



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00561

(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;
• POP GEORGETA, STR. OEDIP NR. 9,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• RADULOV ISIDORA, STR. BABA DOCHIA,
D2, SC. B, AP. 20, TIMIȘOARA, TM, RO;
• CRISTA LAURA, STR.LEULUI, NR.4,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• RUS CRISTIAN, STR.ORȘOVA, NR.26,
TIMIȘOARA, TM, RO

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

(54) **PREPARATE NATURALE CU ACȚIUNE ANTIFUNGICĂ
ȘI ANTIMICOTOXIGENĂ FOLOSITE CA AGENȚI
DE PROTECȚIE A CEREALELOR, ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la preparate naturale tip nanoemulsii cu acțiune antifungică și antimicotoxigenă, destinate protecției cerealelor, în cultură și în depozite, cu aplicare foliară și/sau la semințe, cu utilizare în agricultura biologică, pe bază de uleiuri esențiale din familiile *Lamiaceae* și *Umbellifere*, cu adaos de excipienți organici naturali, și la un procedeu de obținere a acestora. 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 (*Anethum graveolens*), oregano (*Origanum vulgare*) și cimbru (*Thymus vulgaris*) în proporții de 0,3...2%, lecitină din soia în cantitate de 0,05% și diferența până la 100%, apă. Procedeu conform invenției are următoarele faze:

a. sortarea manuală a materialului vegetal alcătuit din semințe, inflorescențe și plantă întreagă, prin îndepărtarea părților putrezite, alterate și a impurităților de natură minerală și organică,

b. uscarea materialului vegetal în spații aerisite și ventilate la o temperatură de 20...25°C, până când umiditatea scade sub 8%,

c. mărunțirea materialului vegetal într-o moară de laborator la o turație de 1000 rot/min,

d. obținerea uleiului esențial prin antrenarea cu vapori a principiilor volatile eliberate de matricea vegetală cu un randament de extracție cuprins între 0,5...4% în funcție de specie,

e. obținerea preparatelor naturale cu acțiune antifungică cu adaos de substanțe emulsionabile prin ultrasonicare folosind Echipamentul Sonic Vibracel WCX130 cu puterea de 130 W și frecvența de 20 kHz, la temperatura de 25°C, folosind ca agenți de emulsificare lecitina și gelatina în proporții diferite, în funcție de rețeta de fabricație,

f. ambalarea produsului în recipiente de plastic cu volumul cuprins între 500...1000 ml și etichetarea acestora, și

g. depozitarea recipientelor în încăperi fără expunere la radiația solară, cu temperatura cuprinsă între 15...25°C.

Revendicări: 2

Figuri: 2

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



25
76

DOCUMENTATIE TEHNICĂ
DESCRIEREA INVENTIEI

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2018 0561
Data depozit	31-07-2018

**PREPARATE NATURALE CU ACTIUNE ANTIFUNGICA SI
ANTIMICOTOXIGENĂ FOLOSITE CA AGENTI DE PROTECTIE A
CEREALELOR SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA**

**Inventatori: Alexa Ersilia¹, Sumalan Renata Maria¹, Lintia Vasile², Negrea Monica¹,
Obistioiu Diana¹, Pop Georgeta¹, Radulov Isidora¹, Crista Laura¹, Rus Cristian¹**

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

²SC Panetone SRL

I. Context

Invenția se referă la produse naturale cu acțiune antifungică (PNA) și antimicotoxigenă cu efect protectiv împotriva speciilor de *Fusarium* respectiv a micotoxinelor dezvoltate în cultura de cereale, pe bază de uleiuri esențiale (UEs) din plante medicinale și condimentare din familiile Lamiaceae și Umbelifere, precum și la un procedeu de obținere a PNA printr-o metodă compatibilă cu agricultura organică.

Cerealele și produsele cerealiere reprezintă una din cele mai importante surse de hrană pentru om și animale. În fiecare an o parte semnificativă a producției cerealiere suferă de atacul fungic în câmp sau pe perioada depozitării, producând pierderi economice importante, dar și efecte negative asupra sănătății umane [1]. Aceste fungi produc metaboliți secundari, compuși chimici cu acțiune toxică, numiți micotoxine, care se dezvoltă în timpul creșterii și multiplicării fungiiilor, când condițiile microecologice sunt favorabile [2-3]. Practic, contaminarea cu micotoxine este răspândită pe tot globul, estimându-se că 25-60% din producția de cereale este afectată de micotoxine produse de fungii de tipul: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* [4]. Contaminarea cerealelor cu micotoxine reprezintă o problemă în spațiul balcanic, cu influențe în producerea nefropatiei endemice, care se consideră a afecta, în zona rurală, cel puțin 25 000 de locuitori [5].



Speciile de *Fusarium*, în special *Fusarium graminearum* și *Fusarium culmorum* reprezintă fungi producătoare de tricotecene, din care deoxinivalenol (DON) reprezintă micotoxina cea mai frecvent întâlnită în cereale [6-10]. DON afectează sistemul imun al animalelor și produce tulburări digestive în organismul uman [11].

Fusarium graminearum reprezintă un patogen al plantelor care se regăsește în mod frecvent în cereale, îndeosebi în grâu și orz și produce fusarioza, o boală cunoscută și sub numele de "înrosirea spicelor" care este una dintre cele mai răspândite și pagubitoare boli la cereale, producând anual pierderi de 1-3%, în unii ani pagubele în țara noastră ridicându-se până la 65-80% [12-13].

