



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00927

(22) Data de depozit: 03.12.2012

(41) Data publicării cererii:
30.10.2013 BOPI nr. 10/2013

(71) Solicitant:
• MEDICA FARMIMPEX S.R.L.,
STR. FRASINULUI NR. 11, OTOPENI, IF,
RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR. 5,
BL. D 7, SC. E, ET. 2, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MORARU IONUȚ, STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• VELEA SANDA, STR. ZAMBILELOR NR. 6,
BL. 60, ET. 2, AP. 5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;

• MORARU HORIA,
STR. ARHITECT PETRE ANTONESCU
NR. 8, BL. 26, AP. 16, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;

• POPESCU MARIANA, STR. VALEA ROȘIE
NR. 6, BL. 62, SC. C, ET. 1, AP. 35,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE PENTRU TRATAMENTUL FAMILIILOR DE
ALBINE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție utilizată pentru tratamentul familiilor de albine. Compoziția conform invenției este realizată prin gelifierea a 20 g de amidon de porumb, reticulat cu 1,6 g acid citric dizolvat în 5 ml de apă sărăcită în deuteriu, într-un sistem dispers care conține, în 75 g apă sărăcită în deuteriu, 4 g tuf vulcanic zeolitic, 10 g eugenol, 2 g ulei esențial din flori de

Tagetes minuta, 2 g ulei esențial de frunze de *Thuja occidentalis*, 0,4 g de lecitină, și omogenizarea ulterioară a gelului inițial rezultat, cu 60 g soluție acid formic 85%.

Revendicări: 3



COMPOZIȚIE PENTRU TRATAMENTUL FAMILIILOR DE ALBINE

Prezenta invenție se referă la o compoziție pe bază de compuși naturali / naturali identici, acid formic și uleiuri esențiale, incluși într-un gel, care se aplică ca tratament al familiilor de albine, și din care, după plasare în stup, se evaporă în timp ingredientele active, acționând pentru limitarea populației unor agenți patogeni și a acarienilor paraziți.

Sunt cunoscute compoziții pe bază de compuși naturali / naturali identici, acid formic și/sau uleiuri esențiale, incluse în structuri gelificate, destinate tratamentului familiilor de albine împotriva unor agenți patogeni și a acarienilor paraziți, în special *Varroa destructor*. Aceste compoziții simplifică manipularea unor compuși iritanți, și corozivi în cazul acidului formic, și asigură dozarea optimă pentru o eficacitate ridicată, fără impurificarea mierii cu reziduuri peste pragul de percepție organoleptic.

Cererea de brevet CA 2237484 A1 revendică o compoziție care conține 60..80% acid formic și 20..40% compuși gelifianti, amidon, pectină sau gumă xantan. Compoziția mai poate conține eventual și 10...30% mentol și timol, compuși naturali identici cu cei regăsiți în uleiurile esențiale de mentă, respectiv cimbru, și este destinată tratamentului familiilor de albine împotriva acarienilor paraziți. Brevetul SUA 6037374 se referă la o compoziție care conține cel puțin 60% acid formic, care este inclus într-un gel de silice coloidală sau acid poliacrilic. Din aceste compoziții însă acidul formic se poate elibera, la temperaturi ridicate, în concentrații care pot fi toxice pentru albine și mai ales pentru mătci.

Brevetul EP0869714 (B1) descrie o compoziție cu eliberare controlată în care uleiurile esențiale (și/sau acizii organici) sunt incluse într-un hidrogel obținut prin reticularea unor agenți de îngroșare care formează geluri, ca acidul poliacrilic, carboximetilceluloza, alcoolul polivinilic, polizaharide hidrofile, etc. Exemplificările brevetului sunt realizate cu acid poliacrilic (Carbopol), care este reticulat cu trietanolamină. În hidrogelul rezultat în exemplele incluse în descrierea detaliată a brevetului sunt incluse diferite componente active, uleiuri esențiale, componente majore ale uleiurilor esențiale, precum timolul, natural identic obținut prin sinteză, acid formic și acid acetic. Din acest hidrogel ingredientele active se evaporă treptat, menținând o concentrație constantă de vapori în stup, sigură pentru albine chiar și atunci când crește temperatura.

