



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00865

(22) Data de depozit: 05/12/2019

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(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;

• CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.297, BL.15A, SC.A,
ET.1, AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• NICOLAE CARMEN-VALENTINA,
STR.MALU ROȘU, NR.67A, BL.141B, ET.3,
AP.15, PLOIEȘTI, PH, RO;
• NEGOI ALINA, ALEEA STREJNIC, NR.3,
BL.A13, SC.A, AP.12, PLOIEȘTI, PH, RO;
• MIHĂILĂ ELIZA GABRIELA,
BD.RÂMNICU SĂRAT, NR.6, BL.21B, SC.A,
ET.7, AP.45, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) SOLVENȚI EUTECTICI CU TOXICITATE REDUSĂ
PENTRU PLANTE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de solvenți eutectici cu toxicitate redusă pentru formularea produselor agrochimice. Compoziția, conform invenției este constituită din clorură de betaină sau clorură de colină, ca acceptori de legături de hidrogen și 2,3-butandiol racemic sau izomerul 2R, 3R, ca donor de legături de hidrogen, în

rapoarte molare cuprinse între 1 mol acceptor de hidrogen la 1 până la 3 moli donori de hidrogen, de preferință 1, 1, 5, 2, 2, 5 și 3 M.

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).



SOLVENȚI EUTECTICI CU TOXICITATE REDUSĂ PENTRU PLANTE

Prezenta invenție se referă la solvenți eutectici cu toxicitate redusă pentru plante, ca și la utilizarea lui pentru formularea produselor agrochimice, în special îngrășăminte, biostimulanți pentru plante și biopesticide.

Sunt cunoscute o serie de amestecuri în raporturi molare bine determinate ale unor compuși cu punct de topire ridicat, care, datorită efectului eutectic pronunțat, sunt lichide la temperatura camerei. Astfel de amestecuri, cunoscute sub denumire de solvenți eutectici, deseori formate din componente naturale (NaDES - Natural Deep Eutectic Solvents) sunt alcătuite dintr-un donor de legături de hidrogen și un acceptor de legături de hidrogen, care formează o legătură de hidrogen cu o energie ridicată, denumită și "legătură de hidrogen ionică" (Martins *et al.* 2019, *Journal of Solution Chemistry*, 48(7), 962-982). NaDES au fost considerați ca fiind o alternativă la lichidele ionice, solvenți considerați ecologici la începutul acestui mileniu, care au însă o serie de dezavantaje precum costul lor ridicat de producție, nivelurile ridicate de toxicitate (mai ales pentru organismele acvatice), biodegradabilitatea redusă.

Cererea de brevet SE1850195 descrie un solvent eutectic format din uree și acetamidă și/sau derivații ai acestora, care este utilizat ca solvent sau agent de dispersie în sinteza chimică, fabricarea (nano)materialelor, cataliză chimică sau enzimatică, formulare a unor produse cosmetice sau farmaceutice, separare sau partiție, agenți pentru transfer termic și ca detergenți sau agenți de curățare.

Cererea de brevet FR3034625 prezintă solvenți eutectici utilizați pentru extracția materialului vegetal și / sau a animal și / sau a materialului biologic din microorganisme format dintr-un amestec care cuprinde: betaină sau o formă hidratată de betaină, ca acceptor de legături de hidrogen, cel puțin un compus donator de legături de hidrogen selectat din grupul de polioli sau acizi organici și apă. Amestecul exclude orice zahăr și / sau săruri de amină și / sau anioni exogeni. Polioli utilizați sunt aleși dintre glicerol, eritritol, manitol, sorbitol, etilen glicol, propilenglicol, ribitol, aldonitol, propanediol, sau pentilenglicol. Acizi organici sunt aleși dintre acidul lactic, acidul malic, acid maleic, acid piruvic, acid fumaric, acid succinic, acid lactic și altele asemenea. acid citric, acid acetic, acid aconitic, acid tartric, acid ascorbic, acid malonic, acid oxalic, acid glucuronic, acid neuraminic, acid sialic, acid shikimic, acid fitic, acid galacturonic, acid iduronic, acid hialuronic, acid hidroxitric sau derivați de lactonă. Proporția în masă a apei în solventul eutectic este de 1 până la 50%, de preferință, de 20 la 30%.

