



A01N 65/12 (2009.01);

A01N 61/00 (2006.01);

A01N 31/02 (2006.01);

A01N 31/08 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00846**

(22) Data de depozit: **14/11/2013**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **27/04/2018** BOPI nr. **4/2018**

(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:
• **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;**

• **DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **RĂUT IULIANA,
ALEEA BARAJUL BISTRIȚA NR.12, BL.4,
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**

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

• **JECU MARIA-LUIZA,
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**EP 1854353 (B1); US 2009270471 (A1);
US 2003231978 (A1); KR 100444124 (B1)**

(54) **COMPOZIȚIE PENTRU LIMITAREA PRODUCERII
DE MICOTOXINE, ȘI PROCEDEU DE OBȚINERE
A ACESTEIA**



RO 131830 B1

1 Prezenta invenție se referă la o compoziție pentru limitarea formării de micotoxine în
diferite substraturi din componența lanțului alimentar, pe bază de ingrediente de origine
3 naturală, cu biodegradabilitate ridicată și impact redus asupra mediului, și la un procedeu de
obținere a acestei compoziții din materii prime provenite din bio-resurse regenerabile.

5 Sunt cunoscute diferite compoziții sau procedee de utilizare a unor compoziții pentru
limitarea/inhibarea producerii de micotoxine de către fungi micotoxigeni.

7 Brevetul **EP 1854353** descrie un procedeu de prevenire a contaminării cu micotoxine,
sau de decontaminare a silozurilor de cereale, fructe și legume uscate, oleaginoase, care
9 implică utilizarea unei compoziții conținând eugenol, izo-eugenol, sau săruri ale acestora
acceptate pentru uz alimentar, și/sau ulei de cuișoare, sau amestec ale acestora. Compoziția
11 este alcătuită din 15...100% principii active din categoria celor menționate mai sus, 0...10%
dintr-un agent ce reduce evaporarea principiului activ, 0...85% dintr-un agent tensioactiv, ales
13 dintre cei anionici, non-ionici și amestecul lor, și 0...80% dintr-un solvent, selectat dintre apă,
alcanoli (C₁-C₆), alchilen-glicoli (C₂-C₆), poli-(C₁-C₅)-alchilenglicoli, esteri alchilici (C₁-C₆) ai
15 acizilor alcanoici și amestec al acestora. Aplicarea acestei compoziții se realizează prin termo-
nebulizare, la 150...230°C, în doze care sunt cuprinse între 1 și 200 cm³ eugenol pur pentru
17 1 m³ din volumul silozului de stocare, de preferat între 10 și 100 cm³ eugenol pur pentru 1 m³
din volumul silozului. Compoziția aplicată prin procedeul descris mai sus este revendicată ca
19 având eficiență în prevenirea producerii și decontaminarea produselor agricole stocate cu
ochratoxină A, deoxinivalenol, aflatoxine, zearalenonă, tricotecene, fumosinine, citrinină, acid
21 penicilic, vomitoxină, patulină.

23 Cererea de brevet **US 2009270471** se referă la o metodă pentru inhibarea producerii
de micotoxine prin pulverizarea unui fungicid de tip benzimidazol pe culturi de grâu, orz, secară,
ovăz și triticale, în perioada cuprinsă între stadiul de anteză și până la recoltarea acestora.

25 Cererea de brevet **US 2003231978** prezintă o compoziție și o metodă de îmbunătățire
a calității aerului din spațiile închise, precum și dezinfectarea suprafețelor din aceste spații.
27 Metoda împiedică dezvoltarea agenților patogeni prin utilizarea unei compoziții sub formă de
suspensie sau emulsie care conține o singură terpenă, o combinație de terpenă și/sau un
29 lipozom.

31 Brevetul **KR 100444124** se referă la o compoziție destinată inhibării producerii de
micotoxine, aflatoxină sau ochratoxină, ce are în compoziție 1...5 μg/ml extract din semințele
de *Cassiae*, și unul sau mai mulți compuși selectați din grupul: alizarină, acid crisofanic,
33 purpurină și quinizarină. Extracția substanțelor cu acțiune inhibitoare din semințele de *Cassiae*
se realizează cu următorii solvenți: hexan, metanol, alcool etilic, acetonă, acetat de etil, clorură
35 de metil, butanol, cloroform și apă distilată. Compoziția poate fi utilizată sub formă lichidă,
emulsie, agent fumigen, granule etc.

37 Cererea de brevet **JP 2009167138** se referă la o compoziție care inhibă producerea de
micotoxine, pe bază de precocen I (7-metoxi-2,2-dimetilcromen), precocen II (6,7-dimetoxi-2,2-
39 dimetilcromen) și precocen III (7-etoxi-6-metoxi-2,2-dimetilcromen), sau uleiuri esențiale care
conțin aceste amestecuri de precocen (ulei esențial de *Ageratum houstonianum*, plantă
41 decorativă originară din Mexic, cunoscută sub denumirea de pufuleți albaștri, sau ulei esențial
de mușețel, *Matricaria recutita*). Precocenu era cunoscut ca fiind un inhibitor al sintezei
43 hormonilor juvenili la insecte, cererea de brevet **JP 20099167138** referindu-se la o nouă utilizare
a diferitelor structuri de precocen, pentru inhibarea producerii de tricotecene, și în special de
45 3-acetil deoxinivalenol (ADON) și deoxinivalenol (DON), de către fungi toxigeni din grupul
Fusarium graminearum.

RO 131830 B1

Cererea de brevet **CN 102212481** prezintă un procedeu de utilizare a acidului α -linolenic și/sau a analogilor sau derivaților acestora, pentru inhibarea producerii de aflatoxine în diferitele substraturi alimentare. Cererea de brevet revendică inhibarea producerii de aflatoxină prin utilizarea unor concentrații cuprinse între 0,005 mg/ml și 5 mg/ml de acid α -linolenic în mediul de cultură al fungilor micotoxigeni din grupul *Aspergillus* section Flavi (exemplificat prin tulpina *A. flavus* CGMCC 32890).

Utilizarea uleiurilor esențiale pentru a preveni producerea de micotoxine în recolta depozitată a fost recent trecută în revistă - **da Cruz Cabrai et al., 2013, Int. J. Food Microbiol., 166:1-14**. S-a demonstrat, de asemenea, și faptul că esterii metilici ai uleiului de in, ulei ce are un conținut foarte ridicat de acid α -linolenic, au un efect de blocare a dezvoltării fungilor producători de aflatoxine - **Abdellillah et al., 2013, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3:443-448**.

