

RECEPȚIONAT

Agencia Națională pentru Cercetare
și Dezvoltare _____

_____ 2024

AVIZAT

Secția AȘM _____

_____ 2024

RAPORT ȘTIINȚIFIC ANUAL 2024

privind implementarea proiectului din cadrul concursului
proiecte pentru tineri cercetători

**Proiectul Dezvoltarea formulărilor contra fitopatogenilor tomatelor pe baza substanțelor
naturale autohtone și a derivaților lor**

Cifrul proiectului **20.80012.5007.13TC**

Prioritatea strategică **Tehnologii inovative, energie sustenabilă, digitalizare**

Rectorul

Igor ȘAROV

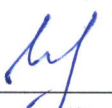
(numele, prenumele)


(semnătura)

Președintele Consiliul Științific

Georgeta STEPANOV

(numele, prenumele)


(semnătura)

Conducătorul proiectului

Natalia SUCMAN

(numele, prenumele)



Chișinău 2024

1. Scopul etapei 2024 conform proiectului depus la concurs (obligatoriu)

Scopul etapei 2024 conform proiectului este de a dezvolta formulări bioactive cu proprietăți fungicide și imunostimulatoare pentru utilizarea în agricultură, cu accent pe protecția tomatelor împotriva bolilor.

2. Obiectivele etapei 2024 (obligatoriu)

1. Sinteza compușilor triazolici cu bioactivitatea stabilită anterior de echipă.
2. Sinteza compușilor cu structură similar triazolică pentru extinderea bibliotecii de substanțe potențial active, în vederea efectuării analizei relațiilor structură-bioactivitate.
3. Sintezei compușilor din seria spiro[ciclopropan-oxindolilor] cu activitatea antivirală.
4. Obținerea chitozanului din surse naturale.
5. Obținerea formulărilor pentru tratarea tomatelor, cu concentrații și compoziții diferite.
6. Studiul *in vitro* și *in vivo* al proprietăților fungicide ale compușilor la diferite concentrații.
7. Studiul *in vivo* al proprietăților de stimulare a creșterii compușilor la diferite concentrații.

3. Acțiunile planificate pentru realizarea scopului și obiectivelor etapei 2024 (obligatoriu)

1. Obținerea hitozanului din trupurile albinelor și ciupercilor.
2. Efectuarea sintezei compușilor țintă cu activitatea antivirală din seria spiro[ciclopropan-oxindolilor].
3. Efectuarea sintezei compușilor țintă cu activitatea fungicidă din seria triazolilor.
1. Obținerea formulărilor cu componența deferită a substanțelor active.
2. Tratarea tomatelor cu formulări de diferită concentrație și componență de substanțe active și efectuarea qPCR analize materiei vegetale.

4. Acțiunile realizate pentru atingerea scopului și obiectivelor etapei 2024 (obligatoriu)

1. Au fost pregătite soluții de chitozan din ciuperci (șampinioni) și chitozan sintetic.
2. Au fost sintetizate 3 substanțe din seria spiro[ciclopropan-oxindolilor] cu activitate antivirală.
3. Au fost sintetizați șase substanțe noi sau substanțe pentru care nu a fost determinată activitatea fungicidă anterior.
4. Au fost obținute 30 de formulări cu compoziții diferite.
5. A fost studiat efectul substanțelor testate asupra creșterii plantelor de tomate.
6. A fost studiată activitatea fungicidă a substanțelor testate asupra *Fusarium spp.*

5. Rezultatele obținute (descriere narativă 3-5 pagini) (obligatoriu)

Una dintre sarcinile primului trimestru de implementare a proiectului a fost sinteza compușilor cu activitate antivirală. În urma cercetărilor efectuate în cadrul unui alt proiect, a fost sintetizată o serie extinsă de substanțe, dintre care trei au demonstrat o activitate ridicată împotriva HIV. Bazându-ne pe teoria uniformității lumii animale, vegetale și microbiologice, precum și pe faptul că, de multe ori, medicamentele utilizate în industria farmaceutică sunt active împotriva mai multor virusuri (de exemplu: lamivudina este activă împotriva HIV și a virusului hepatitei B, iar ribavirina – împotriva virusului hepatitei C, febrei hemoragice Crimeea-Congo, precum și altor infecții virale), s-a presupus că aceste substanțe ar putea fi active și împotriva virusurilor plantelor. Pentru a verifica această ipoteză, colaboratorii din Institutul Viei și Vinului au efectuat studii preliminare pe tomate. Pe teritoriul Republicii Moldova, printre virusurile fitopatogene care afectează culturile legumicole, cele mai răspândite sunt virusul mozaicului

tutunului (TMV) și virusul petelor bronzate ale tomatelor (TSWV). S-a constatat că cele mai active substanțe au prezentat rezultate promițătoare în cazul ambelor virusuri. Cu toate acestea, bazându-ne doar pe aceste date, nu se pot formula concluzii definitive despre mecanismul de acțiune al substanțelor. Pentru a confirma sau infirma aceste rezultate, este necesar un studiu biochimic complet, care să includă determinarea conținutului cantitativ al materialului genetic al agentului patogen în probele analizate și investigarea proprietăților imunostimulatoare ale compușilor. Testările biologice privind activitatea împotriva virusurilor vor fi efectuate în semestrul al doilea al proiectului.

