



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00925**

(22) Data de depozit: **27/11/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/07/2018** BOPI nr. **7/2018**

(41) Data publicării cererii:  
**30/05/2017** BOPI nr. **5/2017**

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

(72) Inventatori:  
• **NISTOR CRISTINA LAVINIA,  
ȘOS. ALEXANDRIA NR. 16, BL. L4, ET. 1,  
AP. 41, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **IANCHIȘ RALUCA, STR. CÔPȘA MICĂ  
NR. 24A, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **JECU MARIA-LUIZA, STR.PICTOR  
OCTAV BĂNCILĂ NR.8, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **RĂUT IULIANA,  
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,  
SC.1, ET.4, AP.54, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **DONESCU DAN, VALEA  
CĂLUGĂREASCĂ NR. 3 BL. D4, SC. B, AP.  
16, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**RO 128885 A0; CN 1805784 A;**  
**US 20110268780 A1; EP 1845786 B1**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR CAPSULE PE BAZĂ  
DE ULEIURI ESENȚIALE ȘI METODĂ DE ADMINISTRARE**



# RO 131823 B1

1            Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unor capsule pe bază de  
2 uleiuri esențiale, în vederea realizării unor produse utilizate ca biostimulanți pentru plantele  
3 cultivate, în special a celor medicinale/nutraceutice, în agricultură, și metodă de administrare  
4 a acestora.

5            Uleiurile esențiale sunt cunoscute ca având acțiuni de protecție a plantelor/pesticide  
6 „verzi” (a se vedea, de exemplu, review-ul foarte citat, Isman, 2000, Crop Protection, 19:  
7 603-608), dar numai de curând s-a demonstrat activarea mecanismelor de apărare din  
8 plante, ca urmare a tratamentelor foliare cu uleiuri esențiale (**Ben-Jabeur et al. 2015, Plant  
9 Physiology and Biochemistry, 94:35-40**), fără a se revendica acțiunea biostimulantă, de  
10 favorizare a acumulării de compuși biologic activi /fitonutrienți.

11            Sunt cunoscute diferite procedee de încapsulare a uleiurilor esențiale utilizate ca  
12 inputuri în tehnologiile de cultivare a plantelor, care au ca scop eliberarea controlată/treptată  
13 a respectivelor uleiuri esențiale, pentru prelungirea activității biologice a acestora.

14            **RO 128885 A0** se referă la un biopesticid care conține uleiuri esențiale încapsulate,  
15 și săruri de potasiu ale acizilor grași, și la procedeu de obținere a acestuia, care constă în  
16 tratarea uleiului vegetal cu o soluție de hidroxid de potasiu, în prezența unui cuplu de  
17 substanțe tensioactive și a unui solvent, la temperatura ambiantă, obținându-se săruri de  
18 potasiu ale acizilor grași cu concentrație de 30...40%. Uleiul vegetal hidrogenat sau ceara,  
19 uleiul esențial, o pereche de surfactanți și apa se încălzesc la temperatura de 60...90°C timp  
20 de 15 min, apoi se răcesc treptat, sub agitare, până la temperatura de 20°C. Se obține o  
21 suspensie de nanoparticule lipidice solide, care conțin la interior uleiul volatil lichid, iar la  
22 exterior uleiul vegetal hidrogenat sau ceara sub formă solidă. Aplicarea produsului se face  
23 prin diluare cu apă, urmată de stropire.

24            **CN 1805784 A** descrie o metodă de preparare a microcapsulelor ce conțin uleiuri  
25 esențiale, în care filmul de poliuree și/sau poliuretan format prin polimerizare interfacială, în  
26 jurul picăturilor de ulei esențial, amplifică stabilitatea acestuia, îi reduce rata de evaporare  
27 și controlează rata de eliberare la aplicarea pe un substrat.

28            **US 20110268780 A1** se referă la obținerea unor microcapsule formate dintr-un miez  
29 solid, care conține cel puțin un ulei esențial amestecat cu un material poros solid, și care  
30 este acoperit de un strat de film de poliuree și/sau poliuretan, sau de coaja amfifilă compusă  
31 din sarea multivalentă provenită de la cel puțin un acid alcanic. De asemenea, sunt date  
32 compoziții care conțin aceste microcapsule, și informații despre utilizarea lor în agricultură.