Incidența fungică și a micotoxinelor în cereale este influențată de condițiile climatice. România este caracterizată printr-un climat continental caracterizat prin ierni reci și uscate și veri calde și ploioase, ceea ce creează condiții optime de dezvoltare a fungilor. Cercetările anterioare privind incidența micotoxinelor DON în România, în perioada 2010-2011, ca urmare a contaminării boabelor de grâu cu specii de *Fusarium*, au evidențiat faptul că DON a fost identificat în 73.08% din probele recoltate în anul 2010, nivelul maxim de contaminare fiind de 3.39 ppm. În anul 2011, incidența DON a fost mai scăzută comparativ cu anul anterior, cu o frecvență de 19.23% și o medie a valorilor probelor pozitive de 0.763 ppm [14]. Rezultate similare au fost raportate de alți autori în vestul României [15-17]. Valorile înregistrate în probele din România sunt superioare celor recoltate în alte țări europene [18]. Prevenția infecției fungice în timpul dezvoltării plantelor, recoltării și depozitării, precum și măsurile necesare pentru decontaminarea matricelor cerealiere reprezintă priorități currente ale Comisiei Europene [19].

În agricultura organică, preparatele naturale reprezintă alterantive viabile la produșii sintetici cu acțiune antifungică. În acest sens, proprietățile antifungice ale uleiurilor esențiale și a principalilor componenți chimici asupra speciilor de *Fusarium* au fost demonstrate recent în diferite studii [20-25]. Activitatea biologică a uleiurilor esențiale depinde de principalele chemotipuri determinate de genotip și influențate de condițiile agrotehnice și de mediu [25]. Funcționalitatea plantelor medicinale și condimentare se bazează pe relația existentă între structura chimică a principiilor active și acțiunea biologică exercitată asupra diferitelor celule, organe sau organisme. Diferite mecanisme de acțiune asupra celulelor microbiene pentru uleiurile volatile au fost propuse de-a lungul timpului. Astfel, se consideră că uleiurile volatile pot afecta atât membrana protoplasmatică cât și citoplasma celulei. Caracterul lor hidrofobic pare a fi responsabil de distrugerea structurii bacteriene care conduce la creșterea permeabilității membranei citoplasmatică [25].

Plantele din familia Lamiaceae reprezintă sursa cea mai importantă de compuși aromatici care fortifică, stimulează sau protejează anumite organe, aparate sau sisteme de apărare împotriva agresiunii factorilor externi. S-a demonstrat faptul că plantele din familia Lamiaceae au proprietăți antifungice ceea ce sugerează că aceste plante pot reprezenta alternative viabile la produșii sintetici utilizați în agricultura organică [26]. De asemenea, rolul functional al plantelor din familia Umbelifere, inclusiv efectul antifungic, a fost raportat anterior în literatura de specialitate [26].

II. Parte experimentală

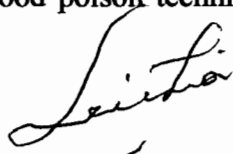
Partea experimentală a invenției revendicate presupune realizarea următoarelor etape:

- A. Obținerea uleiurilor esențiale din plante medicinale din familiile Lamiaceae și Umbelifere și evaluarea *in vitro* și *in vivo* a efectului antifungic și fungicidal;
- B. Obținerea preparatelor naturale cu acțiune antifungică (PNA);
- C. Evaluarea potențialului antifungic, fungicidal și micotoxicogen *in vitro* și *in vivo* în condiții controlate, stabilirea efectelor fitotoxice a preparatelor naturale în cultură și asupra germinării semintelor de cereale.
- D. Procedeu tehnologic aplicat la scară pilot de obținere a preparatelor naturale cu acțiune antifungică și antimicotogenică.

A. Obținerea uleiurilor esențiale și evaluarea *in vitro* și *in vivo* a efectului antifungic și fungicidal

Plantele medicinale studiate aparțin familiei Lamiaceae (*Satureja montana*, *Thymus vulgaris* și *Origanum vulgare*) și Umbelifere (*Coriandrum sativum*, *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare*) au fost obținute din culturile provenite 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, Întreprinderea Individuală Lintia Vasile sau achiziționate din culturile Stațiunii Didactice Secuieni și Plafar. Identificarea speciilor a fost confirmată de către Departamentul de plante aromatice de la USAMVB Timișoara și o probă voucher a fost păstrată. Aceste plante au constituit material vegetal pentru obținerea preparatelor naturale cu acțiune antifungică. Extractia uleiurilor esențiale s-a realizat prin antrenare cu vapori de apă utilizând instalația de extracție Clevenger.

Uleiurile esențiale menționate au fost analizate *in vitro* în scopul stabilirii concentrației minime cu impact asupra creșterii miceliene a fungilor de tip *Fusarium* prin tehnica mediului otrăvit sau food poison technique [27-28]. Aceasta presupune introducerea în mediul de cultură a unei



cantitati determinate de substanta pentru a studia capacitatea de regenerare si crestere a miceliului fungic. Mediul de cultivare a fost CYGA (chloramphenicol-yeast-glucose agar), iar concentratiile UEs testate: 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0,5% si 0,6%. Varianta de control negativ a fost reprezentată de proba fara adaos, iar controlul pozitiv l-a constituit un fungicid comercial Topsin (tiofanat metil) utilizat in concentratia recomandata in practica agricola.

