



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00424

(22) Data de depozit: 18/07/2022

(41) Data publicării cererii:  
29/11/2022 BOPI nr. 11/2022

(71) Solicitant:  
• HOFIGAL EXPORT - IMPORT S.A.,  
INTRAREA SERELOR NR.2, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• POPESCU ADRIANA FLORINA,  
DRM.DEALU ALUNIȘ NR.37, BL.4, ET.5,  
AP.45, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• LUNTRARU CRISTINA MIHAELA,  
STR.GRIGORE C. MOISIL NR.6, BL.10,  
SC.2, ET.7, AP.91, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• GASPAR-PINTILIESCU ALEXANDRA,  
ȘOS.COLENTINA, NR.55, BLOC.83, SC.1,  
AP.17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• PRELIPCEAN ANA-MARIA,  
STR.SG.NIȚU VASILE NR.66, BL.25, ET.3,  
SC.2, AP.52, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• MOLDOVAN LUCIA,  
BD.CONSTRUCTORILOR NR.24A, BL.19,  
SC.A, ET.2, AP.13, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• CRACIUNESCU OANA,  
BD. NICOLAE GRIGORESCU NR. 33,  
BL. A1, SC. 3, AP. 33, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PREPARAT NATURAL  
ANTIFUNGIC DE TIP EMULSIE PENTRU TRATAMENTUL  
SISTEMIC AL PLANTELOR ÎN CULTURĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui preparat natural antifungic pentru tratamentul sistemic al plantelor în cultură. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: preparare a apelor florale din plante din familia *Lamiaceae* sub forma unei soluții cu minimum 1% conținut substanță uscată, prepararea unui adjuvant sub formă de emulsie stabilă de tip ulei în apă din amestec de ulei vegetal ales dintre floarea soarelui, măsline și rapiță, glicerol, alcool etilic și un emulgator de tip lecitină din soia sau fosfatidilcolină, adăugarea

soluțiilor peste adjuvantul de tip emulsie, în picătură, sub agitare, omogenizarea emulsiei în prezență de 0,1...1,5% surfactant neionic și completarea cu apă până la 1000 g, rezultând emulsii stabile cu 2...10% conținut de substanță uscată, pH de 6...7,5, având efect antimicrobian asupra bolilor de tip rugina plantelor, putregaiul rădăcinii, în culturile ecologice de plante.

Revendicări: 1



## PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI PREPARAT NATURAL ANTIFUNGIC DE TIP EMULSIE PENTRU TRATAMENTUL SISTEMIC AL PLANTELOR ÎN CULTURĂ

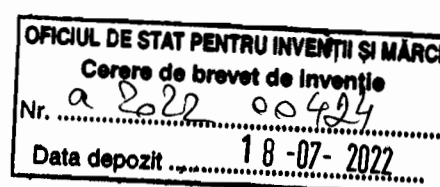
Adriana Florina Popescu, Cristina Mihaela Luntraru, Alexandra Gaspar-Pintiliescu,  
Ana-Maria Prelipcean, Lucia Moldovan, Oana Crăciunescu

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui preparat natural cu proprietăți antifungice sub forma unei emulsii de tip apă în ulei, pe bază de ape florale din plante aromatice și adjuvant uleios, destinat tratamentului sistemic al plantelor în cultură prin prelungirea perioadei de contact cu țesutul vegetal și capacitate de absorbție mărită și care acționează într-un mod prietenos cu mediul.

Se știe că apele florale se obțin în urma procesului de distilare a plantelor aromatice și separare de uleiurile volatile care rămân la suprafața acestora. Ele sunt considerate produse secundare, utilizate în special în aromaterapie, îngrijirea cosmetică a pielii și prepararea industrială a prăjiturilor și băuturilor (Paolini J. et al., *Journal of Chromatography Part A*, 2008, 1193, 37-49; Aazza S. & Miguel MG, *Journal of Medicinal Plant Research*, 2011, 5, 6688-6696; Acimovic M.G. et al., *Advances in Technology*, 2020, 9, 54-70). Apele florale conțin compuși vegetali bioactivi de tipul polifenolilor solubili în apă și fracția apoasă a uleiurilor volatile, care le conferă un miros plăcut. Cele mai cunoscute ape florale sunt cele din trandafir și portocal, utilizate în special în zona mediteraneană.