Această compoziție cu eliberare controlată din hidrogel reticulat prezintă însă o serie de dezavantaje, legate de separarea parțială în timp a fazei apoase, mai ales în cazul în care nu este menținută la temperatură constantă și este supusă unor diferențe semnificative de temperatură. În plus, deși hidrogelul este exemplificat și pentru acizi organici, acetic și formic, revendicările brevetului se referă numai la timol. Acizii organici incluși într-un astfel de hidrogel ar interacționa cu trietanolamina și ar bloca în timp acțiunea acestora de reticulare a acidului poliactic și de formare a hidrogelului, favorizând efectul de separare în timp a componentei apoase.

Pentru a rezolva problema separării parțiale a fazei apoase în cazul compoziției descrise de brevetul EP0869714 (B1) propune utilizarea uleiurilor esențiale microîncapsulate sub formă de coacervate. Microîncapsularea se realizează în soluții apoase, cu folosirea unor emulgatori, exemplificați prin polisorbitat 20 (Tween 20), obținut prin deshidratarea sorbitolului și tratarea produșilor de deshidratare cu acid lauric și oxid de etilenă, iar stratul polimeric al coacervatelor prezentate în exemplele de realizare a invenției este format prin coagularea și reticularea proteinelor. Agarul este preferat în exemplele de realizare a invenției ca agent de îngroșare. Compoziția conține între 10 și 30% ulei esențial, între 1 și 10% polimer coacervat și între 0,2 și 5% surfactant neionic.

Brevetul se referă însă numai la încapsularea uleiurilor esențiale și nu revendică și acizi organici, acid formic și/sau acetic. Acești acizi ar interfera cu proteinele care formează coacervatele, destabilizându-le și determinând în timp separarea fazelor microemulsiei.

Compozițiile care includ acizi organici sunt compoziții solicitate de practică, întrucât au un preț mai mic decât cele care conțin numai uleiuri esențiale, iar aplicarea combinată, acizi organici uleiuri esențiale reduce semnificativ gradul de infestare și toxicitatea față de mătci (Amrine *et al.*, 2007, Int. J. Acar., 33:99-109). În plus acidul formic este activ și față de alți dăunători ai albinelor, cum sunt acarieni traheali, *Acarapis woodi* (Garza *et al.*, 1990, Am. Bee J., 130:801) și nosemoza (Underwood și Currie, 2009, J. Econ. Entomol. 102:1729-36).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție destinată tratării familiilor de albine, care să conțină ca ingrediente active atât uleiuri esențiale / componente majore ale uleiurilor esențiale, cât și acizi organici / acid formic, incluse în structuri gelificate, care să simplifice manipularea și din care

aceste ingrediente active să se elibereze treptat prin evaporare, la nivele sigure pentru albine chiar și atunci când crește temperatura, și care să fie stabilă în timp, fără a separa vreuna din fazele componente.

Această invenție are ca obiect furnizarea unei compoziții cu stabilitate ridicată la păstrare, în care acidul formic este inclus într-un gel de amidon reticulat cu acid citric, care conține zeoliți în suspensie și o emulsie de uleiuri esențiale, eugenol, ulei esențial din flori de *Tagetes minuta*, ulei esențial din frunze de *Thuja occidentalis*, și lecitină, în apă săracită în deuteriu,. Autorii au constatat că folosirea apei săracite în deuteriu ca mediu de dispersie pentru compoziția realizată crește semnificativ stabilitatea acesteia la păstrare, fără separarea fazei apoase.

Este un obiect derivat al acestei invenții de a furniza o compoziție de acid formic și uleiuri esențiale care să combată nu numai acarienii *Varroa destructor*, ci și alți patogeni și dăunători. Autorii au constatat că prin aplicarea compoziției propuse este redus semnificativ și atacul de *Ascosphaera apis* în familiile de albine tratate.

Ca atare într-un prim aspect invenția implică realizarea unei compoziții alcătuite din 160 g gel, realizată prin gelifierea 20 g de amidon de porumb, reticulat cu 1,6 g de acid citric dizolvat în 5 ml de apă săracită în deuteriu, într-un sistem dispers care conține, în 75 g apă săracită în deuteriu, 4 g tuf vulcanic zeolitic, 10 g eugenol, 2 g ulei esențial din flori de *Tagetes minuta*, 2 g ulei esențial de frunze de *Thuja occidentalis*, 0,4 g de lecitină, și omogenizarea ulterioară a gelului inițial rezultat, cu 60 g soluție acid formic 85%.

Intr-un aspect preferat al invenției apa săracită în deuteriu conține mai puțin 20 ppm deuteriu, lecitina este o lecitină modificată cu o balanță hidrofil – lipofilă mai mare de 8, iar tuful vulcanic zeolitic conține min. 71% clinoptilolit.

