



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2013 00846

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

(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:
• 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

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție pentru limitarea producerii de micotoxine, și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția conform invenției este constituită din 42,1 părți esteri etilici ai acizilor grași din ulei de in, 15 părți lecitină, 13,7 părți alcool etilic, 6 părți ulei esențial de muguri floral 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

manitol, 0,5 părți apă și, în rest, până la 100 părți, substanțe nesaponificabile și săruri. Procedeu conform invenției constă în utilizarea unui exces de alcool în reacția de transesterificare, cu menținerea produselor de transesterificare și a excesului de alcool etilic, și amestecarea masei de reacție rezultate, cu uleiuri esențiale, lecitină și manitol.

Revendicări: 7



COMPOZIȚIE PENTRU LIMITAREA PRODUCERII DE MICOTOXINE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA

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 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.

Sunt cunoscute diferite compoziții sau procedee de utilizare a unor compoziții pentru limitarea / inhibarea producerii de micotoxine de către fungi micotoxigeni. 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 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 este alcătuită din 15...100% principii active din categoria celor menționate mai sus, 0...10% dintr-un agent care reduce evaporarea principiului activ, 0...85% dintr-un agent tensioactiv, ales 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, esterii alchilici (C₁-C₆) ai acizilor alcanici 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 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 având eficiență în prevenirea producerii și decontaminarea produselor agricole stocate cu ochratoxină A, deoxinivalenol, aflatoxine, zearalenonă, tricotecene, fumosinine, citrinină, acid penicilic, vomitoxină, patulină.

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-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 decorativă originară din Mexic cunoscută sub denumirea de pufuleți albaștri, sau ulei esențial de mușețel, *Matricaria recutita*). Precocen-ul era cunoscut ca fiind un inhibitor al sintezei

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 3-acetil deoxinivalenol (ADON) și deoxinivalenol (DON), de către fungi toxigeni din grupul *Fusarium graminearum*.

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 Cabral *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 care 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 utilizări 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 ex. 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 CN102058016 revendică o compoziție care include 150-180 părți de di-acetat 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 care 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 ex. review-ul Voloshuk și Shim, 2013, FEMS Microb. Rev. 37:94-109. Speciile micotoxigene din genul *Fusarium* de ex. 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 funghi 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 porumb, este larg folosită în lanțul alimentar (stresul hidric al plantelor de cultură și temperaturile ridicate, caracteristice perioadelor de secetă, favorizează infecția cu funghi din grupul *Aspergillus* section *Flavi* și formarea de aflatoxine – a se vedea de ex. review-ul Guo *et al.*, 2008, J. Integr. Plant Biol. 50:1281-1291).

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 acestor uleiuri extrase din material vegetal la produse compatibile.

Sunt deci necesare compoziții pe bază de componente provenite din bioresurse regenerabile, utilizabile pentru limitarea producerii de micotoxine, care să prezinte următoarele caracteristici: (i) o rezistență intrinsecă la biodegradare în timpul stocării; (ii) inhibarea (per)oxidării legăturilor duble din lanțurile hidrocarbonate ale lipidelor constituente; (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 agro-alimentare depozitate; (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. Sunt necesare și procedee pentru obținerea unor astfel de compoziții, care să nu genereze co-produse și care să aibă consumuri energetice specifice cât mai mici.

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 *Syzygium aromaticum*, 6 părți ulei esențial de flori de *Ageratum houstonianum*, 5,6 părți săruri de potasiu ale acizi 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.

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 de *Ageratum houstonianum* are un conținut de minimum 75% precocen total, din care min 30% precocen II, 6, 7-dimetoxi-2, 2-dimetilcromen.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Trans-esterificarea uleiului de in cu alcool etilic în exces cu alcool etilic 200% în exces față de reacția de trans-esterificare pentru a forma masa de reacție (R1), în prezență de hidroxid de potasiu, în autoclavă la 40°C, timp de 8 ore, în atmosferă protectoare de azot;
- ✓ Răcirea masei de reacție în care este menținută glicerina și celelalte co-produse ale reacției de trans-esterificare, ca și excesul de alcool etilic, și