33            **EP1845786 B1** se referă la o compoziție utilizată în “agricultura verde”, având acțiune  
34 repelentă asupra dăunătorilor plantelor, și care conține cel puțin un ulei esențial volatil  
35 încapsulat, un vector non-volatil sub formă solidă sau lichidă, și cel puțin un agent selectat  
36 din grupul adjuvanților, adezivilor, antioxidanților, surfactanților, care previne aglomerarea  
37 microcapsulelor.

38            **US 9101143 B2** protejează un procedeu de obținere a microcapsulelor încărcate cu  
39 uleiuri esențiale printr-o polimerizare interfacială a unei emulsii apoase, de uleiuri esențiale  
40 solubilizate în vehicule hidrofobe non-volatile - uleiuri esențiale non-volatile, uleiuri vegetale  
41 sau o combinație a acestora. Prin polimerizarea interfacială se formează un film de poliuree  
42 și/sau poliuretan în jurul picăturilor de uleiuri esențiale, dizolvate în vehiculul hidrofob non-  
43 volatil. Monomerii implicați în polimerizarea/policondensarea interfacială sunt distribuiți în  
44 faza apoasă.

45            **US 2015264921 A1** descrie un procedeu care include dizolvarea unui di- sau poli-  
46 izocianat într-un ulei esențial, emulsionarea amestecului rezultat într-o soluție apoasă  
47 conținând o di- sau poli-amină și/sau un compus di- sau poli-hidroxilic, pentru a efectua

# RO 131823 B1

Încapsularea uleiului esențial prin polimerizare interfacială, prin care se formează un film de poliuree și/sau de poliuretan în jurul picăturilor de ulei esențiale. Filmul astfel format îmbunătățește stabilitatea uleiului esențial, reduce viteza de evaporare și controlează viteza de eliberare atunci când este aplicat pe un substrat. 1 3

**WO 2007094000 A2** se referă la un procedeu de obținere a unor microcapsule conținând uleiuri esențiale în mediu apos. Respectivetele microcapsule au fost preparate prin amestecarea cel puțin a unui acid alcanolic, selectat dintre acidul decanoic, acidul dodecanoic, acidul tetradecanoic acid, acidul hexadecanoic, acidul octadecanoic, acidul eicosanoic, acidul docosanoic, acidul tetracosanoic, acidul 11-octadecenoic, acidul 5,8,11,14-eicosatetraenoic și acizii grași omega-3, cu cel puțin un ulei esențial, urmată de adăugarea unei soluții apoase bazice, pentru a obține o emulsie, și de amestecarea în emulsia rezultată a unei soluții apoase a unei sări conținând un cation multivalent, care complexează cu grupele acide ale acidului alcanolic, stabilizând microcapsulele. 5 7 9 11 13

În cadrul cererii de brevet **EP 2737799 A1** se descrie un biopesticid care conține uleiuri esențiale încapsulate, și săruri de potasiu ale acizilor grași. În prima etapă uleiul vegetal este tratat la temperatura ambiantă cu o soluție de hidroxid de potasiu, în prezența unui cuplu de surfactanți și a unui solvent, rezultând săruri de potasiu ale acizilor grași cu concentrație de 30...40%. În a doua etapă, uleiul vegetal hidrogenat sau ceara, uleiul esențial, o pereche de surfactanți și apă sunt încălzite sub agitare, amestecul este răcit într-o manieră controlată, rezultând o suspensie de nanoparticule lipidice solide, cu nanoparticule, ce are un înveliș constând din ulei vegetal hidrogenat sau ceară, și un miez lichid, constând din uleiuri esențiale; produsul final este o suspensie (mediul fluid fiind reprezentat de săpunul de potasiu) în care există nanoparticule formate din ulei volatil lichid (în miez) și ulei hidrogenat solid drept coajă. Tehnologia de obținere se bazează pe proprietatea uleiurilor hidrogenate și a cerurilor de a solidifica prin răcirea topiturii la temperatura ambiantă. Aplicarea produsului se face prin diluare cu apă și stropire. 15 17 19 21 23 25