Un principal dezavantaj al acestor compoziții obținute cu precădere din compuși naturali, proveniți din resurse regenerabile, este determinat de (bio)degradabilitatea lor ridicată, care este un avantaj în cazul utilizării, pentru că reduce semnificativ riscul de acumulare a unor compuși potențial toxici, dar este un dezavantaj în ceea ce privește stabilitatea la păstrare, care trebuie să fie de minimum 12 luni, pentru a corespunde cerințelor lanțului de distribuție și unei utilizării predominant sezoniere. Moleculele organice cu legături duble multiple, cum sunt componentele unor uleiuri esențiale, dar mai ales acidul α -linolenic (C18:3n-3), care prezintă trei legături duble în lanțul hidrocarbonat, au stabilitate redusă și la (per)oxidare. Oxidarea acidului α -linolenic determină formarea unor aldehide oxigenate α,β -nesaturate toxice - a se vedea, de exemplu, review-ul (**Guillen și Goicoechea, 2008, Crit. Rev. Food Sci. 48:119-136**). Degradarea microbiologică a diferiților compuși naturali utilizați în compozițiile pentru limitarea/inhibarea producerii de micotoxine duce la pierderea activității biologice a acestora - a se vedea review-ul (**Turek și Stintzing, 2013, Compr. Rev. Food Sci. F., 12: 40-53**).

Pentru a crește stabilitatea în timp a unor astfel de compoziții pe bază de ingrediente naturale, cererea de brevet **CN 102058016** revendică o compoziție care include 150...180 părți de diacetat de sodiu, 45...65 părți de propil-paraben, 3...15 părți de pulbere de cuișoare, 2...12 părți de acid citric, 1...8 părți ulei esențial de *Ruta graveolens*, 100...125 părți de pulbere de vermiculit. Compoziția prezintă stabilitate în timp, dar agenții de conservare, de tipul propil-parabenului folosit în compoziția descrisă mai sus, prezintă o serie de dezavantaje, printre care: generarea unor costuri adiționale și a unor preocupări suplimentare referitoare la protecția mediului, acceptanță redusă, risc de bioacumulare peste limita maximă admisibilă, prin bioconcentrarea în lanțul alimentar, datorită folosirii în furaje, blocarea certificării unor astfel de compoziții rezultate din surse regenerabile, cu trasabilitate verificabilă pentru sistemele de agricultură organică. În plus, aplicarea unor compoziții sub formă pulverulentă este limitată, iar compoziția descrisă mai sus este destinată exclusiv prevenirii producerii de micotoxine în furajele depozitate.

Micotoxinele se formează atât în timpul vegetației, înainte de recoltare, cât și după recoltare, mai ales în cazul unor condiții de depozitare ce favorizează dezvoltarea fungilor micotoxigeni. Fungii toxigeni din genurile *Fusarium* și *Aspergillus* sunt și agenți fitopatogeni care infectează plantele în perioada de vegetație, și contaminează cu micotoxine recolta rezultată din plantele infectate - a se vedea, de exemplu, review-ul (**Voloshuk și Shim, 2013, FEMS Microb. Rev. 37:94-109**). Speciile micotoxigene din genul *Fusarium*, de exemplu, au o diversitate de plante gazdă pe care le infectează în timpul vegetației, și care includ practic cele mai importante, din punct de vedere economic, culturi de câmp (cerealele păioase, porumbul și sorgul, leguminoasele boabe, cartoful - **Ma et al. 2013, Ann. Rev. Microbiol. 67: 399-416**). Tulpinile de fungi aflatoxigeni din grupul *Aspergillus* section Flavi infectează recolta în curs de formare, și o contaminează cu aflatoxine, determinând pierderi economice semnificative în anii care urmează celor secetoși, anii în care recolta contaminată cu aflatoxine, în special cea de

RO 131830 B1

1 porumb, este larg folosită în lanțul alimentar (stresul hidric al plantelor de cultură și temperaturile
ridicate, caracteristice perioadelor de secetă, favorizează infecția cu fungi din grupul *Aspergillus*
3 section Flavi, și formarea de aflatoxine - a se vedea, de exemplu, review-ul (**Guo et al., 2008,**
J. Integr. Plant Biol. 50:1281-1291).

5 Un alt dezavantaj al tratamentelor cu uleiuri esențiale este determinat de aroma
puternică pe care acestea o pot transmite substraturilor tratate, și care limitează utilizarea
7 acestor uleiuri extrase din material vegetal la produse compatibile.

9 Ca urmare, s-a considerat necesară obținerea de compoziții pe bază de componente
provenite din bioresurse regenerabile, utilizabile pentru limitarea producerii de micotoxine, care
să prezinte următoarele caracteristici:

11 (i) o rezistență intrinsecă la biodegradare în timpul stocării;

13 (ii) inhibarea (per)oxidării legăturilor duble din lanțurile hidrocarbonate ale lipidelor
constituente;

15 (iii) posibilitatea aplicării prin pulverizare, după suspendare/emulsionare și diluare cu
apă, inclusiv apă cu duritate ridicată, atât pentru limitarea producerii de micotoxine în timpul
vegetației, cât și pentru prevenirea producerii de micotoxine în produsele agroalimentare
17 depozitate;

19 (iv) activitate complementară a mai multor ingrediente active, prin care să se reducă
dozele de uleiuri esențiale, și prin care să se limiteze efectul de transmitere a aromei acestora
către substraturile tratate. Astfel au fost realizate noi procedee pentru obținerea unor astfel de
21 compoziții, care să nu genereze co-produse, și care să aibă consumuri energetice specifice cât
mai mici.

23 Compoziția conform invenției este alcătuită din 42,1 părți de esteri etilici ai acizilor grași
din ulei de in, 15 părți lecitină, 13,7 părți alcool etilic, 6 părți ulei esențial de muguri florali de
25 *Syzygium aromaticum*, 6 părți ulei esențial de flori de *Ageratum houstonianum*, 5,6 părți săruri
de potasiu ale acizilor grași, exprimate ca oleat, 3,9 părți glicerol, 3,3 părți trigliceride, 3 părți
27 maltol, 0,5 părți apă, diferența până la 100 părți fiind substanțe nesaponificabile și săruri.

29 În compoziția de mai sus cel puțin 64% din esteri etilici de ulei de in sunt esteri etilici ai
acidului α -linolenic; lecitina are o balanță hidrofil-lipofilă HLB mai mare de 8, uleiul esențial de
muguri florali de *Syzygium aromaticum* conține cel puțin 75% eugenol, iar uleiul esențial de flori
31 de *Ageratum houstonianum* are un conținut de minimum 75% precocen total, din care minimum
30% precocen II, 6,7-dimetoxi-2,2-dimetilcromen.

33 Procedeele conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

35 - transesterificarea uleiului de in cu alcool etilic în exces 200%, pentru a forma o masă
de reacție (R1), în prezență de hidroxid de potasiu, în autoclavă, la 40°C, timp de 8 h, în
atmosferă protectoare de azot;

37 - răcirea masei de reacție în care este menținută glicerina și celelalte co-produse ale
reacției de transesterificare, ca și excesul de alcool etilic, și neutralizarea excesului de hidroxid
39 de potasiu din 500 g de masă de reacție (R1) cu 37 g acid oleic, pentru a forma produsul
intermediar (R2);

41 - amestecarea produsului intermediar (R2) cu celelalte ingrediente în următoarele
proporții: 140 g produs intermediar (R2), cu 30 g lecitină din soia, cu o balanță hidrofil-lipofilă
43 HLB mai mare de 8, 12 g ulei esențial de muguri florali *Syzygium aromaticum*, ce are un
conținut de minimum 75% eugenol, 12 g ulei esențial de flori de *Ageratum houstonianum*, ce
45 are un conținut de minimum 75% precocen total, din care minimum 30% precocen II, 6,7-
dimetoxi-2,2-dimetilcromen, 6 g maltol-3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-onă, și omogenizarea lor
47 prin agitare viguroasă, pentru a se forma compoziția cu acțiune de inhibare a producerii de
micotoxine.

