



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00645

(22) Data de depozit: 26/10/2021

(41) Data publicării cererii:
30/03/2022 BOPI nr. 3/2022

(71) Solicitant:

• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE, BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• HOFIGAL EXPORT - IMPORT S.A.,
INTRAREA SERELOR NR.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

• GASPĂR-PINTILIESCU ALEXANDRA,
ȘOS. COLENTINA, NR.55, BLOC.83, SC.1,
AP.17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• CRĂCIUNESCU OANA, BD.NICOLAE
GRIGORESCU NR.33, BL.A 1, SC.3, AP.33,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;

• ȘTEFAN LAURA MIHAELA,
STR. DEALUL ȚUGULEA NR. 54, BL. B9,
SC. A, AP. 26, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• MIHAI ELENA, ALEEA FIZICIENILOR,
NR.8, BL.3D, SC.2, ET.3, AP.73, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CIUCAN TEODORA CRISTINA,
ALEEA CIUCEA, NR.1, BL.P19BIS, SC.1,
PARTER, AP.2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• POPESCU ADRIANA FLORINA, NR.139,
SAT COCORASTII GRIND, COCORASTII
COLT, PH, RO;
• LUNTRARU CRISTINA MIHAELA,
STR.GRIGORE C.MOISIL NR.6, BL.10, SC.2,
ET.7, AP.91, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;
• POPESCU MARIANA, STR.VIIOR II NR.5,
PANTELIMON, IF, RO

(54) COMPOZIȚIE NATURALĂ CU PROPRIETĂȚI BIOPESTICIDE
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție naturală cu proprietăți biopesticide destinată protecției plantelor și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția, conform invenției, este constituită în părți în greutate din 0,15...1,5 părți amestec liofilizat de hidrosoli din plante aromatice de tip salvie:rozmarin:lavandă în raport 2:2:1...5:4:2, 0,01...0,06 părți amestec de uleiuri esențiale de salvie, rozmarin și lavandă, în rapoarte egale, 0,01...0,025 părți agent de neutralizare, 0,2...1, surfactant și apă, până la 100 părți. Procedul, conform invenției constă în etapele:

(a) extracția hidrosolilor din plantele aromatice și colectarea separată a hidrosolilor și a uleiurilor esențiale,

(b) obținerea compoziției prin uscarea prin liofilizare a amestecului de hidrosoli,

(c) dizolvarea amestecului liofilizat în apă ultrapură, adăugarea surfactantului și a amestecului de uleiuri esențiale, ajustarea pH la 6, 3...7,

(d) condiționarea compoziției finale sub formă de soluție omogenă, cu pH neutru și conținut de substanță uscată de 10 mg/ml.

Revendicări: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



COMPOZIȚIE NATURALĂ CU PROPRIETĂȚI BIOPESTICIDE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Alexandra Gaspar-Pintiliescu, Oana Crăciunescu, Laura Mihaela Ștefan, Elena Mihai,
Teodora Cristina Ciucan, Adriana Florina Popescu, Cristina Mihaela Luntraru, Mariana Popescu

Prezenta invenție se referă la o compoziție naturală cu proprietăți biopesticide pe bază de amestec optimizat de hidrosoli obținuți din plante aromatice, cu adaos minim de uleiuri esențiale, având proprietăți antioxidante și neurotoxice, destinată protecției plantelor împotriva insectelor dăunătoare într-un mod ecologic, prietenos cu mediul, precum și la un procedeu de obținere a acestei compoziții.

Se știe că pesticidele sintetice utilizate în agricultură sunt toxice, iar toxicitatea lor este remanentă în produsele agricole, sol, ape și, în general, în mediu. Astfel, o direcție recent dezvoltată pentru o agricultură ecologică și durabilă recomandă utilizarea biopesticidelor, preparate în special din compuși biologic activi extrași din plante aromatice.

