



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 01016

(22) Data de depozit: 03/12/2018

(41) Data publicării cererii:
30/07/2020 BOPI nr. 7/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE CHIMIE
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI" DIN
IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ
NR.41 A, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:
• MARIN LUMINIȚA,
STR.SARMISEGETUZA, NR.13, BL.J1,
SC.A, ET.1, AP.3, IAȘI, IS, RO;
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• AILINCAI DANIELA,
STR. ANASTASIE PANU, NR.23,
BL.MUNTENIA, SC.B, AP.21, IAȘI, IS, RO;
• CONSTANTINESCU-ARUXANDREI
DIANA, ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297,
BL.15A, SC.A, ET.1, AP.5, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• IFTIME MANUELA, STR. STEJAR, NR.64,
BL.N4, ET.4, AP.6, IAȘI, IS, RO;
• DELEANU CĂLIN, ȘOS.PANTELIMON
NR.354, BL.2, SC.4, AP.135, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) XEROGEL PE BAZĂ DE CHITOSAN CU ELIBERARE
CONTROLATĂ A EXO-SEMNALELOR INDUCTORI DE OXID
NITRIC

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor structuri de xerogel pe bază de chitosan, cu eliberare controlată a exo-semnalelor inductori de oxid nitric în organismele care au rol de comunicare, din filofera plantelor de cultură. Procedeu conform invenției constă în liofilizarea unui hidrogel biodinamic rezultat prin

reacția unei soluții de chitosan extras din ciuperci 2% în apă acidulată cu 0, 7% acid acetic glacial, și cu soluție de citral 1% în alcool etilic, timp de maximum 24 h, la temperatura de 55°C, sub agitare continuă.

Revendicări: 4



XEROGEL PE BAZĂ DE CHITOSAN CU ELIBERARE CONTROLATĂ A EXO-SEMNALELOR INDUCTORI DE OXID NITRIC

Prezenta invenție se referă la un xerogel amfifil pe bază de chitosan obținut din ciuperci, care înglobează și eliberează controlat exo-semnale hidrofobe, inductori de oxid nitric în organismele pentru care au rol de comunicare, în special în cazul interacțiilor tripartite dintre plantele de cultură – (micro)organisme benefice – (micro)organisme dăunătoare.

Sunt cunoscute o serie de bio-moleculă hidrofobe, care acționează ca exo-semnale implicate în recunoașterea partenerilor interacțiilor dintre plantele de cultură (rădăcini) – (micro)organisme benefice – (micro)organisme dăunătoare. În cazul rizosferei aceste exo-semnale hidrofobe sunt secretate în mediul predominant hidrofil specific porțiunii de sol delimitată de plante, determinând declanșarea unor răspunsuri specifice la partenerul receptor. De exemplu simbiozele fixatoare de azot implică un dialog între rădăcinile plantelor și rhizobii, mediat de către flavonoide hidrofobe (produse de rădăcinile plantelor) și de factorul **Nod** mitogen specific, de natură lipochitooligozaharidică, care este produs de rhizobii (Cooper, 2007, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1355-1365). Ciupercile de micoriză produc și ele un factor mitogen lipochitooligozaharidic, denumit factor **Myc** (Maillet et al. 2011, *Nature*, 469, 58-63). Activitatea biologică a acestor compuși amfifili este însă definită de porțiunea hidrofobă, pentru care s-au identificat kinaze specifice cu funcțiune similară receptorilor (Malkov et al. 2016, *Biochemical Journal*, 473, 1369-1378).

În filosfera plantelor de cultură, respectiv în spațiul care este delimitat de organele aeriene ale plantelor, au fost de asemenea descrise exo-semnale hidrofobe, implicate în comunicarea dintre plante și (micro)organismele asociate. Bacteriile epifite produc surfactanți care să le permită să se miște pe suprafața hidrofobă a frunzei (Burch et al. 2016. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-01751). Acești compuși hidrofobi sunt percepuți de plante ca fiind o dovadă a prezenței microorganismelor dăunătoare - *Microbe-Associated Molecular Patterns*, MAMPs, tipare moleculare asociate microbilor. Acești MAMPs surfactanți acționează activatori ai răspunsului de apărare din plante, fiind percepuți în principal la nivelul stomatelor (Melotto et al. 2008. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 101-122).

