



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00923

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

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

(71) Solicitant:
• 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 BISTRIȚA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• VLĂȘCEANU 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

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție biostimulantă, pe bază de siliciu, pentru aplicare foliară. Compoziția conform invenției este constituită, în părți masice, din 20 părți dioxid coloidal de siliciu, 42,2 părți 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, 6,4 părți oleat de potasiu, 0,1 părți silicază bacteriană, 0,1 părți expansine fungale, și până la 100 părți apă și substanțe nesaponificabile.

Revendicări: 5



COMPOZIȚIE BIOSTIMULANTĂ PE BAZĂ DE SILICIU PENTRU APLICARE FOLIARĂ

Prezenta invenție se referă la o compoziție cu efect de biostimulare a plantelor, pe bază de siliciu cu biodisponibilitate crescută, destinată aplicării prin tratament foliar, pentru creșterea rezistenței plantelor la stresurile biotice și abiotice și favorizarea acumulării de compuși biologic activi în culturile de plante nutraceutice.

Sunt cunoscute o serie de compoziții pe bază de siliciu destinate aplicării foliare la plantele cultivate. Brevetul SUA 5183477 B descrie o compoziție destinată tratamentelor foliare, pentru protecția plantelor împotriva agenților fitopatogeni și a daunelor produse de aceștia, în care ingredientul activ este reprezentat de silicați alcalini, de sodiu sau de potasiu. Penetrarea cuticulei hidrofobe care acoperă frunzele de către silicați hidrofilii este favorizată de pH-ul puternic alcalin al soluțiilor de silicați de sodiu sau de potasiu, care determină o hidroliză locală a cerurilor din componența cuticulei.

Un dezavantaj al unor astfel de compoziții, care conțin numai silicați, este determinat de reducerea bio-disponibilității, ca urmare a tendinței de precipitare, inclusiv datorită policondensării acidului silicic eliberat din silicați. Brevetul EP2371220 B1 se referă la o compoziție în care silicații alcalini sunt stabiliți 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, glicerofosforilcolină, diglicerol-fosfat, analogi sulfonici ai trimetilglicinei, dimetilsulfoniopropionat, 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 10mM 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.

Cererea de brevet SUA 2014 0116103 A1 prezintă o compoziție care include, într-o soluție apoasă, (a) un prim component, reprezentat de o sursă acceptată de siliciu absorbit foliar; (b) un al doilea component selectat dintr-o sursă acceptată de ioni hidro-sulfatați, agenți eficienți în prevenirea polimerizării acidului silicic sau a ionilor silicați și (c) un al treilea component reprezentat de un grup de acizi organici care au



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).

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.

În anumite situații, cum sunt și cele exemplificate ca aplicare a compoziției descrise de cererea de brevet WO2014185794 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.

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.

Pornind de la ipoteza că siliciul formează o matrice care permite sinteza proteinelor implicate în răspunsul plantelor la stresurile biotice și abiotice, cu



grupări funcționale cu caracteristici de legare reversibilă sau de complexare a anionilor anorganici.

Brevetul JPH07484 B2 dezvăluie o soluție de acid silicic care conține siliciu la concentrații ridicate, obținută prin adăugarea unor agenți de solubilizare la un silicat. Unul sau mai mulți solvenți, selectați din grupul reprezentat de etilenglicol, dietilenglicol, dipropilenglicol, cazeină, gelatină, arginină, histidină, acid L-glutamic, hidrolizat de proteine din soia și uree, este adăugat la soluțiile apoase de silicat, pH-ul fiind ajustat la valori cuprinse între 5 și 7 prin adăugare de acid fosforic.

Cererea de brevet WO2014185794 A1 protejează o compoziție pe bază de siliciu, pentru stimularea creșterii plantelor, care conține un compus solubil al siliciului, în proporție de 0,5-60% (calculat ca SiO_2), dizolvat într-un mediu apos în prezență de polizaharide, polioli, acizi fulvici sau a unui amestec al acestora. Compoziția include și cel puțin unul sau mai mulți macro- și/sau micro – nutrienți, ca de ex. azot, fosfor, potasiu, magneziu, calciu, sulf, bor, cupru, fier, mangan, molibden, zinc, cobalt. Compușii solubili ai siliciului sunt acizii 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 amestec al acestora, în proporție de 0,1 la 10%.