Sunt cunoscute diferite formulări de biopesticide pe bază de extracte de plante destinate tratamentului plantelor de cultură împotriva dăunătorilor. S-a arătat că, uleiurile esențiale au un efect toxic, repelent și de distrugere a ouălor dăunătorilor, astfel că pot fi o alternativă la pesticidele sintetice datorită toxicității scăzute și biodegradabilității rapide (**Isman M. B., *Industrial Crops and Products*, 2017, 110, 10-14**). Dezavantajul de a fi foarte volatile și insolubile în apă a condus la formularea acestora prin tehnici de încapsulare, emulsifiere, condiționare ca nanoparticule cu scopul eliberării controlate a compușilor bioactivi și a îmbunătățirii eficienței tratamentului. Astfel, uleiul esențial de *Achillea millefolium* încapsulat în nanoparticule de chitosan a prezentat o activitate acaricidă față de păianjenul roșu comun (*Tetranychus urticae*) în urma testării pe modele de laborator cu frunze de fasole (**Ahmadi Z. et al., *Journal of Pest Science*, 2018, 91, 837-848**).

S-a demonstrat că, pe lângă uleiurile esențiale, hidrosolii obținuți ca fracție hidrosolubilă reziduală în urma extracției acestor uleiuri au un conținut consistent de compuși metabolici secundari (polifenoli) și mai scăzut de compuși volatili (0,2-0,4 g/100 ml) și prezintă proprietăți antioxidante, antimicrobiene și pesticide, acționând împotriva dăunătorilor plantelor în cultură (**Degirmenci H. & Erkurt H., *Journal of Infection and Public Health*, 2020, 13, 58-67**; **Georgiev V. et al., *Molecules*, 2019, 24, 3355**; **Cid-Perez T. S. et al., *Plants*, 2019, 8, 22**). Astfel,

hidrosolii extrași din plante de măghiran (*Origanum majorana*), roiniță (*Melissa officinalis*) și busuiocul cerbilor (*Mentha pulegium*) au indus o mortalitate de 5-15% afidelor de *Myzus persicae* după o zi de la tratament (Petrakis E. A. et al., *Journal of Applied Entomology*, 2015, 139, 260-267). Testarea hidrosolilor de busuioc (*Ocimum basilicum*) și franjuri (*Ruta chalepensis*) într-un model experimental dezvoltat pe frunze de castravete a avut ca rezultat reducerea fecundității afidelor *Aphis gossypii* și acarienilor *Tetranychus urticae* și inducerea unei mortalități ridicate a acestora (46-64%) în comparație cu un pesticid sintetic (100%) (Traka C. K. et al., *Journal of Applied Entomology*, 2018, 142, 413-420). În cazul unei formule de extract metanolic concentrat de *Sophora alopecuroides* L. emulsificat în ulei de soia s-a raportat un efect repelent, în urma aplicării foliare, cu acțiune prelungită față de păduchii de plante citrice (psyllids) (Rizvi S. A. H. et al., *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26, 21871-21881).

Biopesticide formulate recent pe bază de ulei esențial de semințe de neem (*Azadirachta indica*), tămâiță (*Chenopodium ambrosioides*) și, respectiv, portocal și condiționate sub formă de concentrat emulsifiabil, dispersie uleioasă și, respectiv, lichid solubil au fost testate pe plante ornamentale în cultură (panseluțe, Hebe), în condiții controlate de seră și au demonstrat un control eficient al populației de afide *M. persicae*, care dezvoltă rezistență la insecticidele sintetice convenționale (Smith G. H. et al., *Crop Protection*, 2018, 110, 125-130). Totuși, este necesară dezvoltarea unor noi sisteme de pulverizare pentru a evita fitotoxicitatea uleiurilor esențiale și a îmbunătăți eficiența lor și raportul cost-calitate.

Brevetul RO 128885 B1/30.10.2017 descrie o compoziție de biopesticid conținând unul sau mai multe tipuri de uleiuri esențiale (rozmarin, mentă, cimbru, eucalipt, etc) încapsulate în particule lipidice de ulei vegetal hidrogenat și săruri de potasiu ale acizilor grași cu efect insecto-fungicid și erbicid. **Brevetul WO 2019/215617 A1/14.11.2019** se referă la o compoziție naturală, care include unul sau mai multe tipuri de hidrosoli (rozmarin, iarbă de lămâie, neem, pin, busuioc), preparați prin hidrodistilare cu vapori conform **brevetului US 2004/0178054**, asociați într-o matrice polimerică, prin aplicarea căreia se urmărește controlul populațiilor de dăunători la plantele în cultură.