Se știe că agricultura bazată pe produse fungicide de sinteză conduce la poluarea mediului (sol, ape), precum și la produse agricole cu toxicitate remanentă, care pot afecta sănătatea oamenilor. În plus, manevrarea acestora este periculoasă și necesită condiții speciale de ambalare, transport, depozitare și utilizare. De aceea, se recomandă utilizarea unor produse realizate din compuși naturali cu acțiune antimicrobiană și toxicitate redusă pentru dezvoltarea unei agriculturi ecologice și durabile.

Sunt cunoscute diferite produse fungicide pe bază de extracte naturale de plante destinate protecției și tratamentului plantelor în cultură. Produsul denumit Bioprotekt este obținut din ulei volatil de neem (*Azadirachta indica*), materie organică, microorganisme, uleiuri volatile, acizi humici și huminici, care acționează ca un insecto-fungicid organic în controlul unor fungi patogeni din culturile de plante, precum *Puccinia recondite*, *Puccinia striiformis*, *Fusarium* spp. și *Erysiphe graminis* ([www.biohumussol.ro/produs/bioprotekt](http://www.biohumussol.ro/produs/bioprotekt)). Nimbudin și gedunin sunt compuși bioactivi toxici izolați din uleiul volatil de semințe de neem care asigură o activitate



biofungicidă (**Kumar R. et al.**, Bioactive constituents of neem, *In: Synthesis of Medicinal Agents from Plants*, pp. 75-103, 2018).

S-a arătat că extractele din rizomi de *Curcuma longa* obținute în hexan și acetat de etil conțin compusul bioactiv curcumin și au prezentat activitate fungicidă față de fitopatogenii *Rhizoctonia solani* și *Phytophthora infestans*, asigurând protecția plantelor în cultură față de boli precum, putregaiul tecii de orez și, respectiv, putregaiul cenușiu al tomatelor (**Kim M.K. et al.**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51, 1578-1581; **Han J.W. et al.**, *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 2018, 53, 135-140). Uleiurile volatile extrase din plantele *Hyptis marrubioides*, *Aloysia gratissima* și *Cordia verbenacea* au fost eficiente în controlul bolii rugina plantelor declanșată de agentul patogen *Phakopsora pachyrhizi* prin aplicarea unor tratamente preventive (**da Silva A.C. et al.**, *European Journal of Plant Pathology*, 2012, 134, 865-871).

Exista indicații că apele florale au o acțiune antioxidantă și antimicrobiană adecvată pentru aplicații în agricultura organică (**D'Amato S. et al.**, *Food Control*, 2018, 86, 126-137). Astfel, modelele experimentale *in vitro* au arătat că apele florale obținute din specii de plante aparținând familiei *Lamiaceae*, și anume din oregano mexican (*Poliomintha longiflora*), cimbrul de câmp (*Thymus vulgaris*), rozmarinul (*Rosmarinus officinalis*), cimbrul de grădină (*Satureja hortensis*), oregano (*Origanum vulgare*) și busuiocul (*Ocimum basilicum*) au prezentat proprietăți antioxidante și bacteriostatice față de speciile de *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Staphylococcus* sp. și *E. coli*, precum și activitate fungistatică pe tulpinile de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* și *Alternaria citri* (**Cid-Perez T.S. et al.**, *Plants*, 2019, 8, 22; **Hay Y.O.M. et al.**, *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 2015, 2, 7; **Boyras N. & Ozcan M.**, *Fitoterapia*, 2005, 76, 661-665; **Sagdic O. & Ozcan M.**, *Food Control*, 2003, 14, 141-143). Ca urmare a acestor studii, apele florale obținute din aceste specii au fost recomandate ca dezinfectanți naturali pentru alimente, prelungind calitatea fructelor și legumelor proaspete pe perioada depozitării acestora (**Tornuk F. et al.**, *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 148, 30-35; **Tornuk F. et al.**, *International Journal of Food Properties*, 2014, 17, 587-598). În schimb, apa florală de lavandă (*Lavandula augustifolia*) a prezentat o activitate antibacteriană semnificativă doar după o concentrare a extractului de 50 de ori sau formularea acesteia ca nanoemulsie (**Prusinowska R. et al.**, *Natural Product Research*, 2016, 30, 386-393; **Silha D. et al.**, *Molecules*, 2020, 25, 5654; **Garzoli S. et al.**, *Industrial Crop Production*, 2020, 145, 112068; **Kunicka-Styczynska A. et al.**, *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60, 27-32).

