



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00865**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/06/2024** BOPI nr. **6/2024**

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

(73) Titular:
• **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.D7, 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 108619202 A; CN 111171095 A

(54) **SOLVENȚI EUTECTICI CU TOXICITATE REDUSĂ
PENTRU PLANTE**



RO 135022 B1

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

 Sunt cunoscute o serie de amestecuri în raporturi molare bine determinate ale unor
5 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,
7 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
9 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
11 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
13 producție, nivelurile ridicate de toxicitate (mai ales pentru organismele acvatice), biodegra-
dabilitatea redusă.

15 Cererea de brevet **SE 1850195** descrie un solvent eutectic format din uree și aceta-
midă și/sau derivați ai acestora, care este utilizat ca solvent sau agent de dispersie în sinteza
17 chimică, fabricarea (nano)materialelor, cataliză chimică sau enzimatică, formulare a unor
produse cosmetice sau farmaceutice, separare sau partiție, agenți pentru transfer termic și
19 ca detergenți sau agenți de curățare.

 Cererea de brevet **FR 3034625** prezintă solvenți eutectici utilizați pentru extracția
21 materialului vegetal și/sau a animal și/sau a materialului biologic din microorganisme formate
dintr-un amestec care cuprinde: betaină sau o formă hidratată de betaină, ca acceptor de
23 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
25 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
27 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
29 malonic, acid oxalic, acid glucuronic, acid neuraminic, acid sialic, acid fitic, acid galacturonic,
acid iduronic, acid hialuronic, acid hidroxititric sau derivați de lactonă. Proporția în masă a
31 apei în solventul eutectic este de 1 până la 50%, de preferință, de 20 la 30%.

 În cazul utilizării lor ca extractanți unul din dezavantajele solvenților eutectici este
33 dificultatea separării lor de compuși extrași - din acest motiv cererea de brevet **FR 30334625**
descrie utilizarea solvenților eutectici pentru îmbunătățirea activității biologice și/sau fizico-
35 chimice a compușilor incluși în respectivul extract, ca și utilizarea compușilor extrași
împreună cu solvenții eutectici pentru producerea de nutraceutice, cosmeceutice, dispozitive
37 medicale, compoziții farmaceutice. Rolul de creștere a biodisponibilității diferitelor medi-
camente de către solvenții eutectici este revendicat și de brevetul **NL 2021729 B1**.

39 Deși sunt formați din componente naturale, citotoxicitatea NaDES este mai ridicată
decât cea a componentelor (**Hayyan et al. 2013. Chemosphere, 90, 2193-2195**). Solventul
41 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
43 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,
45 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 au avut o toxicitate moderată
47 pentru plante (**Samorì et al. 2019, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 7,
15558-15567**).

RO 135022 B1

Comportamentul deosebit al solvenților eutectici este datorat 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 straturilor membranare. Destabilizarea membranelor determină formarea de specii reactive de oxigen și azot (**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, o reprezintă obținerea unor compuși 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 agroindustriale.

Solvenții eutectici conform invenției sunt formați din clorură de betaină sau clorură de colină, ca acceptori de legături 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 semimolară 1, 1,5, 2, 2,5 și 3 M. 2,3 butandiolul din compoziția de mai sus este racemic sau izomerul 2R, 3R al acestuia.

Solvenții eutectici sunt utilizați pentru a formula și/sau extrage: nanoparticule de silice amorfă extrase 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:

- 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, butandiol, (**Cho et al. The Plant Pathology Journal, 2013, 29, 427**).

- capacitate ridicată de a solubiliza ingrediente biologic 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 g de clorură de colină ChCl uscată și 901,2 g de 2,3 butandiol 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 l, 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. Spectrul FTIR relevă modificări la 3322 cm^{-1} , specifică vibrației de întindere a

RO 135022 B1

1 grupărilor -OH, ceea ce demonstrează formarea unor legături de hidrogen cu intensitate
crescută. Solventul eutectic rezultat, CHCl_3 :2,3 BD 1:1, este utilizat pentru a formula nanopar-
3 ticulele de silice amorfă extrase din pleavă de orez, prin dizolvare a 10 g nanoparticule de
silice în 90 g solvent eutectic.

