul secundar din plante, și favorizând acumularea de compuși biologic activi în culturile de plante nutraceutice. 25
27

În continuare se prezintă exemple de realizare ce ilustrează invenția, fără a o limita. 29

Exemplul 1

1000 g de ulei degumat de rapiță, cu caracteristicile prezentate în tabelul 1, este adus într-o autoclavă de 2 l, din oțel inox, cu sistem de agitare și de încălzire, sub atmosferă protectoare de azot. 31
33

Tabelul 1 35

Caracteristicile uleiului degumat de rapiță folosit

Apă și compuși volatili	% m/m	4	37
Substanțe nesaponificabile	% m/m	14	
Acizi grași liberi	% m/m	19	39
Index de saponificare	mg KOH/g	1695	
Compoziția medie în acizi grași (% m/m): C16: 24,4; C18: 1,2 ; C18-1: 16,1; C18-2: 24,5; C18-3: 7,3; C20-1: 7,3; C22-1: 42,4			41

Se dizolvă 25 g de hidroxid de potasiu de puritate 98% în 420 g de etanol cu 0,3% apă (200% în exces față de reacția de trans-esterificare), iar soluția rezultată este adăugată în autoclav peste uleiul degumat de rapiță. Se pornește agitarea și încălzirea la 40°C. După un timp de reacție de 8 h, masa de reacție se răcește la temperatura camerei. Se colectează 43
45
47

RO 131869 B1

1 1435 g de masă transparentă de reacție (R1) cu următorul conținut (% m/m): esteri etilici de
acizi grași din rapiță (FAEE) 64,6; trigliceride 5,1; glicerol 5,9; etanol 20; hidroxid de potasiu
3 1,5 și apă 0,4, corespunzând unui randament de trans-esterificare de 92,3%. În produsul de
reacție (R1), la o stocare timp de 1...180 zile, nu se separă straturi diferite. 500 g de produs
5 de reacție (R1) se tratează sub agitare viguroasă cu 37 g de acid oleic tehnic, ale cărui
caracteristici sunt prezentate în tabelul 2 de mai jos, pentru a se neutraliza excesul de
7 hidroxid de potasiu.

9 *Tabelul 2*

Caracteristicile tehnice ale acidului oleic folosit

Caracteristica	Unitate	Valoare
Indice de aciditate	mg KOH/g	1979
Indice de iod	g I ₂ /100 g	914
Conținut de apă	% m/m	3

15

17 Se formează o soluție clară, notată (R1.1), ce are următoarea compoziție (% m/m):
19 esteri etilici ai acizilor grași: 60,3; trigliceride 4,8; glicerol 5,5; etanol 18,7; săruri de potasiu
ale acizi grași exprimate ca oleat 9,2; apă 0,9. 140 g produs intermediat (R1.1) este ames-
21 tecat prin agitare viguroasă cu 40 g bioxid de siliciu coloidal (Aerosil® 300 Pharma, Evonik
Resource Efficiency, Hanau-Wolfgang, Germania), 19,6 g lecitină modificată, cu o balanță
hidrofil - lipofilă HLB mai mare de 8 (Thermolec® WFC, Archer Daniels Midland), 0,2 g
23 silicază bacteriană, 0,2 părți expansine fungale, pentru a se obține compoziția cu efect de
biostimulare a plantelor, pe bază de siliciu cu biodisponibilitate crescută, destinată aplicării
prin tratament foliar.

25 Dioxidul de siliciu coloidal are o suprafață specifică BET cuprinsă între 270 și
330 m²/g, un conținut de bioxid de siliciu de minimum 98%, și generează suspensii cu un pH
27 de 5,5. Orice produs cu caracteristicile de mai sus poate fi utilizat pentru realizarea
compoziției.

29 Silicaza din compoziția de mai sus este un extract proteic (parțial) purificat din
microorganisme producătoare de astfel de enzime care hidrolizează legătura oxo-silicice, și
31 are o activitate de minimum 0,5 μg/ml acid ortosilicic, H₄SiO₄, eliberat din silicagel, SiO₂ ·
· nH₂O, la temperatura camerei, și la pH de 7,5, timp de 1 h, per mg de proteină.