Tehnica de lucru a constat in obtinerea culturilor fungice preinocul de *Fusarium graminearum*, cu o vechime de 4 zile din care s-au recoltat discuri miceliene, cu diametru de 9mm, care au fost transferate pe variantele de medii aditionate cu cantitati diferite de UEs in placi Petri (cate 3). Incubarea s-a realizat la temperatura 22 ± 2 , in conditii de alternanță lumina /intuneric 12h/12h. In ziua a 5- a s-au facut observatii prin masurarea a doua diametre perpendiculare pentru fiecare disc micelian inoculat. Datele brute au fost folosite in calcularea suprafetei miceliene nou crescute (SMN) folosind formula: $SMN = [(RM^2 * 3.14 / 4) - SFI] / 100$, unde: RM- raza suprafetei miceliene, SFI – Suprafata initială inoculată

Rezultatele (cm²) au fost ulterior exprimate procentual raportat la control.

Concentratia minimă cu efect fungistatic (CMFs) este considerata a fi aceea concentratie de la care cresterea fungica este nula (SMN= 0), iar prin transferul discului fungic inoculat pe un alt mediu proaspat (fara adaos de UEs) se constata reluarea cresterii hifale si refacerea miceliului fungic.

Concentratia minimă cu efect fungicid (CMFg) este considerata a fi aceea concentratie de la care cresterea fungica este nula (SMN= 0), iar prin transferul discului fungic inoculat pe un alt mediu proaspat NU se constata reluarea cresterii hifale, practic miceliul fiind inactivat.

Evaluarea in vivo a efectului antifungic si fungicidal s-a efectuat prin determinarea indicelui de contaminare a semintelor (ICS) si identificarea genurilor fungice si a micotoxinelor elaborate in cazul fumigarii semintelor de grâu. Genurile fungice studiate au fost: *Mucor*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* si *Fusarium*.

Pentru experiment a fost folosit grâu obtinut prin tehnologie ecologică, soiul Antille, care a fost inoculat artificial cu suspensie de spori *Fusarium graminearum* cu titrul 2×10^6 /ml. Dupa 2 zile cate 50 gr semite au fost cântărite si tratate cu 5 ml din varintele de amestecuri naturale. Dupa tratament au fost introduse in recipiente inchise, cântărite si pastrate la 20-22 °C, la intuneric. După 7 zile din fiecare proba au fost extrase câte 10 seminte care s-au folost pentru determinarea germinatiei si prezentei lui *Fusarium*.



Observatiile au fost facute prin estimarea gradului de germinatie a semintelor si a indexului de contaminare a semintelor (ICS) pentru fiecare varianta de tratament, dupa procedeul descris de Doolotkeldieva si colab..[27].

$$\text{ICS (\%)} = (\text{număr seminte contaminate/numar total seminte}) \times 100$$

Rezultatele experimentale au arătat faptul că indicele de colonizare al semintelor (ICS), dupa o saptamana de la tratament, este inferior controlului in cazul utilizării uleiurilor esentiale de coriandru, cimbru si mărar. Speciile fungice predominante in această fază sunt: *Fusarium*, *Cladosporium* si *Rhizopus*. După două săptămâni de la efectuarea tratamentului, se observă că ICS este maxim in cazul controlului, că tratamentul cu uleiuri esentiale asigură protecție fungică, iar potentialul de inhibare al colonizării micelare creste in ordinea: fenicul < marar = oregano < coriandru < cimbru de camp. In această etapă predomină specia fungică *Alternaria*, regăsindu-se, in control, si tulpini fungice de *Aspergillus*, *Penicillium* si *Fusarium*.

B. Obținerea preparatelor naturale cu actiune antifungică (PNA)

Pe baza datelor experimentale obtinute, a concentratie minima cu efect fungistatic (CMFs) si concentratie minimă fungică (CMFg), correlate cu aspect de ordin economic, au fost selectate 3 uleiuri esentiale pentru a fi incluse in preparatele naturale cu efect antifungic asupra *Fusarium graminearum*, care au fost introduse în preparate naturale (PNA) sub formă de nanoemulsiu obtinandu-se 3 variante de lucru: G-M-O/ (mărar- oregano); G-M-T / (marar-tymus); M-O-T/(marar-oregano-tymus). Doua substante emulsifiante (gelatina si lecitina) care au fost utilizate in obtinerea nanoemulsiilor ca atare au servit ca si control. Modul de preparare a emulsiilor este prezentat la punctul D al prezentei documentatii tehnice.

C. Evaluarea potentialului antifungic, fungicidal si micotoxicogen in vitro si in vivo, in conditii controlate si stabilirea efectelor fitotoxice a preparatelor naturale in cultura si asupra germinatiei semintelor de cereale.