În cazul utilizării ca extractanți unul din dezavantajele solvenților eutectici este dificultatea separării lor de compușii extrași – din acest motiv cererea de brevet

FR30334625 descrie utilizarea solvenților eutectici pentru îmbunătățirea activității biologice și / sau fizico-chimice a compușilor incluși în respectivul extract, ca și utilizarea compușilor extrași împreună cu solvenții eutectici pentru producerea de nutraceutice, cosmeceutice, dispozitive medicale, compoziții farmaceutice. Rolul de creștere a biodisponibilității diferitelor medicamente de către solvenții eutectici este revendicat și de brevetul NL2021729 B1.

Deși sunt formați din componente naturale, citotoxicitatea NaDES este mai ridicată decât cea a componentelor (Hayyan *et al.* 2013. *Chemosphere*, 90, 2193-2195). Solventul eutectic betaină-glicerol conținând polifenoli extrași din cafea verde s-a dovedit a fi toxic pentru șobolani, inducând consum excesiv de apă, hepatomegalie, creșterea conținutului de lipide serice și a markerilor de stres oxidativ (Benlebna *et al.* 2018, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24), 6205-6212). NaDES formați din clorură de colină sau betaină, în combinație cu etilen glicolul, acidul citric sau urea, în care au fost extrași polifenoli din boască de struguri, s-au dovedit a fi toxici pentru râme și a avea o toxicitate moderată pentru plante (Samorì *et al.* 2019, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7, 15558-15567).

Comportamentul deosebit al solvenților eutectici este datorită faptului că structura lor stabilizată prin legături de hidrogen ionice se hidratează lent, cu menținerea unor nanostructuri de solvent eutectic (Posada *et al.* 2019. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 196-203). Aceste nanostructuri afectează stabilitatea sistemului celular de membrane pentru că modifică legăturile de hidrogen din apă, care stabilizează entropic interacțiile hidrofobe responsabile pentru menținerea stratelor bilipidice membranare. Destabilizarea membranelor determină formarea de specii reactive de oxigen și azot stress nitrosativ / oxidativ (Weidinger & Kozlov 2015. *Biomolecules*, 5, 472-484), cu efecte fiziopatologice.

Este deci necesară dezvoltarea unor noi solvenți eutectici, care să aibă o toxicitate redusă pentru organismele pe care se aplică împreună cu compușii bioactivi pe care-i extrag. În particular sunt necesari noi solvenți eutectici care să aibă capacitatea de a extrage ingredientele active din fluxurile laterale agroindustriale (subproduse ale agriculturii și industriei alimentare) utilizabile pentru realizarea de produse agrochimice. În felul acesta s-ar realiza o închidere biomimetică a lanțurilor de valoare din agricultură și industrie alimentară, fluxurile laterale generând produse agrochimice / inputuri în tehnologiile de cultivare a plantelor.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza solvenți eutectici formați din componente naturale, cu o toxicitate redusă față de plante și care să solubilizeze și să bio-disponibilizeze compuși biologic activi din fluxurile laterale agro-

industriale, pentru a forma produse destinate cultivării plantelor – biofertilizanți, biostimulanți pentru plante, biopesticide.

Solvenții eutectici conform invenției sunt formați din clorură de betaină sau clorură de colină, ca acceptori de hidrogen și 2,3 butandiol, ca donori de legături de hidrogen, în rapoarte molare cuprinse între 1 mol acceptori de hidrogen la 1 până la 3 moli donori de hidrogen, în variație demimolară 1, 1,5, 2, 2,5 și 3 M.

2,3 butandiolul din compoziția de mai sus este racemic sau izomerul *2R,3R*.

Solvenții eutectici sunt utilizați pentru a formula și/sau extrage: nanoparticule de silice amorfă extrasă din pleavă de orez sau de grâu spelta, utilizate ca biostimulanți pentru plante; saponide steroidice și acizi grași, utilizate ca bioinsecticide; chitosan format din chitină fungică, utilizat ca biofungicid și biostimulant pentru plante; hidrolizate proteice și chelați proteici, utilizați ca biofertilizanți și biostimulanți pentru plante.