33 Orice preparat enzimatic cu acțiune silicazică poate fi utilizat pentru realizarea com-
poziției de mai sus, cum este, de exemplu, cel realizat pe baza brevetului **US 8822188 B2**,
35 din culturi de *Methanosarcina thermophila*. În realizarea compoziției conform exemplului s-a
folosit un preparat enzimatic silicazic obținut dintr-o tulpină de *Brevibacillus parabrevis* B50,
37 depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) B 001413 la National Collection of Agricultural
and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, care a fost selectată
39 pentru degradarea accelerată a materialului vegetal provenit din tulpinile de cereale, cu un
conținut ridicat de biosiliciu.

41 Expansinele bacteriene din compoziția de mai sus sunt reprezentate de un extract
proteic purificat din bacteriile producătoare de astfel de proteine non-catalitice, care slăbesc
43 rețeaua (ligno)celulozică, datorită desfacerii legăturilor de hidrogen, și care au o activitate
de reducere a rezistenței la rupere, în extensometru, a hârtiei de filtru Whatman nr. 3, cu
45 minimum 20%.

47 Se poate folosi, de exemplu, preparatul enzimatic descris de **Zhou et al. 2011, World
Journal of Microbiology and Biotechnology, 27, 1905-1910**, denumit swolenină (cu
acțiune similară expansinelor, de slăbire a peretelui celular), obținut din tulpina S38 de

RO 131869 B1

Trichoderma pseudokoningii. În acest exemplu se folosește un preparat de expansine *T. harzianum* Td50b, număr de depozit NCAIM (P) F 001412, selectată pentru abilitatea acesteia de a degrada accelerat materialul vegetal. 1
3

Compoziția rezultată este alcătuită din: 20 părți dioxid coloidal de siliciu; 42,2 părți de esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță; 12,9 părți alcool etilic; 5,5 părți glicerol, 3,4 părți trigliceride, 9,8 părți lecitină modificată, cu o balanță hidrofil-lipofilă HLB mai mare de 8, 6,4 părți oleat de potasiu, 0,1 părți silicază microbiană, 0,1 părți expansine bacteriene, diferența până la 100 părți fiind reprezentată de apă și substanțe nesaponificabile. 5
7

Exemplul 2 9

S-a realizat un tampon fără siliciu/silicați, constituit din 50 mM glicină, 50 mM acid citric acid, 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM ditiotritol, 100 mM NaCl și 0,5 mM ZnSO₄. Valoarea pH s-a ajustat la 7,5 cu NaOH. Tamponul a fost realizat în apă fără silicat, apă ultrapură (produsă într-un aparat Milli-Q® Integral, Merck-Millipore, Darmstadt, Germania), în recipiente de laborator din material plastic (Nalgene®, Thermo Scientific Nalge Nune, Rochester, NY, SUA). În tuburi Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Germania) de 1,5 ml s-au adus 10 μl de compoziție conform exemplului 1, și 1 ml de tampon. Amestecul s-a incubat timp de 24 h la temperatura camerei, sub agitare. După 24 h, suspo-emulsia s-a centrifugat (13400 rpm, 15 min, 4°C, pe o centrifugă Eppendorf 5804 R), iar 700 μl de supernatant s-au filtrat printr-o seringă filtrantă (filtre Durapore Millex-GV 22 μm, 13 mm diametru, Merck Millipore). În filtrat a fost determinat conținutul de acid ortosilicic liber, cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 114794, Merck-Millipore). Acest test colorimetric este bazat pe reacția dintre silicat și ionii molibdat, pentru a forma un complex colorat de silicomolibdat albastru, care poate fi detectat spectrofotometric la 810 nm. Concentrația absolută de acid silicic a fost calculată după construcția unei curbe de calibrare, folosind un standard de siliciu (Merck 170236, Merck-Millipore). Domeniul de linearitate a fost stabilit pentru intervalul 0...0,25 mM acid silicic. S-a lucrat față de un martor realizat prin amestecarea a 140 g produs intermediat (R1.1) cu 40 g bioxid de siliciu coloidal (Aerosil® 300 Pharma, Evonik Resource Efficiency), 19,6 g lecitină modificată, cu o balanță hidrofil-lipofilă HLB mai mare de 8 (Thermolec® WFC, ADM), ce reprezenta compoziția conform exemplului 1, fără componentele de origine microbiană. În final s-a constatat că din compoziția conform exemplului 1 se eliberează cu 125% mai mult acid ortosilicic decât în compozita martor, fără ingredientele de origine microbiologică. 11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31

