



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 01015

(22) Data de depozit: 03/12/2018

(41) Data publicării cererii:  
29/04/2022 BOPI nr. 4/2022

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL DE CHIMIE  
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI" DIN  
IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ  
NR.41 A, IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:  
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,  
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MARIN LUMINIȚA,  
STR.SARMISEGETUZA, NR.13, BL.J1,  
SC.A, ET.1, AP.3, IAȘI, IS, RO;

• CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,  
ȘOS.MIHAI BRAVU NR. 297, BL. 15A,  
SC. A, AP. 5, ET.1, SECTOR 3, BUCUREȘTI,  
B, RO;  
• AILINCAI DANIELA,  
STR. ANASTASIE PANU, NR.23,  
BL.MUNTENIA, SC.B, AP.21, IAȘI, IS, RO;  
• NICOLESCU ALINA, STR.LUICĂ NR.33,  
BL.M5, SC.1, ET.4, AP.29, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DELEANU CĂLIN, ȘOS.PANTELIMON  
NR.354, BL.2, SC.4, AP.135, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) FILM BIOACTIV GLICODINAMERIC PE BAZĂ DE CHITOSAN  
OBȚINUT DIN CIUPERCI ȘI PROCEDEU DE APLICARE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un film bioactiv comestibil, realizat din chitosan provenit din ciuperci, și la un procedeu de aplicare a acestui film bioactiv pentru protecția produselor vegetale care sunt consumate în stare proaspătă, în ultimele faze de vegetație și în timpul depozitării. Filmul bioactiv, conform invenției, este obținut prin turnare și uscare, din soluție vâscoasă rezultată prin reacția unei soluții 2% dechitosan extras din ciuperci în apă acidifiată cu acid acetic glacial, încălzită la 60°C, la care se adaugă lent soluție alcoolică de

aldehidă, sub agitare magnetică continuă, la 1000rot/min, timp de 3 ore, și termostatare la 60°C. Procedeu de aplicare, conform invenției, implică etapele: măcinarea filmului la o granulație de 2 mm, realizarea unei soluții 2% prin solubilizarea în apă la care s-a adus pH-ul la valoarea de 6,2, și stropirea pe plantele din care se intenționează obținerea de produse vegetale proaspete.

Revendicări: 7



## FILM BIOACTIV GLICODINAMERIC PE BAZĂ DE CHITOSAN OBȚINUT DIN CIUPERCI ȘI PROCEDEU DE APLICARE

Prezenta invenție se referă la un film bioactiv comestibil, realizat din chitosan provenit din ciuperci, în special din subproduse de la creșterea ciupercilor, și la un procedeu de aplicare a acestui film bioactiv pentru protecția fructelor și legumelor consumate în stare proaspătă, în ultimele faze de vegetație și în timpul depozitării.

Sunt cunoscute filme bioactive realizate din chitosan care sunt utilizate pentru extinderea duratei de păstrare a diferitelor produse alimentare, inclusiv fructe și legume. Filmele bioactive pe bază de chitosan limitează modificările calitative ale produselor tratate, previn dezvoltarea microorganismelor, mențin activitatea antioxidantă a produselor vegetale și le prelungesc durata de valabilitate (Wang et al. 2018, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 395-413). În majoritatea cazurilor aplicarea filmelor de chitosan se face după recoltare. Cererea de brevet WO2016003295 se referă la un film biopolimeric produs dintr-o soluție de alfa și/sau beta chitosan și acizi organici, în special acid acetic, destinat acoperirii fructelor și legumelor, proaspete sau pre-fierte. Odată acoperite cu filmul de chitosan, fructele și / sau legumele sunt introduse în recipiente perforate din PET reciclabil și depozitate la 3°C. Brevetul SUA US5633025 prezintă un film bioactiv format din derivați de chitosan, glicolchitosan sau carboximetilchitosan, și drojdii antagoniste, *Candida oleophila*, *Candida saitoana*, *Candida sake*, *Candida tinus*, *Candida utilis* și *Pichia guilliermondii*. Brevetul RO 128966 B1 descrie un film bioactiv destinat ambalării produselor alimentare, care este obținut din extract apos de plante, din ceai verde și busuioc, cu chitosan acidifiat cu 0,7% acid acetic glacial, amestecul rezultat conținând 4% ceai verde, 2% busuioc și 2% chitosan, fiind ulterior sterilizat timp de 10 min la 110°C, turnat în forme, deshidratat la 37°C, timp de 2 h, iar apoi depozitat la maximum 25°C. Cererea de brevet IN 201731010421 A protejează o compoziție pe bază de chitosan, nanoparticule de cupru și mentol, pentru prelungirea duratei de păstrare a fructelor climatice (la care etilena produsă post-recoltare are rol în maturare), selectate din grupul căpșuni, măr, portocale, tomate și dovlecei, preferabil tomate (*Solanum lycopersicum*).