Compoziția conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- Stabilitate ridicată în timp, fără separarea fazei apoase, datorită acțiunii stabilizante a apei săracite în deuteriu, care formează legături de hidrogen mai puternice ca o consecință a ponderii mai reduse a moleculelor de apă cu un dipol mai mic în zona atomului de deuteriu;
- Acțiune de combatere a diferiților patogeni (*Nosema* spp., *Ascosphaera apis*) și dăunători (*Varroa destructor*, *Acarapis woodi*) ai albinelor;

- Efecte secundare limitate asupra albinelor, mătcii și puietului, datorită tendinței de reducere a porilor gelului de amidon reticulat cu acid citric sub efectul temperaturii și a amplificării efectului de absorbție a ingredientelor active în tuful vulcanic zeolitic.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a acestei invenții.

Exemplu 1. Se dizolvă 1,6 g de acid citric (anhidru, >99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SUA) în 2 ml apă săracită în deuteriu (apă superușoară SU1, >20 ppm deuteriu, Romag Prod SA, Drobeta Turnu-Severin, România), iar pH-ul soluției se ajustează la 3.5 cu soluție de hidroxid de sodiu 10M, obținută prin dizolvarea în apă superușoară a hidroxidului de sodiu BioXtra (>98%, Sigma-Aldrich). Soluția de acid citric se aduce la un volum final de 5 ml cu apă superușoară SU1 și se încorporează în 20 g de amidon de porumb (Merizet™, Tate and Lyle, Londra, Marea Britanie), care a fost adus în prealabil într-un balon cu fund plat gât rodat. Balonul se închide cu un refrigerent și se menține 24 ore la temperatura camerei, sub agitare cu agitator magnetic, la 10 rpm. După 24 ore se scoate refrigerentul și peste amidonul reticulat parțial cu acid citric din balonul cu gât rodat se adaugă 75 g de apă superușoară, 4 g tuf vulcanic zeolitic (min. 71% clinoptilolit, Clinolit Srl, Rupea, Romania) 10 g eugenol (4-alil-2-methoxifenol, Merck Millipore, Darmstadt, Germania), 2 g ulei esențial din flori de *Tagetes minuta*, 2 g ulei esențial de frunze de *Thuja occidentalis*, 0,4 g de lecitină modificată cu o balanță hidrofil - lipofilă HLB mai mare de 8 (Thermolec® WFC, Archer Daniels Midland, Decatur, IL, SUA). Se închide cu refrigerent și se gelifiază prin încălzire și agitare continuă, la 10 rpm timp de 60 min. Se răcește la temperatura camerei, obținându-se 100 g gel consistent. În acest gel consistent se omogenizează 60 g soluție de acid formic 85% (Kemira, Helsinki, Finlanda), obținându-se un gel consistent, care poate fi turnat în tăvi din material plastic.

Uleiul esențial din flori de *Tagetes minuta* și uleiul esențial de frunze de *Thuja occidentalis* s-au obținut prin extragerea materialului vegetal uscat la Soxlet cu n-hexan, uscare cu sulfat de sodiu anhidru și evaporarea solventului.

Produsul a fost experimentat în toamna anului 2012, la sfârșitul lunii septembrie, într-o perioadă în care temperatura medie din timpul zilei a variat între 16,8 și 23,5°C. Experimentul a fost realizat în cadrul unei singure stupine, aparținând unuia dintre autori, și a inclus următoarele variante experimentale: V₁ – martor netratat; V₂ – tratament cu un produs etalon pe bază de timol aplicat prin

vaporizare (Apiguard[®], 2 tăvițe a 50 g gel, 12,5 g timol per tăviță, deasupra ramelor, sub podișor); V₃ – tratament cu 102 g soluție acid formic 50%, absorbită în fâșii de tifon, care apoi au fost amplasate vertical între ramele stupului; V₄ - produs conform exemplului de realizare a invenției, aplicat prin vaporizare, după divizarea egală a celor 160 g în 2 tăvițe, fiecare cu suprafața 80 cm² în care se depun uniform câte 80 g gel, și amplasarea tăvițelor deasupra ramelor, sub podișor. Fiecare variantă experimentală a inclus patru repetiții, fiecare repetiție incluzând câte 3 stupi, fiecare stup având 15.000 albine; randomizarea celor patru variante în patru repetiții a fost făcută în pătrat latin.