Exemplul 3 33

Compoziția conform exemplului a fost aplicată pe plante de mazăre, cultivate pe un sistem hidroponic (cu soluții Hoagland complete). Plantele de mazăre erau separate de mediul nutritiv cu tampoane de vată hidrofobă, pentru a evita contaminarea soluției nutritive cu soluție aplicată foliar. 35

S-a aplicat un tratament de stropire cu o soluție de 1% compoziție conform exemplului 1, și 1% martor, realizat prin amestecarea a 140 g produs intermediat (R1.1) cu 40 g bioxid de siliciu coloidal (Aerosil® 300 Pharma, Evonik Resource Efficiency), 19,6 g lecitină modificată, cu o balanță hidrofil-lipofilă HLB mai mare de 8 (Thermolec® WFC, ADM), ce reprezenta compoziția conform exemplului 1, fără componentele de origine microbiană. 37
39
41

Produsele au fost aplicate prin stropire cu un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Healthcare, Somerset, PA, SUA), câte 2 ml pe fiecare plantă. La 3 zile de la tratament au fost prelevate frunzele, și s-a separat fracția citosolică prin tehnica descrisă de **Hernandez et al. 2000, Plant, Cell & Environment, 23: 853-862**. În fracția citosolică s-a determinat acidul ortosilicic cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Rezultatele au demonstrat o creștere cu peste 80% a nivelului de acid ortosilicic în plantele tratate cu o suspo-emulsie 1% din compoziția conform exemplului 1, comparativ cu plante martor, tratate cu o compoziție asemănătoare, dar din care lipseau componentele microbiologice. 43
45
47
49

1 Exemplul 4

3 A fost testat efectul tratamentului cu o suspo-emulsie de 1% asupra eficienței de
 4 utilizare a zincului. S-a lucrat cu plantule de piersici (*Prunus persica* (L.) Batsch) ev. Suncred.
 5 Două semințe de piersic au fost plantate în vase VC10 (diametru 10 mm, înălțime 7,6 cm;
 6 volum 0,41 l) umplute cu nisip spălat, clasificat și calcinat (Făget, Begamineral, SiO₂
 7 minimum 96%, Fe₂O₃ maximum 0,4%). După germinare a fost lăsată în fiecare vas numai
 8 o plantă, cele mai puțin dezvoltate fiind eliminate. În plantulele rămase au fost eliminate
 9 cotiledoanele. Plantele au fost cultivate în condiții hidroponice cu o soluție Hoagland cu un
 10 deficit de 10% Zn. Baza tulpinii a fost învelită cu o vată hidrofobă, și suprafața vasului de
 11 creștere a fost acoperită cu o folie din material plastic și două straturi de hârtie-prosop pentru
 a preveni contaminarea zonelor radiculare cu soluțiile aplicate prin stropire.

12 S-au aplicat două tratamente de stropire, la 7 și 21 zile de la eliminarea cotiledoa-
 13 nelor, cu o soluție de 1% compoziție conform exemplul 1, și 1% martor, realizat prin ameste-
 14 carea a 140 g produs intermediat (R1.1) cu 40 g bioxid de siliciu coloidal (Aerosil® 300
 15 Pharma, Evonik Resource Efficiency), 19,6 g lecitină modificată, cu o balanță hidofil-lipofilă
 16 HLB mai mare de 8 (Thermolec® WFC, ADM), ce reprezenta compoziția conform exemplului
 17 1 fără componentele de origine microbială. Produsele au fost aplicate prin stropire cu un
 18 atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Healthcare),
 19 câte 5 ml pe fiecare plantă.

