



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 00562**

(22) Data de depozit: **31/07/2018**

(41) Data publicării cererii:  
**30/05/2019** BOPI nr. **5/2019**

(71) Solicitant:  
• **PANETONE S.R.L.**,  
STRADA NICOLAE ILIESU, NR.10, AP.2,  
TIMIȘOARA, TM, RO

(72) Inventatori:  
• **ALEXA ERSILIA CĂLINA**, STR. LETEA  
NR. 14, TIMIȘOARA, TM, RO;  
• **SUMĂLAN RENATA MARIA**,  
STR.BUJORILOR, NR.15, CERNETEAZ,  
TM, RO;  
• **LINTIA VASILE**,  
STRADA NICOLAE ILIEȘU, NR.10, AP.2,  
TIMIȘOARA, TM, RO;  
• **NEGREA MONICA**, STR.DUZILOR, NR.4,  
BECICHERECUL MIC, TM, RO;

• **OBIȘTIOIU DIANA MONICA**, STR.HAGA,  
NR.38, TIMIȘOARA, TM, RO;  
• **POIANĂ MARIANA ATENA**,  
CALEA SAGULUI, NR.85, BL.11, SC.G,  
ET.6, AP.28, TIMIȘOARA, TM, RO;  
• **RUS CRISTIAN**, STR.ORȘOVA, NR.26,  
TIMIȘOARA, TM, RO;  
• **TULCAN CAMELIA**,  
STR.SAMUIL SAGOVICI, NR.82,  
TIMIȘOARA, TM, RO

(74) Mandatar:  
**CABINET "CECIU GABRIELA"**  
**CONSULTANȚĂ ÎN DOMENIUL**  
**PROPRIETĂȚII INTELLECTUALE**,  
STR. M.LEONTINA BANCUI, NR.6, AP.110,  
TIMIȘOARA, JUDEȚUL TIMIȘ

(54) **PREPARATE NATURALE CU ACȚIUNE ANTIFUNGICĂ  
FOLOSITE CA AGENȚI DE PROTECȚIE ÎN CULTURILE  
LEGUMICOLE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la preparate naturale de tip nano-emulsii cu acțiune antifungică destinat culturilor legumicole, cu aplicare foliară și/sau radiculară, pe bază de uleiuri esențiale din familiile *Lamiaceae* și *Umbelifere* cu adaos de excipienți organici naturali: mărar - oregano, mărar - tymus, fenicul - tymus sau coriandru - satureja. Preparatele conform invenției sunt constituite dintr-un amestec de principii active reprezentate de uleiuri esențiale selectate din următoarele plante, exprimate în procente în greutate: mărar, fenicul, coliadru, oregano, cimbru (*Thymus vulgaris*) și cimbru (*Satureja hortensis*) în proporții de 0,3...2%, lecitină din soia în cantitate de 0,01...0,05%, gelatină între 0...0,05% și diferența până la 100% apă. Procedul conform invenției are următoarele etape:

a. sortarea matricilor vegetale, respectiv semințele, aparținând familiei *Umbelifere* și *herba* întregă provenită din inflorescențe și tulpini, aparținând familiei *Lamiaceae*, separarea acestora de impuritățile grosiere, uscate la temperatura ambiantă și măcinate cu o moară de laborator Grindomix Retsch la o turație de 1000 rot/min timp de 60 s,

b. extragerea uleiurilor esențiale volatile prin antrenare cu vapori de apă utilizând instalația de extracție Clevenger, având randamente de extracție cuprinse între 0,5...4%, urmată de ambalare, etichetare și depozitare la 2...4°C până la utilizarea în testele *in vitro*, *in vivo* și pentru obținerea emulsiilor,

c. prepararea nanoemulsiilor s-a realizat prin ultrasonicare la temperatura de 25°C cu ajutorul echipamentului Sonic Vibracel WCX130 cu puterea de 130 W și frecvența de 20 kHz, obținându-se 4 variante de lucru mărar - oregano, mărar - tymus, fenicul - tymus și coriandru - satureja care au fost utilizate pentru obținerea nanoemulsiilor împreună cu anumite proporții de lecitină și gelatină în funcție de matricea vegetală folosită.