Proprietățile antimicrobiene exercitate prin interacțiunea de tip hidrofob și/sau hidrofil cu membrana celulelor microbiene variază în funcție de structura chimică a compușilor constituenți. Astfel, compușii având grupări funcționale de tip alcool și alchil (mentol, timol, linalool) sau grupări epoxid (eucaliptol) prezintă o activitate antimicrobiană mai ridicată, iar cei cu grupări de tip alchene (terpinen, limonen) și inel benzenic (carvacrol) o activitate moderată (**Basavegowda N. & Baek K.H.**, *Biomolecules*, 2021, 11, 1267).

De asemenea, s-a arătat că o combinație de apă florală și ulei volatil din cimbru de grădină (*Thymus vulgaris*) sau de apă florală de oregano spaniol (*Coridothymus capitatus*) și medicamentul antifungic itraconazol au prezentat un efect sinergic, ceea ce a determinat un efect antimicrobian mai mare, comparativ cu al apelor florale individuale (**Hay Y.O. et al**, *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2018, 6, 216–230; **Marino A. et al.**, *BMC Complementary Medicine Therapy*, 2020, 20, 1-11).

Totuși, pentru a obține produse fungicide utile în tratamentul culturilor de plante de orez, **brevetul CN 107950597 (A)/24.04.2018** a descris un amestec de polizaharide extrase din rădăcină de *Astragalus* combinate cu ulei volatil de scorțișoară. De asemenea, **brevetul CZ 2016819 (A3)/11.07.2018** se referă la un produs fungicid pentru protecția plantelor constituit dintr-un amestec de ulei volatil de *Thymus vulgaris* și ulei de rapiță încapsulate într-un biopolimer de gelatină-chitosan și polietilenglicol și metoda de preparare a acestuia.

Dezavantajul fungicidelor de contact este acela că acționează doar la suprafața plantei și nu pătrund în țesutul vegetal, iar produsele pe bază de uleiuri esențiale au o volatilitate ridicată, ceea ce reduce eficiența tratamentului prin aplicare foliară. În plus, insolubilitatea în apă determină o absorbție lentă în țesuturile plantei, iar tratamentul trebuie utilizat preventiv deoarece, după instalarea bolii, eficacitatea este minimă. Aceste preparate asigură protecția plantelor pe perioade scurte, atât timp cât sunt în contact cu planta, iar tratamentul trebuie repetat în funcție de condițiile meteorologice, după fiecare ploaie sau la fiecare 7-14 zile. De aceea, este necesară îmbunătățirea preparării și reducerea fitotoxicității produselor fungicide, optimizarea schemei de tratament aplicată și a costurilor de producție ale acestora.

Prezenta invenție are ca scop soluționarea acestor probleme tehnice și propune un procedeu de obținere a unui preparat natural cu proprietăți antifungice sub formă de emulsie stabilă de tip apă în ulei, pe bază de ape florale din plante aromatice asociate cu ulei vegetal transesterificat cu alcooli mono- și trihidroxilici, emulgatori și surfactanți neionici, în proporții bine definite. Această combinație conduce la obținerea unui preparat cu absorbție ridicată datorită efectului sinergic al componentelor, capacitatea de a penetra membrana celulelor vegetale și stabilitate mare, prelungind astfel perioada de contact cu țesutul vegetal pentru

stabilirea unei scheme de tratament sistemic eficient al plantelor în cultură. În plus, procedeul permite valorificarea apelor florale rezultate ca produse secundare, solubile în apă, în urma procesului de preparare a uleiurilor volatile din plante aromatice.