Produsul denumit Neemex este comercializat ca insecticid ecologic sistemic obținut din extract de ulei esențial din semințe de neem (*Azadirachta indica*) și acționează asupra afidelor (*Aphis sambuci*, *Aphis pomi*), a gândacului de Colorado și a viermelui roșu al paiului (*Haplodiplozis marginala*) prin aplicare foliară, intervenind asupra metabolismului hormonului steroid juvenil (ecdisona) implicat în procesul de creștere și maturare sexuală, reducerea fertilității

și a numărului de ouă a dăunătorilor și cu efect repelent (stopează consumarea plantei de către dăunători).

Dezavantajul compozițiilor pe bază de compuși chimici de sinteză cu proprietăți pesticide este reprezentat de toxicitatea acestora pentru om și necesitatea de a respecta reguli stricte de ambalare, depozitare și transport. Un dezavantaj al uleiurilor esențiale este reprezentat de lipsa solubilității lor în apă, volatilitatea și biodegradarea rapidă (Pavela R., 2014, *Limitation of plant biopesticides. In: Advances in Plant Biopesticides, Springer, pp. 347-359*).

Problema tehnică pe care această invenție urmărește să o rezolve constă în furnizarea unei compoziții naturale cu proprietăți biopesticide destinată tratamentului insectelor dăunătoare din culturile de plante, care conține hidrosoli de plante aromatice obținuți ca produse secundare cu solubilitate mare în apă, amestecați în proporții optimizate prin analiză matematică de regresie lineară, cu adaos minim de uleiuri esențiale, pentru un efect antioxidant și neurotoxic maximizat. Un alt obiect al soluției tehnice se referă la un procedeu de obținere a compoziției naturale pentru protecția plantelor împotriva insectelor dăunătoare conținând hidrosoli în proporții optimizate pentru un efect neurotoxic maxim.

Compoziția naturală cu proprietăți biopesticide, conform invenției, este constituită din 0,5...1,5 părți amestec liofilizat de hidrosoli din plante aromatice, respectiv salvie:rozmarin:lavandă în proporții optimizate între 2:2:1...5:4:2 (g/g/g), cu un conținut total de polifenoli de minim 5%, 0,01...0,06 amestec în părți egale de uleiuri esențiale de salvie, rozmarin și lavandă, 0,01...0,025 părți agent de neutralizare ales dintre hidroxid de sodiu și hidroxid de potasiu, 0,2...1 părți surfactant, ales dintre Tween 20 și Tween 80, și apă până la 100 părți, părțile fiind exprimate în greutate.

Procedeu de obținere a compoziției naturale cu proprietăți biopesticide, conform invenției, constă din următoarele etape: **(a)** extracția hidrosolilor din părțile aeriene uscate și mărunțite de plante aromatice din fam. Lamiaceae (salvie, rozmarin, lavandă) prin hidrodistilare în raport de greutate plantă uscată:apă ultrapură de 1:15...1:30, prin antrenare cu vaporii sau reflux, la 95...100 °C, timp de 2...4 ore și colectarea separată a uleiurilor esențiale și a hidrosolilor; **(b)** uscarea prin liofilizare a unui amestec de hidrosoli de salvie:rozmarin:lavandă în proporții optimizate între 2:2:1...5:4:2 (g/g/g), cu proprietăți biopesticide maximizate, obținut prin agitarea și omogenizarea amestecului pe o plită magnetică la 100...250 rpm, la 25...35 °C, timp de 1...2 ore, repartizarea în plăci de sticlă, congelarea la -20 °C, liofilizarea între -35 °C și +30 °C, sub vid de 0,26 mbar, timp

de 48 de ore și ambalarea etanșă a pulberii rezultate; (c) prepararea compoziției naturale prin dizolvarea amestecului liofilizat de hidrosoli în apă ultrapură în raport de greutate 1:50...1:100, prin agitare pe o plită magnetică la turația de 100...200 rpm și temperatura de 25...35 °C, timp de 1...2 ore, adăugarea amestecului în părți egale de uleiuri esențiale, omogenizarea cu ajutorul unui stirrer manual la 8000 rpm, timp de 3 minute și apoi adăugarea în picătură, sub agitare de Tween cu rol de agent surfactant, se continuă agitarea microemulsiei obținute pe plita magnetică, la temperatura de 25...35 °C și turația de 100...200 rpm, timp de 1...2 ore și se verifică și ajustează pH-ul cu o soluție bazică de hidroxid cu rol de agent de neutralizare până la o valoare de 6,3...7,0; (d) condiționarea compoziției finale sub formă de soluție omogenă de culoare brună, cu miros plăcut specific, substanță uscată de 10 mg/ml și pH neutru, stocarea soluției în sticle închise la culoare și utilizarea acesteia prin pulverizare pe frunzele plantelor în cultură pentru protecția acestora împotriva insectelor dăunătoare (afide).