Strigolactonele, sunt un grup de derivați carotenoidici / lactone sequisterpenice puternic hidrofobe cu rol mixt, de fitohormoni (endo-semnale) și de semio-chimicale /

exo-semnale. Aceste exo-semnale sunt produse de rădăcinile plantelor, stimulează germinarea sporilor ciupercilor de micoriză, cu ramificarea hifelor (Akiyama et al. 2005, *Nature*, **435**, 824-827), modifică tiparul de dezvoltare și de ramificare al ciupercilor fitopatogene (Dor et al. 2011, *Planta*, **234**, 419-427) și favorizează formarea nodulilor fixatori de azot pe rădăcinile leguminoaselor (Soto et al. 2010, *Soil Biology and Biochemistry*, **42**, 383-385). În același timp, strigolactonele sunt percepute și de semințele plantelor parazite, ca un indicator al prezenței plantelor gazdă, inducând germinarea semințelor respectivelor plante parazite, la momentul oportun parazitării (Matusova et al. 2005, *Plant Physiology*, **139**, 920-934).

Monomerii de cutină, (poli)alcooli grași ramificați, au și ei rol în formarea simbiozelor micorizale (Murray et al. 2013, *Molecular Plant*, **6**, 1381-1383), fiind implicați, în același timp și în stimularea dezvoltării apresorilor oomicetelor fitopatogene (Wang et al. 2012, *Current Biology*, **22**, 2242-2246). Sorgoleonele, componentul major al exsudatelor hidrofobe ale plantelor de sorg, acționează atât ca inhibitori ai proceselor de nitrificare din sol, crescând eficiența utilizării azotului (Subbarao et al. 2013, *Plant and Soil*, **366**, 243-259), cât și ca alomoni implicați în interacții alelopatice, cu efect erbicid pentru alte plante (Einhellig și Souza, 1992, *Journal of Chemical Ecology*, **18**, 1-11). Plantele secretă compuși care mimează N-acil-homoserin-lactonele bacteriene (Teplitski et al. 2000, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 637-648), exo-semnale hidrofobe implicate în comunicarea din cadrul comunităților microbiene și în reglarea concertată a exprimării genelor / *quorum sensing* (Fuqua et al. 2001, *Annual Review of Genetics*, **35**, 439-468). Percepția de către plante a N-acil-homoserin-lactonele (AHLs), ca pe un indicator al prezenței microorganismelor / un tipar molecular asociat microbilor (MAMPs), determină o serie de efecte specifice, inclusiv amorsarea sistemului de apărare din plante (Schikora et al. 2016, *Plant Molecular Biology*, **90**, 605-612). Și la nivelul filosferei AHLs sunt percepute de plante ca MAMPs, cu amorsarea răspunsului de apărare din plante (Velmourougane et al. 2017, *Journal of Basic Microbiology*, **57**, 548-573).

Au fost descrise până în prezent diferite brevete prin care au fost revendicate aplicații practice în tehnologiile de cultură ale plantelor, pentru majoritatea acestor bio-moleculă exo-semnal hidrofobe și/sau pentru analogii lor / compuși bio-mimetici. Astfel de exo-semnale bioactive, care favorizează răspunsul microorganismelor benefice plantelor, sunt utile pentru a realiza noua generație de biostimulanți pentru

plante, caracterizată prin sinergismul componentelor (Rouphael și Colla, 2018, *Frontiers in Plant Science*, **9**, 1655). Biostimulanții pentru plante sunt o nouă clasă de produse utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor, care determină: creșterea eficienței de preluare și utilizare a nutrienților de către plante, mărirea rezistenței la factorii de stres abiotici și îmbunătățirea calității recoltei (du Jardin, 2015. *Scientia Horticulturae*, **196**, 3-14). Interesul crescut pentru biostimulanți este determinat de faptul că această nouă clasă de inputuri agricole asigură o intensificare sustenabilă a producțiilor agricole în condițiile schimbărilor climatice (Calvo et al. 2014, *Plant and Soil*, **383**, 3-41).