Revendicări: 2  
Figuri: 1



# DOCUMENTAȚIE TEHNICĂ

BUCUREȘTI	
BUREAU DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr. a	2018 00 562
Data depozit	31-07-2018

## PREPARATE NATURALE CU ACȚIUNE ANTIFUNGICĂ FOLOSITE CA AGENȚI DE PROTECȚIE ÎN CULTURILE LEGUMICOLE

**Inventatori: Alexa Ersilia<sup>1</sup>, Sumalan Renata Maria<sup>1</sup>, Lintia Vasile<sup>2</sup>, Negrea Monica<sup>1</sup>, Obistoiu Diana<sup>1</sup>, Poiană Mariana Atena<sup>1</sup>, Rus Cristian<sup>1</sup> Tulcan Camelia<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara,

<sup>2</sup>SC Panetone SRL

### DESCRIEREA INVENTIEI

#### Context

Invenția se referă la produse naturale cu acțiune antifungică (PNA) pe bază de uleiuri esențiale (UEs) din plante medicinale și condimentare din familiile Lamiaceae și Umbelifere care exercită efect protectiv împotriva speciei de fungi *Verticillium dahliae* din culturile legumicole din spații protejate sau câmp deschis, precum și la un procedeu de obținere a PNA printr-o metodă compatibilă cu agricultura organică.

În cazul produselor legumicole incidența fungică ridicată se referă la contaminarea cu specii de *Verticillium*. *Verticilioza* sau ofilirea verticiliană reprezintă o boală infecțioasă a plantelor, care afectează peste 300 de specii de plante, provocată în special de *Verticillium dahliae*, al cărui miceliu se dezvoltă în organele conducătoare, împiedicând circulația sevei. Pierderile economice provocate de atacul de *Verticilioză* reprezintă până la 50% din total pierderi în special la cultura de tomate afectată de *Verticillium dahliae* [1-4].

Utilizarea preparatelor naturale în prevenția poluării biologice a produselor de origine vegetală prezintă o deosebită importanță în promovarea agriculturii organice și a unui stil de viață sănătos. Piața produselor ecologice s-a aflat în continuă expansiune în ultimele două decenii atingând în acest răstimp scurt, cote de piață de până la 10-12%. Pe lângă beneficiile sociale și de mediu aduse, agricultura ecologică poate să reprezinte cheia integrării europene a agriculturii românești. Resursele naturale deosebite, varietatea condițiilor de sol și climatice, relativa nepoluare a terenurilor agricole din ultimii 15 ani, forța de muncă ieftină existentă precum și

proximitatea piețelor de desfacere europene, par să ofere României climatul ideal pentru pătrunderea pe piața Europeană.

În ultimii ani, uleiurile esențiale (UEs) din diferite plante au fost testate în prevenția dezvoltării de funghi pe produsele de origine vegetală [5]. UEs reprezintă un complex de compuși volatili biosintetizați de plante care includ substanțe din clase terpenelor, terpenoidelor, compuși alifatici și aromatici cu masă moleculară mică și care reprezintă surse naturale de compuși biologic activi cu capacitate antioxidantă ridicată [6-7]. Absența toxicității recomandă utilizarea uleiurilor esențiale ca și agenți de protecție antifungică a matricelor vegetale.

Plecând de la aceste considerente cercetările noastre dezvoltate în această invenție sunt centrate pe efectul antifungic și fungicidal *in vivo* al uleiurilor esențiale asupra *Verticillium dahlie*, dar și asupra altor funghi dezvoltate în culturile legumicole, în scopul obținerii unor preparate comerciale testate care să reprezinte alternative viabile la preparatele de sinteză.

### **Partea experimentală**

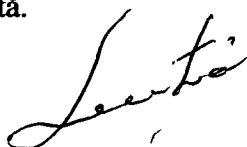
Partea experimentală a invenției revendicate a presupus realizarea următoarelor etape:

- A. Obținerea unor preparate naturale cu acțiune antifungică (PNA) extrase din plante medicinale și condimentare aparținând familiilor botanice Lamiaceae și Umbelifere;
- B. Evaluarea potențialului antifungic, fungistatic și fungicidal *in vitro* asupra *Verticillium dahlie* a UEs constitutive și a PNA
- C. Evaluarea potențialului antifungic *in vivo* în condiții controlate, stabilirea efectelor fitotoxice a preparatelor naturale și a efectelor asupra producției și a indicilor calitativi la cultura de tomate.