20 La 2 săptămâni de la ultimul tratament s-a desființat experiența. S-a determinat
 21 suprafața foliară primară, suprafața radiculară și conținutul de zinc în țesuturile foliare. O
 22 probă de material foliar de 0,5 g, cântărită cu precizie, a fost mineralizată cu un amestec de
 23 30% H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, SUA) și HNO₃ 65% (Merck, Germania) (3:5, v/v).
 24 Mineralizarea probelor s-a realizat într-un digester cu microunde (Berghof, Eningen,
 25 Germania). După mineralizare probele au fost transferate într-un balon cotat de 50 ml, și
 26 diluate cu apă pură miliQ. În soluția rezultată s-a determinat conținutul de zinc, folosind un
 27 sistem Optima 2100 DV ICP-OES (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, SUA). Rezultatele sunt
 28 prezentate în tabelul 3.

29

Tabelul 3

31 *Influența tratamentelor foliare cu siliciu asupra eficienței
 de preluare și utilizare a zincului*

33	Tratament	Suprafață foliară (cm ²)	Suprafață radiculară (cm ²)	Conținutul de zinc în țesuturi (mg/kg)
35	Martor, tratat cu apă distilată	493	552	62
37	Martor, compoziție cf. exemplului 1, fără componente microbiologice	578	694	65
38	Compoziție cf. exemplului 1	846	1096	87
39	DL5%	54	82	12

41 Rezultatele din tabelul 3 dovedesc faptul că aplicarea prin stropire a compoziției
 42 obținute conform exemplului 1 determină o semnificativă ameliorare a preluării și utilizării
 43 zincului. Acest fapt este cunoscut pentru siliciul aplicat radicular (**Mehrabanjoubani, et al.**
2015, Pedosphere, 25, 192-201).

45 Exemplul 5

46 Compoziția obținută conform exemplului 1 a fost testată din punct de vedere al
 47 acțiunii de biostimulant pentru plantele nutraceutice, determinându-se influența tratamentelor
 foliare asupra acumulării compușilor biologic activi în *Passiflora incarnata* L. și *Momordica*

RO 131869 B1

charantia L. Plantele nutraceutice au fost cultivate pe preluvosol roșcat molie, fertilizat echilibrat conform recomandărilor agrochimice. Tratamentele foliare s-au aplicat în a doua decadă a lunii mai 2015, și la începutul lunii iulie 2015, când plantele erau la începutul înfloriturii și, respectiv, la sfârșitul perioadei de înflorit. S-au aplicat doze echivalente a 2 l/ha de compoziție conform exemplului, la începutul înfloriturii, și, respectiv, 4 l/ha la sfârșitul înfloriturii. S-a aplicat o suspo-emulsie de 1% din compoziția conform exemplului 1, într-o normă de stropire echivalentă a 200 l/ha la începutul înfloriturii, și de 400 l/ha la sfârșitul înfloriturii. Aplicarea soluțiilor s-a realizat cu ajutorul unei pompe de spate SG20 (Stihl AG, Waiblingen, Germania), prin stropire de la 40 cm, cu o presiune de stropire stabilită la 275 kPa, folosind o duză cu jet plat și derivă limitată (TeeJett® flat-fan TT11002 model, Spraying Systems Co., Wheaton, IL, SUA). Tratamentele s-au realizat într-un experiment care a inclus și un martor netratat cu dispersii de uleiuri esențiale, amplasat randomizat în 4 repetiții.

La 2 săptămâni de la tratament s-au prelevat probe în care s-au determinat principalele ingrediente biologic active.