Brevetul EP0245931 descrie diferite flavone substituie, ca de ex. 7,4'-dihydroxiflavonă, 7,4'-dihidroxi-3'-metoxiflavonă și 4'-hidroxi-7-metoxiflavonă, din extractul de trifoi, care sunt inductori ai genelor implicate în nodularea de la *Rhizobium trifolii*. Brevetul US 5229113 prezintă o serie de izoflavone, daidzein, genistein, 7-hidroxi-isoflavonă, 5,7-dihidroxi-isoflavonă, biochanină A, formononetină și prunetină, ca și compuși flavonoidici, care includ 4',7'-dihydroxiflavona, apigenina, kaempferolul și coumestrolul, extrase din plante de soia, care sunt inductori ai genelor de nodulare de la *Bradyrhizobium japonicum*. Brevetul FR 2660658 revendică un compus cu o structură lipo-polizaharidică similară factorului *Nod* produs de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* și *Azorhizobium*, care acționează ca factor semnal favorizând formarea simbiozelor fixatoare de azot. Brevetul US 9241454 B2 protejează utilizarea unei structuri lipochitoooligozaharidice, cu un lanț acil saturat sau mono-ne-saturat, conținând 16 sau 18 atomi, pentru stimularea formării simbiozelor micorizale.

Întrucât sinteza sorgoleonelor este laborioasă și scumpă, iar extragerea lor din exsudatele radiculare este limitată, au fost realizate și brevetate procedee de sinteză a unor compuși hidrofobi natural identici / biosimilari strigolactonelor aleopate, cu acțiune erbicidă, prin transformarea oleoresinei din coajă de nucă caju (Brevet US 9447010 B2).

Brevetul US 8101171 B2 se referă la utilizarea strigolactonelor naturale, strigol, alectrol, sorgolactone, orobanchol, sau a analogilor lor sintetici GR7, GR24, Nijmegen1, dimetilsorgolactone, pentru intensificarea interacției simbiotice dintre ciupercile producătoare de endo-micorize (AM) și plantele cultivate. Brevetul revendică aplicarea repetată a strigolactonelor care stimulează / intensifică interacția simbiotică AM - rădăcinile plantelor de cultură, dar nu exemplifică modalitatea

concretă prin care se realizează această aplicare repetată. Cererea de brevet WO 2013034621 A1 dezvăluie folosirea, ca tratament în brazdă sau ca tratament al seminței, a unor derivați ai acil-homoserin lactonelor, pentru creșterea randamentului culturilor agricole, conținutului de clorofilă al plantelor, germinarea semințelor, preluarea nutrienților și interacțiile simbiotice micorizale.

O problemă tehnică care limitează utilizarea eficientă a acestor exo-semnale hidrofobe în tehnologiile de cultivare a plantelor este determinată de solubilitatea redusă a unor astfel de compuși în apa utilizată pentru aplicarea unor tratamente în agricultură, și care reprezintă vehiculul de transfer către mediul predominant hidrofil specific rizosferei plantelor de cultură. Nu au fost descoperiți decât un număr limitat de compuși naturali care cresc solubilitatea în apă a acestor exo-semnale (semiochimicale) hidrofobe și care sunt secretați inclusiv de organismul receptor. În cazul flavonoidelor hidrofobe solubilitatea lor este crescută de către ciclosoforoze (beta-glucani ciclici), produse de rhizobiile - receptori ai respectivelor exo-semnale hidrofobe (Lee et al. 2003, *Antonie van Leeuwenhoek*, **84**, 201-207). Compuși din clasa beta-glucanilor ciclici au fost puși în evidență ca fiind produși și de tulpina *Paenibacillus graminis* FL400 (NCAIM B001365), care favorizează formarea simbiozelor fixatoare de azot (Brevet RO 125651 B1).