Înainte de aplicarea tratamentelor s-au prelevat câte 300 de albine din câte trei rame pe care s-a determinat gradul de infestare prin utilizare metodei propuse de De Jong et al., 1982, Apidologie 13: 297-303. Pentru diagnosticarea prezenței *Varroa* pe puiet au fost inspectate, prin deschidere, câte 100 celule de puiet de lucrătoare din fiecare stup. Pe baza rezultatelor coloniile au fost împărțite în trei categorii de infestare cu *Varroa*, scăzut, mediu, ridicat, iar fiecare repetiție a inclus câte o colonie din fiecare categorie de infestare. La sfârșitul perioadei de experimentare de 4 săptămâni s-a procedat din nou la o estimare a infestării cu acarieni din stupii folosiți în experiment, prin prelevarea a câte 300 albine per colonie și a câte 100 de larve. Eficacitatea fiecărui tratament a fost calculată prin folosirea formulei Henderson - Tilton (Henderson și Tilton, 1955, J. Econ. Entomol. 48:157-161):

$$\text{Eficacitatea \%} = \left(1 - \frac{\text{Acarieni netratat înainte trat.} \times \text{acarieni variantă după trat.}}{\text{Acarieni netratat după trat.} \times \text{acarieni variantă înainte trat.}} \right) * 100$$

Monitorizarea evoluției ascosferozei s-a realizat prin determinarea mediei însumate săptămânal a numărului zilnic de larve moarte (puiet văros, simptom infecție *Ascospaera apis*) scoase la urdiniș. Datele obținute în cadrul experimentului s-au prelucrat prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos. Aceste rezultate demonstrează o eficacitate bună a produsului realizat conform invenției față de *Varroa destructor*, care este peste nivelul produsului comercial folosit ca referință, și care este statistic semnificativ superioară acidului formic, administrat în doză similară, fără uleiuri esențiale.

Tab. 1. Eficacitatea produsului conform invenției, aplicat concomitent ca stropire a emulsiei care acționează prin vaporizare și ca supliment în hrana albinelor a emulsiei care stimulează albinele*.

Tratament	Eficacitate anti-Varroa (%)	Puiet văros (nr. mediu larve pe săptămână)
V ₁ martor netratat	-	412d
V ₂ Apiguard®, 2 tăvițe a 50 g gel, 12,5 g timol per tăviță	73,61ab	148e
V ₃ 102 g soluție acid formic 50%, absorbită în fâșii de tifon, amplasate vertical între ramele stupului	64,52a	181de
V ₄ - tratament conform ex. 3 de realizare a invenției	78,42b	82f

*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05

**media lunară per variantă a lunii de cules la floarea-soarelui, care a urmat la 28 zile de la aplicarea tratamentului

Activitatea față de *Ascosphaera apis* este semnificativ mai mare în cazul produsului realizat conform invenției, numărul de larve mumificate cu simptome de infestare cu *Ascosphaera apis* („puiet văros”), scoase la urdiniș, fiind semnificativ mai mic la varianta tratată cu produs conform invenției, comparativ cu celelalte tratamente, în condițiile experimentale date. Nu s-au constatat efecte secundare asupra familiilor de albine sau asupra mătcilor.

REVENDICARI

1. Compoziție destinată tratării familiilor de albine caracterizată prin aceea că este alcătuită din 160 g gel și este realizată prin gelifierea 20 g de amidon de porumb, reticulat cu 1,6 g de acid citric dizolvat în 5 ml de apă săracită în deuteriu, într-un sistem dispers care conține, în 75 g apă săracită în deuteriu, 4 g tuf vulcanic zeolitic, 10 g eugenol, 2 g ulei esențial din flori de *Tagetes minuta*, 2 g ulei esențial de frunze de *Thuja occidentalis*, 0,4 g de lecitină, și omogenizarea ulterioară a gelului inițial rezultat, cu 60 g soluție acid formic 85%.
2. Compoziție conform revendicării 1 caracterizată prin aceea că apa săracită în deuteriu conține mai puțin 20 ppm deuteriu, lecitina este o lecitină modificată cu o balanță hidrofil – lipofilă mai mare de 8, iar tuful vulcanic zeolitic conține min. 71% clinoptilolit.
3. Compoziție conform revendicării 1 caracterizată prin aceea că se aplică aplicat prin vaporizare, după divizarea egală a celor 160 g în 2 tăvițe, fiecare cu suprafața 80 cm² în care se depun uniform câte 80 g gel, și amplasarea tăvițelor deasupra ramelor, sub podișor.