În această etapă, sarcina noastră a fost să pregătim probe ale substanțelor cele mai promițătoare. În acest scop, din 5-clor-, 5-brom- și 5-clor-7-brom izatine s-au obținut, prin intermediul compușilor diazo, spirociclopropanii corespunzători (Figura 1). Compusul **3a** a fost supus hidrolizei pentru obținerea acidului corespunzător și, ulterior, a amidului **4**. Activitatea compusului **4** nu a fost testată anterior pe plante, dar a demonstrat o activitate moderată împotriva virusului HIV. Având în vedere că amidele de origine nenaturală nu sunt supuse sau sunt foarte puțin supuse hidrolizei în celulele vii, se presupune că, păstrându-și activitatea în plantă, acest compus ar putea avea un efect prelungit.

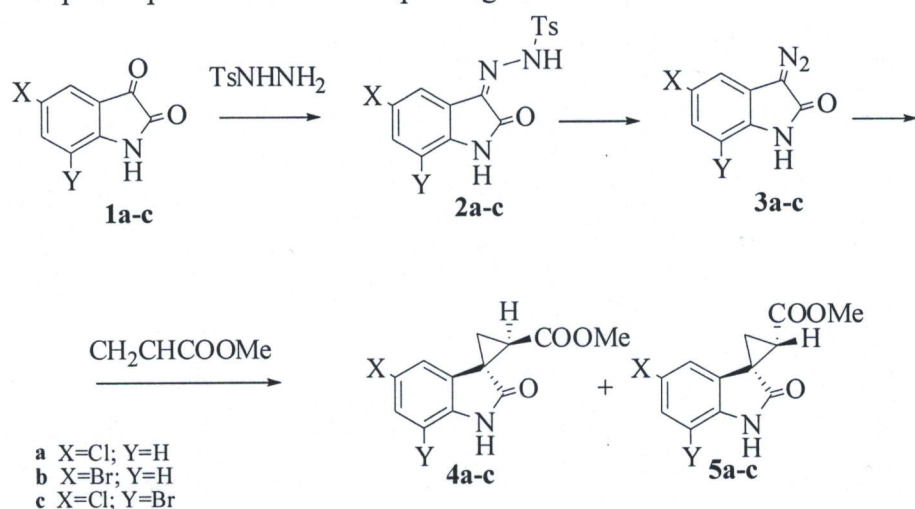


Fig. 1 Schema sintezei compușilor din seria spiro[ciclopropan-oxindolilor].

O altă sarcină a fost sinteza compușilor care conțin în structura lor un fragment triazolic și posedă proprietăți antifungice. Pentru aceasta, din compușii **6a-f**, prin transformări chimice, au fost sintetizați compușii **8a**, **8b**, **8e**, **11c**, **11d**, **9f** și **12a** (MF1-6,8), dintre care șase sunt noi și anterior nedescrși (Figura 2). Compușii MF7, MF8 și MF-EPS-877 au fost anterior studiați pentru capacitatea lor de a inhiba *Fusarium spp.* pe grâu și au fost brevetați. Compușii MF7, MF-EPS-877 și MF10 au fost utilizați în formă gata, fără a fi sintetizați de echipa noastră, fiind preluați din fondul laboratorului. Pentru ultimul compus, proprietățile antifungice nu au fost investigate, însă se cunoaște o astfel de bioactivitate la un compus cu structură similară, care a fost, de asemenea, brevetat anterior. Toate noile substanțe au fost caracterizate utilizând metode de analiză fizico-chimice și spectrale.

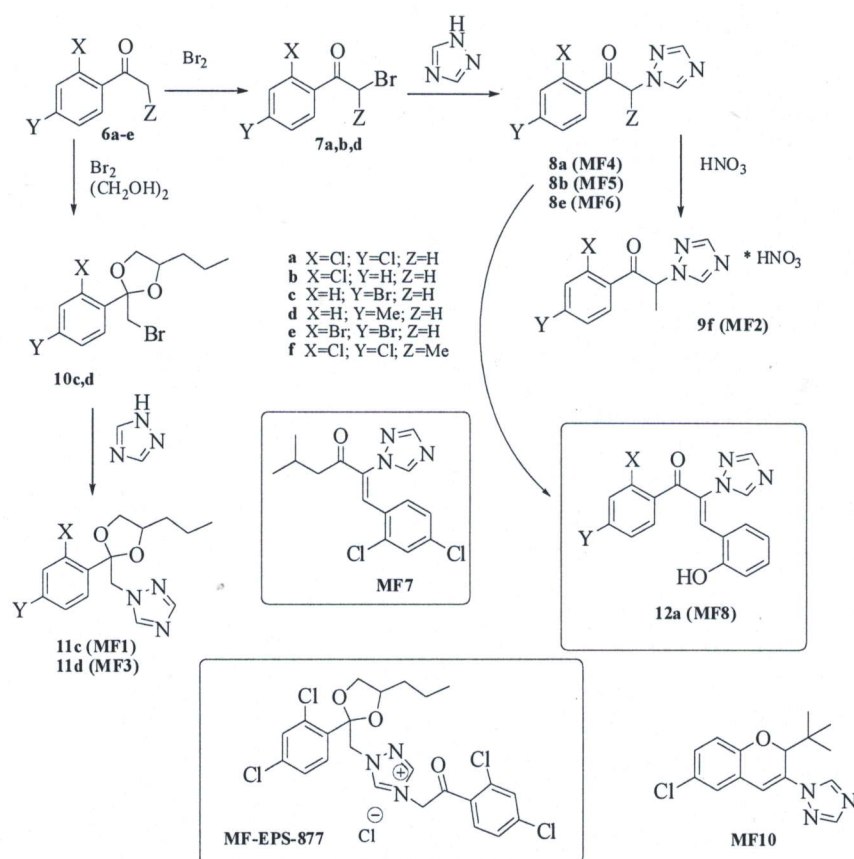


Fig.2. Schema obținerii compușilor noi utilizați în biotestări.