A fost descrisă utilizarea ciclodextrinelor pentru creșterea solubilității în apă a compușilor hidrofobi. Mecanismul este similar cu cel al beta-glucanilor ciclici. Ciclodextrinele formează complecși de incluziune cu compușii hidrofobi, pe care îi sechestrează în interiorul hidrofob. Astfel de compuși de incluziune au fost propuși pentru creșterea solubilității medicamentelor hidrofobe (Loftsson și Brewster, 1996, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **85**, 1017-1025), biocidelor (Nardello-Rataj și 2014, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **10**, 2603-2622) sau a regulatorilor de creștere pentru plante (Cerere de brevet JP2013241384 A). Ciclodextrinele sunt însă relativ scumpe și au o stabilitate redusă în sol, datorită unei biodegradabilități semnificative (Fenyvesi et al. 2005, *Chemosphere*, **60**, 1001-1008).

Alte soluții tehnice sunt cele de condiționare a exo-semnalelor hidrofobe sub forma unor concentrate emulsionabile. Cererea de brevet EP 3060561 A1 revendică și o formulare a strigolactonelor (de biosinteză sau analogi sintetici) de tip concentrat emulsionabil, în care strigolactonele sunt dizolvate într-un alcool, metanol, etanol, propanol, iso-propanol, and butanol, emulsionat cu un surfactant, sulfosuccinat, sulfonat de naftalenă, ester sulfat, ester fosfat, alcool sulfatat, sulfonat de alchil

benzen, policarboxilat, condensat de sulfonat de naftalene, condensat de acid fenol sulfonic, lignosulfonat, taurat de metil oleat, alcool polivinilic sau orice combinație dintre acești surfactanți. Formulările de tip concentrat emulsionabil au însă o serie de dezavantaje: suprautilizare a ingredientului activ, necesar pentru a genera gradientul de concentrație implicat în difuzia din solvent în mediu apos; riscul de supradozare sau de sub-dozare; afectarea suprafețelor de material plastic sau de cauciuc de către solvenți; distrugerea straturilor de lacuri și vopsele care protejează metalele diferitelor utilaje și echipamente agricole împotriva coroziunii; efect coroziv al solvenților în unele situații; inflamabilitatea, care complică manipularea.

Un alt dezavantaj al acestor formulări de tip concentrat emulsionabil, specific pentru semiochimicalele hidrofobe din rizosferă, este determinat de stabilitatea redusă în mediu apos a unor astfel de compuși, ca de ex. strigolactonele. Pentru a limita pierderile de substanță activă în soluțiile / emulsiile apoase utilizate pentru stropit, cererea de brevet US 20160198714 A1 descrie utilizarea ca solvenți purtători cu rol de stabilizare, în formularea destinată tratamentului seminței, a unor factori de creștere pentru plante, majoritatea puternic hidrofob, a unor solvenți ne-apoși, polari, de tipul alcoolilor, dialchil cetonelor, carbonatului de alchilene, esterilor alchilici și esterilor aril, sau combinații ale acestora, sau semi-polari, ca de ex. polietilenglicol. Cererea de brevet EP2949215 prezintă utilizarea unui amestec de iso-flavone, dizolvate într-un purtător acceptabil din punct de vedere agronomic, pentru tratamentul seminței leguminoaselor, în vederea favorizării formării simbiozelor fixatoare de azot. Formulările descrise mai sus protejează semnificativ numai compușii hidrofobi instabili în mediu apos care sunt aplicați ca tratament al seminței, nefiind utilizabile pentru produsele aplicate ca tratament al rizosferei / solului.

