



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00925

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

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

(71) Solicitant:  
• 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. COPȘA 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

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE ȘI DE UTILIZARE  
CA BIOSTIMULANȚI PENTRU PLANTE A UNOR ULEIURI  
ESEȚIALE ÎNCAPSULATE ÎN SISTEME PE BAZĂ DE SILICE  
MEZOPOROASĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor biostimulanți pentru plantele cultivate, în special a celor medicinale/nutraceutice. Procedeu conform invenției constă în încapsularea unor uleiuri esențiale de cimbru,

lavandă, busuioc sau scorțișoară, în sisteme pe bază de silice mezoporoasă.

Revendicări: 4

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).



## **PROCEDEU DE OBTINERE SI DE UTILIZARE CA BIOSTIMULANTI PENTRU PLANTE A UNOR ULEIURI ESENȚIALE INCAPSULATE IN SISTEME PE BAZA DE SILICE MEZOPOROASA**

Prezenta invenție se referă la un procedeu de încapsulare a unor uleiuri esențiale, în sisteme pe bază de silice mezoporoasă, pentru realizarea unor produse utilizate în agricultură, și la un procedeu de utilizare a uleiurilor esențiale astfel încapsulate ca biostimulanți pentru plantele cultivate, în special a celor medicinale / nutraceutice.

Sunt cunoscute diferite procedee de încapsulare a uleiurilor esențiale utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultivare a plantelor, care au ca scop eliberarea controlată / treptată a respectivelor uleiuri esențiale, pentru prelungirea activității biologice a acestora. Brevetul SUA 9101143 B1 revendică obținerea microcapsulelor încărcate cu uleiuri esențiale printr-o polimerizare interfacială a unei emulsii apoase, de uleiuri esențiale solubilizate în vehicule hidrofobe non-volatile - uleiuri esențiale non-volatile, uleiuri vegetale sau o combinație a acestora. Prin polimerizarea interfacială se formează un film de poliuree și/sau poliuretan în jurul picăturilor de uleiuri esențiale, dizolvate în vehiculul hidrofob non-volatile. Monomerii implicați în polimerizarea / policondensarea interfacială sunt distribuiți în faza apoasă.

Cererea de brevet US2015264921 A1 descrie un procedeu care include dizolvarea unui di- sau poli-izocianat într-un ulei esențial, emulsionarea amestecului rezultat într-o soluție apoasă conținând o di- sau poli-amină și/sau un compus di- sau poli-hidroxic, pentru a efectua încapsularea uleiului esențial prin polimerizare interfacială, prin care se formează un film de poliuree și/sau de poliuretan în jurul picăturilor de ulei esențial. Filmul astfel format îmbunătățește stabilitatea uleiului esențial, reduce viteza de evaporare și controlează viteza de eliberare atunci când este aplicată pe un substrat.

Cererea de brevet WO2007094000 A2 se referă la un procedeu de obținere a unor microcapsule conținând uleiuri esențiale în mediu apos. Respectivul microcapsule au fost preparate prin amestecarea a cel puțin 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 acid, 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 alcanic, stabilizând microcapsulele. În cadrul cererii de brevet US2011268780 A1 aceiași inventatori de mai sus raportează obținerea unor microcapsule conținând un miez solid și cel puțin un ulei esențial amestecat cu un material poros solid, în care acest miez solid este acoperit cu un strat de film de poliuree și/sau de poliuretan sau de o coaja amfifilă compusă din sarea multivalenta provenita de la cel puțin un acid alcanic.

Cererea de brevet EP2737799 A1 protejează 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 un 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 care 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 exista 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 ambianta. Aplicarea produsului se face prin diluare cu apă și stropire.

Brevetul 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 apa 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.

Cererea de brevet EP2684457 A1 prezintă obținerea unui erbicid natural conținând uleiuri esențiale, singure sau în amestec. Compoziția acestui erbicid natural este caracterizată printr-un component de baza (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.

Dezavantajele procedurilor cunoscute de încapsulare sunt determinate de variația în timp a vitezei de eliberare a uleiurilor esențiale. Inițial eliberarea uleiurilor esențiale din structurile intacte în care sunt încapsulate este lentă, dar ulterior, pe măsură ce aceste structuri se degradează, viteza de eliberare crește.

Materialele mezoporoase reprezintă astfel de structuri, din care eliberarea componentelor volatile ale uleiurilor esențiale se realizează cu o rată constantă, pe o perioadă mai îndelungată. Cererea de brevet EP2662069 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 mezo-porilor determină în final aceeași problemă tehnică de variere în timp a ratei de eliberare a uleiurilor esențiale.

În cazul materialelor mezoporoase o problemă tehnică derivată este cea a costurilor de realizare a acestora, care implică fie reactivi scumpi, fie echipamente care necesită costuri investiționale mari.

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.