Procedeul de obținere a unui preparat natural antifungic de tip emulsie stabilă pentru tratamentul sistemic al plantelor în cultură, conform invenției, constă din următoarele etape:

(a) prepararea apelor florale din plante aromatice, preferabil din familia Lamiaceae, cu ajutorul unui echipament de reflux de tip Clevenger, la 100 °C, timp de 1,5...3 ore, obținând în final soluții cu o substanță uscată de minim 1%;

(b) prepararea unui adjuvant sub formă de emulsie de tip ulei-apă pe bază de ulei vegetal, ales dintre floarea soarelui, măsline și rapiță, glicerol și alcool etilic, emulsia fiind stabilizată în prezența unui emulgator, ales dintre lecitină sau fosfatidilcolină, în proporții bine definite, astfel:

(i) se obține inițial **faza uleioasă** pe bază de amestec de ulei vegetal, glicerol și alcool etilic în raport de combinare de 2:1:1...3:2:3 prin reacția de transesterificare a uleiului vegetal cu glicerol și alcool etilic, la o temperatură de 45...65 °C, prin agitare pe o plită magnetică, timp de 1...3 ore; (ii) separat, se prepară **faza apoasă** pe bază de apă, tampon fosfat și emulgator, în raport de combinare de 1:30:5...4:50:10 prin dizolvarea lecitinei sau fosfatidilcolinei într-un amestec de apă cu tampon fosfat, prin agitare pe o plită magnetică cu încălzire, la temperatura de 45...65 °C, timp de 1...3 ore. În final, faza uleioasă încălzită la 50...60 °C se adaugă peste faza apoasă, în picătură, sub agitare continuă. Pre-emulsia ulei-apă astfel formată se omogenizează cu ajutorul unui stirrer manual la turația de 6000...8000 rpm, timp de 3...5 minute, rezultând astfel un adjuvant de tip emulsie ulei-apă cu un pH de 7,0...8,5, care poate fi utilizat imediat sau stocat în sticle de culoare brună, la temperatura camerei;

(c) obținerea unui preparat natural antifungic sub formă de emulsie de tip apă-ulei prin adăugarea apelor florale obținute la punctul (a) peste adjuvantul uleios obținut la punctul (b) și încălzit la 45...65 °C, în raport de greutate apă florală:adjuvant de 1:2...1:3, în picătură, sub agitare pe o plită magnetică;

(d) omogenizarea emulsiei în prezență de 0,1...1,5% surfactant neionic, ales între Tween 20 și Tween 80, și adăugarea de apă până la 1000 g, continuând omogenizarea la 60 °C, timp de 1...3 ore;

(e) verificarea și ajustarea pH-ului la valori cuprinse între 6,0...7,5 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 0,5 M obținând, în final, emulsii cu substanța uscată de 2...10%, care se păstrează în sticle închise la culoare. Înainte de utilizarea pentru tratamentul sistemic al plantelor în cultură prin aplicare foliară sub forma de spray, emulsiile se diluează la concentrații prestabilite.

Procedeul de obținere a unui preparat natural antifungic de tip emulsie pentru tratamentul sistemic al plantelor în cultură, conform invenției, are următoarele avantaje:

- Este fezabil, are cost redus, nu necesită echipamente complexe și are o durată redusă.
- Se bazează pe o tehnologie simplă, cu randament mare de valorificare a unor produse secundare ale procesului de extracție a uleiurilor volatile.
- Rezultă un produs natural cu efect antimicrobian pentru controlul bolilor (rugina plantelor, putregaiul rădăcinii) în culturile ecologice de plante, ca alternativă la produsele fungicide existente.
- Îmbunătățește acțiunea sistemică a apelor florale prin combinarea cu un adjuvant uleios sub formă de emulsie stabilă, care asigură penetrarea țesutului vegetal după aplicarea foliară și protecție de lungă durată.
- Valorifică produse naturale, biodegradabile în mediu, lipsite de citotoxicitate față de plante și consumatori, chiar dacă penetrează țesuturile plantei, pentru dezvoltarea unei agriculturi ecologice, durabile și sustenabile.
- Tratamentul este aplicat doar de 2-3 ori pe sezon și nu este afectat de condițiile meteorologice.

