



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00158

(22) Data de depozit: 12/03/2019

(41) Data publicării cererii:
30/09/2020 BOPI nr. 9/2020

(71) Solicitant:

- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.202, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- UNIVERSITATEA DIN PITEȘTI, STR.TÂRGUL DIN VALE NR.1, PITEȘTI, AG, RO;
- UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE PENTRU BIOTEHNOLOGII ÎN HORTICULTURĂ ȘTEFĂNEȘTI-ARGEȘ, CALEA BUCUREȘTI NR.37, ȘTEFĂNEȘTI, AG, RO

(72) Inventatori:

- FIERASCU IRINA, STR. CÂMPIA LIBERTĂȚII, NR.5, BL.PM 60, SC.A, AP.48, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- FIERASCU RADU CLAUDIU, STR.DUNĂRII, BL.D4, AP.18, ROȘIORI DE VEDE, TR, RO;
- FISTOȘ TOMA, STR.SPICULUI, NR.31, ONEȘTI, BC, RO;
- SOARE LILIANA CRISTINA, ALEEA SENESLAU, NR.6A, PITEȘTI, AG, RO;
- UNGUREANU CAMELIA, ALEEA DOLINA NR.1, BL.134, ET.2, SC.1, AP.12, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
- VIZITIU DIANA, STR.COASTA CAMPULUI, NR.155B, ȘTEFĂNEȘTI, AG, RO;
- DRĂGHICEANU OANA ALEXANDRA, STR.TOCILESCU GRIGORE, NR.1, BL.1, SC.E, AP.1, PITEȘTI, AG, RO;
- PĂUNESCU ALINA, STR.CONSTANTIN BRÂNCOVEANU, NR.2, BL.B1, SC.A, AP.24, PITEȘTI, AG, RO

(54) COMPOZIȚIE ECOLOGICĂ ANTIFUNGICĂ DE COMBATERE A TULPINILOR FITOPATOGENE CARE AFECTEAZĂ VIȚA-DE-VIE ȘI METODĂ DE OBȚINERE A ACESTEIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții antifungice pentru tratarea manei viței-de-vie. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: preparare a extractului alcoolic din ferigă *Asplenium scolopendrium* utilizând un raport plantă: solvent etanol între 1:7 și 1:15, amestecarea extractului filtrat cu o soluție de azotat de argint în raport extract: soluție între

3:1 și 1:3, menținerea la lumină timp de 2...8h, rezultând nanoparticule de argint fitosintetizate în dispersie în extract hidroalcoolic de *A. scolopendrium*, care se stochează la întuneric în vederea utilizării într-o perioadă de cel puțin 4 luni .

Revendicări: 3

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



**COMPOZIȚIE ECOLOGICĂ ANTIFUNGICĂ DE COMBATERE A TULPINILOR
FITOPATOGENE CARE AFECTEAZĂ VIȚA-DE-VIE ȘI METODĂ DE OBȚINERE A
ACESTEIA**

Prezenta invenție se referă la o compoziție ecologică de combatere a tulpinilor patogene care afectează vița-de-vie (de tipul *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, (1888) responsabilă cu apariția manei vitei-de-vie), bazată pe nanoparticule de argint fitosintetizate utilizând extract de *Asplenium scolopendrium* L.

Sunt cunoscute numeroase boli ale plantelor cauzate de agenți patogeni, cum ar fi ciuperci, mușgaiuri, bacterii și virusuri. Multe dintre ele, de obicei legate de condițiile climatice care favorizează debutul și difuzia lor, au consecințe dramatice, ducând la pierderi de randament ale culturilor care pot avea un impact profund și, uneori, catastrofal asupra economiei agricole, în special atunci când boala își asumă statutul de epidemie.

Un exemplu remarcabil din punct de vedere istoric al unei boli a plantelor care provoacă consecințe devastatoare este infectarea culturilor de cartofi de către *Phytophthora infestans*, responsabilă de marea foamete irlandeză de la sfârșitul anilor 1840.

Producția agricolă la nivel mondial este amenințată permanent de numeroasele ciuperci și bacterii fitopatogene. Pentru protecția randamentului și a calității produselor și pentru evitarea pierderilor economice, aplicarea agenților care controlează bolile plantelor este o cerință absolută. În acest sens acestea trebuie să îndeplinească exigențele de mediu: să nu dauneze mediului și sănătății umane, prin acumularea lor, sau prin aplicare directă.