#### ***A. Obținerea preparatelor naturale cu acțiune antifungică (PNA) extrase din plante medicinale și condimentare aparținând familiilor botanice Lamiaceae și Umbelifere***

În această etapă s-au obținut nanoemulsiile pe bază de uleiuri esențiale aparținând familiei Umbelifere (*Coriandrum sativum*, *Anethum graveolens*, *Feniculum vulgare*) și familia Lamiaceae (*Satureja hortensis*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*) conform procedurii descrisă mai jos și pentru care se solicită drept de proprietate intelectuală.

Au fost obținute 4 variante de lucru: G-M-O/ (mărar- oregano); G-M-T/(marar-tymus); G-F-T (fenicul-tymus); G-C-S/(coriandru-satureja). Două substanțe emulsifiante (lecitină și gelatină) au fost utilizate în obținerea nanoemulsiilor în diferite proporții în funcție de matricea vegetală folosită.



**B. Evaluarea potentialului antifungic, fungistatic si fungicidal in vitro asupra *Verticillium dahliae* a UEs constituyente si a PNA**

UEs de fenicul (*Feniculum vulgare*), familia Umbeliferae, a dovedit o stimulare a cresterii fungului *Verticillium dahliae* pentru concentratiile 0,02, - 0,06%.. Creșterea miceliana, peste valoarea controlului cu 11%, s-a înregistrat la concentratiile 0,04 si 0,06% ulei fenicul in mediul de cultură. Incepand cu 0,1% se constata reducerea suprafetei miceliene in raport cu controlul, iar la concentratia de 0,6% valoarea SMN este 0, ceea ce reprezintă CMFs (rezultat confirmat prin transferul miceliului pe mediu neaditionat).

Aceelasi efect, de stimulare în doze reduse, a fost constatat si in cazul uleiului de mărar (*Anethum graveolens*). La 0,02% concentratie se stimuleaza cresterea miceliului fungic, însa începînd de la 0,04% asistam la inhibare progresiva cu crestrea concentrației de ulei in mediu. La 0,5% se atinge CMFs, efectul fungistatic menținându-se si la 0,6%.

UEs de coriandru (*Coriandrum sativum*), aparținând familiei Umbeliferae, a dovedit efect inhibitor pentru cresterea fungică, efectul fiind corelat cu cresterea concentrației de ulei. CMFs a fost stabilită la 0,4%.

UEs de *Satureja hortensis*, cimbru de grădină, a aratat un puternic efect antifungic. Inca de la 0,02% cresterea fungica a fost inhibata, fiind de doar 14%. Valoare CMFs este 0,06% iar la 0,1% efectul s-a dovedit efectul a fost fungicid (CMFg).

Oregano (*Origanum vulgare*) cunoscut in țara noastră sub denumirea de sovârf sau măghiran, aparținînd familiei Lamiaceae, este apreciat ca si condiment. Testările in vitro au dovedit un pronuntat efect antifungic, la 0,02% cresterea miceliului fiind de 40%. Valoarea CMFs este 0,06% iar la 0,1% dovedeste efect fungicid.

UE de cimbru de câmp (*Thymus vulgaris*) fam Lamiaceae, a dovedit un efect antifungic pronnțat, astfel la 0,02% valoare SMN este de 53% comparativ cu martorul, iar la 0,1% este 0 atingându-se CMFs. 0,2% reprezinta CMFg la care *Verticillium* nu se mai reface, concentratia avand efect fungicid total.

Testarea potentialului antifungic al preparatelor naturale obtinute a evidentiat faptul că in vitro emulsia pe bază de gelatină-mărar-thymus (GMT) prezintă eficiență maximă, urmată de amestecurile GMO (gelatină-mărar-oregano) si GFT (gelatină-fenicul-thymus).