Cele 3 emulsii au fost testate **in vitro** asupra *Fusarium graminearum* folosind tehnica mentionata la testarea uleiurilor, in 3 concentratii diferite (1/10, 1/50, 1/100), rezultatele evidentind faptul ca preparatele naturale prezintă activitate antifungică pronunțată, cresterea de miceliu nou, exprimata in valori SMN, fiind in majoritatea variantelor 0. Se evidentiază faptul că eficienta preparatelor naturale asupra cresterii miceliului de *Fusarium* variaza in ordinea: GMT > GMO > MOT. Preparatul GMT a dovedit cele mai puternice efecte antifungice, valorile SMN fiind cele mai reduse pentru *Fusarium*, inregistrandu-se cele mai mari diferentele

fata de control, atat pentru dilutia 1/10 cat si 1/100. Preparatul GMT 1/10 inhibă dezvoltarea *Fusarium graminearum* in proportie de 69.69% comparativ cu martorul.

Variante de lucru: Martor – fara tratament, G-M-T concentrat, G-M-T dil 1/10, G-M-T dil 1/50, G-M-O concentrat, G-M-O dil 1/10, G-M-O dil 1/50, M-O -T – concentrat, M-O-T 1/10, M-O-T 1/50

Rezultatele obtinute au evidentiat o scădere semnificativă a numărului de seminte contaminate cu *Fusarium*, in raport cu controlul, in toate variantele experimentale, eficienta inhibării crescând in ordinea: MOT<GMO<GMT. Preparatul GMT, 1/50 asigură 84% protectie impotriva dezvoltării micelului de *Fusarium* în raport cu controlul, in timp ce GMO 1/50 asigură 80% protectie.

Experimentul in vivo efectuat pe genuri fungice dezvoltate pe culturi de cereale s-a efectuat pe grau soiul Antile, conform metodei descrie la punctual A. In cazul utilizării de produse naturale antifungice (PNA), se observă un profil fungic asemănător experimentului in care s-au utilizat uleiuri esențiale. După prima săptămână de la fumigarea semintelor genurile fungice predominante sunt: *Fusarium*, *Cladosporium*, *Rhizopus*. De remarcat este o scădere semnificativă a numărului de seminte contaminate cu *Fusarium*, in raport cu controlul, in toate variantele experimentale, eficienta inhibării crescând in ordinea: MO<GMO<GMT. Preparatul GMT, 1/50 asigură 84% protectie impotriva dezvoltării micelului de *Fusarium* în raport cu controlul, in timp ce GMO 1/50 asigură 80% protectie.

După două săptămâni de la fumigare incidența *Cladosporium*-ului si *Rhizopus*-ului scade, dar numărul de seminte contaminate cu *Fusarium* nu se reduce semnificativ comparativ cu valorile inregistrate după prima săptămână de fumigare, ceea ce evidentiază faptul că durata tratamentului de preventie in controlul fungic din silozurile de cereale este de 7 zile, după această perioadă fiind necesar un al doilea tratament. In ceea ce priveste concentratia recomandată, dilutia 1/50 asigură protectie corespunzătoare corelată cu eficiență economică.

Determinarea micotoxinelor. Metoda utilizata a fost metoda imunoenzimatică (ELISA), iar prepararea probelor s-a realizat in conformitate cu instructiunile producătorului de kit-uri pentru analiza deoxinivalenolului (DON) din cereale (R-Biopharm). Proba măcinată (5g) a fost extrasă cu 100 ml apă distilată si omogenizată cu ajutorul unui agitator 20 min pentru extractie. Extractul se filtrează, iar filtratul este direct utilizat pentru analiza enzimatică. Solutiile standard si probele (50 µl) se amestecă cu 50 µl conjugat enzimatic in celule individuale din plăcile kit-ului ELISA. Se adaugă 50 µl solutie anticorp si se lasă la incubat 10 min. la temperatura camerei. Se spală celulele de trei ori cu cate 250 µl apă distilată si se adaugă substratul (100 µl) si se lasă încă 5 min la temperature camerei. Solutia de stopare (100 µl) se adaugă in fiecare

celulă și intensitatea culorii galbene se măsoară la 450 nm utilizând un cititor ELISA 96 (PR-1100, Bio-Rad Laboratories, USA).

În scopul testării efectului protectiv asociat tratamentului cu preparate naturale emulsionabile, 50 g proba de grau (cu o concentrație DON cunoscută) au fost stropite cu diferite concentrații de emulsii, iar după 7 zile și 14 zile au fost analizate din punct de vedere al conținutului de DON. Conținutul mediu de DON (ppm) determinat inițial în probele de grau a fost de 0.464 ppm iar umiditatea probei a fost 12,41% și aw 0,9.

În cazul utilizării preparatelor naturale, GMT concentrat reduce conținutul de DON în proporție de 20,56% după 7 zile de tratament, respectiv 52,41% după 14 zile. Se observă o disponibilitate accentuată de inhibare a dezvoltării DON în cazul diluției de 1/50 comparativ cu 1/10. Gradul de inhibare după 7 zile, fiind de 7,80% la diluția 1/50 și 2,48% la diluția 1/10. După 14 zile de tratament, nivelul de DON este redus cu 10,0% în cazul diluției 1/10 respectiv 33,45% pentru diluția 1/50.