Materialul vegetal (frunze *P. incarnata*, fructe *M. charantia*) a fost uscat la 50°C și apoi a fost extras în etanol 70% (v/v), într-un raport de 1,5:10 (m/v), la temperatura camerei, timp de 10 zile. Extractele au fost filtrate, iar filtratele au fost stocate la 4°C până la utilizare. Greutatea în stare uscată a fost determinată folosind un analizator de umiditate (Radwag, Radom, Polonia).

În extractul din materialul vegetal de *P. incarnata* s-a determinat activitatea antioxidantă, prin măsurarea capacității respectivelor extracte de stinge: cationii radicalici produși de acidul 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulphononic (ABTS) și radicalii stabili generați de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Rezultatele au fost exprimate ca echivalent Trolox (TEAC)/g s.u. și, respectiv, ca % inhibarea DDPH (**Gaspar et al. 2014, Romanian Biotechnological Letters, 19: 9353-9365**).

Tabelul 4

Activitatea antioxidantă în extractul de material vegetal
provenit din plante de *Passiflora incarnata*

Varianta experimentală	TEAC /g s.u.		% DDPH	
	Primul tratament	Al doilea tratament	Primul tratament	Al doilea tratament
Martor netratat cu siliciu	78,55 ± 3,05b	78,69 ± 5,88b	28,83 ± 1,22a	28,33 ± 1,56b
Tratament compoziție cf. ex. 1, 1 tratament 2 l/ha, după 3 săptămâni 1 tratament 4 l/ha	89,34 ± 4,2a	93,27 ± 6,84a	29,64,03 ± 1,82a	33,50 ± 1,32a

Rezultatele prezentate în tabelul 4 demonstrează că aplicarea foliară a compoziției obținute conform exemplului 1 determină o creștere a activității antioxidante de peste 10% în frunzele de *P. incarnata*. Activitatea antioxidantă este în directă legătură cu utilizările fitoterapeutice ale plantelor de *Passiflora* (**Sarris et al. 2013, CNS Drugs, 27: 301-319**).

În extractul de material vegetal de *M. charantia* s-a determinat activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, o proteină transmembranară majoră, cu rol în diabetul de tip II, non-insulino-dependent, care este inhibată de sapogenine triterpenice de tip cucurbitan

RO 131869 B1

1 din *M. charantia*. (Zeng et al. 2014. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 81: 176-
2 S-a folosit metoda descrisă de Lund et al. 2004 (*Journal of Biological Chemistry*,
3 279:, 24226-24235), folosind ca substrat pNPP (para-nitro-fenil fosfat). Tamponul de testare
4 (pH = 7,4) a fost constituit din 50 mM 3,3-dimetilglutarate, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitola
5 fost ajustat la o tărie ionică de 0,15 M, prin adăugarea de NaCl. S-a lucrat în placă de
6 microtitrare cu 96 godeuri, din polipropilenă, volum de lucru 250 µl (Nune™ 96-Well
7 Polypropylene MicroWell™ Plates, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Concentrațiile
8 corespunzătoare de extracte (0 și 30 µl) au fost adăugate la tamponul de testare conținând
9 0 sau 2,5 mM pNPP (concentrație finală) în volum total de 200 µl. Reacția a fost inițiată de
10 adăugarea de 20 µl, conținând 10 unități protein-tirozinfosfatază (PTP1B, Prospec, Rehovot,
11 Israel). S-a incubat timp de 30 min la temperatura de 37°C. Reacția a fost stopată prin
12 adăugarea a 30 µl de soluție 0,5 M NaOH. S-a măsurat absorbanta în placa de microtitrare
13 la 405 nm, folosind un cititor de plăci (FluoroStar Omega, BMG LabTech, Offenburg,
14 Germania), cu posibilitatea corecției absorbantei cauzate de substrat în absența **enzimei și**
15 **compușilor**. Ca martor pozitiv, activitatea de PTP1B a fost determinată în prezența
16 vanadatului de sodiu, Na₃VO₄, un inhibitor cunoscut al activității protein-tirozinfosfatazei 1B.
17 Rezultatele s-au exprimat ca % de inhibare, și sunt prezentate în tabelul 5.

