



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00863

(22) Data de depozit: 05/12/2019

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

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

(72) Inventatori:
• NISTOR CRISTINA LAVINIA,
ȘOS. ALEXANDRIA NR. 16, BL. L4, ET. 1,
AP. 41, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;

• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MIHAESCU CĂTĂLIN IONUȚ,
BD.TRAIAN VUIA, NR.20, BL.Y19, SC.2,
ET.3, AP.35, GALAȚI, GL, RO;
• CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• DEȘLIU-AVRAM MĂLINA, STR. GÂRLENI
NR. 4, BL. C85, SC. A, ET. 6, AP. 40,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU PENTRU FORMULAREA FACTORILOR-SEMNAL
HIDROFABI DIN RIZOSFERA PLANTELOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru formularea factorilor-semnal hidrofobi din rizosfera plantelor. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: preparare a unei soluții de acizi humici, respectiv, a unei soluții de 3 co-precursori de silice: tetraetil ortosilicat (TEOS), octiltriethoxisilan (OTES) și (3-Aminopropil)triethoxisilan (APTES), amestecați într-un raport gravimetric de 10/1/1, solubilizați în 20 ml etanol împreună cu 11,46...13,61 mg exo-semnale hidrofobe, adiția în

picătură a soluției de precursori de silice și exo-semnale peste soluția de acizi humici, timp de 2...3 min, sinteza sol-gel prin agitare timp de 3 h la temperatura camerei, și separarea unei faze solide, care include exo-semnalele hidrofobe și acizi humici, înglobate în structura de silice mezoporoasă.

Revendicări: 2



POCEDEU PENTRU FORMULAREA FACTORILOR-SEMNAL HIDROFOBI DIN RIZOSFERA PLANTELOR

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru formularea factorilor-semnal hidrofobi, prin care se înglobează și se eliberează controlat exo-semnale hidrofobe, cu 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-molecule 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-molecule 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 EP 0245931 descrie diferite flavone substituie, ca de ex. 7,4'-dihydroxiflavonă, 7,4'-dihydroxi-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-dihydroxi-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 lipochitooligozaharidice, 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 alelopatice, 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 interacțiunile 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 ciclosoforoaze (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 sulfat, 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 cetonele, 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.

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 cu rol de comunicare pentru reglarea interacțiilor tripartite dintre plantele de cultură, și în special a rădăcinilor – (micro)organismе benefice – (micro)organismе dăunătoare.

Materialele mezoporoase reprezintă astfel de structuri amfifile, din care eliberarea componentelor se face controlat.

Procedeul este alcătuit din următoarele etape: prepararea unei soluții de acizi humici, prin dizolvarea a 60 mg acizi humici în 200 ml etanol, și 50 ml NH₄OH 25%; prepararea unei soluții de 3 co-precursori de silice: tetraetil ortosilicat (TEOS), octiltrietoxisilan (OTES) și (3-Aminopropil) trietoxisilan (APTES) amestecați la un raport gravimetric de TEOS / OTES / APTES = 10/1/1., solubilizați în 20 ml de etanol împreună cu 11,46-13,61 mg exo-semnale hidrofobe; adăugarea în picătură a soluției de precursori silice și exo-semnale peste soluția de acizi humici, rapid, pe parcursul a 2-3 minute; sinteza sol-gel prin agitare timp de trei ore la temperatura camerei; separarea unei faze solide, care include exo-semnalele hidrofobe și acizi humici, înglobate în structura de silice mezoporoasă.

Exo-semnalele care se înglobează în 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.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- Permite condiționarea diferitelor tipuri de exo-semnale hidrofobe, într-o formulă 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 acizi humici înglobați în silice mezoporoasă;
- 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;
- 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 reacție prevăzut cu agitare magnetică (~500 rotații/minut) se introduc 200 ml etanol, și 50 ml NH₄OH 25%, în care se dizolvă 60 mg acizi humici. În paralel se prepară într-un pahar Erlenmayer o soluție de 3 co-precursori de silice: tetraetil ortosilicat (TEOS), octiltrietoxisilan (OTES) și (3-

Aminopropil) trietoxisilan (APTES), amestecați la un raport gravimetric de TEOS / OTES / APTES = 10/1/1 și solubilizați în 20 ml de etanol. Peste acest amestec se adaugă 11,46 mg 3-metil-5-(2-pirimidin-4-il-fenoxi)-5H-furan-2-onă, mimetic de strigolactonă cu activitate dovedită de factor semnal de rizosferă. Se adaugă în picătură, sub agitare, soluția de precursori silice și exo-semnale peste soluția de acizi humici, rapid, pe parcursul a 2-3 minute. Se perfectează sinteza sol-gel prin agitare timp de trei ore la temperatura camerei. După trei ore se lasă peste noapte pentru separarea unei faze solide, care include exo-semnalele hidrofobe și acizi humici, înglobate în structura de silice mezoporoasă. Faza solidă se separă prin filtrare și se folosește ca ingredient activ în formulele de tratament sămânță sau de tip dry-flowable, pentru aplicarea tratamentului în brazdă.

Exemplul 2. Se procedează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că se adaugă 13,61 mg 3-metil-5-(4-fenilchinazolin-2-il-oxi)-5H-furan-2-onă, mimetic de strigolactonă cu activitate dovedită de factor semnal de rizosferă.

Revendicări

1. Procedeu pentru formularea factorilor-semnal hidrofobi din rizosfera plantelor, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: prepararea unei soluții de acizi humici, prin dizolvarea a 60 mg acizi humici în 200 ml etanol, și 50 ml NH₄OH 25%; prepararea unei soluții de 3 co-precursori de silice: tetraetil ortosilicat (TEOS), octiltrietoxisilan (OTES) și (3-Aminopropil) trietoxisilan (APTES) amestecați la un raport gravimetric de TEOS / OTES / APTES = 10/1/1., solubilizați în 20 ml de etanol împreună cu 11,46-13,61 mg exo-semnale hidrofobe; adăugarea în picătură a soluției de precursori silice și exo-semnale peste soluția de acizi humici, rapid, pe parcursul a 2-3 minute; sinteza sol-gel prin agitare timp de trei ore la temperatura camerei; separarea unei faze solide, care include exo-semnalele hidrofobe și acizi humici, înglobate în structura de silice mezoporoasă.

2. Procedeu pentru formularea factorilor-semnal hidrofobi din rizosfera plantelor, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** exo-semnalele care se înglobează în 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.