Compoziția naturală pentru protecția plantelor împotriva insectelor dăunătoare, obținută în conformitate cu prezenta invenție, are următoarele avantaje:

- este un produs natural dezvoltat ca alternativă la produsele pesticide sintetice comercializate și a celor din uleiuri esențiale, cu efect de blocare a capacității de creștere și reproducere a insectelor dăunătoare pentru plante în cultură;
- prezintă un risc redus de a dezvolta rezistența dăunătorilor la pesticide;
- este un produs organic, biodegradabil în mediu și nu induce citotoxicitatea plantelor destinate consumului;
- biopesticidul are caracter ecologic și prietenos cu mediul pentru protecția integrată a culturilor agricole, un management durabil al fertilității și ecologizării solului și asigură siguranța alimentară prin mărirea producției și lipsa toxicității produselor;
- procedeul de preparare a compoziției naturale pentru protecția plantelor împotriva insectelor dăunătoare este simplu, fezabil, valorifică produse secundare ale procesului de extracție a uleiurilor esențiale, nu necesită echipamente complexe și se realizează pe o durată redusă.

Hidrosolii extrași prin hidrodistilare din plante aromatice (familia Lamiaceae) prezintă un conținut semnificativ de compuși biologic activi, printre care compușii polifenolici și uleiurile volatile. Aceștia prezintă activitate antioxidantă prin catalizarea transformării speciilor reactive de oxigen în produși stabili, favorizând capacitatea de apărare a plantelor la stres oxidativ, la nivel celular și molecular. Speciile reactive de oxigen se formează, în mod natural, ca urmare a

activității metabolice a celulelor normale sau inflamate ca răspuns la factorii agresivi de mediu, cum sunt pesticidele, agenții poluanți, solvenții organici, radiațiile, fumatul (**Bhattacharyya A. et al., *Physiological Reviews*, 2014, 94(2), 329-354**). Mecanismul de acțiune al compușilor antioxidanți asupra speciilor reactive de oxigen se bazează pe transferul atomului de hidrogen (mecanism de tip HAT), transferul de electron (mecanism de tip SET) sau ambele tipuri de mecanisme HAT și SET prin care se neutralizează radicalii de tip hidroxil, superoxid, oxigen singlet, peroxid de hidrogen. Capacitatea antioxidantă este în directă corelație cu conținutul în compuși polifenolici, dar prezența compușilor volatili (monoterpene) le conferă hidrosolilor din plante aromatice un potențial antioxidant comparabil sau mai ridicat decât al agenților antioxidanți cunoscuți, cum sunt butilhidroxitoluenul (BHT) sau acidul ascorbic (vitamina C).

În plus, hidrosolii care conțin fracțiile apoase de substanțe volatile (monoterpene) sunt implicați în procese de stres neurotoxic (**Spochacz M. et al., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2018, 17(5), 1339-1366**). Astfel, cineolul prezent în cantitate mare în hidrosolul de rozmarin determină un efect de inhibare a enzimei acetilcolinesterază și citotoxicitate față de insecte (**Abdelgaleil S. A. M. et al., *Journal of Chemical Ecology*, 2009, 35, 518-525**). Unii compuși polifenolici, cum sunt izoflavona rotenonă din planta *Derris elliptica* și azadirachtin din uleiul de neem, pot acționa ca bioinsecticide datorită toxicității și activității de respingere a dăunătorilor din culturile de plante (**Hernandez-Carlos B. & Gamboa-Angulo M., *Molecules*, 2019, 24(5), 897**). Mecanismul de acțiune neurotoxică al unor compuși din hidrosoli se bazează pe inducerea de modificări hormonale, efect neurologic și dezechilibru al reacțiilor pro-oxidante/antioxidante, ceea ce determină perturbări în creșterea și reproducerea dăunătorilor, reducerea greutateii și modificarea comportamentului acestora și un efect repelent (**Petrakis E. A. et al., *Journal of Applied Entomology*, 2015, 139(4), 260-267**).