Prezenta propunere de invenție se evidențiază prin următoarele exemple:

#### **Exemplul 1.**

Într-un vas de sticlă având capacitatea de 3000 ml, se prepară 1000 ml apă florală de rozmarin folosind un echipament de reflux de tip Clevenger, la 100 °C, timp de 2 ore. Soluția obținută la final a avut o substanță uscată de 2%.

Separat, în alt vas de reacție, se prepară adjuvantul sub formă de emulsie stabilă de tip ulei în apă dintr-un amestec de ulei de floarea soarelui, glicerol, alcool etilic și lecitină din soia în două etape. În prima etapă, se prepară **faza uleioasă** pe bază de ulei vegetal, glicerol și alcool etilic prin reacția de transesterificare a 8,5 g ulei de floarea soarelui în prezența unei cantități de 2 g glicerol și 4 g alcool etilic, la o temperatură de 60 °C, prin agitare pe o plită magnetică, timp de 1,5 ore. În a doua etapă, se prepară **faza apoasă** pe bază de lecitină cu rol emulgator și amestec tampon fosfat-apă, prin dizolvarea a 2,5 g lecitină în 3 g tampon fosfat 0,1 M, pH 7,4 și 110 g apă, prin agitare pe o plită magnetică cu încălzire, la temperatura de 60 °C, timp de 1,5 ore. În final, faza uleioasă încălzită la 60 °C se adaugă peste faza apoasă, în picătură, sub agitare. Pre-emulsia ulei în apă formată se amestecă cu ajutorul unui stirrer manual la turația de 8000 rpm, timp de 3 minute, rezultând în final adjuvantul uleios de tip emulsie stabilă cu un pH de 8,2, care poate fi utilizat imediat sau stocat în sticle de culoare brună, la temperatura camerei.

Apoi, apa florală de rozmarin se adaugă peste adjuvantul încălzit la 60 °C, în picătură, sub agitare pe o plită magnetică prevăzută cu încălzire. Se adaugă apoi 3 g Tween 20 ca agent tensioactiv și se completează la 1000 g cu apă, continuând omogenizarea la temperatura de 60 °C, timp de 2 ore. Se verifică și se ajustează pH-ul la o valoare de 6,3 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 0,5 M. Preparatul natural antifungic de tip emulsie este ambalat în sticle închise la culoare și este utilizat pentru tratamentul sistemic al plantelor în cultură după diluare și ambalare în tuburi spray.

### Exemplul 2.

Într-un vas de sticlă având capacitatea de 5000 ml, se prepară 2000 ml apă florală dintr-un amestec de salvie și rozmarin, folosind un echipament de reflux de tip Clevenger, la 100 °C, timp de 2 ore. Soluția obținută la final a avut o substanță uscată de 2,5 %.

Separat, în alt vas de reacție, se prepară adjuvantul sub formă de emulsie de tip ulei în apă, în condițiile prezentate în exemplul 1, cu diferența că faza uleioasă este pe baza de 10 g ulei de măsline, 4 g glicerol și 3 g alcool etilic. Faza apoasă se obține prin dizolvarea a 3 g fosfatidilcolină într-un amestec de 5 g tampon fosfat 0,1 M, pH 7,4 și 120 g apă, prin agitare continuă pe o plită magnetică prevăzută cu încălzire, la temperatura de 50 °C, timp de 2 ore. Pre-emulsia ulei-apă se formează după încălzirea fazei uleioase la 50 °C și adăugarea acesteia peste faza apoasă, în picătură și sub agitare, urmată de omogenizarea amestecului la turația de 7000 rpm, timp de 5 minute.