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 amorsează 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, dar 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 pg.). 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>).

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*



scurtcircuitarea sistemului genetic, autorii brevetului SUA 7879127 revendică o compoziție care include: una sau mai multe substanțe cu un conținut ridicat în siliciu (A); unul sau mai mulți activatori ai sistemului 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 și foliar, dar nu este exemplificată sau revendicată în această direcție.

În cazul maceratului fermentat de urzică, tradițional utilizat în agricultura organică ca 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 Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture, Florența, 16-19 noiembrie 2015, pg. 81-82).

În cazul compoziției descrise de brevetul EP2371220 B1 osmoliții adăugați determină o activare a rezistenței plantelor – de ex. poliaminele (putresceina, cadaverina, 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 compuși, cum este de exemplu betaina, au și un rol de activare a răspunsului defensiv din plante (Ashraf și Foolad 2007, *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206-216). Acizi organici din cererea de brevet SUA 2014 0116103 A1, care au grupări funcționale cu caracteristici de 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 siliciu, dar cu o puternică alcalinizare a mediului, care nu este compatibilă cu pH-ul fiziologic al citoplasmei, necesar desfășurării procesele metabolice asociate acțiunii de biostimulant.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție care să includă componente care eliberează continuu mici cantități de siliciu, la pH fiziologic și fără 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; 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 hidrofili - lipofilă HLB mai mare de 8, 6,4 părți oleat de potasiu, 0,1 părți silicază



[Handwritten signature]

41

bacteriană, 0,1 părți expansine 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 330 m²/g, un conținut de bioxid de siliciu de min. 98% și generează suspensii cu un pH de 5,5.

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

Expansinele fungale din compoziția de mai sus sunt reprezentate de un extract proteic purificat din microorganismele 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 min 20%.

Aplicarea prin tratament foliar a compoziției de mai sus pentru biostimularea culturilor 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 litri la începutul înfloritului și de 400 litri 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%.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- 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 micro-organismelor spoliatoare;
- Formează suspo-emulsii stabile după diluare datorită acțiunii combinate de emulsionare, exercitate de lecitină și de esterii etilici ai uleiului de rapiță, și de creștere a vâscozității, datorate dioxidului coloidal de siliciu.
- Furnizează o soluție tehnică de obținere a unor compoziții din care rezultă suspoemulsii aplicate foliar cu caracteristici superioare, datorită alcoolului etilic care acționează sinergic 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, emulsifianților / surfactanților care îmbunătățesc capacitatea de udare și de acoperire a frunzelor și reduc rata de formare a picăturilor fine cu grad ridicat de dispersie;

- Eliberează constant mici cantități de siliciu, după diluare în mediu apos și creșterea activității apei, datorită activării silicazei și acțiunii ei asupra bioxidului de siliciu coloidal, parțial hidratat;
- Determină permeabilizarea peretelui celular și o eliberare din acesta în citoplasmă a acidului silicic, datorită expansiunilor microbiene care acționează asupra legăturilor de hidrogen cu rol de stabilizare a matricei lignocelulozice;
- 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.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

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

Tab. 1. Caracteristicile uleiului degumat de rapiță folosit.

Apă și compuși volatili	% m/m	0,4
Substanțe nesaponificabile	% m/m	1,4
Acizi grași liberi	% m/m	1,9
Index de saponificare	mg KOH/g	169,5
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		

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 ore, masa de reacție se răcește la temperatura camerei. Se colectează 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 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 de reacție (R1) se tratează sub agitare viguroasă cu 37g de acid oleic tehnic, ale cărui caracteristici sunt prezentate în tabelul 2 de mai jos, pentru a se neutraliza excesul de hidroxid de potasiu.

Tab. 2. Caracteristicile tehnice ale acidului oleic folosit.

Caracteristica	unitate	valoare
Indice de aciditate	mg KOH/g	197,9
Indice de iod	g I ₂ /100g	91,4
Conținut de apă	% m/m	0,3

Se formează o soluție clară, notată (R1.1), care are compoziția (% m/m): 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 amestecat 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 silicază bacteriană, 0,2 părți expansine fungale, pentru a obține compoziția cu efect de biostimulare a plantelor, pe bază de siliciu cu biodisponibilitate crescută, destinată aplicării prin tratament foliar.