Următoarea etapă a fost obținerea unei soluții de chitosan pentru studierea proprietăților sale biologice. Pentru aceasta, ciupercile champignon mărunțite (400 g) au fost fierte în prezența acidului clorhidric timp de 24 de ore. În urma acestui proces s-au obținut 100 ml de bulion corespunzător, care a fost utilizat ulterior pentru tratarea semințelor în formă nemodificată.

De asemenea, a fost obținută o soluție de chitosan din corpuri de albine moarte. Pentru aceasta, 8 grame de albine moarte au fost mărunțite și fierte în prezența acidului clorhidric timp de o săptămână. Chitosanul este un produs al hidrolizei chitinei, care constituie baza exoscheletului insectelor. Alegerea condițiilor optime pentru descompunerea chitinei și obținerea unei soluții acceptabile de chitosan a necesitat mult timp. Din acest motiv, studierea proprietăților sale biologice nu a fost efectuată, urmând să fie realizată în al doilea trimestru al proiectului.

Pentru compararea caracteristicilor soluțiilor de chitosan, a fost preparată o soluție de chitosan sintetic, disponibil comercial. Pentru a obține soluție de chitosan cu un grad mai ridicat de hidroliză, 4 grame de reactiv au fost fierte timp de 24 de ore în prezența acidului clorhidric, rezultând 130 ml de soluție de 3%. Soluția obținută a fost utilizată ulterior în cercetările biologice.

Următorul pas a fost pregătirea formulărilor preparative pentru realizarea testelor biologice. Pentru aceasta, 30 mg de substanță au fost dizolvate în alcool etilic, iar masa soluției a fost ajustată la 3 g. Ulterior, într-un recipient separat, s-a prelevat 1 g din soluția obținută, s-au adăugat 70 mg de agent tensioactiv Twin 80, iar masa soluției a fost completată cu apă până la 10 g. Astfel, s-au obținut formulări preparative cu o concentrație de 0,1% substanță activă.

Pentru obținerea formulărilor preparative cu o concentrație de 0,01%, s-a prelevat 1 g din soluția cu o concentrație de 0,1% și s-a completat cu apă până la 10 g. În cazul formulărilor care

conțineau chitosan, s-a prelevat 1 g din soluția de 0,1%, s-au adăugat 5 g de soluție de chitosan sintetic și 4 g de apă. Astfel, formularea obținută conținea 0,01% substanță activă și o soluție de chitosan diluată 1:1.

De asemenea, au fost studiate separat bulionul de ciuperci, soluția de chitosan sintetic și soluția de chitosan diluată 1:1 cu apă. Controlul a fost pregătit în mod similar procedurii de obținere a formulării preparative de 0,1%, însă fără adăugarea substanței active. În total, pentru testarea biologică au fost transmise 30 de probe de formulări preparative.

Următorul pas a fost efectuarea testărilor biologice.

Material biologic și schema experienței. În calitate de obiect de studiu au servit plantele de tomate, soiul Brutus (originator – Republica Cehă). Semințele (lot nr. 271-01, Diolsem®, Republica Moldova, 2024) au fost tratate cu soluțiile substanțelor analizate în concentrație de 0.1% și 0.01% (m/m) timp de 8 ore. Pentru fiecare tratare s-au folosit 20 de semințe, experiența s-a efectuat în trei replicări. Semințele au fost împărțite în două grupuri experimentale. Semințele din grupul I au fost germinate pe plăci Petri și hârtie de filtru sterilizate sub razele UV, în calitate de control au servit semințele tratate cu apă distilată. Semințele din grupul II au fost plantate în solul prelevat de pe câmpurile experimentale ale Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor, infectat cu *Fusarium* spp. (fapt confirmat prin teste moleculare), în calitate de martor au servit semințele tratate cu apă distilată (I), fitosporină (II), Topaz (III). Ambele grupuri de plante au fost cultivate în cutia de creștere Hydro Shoot 150 (Secret Jardin®, Belgia) în condiții controlate care au inclus: ciclul zi/noapte de 16 și 8 ore respectiv, $t=24^{\circ}\text{C}$, gradul de iluminare 5000 lm/m^2 , umiditatea aerului 60-65%. Perioada de creștere: 14 zile. La toate plantele la sfârșitul perioadei de cultivare s-au măsurat lungimea rădăcinii și tulpinii. Plantele din grupul II au fost omogenizate și folosite pentru extracția ADN-lui total ($100\text{ }\mu\text{g}$ per probă, 6 probe medii).

Extragerea și cuantificarea acizilor nucleici. ADN-ul total a fost extras din plantele de tomate folosind protocolul ISO 21571:2005 cu modificări. Puritatea și integritatea matricei a fost evaluată în baza raportului densității optice la o lungime de undă de 260/280 și 260/230 nm. Cuantificarea și analiza calității ADN-lui s-a efectuat pe spectrofotometru Genova Nano (Jenway®, Marea Britanie).