RO 131830 B1

Invenția prezintă următoarele avantaje:	1
- formează o compoziție cu o rezistență intrinsecă la biodegradare în timpul depozitării, datorită conținutului de peste 10% alcool etilic, provenit din excesul de la reacția de trans-etilare, care menține activitatea apei din respectiva compoziție sub nivelul necesar dezvoltării unor microorganisme spoliatoare;	3
- conduce la obținerea unei compoziții care prezintă caracteristici superioare în limitarea producerii de micotoxine, datorită interacțiunilor dintre diferitele ingrediente active;	5
- inhibă (per)oxidarea legăturilor duble din lanțurile hidrocarbonate ale lipidelor constituate, datorită activității antioxidante a maltolului și a uleiului esențial de <i>Syzygium aromaticum</i> ;	7
- limitează efectul de transmitere a aromei uleiurilor esențiale către substraturile tratate, datorită reducerii dozelor de uleiuri esențiale ca urmare a activității complementare a mai multor ingrediente active;	9
- maschează aroma uleiurilor esențiale transmisă cerealelor boabe, datorită prezenței maltolului, care este un compus care amplifică aroma specifică produselor în care sunt prelucrate cerealele;	11
- determină o bună comportare tehnologică a soluțiilor de stropit rezultate prin diluarea compoziției conform invenției, datorită:	13
(i) glicerolului, care acționează ca agent de hidratare, reducând viteza de evaporare a apei și a compușilor activi de pe organelor plantelor tratate, în special inflorescențele cerealelor;	15
(ii) acțiunii emulsifiante a lecitinei, care îmbunătățește capacitatea de udare și de acoperire a organelor plantelor tratate, și care reduce rata de formare a picăturilor fine cu grad ridicat de dispersie; și	17
(iii) acțiunii de plastifiere a cuticulei hidrofobe exercitată către alcoolul etilic și esteri etilici ai acizilor grași, care favorizează penetrarea ingredientelor active prin bariera de permeabilitate reprezentată de cuticulă;	19
- permite aplicarea atât pentru limitarea producerii de micotoxine în timpul vegetației, cât și pentru prevenirea producerii de micotoxine în produsele agroalimentare depozitate;	21
- valorifică co-produsele din procesul de obținere a esterilor acizilor grași prin transesterificarea uleiurilor vegetale cu etanol, și în special glicerina, prin menținerea acestora în produsele intermediare și produsul final, cu beneficii pentru aplicarea prin stropire;	25
- asigură randamente ridicate ale procesului de transesterificare ce se desfășoară la temperaturi joase, cu risc redus de peroxidare a acizilor grași (poli)nesaturați, și cu consumuri energetice scăzute;	29
- permite formarea unor compoziții alcătuite exclusiv din componente provenite din materii prime agricole regenerabile, care, după verificarea și asigurarea conformității, poate fi certificată pentru sistemele de agricultură organică.	31
În continuare se prezintă exemple de realizare ce ilustrează invenția fără a o limita.	33
Exemplul 1	35
1000 g de ulei degumat de in, cu caracteristicile prezentate în tabelul 1, este adus într-o autoclavă de 2 l din oțel inox, cu sistem de agitare și de încălzire, sub atmosferă protectoare de azot.	37

Caracteristicile uleiului degumat de in folosit

3	Apă și compuși volatili	% m/m	0,4
	Indice de refracție	-	1,469
5	Substanțe nesaponificabile	% m/m	1,54
	Acizi grași liberi	% m/m	0,8
7	Indice de saponificare	mg KOH/g	188,5
	Indice de iod	g I ₂ /100 g	185
9	Indice de peroxid	meq O ₂ /kg	0,95
11	Compoziția medie în acizi grași (% m/m): C16: 4,6; C18: 2,4; C18-1: 14,5; C18-2: 12,8; C18-3: 64,1; Alții-1,6.		

13 Se dizolvă 25 g de hidroxid de potasiu de puritate 98% în 395 g de etanol cu 0,3% apă
 15 (200% în exces față de reacția de transesterificare), iar soluția rezultată este adăugată în
 17 autoclav, peste uleiul degumat de in. Se pornește agitarea și încălzirea la 40°C. După un timp
 19 de reacție de 8 h, masa de reacție se răcește la temperatura camerei. Se colectează 1415 g
 21 de masă transparentă de reacție (R1) cu următorul conținut (% m/m): esteri etilici de acizi grași
 23 din in (FAEE) 64,6; trigliceride 5,1; glicerol 5,9; etanol 21; hidroxid de potasiu 1,5 și apă 0,4,
 corespunzând unui randament de transesterificare de 92,3%. În produsul de reacție (R1), la o
 stocare timp de 1...365 zile, nu se separă straturi diferite. 500 g de produs de reacție (R1) se
 tratează sub agitare viguroasă cu 37 g de acid oleic tehnic, cu următoarele caracteristici: indice
 de aciditate 197,9 mg KOH/g; indice de iod 91,4 g I₂/100 g; conținut de apă 0,3% m/m, pentru
 a se neutraliza excesul de hidroxid de potasiu.

25 Se formează o soluție clară, notată (R2), ce are compoziția (% m/m): esteri etilici ai
 27 acizilor grași: 60,3; trigliceride 4,8; glicerol 5,5; etanol 19,5; săruri de potasiu ale acizilor grași
 exprimate ca oleat 8; apă 0,7. 140 g produs intermediar (R2) este amestecat prin agitare
 29 viguroasă cu 12 g ulei esențial de muguri florali de cuișoare, *Syzygium aromaticum*, ce are un
 conținut de minimum 75% eugenol, 12 g ulei esențial de flori de pufuleți albaștri, *Ageratum*
 31 *houstonianum*, ce are un conținut de minimum 75% precocen total, din care min 30% precocen
 II, 6,7-dimetoxi-2,2-dimetilcromen, 6 g maltol-3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-onă, 30 g lecitină de
 33 soia cu o balanță hidrofil-lipofilă HLB mai mare de 8, pentru a obține produsul A1, a cărui
 compoziție este următoarea: esteri etilici ai acizilor grași (FAEE) 42,1, din care cel puțin 64%
 sunt esteri etilici ai acidului α -linolenic, C18:3 (n-3); trigliceride 3,3; glicerol 3,9; alcool etilic 13,7;
 35 săruri de potasiu ale acizilor grași, exprimate ca oleat 5,6; maltol 3, ulei esențial de muguri florali
 de *Syzygium aromaticum* 6, ulei esențial de flori de *Ageratum houstonianum* 6, lecitină 15,0;
 apă 0,5, diferența până la 100 fiind substanțe nesaponificabile.

