



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01399

(22) Data de depozit: 15.12.2011

(41) Data publicării cererii:
30.08.2013 BOPI nr. 8/2013

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

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

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

• FRANGU OCTAVIAN, ȘOS. COLENTINA
NR. 2, BL. 3, SC. B, ET. 4, AP. 55,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• STEPAN EMIL, BD.TIMIȘOARA NR.49,
BL.CC6, SC.A, ET.3, AP.12, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• STÎLPEANU DANIELA LELIEANA,
BD. IULIU MANIU NR.56, BL.22A, SC.A,
ET.6, AP.24, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) COMPOZIȚIE PENTRU STIMULAREA POLENIZĂRII
CULTURILOR AGRICOLE, PROCEDU DE OBȚINERE A
ACESTEIA ȘI PROCEDU DE APLICARE ÎN CULTURILE
AGRICOLE

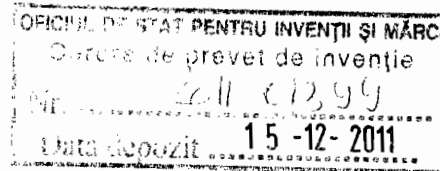
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție pentru stimularea polenizării culturilor agricole și la un procedeu pentru obținerea acesteia, cu utilizare pentru culturile agricole. Compoziția conform invenției cuprinde etil maltol, compus cu acțiune de stimulator al aromelor, și un amestec sintetic de esteri etilici și metilici ai acizilor grași, cu activitate similară cu a feromonului larvar ester. Procedul conform invenției constă din adăugarea etil maltolului la un amestec sintetic produs prin amestecarea esterilor etilici și metilici, rezultați din

transesterificarea uleiului de măsline și a uleiului de in, și prin transesterificarea acidului stearic de puritate tehnică, după care compoziția rezultată se amestecă cu o soluție din alginat de sodiu, metilceluloză și un emulgator, după care emulsia formată este gelifiată ionotropic cu o soluție de clorură de calciu, se diluează cu apă și se aplică prin stropire pe plantele de cultură.

Revendicări: 3





COMPOZIȚIE PENTRU STIMULAREA POLENIZARII CULTURILOR AGRICOLE, PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA SI PROCEDEU DE APLICARE IN CULTURILE AGRICOLE

Prezenta invenție se referă la o compoziție care atrage insectele polenizatoare, în special albine melifere, către florile plantelor cultivate și, în același timp, stimulează colectarea de polen și activitatea de polenizare a florilor de către albinele melifere atrase, ca și la un procedeu de obținere a respectivei compoziții, din materii prime naturale și de puritate tehnică, și la un procedeu de aplicare a compoziției în culturile agricole.

Sunt cunoscute mai multe compoziții cu acțiune de stimulare a polenizării culturilor agricole. Brevetul US 4075783 descrie o compoziție care este solubilă și dispersabilă în apă, care include zer, zahăr și agenți de umectare și de dispersare. Compoziția este aplicată prin stropire pe zonele agricole în timpul înmuguriturii culturilor agricole, iar, în acest fel, albinele sunt atrase și menținute în zonă suficient timp pentru a realiza numărul necesar de vizite pentru polenizare. Compoziția prezintă dezavantajul unei selectivități reduse, care generează o semnificativă variabilitate a rezultatelor după tratamentele aplicate culturilor agricole, inclusive o lipsă de eficacitate pentru meri și peri (American Bee Journal, 122:287–289, 1982).

O altă încercare de a atrage albinele la flori a fost realizată prin utilizarea compozițiilor sintetice care mimează acțiunea feromonului glandei Nasonov (Entomologia Experimentalis et Applicata 30:199-201, 1981), dar și această abordare s-a dovedit a fi ineficientă (HortScience. 29:155-158, 1994).

S-a propus și utilizarea stropirii în masă cu feromon mandibular al reginei albinelor melifere (QMP), direct pe pomii fructiferi înfloriți. Ideea din spatele acestei utilizări era aceea că albinele culegătoare se vor întoarce la stup purtând resturi de feromon mandibular de regină, și prin aceasta vor atrage mai multe albine prin dansul lor de semnalare. Testele de câmp, care au implicat tratamente cu QMP în livezi din Canada, au arătat o creștere a producțiilor la limita încrederii statistice și numai în condiții climatic nefavorabile și numai într-unul din cei doi ani în care au fost întreprinse. (Journal of Economic Entomology 85:1293-1299, 1992, Journal of Economic Entomology 85:1300-1306, 1992).