Plasmopara viticola (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, (1888) este ciuperca ce produce mana vitei-de-vie, foarte des întâlnită în țara noastră și care poate să ducă la pierderi ale producției până la chiar 80%. Atacul manei asupra vitei de vie se manifestă pe toate organele aeriene cum ar fi: frunze, flori, ciorchini, lăstari și boabe. Încă de primăvara sporii de rezistență germinează la suprafața solului umed la temperaturi peste 10 °C (optimum fiind 22-23 °C) și din interior apare un filament micelian care cade pe sol. Sporii astfel formați ajung în timpul ploilor pe frunze (partea interioară) unde pătrund în țesuturile plantei producând infecția. Din acest moment apar pete galbene pe frunze deoarece *Plasmopara viticola* începe perioada de hrănire în frunză. Boala propriu-zisă apare la apariția unui puf alb care poartă sporii (viabili 7-8 zile) și reprezintă miceliile. Aceștia pătrund în frunze prin stomate fiind mult mai bine drenați când au și umiditate de la ploaie. Toamna are loc contaminarea secundară când practic se închide ciclul formând din nou sporii de rezistență care germinează iar primăvara. Este foarte important să se dreneze



[Handwritten signature]



[Handwritten signature]

solurile care rețin puternic apa și să se distrugă toamna frunzele și iarba din jurul plantațiilor și/sau să se realizeze și arături adânci. Frunzele pot să fie atacate după ce ating o suprafață 10-25 cm² până ce îmbatrânesc și au aspect variat pornind primăvara de la o culoare galbenă până toamna când se brunifică (aspect uscat, ars). Pe spatele frunzelor apare un puf albicios care reprezintă miceliul și sporii fungului. Atacul pe lăstari se manifestă prin apariția unor pete de culoare brună care pe timp ploios se acoperă cu un puf albicios alcătuit din micelii cu spori. Coardele astfel atacate nu mai ajung la maturitate. În anii foarte ploioși ciorchinii tineri au cel mai mult de suferit și duc la scăderea dramatică a producției. Toamna, *Plasmopara viticola*, formează organele de rezistență care germinează din nou primăvara.

Compușii de cupru anorganici au fost primele biocide dezvoltate și utilizate. De remarcat este produsul de reacție al sulfatului de cupru și al hidroxidului de calciu, cunoscut sub numele de amestecul Bordeaux, care a fost dezvoltat la sfârșitul secolului al XIX-lea și care este încă folosit pe scară largă pentru controlul multor boli fungice și bacteriene ale plantelor. Alte exemple de săruri de cupru anorganice utilizate ca biocide sunt oxiclorigidele de cupru, hidroxizii de cupru, oxizi de cupru carbonat de carbonat de amoniu. Solubilitatea sărurilor de cupru variază de la zero (oxid de cupru) până la un nivel relativ ridicat (sulfat de cupru). Deși produsele cuprice sunt eficiente, acestea nu se recomandă în prima parte a perioadei de vegetație deoarece este împiedicată buna creștere și dezvoltare a plantelor. Pe lângă sărurile de cupru anorganice, sărurile anorganice ale altor metale sunt cunoscute pentru activitatea lor biocidă.

Ionii metalici sau compușii care conțin ioni metalici pot fi încorporați ca constituenți activi în compoziții care conțin alte ingrediente active. Sunt cunoscute combinații cu acid fosforos și / sau o sare și / sau un ester al acestora.

Fungicidele sistemice noi, cum ar fi fosetilul aluminiu și fenilamidele sunt eficiente datorită încorporării lor în țesuturile vegetale, dar absorbția fungicidului de către țesuturile de plante duce la acumulări de compusi chimici.

Studiile ecologice de evaluare a riscurilor au arătat că produsele din cupru, care în mod obișnuit sunt aplicate la viteze mari de utilizare, pot fi toxice pentru păsări, mamifere, pești și alte specii acvatice. Astfel, în timp ce cuprul este un agent foarte util pentru controlul creșterii organismelor patogene în medii diferite, este de dorit să se reducă la minimum cantitatea de cupru aplicată.

Dintre compuşii organici, o serie de compuşii chimici se utilizează ca și fungicide: incluzând ditiocarbamații, benzimidazoli, imidazoli, pirimidine, triazoli, anilide, etc.

Din cauza preocupărilor legate de impactul asupra sănătății umane și asupra mediului, există o cerere tot mai mare de înlocuire a pesticidelor chimice prin alternative ecologice. În plus,



în temeiul unor reglementări mai stricte, multe pesticide au fost deja interzise sau sunt în curs de reconsiderare.

Brevetul US 4 075 324 revendica folosirea fosfitului cupros ca agent antifungic.

Brevetul WO 2006/136551 revendica folosirea combinatiilor fungicide între cupru și acid fosforos.