Totuși, microorganismele fitopatogene și/sau spoliatoare care reduc durata de păstrare a fructelor și legumelor proaspete infestază produsele vegetale în ultimele faze de vegetație (Hua et al. 2018. *Food Quality and Safety*, 2, 111-119). De asemenea, microorganismele considerate factori majori de risc pentru siguranța alimentelor proaspete, respectiv bacteriile enteropatogene și fungii toxigeni, contaminatează produsele vegetale în ultimele faze de vegetație (Eduardo et al. 2018, *Scientia Horticulturae*, 236, 192-206, Barkai-Golan și Paster 2008, *World Mycotoxin Journal*, 1, 147-159). Astfel încât tratamentele cu bioproduse pe bază de chitosan în ultimele faze de vegetație ale culturilor de fructe și legume conferă și o protecție sporită a acestor produse vegetale față de microorganismele dăunătoare, agenți fitopatogeni, microorganisme spoliatoare, bacterii enteropatogene, fungi toxigeni (Romanazzi, 2017, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 579-601), și apoi ar determina mărirea duratei de păstrare a produselor vegetale consumate în stare proaspătă.

Deși rezultatele aplicării filmelor bioactive în timpul ultimelor faze de vegetație sunt promițătoare, au fost descrise relativ puține brevete care protejează soluțiile tehnice asociate (bio)produselor pe bază de chitosan aplicate în timpul vegetației pentru prelungirea duratei de păstrare a produselor consumate în stare proaspătă. De exemplu, brevetul CN 103238633 B prezintă un procedeu de prevenire a bolilor și de prelungire a duratei de păstrare a curmalelor chinezești (*Ziziphus jujuba*), care implică aplicarea unei suspensii care conține elemente minerale, chitosan și o drojdie antagonistă, *Cryptococcus laurentii*.

În majoritatea soluțiilor care utilizează bioproduse pe bază de chitosan, pentru prelungirea duratei de acțiune, necesară exercitării efectelor pe toată perioada, de la ultimele faze de vegetație până la consum, se asociază chitosanul cu alți agenți bioactivi, cum ar fi de ex. microorganismele antagoniste microorganismelor dăunătoare (Zhang et al. 2018. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 180-187) sau uleiurile esențiale (Tovar et al. 2018. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 61-76). Este de dorit deci realizarea unor filme bioactive, care să poată fi aplicate în timpul ultimelor faze de vegetație ale fructelor și legumelor, și care să aibă o durată de acțiune prelungită, datorită eliberării controlate a agenților bioactivi.

Glicodinamerii, structuri supramoleculare rezultate din chitosan și aldehide, care sunt caracterizați prin existența unor legături fizice (de hidrogen) și chimice (covalente) dinamice, prezintă astfel de acțiuni prelungită, datorită eliberării lente a monoaldehydelor și a oligochitozaharidelor formate prin hidroliza lentă a chitosanului sub acțiunea factorilor biotici și abiotici.