37 S-a realizat un studiu de stabilitate microbiologică a compoziției realizate conform
 exemplului de mai sus. 100 ml din produsul A1 au fost repartizați în flacoane Erlenmeyer de
 39 500 ml, care au fost menținute la 25°C timp de 192 de zile. Din 24 în 24 de zile s-au prelevat
 probe din care s-a determinat numărul de bacterii prin folosirea tehnicii de epifluorescență după
 41 colorarea cu 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) - **Porter și Feig, 1980, Limnol. Oceanogr., 25: 943-948.**

43 Experimentul s-a realizat în 5 repetiții, lucrându-se comparativ cu produs M1, realizat
 după un procedeu similar cu cel descris mai sus, dar în care s-a folosit cantitatea stoichiometric
 45 necesară de alcool etilic, fără exces. Compoziția produsului M1 este următoarea: esteri etilici
 ai acizilor grași (FAEE) 53,2, din care cel puțin 64% sunt esteri etilici ai acidului α -linolenic,

RO 131830 B1

C18:3 (n-3); trigliceride 4,2; glicerol 4,9; săruri de potasiu ale acizilor grași exprimate ca oleat 7,1; maltol 3, ulei esențial de muguri florali de *Syzygium aromaticum* 6, ulei esențial de flori de *Ageratum houstonianum* 6, lecitină 15,0; apă 0,6, diferența până la 100 fiind substanțe nesaponificabile. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2 de mai jos.

Tabelul 2

Stabilitatea microbiologică a produsului realizat conform exemplului 1

Produs	Inițial	24 zile	48 zile	72 zile	96 zile	120 zile	144 zile	168 zile	192 zile
Produs A1, conform exemplului 1	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³	<10 ³
Produs M, fără exces de etanol	<10 ³	<10 ³	<10 ³	3,7*10 ³	8,5*10 ³	2,4*10 ⁴	6,5*10 ⁴	1,8*10 ⁵	4,8*10 ⁵

Aceste rezultate demonstrează o stabilitate ridicată a produsului A1 realizat conform invenției, datorită prezenței alcoolului etilic ce reduce semnificativ disponibilitatea apei.

În produsul A1 realizat conform exemplului 1 s-a determinat activitatea antioxidantă. S-a folosit tehnica fotochemiluminiscenței, pe baza metodei Popov și Lewin, 1999, Meth. Enzymol., 300:96-100, pe un echipament Photochem® (Analytik Jena, Jena, Germania), față de radicali anionici superoxid generați de luminol, un fotosensibilizant atunci când este expus la lumină UV. Probe de 0,1 ml au fost diluate cu hexan înainte de determinarea antioxidantilor, folosind kit-ul ACL furnizat de Analytik Jena. Activitatea antioxidantă a fost monitorizată pentru 180 s și exprimată ca μm de echivalent trolox pentru 1 g de probă. S-a lucrat în triplicat, comparativ cu un produs M2, obținut prin aplicarea unui procedeu similar cu cel descris mai sus, dar în care nu s-au introdus maltol și uleiuri esențiale în produsul intermediar R2, ci numai lecitină. Compoziția produsului M2 este următoarea: esteri etilici ai acizilor grași (FAEE) 49,6, din care cel puțin 64% sunt esteri etilici ai acidului α-linolenic, C18:3 (n-3); trigliceride 3,9; glicerol 4,5; săruri de potasiu ale acizilor grași exprimate ca oleat 6,6; lecitină 17,7%, apă 0,6, diferența până la 100 fiind substanțe nesaponificabile. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3 de mai jos.

Tabelul 3

Activitatea antioxidantă din compoziția A1 realizată conform exemplului 1

Produs	Activitate antioxidantă (echiv. μm trolox/g)
Compoziția A1, realizată conform exemplului 1	128,7
Produs M2, produs intermediar R2 cu adaos numai de lecitină	1,78

Inhibarea peroxidării lipidelor de către antioxidanții incluși în compoziția realizată s-a testat în cadrul unui experiment în care s-a folosit metoda tiocianatului feric. Câte 25 ml din compozițiile A1 și M2 au fost emulsionate cu 25 ml de tampon fosfat sodic (0,04 M, pH 7,0). Amestecul de soluții a fost incubat la 37°C în flacoane de 100 ml, din polietilenă. Nivelul de peroxid s-a determinat prin prelevarea a 0,1 ml probă, în care s-au adăugat 0,1 ml de tiocianat de amoniu 30%, și exact după 3 min s-au adăugat 0,1 ml de 2 x 10⁻² M clorură ferică în acid clorhidric 3,5%, citindu-se culoarea roșie formată la 500 nm, pe un spectrofotometru UV-Vis Biomate, ThermoSpectronic (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA). Peroxizii sunt formați în timpul peroxidării legăturilor duble din acizii grași incluși în esterii etilici formați din ulei de în care oxidează ionii Fe²⁺ la Fe³⁺. Ionii ferici reacționează cu tiocianatul, formând complexul ce are un maximum de absorbție la 500 nm. Analiza s-a repetat din 6 în 6 h, timp de 2 zile.

RO 131830 B1

Inhibarea peroxidării lipidelor de către antioxidanții adăugați în compoziția A1 (maltol, uleiuri esențiale) s-a calculat cu ajutorul următoarei ecuații:

$$\text{Inhibarea peroxidării lipidelor} = 100 - (DO_A/DO_M \times 100)$$

unde DO_A este densitatea optică la 500 nm a probelor de compoziția A, iar DO_M este densitatea optică a 500 nm probelor de produs M_2 .

Pe parcursul tuturor celor 6 determinări, inhibarea peroxidării lipidelor a fost de peste 99%, ceea ce demonstrează că antioxidanții adăugați în compoziție protejează față de peroxidare legăturile duble din esterii etilici formați din uleiul de in.

S-au realizat și experimente pentru determinarea efectului compozițiilor obținute pentru inhibarea producerii de micotoxine *in vitro* de către fungii toxigeni din genurile *Aspergillus* și *Fusarium*.

Pentru determinarea inhibării producerii de aflatoxine, s-a folosit mediul sintetic cu asparagină (Reddy et al., 1979, J. Gen. Microbiol., 114:409-413 - zaharoză 80 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 3,5 g/l, asparagină 3 g/l, KH_2PO_4 0,75 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,025 g/l). S-au repartizat câte 50 ml de mediu în flacoane erlenmeyer de 500 ml, acoperite cu dopuri de vată, și s-au sterilizat prin autoclavare. Mediile răcite au fost inoculate aseptice cu câte 1 ml de suspensie de spori conținând $1,2 \text{ ml} \times 10^6$ spori/ml din tulpina *Aspergillus parasiticus* DSM 2038/ATCC 15517. S-au adăugat diferite volume din compoziția A1, sterilizate prin filtrare, pentru a atinge concentrațiile finale în mediul de cultură de 10 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 1,0 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ și 0,1 $\mu\text{g/ml}$. S-a lucrat în triplicat, folosindu-se ca produse de referință compozițiile M1 și M2, față de un martor care nu a fost tratat.