Sunt necesare deci noi formulări, prin care cantități mici de compuși hidrofobi, cu rol de comunicare în reglarea interacțiilor tripartite specifice plantelor, să fie protejate în interiorul unor structuri hidrofobe. În același timp este de dorit ca respectivele structuri să răspundă specific la unul din factorii de mediu specifici rizosferei, respectiv variația de pH, cu eliberarea compușilor protejați în interiorul structurilor hidrofobe.

În majoritatea cazurilor exo-semnalele hidrofobe sunt asociate unor cascade de semnalizare chimică în care este implicat oxidul nitric (NO) ca mesager secund / gazo-transmițător tisular. De exemplu strigolactonele exo-semnal declanșează producerea tisulară de oxid nitric în plante (Kolbert, 2018 *Physiologia Plantarum*,

doi.org/10.1111/ppl.12712). O structură care ar permite formularea unor astfel de exo-semnale hidrofobe naturale / biomimetice care sunt inductori de oxid nitric ar fi utilă și pentru formularea unor compuși de sinteză care acționează ca inductori de NO în țesuturile plantelor (Georgescu et al. 2018. *PLoS One*, 13, e0198121; Oancea et al. 2017, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 13, 659).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o structură amfifilă, compatibilă cu rizosfera plantelor, care are capacitatea de eliberare controlată a unor exo-semnale hidrofobe inductori de oxid nitric și/sau cu rol de comunicare pentru reglarea interacțiilor tripartite dintre plantele de cultură, și în special a rădăcinilor – (micro)organisme benefice – (micro)organisme dăunătoare.

Inventatorii au găsit că imobilizarea reversibilă a unor molecule de citral hidrofobe pe o structură de chitosan determină formarea de glicodinameri amfifilici, care se auto-asamblează apoi prin interacții supra-moleculare într-o rețea tridimensională de hidrogel biodinamic, care apoi poate fi uscat ca xerogel și reconstituit ca hidrogel, și care răspunde specific la pH.

Xerogelul pe bază de chitosan înglobează în structuri hidrofobe 0,23 – 0,53 g de exo-semnale hidrofobe inductori de oxid nitric și se obține prin liofilizarea unui hidrogel biodinamic rezultat prin reacția a 3 litri soluție chitosan extras din ciuperci 2% în apă acidifiată cu 0,7% acid acetic glacial, cu 1,16-4,6 litri soluție de citral 1% în alcool etilic, timp de maximum 24 ore, la temperatura de 55°C, sub agitare continuă.

Chitosanul extras din ciuperci are masa moleculară de 263 KDa și un grad de acetilare de 15%.

Exo-semnalele se înglobează în structurile hidrofobe ale hidrogelului biodinamic(i) prin adăugare în soluția inițială de citral în cazul aplicării a 4,6 sau 2,3 litri de soluție de citral, și (ii) prin adăugare ca soluție 2,16 – 2,8% în alcool, după 20-22 ore de reacție formare hidrogel, în cazul utilizării altor volume de soluție de citral.

Exo-semnalele care se înglobează în xerogel sunt: N-tetradecanoil-DL-homoserin-lactonă, un factor semnal utilizat de bacterii pentru detectarea cvorumului / densității populaționale, care este perceput de plante ca un semnal al prezenței microorganismelor, și care activează răspunsul de apărare; 1-(3-metil-2-oxi-furazan-4-ilmetilene)-4-(4-metilfenil)-3-tiosemicarbazone, inductor de oxid nitric în țesuturile vegetale; 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă și 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, compuși mimetici pentru strigolactone, cu rol demonstrat de exo-semnal de rizosferă; naringenină, (±)-2,3-Dihidro-5,7-dihidroxi-2-