Eficienta in vitro a preparatelor naturale asupra cresterii miceliului de *Verticillium* variază in ordinea: GMT> GFT> GMO=GCS.

**C. Evaluarea potentialului antifungic in vivo in conditii controlate, stabilirea efectelor fitotoxice a preparatelor naturale si a efectelor asupra productiei si a indicilor calitativi la cultura de tomate**

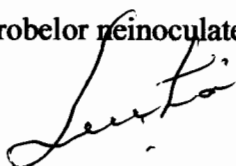
Eficienta protectiei antifungice a plantelor de tomate a fost urmarita pentru fungi endoparaziti, ce produc traheomicoze, evolutia bolii conducand la ofilirea/vestejirea plantelor, (ex *Fusarium oxisporum*, *Verticillium* sp) si ectoendoparazite obligate/facultative, ce se dezvoltă pe/in tesutul vegetal determinand aparitia decolorarilor, necrozelor, atrofiilor (ex *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani*, *Septoria lycopersici*, *Botrytis cinerea*, *Pythium*).

Experimentul s-a realizat in conditii controlate, in sera Phytotron, in vase de vegetatie inoculate cu microscleroti de *Verticillium*, în care s-au plantat răsaduri de tomate, soi ACE 55VF, urmarindu-se efectul fitotoxic in prezenta tratamentelor cu preparate naturale si efectul acestora asupra indicilor calitativi ai fructelor. Au fost efectuate mai multe tratamente (5) primul la transplantare in vase, urmatoarele la interval de 2 saptamani. O reinoculare cu suspensie sporala de *Verticillium* s-a efectuat la 6 săptămâni de la initierea experimentului.

Variantele experimentale utilizate, diluate 1/50, au fost: 1 -GFT; 2-GMT;3-GCS; 4- GMO. Rezultatele experimentale obtinute au evidentiat faptul că plantele de tomate supuse tratamentului cu produse naturale au fost protejate de infectia radiculara fungica ce determina ofilirea plantelor. Mai mult s-a constata ca tomatele tratate au inaintat mai repede vegetatie, inflorirea si fructificarea fiind mai timpurie cu 10 zile in timp ce pentru plantele martor s-a inregistrat doar crestere vegetativa. Concomitent cu efectele fitotoxice au fost urmărite si efectele stimulative ale PNA asupra principalilor indici de calitate al produselor finite obtinute, precum si a productiei. In acest sens, s-au determinat următorii indici fizico-chimici si biochimici: umiditatea, continutul de substante minerale exprimat ca si cenusa si continutul de polifenoli.

Rezultatele experimentale evidentiază faptul că probele supuse atacului cu *Verticillium* prezintă un continut de umiditate superior respectiv un procent de substanta uscată inferior probelor neinoculate. In cazul probelor neinoculate, dar tratate cu produse naturale, continutul de substanta uscată creste comparativ cu martorul, in toate variantele experimentale in ordinea: GFT<GCS<GMO<GMT.

In ceea ce priveste continutul de cenusa, care redă aportul de substante minerale, se observa ca atacul cu *Verticillium* influentează negativ acumularea substantelor minerale, nivelul acestora fiind inferior comparativ cu varianta neinoculată, atat in prezenta cat si in absenta tratamentului cu preparate naturale. In mod contrar, continutul de polifenoli inregistreaza un regres in cazul probelor neinoculate, ceea ce conduce la ideea ca mecanismele de apărare ale plantei in scopul



protejării de atacul fungic cu *Verticillium* conduce la o potentare a reacțiilor biochimice și metabolice de formare a compusilor polifenolici. Comparativ cu controlul, în varianta inoculată, produsele naturale au un efect de creștere a conținutului de polifenoli, în timp ce în variantele neinoculate se observă un nivel inferior matorului în cazul tratamentelor cu produse naturale. Efectul potentator asupra conținutului de polifenoli, al preparatelor pe baza de uleiuri esențiale, în cazul variantelor inoculate, crește în ordinea: CS<GMO<GMT<GFT. În cazul substanțelor minerale, comparativ cu controlul, creșterea conținutului este mai redusă și variază în ordinea: GCS<GFT<GMO<GMT.