Brevetul EP 3 259 991 A1 revendica utilizarea de compoziții antifungice cuprinzând esteri ai acidului benzoic și/ sau acid cinamic sau extracte de *Styrax tonkinensis* (Pierre) Craib ex Hartwich, *Styrax benzoin* Dryand și/sau *Styrax paralleloneurum* Perk și *Myroxylon balsamum* Harms var. *pereirae* Royle.

Brevetul WO 2006/006878 revendica o compoziție naturală antifungică bazată pe lapte gras, ulei de soia, ulei de măsline și ulei de nucă de cocos.

Brevetul US 2015/0344905 A1 revendica utilizarea unei compoziții fungicide dintre lipopeptidele formate de tulpinile de *Bacillus subtilis* sau *Bacillus amyloliquefaciens* și unul sau mai mulți compuși într-o cantitate eficientă din punct de vedere sinergic, de tipul: diclicol eter sulfati de sodiu ai alcoolului gras, monododecanoat de sorbitan și cauciuc sintetic.

Brevetul WO 2008/007251 A2 revendica utilizarea unei compoziții antifungice bazată pe metabolitul fungilor endofiti de *Alternaria alternata*, ca agenți antagoniști pentru *Plasmopara viticola*.

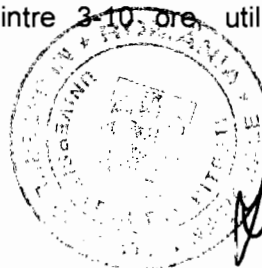
Brevetul WO 2017/125656 A1 revendica utilizarea unei compoziții antifungice ecologice bazată pe diverse tipuri de extracte de *Ditrichia viscosa*, împotriva organismelor patogene din familiile *Basidiomycetes*, *Oomycetes*, *Ascomycetes* și *Deuteromycetes*.

Scopul acestei invenții este găsirea unei soluții ecologice, ieftine și eficiente, de combatere a tulpinilor patogene care afectează culturile de via de vie și metoda de obținere a acestora.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unui nou tip de agent antifungic, împotriva manei vitei de vie, concomitent cu proprietatea de a nu fi toxic pentru mediul înconjurător și sănătatea umană și a fi ieftin și eficient.

Soluția ecologică de combatere a tulpinilor patogene care afectează culturile de via de vie, este bazată pe nanoparticule de argint fitosintetizate cu ajutorul extractului alcoolic de *Asplenium scolopendrium* L., planta din resursa vegetală autohtonă.

Pentru obținerea extractului alcoolic de *Asplenium scolopendrium* materialul vegetal se macină până la dimensiuni sub 100 μm, apoi se extrage prin folosirea etanolului de puritate 96% sau a unui amestec etanol:apă (în rapoarte variabile între 9:1 și 4:6), la o temperatură între 55-75°C, pentru o perioadă de timp variabilă între 3-10 ore, utilizând un raport material



R

vegetal:solvent între 1:7 și 1:15. Extractul se filtrează pentru îndepărtarea materialului vegetal. Fitosinteza nanoparticulelor de argint se realizează prin amestecul extractului cu o soluție de azotat de argint (concentrație între 1×10^{-4} M și 0,1 M) în rapoarte variabile între 3:1 și 1:3 (extract:soluție). Amestecul se păstrează la lumină pentru o perioadă de timp între 2-8 ore. Se formează nanoparticule de argint cu dimensiuni între 10-80 nm aflate în dispersie în extractul utilizat. Soluția conținând nanoparticule de argint astfel obținută se păstrează la întuneric sau în recipiente brune, putând fi utilizată o perioadă de cel puțin 4 luni.

Soluția propusă, conform invenției, **înlătură dezavantajele** utilizării substantelor chimice de sinteza, prin aceea că utilizează materiale ieftine ce se pot recolta din natura, nu necesita substanțe și solvenți toxici și/sau periculoși, și este fără acțiune negativă asupra mediului și sănătății umane.

Avantajul utilizării acestei soluții ecologice de combatere a tulpinilor patogene care afectează culturile de via de vie este că utilizează solvenți netoxici, este naturală și fără reacții adverse, este ieftină, și nu prezintă acțiune negativă asupra mediului și sănătății umane.

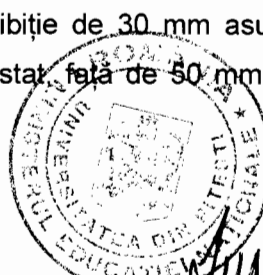
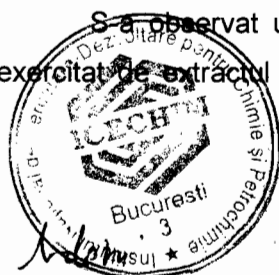
Se dau în continuare doua exemple de aplicare a invenției.