Pentru producerea de aflatoxină B1, mediile de cultură au fost incubate la 25°C pentru 5 zile. Culturile au fost filtrate, miceliul rezultat fiind cântărit după recoltare și uscare la 50°C, timp de 4 zile. Filtratul a fost extras de trei ori cu câte 25 ml de cloroform. Frațiile cloroformice au fost combinate, evaporate la sec, reziduul fiind reluat în cloroform și adus la 1 ml în flacon volumetric. Din acest extract s-au prelevat probe care au fost analizate pe un lichid cromatograf de înaltă presiune Agilent 6224 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SUA), folosind un amestec isocratic ternar de apă, metanol și acetonitril, 50/40/10, pe o coloană ZORBAC Eclipse XBD-C18, 4,6 mm x 150 mm x 3,5 μm , cu detectare pe detector UV (<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-3634EN.pdf>). Ca etalon s-a folosit aflatoxină B1 furnizată de Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SUA), iar cuantificarea s-a făcut prin raportarea suprafeței picurilor corespunzătoare aflatoxinei B1 din probele analizate cu cele ale etalonului. Inhibarea creșterii miceliului fungilor toxigeni *A. parasiticus* DSM 2038 și a producerii de aflatoxină B1 de către aceștia, pe mediu lichid sintetic, cu asparagină, s-a realizat prin raportarea procentuală a mediilor fiecărei concentrații de compoziție testată la media matorului netratat. Rezultatele experimentului sunt prezentate în tabelul 4.

Tabelul 4

Inhibarea creșterii miceliului fungilor toxigeni A. parasiticus DSM 2038 și a producerii de aflatoxină B1 de către aceștia, pe mediu lichid sintetic, cu asparagină

Produs	Inhibare creștere (% față de martor)	Inhibarea producerii de aflatoxină B1 (% față de martor)
Compoziție A1, obținută conform ex. 1, 10 $\mu\text{l/ml}$	56,3	100
Compoziție A1, obținută conform ex. 1, 5 $\mu\text{l/ml}$	61,1	100
Compoziție A1, obținută conform ex. 1, 1 $\mu\text{l/ml}$	57,8	100

Tabelul 4 (continuare)

Produs	Inhibare creștere (% față de martor)	Inhibarea producerii de aflatoxină B1 (% față de martor)
Compoziție A1, obținută conform ex. 1, 0,5 μl/ml	45,3	66,7
Compoziție A1, obținută conform ex. 1, 0,1 μl/ml	34,8	44,5
Compoziție M1, obținută fără exces de metanol, 10 μl/ml	41,3	88,3
Compoziție M2, obținută fără maltol și uleiuri esențiale, 10 μl/ml	35,7	33,4

Rezultatele demonstrează o eficacitate ridicată a compoziției A1, obținută conform invenției, în inhibarea producerii de aflatoxină B1 pe mediu lichid.

S-a testat stabilitatea emulsiei formate de compoziția A1 în apă dură standard. S-a folosit metoda Method MT 36.3: Emulsion characteristics of emulsifiable concentrates, emulsion characteristics and re-emulsification properties, CIPAC Handbook K, care constă în realizarea a 100 ml emulsie în apă standard, și examinarea stabilității emulsiei timp de 24 h. După 24 h nu s-a constatat o separare semnificativă a fazelor, iar capacitatea de reemulsificare după acest timp a fost semnificativă. Apa folosită a fost apă dură standard (metoda WHO/M/29), duritatea apei fiind verificată conform metodei CIPAC MT73 (CIPAC Handbook F), și corectată dacă era nevoie. Compoziția realizată este deci stabilă în apă dură standard, putând fi utilizată ca atare pentru realizarea de tratamente ale culturilor agricole sau a recoltei înainte de depozitare, prin stropire după diluare în apă, inclusiv în apă de fântână cu duritate ridicată.

Exemplul 2

Compoziția A1, obținută conform exemplului 1, a fost aplicată în condiții de câmp experimental, pentru a verifica reducerea contaminării cu micotoxine a porumbului și grâului, înainte de recoltare.

Experimentele s-au realizat în anii agricoli 2012 și 2013, pe câmpurile experimentale de la Fundulea (44°27'45" latitudine nordică și 26°31'35" longitudine estică), pe un cernoziom cambic, cu caracteristicile prezentate în tabelul 5 de mai jos.

Tabelul 5

Caracteristicile cernoziomului cambic din câmpul experimental de la Fundulea

Caracteristică	UM	Ap	Aph
Adâncime orizont	cm	0-18	18-30
Humus (Cx 1,72)	%	3,0	3,0
Total N	%	0,179	0,169
C : N	-	11,4	11,8
CaCO ₃	%	0,0	0,0
pH (în H ₂ O)	pH unit	6,3	6,5
Capacitatea totală de schimb cationi, CEC	meq/100g	21,1	21,3
Fosfor total (AL)	ppm	28	14
Potasiu mobil	ppm	98	87

RO 131830 B1

În zona experimentală de la Fundulea, temperatura medie multianuală atmosferică este de 10,25°C, iar precipitațiile anuale însumează 571 mm. În anul agricol 2012, în care s-a efectuat experimentul pentru porumb, primăvara și vara au fost mai calde decât normalul perioadei, deficitul de precipitații fiind de peste 150 mm în perioada de vegetație a porumbului.

Experimentul pentru verificarea eficacității compoziției realizate prin brevet, în limitarea producerii de aflatoxine de către fungi toxigeni din grupul *Aspergillus* section Flavi, care infectează porumbul în timpul vegetației, a fost amplasat în blocuri randomizate, de tip split-split-plot. Variantele au fost: inoculat cu *A. parasiticus* DSM 2038 și neinoculat/tratat cu apă sterilă, separate în două subvariante de aplicare a tratamentului cu compoziția A1, cu 24 h înainte de aplicarea inoculării (1) și cu 24 h după aplicarea tratamentului (2), fiecare separat apoi în trei niveluri ale tratamentului cu compoziția A1: (a) 0%/apă; (b) echivalent 1 kg/ha în 400 l apă (soluție 0,25%); (c) echivalent 1 kg/ha în 400 l apă (soluție 0,5%). Randomizarea (sub)variantelor în trei repetiții este prezentată în tabelul 6 de mai jos.

Tabelul 6

Randomizarea (sub)variantelor în trei repetiții, pentru experimentul de verificare a eficacității compoziției A1 în limitarea producerii de aflatoxine

Bloc I	Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038	Neinoculat/tratat cu apă sterilă
	1a 1b 1c2c2b2a	2b 2c 2a 1a 1c 1b
Bloc II	Neinoculat/tratat cu apă sterilă	Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038
	1c 1a 1b 2b 2c 2a	2c 2a 2b 1b 1a 1c
Bloc III	Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038	Neinoculat/tratat cu apă sterilă
	2b 2c 2a 1a 1c 1b	1c 1a 1b 2a 2b 2c