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

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 constantă de eliberare a componentelor volatile din uleiurile esențiale, pe o perioadă de timp îndelungată, de cel puțin 6 luni.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu prin care să se obțină o compoziție în care componentele se află în rapoarte optime, care să permită dispersarea și stabilizarea uleiurilor esențiale în mediu apos, inclusiv după diluarea ulterioară, datorită prezenței unui stabilizator biocompatibil.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu prin care uleiurile esențiale încapsulate să fie utilizate ca biostimulanți pentru plante, în special plante nutraceutice, pentru activarea metabolismului secundar și acumularea de compuși biologic activi / fitonutrienți.

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

Procedeu de încapsulare a unor uleiuri esențiale, în sisteme pe bază de silice mezoporoasă, conform invenției, 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 rotații pe minut și o temperatură de 40°C;
- ✓ Aducerea peste soluția de silicat de sodiu a 9,7-10,68 soluție etanolică, care 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, lavanda, busuioc sau scorțișoară, părțile fiind exprimate în unități de masă;

- ✓ Menținerea amestecului sub agitare timp de încă 4 ore, la 40 °C și transvazarea celor 100 părți dispersie omogenă și opacă rezultată în fiole închise etanș.

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>.

Procedura de utilizare a uleiurilor esențiale încapsulate în sisteme pe bază de silice mezoporoasă pentru biostimularea culturilor de plante nutraceutice *Passiflora incarnata* L. și *Momordica charantia* L., în vederea acumulării suplimentare de compuși bioactivi, constă în aplicarea unor doze de 2-4 kg/ha de dispersie de microcapsule cu 0,86% ulei de cimbru, în două tratamente, la începutul înfloritului și la sfârșitul înfloritului, și implică următoarele etape: diluarea dispersiei omogene și opace de ulei esențial de cimbru încapsulat în silice mezoporoasă, 1 parte dispersie omogenă la 99 părți apă, aplicarea prin pulverizare pe frunze a suspo-emulsiei rezultate, cu o normă de stropire de 200 litri la începutul înfloritului și de 400 litri la sfârșitul înfloritului.

Prin utilizarea uleiului esențial de cimbru încapsulat în sisteme pe bază de silice mezoporoasă se obține 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%.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Determină obținerea unor produse agrochimice ecologice, bazate pe uleiuri esențiale naturale (ulei de cimbru, ulei de lavanda, ulei de busuioc sau ulei de scortșoara), ca ingrediente bioactive, încapsulate în microparticule de silice mezoporoasă, stabilizate de complexul vezicular acid oleic – oleat de sodiu, și formulate ca dispersii apoase omogene, stabile pe perioade de cel puțin 6 luni și la diluarea cu apă, inclusiv apă dură standard;
- ✓ Asigură producerea *in-situ* a particulele 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;
- ✓ Permite formarea particulele de silice mezoporoasă, matricea nevolatilă în care are loc încapsularea ingredientului activ volatil, și stabilizarea acestora de către

complexul vezicular format din acid oleic și sarea de sodiu a acestuia, rezultată în urma neutralizării silicatului de sodiu

- ✓ 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 existent în sistemul de sinteză, restul de acid oleic formând împreună cu oleatul de sodiu rezultat complexul vezicular stabilizant acid oleic – oleat de sodiu;
- ✓ 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.
- ✓ 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.

*Exemplu 1.* Într-un vas de reacție prevăzut cu agitare magnetică (~500 rotații/minut) 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 de minute 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 ore, la 40 °C. În final, dispersia omogenă rezultată este transvazată în fiole

închise etanș. Dispersia a rămas stabila (fără separări de faze) în cele 6 luni cât a fost verificată.

*Exemplu 2.* Se procedează la fel ca în exemplu 1, numai că se folosește ulei esențial de lavandă.

*Exemplu 3.* Se procedează la fel ca în exemplu 1, numai că se folosește ulei de esențial de busuioc.

*Exemplu 4.* Se procedează la fel ca în exemplu 1, numai că se folosește ulei esențial de scorțișoară.

*Exemplu 5.* Într-un vas de reacție prevăzut cu agitare magnetica (~500 rotații/minut) 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% apa distilata. Amestecul a fost omogenizat timp de 30 de minute 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 ore, la 40 °C. În final, dispersia omogena rezultata este transvazata în fiole închise etanș. Dispersia a rămas stabila (fără separări de faze) în cele 6 luni cât a fost verificata.

*Exemplu 6.* Se procedează la fel ca în exemplu 5, numai că se folosește ulei esențial de lavandă.

*Exemplu 7.* Se procedează la fel ca în exemplu 5, numai că se folosește ulei de esențial de busuioc.

*Exemplu 8.* Se procedează la fel ca în exemplu 5, numai că se folosește ulei esențial de scorțișoară.