Se pare că abordările prezentate mai sus nu au avut capacitate de a atrage albinele melifere către florile plantelor de cultură și de a stimula polenizare pentru că tratamentele s-au făcut fără a se lua în considerare secreții de nectar, determinând în final albinele să devină ne-receptive la semnalul odorifer care nu este asociat unei recompense semnificative în nectar. Un

dezavantaj suplimentar rezultă din faptul că tratamentele se aplică peste întreaga plantă, fapt care generează confuzii pentru albinele melifere, pentru că parfumul atractant nu este emanat numai de către flori.

O soluție potențială a conflictului dintre semnale ale unei resurse bogate în nectar și recompensa reală scăzută este de a aplica concomitent un atractant pentru albinele melifere și feromon larvar esteric (BEP), care este alcătuit dintr-un amestec de 10 esteri metilici și etilici ai acizilor grași, care reduce pragul de sensibilitate la sucroză la albinele lucrătoare (Behavioral Ecology and Sociobiology 49:206–213, 2001) și stimulează hrănirea cu polen (Behavioral Ecology and Sociobiology 44: 193–198, 1998).

Cererea de brevet US 2011/0021622, revendică folosirea BEP stabilizat (cu 0,005 – 5% tert-butilhidrochinonă) în combinație cu feromon sintetic al glandei mandibulare a reginei (QMP) la albine, colonii de albine sau unități de polenizare, sau administrarea BEP stabilizat la albine, colonii de albine sau unități de polenizare, în combinație cu aplicarea QMP sintetic pe plantele înflorite la care se dorește stimularea polenizării. Stabilizarea BEP cu un aditiv chimic alimentar, perceput ca fiind ne-natural, poate ridica preocupări referitoare la contaminarea mierii.

Cererea de brevet US 2011/0021622 nu prezintă revendicări referitoare la folosirea BEP în combinație cu un atractant pentru polenizatori, inclusiv QMP sintetic, pentru tratarea plantelor înflorite. Această cerere de brevet nu dezvăluie raportul dintre BEP și QMP în combinația revendicată și nu prezintă doza la care BEP ar trebui aplicat culturilor agricole pentru a le stimula polenizarea.

Costurile de producție a feromonului larvar din acizi grași puri sunt ridicate. Brevetul US 7,727,517 dezvăluie faptul că feromonul larvar, formulat prin folosirea produselor de puritate tehnică, a cărui compoziție variază față de cea a feromonului larvar, continuă să păstreze un efect biologic semnificativ. Autorii brevetului US 7,727,517 au folosit acizi grași de puritate tehnică, pe care i-au amestecat apoi în proporțiile necesare pentru a realiza compoziții apropiate de cele naturale. Deși costurile de producție sunt semnificativ reduse prin folosirea compușilor de puritate tehnică, există posibilități suplimentare de reducere a costurilor de producție.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție cu acțiune atractantă și stimulantă pentru polenizatori, în special albine melifere, ușor de aplicat ca tratament al culturilor agricole sau al stupilor de albine, care să prezinte o stabilitate ridicată în timp, fără a include aditivi care sunt percepuți ca fiind nenaturali, și care să aibă un preț de cost accesibil.

Pentru a soluționa problema tehnică invenția prezintă o compoziție pentru stimularea polenizării, include etil-maltol, un compus binecunoscut ca având acțiune de stimulator al aromelor, și un amestec sintetic de esteri etilici și metilici ai acizilor grași, care continuă să aibă o activitate similară cu feromonul larvar esteric. Acest amestec sintetic este produs prin amestecarea esterilor etilici și metilici rezultați din transesterificarea uleiului de măsline și a uleiului de in și prin esterificarea acidului stearic de puritate tehnică. La această compoziție de esteri ai acizilor grași este adăugat etil maltol. Compoziția rezultată este amestecată cu o soluție de alginat de sodiu, metilceluloză și un emulsificator. Emulsia formată este gelificată ionotropic cu o soluție de clorură de calciu, diluată cu apă și aplicată prin stropire pe plantele de cultură.

Maltolul și etil-maltolul sunt larg cunoscuți ca fiind stimulanți de aromă (Food Technology, 43: 78, 1989), dar nu au fost utilizați până în prezent ca atracțanți pentru polenizatori prin stimularea recepționării parfumului floral. Maltolul și etil-maltolul prezintă o activitate anti-oxidantă semnificativă, inhibând peroxidarea lipidelor / lanțurilor de acizi grași (Biomedical Research - Tokyo 22: 183-186, 2001), dar nu au fost utilizați ca anti-oxidanți ai lipidelor sau ai altor esteri ai acizilor grași.