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

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

Orice preparat enzimatic cu acțiune silicazică poate fi utilizat pentru realizarea compoziției de mai sus, cum este de exemplu cel realizat pe baza brevetului US 8822188 B2, din culturi de *Methanosarcina thermophila*. În realizarea compoziției conform exemplului s-a folosit un preparat enzimatic silicazic obținut dintr-o tulpină de *Brevibacillus parabravis* B50, 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 pentru degradarea accelerată a materialului vegetal provenit tulpinile de cereale, cu un conținut ridicat de biosiliciu.

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 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 min 20%. Se poate folosi de ex. 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 *Trichoderma pseudokoningii*. În acest exemplu se folosește un preparat de expansine *T. harzianum* Td50b, număr depozit NCAIM (P) F 001412, selectată pentru abilitatea ei de a degrada accelerat materialul vegetal.

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

Exemplu 2. S-a realizat un tampon fără siliciu / silicați, constituit din 50 mM glicină, 50 mM acid citric acid, 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM ditiotreitol, 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 Nunc, Rochester, NY, SUA). În tuburi Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Germania) de 1,5 ml s-au adus 10 μl de compoziție conform exemplu 1 și 1 ml de tampon. Amestecul s-a incubat timp de 24 ore la temperatura camerei, sub agitare. După 24 ore suspo-emulsia s-a centrifugat (13.400 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, # 14794, 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 absolute de acid silicic a fost calculate 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), care reprezenta compoziția conform Exemplu 1 fără componentele de origine microbiană. În final s-a constatat că din compoziția conform Exemplu 1 se eliberează cu 125% mai mult acid ortosilicic decât în compoziția martor, fără ingredientele de origine microbiologică.

Exemplu 3. Compoziția conform exemplu 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. S-a aplicat un tratament de stropire cu o soluție de 1% compoziție conform Exemplu 1 și 1% martor, realizat 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), care reprezenta compoziția conform Exemplu 1 fără componentele de origine microbiană. 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 suspoemulsie 1% din compoziția conform Exemplu 1, comparativ cu plante martor, tratate cu o compoziție asemănătoare, dar din care lipseau componentele microbiologice.

Exemplu 4. a fost testat efectul tratamentului cu o suspoemulsie de 1% asupra eficienței de utilizare a zincului. S-a lucrat cu plantule de piersici (*Prunus persica* (L.) Batsch) cv. Suncred. Două semințe de piersic au fost plantate în vase VC10 (diametru 10 mm; înălțime 7,6 cm; volum 0,41 litri) umplut cu nisip spălat,



clasificat și calcinat (Făget, Begamineral, SiO_2 min. 96%, Fe_2O_3 max. 0,4%). După germinarea a fost lăsat în fiecare vas numai o plantă, cele mai puțin dezvoltate fiind eliminate. În plantulele rămase a fost eliminată cotiledoanele. Plantelor au fost cultivate în condiții hidroponice cu o soluție Hoagland cu un deficit de 10% Zn. Baza tulpinii a fost învelită cu o vată hidrofobă și suprafața vasului de 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.

S-a aplicat două tratamente de stropire, la 7 și 21 zile de la eliminarea cotiledonelor, cu o soluție de 1% compoziție conform Exemplu 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), care reprezenta compoziția conform Exemplu 1 fără componentele de origine microbiană. Produsele au fost aplicate prin stropire cu un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Healthcare), câte 5 ml pe fiecare plantă.

La 2 săptămâni de la ultimul tratament s-a desființat experiența. S-a determinat suprafața foliară primară, suprafața radiculară și conținutul de zinc în țesuturile foliare. O probă de material foliar de 0,5 g, cântărită cu precizie a fost mineralizată cu un amestec de 30% H_2O_2 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, SUA) și HNO_3 65% (Merck, Germania), (3:5, v/v). Mineralizarea probelor s-a realizat într-un digester cu microunde (Berghof, Eningen, Germania). După mineralizare probele au fost transferate într-un balon cotat de 50 ml și diluate cu apă pură miliQ. În soluția rezultată s-a determinat conținutul de zinc, folosind un sistem Optima 2100 DV ICP-OES (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, SUA). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.