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

Înainte de efectuarea măsurătorilor de dimensiuni de particule (diametre medii hidrodinamice) și de potențial zeta, probele au fost diluate astfel: 0,4 mL probă au fost introduși într-un balon cotat de 25 mL și apoi s-a adus la semn cu apă distilată. probele astfel diluate au fost omogenizate prin ultrasonicare 10 minute la 50°C, folosind o baie de ultrasunete Bandelin Sonorex Digitec. Măsurătorile s-au efectuat cu ajutorul



aparaturii Zeta Nano ZS 3600, produs de Malvern Instruments Ltd. Rezultatele reprezintă media a 6 măsurători succesive. Pentru determinarea diametrelor medii hidrodinamice, s-a folosit tehnica DLS (Dynamic Light Scattering), iar pentru determinarea valorilor medii ale potențialului zeta s-a utilizat tehnica LDV (Laser Doppler Velocimetry).

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

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

*Exemplu 10.* Dispersiile stabile și omogene, realizate conform Exemplu 1 - Exemplu 8, au fost testate din punct de vedere al acțiunii fungicide față de fungii fitopatogeni *Botrytis allii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, prin utilizarea metodei descrise de Manso et al. 2015, Food Control, 47, 20-26. S-a lucrat în triplicat pentru fiecare agent fitopatogen, cu folosirea unor matori reprezentați de uleiurile esențiale ca atare, distribuite în aceeași concentrație. S-a determinat concentrația minimă fungicidă (MFC), ca fiind cea mai mică concentrație de ulei esențial la care nu s-a mai observat creșterea microorganismelor, după 5 zile de incubare la 25°C. Nu s-au observat diferențe ale valorilor MFC între uleiurile esențiale ca atare și cele incluse în microparticule de silice mezoporoasă, obținute conform Exemplu 1 - Exemplu 8.

*Exemplu 11.* A fost testată stabilitatea suspo-emulsiilor rezultate după diluarea la 1% în apă (dură) standard a dispersiilor obținute conform Exemplu 1- Exemplu 8, prin

utilizarea metodei MT 180 Dispersion stability of suspo-emulsions (CIPAC Handbook, Ashwort et al. eds, 2005). Apa 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, fără separare de faze la 2 ore și cu re-suspendare după 24 ore.

*Exemplu 12.* Dispersia omogenă și stabilă obținută conform Exemplu 5 a fost testată din punct de vedere a 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 al începutul înfloritului, și, respectiv, 4 kg/ha la sfârșitul înfloritului. S-au aplicat o soluție de 1% din dispersia omogenă și stabilă obținută conform Exemplu 5, într-o normă de stropire echivalentă a 200 l/ha la începutul înfloritului, și de 400 l/ha la sfârșitul înfloritului. Aplicarea soluțiilor 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 (Radwag, 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-sulphonic (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 DPPH (Gaspar et al. 2014, *Romanian Biotechnological Letters*, 19: 9353-9365).

Tab. 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 conf. Ex.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 tab. 1. demonstrează că aplicarea foliară a dispersiilor cu ulei de cimbru încapsulate în silice mezoporoasă obținute conform Exemplu 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).

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 sapogenine triperterice 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 a 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 (Nunc™ 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 compuși. 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 % de inhibare și sunt prezentate în tabelul 2.

Tab. 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 conf. Ex.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 Exemplu 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 in domenii prioritare — PN II, derulat cu sprijinul MEN – UEFISCDI, proiect PN-II-PT-PCCA-2013-4-0995, contract 160/2014 MAIA*

## REVEDICĂRI

1. Procedeu de obținere a unor uleiuri esențiale încapsulate în sisteme pe bază de silice mezoporoasă, conform invenției, **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 rotații pe minut și o temperatură de 40°C; aducerea peste soluția de silicat de sodiu a 9,7-10,68 soluție etanolică, care 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, lavanda, busuioc sau scorțișoară, părțile fiind exprimate în unități de masă; menținerea amestecului sub agitare timp de încă 4 ore, la 40 °C și transvazarea celor 100 părți dispersie omogenă și opacă rezultate în fiole închise etanș.
2. Procedeu de obținere a unor uleiuri esențiale încapsulate în sisteme pe bază de silice mezoporoasă 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. Procedul de utilizare a uleiului esențial de cimbru încapsulat în sisteme pe bază de silice mezoporoasă pentru biostimularea culturilor de plante nutraceutice *Passiflora incarnata* L. și *Momordica charantia* L., în vederea acumulării suplimentare de compuși bioactivi, **caracterizat prin aceea că** implică aplicarea unor doze de 2-4 kg/ha de dispersie 1% de microcapsule cu 0,86% ulei de cimbru, în două tratamente, la începutul înfloritului și la sfârșitul înfloritului, și este constituit din următoarele etape: diluarea dispersiei omogene și opace de ulei esențial de cimbru încapsulat în silice mezoporoasă, 1 parte dispersie omogenă la 99 părți apă, aplicarea prin pulverizare pe frunze a suspo-emulsiei rezultate, cu o normă de stropire de 200 litri la începutul înfloritului și de 400 litri la sfârșitul înfloritului.
4. Procedul de utilizare a uleiului esențial de cimbru încapsulat în sisteme pe bază de silice mezoporoasă conform revendicării 3, **caracterizat prin aceea că** prin aplicarea lui se obține 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%.