neutralizarea excesului de hidroxid de potasiu din 500 g de masă de reacție (R1) formată la trans-esterificarea uleiului de in cu 37 g acid oleic pentru a forma produsul 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 hidrofil - lipofilă HLB mai mare de 8, 12 g ulei esențial de muguri florali *Syzygium aromaticum*, care are un conținut de minimum 75% eugenol, 12 g ulei esențial de flori de *Ageratum houstonianum*, care 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, și omogenizarea lor prin agitare viguroasă pentru a se forma compoziția cu acțiuni de inhibare a producerii de micotoxine.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- 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 micro-organisme spoliatoare;
- Conduce la obținerea unei compoziții care prezintă caracteristici superioare în limitarea producerii de micotoxine, datorită interacțiunilor dintre diferitele ingrediente active;
- Inhibă (per)oxidarea legăturilor duble din lanțurile hidrocarbonate ale lipidelor constituente datorită activității antioxidante a maltolului și a uleiului esențial de *Syzygium aromaticum*;
- 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;
- Maschează aroma uleiurilor esențiale transmisă cerealelor boabe datorită prezenței maltolului, care este un compus care amplifică aroma specifică produselor în care sunt prelucrate cerealele;
- Determină o bună comportare tehnologică a soluțiilor de stropit rezultate prin diluarea compoziției conform invenției, datorită: (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; (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 (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;

- Permite aplicarea atât pentru limitarea producerii de micotoxine în timpul vegetației, cât și pentru prevenirea producerii de micotoxine în produsele agro-alimentare depozitate;
- Valorifică co-produsele din procesul de obținere a esterilor acizilor grași prin trans-esterificarea uleiurilor vegetale cu etanol, și în special glicerina, prin menținerea acestora în produsele intermediare și produsul final, cu beneficii pentru aplicarea prin stropire;
- Asigură randamente ridicate ale procesului de trans-esterificare care se desfășoară la temperaturi joase, cu risc redus de peroxidare a acizilor grași (poli)nesaturați și cu consumuri energetice scăzute;
- Permite formarea unor compoziții formate exclusiv din componente provenite din materii prime agricole regenerabile, care, după verificarea și asigurarea conformității, poate fi certificată pentru sistemele de agricultură organică.

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

Exemplu 1. 1000 g de ulei degumat de in, cu caracteristicile prezentate în tabelul 1, este adus într-o autoclavă de 2 litri din oțel inox, cu sistem de agitare și de încălzire, sub atmosferă protectoare de azot.

Tab. 1. Caracteristicile uleiului degumat de in folosit.

Apă și compuși volatili	% m/m	0,4
Indice de refracție	-	1,469
Substanțe nesaponificabile	% m/m	1,54
Acizi grași liberi	% m/m	0,8
Indice de saponificare	mg KOH/g	188,5
Indice de iod	g I ₂ /100 g	185
Indice de peroxid	meq O ₂ /kg	0,95
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.		

Se dizolvă 25 g de hidroxid de potasiu de puritate 98% în 395 g de etanol cu 0,3% apă (200% în exces față de reacția de trans-esterificare), iar soluția rezultată este adăugată în autoclav peste uleiul degumat de in. Se pornește agitarea și încălzirea la 40°C. După un timp de reacție de 8 ore, masa de reacție se răcește la temperatura camerei. Se colectează 1415 g de masă transparentă de reacție (R1) cu următorul conținut (% m/m): esteri etilici de acizi grași 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 trans-esterificare 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.

Se formează o soluție clară, notată (R2), care are compoziția (% m/m): esteri etilici ai acizilor grași: 60,3; trigliceride 4,8; glicerol 5,5; etanol 19,5; săruri de potasiu ale acizi grași exprimate ca oleat 8; apă 0.7. 140 g produs intermediar (R2) este amestecat prin agitare viguroasă cu 12 g ulei esențial de muguri florali de cuișoare, *Syzygium aromaticum*, care are un conținut de minimum 75% eugenol, 12 g ulei esențial de flori de pufuleți albaștri, *Ageratum houstonianum*, care are un conținut de minimum 75% precocen total, din care min 30% precocen II, 6, 7-dimetoxi-2, 2-dimetilcromen, 6 grame maltol - 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-onă, 30 g lecitină de 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; săruri de potasiu ale acizi 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.