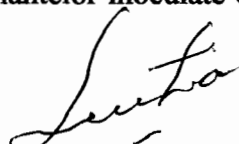
În cazul tratamentului cu preparatul natural MOT se observă o scădere progresivă a contaminării cu DON, liniară și invers proporțională cu concentrația aplicată, nivelul contaminării fiind minim în cazul aplicării tratamentului cu diluție 1/50, după 14 zile de la administrare. În acest caz, reducerea este semnificativă (88,10%), comparativ cu martorul. Important de evidențiat este faptul că, în absența tratamentului cu preparatele naturale, gradul de reducere a contaminării cu DON este de doar 4,6% între 7-14 zile.

Preparatul natural GMO prezintă eficiență maximă în protecția împotriva DON, după 14 zile de la administrare, în cazul utilizării diluției 1/50 (92,93% comparativ cu controlul).

Prin coroborarea datelor privind efectul protectiv al preparatelor naturale asupra contaminării cu DON a semintelor de grau expuse atacului cu *Fusarium* și producției de micotoxine (DON), datele experimentale evidențiază faptul că preparatul natural GMO prezintă eficiență maximă, după 14 zile de la administrare, în cazul utilizării diluției 1/50 (92,93% comparativ cu controlul).

Testarea in vivo, în condiții controlate, în seră Phytotron al efectului antifungic al produselor naturale pe seminte de cereale și produse derivate infectate artificial cu spori de *Fusarium* și evaluarea efectelor fitotoxice.

În această etapă experimentală, grau tratat cu PNA și ulterior inoculat artificial cu suspensie sporala de *Fusarium graminearum* (5×10^5 /ml) a fost amplasat în vase de vegetație urmărindu-se periodic atacul cu fuzarioză și conținutul de micotoxine. Evaluarea atacului fungic asupra plantelor inoculate cu spori de *Fusarium* evidențiază o scădere a numărului de plante atacate



comparativ cu controlul, eficiența maximă remarcându-se în cazul preparatului GMT 1/10, urmat de produsul GMO 1/10.

Evoluția conținutului de clorofilă în timp evidențiază faptul că, în cazul probelor neinoculate, după 7 zile de tratament, crește concentrația de clorofilă, atât în control cât și în probele supuse tratamentului cu uleiuri esențiale, cu excepția preparatului GMO, pentru care conținutul de clorofilă a crescut după aplicarea tratamentului și în proba inoculată cu *Fusarium*.

După 14 zile de tratament conținutul de clorofilă în probele martor, inoculate și neinoculate este egal, ceea ce demonstrează funcționalitatea mecanismelor de apărare și reglare ale plantei în scopul protecției naturale a acesteia la atacul cu fungii. Efectul pozitiv al uleiurilor testate asupra conținutului de clorofilă din probele inoculate cu *Fusarium* este evident după 14 zile de tratament, când conținutul de clorofilă, în varianta GMO inoculată, este superior probei neinoculate, ceea ce demonstrează eficiența preparatelor naturale atât ca și agenți antifungici cât și nutritivi. După 21 de zile de la tratament, controlul inoculat și netratat prezintă valori mai scăzute ale conținutului de clorofilă comparativ cu varianta neinoculată, în timp ce preparatul GMO demonstrează eficiența tratamentului, conținutul de clorofilă crescând cu 7,4 unități SPAD, care se dovedește a fi cel mai eficient produs, atât antifungic cât și nutritiv.

Efectele fitotoxice ale amestecurilor naturale asupra germinării semintelor s-a realizat utilizând seminte inoculate și fumigate cu preparatele naturale utilizate în experimentul anterior. La stabilirea concentrațiilor luate în lucru s-a ținut cont de performanța uleiurilor și preparatelor naturale în asigurarea efectului fungicidal rezultat în urma testărilor *in vitro* pe mediul de cultură.

În cazul preparatelor emulsionabile, testate în 3 concentrații (concentrate, diluție 1/50 și 1/100) se observă că acestea conferă protecția germinativă de peste 80%. Astfel, la diluțiile 1/100, pentru preparatele GMT și GMO, respectiv 1/50, pentru preparatele GMO, gradul de germinare nu este afectat, fiind comparativ cu controlul, iar pentru celelalte variante experimentale germinatia este de 90%, cu excepția GMT concentrat pentru care capacitatea germinativă este de 80%.

Având în vedere datele obținute cu privire la protecția *in vivo* a preparatelor naturale asupra semintelor de grâu din depozite, atacate de *Fusarium* și contaminate cu DON și coroborând aceste rezultate cu capacitatea germinativă, recomandăm utilizarea preparatelor MOT (1/50), GMO (1/50) și GMT (1/10) ca agenți de protecție optimă în cultura cerealelor în condițiile utilizării alternative, prin tratament la sămânță și în vegetație.



D. Procedeu de obtinere a preparatelor naturale cu actiune antifungică si antimicotoxigenă

Procedeul de obtinere a preparatelor naturale cu actiune antifungică, precum si conditiile tehnologice sunt prezentate în schema tehnologică anexată. La întocmirea fluxului tehnologic au fost evaluate riscurile de contaminare și elaborat planul HACCP pentru procesul tehnologic.