Amplificare. Pentru identificarea și cuantificarea fungilor în mostre de ADN extras din plante s-au folosit în calitate de amorsă primerii fcbt2-fcbt3 specifici genomului *Fusarium*: fcbt2 (sens) – AGCTGTCCAACCCCTCTTACG, fcbt3 (antisens) – CAGCGCGGAAAGAGTGAGC. Secvența-țintă – gena β -tubulinei (cifrul FASTA MH521296.1 din baza de date NCBI). Mix-ul de reacție a inclus $10\text{ }\mu\text{l}$ de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific®, SUA), 800 nM de primeri sens+antisens, 20 ng de ADN. Analiza s-a efectuat în C1000 Touch Thermal Cycler cu modulul optic CFX96™ (Bio-Rad®, SUA). Protocolul qPCR a inclus UDG-activarea timp de 2 minute la 50°C (1 ciclu), ADN-activarea timp de 2 min la 95°C (1 ciclu) și 35 de cicluri de denaturare (3 secunde la 95°C) și aliniere/extindere (30 secunde la 60°C). Amplificarea a fost urmată cu analiza de disociere. Condițiile curbei de disociere: 15 secunde la 95°C , 1 minut la 60°C , 15 secunde la 95°C . Eficiența reacției s-a calculat prin formula $E = -1 + 10^{(-1/\text{pantă})}$, unde E – eficiența teoretică, pantă – panta curbei-standard descrisă de valorile C_q pe axa y și $\log(\text{cantitate})$ pe axa x.

Analiza statistică. Mediile au fost comparate prin testul Student la $p<.01$. Normalitatea distribuției a fost evaluată prin testul Shapiro-Wilk la $p<.01$. Abaterea standard a fost calculată conform formulei $\sigma = \sqrt{(\sum(x-m) (x - m)^2 / n)}$, unde m – media aritmetică, n – numărul de observații.

Analiza calității amplificării. Evaluarea reacției qPCR s-a efectuat în baza analizei curbelor de amplificare și disociere (Fig.3). Curba de amplificare prezintă dependența valorilor fluorescenței relative (RFU) de numărul de cicluri PCR. Acumularea signalului fluorescent determină reacția pozitivă. Lipsa ADN-lui de interes în mix de reacție rezultă în faptul că valorile RFU nu depășesc valorile de fundal iar graficul prezintă o linie dreaptă. În baza curbei de disociere au fost analizate proprietățile disociative ale ampliconului și determinată temperatura la care ADN-ul mono-catenar reasociază cu catena complementară și revine la forma sa dublu-catenară. Analiza curbei de disociere a dat informația despre cantitatea, lungimea și structura ampliconului obținut. Pe curba de amplificare se observă creșterea exponențială rapidă a valorilor fluorescenței relative, ceea ce indică cantități semnificative ale genei de interes în mostre. Graficul de disociere a ampliconilor generați de perechea fcbt2-fcbt3 arată un singur vârf clar definit cu un punct de topire de 77°C, ceea ce indică omogenitatea fragmentului amplificat și specificitatea perechii de primeri testate. Lipsa artefactelor pe graficul de disociere vorbește despre omogenitatea ampliconului sintetizat în urma reacției PCR și specificității primerilor utilizați

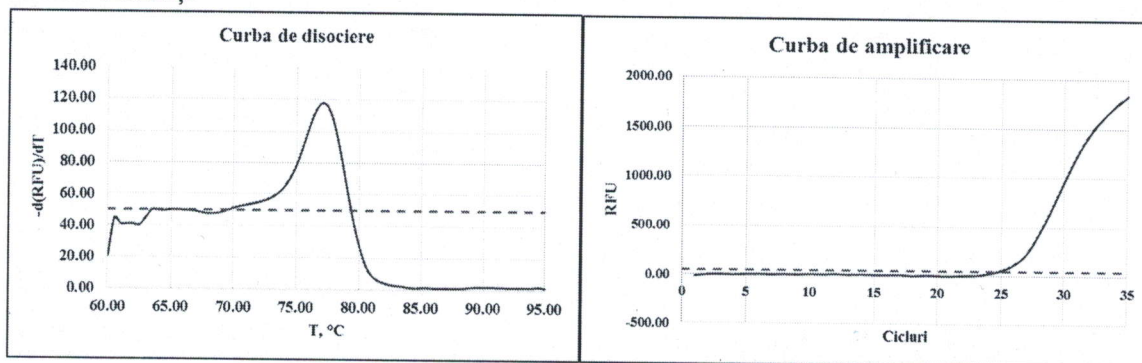


Fig.3. Curbele de disociere și amplificare pentru primerii fcbt2-fcbt3 (linia intermitentă – valorile de prag ale fluorescenței)

Eficiența medie calculată pentru reacția de amplificare cu perechea fcbt2-fcbt3 a constat 99.31 ± 0.57 .

Efectul substanțelor testate asupra creșterii plantelor de tomate. Pentru mai multe substanțe s-a constatat efect stimulatoriu asupra creșterii rădăcinii și tulpinii plantelor de tomate crescute în condiții aseptice în comparație cu apă (Tabelul 1). În mai multe cazuri micșorarea concentrației a substanței de interes a indus efectul stimulatoriu mai accentuat (cu excepția compușilor MF5, MF8). MF1 în concentrația de 0.01% și MF10 de 0.1% au manifestat efect inhibitor asupra creșterea plantelor. Efectul stimulatoriu a chitosanului fungic a fost mai semnificat în comparație cu chitosanul sintetic (ultimul s-a manifestat ca stimulator asupra creșterii doar diluat cu apă în raport 1:1). Nu s-a observat sinergie dintre substanța de interes și chitosan. Se observă, că unele substanțe stimulează selectiv creșterea rădăcinii comparativ cu tulpina.