Preparatul natural antifungic de tip emulsie se prepară prin adăugarea apei florale de salvie și rozmarin peste adjuvantul uleios încălzit la 50 °C. Se adaugă apoi 3 g Tween 80 ca agent tensioactiv și se completează la 1000 g cu apă, continuând omogenizarea la temperatura de 50 °C, timp de 2 ore. Se ajustează pH-ul la o valoare de 7,0 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 0,5 M și se ambalează în sticle închise la culoare până la momentul utilizării.

Pentru evaluarea eficacității *in vitro* a formulărilor de preparat natural de tip emulsie pe bază de ape florale și adjuvant uleios, s-a determinat activitatea antimicrobiană pe culturi bacteriene de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* și, respectiv, pe culturi fungice de *Rhizoctonia solani* prin metoda microdiluției. Astfel, suspensiile bacteriene au fost obținute prin cultivare pe bulion creier-inimă, la 35 °C, peste noapte. Inoculul a fost ajustat la concentrația de 10<sup>8</sup> celule/ml cu ajutorul unui standard 0,5 McFarland. Cultura de fungi patogeni a fost menținută pe mediul de cartof-glucoză-agar, la 35 °C, timp de 4 zile și apoi subcultivată în tampon fosfat salin prin vortexare până la obținerea unei suspensii omogene. Metoda

microdiluției s-a realizat prin diluții seriale ale preparatului emulsie în mediul de cultură la concentrații între 0,1-10 mg/ml, pregătite în godeurile unei microplăci de cultură. Incubarea plăcii s-a realizat la 35 °C, iar creșterea populației bacteriene a fost măsurată prin citirea absorbției la 600 nm cu ajutorul unui cititor de plăci SPECTROstar Nano (BMG Labtech), după 24 ore de cultivare.

Rezultatele obținute pe ambele tulpini bacteriene au indicat un efect antibacterian al preparatelor naturale analizate, care a variat între specia Gram pozitivă și cea Gram negativă și a fost dependent de concentrația probei (Tabelul 1). Astfel, preparatele naturale au inhibat mai eficient creșterea tulpinii Gram pozitive de *S. aureus*, interferând cu multiplicarea celulelor bacteriene începând de la concentrația minimă de 1,25 mg/ml, în timp ce inhibiția creșterii microbiene în cazul culturii Gram negative de *P. aeruginosa* a avut loc de la o concentrație de 5 mg/ml. Se știe că bacteriile Gram negative sunt mai rezistente decât cele Gram pozitive la acțiunea unor compuși antibacterieni, datorită membranei externe suplimentare bogată în lipopolizaharide. Testele realizate au fost utile deoarece au indicat efectul antimicrobian al preparatelor naturale, atât în culturi bacteriene Gram pozitive, cât și Gram negative.

**Tabelul 1.** Activitatea antimicrobiană a preparatelor naturale antifungice pe tulpini de bacterii patogene de *P. aeruginosa* și *S. aureus*, precum și pe tulpina de fungi patogeni de *R. solani*, comparativ cu controlul pozitiv de bacitracină și, respectiv, bifonazol, determinată ca o concentrație minimă inhibitorie.

Nr. probă	Preparat natural antifungic (PNA)	Concentrația minimă inhibitorie (mg/ml)		
		<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>R. solani</i>
1	PNA 1	1,25	5	1,25
2	PNA 2	1,25	5	1,25
3	Bacitracin (control antibacterian)	0,15	0,15	-
4	Bifonazol (control antifungic)	-	-	0,15



Rezultatele obținute pe tulpina de funghi patogeni au indicat o activitate antifungică a variantelor de preparate naturale analizate începând cu concentrația minimă de 1,25 mg/ml, după 24 ore de la tratament, comparabilă cu cea a compusului standard bifonazol. Astfel, s-a demonstrat utilitatea acestor preparate fungicide naturale pentru tratarea plantelor împotriva infecției cu *R. solani*.