Stabilirea rapoartelor optime de amestecare a hidrosolilor din plante aromatice pentru obținerea unui potențial pesticid maxim, se realizează prin metoda regresiei liniare cu ajutorul softului Excel (**Avadhani K. S. et al., *Drug Delivery*, 2017, 24(1), 61-74**), aplicată unui număr de minim 10 concentrații ale fiecărui hidrosol pentru care se determină valorile experimentale de activitate antioxidantă și neurotoxică.

Surfactanții utilizați în studiul nostru, Tween 20 și Tween 80 acționează ca agenți tensioactivi pentru formarea unei singure faze continue și asigurarea unei stabilități termodinamice (**Traynor M. et al., *International Food Research Journal*, 2013, 20(5), 2173-2181**).

Prezenta propunere de invenție se evidențiază prin două exemple nelimitative de obținere a compoziției naturale pentru protecția plantelor împotriva dăunătorilor:

Exemplul 1.

Pentru a obține 1000 g compoziție naturală pentru protecția plantelor împotriva insectelor dăunătoare, se asociază 10 g amestec liofilizat de hidrosoli din salvie:rozmarin:lavandă în raport de greutate 2,5:4:1 (g/g/g), cu un conținut total de polifenoli de 15%, 0,6 g amestec de uleiuri volatile din salvie:rozmarin:lavandă în raport de greutate 1:1:1 (g/g/g), 0,2 g hidroxid de sodiu, 2,5 g Tween 20 și apă până la 1000 g.

Procedeeul de obținere a compoziției naturale cu activitate biopesticidă constă în mai multe etape. Într-o primă etapă, părțile aeriene ale plantelor aromatice de salvie, rozmarin și lavandă din cultură ecologică sunt uscate în condiții de temperatură și umiditate controlate, apoi se mărunțesc cu ajutorul unui blender electric și se supun hidrodistilării pentru extracția hidrosolilor și a uleiurilor esențiale într-un echipament de tip Clevenger. Într-un balon de distilare cu șlif cu o capacitate de 2 l se introduc 50 g material vegetal măcinat și umectat în apă ultrapură, peste care se pun apoi 1200 g apă și se încălzește balonul de distilare în cuib până la fierberea amestecului la o temperatură de 95...100 °C. Se menține o viteză de distilare moderată timp de 2 h, după care se spală refrigerentul cu ajutorul vaporilor timp de 30 de minute. Apoi, se procedează la colectarea separată a uleiului esențial din tubul gradat și a hidrosolului din balonul de distilare și stocarea acestora prin închidere în sticle de culoare brună și depozitare la 4 °C.

Apoi, se amestecă hidrosolii obținuți din cele 3 plante aromatice în urma hidrodistilării, în proporții optimizate pentru a obține proprietăți biopesticide maxime, prin adăugarea într-un pahar Erlenmeyer a 75 g hidrosol de salvie, 120 g hidrosol de rozmarin și 30 g hidrosol de lavandă, se agită pe o plită magnetică, la 200 rpm și temperatura de 25 °C. După o oră de omogenizare, se obține o soluție de culoare brună cu o valoare a pH-ului de aproximativ 5,4, care se repartizează în plăci de sticlă, se congelează la -20 °C, peste noapte și se liofilizează între -35 °C și +30 °C, sub vid de 0,26 mbar, timp de 48 h cu ajutorul unui echipament Martin Christ. Pulberea astfel rezultată se ambalează etanș în pungi de polietilenă și se depozitează în condiții de temperatură și umiditate controlate.

Separat, într-un pahar Berzelius, se dizolvă 1 g amestec liofilizat de hidrosoli de salvie:rozmarin:lavandă în proporție de greutate de 2,5:4:1, cu un conținut de polifenoli de 15%, prin adăugare de 50 ml apă ultrapură și se agită pe o plită magnetică, la 200 rpm și temperatură de 25 °C, timp de 1 oră. Se adaugă apoi, sub agitare, 0,6 g amestec de uleiuri esențiale de salvie,

rozmarin și lavandă, în părți egale, 2 g Tween 20, apoi paharul se ia de pe plită și se omogenizează cu un stirrer manual (Xenox, MHX/E), la 8000 rpm, timp de 3 min. Se continuă agitarea la temperatura camerei, timp de 2 h, se verifică pH-ul cu ajutorul unui pH-metru Consort și se ajustează la o valoare de 6,5 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 0,5 M și apoi, se completează cu apă ultrapură până la 1000 g.