Fazele tehnologice aferente acestei tehnologii cuprind următoarele etape:

- **Sortarea materialului vegetal** alcătuit din seminte, inflorescente si plantă întreagă herba proaspătă se realizează manual prin îndepărtarea semintelor alterate, mucegăite, putrezite, a corpurilor străine de natură minerală (pietris, nisip), organică (resturi vegetale din alte culturi, buruieni, insecte) sau a altor impurități. Pentru plantele din familia Lamiaceae s-a folosit herba proaspătă în forma integrală, iar pentru plantele din familia Umbelifere s-au folosit semintele.
- **Uscarea materialului vegetal** se realizează prin dispunerea acestuia în plan deschis pe suprafete uscate, în spatii aerisite, cu ventilatie si umiditate controlată, la temperatură de 20-25°C. Umiditatea este controlată periodic, conform SR EN ISO 712:2010, iar uscarea se consideră încheiată când conținutul de umiditate este sub 8%.
- **Măruntirea materialului vegetal** se realizează prin măcinare uscată folosind o moară de laborator tip GRINDOMIX RETSCH si măcinate la turatie de 1000 rot/min, timp variabil în functie de natura materialului vegetal.
- **Obținerea uleiului esential** presupune antrenarea cu vapori de apă a principiilor volatile constituate utilizând instalatia de extractie Clevenger modificată. Materialul vegetal este dispus pe o sită perforată situată la partea superioară a vasului de extractie, care conține apă încălzită la temperatura de fierbere, vaporii formati antrenând principiile volatile eliberate din matricea vegetală. Randamentele de extractie a uleiurilor esentiale variaza între 0.5-4%, in functie de specie.
- **Obținerea preparatelor naturale cu actiune antifungică (PNA)** de tip nanoemulsii de tip U/A pe baza de uleiuri esentiale din familiile Lamiaceae si Umbelifere, cu adaos de substante emulsionabile se realizează prin ultrasonicare folosind Echipamentul Sonic Vibracel WCX130, la temperatura de 25°C. Caracteristici aparatura: Putere 130 W, frecventa 20kHz. Ca agenti de emulsionare se folosesc compusi netoxici, organici (lecitina si gelatina) utilizate in procente diferite in functie de natura si numărul de uleiuri volatile introduse in reteta de fabricatie. Investigatiile de granulometrie prin metoda DLS au fost efectuate cu ajutorul aparatului de la *Malvern numit Zetasizer Nano*

67

ZS, prin imprastierea inapoi (173°) a unui fascicul laser HeNe (632.8 nm). Rezultatele experimentale au evidentiat 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.

- **Ambalarea produsului** se realizează în recipiente din material plastic cu închidere etansă, cu volum de 500-1000 ml, etichetate conform cerințelor cu menționarea specificațiilor tehnice, termenului de valabilitate și a instrucțiunilor de folosire.
- **Depozitarea produsului** se va realiza la temperatura ambientală 15-25°C, în încăperi fără expunere directă la radiațiile solare. Termenul de valabilitate se consideră 12 luni de la data fabricației, în condiții de depozitare corespunzătoare.