Tab. 3. Influența tratamentelor foliare cu siliciu asupra eficienței de preluare și utilizare a zincului

Tratament	Suprafață foliară (cm^2)	Suprafață radiculară (cm^2)	Conținutul de zinc în țesuturi (mg/kg)
Martor, tratat cu apă distilată	49,3	55,2	6,2
Martor, compoziție cf. Ex.1, fără componente microbiologice	57,8	69,4	6,5
compoziție cf. Ex.1,	84,6	109,6	8,7
DL5%	5,4	8,2	1,2



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

Exemplu 5. Compoziția obținută conform Exemplu 1 a fost testată din punct de vedere a acțiunii de biostimulant pentru plantele nutraceutice, determinându-se influența tratamentelor foliare asupra acumulării compușilor biologic activi în *Passiflora incarnata* L. și *Momordica charantia* L. Plantele nutraceutice au fost cultivate pe preluvosol roșcat molic, 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 înfloritului, și, respectiv, la sfârșitul perioadei de înflorit. S-au aplicat doze echivalente a 2 litri/ha de compoziție conform exemplu la începutul înfloritului, și, respectiv, 4 litri/ha la sfârșitul înfloritului. S-au aplicat o suspoemulsie de 1% din compoziția conform Exemplu 1, într-o normă de stropire echivalentă a 200 l/ha la începutul înfloritului, și de 400 l/ha la sfârșitul înfloritului. 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 (Radweg, 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-sulphonic (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).

Tab. 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 tab. 4. demonstrează că aplicarea foliară a compoziției obținute conform Exemplu 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 triptenice de tip cucurbitan din *M. charantia*. (Zeng et al. 2014. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 81: 176-180). S-a folosit metoda descrisă de Lund et al. 2004 (*Journal of Biological Chemistry*, 279:, 24226-24235), folosind ca substrat pNPP (para-nitro-fenil fosfat). Tamponul de testare (pH 7,4) a fost constituit din 50 mM 3,3-dimetilglutarate, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotritol a fost ajustat la o tărie ionică de 0.15 M prin adăugarea de NaCl. S-a lucrat în placă de microtitrare cu 96 godeuri, din polipropilenă volum de lucru 250 μl (Nunc™ 96-Well Polypropylene MicroWell™ Plates, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Concentrațiile corespunzătoare de extracte (0 și 30 μl) au fost adăugate la tamponul de testare conținând 0 sau 2,5 mM pNPP (concentrație finală) în volum total de 200 μl. Reacția a fost inițiată de adăugarea de 20 μl, conținând 10 unități protein-tirozinfosfatază (PTP1B, Prospec, Rehovot, Israel). S-a incubat timp de 30 min la temperatura de 37°C. Reacția a fost stopată prin adăugarea a 30 μl de soluție 0.5 M NaOH. S-a măsurat absorbanta în placa de microtitrare la 405 nm folosind un cititor de plăci (FluoroStar Omega, BMG



LabTech, Offenburg, Germania) cu posibilitatea corecției absorbantei cauzate de substrat în absența enzimei și compuși. Ca martor pozitiv, activitatea de PTP1B a fost determinată în prezența vanadatului de sodiu, Na_3VO_4 , un inhibitor cunoscut al activității protein-tirozinfosfatazei 1B. Rezultatele s-au exprimat ca % de inhibare și sunt prezentate în tabelul 5.

Tab. 5. Activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, PTP1B, în extractele 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

Rezultatele demonstrează că aplicarea foliară a compoziției obținute conform Exemplu 1, determină o creștere a activității de inhibare a enzimei implicate în diabetul de tip II, protein-tirozinfosfatazei 1B, cu peste 15% în materialul vegetal de *Momordica charantia*.

Compoziția pe bază de siliciu obținută conform Exemplu 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 nutraceutice.

Această lucrare a fost realizată prin programul Parteneriate in domenii prioritare — PN II, derulat cu sprijinul MEN – UEFISCDI, proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-0995, contract 160/2014 MAIA



REVEDICĂRI

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.
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 min. 98% și generează suspensii cu un pH de 5,5.
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 min. 0,5 μg/ml acid ortosilicic, H₄SiO₄, eliberat din silicagel, SiO₂.nH₂O, la temperatura camerei și la pH 7,5, în timp de o oră, per mg de proteină.
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 microorganismele 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 min 20%.
5. Compoziție biostimulantă pe bază de siliciu pentru aplicare foliară conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** atunci când este aplicată 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 litri la începutul înfloritului și de 400 litri 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%.