(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-one, 4',5,7-trihidroxiflavanone, izoflavonă care stimulează formarea simbiozelor fixatoare de azot; acid dihidroxistearic, un analog al monomerilor de cutină, și, respectiv, sorgoleone 364, 2-Hidroxi-5-metoxi-3-tridecil-[1,4] benzochinonă, compus cu acțiune alelopată și de inhibare a nitrificării.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- Permite condiționarea diferitelor tipuri de exo-semnale hidrofobe, într-o formulă de xerogel compatibilă cu tratamente la sol –tratamente în brazdă, tratamente ale seminței.
- Protejează compuși exo-semnal prin închiderea în buzunarele hidrofobe, neaccesibile apei, din cadrul structurilor supra-moleculare de hidrogel biodinamic, reconstituit din xerogel prin umectare în soluția solului;
- Asigură o eliberare controlată de factori de mediu, respectiv de variația de pH din rizosferă determinată de exsudatele radiculare acide ale rădăcinilor plantelor, care determină schimbări conformaționale, cu expunerea parțială a buzunarelor hidrofobe la structuri hidrofobe ale rizoplanului plantelor;
- Reduce riscul supradozării datorită diluării semnificative a ingredientelor active în produsul formulat, la max. 1%;
- Nu prezintă riscuri de inflamabilitate, coroziune, sau de afectare a suprafețelor de material plastic sau cauciuc.

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

Exemplu 1. Într-un vas de sticlă Simax® de 10 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică și refrigerent se solubilizează chitosanul extras din butoni de ciuperci *Agaricus bisporus*, (263 kDa, grad de acetilare 15 %). Acesta este dizolvat în soluție de acid acetic 0,7 % pentru a forma 10 kg soluție 2 %. Soluția de chitosan de 2% este încălzită la 55°C. Separat, este dizolvat citralul în etanol, pentru a forma 4,6 litri soluție 1% citral, iar soluția rezultată este încălzită la 55°C. În soluția caldă de citral în etanol se introduc și 0,53 g de N-tetradecanoil-DL-homoserin-lactonă. Soluția caldă de citral în etanol este picurată încet peste soluția caldă de chitosan, sub agitare continuă, 1000 rot/min. Pe măsură ce soluția de citral este adăugată peste soluția de chitosan se observă colorarea și gelifierea acesteia, datorită reacției de iminare. Raportul molar este de 1/1 între grupările amină ale chitosanului și grupările aldehidă ale citralului. După terminarea picurării soluției de etanol hidrogelul rezultat este transferat în tăvile de aluminiu

anodizat ale unui liofilizator (Beta 1-8 LSCplus, Martin Christ, Osterode am Harz, Germania).

Xerogelul rezultat este analizat din punct de vedere al umflării masice în diferite soluții, cu pH diferit. Comportamentul de umflare a fost monitorizat prin calcularea umflării masice la echilibru (MES) cu formula:

$$MES = (M_s - M_d) / M_d \quad (1)$$

unde M_s este masa de hidrogel în stare umflată, iar M_d este masa de xerogel (hidrogel în stare uscată). Măsurătorile sunt efectuate în triplicat, pe bucăți de xerogel de $2 \times 2 \times 0,3 \text{ cm}^3$. Sunt folosite trei medii de pH diferit, considerate relevante pentru aplicațiile practice: apa (pH=7); soluție tampon acidă (pH = 4,2) și soluție tampon fosfat (pH = 7,4). Practic, bucățile de xerogel sunt imersate în sticlute cu 10 ml de mediu cu diferite valori de pH, de unde sunt extrase din timp în timp și cântărite. Procesul de cântărire este oprit în momentul în care trei măsurători consecutive arată lipsa oricărei variații masice. Se constată o creștere semnificativă a gradului de umflare în funcție de pH, de la o gonflare mică, de 3,4 la pH 7,4, la o gonflare de aproape 5 ori mai mare, de 16,3, la pH 7, și o gonflare de 21,4, fără dizolvare la pH 4,2. Variația mare de umflare la o variație mică de pH în limitele fiziologice, între 7,4, pH-ul uzual al celulelor, și pH-ul 7,0, care se formează în zona de influență a rădăcinilor, datorită transportului de nutrienți prin rădăcină asociat transportului de protoni, demonstrează capacitatea xerogelului realizat de a elibera controlat compușii pe care îi include. Din structurile hidrofobe dispersate în hidrogelul reformat prin umflarea xerogelului, exo-semnalele hidrofobe sunt eliberate lent. Se face un biotest de verificare a eliberării compușilor AHL prin determinarea inducerii violaceinei în tulpina bacteriană biosenzor AHL *Chromobacterium violaceum* CV026 (Chu et al., 2011. în: Rumbaugh K. eds., *Quorum Sensing. Methods in Molecular Biology - Methods and Protocols*, vol. 692. Humana Press, pp. 3-19).