Până în prezent (glico)dinamerii nu au fost descriși cu utilizări în obținerea filmelor bioactive destinate prelungirii duratei de păstrare a produselor vegetale consumate în stare proaspătă, aplicate în timpul vegetației sau după recoltare. Este cunoscută utilizarea unor dinameri, care includ legături covalente reversibile în condiții fiziologice, hidrazone, imine, oxime sau o combinație a acestora, pentru formarea unor acoperiri bioactive pe dispozitive medicale, ca de ex. stent (cererea de brevet WO2008100847). Acoperirea include și interacțiuni ne-covalente reversibile și un agent terapeutic.

Cererea de brevet WO 2006092057 A1 descrie un polizaharid modificat prin reacția dintre o unitate monozaharidică cu o grupare amină primară și o aldehydă hidrofobă. Polizaharidul este chitosan sau agaroză amino-substituită, alginat amino-substituit, pectină amino-substituită, celuloză amino-substituită. Aldehyda hidrofobă este selectată din grupul constituit din cinamaldehydă, metoxi-cinamaldehydă, metil-cinamaldehydă, hidroxi-cinamaldehydă, benzaldehydă, cuminaldehydă, metoxi-benzaldehydă, siringaldehydă, anisaldehydă, dimetil-anisaldehyde, hidroxi-anisaldehydă, metil-anisaldehydă, ciclohexen-carboxaldehyde, mirtenal, perilaldehydă și felandral. Sunt revendicate procese de preparare și de utilizare a compoziției în industria cosmetică, farmaceutică sau alimentară. În industria alimentară principala revendicare este pentru realizarea filmelor destinate prelungirii duratei de păstrare a produselor alimentare. Nu sunt însă descrise utilizări ale compoziției revendicate pentru tratamente aplicate plantelor de cultură în timpul vegetației. De asemenea nu sunt revendicate compoziții supramoleculare de tip glicodinamer, cu legături reversibile, și nu sunt descrise condițiile pentru formarea unei astfel de structuri.

Chitosanul are acțiuni multiple asupra plantelor de cultură, inclusiv acțiune de biostimulant pentru plante (Pichyangkura și Chadchawan 2015. *Scientia Horticulturae*, 196, 49-65). Biostimulanții pentru plante sunt o nouă clasă de produse

utilizate ca inputuri în tehnologiile de cultură a plantelor, care determină: creșterea eficienței de preluare și utilizare a nutrienților de către plante, mărirea rezistenței la factorii de stres abiotici și îmbunătățirea calității recoltei (du Jardin, 2015. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14). Până în prezent nu au fost descrise bio-produse pe bază de chitosan, care să fie destinate tratamentului fructelor / legumelor în ultimele faze de vegetație, pentru prelungirea duratei de păstrare în stare proaspătă, și care, în același timp, să prezinte și o activitate semnificativă de biostimulanți de creștere.

Majoritatea bioproduselor pe bază de chitosan realizate până în prezent sunt pe bază de chitosan din crustacee marine (McInnis et al. 2018, *Coatingstech*, 15, 36-43). Aceasta generează o serie de dezavantaje, datorită solubilității reduse în apă, proprietăților mecanice slabe ale filmelor de chitosan (Zivanovic et al. 2007, *Biomacromolecules*, 8, 1505-1510), ca și lipsei de reproductibilitate a sintezei și proprietăților filmelor bioactive, datorită diferențelor de masă, grad de deacetilare și cristalinitate a chitosanului provenit din crustacee marine (Philibert et al. 2017. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181, 1314-1337).

Chitosanul obținut din ciuperci are proprietăți mecanice superioare și o reproductibilitate mai bună a sintezei și proprietăților filmelor bioactive, datorită gradului de deacetilare mare și unui tipar de deacetilare uniform (Ghormade, et al. 2017, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1415-1421). De asemenea, chitosanul din ciuperci (macro sau micro-micete) are o capacitate superioară de inducere a răspunsului de apărare, (Sharif et al. 2018. *Molecules*, 23, 872), deci poate funcționa mai eficient ca biostimulant pentru plante.