19 *Tabelul 5*

20 *Activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, PTP1B, în extractele*
21 *din materialul vegetal provenit din plante de Momordica charantia*

Varianta experimentală	% inhibare PTP1B	
	Primul tratament	Al doilea tratament
Martor netratat cu siliciu	27,25 ± 4,08b	28,92 ± 8,74b
Tratament compoziție cf. ex.1, 1 tratament 2 l/ha, după 3 săptămâni 1 tratament 4 l/ha	33,94 ± 2,42a	38,32 ± 5,24a

22
23
24
25
26
27
28
29 Rezultatele demonstrează că aplicarea foliară a compoziției obținute conform exem-
30 plului 1 determină o creștere a activității de inhibare a enzimei implicate în diabetul de tip II,
31 protein-tirozinfosfatazei 1B, cu peste 15% în materialul vegetal de *Momordica charantia* L.

32
33 Compoziția pe bază de siliciu, obținută conform exemplului 1, prezintă caracteristicile
unui biostimulant pentru plante, pentru că activează echilibrat metabolismul secundar din
plante, și favorizează acumularea de compuși biologic activi în culturile de plante nutra-
ceutice.

1. Compoziție biostimulantă pe bază de siliciu, pentru aplicare foliară, conform invenției, **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din: 20 părți dioxid coloidal de siliciu, 42,2 părți de esteri etilici ai acizilor grași din ulei de rapiță, 12,9 părți alcool etilic, 5,5 părți glicerol, 3,4 părți trigliceride, 9,8 părți lecitină modificată, cu o balanță hidrofil - lipofilă HLB mai mare de 8, 6,4 părți oleat de potasiu, 0,1 părți silicază bacteriană, 0,1 părți expansine fungale, diferența până la 100 părți fiind reprezentată de apă și substanțe nesaponificabile. 3 5 7
2. Compoziție biostimulantă pe bază de siliciu, pentru aplicare foliară, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** dioxidul de siliciu coloidal folosit are o suprafață specifică BET cuprinsă între 270 și 330 m²/g, un conținut de bioxid de siliciu de minimum 98%, și generează suspensii cu un pH de 5,5. 9 11
3. Compoziție biostimulantă pe bază de siliciu, pentru aplicare foliară, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** preparatul de silicază este un extract proteic (parțial) purificat din bacterii producătoare de astfel de enzime care hidrolizează legătura oxo-silicice, și are o activitate de minimum 0,5 μg/ml acid ortosilicic, H₄SiO₄, eliberat din silicagel, SiO₂ · nH₂O, la temperatura camerei și la pH = 7,5, în timp de 1 h, per mg de proteină. 13 15 17
4. Compoziție biostimulantă pe bază de siliciu, pentru aplicare foliară, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** expansinele fungale sunt reprezentate de un extract proteic purificat din microorganisme producătoare, de astfel de proteine non-catalitice, care slăbesc rețeaua (ligno)celulozică, datorită desfacerii legăturilor de hidrogen, și care au o activitate de reducere a rezistenței la rupere, în extensometru, a hârtiei de filtru Whatman nr. 3, cu minimum 20%. 19 21 23
5. Compoziție biostimulantă pe bază de siliciu, pentru aplicare foliară, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** se aplică sub formă de suspoemulsie 1% din compoziția conform invenției, prin tratament foliar la culturile de plante nutraceutice *Passiflora incarnata* L. și *Momordica charantia* L., în doze de 2...4 kg/ha, în două tratamente, la începutul înfloritului și la sfârșitul înfloritului, cu o normă de stropire de 200 l la începutul înfloritului, și de 400 l la sfârșitul înfloritului, determinând o creștere a acumulării compușilor antioxidanți în frunzele de *Passiflora incarnata* L. de cel puțin 10%, și o creștere a acumulării unor compuși antidiabetici în frunzele de *Momordica charantia* L. de cel puțin 15%. 25 27 29 31