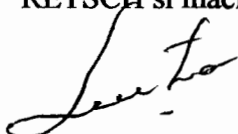
În **concluzie**, preparatele naturale exercită un efect protectiv asupra conținutului de polifenoli și substanțe minerale în cazul plantelor de tomate atacate de *Verticillium*, eficiența maximă, prin extrapolarea rezultatelor obținute, fiind asigurată de produsele GMT, CS și GFT.

Prin coroborarea datelor privind efectele protective împotriva dezvoltării atacului fungic și indicii calitativ și de productivitate la cultura de tomate, în prezența preparatelor naturale utilizate, recomandăm utilizarea emulsiilor GMT, GFT, GCS în concentrație de 1/50 cu aplicare în vegetație, respectiv concentrație 1/10 pentru protecție la rădăcină.

**Procedeu de obținere a unor preparate naturale cu acțiune antifungică (PNA).** Procedeu de obținere a preparatelor naturale presupune următoarele etape:

1. Obținerea uleiurilor esențiale din plante medicinale;
2. obținerea preparatelor naturale cu acțiune antifungică (PNA) de tip nanoemulsii pe baza de uleiuri esențiale din familiile Lamiaceae și Umbelifere, cu adaos de substanțe emulsionabile, prin tehnici compatibile cu agricultura organică.

Uleiurile esențiale s-au obținut din matrici vegetale aparținând familiei Umbelifere (*Coriandrum sativum*, *Anethum graveolens*, *Feniculum vulgare*) și familia Lamiaceae (*Satureja hortensis*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*). În cazul plantelor din familia Umbelifere materialul vegetal utilizat a fost constituit din semințe, iar pentru uleiurile obținute din plantele aparținând familiei Lamiaceae se folosește herba întreagă provenită din inflorescențe și tulpini. Materialul vegetal provenit de la Stațiunea Didactică a Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului "Regele Mihai I al României" din Timișoara, România (21°13' E longitudine, 45°45' N latitudine), din producția S.C.PANETONE SRL și Întreprinderea Individuală Lintia Vasile. Atât semințele cât și herba au fost selectate pentru îndepărtarea impurităților grosiere și conditionate prin uscare la temperatura ambientală. Măcinarea materialului vegetal s-a realizat cu ajutorul morii de laborator GRINDOMIX RETSCH și măcinate la turatie de 1000 rot/min, timp de 60 sec.



Uleiurile volatile prin antrenare cu vapori de apă utilizând instalația de extracție Clevenger. Randamentele de extracție a uleiurilor esențiale variază între 0.5-4%, randamentul maxim obținându-se în cazul plantelor condimentare de tipul mărar și fenicul. Uleiurile și extractele obținute au fost ambalate, etichetate și depozitate la 2-4°C până la utilizarea în testele in vitro, in vivo și pentru obținerea emulsiilor.

Prepararea nanoemulsiilor de tip U/A s-a realizat cu ajutorul Echipamentului Sonic Vibracel WCX130, prin ultrasonicare la temperatura de 25°C. Caracteristici aparatură: Putere 130 W, frecvență 20kHz.

Au fost obținute 4 variante de lucru: G-M-O/ (mărar- oregano); G-M-T / (marar-tymus); G-F-T (fenicul-tymus); G-C-S / (coriandru-satureja). Două substanțe emulsifiante (lecitină și gelatină) au fost utilizate în obținerea nanoemulsiilor în diferite proporții în funcție de matricea vegetală folosită.

În realizarea acestui experiment s-au avut în vedere următoarele aspecte:

- S-au utilizat valori medii ale indicelui de refracție din literatura de specialitate, după cum urmează: ulei mărar: RI=1.484; ulei coriandru: RI=1.467; ulei cimbru: Ri=1.500;
- S-au realizat diluții de 1/10000 pentru probele măsurate;
- Probele au fost ultrasonate timp de 10s și au fost măsurate după un repaus de 50s;
- Un volum de 1.5 ml proba a fost măsurat într-o cuva termostată de PS.
- Toate măsurătorile au fost efectuate la 25°C.