În vederea evaluării funcționalității *in vivo* a variantelor de produse naturale, s-a determinat activitatea fungistatică și fungică a acestora pe loturi experimentale de plante tinere de tomate obținute din semințe cultivate în camere de creștere cu condiții controlate, timp de 5 săptămâni, și infectate cu spori de *Mycosphaella* sp., cunoscuți pentru declanșarea bolii rugina plantelor. Astfel, 12 plante tinere de tomate au fost împărțite în 3 loturi a câte 4 plante și au fost stropite cu 1,5 ml preparat natural PNA 1, PNA 2, și, respectiv, cu o soluție de sulfat de cupru (control) de concentrație 5 mg/ml. Alte 2 loturi au servit drept plante netratate și neinfectate și, respectiv, plante netratate dar infectate. Loturile au fost menținute peste noapte în camera de creștere în condiții controlate de lumină și umiditate. Apoi, s-a realizat infectarea plantelor prin aplicarea foliară a unui inocul de  $5 \times 10^5$  spori/ml, suspendat în apă distilată conținând Tween 20. Plantele au fost acoperite cu pungi de plastic transparente peste noapte, pentru menținerea umidității. Apoi, plantele au fost crescute în condiții controlate de temperatură și umiditate, timp de 7 zile și s-a monitorizat zilnic apariția petelor specifice ruginii plantelor. S-au realizat măsurători ale ariei lezate pe frunzele tratate și pe cele netratate și s-a calculat eficiența preparatului natural cu ajutorul formulei:

$$\text{Eficiența (\%)} = 100 \times \left( 1 - \frac{\text{aria medie a leziunii (\%) pe frunzele tratate}}{\text{aria medie a leziunii (\%) pe frunzele netratate}} \right)$$

Rezultatele au demonstrat că preparatele naturale PNA 1 și PNA 2 au avut o eficiență ridicată de protecție a plantelor tinere de tomate împotriva infecției cu spori de *Mycosphaella* sp. și a apariției petelor specifice bolii rugina plantelor (Tabelul 2).

**Tabelul 2.** Eficiența preparatelor naturale PNA 1 și PNA 2 împotriva infecției cu spori de *Mycosphaella* sp. și a apariției petelor specifice bolii rugina plantelor pe plante tinere de tomate, comparativ cu o soluție de CuSO<sub>4</sub> și a controlului netratat, infectat.

<b>Nr. probă</b>	<b>Preparat natural antifungic (PNA)</b>	<b>Eficiența preparatului (%)</b>
1	PNA 1	94,21
2	PNA 2	88,13
3	CuSO <sub>4</sub>	55,02
4	Control netratat, infectat	37,15

În vederea stabilirii schemei de tratament cu preparate naturale antifungice a plantelor în cultură, s-au aplicat diferite variante cu design de tip bloc randomizat cu 5 replici și split plot în timp, pe plante tinere de tomate infectate cu un inocul de *Mycosphaella* sp. prin aplicare foliară, cum s-a descris mai sus. Schemele de tratament au variat prin: 1) tipul de preparat, între PNA 1, PNA 2; 2) concentrația de preparat, între 1,25, 2,5 și 5 mg/ml; 3) perioada de timp între tratament și inoculare, de o oră, 6 ore sau 18 ore. În urma calculării eficienței preparatelor, s-a stabilit un protocol de tratament optim recomandat, constând din utilizarea unui preparat natural antifungic, ales între PNA 1 și PNA 2, de concentrație 5 mg/ml, cu un interval de 6 ore până la expunerea la spori.

La final, testarea citotoxicității plantelor tinere de tomate tratate cu variantele de preparat natural antifungic pe o linie stabilizată de celule intestinale Caco-2 prin metoda extractului, la intervale de 24 și 48 de ore de cultivare a arătat că viabilitatea celulară a fost ridicată pentru toate concentrațiile testate, valorile fiind cuprinse între 80-100% (Tabelul 3). Astfel, s-a demonstrat că preparatele sunt biocompatibile și nu pun în pericol sănătatea oamenilor, chiar dacă penetrează țesutul vegetal.