S-a folosit hibridul Fundulea 376 (FAO 450), hibrid simplu semitardiv, cu perioada de vegetație de 143 zile. Cultura premergătoare a fost grâul, iar lotul experimental a fost fertilizat cu azot și fosfor în doză de 90 N kg/ha + 75 kg P₂O₅/ha (N90P75). Sămânța de porumb a fost tratată cu un insecticid condiționat, care conținea clotianidin 600 g/l (Poncho 600 FS, Bayer CropScience AG, Monheim am Rhein, Germania), aplicat în doză de 4 l/t (0,83 μl p.c./bob). Densitatea a fost de 5,8 boabe germinabile pe m². Lungimea unui bloc experimental a fost de 50 m, lățimea de 4 m, benzile dintre parcelele experimentale individuale de 12 m² (3 x 4 m) fiind de 1 m. S-a aplicat și un tratament cu erbicide, preemergent un erbicid cu pethoxamid 300 g/l + terbutilazină 250 g/l (Successor T, Cheminova, Harboore, Danemarca) și postemergent timpuriu cu rimsulfuron 50% + tifensulfuron 25% (Basis, DuPont, Wilmington, Delaware). Benzile au fost menținute libere de buruieni și prin pășire. Inocularea s-a realizat în fenofaza de mijloc a înfloritului, și a implicat inserarea unui ac 14G/2,1 mm, printre pănuși din vârful fiecărui știulete, și injectarea a 3 ml de suspensie de *A. parasiticus* DSM 2038, cultivat pe mediul sintetic, cu asparagină, descris mai sus, normalizat la 10⁸ spori/ml după numărare la camera Thoma. Aplicarea s-a realizat cu ajutorul unui pistol de stropit cu sifon HVLP (Blue) (DeVilbiss, Glendale Heights, IL, SUA), prevăzut cu ac de 14 G. Tratamentele au fost aplicate individualizat pe fiecare parcelă, folosind un atomizor portabil de spate Stihl SR430 (Stihl AG&Co Kg, Dieburg, Germania), compoziția A1 fiind aplicată ca soluție 0,25% și 0,5%, în volum echivalent celui de 400 l/ha.

Cultura de porumb a fost menținută până la maturitate. S-au recoltat știuleți de porumb, s-au desfăcut boabele de pe știuleți și s-au uscat la temperatura de 35°C, timp de 7 zile, până la 14% umiditate. Din fiecare repetiție au fost prelevate probe de porumb reprezentative, care

RO 131830 B1

au fost măcinate până la o granulație de 20 mesh (0,85 mm), folosind o moară Retsch (Grindomix, Retsch, Haan, Germania). În probe s-a determinat conținutul de aflatoxină B₁, după extragere în soluție acetone-tril - apă (9 + 1), prepurificare cu coloană de curățare multifuncțională (Mycosep™, Romer Labs Inc., Union, MT, USA), derivatizare și determinare prin HPLC cu detector de fluorescență (AOAC Official Method 994.08, 2000, 17th edition, volume II, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA).

În probele de porumb măcinate s-a determinat și fumonisina B₁, prin extracție cu metanol - acetone-tril - apă (25 + 25 + 50, v/v/v), prepurificare pe coloană de imunoafinitate, evaporare la sec a eluatului de pe coloană, reluarea rezidului în acetone-tril - apă (50 + 50, v/v), derivatizare și analiză prin lichid cromatografie cu fază inversă și detector de fluorescență (Visconti et al., 2001, J. AOAC Int. 84: 1828-1837).

Numărul de boabe infestate intern cu fungi aflatoxigeni a fost estimat după dezinfectarea suprafeței boabelor de porumb prin spălări repetate cu hipoclorit de sodiu și apă distilată sterilă. Boabele dezinfectate au fost depuse pe mediu agarizat cu zinc - gelatin-peptonă, ciclodextrină, cloramfenicol și dicloran (**Oancea și Ștefan, brevet RO 0123355**), câte 12 boabe pentru o placă Petri Ø 9 cm (360 de boabe per repetiție). După incubare 7 zile la 28°C, s-au examinat plăcile în lumină ultravioletă, pentru a evidenția creșterea fungilor aflatoxigeni și producerea de micotoxine de către aceștia.

Datele au fost analizate folosind pachetul software SAS/STAT (SA Institute, Carry, NC, SUA). Pentru a stabili variabilitatea datelor, a fost folosită transformarea logaritmică [$\log(y + 1)$] pentru toate datele referitoare la conținutul de micotoxine. Datele au fost analizate folosind procedura ProGLM. Toate datele referitoare la contaminarea cu micotoxine au fost raportate ca medie geometrică (anti-logaritmul mediei logaritmice), pentru că această medie reprezintă cel mai bine tendința centrală/ valoarea tipică a unui set de numere. Mediile fiecărei variante au fost separate folosind testul diferenței pentru P = 0,05.

Rezultatele experimentului sunt prezentate în tabelul 7 de mai jos.

Tabelul 7

Contaminarea cu micotoxine, aflatoxină B₁ și fumonisină B₁, și infecția cu fungi aflatoxigeni a probelor reprezentative din diferitele variante experimentale

Varianta experimentală	Conținut aflatoxină B ₁ (μg/kg)	Conținut fumonisină B ₁ (μg/kg)	% infecție boabe fungi aflatoxigeni
Neinoculat, tratat cu apă înainte de injectare	4,5c	280a	0,6c
Neinoculat, tratat cu apă după injectare	5,8c	230a	0,6c
Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038, 3 ml x 10 ⁸ spori/ml, tratat cu apă înainte de injectare	67a	320a	7,3a
Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038, 3 ml x 10 ⁸ spori/ml, tratat cu apă după injectare	73a	340a	7,9a
Neinoculat, tratat compoziție A1, cf. ex. 1, 1 kg/ha, înainte de injectare	1,2c	20bc	0,4c

Tabelul 7 (continuare)

Varianta experimentală	Conținut aflatoxină B ₁ (μg/kg)	Conținut fumonisină B ₁ (μg/kg)	% infecție boabe fungi aflatoxigeni
Neinoculat, tratat compoziție A1, cf. ex. 1, 1 kg/ha, după injectare	1,7c	30bc	0,7c
Neinoculat, tratat compoziție A1, cf. ex. 1, 2 kg/ha, înainte de injectare	1,2c	5c	0,4c
Neinoculat, tratat compoziție A1, cf. ex. 1, 2 kg/ha, după injectare	1,3c	10c	0,6c
Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038, 3 ml x 10 ⁸ spori/ml, tratat compoziție A1, cf. ex. 1, 1 kg/ha, înainte de injectare	6c	25bc	1,8bc
Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038, 3 ml x 10 ⁸ spori/ml, tratat compoziție A1, cf. ex. 1, 1 kg/ha, după injectare	15bc	30bc	3,7b
Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038, 3 ml x 10 ⁸ spori/ml, tratat compoziție A1, cf. ex. 1, 2 kg/ha, înainte de injectare	4c	10c	0,7c
Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038, 3 ml x 10 ⁸ spori/ml, tratat compoziție A1, cf. ex. 1, 2 kg/ha, după injectare	5c	15c	0,8c
DL5%	12,3	18,8	2,7

Rezultatele demonstrează eficacitatea compoziției realizate conform exemplului 1, în reducerea producerii de micotoxine la porumb înainte de recoltare. Aplicarea compoziției, la ambele doze testate în variantele neinoculate, a determinat reducerea contaminării porumbului cu aflatoxină B₁, în condițiile anului experimental 2012, caracterizat prin condiții de secetă favorabile contaminării cu aflatoxine sub limitele stabilite prin Regulamentul UE nr. 165/2010. Aplicarea compoziției conform exemplului 1 la doza de 2 kg/ha a determinat reducerea sub limita maximă prevăzută pentru porumbul care urmează a fi sortat sau supus altui tratament fizic, înaintea consumului uman sau a utilizării ca ingrediente în produse alimentare, inclusiv pentru situația inoculării cu o tulpină producătoare de aflatoxine. De asemenea, aplicarea compoziției a determinat reducerea semnificativă a infecției cu fungi aflatoxigeni și a contaminării cu fumonisine a porumbului înainte de recoltare.