Problema tehnică pe care o rezolvă această invenție este de a realiza un film bioactiv comestibil, realizat din chitosan provenit din subproduse de la creșterea ciupercilor, care să aibă caracteristici mecanice superioare și care să inducă eficient sistemele de apărare din plante, pentru o acțiune reproductibilă ca biostimulant pentru plante.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu de aplicare țintit, prin care să se formeze un film bioactiv comestibil la suprafața fructelor și/sau frunzelor și în același timp să se realizeze și acțiunea de biostimulant pentru plante.

Inventatorii au găsit că grefarea de unități imină pe lanțurile de chitosan cu obținere de glicodinameri îmbunătățește considerabil proprietățile mecanice ale acestora datorită diminuării forței legăturilor de hidrogen dintre lanțurile de chitosan, simultan cu apariția unei arhitecturi supramoleculare stratificate. Pe de altă parte, reversibilitatea legăturii imină conferă caracter dinamic noilor derivați, înzestrându-i cu sensibilitate la variația de pH și umiditate, și, implicit, cu o capacitate de eliberare controlată a agenților bioactivi.

Procedeul de aplicare ținut dezvoltat de invenție este un procedeu de stropire electrostatică, prin care picăturile de soluție de glicodinamer aplicate plantelor în ultimele faze de vegetație sunt încărcate electrostatic, de către electrodul care înconjoară fiecare duză. Picăturile încărcate electrostatic induc o sarcină opusă în plante, inclusiv pe fructele în curs de formare, și sunt atrase preponderent spre acestea (Law și Scherm, 2005, *Journal of Electrostatics*, 63, 399-408), unde (re)formează filmul bioactiv. De asemenea, picăturile încărcate electrostatic au dimensiuni semnificativ mai mici, de sub 100 μm în diametru, comparativ cu 300 - 600 μm, cât au picăturile generate convențional prin duzele de presiune (Law și Cooper, 2001. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 37, 1597-1602), ceea ce înseamnă posibilitatea reducerii normei de aplicare și creșterii concentrației, în condițiile menținerii dozei de chitosan în limitele activității biologice optime.

Filmul bioactiv conform invenției este obținut prin turnare și uscare, din soluția vâscoasă rezultată prin reacția a 9,27 kg de soluție chitosan extras din ciuperci 2% în apă acidifiată cu 0,7% acid acetic glacial, încălzită la 60°C, la care s-a adăugat încet 10 kg de soluție alcoolică de aldehydă, sub agitare continuă, la 1000 rot/min, timp de 3 ore, și termostatare la 60°C.

Chitosanul extras din ciuperci are masa moleculară de 263 kDa și un grad de acetilare de 15%.

Soluția alcoolică de aldehydă utilizată are concentrația de: 1,52% pentru vanilină; 1,06% pentru benzaldehidă; 1,22% pentru salicilaldehidă; 1,22% pentru 4-hidroxibenzaldehidă; 1,67% pentru 2-Hidroxi-5-nitrobenzaldehyda; 1,85% pentru 4-bromobenzaldehida; 1,40% pentru 4-clorbenzaldehyda; 1,52% pentru citral; 1,49%

pentru 2-formilfenil-acid boronic; 1,32% pentru cinamaladehida; 1,50% pentru piperonal, și, respectiv, de 1,54% pentru mentonă.

Procedeul de aplicare implică următoarele etape: măcinarea filmului până la o granulație de 2 mm, realizarea unei soluții de 2% prin solubilizarea înainte de aplicare în apă la care s-a adus pH-ul la valoarea 6,2, și stropirea pe plantele de la care se intenționează obținerea de fructe și legume proaspete, cu un volum corespunzător unei norme de stropire de 200 litri per ha, la o presiune pe duza de stropire de 207 kPa, la o tensiune de inducere de 0,85kV și la o încărcare electrostatică de 7,8 mC per litru de soluție aplicată.

Plantele pe care se aplică tratamentul sunt căpșun, zmeur, afin, mur, agriș, aronia, merișor, salată, spanac, lobodă.