Compoziția conform invenției este alcătuită din: 2,50 ... 2,80 părți de palmitat de metil, 1,63 ... 1,71 părți de palmitat de etil, 16,26...17,00 părți de stearat de metil, 7,50 ... 7,68 părți de stearat de etil, 24,29... 24,76 părți oleat de metil, 5,45...5,65 părți linoleat de metil, 3,25 ... 3,40 părți linoleat de etil, 16,74 ... 17,15 părți linolenat de metil, 12,38...12,89 părți linolenat de etil, 0,5 părți etil-maltol, părțile fiind exprimate în unități de masă.

Procedeele de obținere a compoziției conform invenției este alcătuit în următoarele etape:

- Producerea de esteri metilici și etilici din ulei de măsline, ulei de in și acid stearic tehnic, prin procedee cunoscute;
- Combinarea esterilor obținuți în următoarele proporții: esteri metilici din ulei de măsline 64 părți; esteri metilici din acid stearic tehnic 48 părți; esteri metilici din ulei de in 88 părți; esteri etilici din ulei de măsline 8,5 părți; esteri etilici din acid stearic tehnic 24,5 părți, esteri etilici din ulei de in 67 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă.
- Dizolvarea prin agitare viguroasă a 1,5 părți etil-maltol în amestecul de 300 părți esteri de mai sus, părțile fiind exprimate în unități de masă.

Procedeele de aplicare a compoziției implică următoarele etape:

- Prepararea a 500 ml soluție de 6 g/l alginat de sodiu, 4 g/l metilceluloză și 0,5 g Polysorbate 80 în apă deionizată;

- Adăugarea treptată, în cantități mici și sub agitare continuă, a 10 g amestec de esteri ai acizilor grași și etil-maltol, peste cei 500 ml dispersie de alginat de sodiu, metilceluloză și Polysorbate 80 și omogenizare la turbo-mixer;
- Aducerea sub agitare, peste emulsia de esteri ai acizilor grași și etil-maltol în alginat de sodiu, a 500 ml soluție de clorură de calciu 0,67 g/l;
- Menținerea amestecului timp de 30 min pentru desăvârșirea formării microcapsulelor de alginat de calciu conținând amestecul de esteri și etil-maltol;
- Diluarea suspensiei cu microcapsule de alginat de calciu până la 600 litri cu apă și aplicarea prin stropire cu echipamentele uzuale de pulverizat;

Compoziția conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- preț de cost relativ redus pentru că este realizată din materii prime accesibile;
- stabilitate ridicată la temperatura camerei ca urmare a prezenței etil-maltolului, cu acțiune de prevenire a peroxidării legăturilor duble datorită blocării ionilor de fer;
- amplificarea acțiunii de atragere a polenizatorilor în zona florilor plantelor de cultură, datorită acțiunii etil-maltolului de potențare a aromelor florale cu rol atractant pentru polenizatori;
- conține exclusiv agenți de condiționare biocompatibili, care nu sunt percepuți ca nenaturali.

Procedeul de obținere prezintă avantajul realizării unei compoziții apropiate de cea a feromonului natural larvar, în pofida folosirii unor materii prime de tipul uleiului de măsline și a uleiului de in;

Procedeul de aplicare prezintă următoarele avantaje;

- realizarea unei compoziții în care produsul sintetic, amestec de esteri metilici și etilici și etil-maltol, este înglobat în microcapsule, de unde este eliberat controlat;
- stabilizarea suspensiei de microcapsule de alginat de calciu prin adaosul de metil-celuloză;

Se prezintă mai jos un exemplu de realizare a invenției.

Exemplu. Într-un balon cu 3 gâturi prevăzut cu agitator, condensator și termometru s-a introdus ulei vegetal brut, de măsline sau de in, sau acid stearic tehnic (cu min. 75% acid stearic). S-a dizolvat KOH p.a. (0,6% față de cantitatea de ulei/acid stearic) în metanol, respectiv etanol (exces de 50% față de cantitatea stoechiometrică), iar soluția respectivă s-a introdus sub agitare peste uleiul/acidul stearic din vas. S-a continuat agitarea menținându-se la temperatura camerei timp de 60 minute.