Analiza plantelor din grupul II a evidențiat că efectul stimulatoriu ale substanțelor testate se manifestă mai pronunțat la plante cultivate în condiții de stres biotic (plante infectate). Lungimile medii ale rădăcinilor sunt în mai multe cazuri semnificativ mai mari la plantele tratate atât în comparație cu martor-apă, cât și valorile respective din grupul I. În primul rând tratarea semințelor înainte de cultivare cu substanțele de interes a afectat semnificativ creșterea rădăcinii. Pentru compusul MF10 s-a observat potențială sinergie dintre substanța de interes și chitosan ca stimulatori de creștere. Aceeași sinergie cu chitosan se observă și pentru MF2, însă concluzionarea veridică necesită teste repetate cu un eșantion de plante mai mare.

Tabelul 1.

Lungimile rădăcinilor și tulpinilor, raportul lungimii rădăcinii la lungimea tulpinii la plantele de tomate crescute în sol infectat din semințe pre-tratate

Formularea	Rădăcină	Tulpină	Rădăcină/tulpină
Martor I(H ₂ O)	24.83±29.61	18.33±12.48	1.55±1.45
Martor II (fitosporină)	24.75±24.75	21.50±7.50	1.23±0.98
Martor III (Topaz)	88.44±56.41	17.11±6.23	5.45±4.47
<i>MF1, 0.01%</i>	<i>147.33±27.21</i>	<i>17.67±0.58</i>	<i>8.36±1.71</i>
<i>MF2, 0.1%</i>	<i>53.50±62.93</i>	<i>12.00±7.07</i>	<i>3.53±3.17</i>
MF2, 0.01%	119.43±19.48 *I	25.86±3.93	4.71±0.99 *I
MF3, 0.01%	121.33±44.41 *I, II	27.17±5.38 *III	4.45±1.37 *I, II
<i>MF4, 0.1%</i>	<i>88.33±50.08</i>	<i>19.33±1.15</i>	<i>4.49±2.40</i>
MF4, 0.01%	106.50±69.62 *I, II	19.60±4.56	5.31±3.25 *I, II
MF5, 0.01%	56.29±16.29 *II	26.29±2.29 *III	2.12±0.47
<i>MF6, 0.1%</i>	<i>49.50±50.20</i>	<i>24.50±3.54</i>	<i>1.89±1.78</i>
MF6, 0.01%	124.00±60.30	22.20±1.79	5.60±2.86
<i>MF7, 0.1%</i>	<i>87.75±38.69</i>	<i>16.75±3.95</i>	<i>5.77±3.73</i>
MF7, 0.01%	64.63±55.00	17.25±4.53	3.73±3.61
MF8, 0.1%	95.58±44.90 *I, II	22.33±3.95	4.14±1.73 *I, II
MF8, 0.01%	108.69±58.31 *I, II	20.69±5.97	5.10±2.01 *I, II
MF10, 0.01%	124.80±58.76 *I, II	18.50±3.69	6.66±2.98 *I, II
MF1:chitosan:H ₂ O	64.33±37.50	17.83±4.49	3.36±1.59 *II
MF2:chitosan:H ₂ O	95.80±16.22 *I, II	26.80±3.90 *III	3.57±0.32 *I, II
MF3:chitosan:H ₂ O	97.44±52.34 *I, II	22.89±8.34	3.96±1.98 *II
MF4:chitosan:H ₂ O	78.00±35.44 *I, II	16.92±5.82	4.63±1.82 *I, II
MF10:chitosan:H ₂ O	148.20±81.88 *I, II	20.60±3.65	7.70±5.64 *II
chitosan fungic	17.46±10.86 *III	17.77±7.18	1.06±0.90 *III
chitosan sintetic	137.14±72.80 *I, II	20.29±4.42	6.54±2.51 *I, II
chitosan sintetic+H ₂ O, 1:1	115.64±59.27 *I, II	23.36±8.28	4.72±1.09 *I, II
EPS 1:5:4	109.00±27.29 *I, II	17.00±2.07	6.49±1.80 *I, II
MF+EPS 877, 0.01%	107.78±56.02 *I, II	18.33±4.06 *III	6.01±3.34 *I, II

*-diferență semnificativă față de martor la $p<.01$: I – apă, II – fitosporină, III – Topaz).

Cu italic sunt evidențiate grupurile experimentale cu numărul de plante prea mic pentru analiza statistică veridică

Activitatea fungică ale substanțelor testate asupra Fusarium spp. Efectul tratării semințelor asupra rezistenței la *Fusarium* s-a analizat prin compararea valorilor Cq obținute pentru fiecare probă în urma reacției qPCR. Cq (sau ciclul de prag) reprezintă ciclul după care valorile fluorescenței detectate de către sistemul optic depășesc valorile de prag ale fluorescenței. Mărimea dată este invers proporțională cantității secvenței-țintă în probă. Astfel, cu pe Fig. 5 se observă, că în mostrele de ADN extras din plante pre-tratate cu substanțe testate cantitatea ADN-lui fungic a fost nesemnificativă comparativ cu martor-apă. Se poate deduce că substanțele MF4, MF8, MF10 în concentrațiile indicate și chitosanul fungic manifestă proprietăți fungicide contra *Fusarium* la nivel de Topaz și Fitosporină (nu s-a observat diferență statistic semnificativă la la $p<.01$).