Procedeul de aplicare se realizează la căpșun, zmeur, afin, mur, agriș, aronia, merișor pe plante aflate în faza de finalizare a dezvoltării fructelor.

Procedeul de aplicare se realizează la salată, spanac, lobodă aflate în fenofazade începutul formării frunzelor de consum.

Această invenție prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Permite aplicarea țintită a celei mai mari părți din soluția de stropit, pe partea comestibilă a produselor vegetale destinate consumului în stare proaspătă, la o concentrație care asigură reformarea filmului bioactiv glicodinamic;
- ✓ Asigură protecția produselor vegetale tratate pe perioada de maturare a părților consumate în stare proaspătă, ca și pe perioada de recoltare, transport și depozitare;
- ✓ Eliberează treptat chitooligozaharide și aldehide sub acțiunea factorilor biotici și abiotici de pe frunze și/sau de pe fructe și legume;
- ✓ Are efect de biostimulant pentru plante, datorită acțiunii chitosanului, chitooligozaharidelor și aldehydelor eliberate în timp de produsul ajuns pe frunze;
- ✓ Limitează riscurile fitosanitare în timpul vegetației, dar și la recoltare, transport și depozitare, datorită acțiunii anti-microbiene a chitosanului și aldehydelor eliberate de produsul ajuns pe părțile comestibile consumate în stare proaspătă,

În continuare se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita.

*Exemplu 1.* Într-un vas de sticlă Simax® de 30 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică și refrigerent se solubilizează chitosanul extras din butoni de ciuperci *Agaricus bisporus*, (263 kDa, grad de acetilare 15 %). Acesta este dizolvat în soluție de acid acetic 0,7 % pentru a forma 10 kg soluție 2 %. Soluția de chitosan de 2% este încălzită la 60°C. Separat, este dizolvată vanilina în etanol, pentru a forma o soluție de 1,52%, iar soluția rezultată este încălzită la 60°C. Pentru a obține un grad maxim de iminare a chitosanului este necesară existența unui raport molar de 1/1 între grupările amină ale chitosanului și grupările aldehida. Soluția caldă de vanilină este picurată încet peste soluția caldă de chitosan, sub agitare continuă (1000 rot/min), timp de 3 ore. Pe măsură ce soluția de aldehidă este adăugată peste soluția de chitosan se observă colorarea acesteia, datorită reacției de iminare. După 3 ore de reacție, soluția obținută este turnată în strat subțire în tăvi de sticlă, care sunt incubate timp de o săptămână la 30°C. Filmele astfel obținute sunt apoi uscate într-o etuvă sub vacuum (Heraeus, VT6025, Thermo, Waltham, MA, SUA) la 70°C, timp de 72 de ore. Filmele uscate sunt apoi măcinate pe o moară cu rotor (SR 300, Retsch, Haan, Germania), până la o granulație de 2 mm.

Produsul rezultat se aplică la căpșun. Se realizează 5 litri de soluție de 2% prin solubilizarea filmului bioactiv glicodinamic granulat, în apă la care s-a adus pH-ul la valoarea 6,2. Produsul se aplică pe căpșun aflat în faza de finalizare a dezvoltării fructelor. Cu ajutorul unei pompe de spate prevăzut cu dispozitiv de stropire electrostatică MaxCharge™ (Electrostatic Spraying Equipment, Watkinsville, GA, SUA) se aplică 5 litri de produs pe 250 m<sup>2</sup> cultură de căpșuni. Volumul este corespunzător unei norme de stropire de 200 litri per ha. Se aplică produsul la o presiune pe duza de stropire de 207 kPa, la o tensiune de inducere de 0,85kV și la o încărcare electrostatică de 7,8 mC per litru de soluție aplicată.

*Exemplu 2.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,06% benzaldehidă. Produsul se aplică pe zmeur aflat în faza de finalizare a dezvoltării fructelor.

*Exemplu 3.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,22% salicilaldehidă. Produsul se aplică pe afin aflat în faza de finalizare a dezvoltării fructelor.