Bibliografie

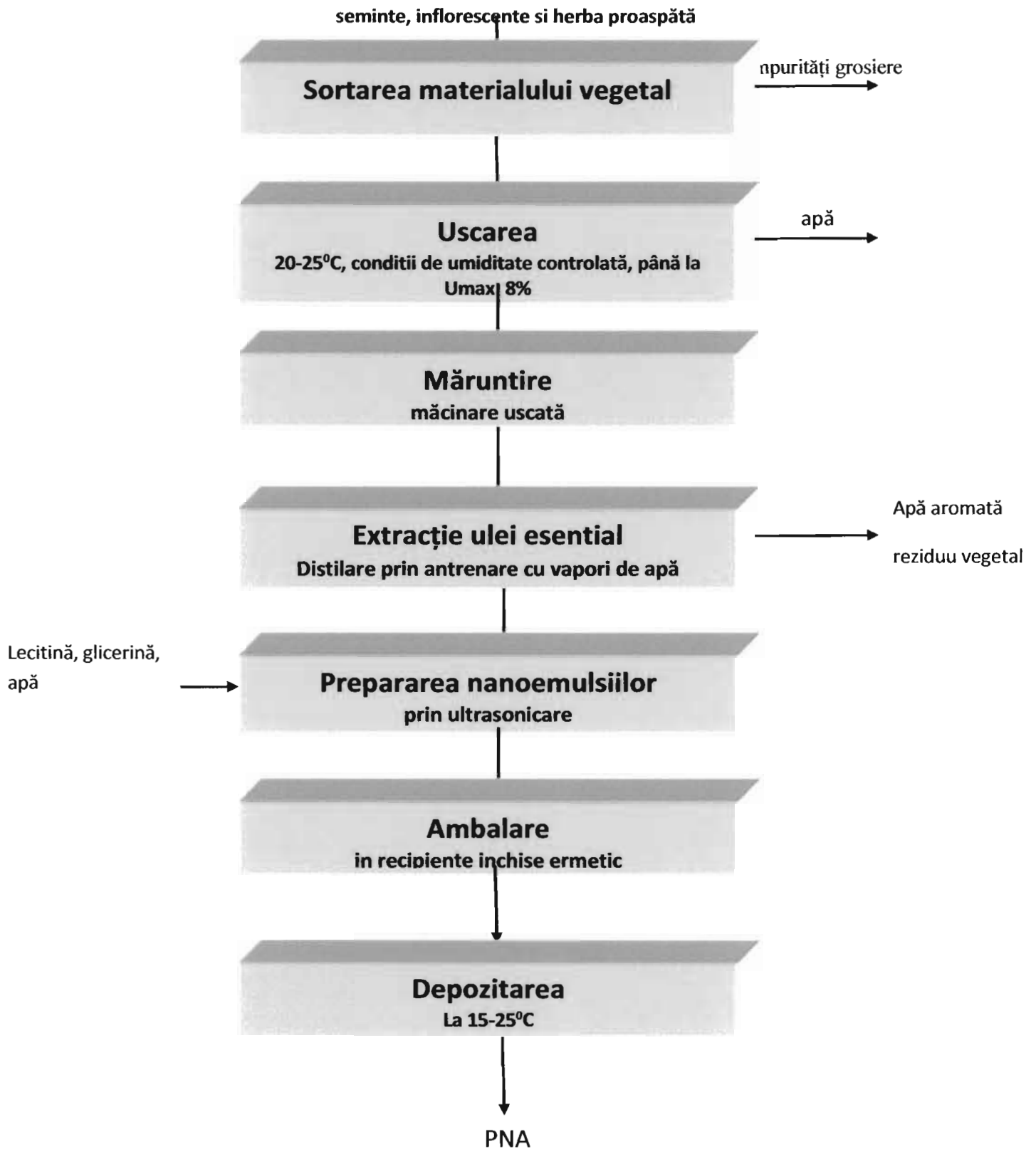
1. Jajic I., Juric V., Glamocic D., Abramovic B., *Occurrence of Deoxynivalenol in Maize and Wheat in Serbia*, Int J Mol Sci, **2008**, 9:2114–2126.
2. Alexa E., Pop G., Sumalan R., Radulov I., Poiana M., Tulcan C., *Fusarium species and Fusarium mycotoxins in cereals from West Romania: preliminary survey*. Comm Agr Appl Biol Sci., **2011**, 76(4):661-666.
3. Sumalan R., Alexa E., Pop G., Dehelean C., Sumalan R., *The Biodiversity and Dissemination of Mycotoxin-producing Fungi in Cereals and Cereal Products*. In Proceedings of the 46th Croatian and 6th International Symposium on Agriculture, Edited by Milan Pospisil, Zagreb, Croatia, **2011**: 770–773 [http://sa.agr.hr/pdf/2011/sa2011_proceedings.pdf]
4. Scott P.M., *General referee report. Mycotoxins*. J Assoc Off Anal Chem, **1990**, 73:98–105.
5. Puntaric D., Bosnir J., Smit Z., Skes I., Baklaic Z., *Ochratoxin A in corn and wheat: geographical association with endemic nephropathy*, Croat Med J, **2001**, 42:175–180.
6. Kuiper-Goodman T., *Mycotoxins: risk assessment and legislation*, Toxicol Lett, **1995**, 82–83:853–859.
7. Binder E.M., Tan L.M., Chin L.J., Handl J., Richard J., *Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients*, Anim Feed Sci Technol, **2007**, 137:265–282.
8. Mankeviciene A., Butkute B., Gaurilcikiene I., Dabkevicius Z., Suproniene S., *Risk assessment of Fusarium mycotoxins in Lithuanian small cereal grains*, Food Control, **2011**, 22:970–976.
9. Muthomi J.W., Ndung'u J.K., Gathumbi J.K., Mutitu E.W., Wagacha J.M., *The occurrence of Fusarium species and mycotoxins in Kenyan wheat*, Crop Prot, **2008**, 27:1215–1219.
10. Sokolovic M., Simpraga B., *Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography*, Food Control, **2006**, 17:733–740.
11. Richard J., *Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – an overview*, Int J Food Microbiol, **2007**, 119:3–10.
12. Pitt JI, Hocking AD: *Fungi and food spoilage*. Ed. Springer, New York; **2009**:53-142.
13. Singh, Suman, *In vitro antifungal activity of some essential oils*, Journal of Herbal Medicine and Toxicology **2010**. 4 (2) 107-111