În cazul uleiurilor masa de reacție s-a transvazat într-o pâlnie de separare și după 3 ore s-a separat prin decantare glicerina brută I de esterii metilici respectiv etilici bruți I. Frația de esteri metilici, respectiv etilici, bruți, ai acizilor grași din ulei de măsline sau din ulei de in s-au reintrodus în vas. S-a dizolvat KOH (0,3% față de cantitatea de ulei/grăsime) în metanol, respectiv etanol, (0,7% față de cantitatea de ulei/grăsime), iar soluția respectivă s-a introdus sub agitare în vas peste esterii metilici, respectiv etilici, bruți I. S-a continuat agitarea menținându-se temperatura la temperatura camerei timp de 60 minute. Masa de reacție s-a transvazat în pâlnia de separare și după 3 ore s-a separat prin decantare glicerina brută II de esterii metilici, respectiv etilici bruți II. Esterii metilici, respectiv etilici bruți II, ca și produși reacției de esterificare ai acidului stearic, s-au introdus într-o instalație de separare volatile, la vid, pentru desolventizare. Temperatura masei de reacție s-a menținut la 55-60°C, iar depresiunea la 20 torr și au rezultat, în instalația de separare volatile, esteri purificați.

Esterii metilici, respectiv etilici, purificați (care pot fi obținuți și prin alte procedee de (trans)esterificare din uleiuri, de măsline sau in, sau din acid stearic tehnic), s-au combinat în următoarele proporții: esteri metilici din ulei de măsline 64 părți; esteri metilici din acid stearic tehnic 48 părți; esteri metilici din ulei de in 88 părți; esteri etilici din ulei de măsline 8,5 părți; esteri etilici din acid stearic tehnic 24,5 părți, esteri etilici din ulei de in 67 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă.

S-au realizat, conform exemplului de mai sus, trei șarje de produs, folosind loturi diferite de uleiuri vegetale și acid stearic tehnic. Amestecul de esteri rezultat în cadrul celor trei șarje a fost analizat gaz-cromatografic, determinându-se compozițiile prezentate în tab.1. Aceste compoziții sunt foarte apropiate de compoziția de feromon larvar (Journal of Economic Entomology 97:748-751, 2004).

În amestecul celor 300 părți esteri de mai sus s-a dizolvat, prin agitare viguroasă, 1,5 părți etil-maltol. A rezultatul produsul atractant pentru polenizatori conform invenției, care a prezentat o stabilitate bună la temperatura camerei.

Produsul rezultat prin amestecarea esterilor metilici și etilici cu etil-maltolul a fost aplicat ca tratament al plantelor de cultură.

Pentru aplicarea tratamentului s-au preparat 50 ml soluție 6 g/l alginat de sodiu și 4 g/l metilceluloză în apă deionizată, și 0,5 g Polysorbate 80 Polioxietilen - 20 - sorbitan monooleat). S-a adăugat 300 mg amestec de esteri ai acizilor grași și etil-maltol, treptat, în cantități mici și sub agitare continuă, peste cei 50 ml dispersie de alginat de sodiu, metilceluloză și Polysorbate 80.

S-a omogenizat la turbomixer; peste emulsia de esteri ai acizilor grași și etil-maltol în alginat de sodiu, s-au adăugat 50 ml soluție de clorură de calciu 0,67 g/l. Amestecul a fost menținut timp de 30 min pentru desăvârșirea formării microcapsulelor de alginat de calciu conținând amestecul de esteri și maltol. S-a prelevat 10% din amestec care a fost diluat la 6 litri și utilizat pentru tratarea a 100 m² (4 repetiții a 25 m²).

Tab.1. Compoziția determinată gaz-cromatografic a amestecului realizat conform exemplului din esteri etilici și metilici produși din diferite loturi de ulei de măsline, ulei de in și acid stearic tehnic.

Ester	□arja 1	□arja 2	□arja 3	Media
Palmitat de metil	2,51	2,72	2,81	2,68
Palmitat de etil	1,78	1,64	1,72	1,71
stearat de metil	16,34	16,74	17,08	16,72
Stearat de etil	7,72	7,54	7,63	7,63
Oleat de metil	24,88	24,41	24,71	24,67
Oleat de etil	8,05	7,73	7,62	7,80
Linoleat de metil	5,68	5,82	5,48	5,66
Linoleat de etil	3,38	3,42	3,27	3,36
Linolenat de metil	16,82	17,03	17,24	17,03
Linolenat de etil	12,84	12,95	12,44	12,74

Testarea eficacității produsului, realizat conform invenției și a procedurii de aplicare în câmp, a fost realizată față de un martor netratat și față de un produs standard, amestecul sintetic mimetic pentru feromonul glandei Nasonov (cital: geraniol: nerol 1:1:0,5). Experimentul a fost realizat pe un preluvosol roșcat, folosindu-se p cultură comercială de 3 ha mazărice păroasă (*Vicia villosa*, cv. Welta). Experiența a fost organizată randomizat, în dreptunghi latin, în trei variante, fiecare cu câte patru repetiții, după cum urmează:

V₁ – martor netratat

V₂ - martor tratat cu amestec cital: geraniol: nerol 1:1:0,5 (0,75 ml amestec per 25 m², echivalent al unei doze de 300 ml per ha);

V₃ – tratament cu produs conform invenției, 7,5 mg per 25 m², echivalent al unei doze de 3 g per ha.