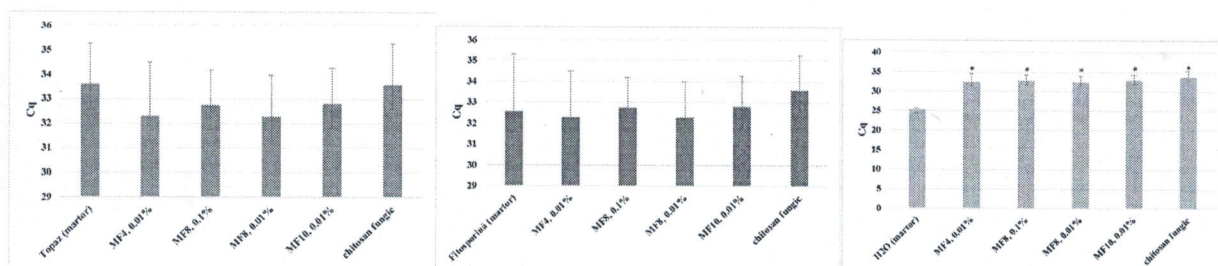


Fig.5. Valorile Cq medii în probele experimentale și martor (*-diferență semnificativă față de martor la $p < 0.01$)

Activitatea antimicrobiană a fost, de asemenea, evaluată *in vitro* prin metoda diluții succesive duble pe 4 tulpini de bacterii (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora*, *Xantomonas campestris*) și 2 tulpini de fungi (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*). Chitosan 3% (H₂O solvent) a prezentat proprietăți antibacteriene în concentrația 0,7%, iar antifungice în concentrația 0,7% pentru *Saccharomyces cerevisiae* și de 0,35% pentru *Candida albicans*. Preparatul: MF2 (2,5% în EtOH 96%) prezintă proprietăți antibacteriene în concentrația 0,15%, iar antifungice în concentrația 0,07%. Preparatul: MF4 (2,5% în EtOH 96%) prezintă proprietăți antibacteriene în concentrația 0,15%, iar antifungice în concentrația 0,15% pentru *Saccharomyces cerevisiae* și de 0,07% pentru *Candida albicans*. Preparatul: MF5 (2,5% în EtOH 96%) prezintă proprietăți antibacteriene și antifungice în concentrația 0,06%. Preparatul: MF6 (2,5% în EtOH 96%) prezintă proprietăți antibacteriene și antifungice în concentrația 0,07%.

Diferența dintre concentrațiile preparațiilor care efectiv au inhibat propagarea fungilor în testele *in vitro* și *in vivo* poate fi explicată prin acțiunea factorilor adiționali în sistemul patogen-plantă. În cazul testelor pe plante cultivate în condiții controlate, trebuie luate în considerare starea fitosanitară a semințelor de tomate (semințe au fost dezinfectate), barierele mecanice ale gazdei, reacția plantei la pătrunderea patogenului în țesuturi. Astfel, substanțele testate activează în ansamblu cu sistemul imunitar al gazdei, ceea ce poate micșora concentrația cu activitate antifungică ale acestora

6. Diseminarea rezultatelor la foruri științifice (obligatoriu)

A fost prezentată 1 prezentarea de poster la conferința științifică națională cu participare internațională „Al X-lea congres al farmaciștilor din Republica Moldova cu participare internațională, 22 noiembrie 2024, Chișinău, Moldova”.

7. Impactul științific, social și/sau economic al rezultatelor științifice obținute în cadrul proiectului (obligatoriu)

Impact științific

Proiectul a generat cunoștințe noi privind efectele substanțelor bioactive asupra plantelor de tomate și asupra fungilor patogeni. Studiile au demonstrat că patru compuși, care anterior s-au dovedit eficienți împotriva fungilor ce afectează grâul, au fost testați și au prezentat rezultate promițătoare împotriva fungilor ce atacă tomate. Au fost sintetizați șase compuși noi, care au arătat activitate biologică semnificativă împotriva *Fusarium spp.*, comparabilă cu preparatele comerciale Topaz și Fitosporină, ceea ce oferă perspective pentru utilizarea lor ca tratamente alternative în agricultură. A fost descoperit efectul stimulator al creșterii rădăcinilor și tulpinilor de tomate, atât în condiții aseptice, cât și în condiții de stres biotic,

sugerând un potențial aplicabil în agricultură. Sinteza substanțelor noi și utilizarea chitosanului fungic și sintetic au oferit o bază solidă pentru cercetări viitoare asupra relației structură-activitate. Dezvoltarea și utilizarea metodelor avansate de analiză (qPCR, spectrofotometrie) au contribuit la validarea rezultatelor și la îmbunătățirea tehnicilor de evaluare a bioactivității.

Impact social

Proiectul are un impact direct asupra sănătății plantelor, contribuind la reducerea pierderilor agricole cauzate de infecțiile fungice. Beneficiile sociale includ creșterea productivității culturilor de tomate, una dintre cele mai importante culturi horticoale; reducerea utilizării fungicidelor sintetice în favoarea unor alternative ecologice și mai puțin toxice, ceea ce sprijină sustenabilitatea agriculturii; dezvoltarea de soluții care să protejeze micii fermieri de pierderi economice semnificative prin aplicarea unor tratamente preventive eficiente.

Impact economic

Rezultatele proiectului pot oferi oportunități semnificative pentru aplicarea practică și dezvoltarea unor produse comerciale inovatoare. Producerea formulărilor bioactive poate înlocui fungicidele convenționale scumpe și potențial dăunătoare. Promovarea utilizării chitosanului natural în formulări fungicide și de stimulare a creșterii plantelor poate sprijini dezvoltarea agriculturii bioorganice. Rezultatele proiectului pot crea o platformă tehnologică pentru dezvoltarea și comercializarea compușilor bioactivi, atrăgând investiții în sectorul agrochimic. Aplicarea soluțiilor propuse poate contribui la reducerea pierderilor economice cauzate de *Fusarium spp.*, o problemă gravă în agricultură.