S-a realizat și un experiment pentru verificarea eficacității compoziției propuse în reducerea producerii de tricotecene la grâu înainte de recoltare. Experimentul s-a realizat în anul agricol 2012/2013, pe loturi experimentale de 25 m², la Fundulea, folosind grâu de toamnă (*Triticum aestivum* L), cultivar Boema. Cultura premergătoare a fost soia. Norma de însămânțare a fost de 480...500 boabe germinabile pe mp. Sămânța a fost tratată cu echivalent 2,5 l/t dintr-un produs care conținea 12 g/l tebuconazol și 210 g/l imidacloprid (Nuprid Max AI 222 FS, Nufarm Srl, București, România). Solul din loturile experimentale a fost un cernoziom cambic, cu caracteristici deja prezentate. Din punct de vedere al temperaturilor, sezonul 2012/2013 nu a prezentat variații semnificative, temperaturile fiind puțin peste normal în timpul lunilor de iarnă, și cu excedent de precipitații mai mare de 50 mm pe perioada de

RO 131830 B1

vegetație a grâului. Solul a fost fertilizat cu 200 kg/ha echivalent îngrășământ complex NPK 15:15;15 (Azomureș, Târgu-Mureș, România) înainte de însămânțare. Au fost aplicate tehnologii de lucru conservative, cu eliminarea arăturii cu întoarcerea brazdei, prin pregătirea patului germinativ prin discuire cu disc greu. La înfrățire s-a aplicat un erbicid pe bază de amidosulfuron 100 g/l + iodossulfuron-metil-Na 25 g/l + mefenpyr-dietil 250 g/l (Sekator Progress OD, Bayer Crop Science, Monheim am Rhein, Germania) în doză echivalentă a 0,1 l/ha. Pentru combaterea bolilor foliare s-a aplicat un singur tratament la GS39 (frunza standard dezvoltată complet), folosindu-se un produs cu 250 g/l sprioxamină + 167 g/l tebuconazol + 43 g/l triadimenol (Falcon 460 EC, Bayer Crop Science), aplicat în doză de 0,6 l/ha. Împreună cu tratamentul de boli foliare s-a aplicat și insecticid pe bază de tiaclopid 100 g/l și deltametrin 10 g/l (Proteus, Bayer Crop Science), în doză de 0,4 l/ha.

Experimentul de testare a efectului compoziției la grâu a fost organizat în blocuri randomizate, în pătrat latin, 4 variante în 4 repetiții. Compoziția A1, conform exemplului 1, s-a aplicat în trei doze, 0,5 kg/ha, 1,0 kg/ha și 2 kg/ha. S-a lucrat față de un martor la care s-a aplicat numai stropire cu apă. Tratamentele s-au aplicat în fenofaza GS59 folosind un atomizor portabil de spate Stihl SR430 (Stihl AG&Co Kg, Dieburg, Germania), în volum echivalent celui de 400 l/ha. În finalul ciclului de vegetație s-a recoltat separat fiecare repetiție, și s-au uscat la temperatura de 35°C, timp de 7 zile, până la 14% umiditate. Din fiecare repetiție au fost preluate probe de boabe de grâu reprezentative, care au fost măcinate până la o granulație de 20 mesh (0,85 mm), folosind o moară Retsch (Grindomix, Retsch, Haan, Germania). În probe s-a determinat conținutul de aflatoxină B₁, după extragere în soluție acetone-tril - apă (84:16, v/v), prepurificare cu coloană de curățare multifuncțională (Mycosep™, Romer Labs Inc., Union, MT, USA), și determinare prin HPLC cu detector de fluorescență (Mateo et al., 2002, J. Chromatogr., A, 955:245).

Datele au fost analizate prin aplicarea modelului liniar general, pentru a se determina valorile medii și diferențele semnificative la un nivel de probabilitate de 5% (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 8 de mai jos.

Tabelul 8

*Efectul aplicării compoziției realizate conform invenției, asupra contaminării cu tricotecene la grâu (ev. Boema)**

Varianta experimentală	Conținut DON (ng/kg)	Conținut AcDON (ng/kg)
Martor, tratat cu apă	628,2a	20,5a
Compoziția A1, cf. Ex.1, echiv. 0,5 kg/ha	294,5b	10,8b
Compoziția A1, cf. Ex.1, echiv. 1 kg/ha	202,4bc	5,87c
Compoziția A1, cf. Ex.1, echiv. 2 kg/ha	132,7c	4,25c

*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P > 0,05; DON, deoxinivalenol; 3-AcDON, 3-acetil-deoxinivalenol.

Rezultatele obținute demonstrează eficacitatea compoziției obținute conform exemplul 1, în reducerea producerii de tricotecene de către fungii toxigeni din grupul *F. graminearum* care infectează grâul în timpul vegetației.

Exemplul 3

A fost realizat un experiment pentru a se verifica eficacitatea compoziției realizate în reducerea producerii de micotoxine de către fungii care se dezvoltă în recolta depozitată de porumb și de orz. Experimentul pe porumb a urmărit efectul compoziției A1 asupra producerii

RO 131830 B1

1 de zearalenonă și deoxinivalenol de către tulpina *F. graminearum* DSM 4529. Boabele de
porumb (ev. Mostiștea) au fost sterilizate prin iradiere la 12 kGy, și menținute aseptice la 4°C.
3 Boabele de porumb au fost testate pentru sterilitate și absența micotoxinelor. Boabele de
porumb au fost rehidratate până la niveluri a_w de 0,900, distribuite aseptice în flacoane
5 erlenmeyer sterile, de 1000 ml, tratate cu compoziția A1 în doze echivalente a 2 și 4 kg/t, și
amestecate viguros pentru omogenizarea tratamentului. S-a lucrat față de un martor tratat cu
7 apă distilată sterilă, echivalent 4 kg/t. Câte 70 g din boabele tratate au fost distribuite în plăci
Petri Ø 20 cm, într-un strat uniform care acoperea întreaga placă. Boabele de porumb au fost
9 inoculate cu un disc de 5 mm, prelevat dintr-un gazon de cultură *F. graminearum* DSM 4529,
de 7 zile pe mediu cartof-glucoză-agar, transferate aseptice în centrul fiecărei plăci Petri cu
11 boabe de porumb. Plăcile Petri cu boabe de porumb și inocul au fost trecute în exsiccatoare cu
soluție de glicerol-apă care avea o activitate a apei de 0,900. Plăcile au fost incubate pentru
13 35 zile la 25°C. După 35 zile s-a procedat la prelevarea de probe din care s-a determinat
zearalenona și deoxinivalenolul, prin folosirea metodelor AOAC 972-26 și AOC 978-22. Analiza
15 rezultatelor s-a realizat prin analiza variantei (ANOVA), folosind pachetul software SAS/STAT
(SA Institute, Carry, NC, SUA). Rezultatele prezentate în tabelul 9 de mai jos demonstrează
17 eficacitatea compoziției A1 realizate conform exemplului 1, în limitarea producerii de
deoxinivalenol și zearalenonă în porumbul depozitat.