**GR 1008453 B** dezvăluie un procedeu de eliberare lentă a uleiurilor volatile pentru o perioadă de 24 de zile, după formarea unor microcapsule de tipul ulei în apă, care conțin diferite uleiuri esențiale (ulei de portocale, ulei de lămâie, amestec de ulei de portocale și de ulei de lămâie), ca și utilizarea respectivelor uleiuri esențiale pentru controlul unor populații de insecte. 27 29 31

**EP 2684457 A1** prezintă obținerea unui erbicid natural, conținând uleiuri esențiale, singure sau în amestec. Compoziția acestui erbicid natural este caracterizată printr-un component de bază (un ulei esențial sau un amestec de uleiuri esențiale), în combinație cu un nano-transportator, care poate fi un amidon rezistent la temperatură, diferite tipuri de maltodextrine, proteine, polizaharide, gelatină, pululan, polietilen-oxid sau combinații între acestea. 33 35 37

**EP 2662069 A2** se referă la un material mezoporos din care cel puțin unii din porii materialului sunt încărcăți cu uleiuri esențiale. Definitivarea încapsulării se realizează însă prin acoperirea porilor cu un film de polimer biodegradabil, iar degradarea în timp a filmului de acoperire a mezopozilor determină în final aceeași problemă tehnică de variație în timp a ratei de eliberare a uleiurilor esențiale. 39 41

Dezavantajele procedeelor cunoscute sunt: 43

- eliberarea uleiurilor esențiale din structurile intacte în care sunt încapsulate este lentă inițial, dar pe măsură ce aceste structuri se degradează, viteza de eliberare crește; 45

- un alt dezavantaj al microcapsulelor realizate prin diferite procedee care implică utilizarea emulsiilor ulei-apă este determinat de dificultatea stabilizării la diluarea ulterioară în apă, în special în apa dură uzual folosită în agricultură; 47

# RO 131823 B1

1 - costurile de realizare a materialelor mezoporoase utilizate sunt mari deoarece  
implică fie reactivi scumpi, fie echipamente care necesită costuri mari.

3 Sunt necesare deci procedee de încapsulare a uleiurilor esențiale în structuri în care  
viteza de eliberare a unor concentrații eficiente de ulei esențial să fie constantă pe o  
5 perioadă de timp îndelungată.

7 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unui procedeu prin care  
să se realizeze încapsularea rapidă a uleiurilor esențiale, în structuri realizate din  
componente ușor accesibile, care să prezinte o stabilitate ridicată, și care să asigure o viteză  
9 constantă de eliberare a componentelor volatile din uleiurile esențiale, pe o perioadă de timp  
îndelungată, de cel puțin 6 luni (așa cum rezultă din descriere și revendicări, este activarea  
11 metabolismului secundar al plantelor nutraceutice, acumularea de compuși biologic  
activi/fitostimulenți, precum și eliberarea controlată a uleiurilor esențiale).

## 13 *Expunerea invenției*

15 Procedeu de obținere a unor capsule pe bază de uleiuri esențiale și silice  
mezoporoasă, conform invenției, este constituit din următoarele etape:

17 - prepararea unei soluții de silicat de sodiu și apă distilată, în raport de 0,7 părți silicat  
la 88,62...89,6 părți apă, sub agitare timp de 30 min, la 500 rpm și o temperatură de 40°C;

19 - aducerea peste soluția de silicat de sodiu a 9,7...10,68 soluție etanolică ce conține:  
7,1...7,16 părți alcooletilic, 1,86...1,88 părți acid oleic, 0,14...0,86 părți 3-aminopropil  
21 trietoxisilan, 0,52...0,86 părți ulei esențial de cimbru, lavandă, busuioc sau scorțișoară,  
părțile fiind exprimate în unități de masă;

23 - menținerea amestecului sub agitare timp de 4 h, la 40°C;

23 - transvazarea a 100 părți dispersie omogenă și opacă în fiole închise etanș.