**Tabelul 3.** Viabilitatea celulară a culturii de celule intestinale Caco-2 cultivate în prezența extractelor de preparat natural antifungic PNA 1, PNA 2 și CuSO<sub>4</sub> timp de 48 h, determinată prin metoda Rosu Neutru. Plantele netratate infectate au servit drept control.

<b>Nr. probă</b>	<b>Preparat natural antifungic (PNA)</b>	<b>Concentrația (mg/ml)</b>	<b>Viabilitatea celulară (%)</b>	<b>Grad de biocompatibilitate</b>
1	PNA 1	0,1	105,26	ridicat
		0,25	97,38	ridicat
		0,5	82,89	ridicat
2	PNA 2	0,1	91,56	ridicat
		0,25	86,19	ridicat
		0,5	80,75	ridicat
3	CuSO <sub>4</sub>	0,1	94,54	ridicat
		0,25	93,31	ridicat
		0,5	69,77	moderat
4	Control netratat, infectat	0,1	99,93	ridicat
		0,25	97,04	ridicat
		0,5	91,54	ridicat

## REVENDICARE

Procedeul de obținere a unui preparat natural antifungic de tip emulsie stabilă pentru tratamentul sistemic al plantelor în cultură, conform invenției, **caracterizat prin aceea că** are la bază următoarele etape: (a) prepararea apelor florale din plante aromatice, preferabil din familia Lamiaceae, cu ajutorul unui echipament de reflux de tip Clevenger, la 100 °C, timp de 1,5...3 ore, obținând în final soluții cu o substanță uscată de minim 1%; (b) prepararea unui adjuvant sub formă de emulsie de tip ulei-apă pe bază de ulei vegetal, ales între floarea soarelui, măsline și rapiță, glicerol și alcool etilic, emulsia fiind stabilizată în prezența unui emulgator, ales între lecitină sau fosfatidilcolină, în proporții bine definite, astfel: (i) se obține inițial faza uleioasă pe bază de amestec de ulei vegetal, glicerol și alcool etilic în raport de combinare de 2:1:1...3:2:3 prin reacția de transesterificare a uleiului vegetal cu glicerol și alcool etilic, la o temperatură de 45...65 °C, prin agitare pe o plită magnetică, timp de 1...3 ore; (ii) separat, se prepară faza apoasă pe bază de apă, tampon fosfat și emulgator, în raport de combinare de 1:30:5...4:50:10 prin dizolvarea lecitinei sau fosfatidilcolinei într-un amestec de apă cu tampon fosfat, prin agitare pe o plită magnetică cu încălzire, la temperatura de 45...65 °C, timp de 1...3 ore. În final, faza uleioasă încălzită la 50...60 °C se adaugă peste faza apoasă, în picătură, sub agitare continuă. Pre-emulsia ulei-apă astfel formată se omogenizează cu ajutorul unui stirrer manual la turația de 6000...8000 rpm, timp de 3...5 minute, rezultând astfel un adjuvant de tip emulsie ulei-apă cu un pH de 7,0...8,5, care poate fi utilizat imediat sau stocat în sticle de culoare brună, la temperatura camerei; (c) obținerea unui preparat natural antifungic sub formă de emulsie de tip apă-ulei prin adăugarea apelor florale obținute la punctul (a) peste adjuvantul uleios obținut la punctul (b) și încălzit la 45...65 °C în raport de greutate apă florală:adjuvant de 1:2...1:3, în picătură, sub agitare pe o plită magnetică; (d) omogenizarea emulsiei în prezență de 0,1...1,5% surfactant neionic, ales între Tween 20 și Tween 80, și adăugarea de apă până la 1000 g, continuând omogenizarea la 60 °C, timp de 1...3 ore; (e) verificarea și ajustarea pH-ului la valori cuprinse între 6,0...7,5 cu ajutorul unei soluții de hidroxid de sodiu 0,5 M obținând, în final, emulsii cu substanța uscată de 2...10%, care se păstrează în sticle închise la culoare. Înainte de utilizarea pentru tratamentul sistemic al plantelor în cultură prin aplicare foliară sub formă de spray, emulsiile se diluează la concentrații pre-stabilite.