5 Exemplul 2

7 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
9 (*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
11 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
13 la 7,5, și cu 2 l de apă, conținând 2 mg/ml lipază B din *Candida antarctica*, cu minimum 9
unități lipazice per mg.

15 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
17 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
19 ca substrat. Suspensia de material vegetal - soluție apoasă NaDES - enzime este ames-
tecată cu agitatorul la 25 rpm și încălzită până la 50°C. Intermitent, 5 min la fiecare 30 min,
21 se trece cu un debit de 5 l 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
23 500 W.

25 După 4 h se separă materialul lignocelulozic recalcitrant 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).
27 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
29 bioteste. Activitatea de stimulare a creșterii și dezvoltării plantelor, corespunzătoare
brassinosteroidelor, a fost determinată prin biotestul plantulelor de *Raphanus sativus* L.,
31 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, care au fost introduse în soluțiile
33 test, reprezentate de diferite diluții, și menținute la întuneric pentru 24 h la $25 \pm 2^\circ\text{C}$. După
24 h s-a măsurat lungimea hipocotilului, care a fost comparată cu lungimea hipocotilului unor
35 plantule martor tratate numai cu apă. Biotestul s-a repetat de două ori, calculându-se pro-
centul de creștere suplimentară față de martor. S-a folosit și un produs standard, castasteron
37 (Bk) [(22R,23R,24S)-2a,3a,22,23-tetrahidroxi-24-metil-5a-cholestan-6-on], în concentrație
de 10^{-10} M. O diluție de 100 ori a soluției de amestec de steroide și acizi grași are aceeași
39 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
41 dozele cuprinse între 10 și 30 mg de brassinosteroide (a se vedea de ex. **Serna et al.,**
2012, Plant Growth Reg. 68:333-342), concentrația obținută prin acest procedeu permite
43 aplicarea în practică a procedurii.

45 Pentru testarea efectului repetent și antifeeding al amestecului de steroide și acizi
grași s-a utilizat biotestul larvelor de gândac de Colorado, determinându-se inhibarea hrănirii
 $\text{FI} = [1 - (T/C)] \times 100$, unde T și C sunt consumurile de discuri de frunze tratate și, respectiv,
47 netratate (martor), conform metodei descrise de **Reina et al., 2002, J. Nat. Proci. 65:448-**
453. Diluația de 100 ori a amestecului de steroide și acizi grași în NaDES a determinat o
49 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 procedurii.

RO 135022 B1

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.

Exemplul 4

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 1:2,5, iar solventul eutectic se folosește pentru a se solubiliza zinc chelatat în hidrolizat proteic de rapiță, folosit ca biofertilizant pentru plante

Exemplul 5

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 1:3, iar solventul eutectic se folosește pentru a se solubiliza fier chelatat în hidrolizat proteic de rapiță, folosit ca biofertilizant pentru plante.

1

3

5

7

9

11

13

15

RO 135022 B1

Revendicări

1

3

1. Solvenți eutectici cu toxicitate redusă pentru plante pe bază de clorură de colină și 2,3 butandiol, **caracterizați prin aceea că**, sunt constituiți din clorură de betaină sau clorură de colină, ca acceptori de legături de hidrogen și 2,3 butandiol, ca donori de legături de hidrogen, în rapoarte molare cuprinse între 1 mol acceptori de hidrogen la 1...3 moli donori de hidrogen, în variație semimolară 1, 1,5, 2, 2,5 și 3 M.

7

9

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 al acestuia.

11

13

3. Solvenți eutectici cu toxicitate redusă pentru plante conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că**, sunt utilizați pentru extragerea din pleavă de orez sau de grâu spelta de nanoparticule de silice amorfă; saponide steroidice și acizi grași; chitosan format din chitină fungică; hidrolizate proteice și chelați proteici.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 268/2024