Compoziția finală se prezintă sub forma unei soluții omogene de culoare brună, cu miros plăcut specific, substanță uscată de 10 mg/ml și pH neutru, care se stochează în sticle închise la culoare, la temperaturi cuprinse între 4-25 °C, timp de 3 luni. Preparatul se utilizează prin pulverizare pe frunzele plantelor în cultură la începutul sezonului vegetativ când agresivitatea dăunătorilor este mai mare, tratamentul repetându-se de câte ori este nevoie.

Exemplul 2.

Pentru a obține 1000 g compoziție naturală pentru protecția plantelor împotriva insectelor dăunătoare, se asociază 10 g amestec liofilizat de hidrosoli din salvie:rozmarin:lavandă în raport de greutate 5:2:1 (g/g/g), cu un conținut total de polifenoli de 25% cu 0,5 g amestec de uleiuri volatile din salvie, rozmarin și lavandă, în părți de greutate egale, 0,2 g hidroxid de potasiu, 2,5 g Tween 80 și apă ultrapură până la 1000 g.

Obținerea hidrosolilor din cele trei plante aromatice uscate și mărunțite s-a realizat conform procedurii prezentat în exemplul 1. Procedul de obținere a compoziției naturale diferă prin aceea că, la etapa de condiționare prin liofilizare se amestecă hidrosolii obținuți din cele 3 plante aromatice în urma hidrodistilării, în proporție de greutate de 5:2:1, prin adăugarea într-un pahar Erlenmeyer a 100 g hidrosol de salvie, 40 g hidrosol de rozmarin și 20 g hidrosol de lavandă, se agită pe o plită magnetică, la 200 rpm și temperatura de 25 °C. Apoi, se continuă conform exemplului 1.

Compoziția naturală pentru protecția plantelor împotriva insectelor dăunătoare, obținută conform exemplurilor de mai sus, a fost analizată din punct de vedere fizico-chimic, biochimic și biologic. Din punct de vedere fizico-chimic, s-a testat stabilitatea noilor compoziții prin determinări de pH, sedimentare și vâscozitate. La intervale de o lună de la preparare, s-a măsurat pH-ul cu ajutorul unui pH-metru Consort cu senzor de temperatură. O cantitate din compoziția naturală a fost transferată într-un cilindru gradat cu șlif închis cu dop rodat și a fost menținută la temperatura camerei. S-a urmărit stabilitatea produsului prin observarea și măsurarea stratului de

sedimentare format. S-au efectuat măsurători de vâscozitate cu ajutorul unui vâscozimetru capilar tip Ubbelohde prevăzut cu baie vâscozimetrică termostată VB-1423 (J.P. Selecta). Rezultatele au arătat că, după 3 luni de stocare la întuneric, la temperatura camerei, aceste compoziții finale preparate sub formă de soluții omogene nu au prezentat sedimentare, modificări ale valorii de pH și vâscozitate.

Din punct de vedere biochimic, s-a determinat activitatea antioxidantă și neurotoxică a compoziției naturale optimizate din hidrosoli de plante aromatice. Activitatea antioxidantă s-a determinat ca procent de inhibare a radicalilor liberi de DPPH generați într-un model experimental *in vitro* și măsurat pe baza diferenței de absorbante înregistrate pentru amestecul de reacție și proba control. Rezultatele calculate drept concentrația care inhibă 50% din radicalii liberi formați (IC50) au arătat că amestecul optimizat de hidrosoli a prezentat o valoare mai mică în comparație cu valorile IC50 ale hidrosolilor individuali, ceea ce demonstrează o activitate antioxidantă mai mare a amestecului de hidrosoli. S-a determinat activitatea pesticidă folosind un model experimental *in vitro* de evaluare a activității de inhibare a acetilcolinesterazei, care mimează efectul neurotoxic asupra insectelor dăunătoare (afide). Rezultatele au arătat că amestecul de hidrosoli optimizat a prezentat o activitate mai eficientă de inhibare a enzimei acetilcolinesterază, încă de la valori mici de concentrație, comparativ cu a hidrosolilor individuali. Aceste activități de neutralizare a radicalilor liberi și inhibare a enzimei acetilcolinesterază se datorează conținutului în polifenoli și fracțiilor apoase de substanțe volatile (monoterpene), compuși care conferă potențial pesticid față de insecte dăunătoare din culturi de plante.