Exemplul 2. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se adaugă 2,3 litri de citral, care conțin și 0,33 g 1-(3-metil-2-oxi-furazan-4-ilmetilene)-4-(4-metilfenil)-3-tiosemicarbazone, inductor de oxid nitric în țesuturile vegetale. Raportul molar este de 2 la 1 între grupările amină ale chitosanului și grupările aldehidă ale citralului. Reacția se continuă timp de 3 ore. În final, la testul de umflare, se constată o creștere semnificativă a gradului de umflare în funcție de pH, de la o umflare relativ mică, de 5,3 la pH 7,4, la o umflare de aproape 4 ori mai mare, de

21,6, la pH 7, și o umflare de 35,7, fără dizolvare la pH 4,2. Biotestul se face pe plante de *Arabidopsis thaliana*, pentru evidențierea inducerii de oxid nitric în țesuturile vegetale (Georgescu et al. 2018. *PLoS One*, 13, e0198121).

Exemplul 3. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se adaugă 1,8 litri de citral. Raportul molar este de 2,5 la 1 între grupările amină ale chitosanului și grupările aldehidă ale citralului. Reacția se continuă timp de 24 ore. După 22 ore se adaugă 10 ml soluție în etanol de 2,8% 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă, un compus mimetic pentru strigolactone, cu rol semnificativ de exo-semnal. În final, la testul de umflare se constată o creștere semnificativă a gradului de umflare în funcție de pH, de la o gonflare relativ mică, de 5,6 la pH 7,4, la o gonflare de aproape 5 ori mai mare, de 24,8, la pH 7, și o gonflare de 39,7, fără dizolvare la pH 4,2. Biotestul se face pe fungi fitopatogeni, pentru evidențierea modificării tiparului de dezvoltare al fungilor fitopatogeni sub acțiunea mimeticilor de strigolactone (Oancea et al. 2017. *Molecules*, 22, 961).

Exemplul 4. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se adaugă 1,5 litri de citral. Raportul molar este de 3 la 1 între grupările amină ale chitosanului și grupările aldehidă ale citralului. Reacția se continuă timp de 24 ore. După 22 ore se adaugă 10 ml soluție în etanol de 2,5% 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, un compus mimetic pentru strigolactone, cu rol semnificativ de exo-semnal. În final, la testul de umflare se constată o creștere semnificativă a gradului de umflare în funcție de pH, de la o gonflare relativ mică, de 6,4 la pH 7,4, la o gonflare de aproape 4 ori mai mare, de 25,9, la pH 7, și o gonflare de 44,9, fără dizolvare la pH 4,2. Biotestul se face pe fungi fitopatogeni, pentru evidențierea modificării tiparului de dezvoltare al fungilor fitopatogeni sub acțiunea mimeticilor de strigolactone (Oancea et al. 2017. *Molecules*, 22, 961).

Exemplul 5. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se adaugă 1,3 litri de citral. Raportul molar este de 3,5 la 1 între grupările amină ale chitosanului și grupările aldehidă ale citralului. Reacția se continuă timp de 24 ore. După 20 ore se adaugă 10 ml soluție 2,3% naringenină, (±)-2,3-Dihidro-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-one, 4',5,7-trihidro-xiflavanone, izoflavonă care stimulează formarea simbiozelor fixatoare de azot la leguminoase. În final, la testul de umflare se constată o creștere semnificativă a gradului de umflare în funcție de pH, de la o gonflare relativ mică, de 6,7 la pH 7,4, la o gonflare de aproape 4 ori mai mare, de 26,6, la pH 7, și o gonflare de 50,3, fără dizolvare la pH 4,2. Biotestul se

face pe plantule de năut, pentru evidențierea stimulării fixării de azot sub acțiunea naringeninei (Garg și Singla, 2016. *Plant Growth Regulation*, 80, 5-22).