Analiza emulsiilor obținute s-a realizat prin tehnica împrăstierii dinamice a luminii (DLS).

Caracteristici emulsii obținute: Emulsia GFT: diametru hidrodinamic 231 nm, indice de polidispersie 0.352, Emulsia GCS: diametru hidrodinamic 220 nm, indice de polidispersie 0.381, Emulsie GMO: diametru hidrodinamic 221 nm, indice de polidispersie 0.300, Emulsia GMT: diametru hidrodinamic 244 nm, indice de polidispersie 0.389.

Rezultatele experimentale au evidențiat faptul că emulsiile pe bază de uleiuri esențiale au fost stabile în timp și se încadrează în categoria nanoemulsiilor cu un diametru al particulelor variind între 220-244 nm, astfel încât tehnologia de obținere poate fi aplicată la scară micropilot și industrială.

**Bibliografie:**

1. Tian J., Ban X., Zeng H., Huang B., Wang Y. (2011). *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes, Food Control, **22**, p. 1992-1999, DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.05.018.
2. Zhang Y, Gao Y, Liang Y, Dong Y, Yang X, Yuan J and Qiu D (2017) The Verticillium dahliae SnodProt1-Like Protein VdCP1 Contributes to Virulence and Triggers the Plant Immune System. Front. Plant Sci. 8:1880. doi: 10.3389/fpls.2017.01880
3. Bhat RG, Subbarao KV., Phytopathology. 1999 Dec;89(12):1218-25. Host Range Specificity in Verticillium dahliae.
4. Zhang, D.-D. *et al.* Identification and characterization of a pathogenicity-related gene *VdCYP1* from *Verticillium dahliae*. *Sci. Rep.* **6**, 27979; doi: 10.1038/srep27979 (2016).
5. Bassole I.H.N., Juliani H.R., *Essential oils in combination and their antimicrobial properties*, Molecules. **2012**, 17(4):3989–4006.
6. Nakatsu T., Lupo, A.T., Chinn J.W., Kang R.K.L., *Biological activity of essential oils and their constituents*, Stud. Nat. Prod. Chem., **2000**, 21:571–631.
7. Cocan I, Alexa E, Danciu C, Radulov I, Galuscan A, Obiștioiu D, Morvay A.A., Șumălan RM, Poiană MA, Pop G, Dehelean CA, *Phytochemical screening and biological activity of Lamiaceae family plant extracts*, Experimental and Therapeutic Medicine, **2018**, 15(2):1863-1870, DOI: 10.3892/etm.2017.5640







## REVENDICĂRI

- Preparate naturale de tip nanoemulsii cu acțiune antifungică destinat culturilor legumicole, cu aplicare foliară si/sau radiculară, pe baza de uleiuri esentiale din familiile Lamiaceae si Umbelifere, cu adaos de excipienți organici naturali. : G-M-O/ (mărar- oregano); G-M-T /(marar-tymus); G-F-T (fenicul-tymus); G-C-S /(coriandru-satureja). **Compozitie caracterizată prin aceea că este constituită din amestec de principii active reprezentate de uleiuri esentiale selectate din următoarele plante: mărar (*Anethum graveolens*), fenicul (*Feniculum vulgare*), coriandru (*Coriandrum sativum*), oregano (*Origanum vulgare*), cimbru (*Thymus vulgaris*), cimbru (*Satureja hortensis*) în proportii de 0,3....2%, lecitină din soia în cantitate de 0,01....0,05%, gelatină 0....0,05% si apă diferenta până la 100%.**
- Procedeu de obținere a unor preparate naturale cu actiune antifungică de tip nanoemulsii pe baza de uleiuri esentiale din familiile Lamiaceae si Umbelifere, cu adaos de substante emulsionabile, prin tehnici compatibile cu agricultura organică.

## DESENE



Planta inoculata artificial cu  
Verticillium, netrata cu emulsii



Inoculat +tratat GMT 1:50



Inoculat +tratat GMO 1:10

Figura 1. Evidentierea efectului antifungic al preparatelor naturale cu actiune antifungica  
(PNA) asupra plantelor de tomate inoculate cu Verticillium dahlie

*Lucia*