Tabelul 9

21 *Influența aplicării compoziției realizate conform invenției, asupra producerii de zearalenonă
și deoxinivalenol de către tulpina *F. graminearum* DSM 4529,
23 inoculată pe boabe de porumb tratate**

Varianta experimentală	Conținut DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$) la 35 zile	Conținut ZEN ($\mu\text{g}/\text{kg}$) la 35 zile
Martor, tratat cu apă	1872a	672a
Compoziția A1, cf. ex. 1, echiv. 2 kg/t	793b	324b
Compoziția A1, cf. ex. 1, echiv. 4 kg/t	624b	215b

*Valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P>0,05$; DON, deoxinivalenol; ZEN - zearalenonă.

29 S-a realizat un experiment similar pe boabe de orz, în care s-a urmărit efectul
31 compoziției A1 asupra producerii de ochratoxină A de către tulpina *Aspergillus ochraceus* MUCL
39539. Boabele de orz (cv. Amiral) au fost sterilizate prin iradiere la 12 kGy și menținute aseptice
33 la 4°C. Boabele de orz au fost testate pentru sterilitate și absența micotoxinelor. Boabele de orz
au fost rehidratate până la niveluri a_w de 0,900, distribuite aseptice în flacoane erlenmeyer sterile,
35 de 1000 ml, tratate cu compoziția A1 în doze echivalente a 2 și 4 kg/t, și amestecate viguros,
pentru omogenizarea tratamentului. S-a lucrat față de un martor tratat cu apă distilată sterilă,
37 echivalent 4 kg/t. Câte 70 g din boabele tratate au fost distribuite în plăci Petri Ø 20 cm, într-un
strat uniform care acoperea întreaga placă. Boabele de orz au fost inoculate cu un disc de
39 5 mm, prelevat dintr-un gazon de *A. ochraceus* MUCL 39539, de 7 zile pe mediu cartof-glucoză-
agar, transferate aseptice în centrul fiecărei plăci Petri cu boabe de orz. Plăcile Petri cu boabe
41 de orz și inocul au fost trecute în exsiccatoare cu soluție de glicerol-apă care avea o activitate
a apei de 0,900. Plăcile au fost incubate pentru 25 zile la 25°C. După 25 zile s-a procedat la
43 prelevarea de probe din care s-a determinat ochratoxina A prin folosirea unei metode de
cromatografie de înaltă presiune, cu detector de fluorescență (Ocnaru et al., 2014, Rev. Chim.,

RO 131830 B1

65:607-619). Analiza rezultatelor s-a realizat prin analiza variantei (ANOVA), folosind pachetul software SAS/STAT (SA Institute, Carry, NC, SUA). Rezultatele prezentate în tabelul 10 de mai jos demonstrează eficacitatea compoziției A1 realizate conform exemplului 1, în limitarea producerii de ochratoxină în orzul depozitat.

Tabelul 10

*Influența aplicării compoziției realizate conform invenției asupra producerii de ochratoxină de către tulpina A. ochraceus MUCL 39539 inoculată pe boabe de orz tratate**

Varianta experimentală	Conținut ochratoxină A (μg/kg) la 25 zile
Martor, tratat cu apă	22,4a
Compoziția A1, cf. ex. 1, echiv. 2 kg/t	6,2b
Compoziția A1, cf. ex. 1, echiv. 4 kg/t	4,7b

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

Analiza organoleptică a probelor tratate nu a relevat pregnanța aromei specifice uleiurilor esențiale utilizate pentru obținerea compoziției A1, conform exemplului 1. Această percepție redusă a componentelor de aromă este datorată dozelor reduse folosite, ca și efectului de mascare exercitat de maltol, care amplifică astfel componentele de aromă specifice pentru cereale.

Revendicări

1. Compoziție pentru limitarea producerii de micotoxine, **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din: 42,1 părți de esteri etilici ai acizilor grași din ulei de in, 15 părți lecitină, 13,7 părți alcool etilic, 6 părți ulei esențial de muguri florali de *Syzygium aromaticum*, 6 părți ulei esențial de flori de *Ageratum houstonianum*, 5,6 părți săruri de potasiu ale acizilor grași exprimate ca oleat, 3,9 părți glicerol, 3,3 părți trigliceride, 3 părți maltol, 0,5 părți apă, diferența până la 100 părți fiind substanțe nesaponificabile și săruri.

2. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** din esterii etilici de ulei de in cel puțin 64% sunt esteri etilici ai acidului α -linolenic, lecitina are o balanță hidrofili-lipofilă HLB mai mare de 8, uleiul esențial de muguri florali de *Syzygium aromaticum* conține cel puțin 75% eugenol, iar uleiul esențial de flori de *Ageratum houstonianum* are un conținut de minimum 75% precocen total, din care minimum 30% precocen II, 6,7-dimetoxi-2,2-dimetilcromen.

3. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** inhibă producerea de aflatoxine și fumonisine la porumb înainte de recoltare, prin aplicare de doze cuprinse între 1 și 2 kg/ha.

4. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** inhibă producerea de tricotecene la grâu înainte de recoltare, și în special DON, deoxinivalenol și 3-AcDON, 3-acetil-deoxinivalenol, prin aplicare de doze cuprinse între 0,5 și 2 kg/ha.

5. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** inhibă producerea de zearalenonă și deoxinivalenol în porumbul depozitat, prin aplicare în doze cuprinse între 2 și 4 kg/t.

6. Compoziție conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** inhibă producerea de ochratoxină în orzul depozitat, prin aplicare în doze cuprinse între 2 și 4 kg/t.

7. Procedeu de obținere a compoziției definite în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: transesterificarea uleiului de in cu alcool etilic în exces 200%, pentru a forma o masă de reacție (R1), în prezență de hidroxid de potasiu, în autoclavă, la 40°C, timp de 8 h, în atmosferă protectoare de azot; răcirea masei de reacție în care este menținută glicerina și celelalte coproduse ale reacției de transesterificare, ca și excesul de alcool etilic, și neutralizarea excesului de hidroxid de potasiu din 500 g de masă de reacție (R1) cu 37 g acid oleic, pentru a forma un produs intermediar (R2); amestecarea produsului intermediar (R2) cu celelalte ingrediente în următoarele proporții: 140 g produs intermediar (R2), cu 30 g lecitină din soia, cu o balanță hidrofili-lipofilă HLB mai mare de 8,12 g ulei esențial de muguri florali *Syzygium aromaticum*, ce are un conținut de minimum 75% eugenol, 12 g ulei esențial de flori de *Ageratum houstonianum*, ce are un conținut de minimum 75% precocen total, din care minimum 30% precocen II, 6,7-dimetoxi-2,2-dimetilcromen, 6 g maltol-3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-onă, și omogenizarea lor prin agitare viguroasă, pentru a se forma compoziția cu acțiune de inhibare a producerii de micotoxine.