Fiecare repetiție a fost reprezentată de un zonă experimental de 25 m² (parcelă experimentală de 5 x 5 m), amplasate randomizat la distanțe de 60

metri între fiecare parcelă. Tratamentele s-a efectuat inițial la 20% înflorire și s-au repetat după un interval de 10 zile.

Activitatea de hrănire a albinelor a fost notată prin numărarea polenizatorilor care se hrănesc într-un interval de 15 min. pe un număr de 10 plante, randomizat selectate din fiecare repetiție.

Tab.2. Influența tratamentelor cu produsele testate asupra producției de sămânță la mazăricea păroasă (*Vicia villosa*, cv. Welta).

Varianta experimentală	Număr mediu de albine per plantă la 15 min	Masa medie a 1000 de semințe	Număr de semințe per teacă	Producția realizată (kg/ha)
martor netratat	5,5 ^a	38,2 ^a	3,9 ^a	1 177 ^a
citral: geraniol: nerol 1:1:0,5, echivalent 300 ml/ha	6,8 ^a	39,6 ^a	3,8 ^a	1 237 ^a
Produs conform invenției, 3 g/ha	7,2 ^b	44,7 ^b	4,7 ^b	1 454 ^b
DL 5%	1,4	3,4	0,6	206

Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P > 0,05$.

Rezultatele prezentate în tab.2 demonstrează eficacitatea produsului, realizat conform invenției și aplicat conform procedurii descrise de invenție, în creșterea producției de sămânță la culturile agricole ca urmare a stimulării polenizării acestora de către albinele melifere.

COMPOZIȚIE PENTRU STIMULAREA POLENIZARII CULTURILOR
AGRICOLE, PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA SI PROCEDEU DE
APLICARE IN CULTURILE AGRICOLE

Revendicări

1. Compoziția conform invenției caracterizată prin aceea că este alcătuit din: 2,50 ... 2,80 părți de palmitat de metil, 1,63 ... 1,71 părți de palmitat de etil, 16,26... 17,00 părți de stearat de metil, 7,50 ... 7,68 părți de stearat de etil, 24,29... 24,76 părți oleat de metil, 5,45... 5,65 părți linoleat de metil, 3,25 ... 3,40 părți linoleat de metil, 16,74 ... 17,15 părți linolenat de metil, 12,38... 12,89 părți linolenat de etil, 0,5 părți etil-maltol, părțile fiind exprimate în unități de masă.
2. Procedeul de obținere a compoziției conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că este alcătuit în următoarele etape: producerea de esteri metilici și etilici din ulei de măsline, ulei de in și acid stearic tehnic; combinarea esterilor obținuți în următoarele proporții: esteri metilici din ulei de măsline 64 părți; esteri metilici din acid stearic tehnic 48 părți; esteri metilici din ulei de in 88 părți; esteri etilici din ulei de măsline 8,5 părți; esteri etilici din acid stearic tehnic 24,5 părți, esteri etilici din ulei de in 67 părți, părțile fiind exprimate în unități de masă; dizolvarea prin agitare viguroasă a 1,5 părți etil-maltol în amestecul de 300 părți esteri de mai sus, părțile fiind exprimate în unități de masă.
3. Procedeul de aplicare a compoziției conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: prepararea a 500 ml soluție de 6 g/l alginat de sodiu, 4 g/l metilceluloză și 0,5 g Polysorbate 80 în apă deionizată; adăugarea treptată, în cantități mici și sub agitare continuă, a 10 g amestec de esteri ai acizilor grași și etil-maltol, peste cei 500 ml dispersie de alginat de sodiu, metilceluloză și Polysorbate 80 și omogenizare la turbo-mixer; aducerea sub agitare, peste emulsia de esteri ai acizilor grași și etil-maltol în alginat de sodiu, a 500 ml soluție de clorură de calciu 0,67 g/l; menținerea amestecului timp de 30 min pentru desăvârșirea formării microcapsulelor de alginat de calciu conținând amestecul de esteri și etil-maltol; diluarea suspensiei cu microcapsule de alginat de calciu până la 600 litri cu apă și aplicarea prin stropire cu echipamentele uzuale de pulverizat.