Exemplul 1

Nanoparticulele de argint au fost fitosintetizate utilizând un extract hidro-alcoolic (raport etanol:apă 7:3) obținut conform descrierii de mai sus, din rizomi de ferigă *A. scolopendrium* (extract obținut utilizând un raport material vegetal:solvent de 1:8, la temperatura de 72°C , timp de 2,5 ore) și sare de azotat de argint la o concentrație de $1,1 \times 10^{-3}$ M (raport extract: soluție de azotat de argint 1,5:1). Soluția nanostructurată obținută a fost testată din punct de vedere antifungic împotriva manei viței-de-vie cauzată de ciuperca *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, (1888). Microorganismul testat a fost izolat în laborator de pe frunze de viță de vie și cultivat pe mediul de cultură Potato Dextroză Agar la 37°C (mediul de cultură a avut următoarea compoziție: 4 g/L amidon din porumb, 20 g/L dextroză și 15 g/L agar) suplimentat cu 1% cloramfenicol pentru evitarea infectării bacteriene.

Metoda utilizată pentru determinarea activității antifungice s-a bazat pe măsurarea diametrului de zone de inhibiție [Behiry, S.I., EL-Hefny, M., Salem, M.Z.M., Toxicity effects of *Eriocephalus africanus* L. leaf essential oil against some molecularly identified phytopathogenic bacterial strains, Natural Product Research, 2019].

S-a observat un diametru al zonei de inhibiție de 30 mm asupra fungului *P. viticola* exercitat de extractul amestecul nanostructurat testat, față de 50 mm cât a fost diametru de



inhibiție rezultat după testarea matorului pozitiv, un fungicid de sinteză conținând două substanțe active (triadimenol și folpet), utilizat la o concentrație de 0,2% (conform instrucțiunilor producătorului).

Exemplul 2

Nanoparticulele de argint au fost fitosintetizate utilizând un extract alcoolic (etanol 96%) obținut conform descrierii de mai sus, din frunze de ferigă *A. scolopendrium* (extract obținut utilizând un raport material vegetal:solvent de 1:10, la temperatura de 70°C, timp de 3,5 ore) și sare de azotat de argint la o concentrație de $1,5 \times 10^{-3}$ M (raport extract:soluție de azotat de argint 1,25:1). Soluția nanostructurată obținută a fost testată din punct de vedere antifungic împotriva manei viței-de-vie cauzată de ciuperca *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, (1888).

S-a observat un diametru al zonei de inhibiție de 30 mm asupra microorganismului *P. viticola* față de rezultatul obținut în cazul matorului pozitiv, un fungicid de sinteză conținând două substanțe active (triadimenol și folpet), utilizat la o concentrație de 0,2% (conform instrucțiunilor producătorului).

În ambele exemple se observă o acțiune antifungică bună a extractelor testate raportată la acțiunea matorului pozitiv. Având în vedere că sunt un bio-extract este mult mai recomandat ca fungicid față de cele de sinteză chimică deja existente pe piață.



Revendicări

1. Compoziție antifungică nanostructurată, **caracterizată prin aceea că** este constituită din nanoparticule de argint fitosintetizate și extract obținut prin extracție termică din componentele unei plante autohtone, *Asplenium scolopendrium* L. (utilizând drept solvent etanol:apă la un raport între 10:0 și 4:6, raport material vegetal:solvent între 1:7-1:15). Soluția nanostructurată este obținută prin amestecarea extractului cu o soluție de azotat de argint (concentrație între 1×10^{-4} M și 0,1 M) în rapoarte variabile între 3:1 și 1:3 (extract:soluție), timp de 2-8 ore.
2. Compoziție antifungică pentru tratarea manei viței-de-vie **caracterizată prin aceea că** este constituită din nanoparticule fitosintetizate aflate în dispersie în extract hidroalcoolic obținut din rizomi ai ferigii *A. scolopentrium* (extract obținut utilizând un raport material vegetal:solvent de 1:8, solvent etanol:apa în raport 7:3, la 72°C, timp de 2,5 ore). Soluția nanostructurată este obținută utilizând un raport extract:soluție de azotat de argint $1,1 \times 10^{-3}$ M de 1,5:1.
3. Compoziție antifungică pentru tratarea manei viței-de-vie **caracterizată prin aceea că** este constituită din nanoparticule fitosintetizate aflate în dispersie în extract alcoolic obținut din frunzele ferigii *A. scolopentrium* (extract obținut utilizând un raport material vegetal:solvent de 1:10, solvent etanol, la 70°C, timp de 3,5 ore). Soluția nanostructurată este obținută utilizând un raport extract:soluție de azotat de argint $1,5 \times 10^{-3}$ M de 1,25:1.



Adon

100h