25 Silicatul de sodiu tehnic utilizat conține 14,2% oxid de sodiu ( $\text{Na}_2\text{O}$ ) și 27,58 dioxid  
de siliciu ( $\text{SiO}_2$ ).

27 Metoda de administrare a dispersiilor pe bază de uleiuri esențiale încapsulate în  
sisteme de silice mezoporoasă, pentru biostimularea culturilor de plante nutraceutice  
*Passiflora incarnata L.* și *Momordica charantia L.*, în vederea acumulării suplimentare de  
29 compuși bioactivi, constă în: diluarea dispersiei având un conținut de 0,86% ulei de cimbru,  
în raport de 1 parte dispersie la 99 părți apă, și aplicarea foliară a acesteia în doze de  
31 2 kg/ha la începutul înfloritului, și de 4 kg/ha la sfârșitul înfloritului.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

33 - determină obținerea unor produse agrochimice ecologice, bazate pe uleiuri  
esențiale naturale (ulei de cimbru, ulei de lavandă, ulei de busuioc sau ulei de scorțișoară),  
35 ca ingrediente bioactive, încapsulate în microparticule de silice mezoporoasă, stabilizate de  
complexul vezicular acid oleic - oleat de sodiu, și formulate ca dispersii apoase omogene,  
37 stabile pe perioade de cel puțin 6 luni și la diluarea cu apă, inclusiv apă dură standard;

39 - asigură producerea *in situ* a particulelor de silice mezoporoasă în care are loc  
încapsularea uleiurilor esențiale, în prezența uleiurilor esențiale dizolvate în etanol, a acidului  
oleic și a unui agent de co-structurare, 3-aminopropiltriethoxisilanul;

41 - permite formarea particulelor de silice mezoporoasă, matricea nevolatilă în care are  
loc încapsularea ingredientului activ volatil, și stabilizarea acestora de către complexul  
43 vezicular format din acid oleic și sarea de sodiu a acestuia, rezultată în urma  
neutralizării silicatlui de sodiu;

45 - stabilește rapoartele optime între silicatul de sodiu și acidul oleic, astfel încât ionii  
de sodiu din soluția de silicat sunt neutralizați de jumătate din cantitatea de acid oleic  
47 existent în sistemul de sinteză, restul de acid oleic formând, împreună cu oleatul de sodiu  
rezultat, complexul vezicular stabilizant acid oleic - oleat de sodiu;

# RO 131823 B1

- utilizează, alături de silicatul de sodiu, folosit ca ingredient la sinteza particulelor de silice mezoporoasă, un agent de co-structurare, 3-aminopropiltriethoxi silan, într-un raport cuprins între 20% și 100% față de uleiul esențial supus încapsulării, cu rolul de a crește capacitatea particulelor de silice mezoporoasă de a încapsula uleiurile esențiale, fără ca în formulările apoase finale să aibă loc separări de faze;

- folosește concentrații optime de uleiuri esențiale, cuprinse între 0,5 și 1,5%, de preferință între 0,8 și 1,2% față de apa prezentă în sistemul de reacție, astfel încât dispersiile apoase obținute sunt omogene și stabile în timp (cel puțin 6 luni) și, în același timp, eficiente în acțiunea lor biologică;

- determină o creștere a acumulării compușilor antioxidanți în frunzele de *Passiflora incarnata* de cel puțin 10%, și o creștere a acumulării unor compuși antidiabetici în frunzele de *Momordica charantia* de cel puțin 15%;

- lărgeste gama de utilizare a uleiurilor esențiale, cunoscute pentru acțiunea lor dezinfectantă, antifungică, insecticidă și erbicidă, descriind un procedeu prin care uleiurile esențiale, respectiv, uleiul de cimbru, sunt folosite pentru biostimularea culturilor de plante nutraceutice *Passiflora incarnata* L. și *Momordica charantia* L., în vederea acumulării suplimentare de compuși bioactivi.