Exemplul 6. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se adaugă 1,16 litri de citral 1% în etanol. Raportul molar este de 1:4 între grupările amină ale chitosanului și grupările aldehydă ale citralului. Reacția se continuă timp de 24 ore. După 20 ore se adaugă 20 ml soluție 2,16% acid dihidroxistearic, un analog al monomerilor de cutină. În final, la testul de umflare se constată o creștere semnificativă a gradului de umflare în funcție de pH, de la o gonflare relativ mică, de 7,9 la pH 7,4, la o gonflare de aproape 4 ori mai mare, de 29,8, la pH 7, și o gonflare de 57,8, fără dizolvare la pH 4,2. Biotestul se face pe plantule de *Medicago truncatula* (Schornack et al. 2012, *Current Biology*, 22, 2242-2246).

Exemplul 6. Se lucrează ca în exemplul 1, cu următoarele diferențe. Se folosește sorgoleone 364, 2-Hidroxi-5-metoxi-3-tridecil-[1,4] benzochinonă, compus cu acțiune alelopată și de inhibare a nitrificării. Biotestul se face pe *Nitrosomonas europaea*, determinându-se inhibarea nitrificării (Teschamariam et al. 2014. *Plant and Soil*, 379, 325-335).

Revendicări

- Xerogel pe bază de chitosan conform invenției, **caracterizat prin aceea că** înglobează în structuri hidrofobe 0,23 – 0,53 g de exo-semnale hidrofobe inductori de oxid nitric și se obține prin liofilizarea unui hidrogel biodinamic rezultat prin reacția a 3 litri soluție chitosan extras din ciuperci 2% în apă acidifiată cu 0,7% acid acetic glacial, cu 1,16 - 4,6 litri soluție de citral 1% în alcool etilic, timp de maximum 24 ore, la temperatura de 55°C, sub agitare continuă.
- Xerogelul pe bază de chitosan conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** include chitosan extras din ciuperci cu masa moleculară de 263 KDa și un grad de acetilare de 15%.
- Xerogelul pe bază de chitosan conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** exo-semnalele se înglobează în structurile hidrofobe ale hidrogelului biodinamic, prin adăugare în soluția inițială de citral în cazul aplicării a 4,6 litri de soluție, sau prin adăugare ca soluție 2,16-2,8% în alcool, după 20-22 ore de reacție, în cazul utilizării altor volume de soluție de citral.
- Xerogelul pe bază de chitosan conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** exo-semnalele care se înglobează în xerogel sunt: N-tetradecanoil-DL-homoserin-lactonă, un factor semnal utilizat de bacterii pentru detectarea cvorumului / densității populaționale și care este perceput de plante ca un semnal al prezenței microorganismelor, care activează răspunsul de apărare; 1-(3-metil-2-oxi-furazan-4-ilmetilene)-4-(4-metilfenil)-3-tiosemicarbazone, inductor de oxid nitric în țesuturile vegetale; 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă și 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, compuși mimetici pentru strigolactone, cu rol demonstrat de exo-semnal de rizosferă; naringenină, (±)-2,3-Dihidro-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-one, 4',5,7-trihidroxiflavonă, izoflavonă care stimulează formarea simbiozelor fixatoare de azot; acid dihidroxistearic, un analog al



MARIN LUMINIȚA

AIUNCAI SANIEUA

Yffine clausula

monomerilor de cutină; sorgoleone 364, 2-Hidroxi-5-metoxi-3-tridecil-[1,4]
benzochinonă, compus cu acțiune alelopată și de inhibare a nitrificării.



MARIN LUMINITA
Leu

ANINCAI DANIEA DAN

Stancu Daniela