Compoziția, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- Are o toxicitate redusă pentru plantele de cultură, întrucât stresul hidric eventual indus de nanostructurile eutectice este compensat de efectele de biostimulant pentru plante ale stereo-izomerului (*2R, 3R*) 2, 3 - BD, (Cho et al. *The Plant Pathology Journal*, 2013, 29, 427);
- Are o capacitate ridicată de a solubiliza ingrediente biologice active pentru biostimulanți, bioinsecticide, biofungicide, biofertilizanți.

În continuare sunt prezentate exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Se cântăresc cu precizie de 4 zecimale la balanța analitică 1396,23 grame de clorură de colină (ChCl:2,3BD) uscată și 901,2 g de 2,3 butanediol racemic (respectându-se astfel raportul molar de 1:1). Formarea DES are loc într-un sistem format dintr-un balon cu de sticlă de 3 litri, cu fund plat și 2 găuri, în care se introduce o bară agitator magnetic și căruia i se atașează un refrigerent vertical (pentru a minimiza pierderile prin evaporare, în special de 2,3 butandiol) și un termometru. Pentru încălzire uniformă se folosește o baie de ulei. Se încălzește la temperatura de 40°C, cu agitare 600 rpm, timp de două ore. După încheierea reacției de formare a amestecului eutectic, se obține o soluție transparentă, incoloră, vâscoasă, perfect omogenă. Spectru FTIR relevă modificări la 3322 cm⁻¹, specifică vibrației de întindere a grupărilor -OH, ceea ce demonstrează formarea unor legături de hidrogen cu intensitate crescută. Solventul eutectic rezultat, ChCl:2,3 BD 1:1, este utilizat pentru a formula nanoparticulele de silice amorfă extrase din pleavă de orez, prin dizolvare a 10 g nanoparticule de silice în 90 g solvent eutectic.

Exemplul 2. Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că se cântăresc cu precizie substanțele pentru a avea un raport molar de 1:2, iar solventul eutectic se

folosește pentru a extrage și formula saponinele steroidice și acizii grași extrase din inflorescențe de levănțică (*Lavandula angustifolia* Mill.) epuizate în uleiuri esențiale. 500 g din materialul vegetal extras de uleiuri esențiale se trece într-un vas de sticlă Simax® de 25 litri (Kavalier), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică, și un sistem de recirculare cu o celulă de flux FC100L1-1S (Hielscher Ultrasonics), împreună cu 3 kg de solvent eutectic, cu pH-ul ajustat la 7,5, și cu 2 litri de apă, conținând 2 mg/ml lipază B din *Candida antarctica*, cu minimum 9 unități lipazice per mg.

Lipaza folosită este Lipozyme Cal B1, (Novozyme A/S, Bagvaerd, Danemarca), lipaza B din *Candida antarctica*, exprimată în *Aspergillus niger*, cu minimum 9 unități lipazice per mg. O unitate lipazică este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, la 40,0°C, pH 7,0, eliberează 1 μmol de acid butiric per min din tributirină folosită ca substrat. Suspensia de material vegetal – soluție apoasă NaDES - enzime este amestecată cu agitatorul la 25 rpm și încălzită până la 50°C. Intermitent, 5 min la fiecare 30 min, se trece cu un debit de 5 litri pe min prin celula de flux pe care este montată o sonotrodă UIP 1000 hd (Hielscher Ultrasonics), omogenizându-se amestecul la 20 kHz și cu o putere de 500 W.