În continuare sunt prezentate exemple de realizare a invenției, care o ilustrează fără a o limita.

## Exemplul 1

Într-un vas de reacție prevăzut cu agitare magnetică (~500 rot/min) s-au introdus 0,7% silicat de sodiu tehnic (14,2% Na<sub>2</sub>O; 27,58% SiO<sub>2</sub>) și 89,6% apă distilată. Amestecul a fost omogenizat timp de 30 min sub agitare, la 40°C. Peste acest amestec se adaugă un alt amestec format din etanol absolut 7,16%, acid oleic 1,88%, 3-aminopropiltriethoxisilan 0,14% și ulei esențial 0,52% ulei esențial de cimbru. Amestecul astfel obținut devine rapid opac și este menținut sub agitare timp de încă 4 h, la 40°C. În final, dispersia omogenă rezultată este transvazată în fiole închise etanș. Dispersia a rămas stabilă (fără separări de faze) în cele 6 luni cât a fost verificată.

## Exemplul 2

Se procedează la fel ca în exemplul 1, numai că se folosește ulei esențial de lavandă.

## Exemplul 3

Se procedează la fel ca în exemplul 1, numai că se folosește ulei de esențial de busuioc.

## Exemplul 4

Se procedează la fel ca în exemplul 1, numai că se folosește ulei esențial de scorțișoară.

## Exemplul 5

Într-un vas de reacție prevăzut cu agitare magnetică (~500 rot/min) s-au introdus 0,7% silicat de sodiu tehnic (14,2% Na<sub>2</sub>O; 27,58% SiO<sub>2</sub>) și 88,62% apă distilată. Amestecul a fost omogenizat timp de 30 min sub agitare, la 40°C. Peste acest amestec se adaugă un alt amestec format din etanol absolut 7,1%, acid oleic 1,86%, 3-aminopropiltriethoxisilan 0,86% și ulei esențial de cimbru 0,86%. Amestecul astfel obținut devine rapid opac, și este menținut sub agitare timp de încă 4 h, la 40°C. În final, dispersia omogenă rezultată este transvazată în fiole închise etanș. Dispersia a rămas stabilă (fără separări de faze) în cele 6 luni cât a fost verificată.

## Exemplul 6

Se procedează la fel ca în exemplul 5, numai că se folosește ulei esențial de lavandă.

## 1 Exemplul 7

2 Se procedează la fel ca în exemplul 5, numai că se folosește ulei de esențial de  
3 busuioc.

## 4 Exemplul 8

5 Se procedează la fel ca în exemplul 5, numai că se folosește ulei esențial de  
6 scorțișoară.

## 7 Exemplul 9

8 S-au realizat determinări ale dimensiunii particulelor de silice mezoporoasă, valorile  
9 potențialului zeta și diametrele porilor, în probe obținute conform exemplelor 1-8.

10 Înainte de efectuarea măsurătorilor de dimensiuni de particule (diametre medii  
11 hidrodinamice) și de potențial zeta, probele au fost diluate astfel: 0,4 ml probă au fost  
12 introduși într-un balon cotat de 25 ml, și apoi s-a adus la semn cu apă distilată, probele astfel  
13 diluate au fost omogenizate prin ultrasonicare 10 min la 50°C, folosind o baie de ultrasunete  
14 Bandelin Sonorex Digitec. Măsurătorile s-au efectuat cu ajutorul aparatului Zeta Nano ZS  
15 3600, produs de Malvern Instruments Ltd. Rezultatele reprezintă media a 6 măsurători  
16 succesive. Pentru determinarea diametrelor medii hidrodinamice, s-a folosit tehnica DLS  
17 (Dynamic Light Scattering), iar pentru determinarea valorilor medii ale potențialului zeta s-a  
18 utilizat tehnica LDV (Laser Doppler Velocimetry).