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

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 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, C18:3 (n-3); Trigliceride 4,2; Glicerol 4,9; săruri de potasiu ale acizi 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 tab. 2 de mai jos

Tab.2. Stabilitatea microbiologică a produsului realizat conform Ex.1

Produs	Inițial	24 zile	48 zile	72 zile	96 zile	120 zile	144 zile	168 zile	192 zile
Produs A1 conform Ex.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	$<10^3$	$<10^3$	$<10^3$	$3,7 \cdot 10^3$	$8,5 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^4$	$6,5 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^5$

Aceste rezultate demonstrează o stabilitate ridicată a produsului A1 realizat conform invenției, datorită prezenței alcoolului etilic care 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 anti-oxidanților, folosind kit-ul ACL furnizat de Analytik Jena. Activitatea anti-oxidantă a fost monitorizată pentru 180s și exprimată ca μ m 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-a 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 acizi grași exprimate ca oleat 6,6; lecitină 17,7%, apă 0,6, diferența până la 100 fiind substanțe nesaponificabile. Rezultatele sunt prezentate în tab. 3 de mai jos.

Tab. 3. Activitatea anti-oxidantă din compoziția A1 realizată conform exemplului 1.

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

Inhibarea peroxidării lipidelor de către anti-oxidanții 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 2×10^{-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 formați în timpul peroxidării legăturilor duble din acizii grași incluși în esterii etilici formați din ulei de in care oxidează ionii Fe^{2+} la Fe^{3+} . Ionii ferici reacționează cu tiocianatul formând complexul care are un maxim de absorbție la 500 nm. Analiza s-a repetat din 6 în 6 ore timp de 2 zile. Inhibarea peroxidării lipidelor de către anti-oxidanții 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 compoziții 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 anti-oxidanții 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, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,5 g/l, asparagină – 3 g/l, KH_2PO_4 0,75 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 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 cloformice au fost combinate, evaporate la sec, reziduu 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 martorului netratat. Rezultatele experimentului sunt prezentate în tab. 4.

Tab. 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 B ₁ (% față de martor)
Compoziție A1, obținută conform Ex.1, 10 μl/ml	56,3	100
Compoziție A1, obținută conform Ex.1, 5 μl/ml	61,1	100
Compoziție A1, obținută conform Ex.1, 1 μl/ml	57,8	100
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 ore. După 24 ore de ore nu s-a constatat o separare semnificativă a fazelor, iar capacitatea de re-emulsificare după acest timp a fost semnificativă. Apă 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 Ex.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.

Tab. 5. Caracteristicile cernoziomului cambic din câmpul experimental de la Fundulea.

Caracteristică	UM	Ap	Aph
Adâncime orizont	cm	0-18	18-30
Humus (C x 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

În zona experimentală de la Fundulea temperatura medie multianuală atmosferică este de 10,25°C, iar precipitații 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 ore înainte de aplicarea inoculării (1) și cu 24 ore după aplicarea tratamentului (2), fiecare

separat apoi în trei nivele ale tratamentului cu compoziția A1: (a) - 0%/apă; (b) - echivalent 1 kg/ha în 400 litri apă (soluție 0,25%); (c) - echivalent 1 kg/ha în 400 litri apă (soluție 0,5%). Randomizarea (sub)variantelor în trei repetiții este prezentată în tab. 6 de mai jos.

Tab. 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 1c 2c 2b 2a	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 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, pre-emergent un erbicid cu pethoxamid 300 g/l + terbutilazină 250 g/l (Successor T, Cheminova, Harboøre, 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 14G. 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-a 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 prelevat probe de porumb 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 acetonitril – apă (9+1), pre-purificare cu coloană de curățare multi-funcțională (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 – acetonitril – apă (25 + 25 + 50, v/v/v), pre-purificare pe coloană de imunoafinitate, evaporare la sec a eluatului de pe coloană, reluarea rezidului în acetonitril - 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 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.

Tab. 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 x10 ⁸ spori/ml, tratat cu apă înainte de injectare	67a	320a	7,3a
Inoculat <i>A. parasiticus</i> DSM 2038, 3 ml x10 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
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 x10 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 x10 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 x10 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 x10 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 cf. Ex.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 cf. Ex.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 pe 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 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 + iodosulfuron-metil-Na 25 g/l + mefenpyr-dietil 250 g/l (Sekator Progress OD, Bayer Crop Science, Monheim am Rhein, germani) în doză echivalentă a 0,1 l/ha. Pentru combaterea bolilor foliare s-a aplicat un singur tratament la GS39 (frunza stindard 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 tiacloprid 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 cf. Ex.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 prelevat 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), pre-purificare 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 analizat 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.

Tab. 8. Efectul aplicării compoziției realizate conform invenției asupra contaminării cu tricotecene la grâu (cv. Boema)*.