După 4 ore se separă materialul lignocelulozic recalitrant de extractul în NaDES cu apă, prin filtrare pe un filtru cu presiune (RPF T01, BHS-Sonthofen), la 0,6 MPa. Extractul se concentrează până la circa 3 kg prin folosirea unui Evaporator 25l/h Simax® (Kavalier). În amestecul de steroide și acizi grași separat în NaDES sunt determinate activitățile de stimulare a creșterii plantelor și de repelent pentru insectele dăunătoare, prin folosirea unor bioteste. Activitatea de stimulare a creșterii și dezvoltării plantelor, corespunzătoare brassinosteroidelor, a fost determinată prin biotestul plantulelor de *Raphanus sativus* L., după metoda descrisă de Takatsuto et al., 1983, Phytochem. 22:2437–2441, cu mici modificări. S-au folosit plantule în vârstă de 4 până la 5 zile, în cinci repeții, care au fost introduse în soluțiile test, reprezentate de diferite diluții, și menținute la întuneric pentru 24 ore la 25±2°C. După 24 ore s-a măsurat lungimea hipocotilului, care a fost comparată cu lungimea hipocotilului unor plantule martor tratate numai cu apă. Biotestul s-a repetat de două ori, calculându-se procentul de creștere suplimentară față de martor. S-a folosit și un produs standard, castasteron (Bk) [(22R,23R,24S)-2α,3α,22,23-tetrahidroxi-24-metil-5α-cholestan-6-on], OlChemIm, Olomuc, Cehia, în concentrație de 10⁻¹⁰ M. O diluție de 100 ori a soluției de amestec de steroide și acizi grași are aceeași activitate cu soluția standard de castasteron 10⁻¹⁰ M, ceea ce înseamnă un echivalent de 4,64 μg în amestecul extras dintr-un kg inițial de material vegetal uscat. Având în vedere dozele cuprinse între 10 și 30 mg de

brassinosteroid (a se vedea de ex. Serna et al., 2012, *Plant Growth Reg.* 68:333-342), concentrația obținută prin acest procedeu permite aplicarea în practică a procedului.

Pentru testarea efectului repelent și antifeeding al amestecului de steroide și acizi grași s-a utilizat biotestul larvelor de gândac de Colorado, determinându-se inhibarea hrănirii $FI = [1 - (T/C)] \times 100$, unde T și C sunt consumurile de discuri de frunze tratate și, respectiv, netratate (martor), conform metodei descrise de Reina et al., 2002, *J. Nat. Prod.* 65:448–453. Diluația de 100 ori a amestecului de steroide și acizi grași în NaDES a determinat o inhibare a hrănirii FI de $97,5 \pm 1,8\%$, ceea ce este semnificativ pentru utilizarea practică a produselor rezultate prin ridicarea la scară a procedului.

Exemplul 3. Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că se folosește betaină și se cântăresc cu precizie substanțele pentru a avea un raport molar de 1:1,5, iar solventul eutectic se folosește pentru a se solubiliza chitosan format din chitină fungică, utilizat ca biofungicid și biostimulant pentru plante.

Exemplu 4. Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că se folosește betaină și se cântăresc se cântăresc cu precizie substanțele pentru a avea un raport molar de 1:2,5, iar solventul eutectic se folosește pentru a se solubiliza zinc chelatat în hidrolizat proteic de rapiță, folosit ca biofertilizant pentru plante

Exemplu 5. Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că se folosește betaină și se cântăresc se cântăresc cu precizie substanțele pentru a avea un raport molar de 1:3, iar solventul eutectic se folosește pentru a se solubiliza fier chelatat în hidrolizat proteic de rapiță, folosit ca biofertilizant pentru plante.

Revendicări

1. Solvenți eutectici cu toxicitate redusă pentru plante conform invenției, **caracterizați prin aceea că**, sunt formați din clorură de betaină sau clorură de colină, ca acceptori de hidrogen și 2,3 butandiol, ca donor de legături de hidrogen, în rapoarte molare cuprinse între 1 mol acceptori de hidrogen la 1 până la 3 moli donori de hidrogen, în variație demimolară 1, 1,5, 2, 2,5 și 3 M.
2. Solvenți eutectici cu toxicitate redusă pentru plante conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că**, 2,3 butandiolul din compoziția de mai sus este racemic sau izomerul *2R,3R*.
3. Solvenți eutectici cu toxicitate redusă pentru plante conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că** sunt utilizați pentru a formula și/sau extrage: nanoparticule de silice amorfă extrasă din pleavă de orez sau de grâu spelta, utilizate ca biostimulanți pentru plante; saponide steroidice și acizi grași, utilizate ca bioinsecticide; chitosan format din chitină fungică, utilizat ca biofungicid și biostimulant pentru plante; hidrolizate proteice și chelați proteici, utilizați ca biofertilizanți și biostimulanți pentru plante