19 Determinările privind diametrul porilor au fost realizate cu ajutorul unui aparat  
20 Quantachrome NOVA2200e, prin absorbție-desorbție de azot. Înainte de efectuarea  
21 analizelor, probele au fost pregătite astfel: acidul oleic a fost îndepărtat din dispersiile finale  
22 prin câte 2 spălări succesive cu o soluție de hidroxid de sodiu de pH=9, și apoi centrifugare  
23 la 9000 rot/min, folosind o centrifugă Hettich Universal 320. După aceea, probele au fost din  
24 nou spălate cu apă distilată, centrifugate și uscate în aer, la temperatura camerei, timp de  
25 3 zile. Au fost apoi calcinate într-un cuptor de calcinare la 600°C, timp de 6 h. Probele  
26 calcinate au fost degazate la 150°C, timp de 12 h, în interiorul porozimetrului.

27 Particulele de silice mezoporoase obținute au de preferință dimensiuni cuprinse între  
28 50 și 200 nm, și valori negative ale potențialului zeta cuprinse de preferință între -60 și -  
29 90 mV. Diametrele porilor particulelor de silice sunt cuprinse între 2 și 30 nm, de preferință  
30 între 3 și 10 nm.

## 31 Exemplu 10

32 Dispersiile stabile și omogene, realizate conform exemplelor 1...8, au fost testate din  
33 punct de vedere al acțiunii fungicide față de fungii fitopatogeni *Botrytis allii*, *Rhizoctonia*  
34 *solani*, *Fusarium graminearum*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, prin  
35 utilizarea metodei descrise de Manso et al., 2015, Food Control, 47, 20-26. S-a lucrat în  
36 triplicat pentru fiecare agent fitopatogen, cu folosirea unor martori reprezentați de uleiurile  
37 esențiale ca atare, distribuite în aceeași concentrație. S-a determinat concentrația minimă  
38 fungicidă (MFC), ca fiind concentrația cea mai mică de ulei esențial la care nu s-a mai  
39 observat creșterea microorganismelor, după 5 zile de incubare la 25°C. Nu s-au observat  
40 diferențe ale valorilor MFC între uleiurile esențiale ca atare și cele incluse în microparticule  
41 de silice mezoporoasă, obținute conform exemplelor 1-8.

## 42 Exemplul 11

43 A fost testată stabilitatea suspo-emulsiilor rezultate după diluarea la 1% în apă (dură)  
44 standard a dispersiilor obținute conform exemplelor 1-8, prin utilizarea metodei MT 180  
45 Dispersion stability of suspo-emulsions (CIPAC Handbook, Ashwort et al. eds, 2005). Apa  
46 standard a fost preparată după metoda M29 WHO (<http://www.who.int/whopes/quality/en/MethodM29.pdf>). Toate dispersiile testate au corespuns din punct de vedere al stabilității,  
47 fără separare de faze la 2 h și cu resuspendare după 24 h.

## Exemplu 12

Dispersia omogenă și stabilă, obținută conform exemplului 5, a fost testată din punct de vedere al acțiunii de biostimulant pentru plantele nutraceutice, determinându-se influența tratamentelor foliare asupra acumulării compușilor biologic activi în *Passiflora incarnata* L. și *Momordica charantia* L. Plantele nutraceutice au fost cultivate pe preluvosol roșcat molic, fertilizat echilibrat, conform recomandărilor agrochimice. Tratamentele foliare s-au aplicat în a doua decadă a lunii mai 2015 și la începutul lunii iulie 2015, când plantele erau la începutul înfloritului și, respectiv, la sfârșitul perioadei de înflorit. S-au aplicat doze echivalente a 2 kg/ha de dispersie de microcapsule cu 0,86% ulei de cimbru la începutul înfloritului, și, respectiv, 4 kg/ha la sfârșitul înfloritului. S-a aplicat o soluție de 1% din dispersia omogenă și stabilă obținută conform exemplului 5, într-o normă de stropire echivalentă a 200 l/ha la începutul înfloritului, și de 400 l/ha la sfârșitul înfloritului. Aplicarea soluției s-a realizat cu ajutorul unei pompe de spate SG20 (Stihl AG, Waiblingen, Germania), prin stropire de la 40 cm, cu o presiune de stropire stabilită la 275 kPa, folosind o duză cu jet plat și derivă limitată (TeeJett® flat-fan TT11002 model, Spraying Systems Co., Wheaton, IL, SUA). Tratamentele s-au realizat într-un experiment care a inclus și un martor netratat cu dispersii de uleiuri esențiale, amplasat randomizat în 4 repetiții.