8. Colaborare la nivel național în cadrul implementării proiectului (opțional)

Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor – Grajdieru Kristina, membru echipei proiectului, este responsabilă de testarea activității antivirale a compușilor sintetizați in vitro și in vivo.

9. Colaborare la nivel internațional în cadrul implementării proiectului (opțional)

Universitatea „Al. I. Cuza” din Iași, România – înregistrarea spectrelor RMN

10. Dificultățile în realizarea proiectului: financiare, organizatorice, legate de resursele umane etc. (opțional)

În urma implementării proiectului au apărut dificultăți semnificative. Prima dificultate a fost legată de procurarea reagenților din cauza problemelor cu achizițiile publice. Până în luna decembrie, reactivii necesari pentru realizarea sintezelor planificate nu au fost recepționați. Au fost utilizate stocurile vechi de reactivi, ceea ce a condus la sinteza unor cantități mici de substanțe. Pentru testările ulterioare în condiții de teren, va fi necesar să se aloce din nou timp și resurse umane pentru repetarea sintezelor. În plus, aceasta a limitat semnificativ posibilitățile de variație a substanțelor sintetizate. Mai mult, din cauza lipsei unui reactiv necesar pentru testele biologice, analizele cantitative ale ADN au fost efectuate doar pentru 6 probe din 33. Acest lucru nu permite formularea unei concluzii finale și încheierea completă a cercetărilor. Probele ADN sunt conservate și vor fi analizate imediat după livrarea reactivului.

A doua dificultate a constat în defectarea, în cadrul Institutului de Chimie, a unui aparat foarte important pentru chimiștii organici – spectrometrul RMN, esențial pentru determinarea sau confirmarea structurii compușilor, precum și pentru descrierea caracteristicilor acestora. Problema a fost soluționată pentru compușii noi sintetizați prin trimiterea probelor la Iași pentru analiză sau prin identificarea compușilor deja cunoscuți prin măsurarea punctului de topire.

11. Recomandări, propuneri (opțional).

- Investigarea altor concentrații de substanță activă în formulările preparative prin reducerea acestora până la valori critice limită, pentru a identifica cea mai mică concentrație activă.
- Se recomandă realizarea unor studii suplimentare care să înlocuiască chitosanul cu β -ciclodextrina, ceea ce nu a fost prevăzut în obiectivele proiectului, dar ar putea avea un efect pozitiv.

Conducătorul de proiect  / Natalia SUCMAN

Data: 5.12.2024

L.S.



**Lista lucrărilor științifice, științifico-metodice și didactice
publicate în anul 2024 în cadrul proiectului**

“Dezvoltarea formulărilor contra fitopatogenilor tomatelor pe baza substanțelor naturale
autohtone și a derivaților lor”

7. Teze ale conferințelor științifice

7.3. în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională

SUCMAN, N., POGREBNOI, V., POGREBNOI, S., COJOCARI, S., GRAJDIERU, K., LUPASCU, L., MACAEV. F. Sinteza și caracterizarea derivaților de triazol cu proprietăți fungicide pentru aplicații în medicină și agricultură. În: Al X-lea congres al farmaciștilor din Republica Moldova cu participare internațională, 22 noiembrie 2024, Rezumate (in pres)

Rezumatul activității și a rezultatelor obținute în proiect în anul 2024**Pentru anul 2024**

Scopul principal al etapei proiectului din anul 2024 a fost dezvoltarea formulărilor bioactive cu proprietăți fungicide și imunostimulatoare pentru utilizare în agricultură, concentrându-se pe protecția tomatelor împotriva bolilor. Obiectivele specifice au inclus sinteza compușilor triazolici și spiro[ciclopropan-oxindolilor], obținerea chitosanului din surse naturale, elaborarea formulărilor cu compoziții diferite și studierea proprietăților fungicide și stimulatorii de creștere ale substanțelor testate.

Pentru obținerea chitosanului, s-au utilizat surse naturale precum ciupercile champignon și albinele moarte. De asemenea, a fost pregătită o soluție de chitosan sintetic pentru comparație. Procesul a implicat condiții specifice de hidroliză în prezența acidului clorhidric.

În vederea obținerii compușilor țintă cu activitate fungică, au fost sintetizate șase substanțe noi din seria triazolilor, caracterizate fizico-chimic, alături de alte patru substanțe din seria spiro[ciclopropan-oxindolilor] cu potențial antiviral. Încă patru substanțe triazolice, cu proprietăți fungicide brevetate, au fost preluate din fondul laboratorului pentru efectuarea cercetărilor biologice pe tomate.

Au fost elaborate 30 de formulări preparative cu diferite concentrații și compoziții ale substanțelor active. Formulările au inclus soluții simple, amestecuri cu chitosan și agenți tensioactivi pentru stabilizare.

Testările biologice privind proprietățile fungicide au demonstrat că substanțele testate sunt eficiente împotriva *Fusarium spp.*, eficiența fiind comparabilă cu cea a preparatelor comerciale Topaz și Fitosporină. Activitatea a fost validată prin analiza qPCR a ADN-ului patogen.

Au fost studiate, de asemenea, efectele asupra creșterii tomatelor. S-a constatat că substanțele testate au avut un efect stimulator asupra rădăcinilor și tulpinilor, mai ales în condiții de stres biotic.