*Exemplu 4.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,22% 4-hidroxibenzaldehidă. Produsul se aplică pe mur aflat în faza de finalizare a dezvoltării fructelor.

*Exemplu 5.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,67% 2-Hidroxi-5-nitrobenzaldehidă. Produsul se aplică pe agriș aflat în faza de finalizare a dezvoltării fructelor.

*Exemplu 6.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,85% 4-bromobenzaldehidă. Produsul se aplică pe arbust de aronia aflat în faza de finalizare a dezvoltării fructelor.

*Exemplu 7.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,40% 4-clorbenzaldehydă. Produsul se aplică pe arbust de merișor aflat în faza de finalizare a dezvoltării fructelor.

*Exemplu 8.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,52% citral. Produsul se aplică pesalată aflate în fenofaza de începutul formării frunzelor de consum.

*Exemplu 9.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,49% 2-formilfenil-acid boronic. Produsul se aplică pesalată aflată în fenofaza de începutul formării frunzelor de consum.

*Exemplu 10.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,32% cinamaladehidă. Produsul se aplică pesalată aflată în fenofaza de începutul formării frunzelor de consum.

*Exemplu 11.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,50% piperonal. Produsul se aplică pespanac aflat în fenofaza de începutul formării frunzelor de consum.

*Exemplu 12.* Se lucrează la fel ca în exemplul 1, cu diferența că soluția de aldehidă care se aplică este o soluție de 1,54% mentonă. Produsul se aplică pelobodă aflată în fenofaza de începutul formării frunzelor de consum.

## Revendicări

- Film bioactiv conform invenției **caracterizat prin aceea că** este obținut prin turnare și uscare, din soluția vâscoasă rezultată prin reacția a 9,27 kg de soluție chitosan extras din ciuperci 2% în apă acidifiată cu 0,7% acid acetic glacial, încălzită la 60°C, la care s-a adăugat încet 10 kg de soluție alcoolică de aldehydă, sub agitare continuă, la 1000 rot/min, timp de 3 ore, și termostatare la 60°C.
- Film bioactiv conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** chitosanul extras din ciuperci are masa moleculară de 263 kDa și un grad de acetilare de 15%.
- Film bioactiv conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** soluția alcoolică de aldehydă are concentrația de 1,52% pentru vanilină; 1,06% pentru benzaldehidă; 1,22% pentru salicilaldehidă; 1,22% pentru 4-hidroxibenzaldehidă; 1,67% pentru 2-Hidroxi-5-nitrobenzaldehyda; 1,85% pentru 4-bromobenzaldehida; 1,40% pentru 4-clorbenzaldehyda; 1,52% pentru citral; 1,49% pentru 2-formilfenil-acid boronic; 1,32% pentru cinamaldehyda; 1,50% pentru piperonal; 1,54% pentru mentonă.
- Procedeu de aplicare conform invenției **caracterizat prin aceea că** implică următoarele etape: măcinarea filmului până la o granulație de 2 mm, realizarea unei soluții de 2% prin solubilizarea în apă la care s-a adus pH-ul la valoarea 6,2, și stropirea pe plantele de la care se intenționează obținerea produse vegetale proaspete, cu un volum corespunzător unei norme de stropire de 200 litri per ha, la o presiune pe duza de stropire de 207 kPa, la o tensiune de inducere de 0,85kV și la o încărcare electrostatică de 7,8 mC per litru de soluție aplicată.
- Procedeu de aplicare conform revendicării 4 **caracterizat prin aceea că** plantele pe care se aplică tratamentul sunt căpșun, zmeur, afin, mur, agriș, aronia, merișor, salată, spanac, lobodă.
- Procedeu de aplicare conform revendicării 4 **caracterizat prin aceea că**

se realizează la căpșun, zmeur, afin, mur, agriș, aronia, merișor pe plante aflate în faza de finalizare a dezvoltării fructelor.

- Procedeu de aplicare conform revendicării 4 **caracterizat prin aceea că** se realizează la salată, spanac, lobodă aflate în fenofaza de începutul formării frunzelor de consum.