Varianta experimentală	Conținut DON (μg/kg)	Conținut AcDON (μg/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 Ex.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 de zearalenonă și deoxinivalenol de către tulpina *F. graminearum* DSM 4529. Boabele de porumb (cv. Mostiștea) au fost sterilizate prin iradiere la 12 kGy și menținute aseptice la 4°C. Boabele de porumb au fost testate pentru sterilitate și absența micotoxinelor. Boabele de porumb au fost rehidratate până la nivele a_w de 0,900, distribuite aseptice în flacoane erlenmeyer sterile de 1000 ml, tratate cu compoziției A1 în doze echivalente a 2 și 4 kg/tonă, și amestecate viguros pentru omogenizarea tratamentului. S-a lucrat față de un martor tratat cu apă distilată sterilă, echivalent 4 kg/tonă. Câte 70 g din boabele tratate au fost distribuite în plăci Petri Ø20 cm, într-un strat uniform care acoperea întreaga placă. Boabele de porumb au fost 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 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 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 rezultatelor s-a realizat prin analiza varianței (ANOVA), folosind pachetul software SAS/STAT (SA Institute, Carry, NC, SUA). Rezultatele prezentate în tab. 9 de mai jos demonstrează eficacitatea compoziției A1 realizate conform Ex.1 în limitarea producerii de deoxinivalenol și zearalenonă în porumbul depozitat.

Tab. 9. Influența aplicării compoziției realizate conform invenției asupra producerii de zearalenona și deoxinivalenol de către tulpina *F. graminearum* DSM 4529 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/tonă	793b	324b
Compoziția A1, cf. Ex.1, echiv. 4 kg/tonă	624b	215b

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

S-a realizat un experiment similar pe boabe de orz, în care a urmărit efectul 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 la 4°C. Boabele de orz au fost testate pentru sterilitate și absența micotoxinelor. Boabele de orz au fost rehidratate până la nivele a_w de 0,900, distribuite aseptice în flacoane erlenmeyer sterile de 1000 ml, tratate cu compoziției A1 în doze echivalente a 2 și 4 kg/tonă, și amestecate viguros pentru omogenizarea tratamentului. S-a lucrat față de un martor tratat cu apă distilată sterilă, echivalent 4 kg/tonă. Câte 70 g din boabele tratate au fost distribuite în plăci Petri Ø20 cm, într-un strat uniform care acoperea întreaga placă. Boabele de orz au fost inoculate cu un disc de 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 de orz și inocul au fost trecute în exsicator 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 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., 65:607-619). Analiza rezultatelor s-a realizat prin analiza varianței (ANOVA), folosind pachetul software SAS/STAT (SA Institute, Carry, NC, SUA). Rezultatele prezentate în tab. 10 de mai jos demonstrează eficacitatea compoziției A1 realizate conform Ex.1 în limitarea producerii de ochratoxină în orzul depozitat.

Tab. 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 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) la 25 zile
Martor, tratat cu apă	22,4a
Compoziția A1, cf. Ex.1, echiv. 2 kg/tonă	6,2b
Compoziția A1, cf. Ex.1, echiv. 4 kg/tonă	4,7b

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

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

REVENDICĂRI

1. Compoziție conform invenției **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 acizi 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 esteri etilici de ulei de in cel puțin 64% 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 de *Ageratum houstonianum* are un conținut de minimum 75% precocen total, din care min 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/tonă.
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/tonă.
7. Procedeu de obținere a compoziției conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: Trans-esterificarea uleiului de in cu alcool etilic în exces cu alcool etilic 200% în exces față de reacția de trans-esterificare pentru a forma masa de reacție (R1), în prezență de hidroxid de potasiu, în autoclavă la 40°C, timp de 8 ore, în atmosferă protectoare de azot; Răcirea masei de reacție în care este menținută glicerina și celelalte co-produse ale reacției de trans-esterificare, ca și excesul de alcool etilic, și neutralizarea excesului de hidroxid de potasiu din 500

g de masă de reacție (R1) formată la trans-esterificarea uleiului de in cu 37 g acid oleic pentru a forma produsul 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 hidrofil - lipofilă HLB mai mare de 8, 12 g ulei esențial de muguri floriali *Syzygium aromaticum*, care are un conținut de minimum 75% eugenol, 12 g ulei esențial de flori de *Ageratum houstonianum*, care 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, și omogenizarea lor prin agitare viguroasă pentru a se forma compoziția cu acțiune de inhibare a producerii de micotoxine.