Din punct de vedere biologic, s-a testat citotoxicitatea *in vitro* a plantelor tratate cu biopesticid și activitatea pesticidă *in vivo* a compoziției naturale obținute pe un model experimental dezvoltat în laborator. În vederea testării citotoxicității plantelor tratate cu biopesticid, compoziția naturală a fost pulverizată pe frunzele unei culturi de echinacea și după 3 zile de la tratament, probele de frunze au fost analizate pe o cultură de celule fibroblaste din linia NCTC clona L929 prin metoda contactului direct. Rezultatele au arătat că viabilitatea celulară a prezentat valori mai mari de 80%, ceea ce demonstrează lipsa citotoxicității plantelor de cultură tratate cu biopesticid. Pentru testarea activității pesticide, frunze cu afide au fost așezate pe hârtii de filtru într-o placă petri cu apă, au fost acoperite cu o pânză care să împiedice migrarea afidelor și au fost pulverizate cu biopesticid. După 7 zile de tratament, s-a determinat o valoare procentuală a mortalității afidelor de 42%.

REVENDICĂRI

1. Compoziție naturală cu proprietăți biopesticide pe bază de amestec de hidrosoli obținuți din plante aromatice și stabilă la păstrare, destinată protecției plantelor într-un mod ecologic, conform invenției, **caracterizată prin aceea că** este constituită din 0,5...1,5 părți amestec liofilizat de hidrosoli din plante aromatice, respectiv salvie:rozmarin:lavandă în proporții optimizate de 2:2:1...5:4:2 (g/g/g), cu un conținut total de polifenoli de minim 5%, 0,01...0,06 amestec în părți egale de uleiuri esențiale de salvie, rozmarin și lavandă, 0,01...0,025 părți agent de neutralizare ales dintre hidroxid de sodiu și hidroxid de potasiu, 0,2...1 părți surfactant, ales dintre Tween 20 și Tween 80, și apă până la 100 părți, părțile fiind exprimate în greutate.

2. Procedul de obținere a compoziției naturale cu proprietăți biopesticide, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** are la bază următoarele etape: (a) extracția hidrosolilor din părțile aeriene uscate și mărunțite de plante aromatice din fam. Lamiaceae (salvie, rozmarin, lavandă) prin hidrodistilare în raport de greutate plantă uscată:apă ultrapură de 1:15...1:30, prin antrenare cu vapori sau reflux, la 95...100 °C, timp de 2...4 ore și colectarea separată a uleiurilor esențiale și a hidrosolilor; (b) uscarea prin liofilizare a unui amestec de hidrosoli de salvie:rozmarin:lavandă în proporții optimizate între 2:2:1...5:4:2 (g/g/g), cu proprietăți biopesticide maxime, obținut prin agitarea și omogenizarea amestecului pe o plită magnetică la 100...250 rpm, la 25...35 °C, timp de 1...2 ore, repartizarea în plăci de sticlă, congelarea la -20 °C, liofilizarea între -35 °C și +30 °C, sub vid de 0,26 mbar, timp de 48 de ore și ambalarea etanșă a pulberii rezultate; (c) prepararea compoziției naturale prin dizolvarea unui amestec liofilizat de hidrosoli în apă ultrapură în raport de greutate 1:50...1:100, prin agitare pe o plită magnetică la turația de 100...200 rpm și temperatura de 25...35 °C, timp de 1...2 ore, adăugarea în picătură sub agitare de Tween cu rol de agent surfactant și a amestecului de uleiuri esențiale prin omogenizare cu ajutorul unui stirrer manual la 8000 rpm, timp de 3 minute, și apoi se continuă agitarea microemulsiei obținute pe plita magnetică, la temperatura de 25...35 °C și turația de 100...200 rpm, timp de 1...2 ore și se verifică și ajustează pH-ul cu o soluție bazică de hidroxid cu rol de agent de neutralizare până la o valoare de 6,3...7,0; (d) condiționarea compoziției finale sub formă de soluție omogenă de culoare brună, cu miros plăcut specific, substanță uscată de 10 mg/ml și pH neutru, stocarea soluției în sticle închise la culoare și utilizarea acesteia prin pulverizare pe frunzele plantelor în cultură pentru protecția acestora împotriva insectelor dăunătoare (afide).