14. Alexa E, Dehelean C, Poiană MA, Radulov I, Cimpean AM, Bordean DM, Tulcan C, Pop G, *The occurrence of mycotoxins in wheat from western Romania and histopathological impact as effect of feed intake*, Chemistry Central Journal, **2013**, 7(1): 99
15. Curtui V., Usleber E., Dietrich R., Lepschy J., Mertlbauer E., *A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania*, Mycopathologia, **1998**, 143:97–103.
16. Stroia C., Tabuc C., Neacsu A., *Incidence of Fusarium species and its mycotoxins in cereals from western Romania*, Res J Agric Sci, **2010**, 42:302–309.
17. Tabuc C., Marin D., Guerre P., Sesan T., Bailly J.D., *Mold and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania*, J Food Prot, **2009**, 72:662–665.
18. Binder E.M., Tan L.M., Chin L.J., Handl J., Richard J., *Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities feeds and feed ingredients*, Anim Feed Sci Technol, **2007**, 137:265–282.
19. The Commission of the European Communities. Commission regulation (EC) Commission Recommendation **2006/576/EC** on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. [http://irmm.jrc.ec.europa.eu/EURLs/eurl_mycotoxins/legislation/Pages/index.aspx]
20. Nguefack J., Dongmo J.B.L., Dakole C.D., Leth V., Vismer H.F., Torp J., Guemdjom E.F.N., Mbeffo M., Tamgue O., Fotio D., et al., *Food preservative potential of essential oils and fractions from Cymbopogon citratus, Ocimum gratissimum and Thymus vulgaris against mycotoxigenic fungi*, Int. J. Food Microbiol. G.H.O., Grespan R., Mikcha J.M.G., Machinski M., *Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of Thymus vulgaris L. by Aspergillus flavus Link*, Food Chem. **2015**, 173:1006–1010.
22. Pinto E., Gonçalves M.J., Oliveira P., Coelho J., Cavaleiro C., Salgueiro L., *Activity of Thymus caespitius essential oil and α -terpineol against yeasts and filamentous fungi*. Ind. Crops Prod., **2014**, 62: 107–112.
23. Rajkovic K., Pekmezovic M., Barac A., Nikodinovic-Runic J., Arsic Arsenijevic V., *Inhibitory effect of thyme and cinnamon essential oils on Aspergillus flavus: Optimization and activity prediction model development*, Ind. Crops Prod. **2015**, 65: 7–13.
24. Rus C.F., Alexa E., Pop G., Sumalan R.M., Copolovici M., *Antifungal Activity and Chemical Composition of Salvia Officinalis L.*, Essential Oil. **2015**, 47(2): 186–194.
25. Tofana M., Socaci Ancuta, Mudura Elena, *Old Principles – New Methods in the Volatile Oils Approach*, Bull. UASVM Agric. **2010**, 67(2): 439–446.
26. Stević T., Berić T., Šavikin M., Soković M., Godevac I., Dimkić I., Stanković S., *Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant*, Ind Crops Prod, **2014** 55:116-122.
27. Doolotkeldieva TD: *Microbiological control of flour-manufacture: Dissemination of mycotoxins producing fungi in cereal products*. Microbiology Insights, **2010**. 3:1-15.
28. Hocking AD, Pitt JI, Samson RA, Thrane U, *Advances in Food Mycology*. Ed. Springer, New York;: **2006**: 344.

REVENDICĂRI

1. Preparate naturale de tip nanoemulsii cu acțiune antifungică și antimicotoxigenă, destinate protecției cerealelor, în cultură și depozite, cu aplicare foliară și/sau la seminte, pentru utilizare în agricultura biologică, pe baza de uleiuri esențiale din familiile Lamiaceae și Umbelifere, cu adaos de excipienți organici naturali. Compoziție caracterizată prin aceea că este constituită din amestec de principii active reprezentate de uleiuri esențiale selectate din următoarele plante: mărar (*Anethum graveolens*), oregano (*Origanum vulgare*), cimbru (*Thymus vulgaris*), în proporții de 0,3...2%, lecitină din soia în cantitate de 0,05%, și apă diferentă până la 100%.
2. Procedeu de obținere a unor preparate naturale cu acțiune antifungică și antimicotoxigenă, de tip nanoemulsii pe baza de uleiuri esențiale din familiile Lamiaceae și Umbelifere, cu adaos de substanțe emulsionabile, prin tehnici compatibile cu agricultura organică.



27

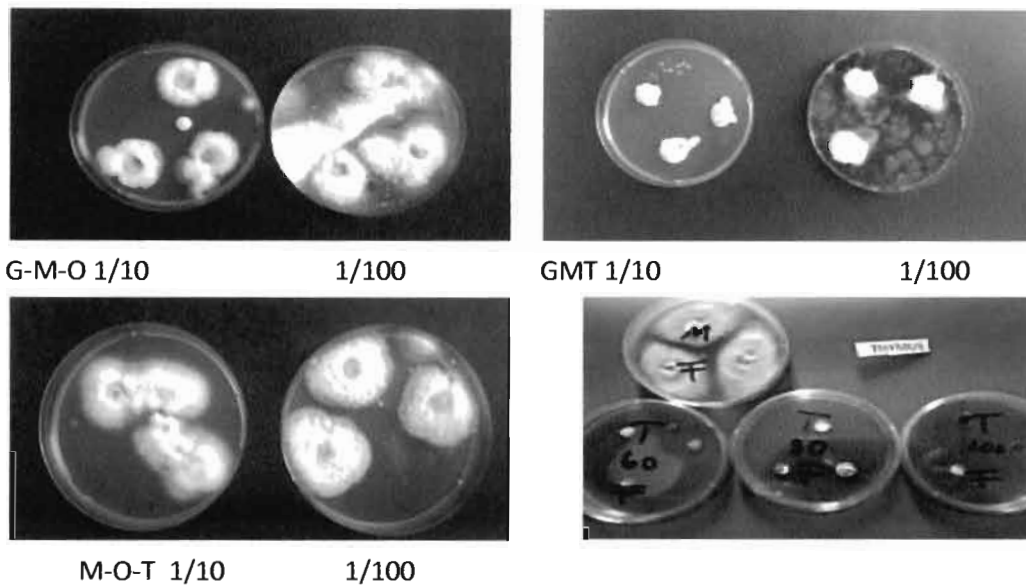


Figura 1. Evidențierea efectului antifungic in vitro al preparatelor naturale cu acțiune antifungică (PNA) și a uleiului de *Thymus* asupra *Fusarium graminearum*



Figura 2. Evidențierea efectului antifungic al preparatelor naturale cu acțiune antifungică (PNA) asupra *Fusarium graminearum* a-control; b- GMT 1:10

Sento