Dintre cele mai remarcabile rezultate obținute se numără: -patru substanțe, anterior brevetate pentru activitatea împotriva fungilor care afectează grâul, au demonstrat rezultate promițătoare împotriva fungilor care atacă tomatele; -noile substanțe sintetizate au arătat activitate biologică semnificativă, oferind perspective pentru utilizarea lor în tratamente agricole; -chitosanul natural și sintetic a avut efect fungicid și s-a dovedit util în formulările testate, inclusiv în combinație cu substanțele active; -testele *in vitro* au confirmat activitatea antimicrobiană a preparatelor împotriva mai multor specii de bacterii și fungi.

Impactul științific al proiectului constă în generarea de cunoștințe noi privind relația structură-activitate a compușilor bioactivi, contribuind la dezvoltarea unor metodologii avansate de sinteză și evaluare. Impactul social constă în reducerea potențială a pierderilor agricole prin utilizarea unor alternative ecologice la fungicidele convenționale, ceea ce sprijină sustenabilitatea. Formulările dezvoltate oferă oportunități pentru producerea unor produse comerciale inovatoare, reducând costurile tratamentelor și pierderile cauzate de patogeni.

Printre dificultățile întâmpinate s-au numărat întârzierea livrării reactivilor, care a limitat posibilitățile de variație a substanțelor sintetizate.

For the year 2024

The main objective of the 2024 stage of the project was to develop bioactive formulations with fungicidal and immunostimulatory properties for use in agriculture, focusing on protecting tomatoes from diseases. Specific objectives included the synthesis of triazolic and spiro[cyclopropan-oxindole] compounds, obtaining chitosan from natural sources, developing formulations with different compositions, and studying the fungicidal and growth-stimulating properties of the tested substances.

Natural sources such as champignon mushrooms and dead bees were used to obtain chitosan. Additionally, a synthetic chitosan solution was prepared for comparison. The process involved specific hydrolysis conditions in the presence of hydrochloric acid.

For the targeted synthesis of compounds with fungicidal activity, six new substances from the triazole series were synthesized and characterized using physico-chemical methods, along with four compounds from the spiro[cyclopropan-oxindole] series with antiviral potential. Four triazolic compounds with patented fungicidal properties were also sourced from the laboratory's stock for biological testing on tomatoes.

A total of 30 preparative formulations with varying concentrations and compositions of active substances were developed. These formulations included simple solutions, mixtures with chitosan, and solutions stabilized with surfactants.

Biological tests on fungicidal properties demonstrated that the tested substances were effective against *Fusarium spp.*, with efficiency comparable to commercial preparations such as Topaz and Fitosporin. The activity was validated through qPCR analysis of the pathogen DNA.

The effects on tomato growth were also studied. It was observed that the tested substances had a stimulatory effect on root and stem growth, particularly under biotic stress conditions.

Among the most notable results obtained were: -four previously patented substances for activity against wheat fungi showed promising results against tomato fungi; -the newly synthesized substances demonstrated significant biological activity, offering prospects for their use in agricultural treatments; -both natural and synthetic chitosan exhibited fungicidal effects and proved useful in the tested formulations, including combinations with active substances; -*in vitro* tests confirmed the antimicrobial activity of the preparations against several species of bacteria and fungi.

The scientific impact of the project lies in the generation of new knowledge about the structure-activity relationship of bioactive compounds, contributing to the development of advanced synthesis and evaluation methodologies. The social impact involves the potential reduction of agricultural losses through the use of eco-friendly alternatives to conventional fungicides, supporting sustainability. The developed formulations provide opportunities for producing innovative commercial products, reducing treatment costs and losses caused by pathogens.

Challenges encountered included delays in reagent delivery, which limited the variation possibilities of the synthesized substances.

Conducătorul de proiect  / Natalia SUCMAN

Data: 5.12.2024 LS



Executarea devizului de cheltuieli,
conform anexei nr. 2.3 din contractul de finanțare pentru anul 2024
Cifrul proiectului: 20.80012.5007.13TC

Cheltuieli, mii lei				
Denumirea	Cod		Anul de gestiune	
	Eco (k6)	Aprobat	Modificat +/-	Precizat
Servicii de cercetări științifice contractate	222930	110,25	-	110,25
Procurarea materialelor pentru scopuri didactice, științifice și alte scopuri	335110	43,75	-	43,75
Total		154,0		154,0

Conducătorul organizației Igor ȘAROV

Contabil șef Liliana COJOCARU

Conducătorul de proiect Natalia SUCMAN

Data: 9.12.2024

LȘ



Componența echipei conform contractului de finanțare 2024

Cifrul proiectului 20.80012.5007.13TC

Echipa proiectului conform contractului de finanțare (la semnarea contractului) pentru 2024						
Nr	Nume, prenume (conform contractului de finanțare)	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării	Data eliberării
1	Sucman Natalia	1983	Dr	0,25	15.07.2024	31.12.2024
2	Pogrebnoi Vsevolod	1987	Dr	0,5	15.07.2024	31.12.2024
3	Bilan Dmitri	1987	Dr	0,25	15.07.2024	31.12.2024
4	Cojocari Sergiu	1998	Ms	0,5	15.07.2024	31.12.2024
5	Grăjdinar Cristina	1990	Ms	0,25	15.07.2024	31.12.2024

Modificări în componența echipei pe parcursul anului 2024					
Nr	Nume, prenume	Anul nașterii	Titlul științific	Norma de muncă conform contractului	Data angajării
1.	-	-	-	-	-

Conducătorul organizației Igor ȘAROVContabil șef Liliana COJOCARUConducătorul de proiect Natalia SUCMAN

Data:

LȘ