La 2 săptămâni de la tratament s-au prelevat probe în care s-au determinat principalele ingrediente biologic active.

Materialul vegetal (frunze *P. incarnata*, fructe *M. charantia*) a fost uscat la 50°C și apoi a fost extras în etanol 70% (v/v), într-un raport de 1,5:10 (m/v), la temperatura camerei, timp de 10 zile. Extractele au fost filtrate, iar filtratele au fost stocate la 4°C până la utilizare. Greutatea în stare uscată a fost determinată folosind un analizator de umiditate (Radweg, Radom, Polonia).

În extractul din materialul vegetal de *P. incarnata* s-a determinat activitatea antioxidantă, prin măsurarea capacității respectivelor extracte de stinge: cationii radicalici produși de acidul 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonic (ABTS) și radicalii stabili generați de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Rezultatele au fost exprimate ca echivalent Trolox (TEAC)/g s.u. și, respectiv, ca % inhibarea DDPH (Gaspar et al. 2014, Romanian Biotechnological Letters, 19: 9353-9365).

Tabelul 1

Activitatea antioxidantă în extractul de material vegetal provenit din plante de *Passiflora incarnata*

Varianta experimentală	TEAC/g s.u.		% DDPH	
	Primul tratament	Al doilea tratament	Primul tratament	Al doilea tratament
Martor netratat cu uleiuri esențiale	78,55 ± 3,05b	78,69 ± 5,88b	28,83 ± 1,22a	28,33 ± 1,56b
Tratament cu ulei de cimbru încapsulat conform exemplului 5, 1 tratament 2 kg/ha, după 3 săptămâni 1 tratament 4 kg/ha	86,34 ± 3,76a	89,42 ± 4,28a	30,03 ± 1,59a	32,60 ± 1,68a

Rezultatele prezentate în tabelul 1 demonstrează că aplicarea foliară a dispersiilor cu ulei de cimbru încapsulate în silice mezoporoasă, obținute conform exemplului 5, determină o creștere a activității antioxidante de peste 10% în frunzele de *P. incarnata*. Activitatea antioxidantă este în directă legătură cu utilizările fitoterapeutice ale plantelor de *Passiflora* (Sarris et al. 2013, CNS Drugs, 27:301-319).

# RO 131823 B1

În extractul de material vegetal de *M. charantia* s-a determinat activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, o proteină transmembranară majoră, cu rol în diabetul de tip II, non-insulino-dependent, care este inhibată de saponenine triptenice de tip cucurbitan din *M. charantia* (Zeng et al. 2014. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 81: 176-180). S-a folosit metoda descrisă de Lund et al. 2004 *Journal of Biological Chemistry*, 279:, 24226-24235, folosind ca substrat pNPP (para-nitro-fenil fosfat). Tamponul de testare (pH=7,4) a fost constituit din 50 mM 3,3-dimetilglutarate, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitola fost ajustat la o tărie ionică de 0,15 M, prin adăugarea de NaCl. S-a lucrat în placă de microtitrare cu 96 godeuri, din polipropilenă, volum de lucru 250 µl (Nune™ 96-Well Polypropylene MicroWell™ Plates, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Concentrațiile corespunzătoare de extracte (0 și 30 µl) au fost adăugate la tamponul de testare conținând 0 sau 2,5 mM pNPP (concentrație finală) în volum total de 200 µl. Reacția a fost inițiată de adăugarea de 20 µl, conținând 10 unități protein-tirozinfosfatază (PTP1B, Prospec, Rehovot, Israel). S-a incubat timp de 30 min la temperatura de 37°C. Reacția a fost stopată prin adăugarea a 30 µl de soluție 0,5 M NaOH. S-a măsurat absorbanta în placa de microtitrare la 405 nm, folosind un cititor de plăci (FluoroStar Omega, BMG LabTech, Offenburg, Germania) cu posibilitatea corecției absorbantei cauzate de substrat în absența enzimei și compușilor. Ca martor pozitiv, activitatea de PTP1B a fost determinată în prezența vanadatului de sodiu Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, un inhibitor cunoscut al activității protein-tirozinfosfatazei 1B. Rezultatele s-au exprimat ca procent de inhibare și sunt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2

Activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, PTP1B, în extractele din materialul vegetal provenit din plante de *Momordica charantia*

Varianta experimentală	% inhibare PTP1B	
	Primul tratament	Al doilea tratament
Martor netratat cu uleiuri esențiale	27,25 ± 4,08b	28,92 ± 8,74b
Tratament cu ulei de cimbru încapsulat, conform exemplului 5, 1 tratament 2 kg/ha, după 3 săptămâni 1 tratament 4 kg/ha	33,71 ± 2,63a	37,43 ± 5,72a

Rezultatele demonstrează că aplicarea foliară a dispersiilor cu ulei de cimbru încapsulate în silice mezoporoasă, obținute conform exemplului 5, determină o creștere a activității de inhibare a enzimei implicate în diabetul de tip II, protein-tirozinfosfatazei 1B, cu peste 15% în materialul vegetal de *Momordica charantia*.

Utilizarea uleiului esențial de cimbru ca biostimulant pentru plante, cu acțiune de stimulare a acumulării de compuși bioactivi, reprezintă o nouă utilizare a uleiurilor esențiale în general, și a uleiului de cimbru în special, care nu a mai fost revendicată până în prezent. Eliberarea controlată a componentelor uleiului esențial de cimbru, din microparticule pe bază de silice mezoporoasă, sintetizate *in situ* prin procedeul conform invenției, permite o prelungire în timp a acestei acțiuni biostimulante.

Această lucrare a fost realizată prin programul Parteneriate în domenii prioritare - PN II, derulat cu sprijinul MEN - UEFISCDI, proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-0995, contract 160/2014 MAIA.



# RO 131823 B1

## Revendicări

1. Procedeu de obținere a unor capsule pe bază de uleiuri esențiale, utilizate ca biostimulanți în agricultură, **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele etape: prepararea unei soluții de silicat de sodiu și apă distilată, în raport de 0,7 părți silicat la 88,62...89,6 părți apă, sub agitare timp de 30 min, la 500 rot/min, și o temperatură de 40°C; aducerea peste soluția de silicat de sodiu a 9,7...10,68 soluție etanolică, ce conține 7,1...7,16 părți alcool etilic, 1,88...1,86 părți acid oleic, 0,14...0,86 părți 3-aminopropiltriethoxisilan, 0,52...0,86 părți ulei esențial de cimbru, lavandă, busuioc sau scorțișoară, părțile fiind exprimate în unități de masă; menținerea amestecului sub agitare timp de încă 4 h, la 40°C, și transvazarea celor 100 părți dispersie omogenă și opacă rezultate, în fiole închise etanș.
2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** silicatul de sodiu tehnic utilizat în cadrul procedurii de mai sus conține 14,2% Na<sub>2</sub>O și 27,58% SiO<sub>2</sub>.
3. Metodă de administrare a dispersiilor pe bază de ulei esențial de cimbru încapsulat în sisteme de silice mezoporoasă, pentru biostimularea culturilor de plante nutraceutice *Passiflora incarnata L.* și *Momordica charantia L.*, **caracterizată prin aceea că** se diluează dispersia omogenă și opacă de ulei esențial de cimbru, 1 parte dispersie omogenă la 99 părți apă, se aplică prin pulverizare pe frunze o doză de 2 kg/ha dispersie 1% microcapsule, având 0,86% ulei de cimbru, la începutul înfloritului, și o doză de 4 kg/ha dispersie 1% microcapsule, având 0,86% ulei de cimbru, la sfârșitul înfloritului.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 344/2018