



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00514

(22) Data de depozit: 25.08.2022

(41) Data publicării cererii:
28.02.2024 BOPI nr. 2/2024

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
PROTECȚIA PLANTELOR BUCUREȘTI,
BD. ION IONESCU DE LA BRAD, NR. 8,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• DINU SORINA, STR. SOLD. GHIȚĂ
ȘERBAN, NR. 4, BL. X17, SC. A, ET. 5, AP. 23,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• CHIRECEANU CONSTANTINA,
STR. BĂLȚIȚA, NR. 4, BL. B26, SC. 1, ET. 3,
AP. 11, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **COMPOZIȚIE PE BAZĂ DE ULEIURI ESENȚIALE PENTRU
COMBATAREA CANCERULUI BACTERIAN AL PLANTELOR
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție pe bază de uleiuri esențiale destinată combaterii cancerului bacterian al plantelor de cultură și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția conform invenției este alcătuită din 73,2...75,4 grame de miere polifloră, 16...18 grame amestec de solvenți hidrofobi care conțin 1,6...1,8 grame dintr-un amestec 1:1 de ulei esențial de cimbru și ulei esențial de scorțișoară și 8,6...8,8 grame chitosan. Procedeu de obținere conform invenției are următoarele etape:

a) realizarea unui amestec de o parte ulei esențial de cimbru și o parte ulei esențial de scorțișoară,

b) dizolvarea prin ultrasonicare a 10 grame de amestec de ulei esențial în 90 grame amestec de solvenți hidrofobi,

c) amestecarea unei cantități de 732...754 grame de miere cu 160...180 grame de de soluție uleioasă de polifenoli și cu o cantitate de 86...88 grame de chitosan și omogenizarea lor energetică.

Revendicări: 3



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2022 00514
Data depozit	25-08-2022

RO 137940 A2

9

COMPOZIȚIE PE BAZĂ DE ULEIURI ESENȚIALE PENTRU COMBATEREA CANCERULUI BACTERIAN AL PLANTELOR ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

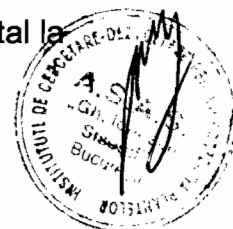
Prezenta invenție se referă la o compoziție pe bază de uleiuri esențiale destinată combaterii cancerului bacterian al plantelor de cultură.

Sunt cunoscute diferite compoziții pe bază de uleiuri esențiale destinate combaterii bolilor plantelor. Brevetul RO132460 B1 descrie un produs natural de protecție foliară pe bază de uleiuri esențiale alcătuit din: 0,3% ulei esențial de *Ocimum basilicum*, 0,1% ulei esențial de *Abies alba*, 0,05% ulei esențial de *Rosmarinus officinalis*, 0,05% ulei esențial de *Mentha piperita*, 0,1% ulei esențial de *Origanum vulgare*, 0,025% praf de diatomit, 0,2% gelatină alimentară, 0,2% agar și 99,4% apă.

Brevetul FR 3080520 B1 protejează o compoziție care include uleiuri esențiale, un agent tensioactiv și un mediu de dispersie apos, sub forma unei emulsii ulei-în-apă. Amestecul de uleiuri esențiale conține un prim ulei esențial, cu limonen ca principal compus; un al doilea ulei esențial cuprinzând majoritar cinamaldehydă; un al treilea ulei esențial care este compus majoritar din terpene. Uleiurile esențiale care sunt folosite sunt uleiuri de portocale, grapefruit, lămâie, lămâie verde / lime, mărar, țelină, scorțișoară, arbore de ceai și măghiran, sau orice amestec al acestora. Compoziția este destinată protejării viței de vie împotriva unor boli cum ar fi făinarea sau mana.

Cererea de brevet MX 2014012472 A prezintă o compoziție care acționează ca un bio-fungicid împotriva agenților fitopatogeni care afectează culturile de cacao, *Moniliophthora roreri* și *Phytophthora* spp. Compoziția include 0,1% dintr-un amestec, în raport de 1: 1: 1: 1 (V / V / V / V), de uleiuri esențiale obținute din scorțișoară (*Cinnamomun zeylanicum*), cuișoare (*Syzygium aromaticum*), ghimbir (*Zingiber officinale*) și piper (*Pimienta dioica*).

Brevetul RO 128885 B1 se referă la un biopesticid cu conținut de uleiuri esențiale încapsulate și de săruri de potasiu ale acizilor grași, precum și la un procedeu de obținere a biopesticidului respectiv. Biopesticidul conform invenției este format dintr-o suspensie de nanoparticule lipidice, constituită din 8...10% în greutate ulei vegetal hidrogenat sau ceară cu punct de congelare 55...86°C, 6...8% în greutate ulei esențial, 2,4...4,6% în greutate substanță tensioactivă cu HLB<8, 2,6...3,5% în greutate substanță tensioactivă cu HLB>8, 1,7...2,1% în greutate glicerină, 18...22% în greutate săruri de potasiu ale acizilor grași din ulei vegetal, 0...18,6% în greutate alcool și 35,7...57,8% în greutate apă. Procedeu constă în tratarea uleiului vegetal la



temperatura ambiantă cu o soluție de hidroxid de potasiu, în prezența unui cuplu de substanțe tensioactive și a unui solvent, rezultând săruri de potasiu ale acizilor grași de concentrație 30...40%, apoi se încălzește sub agitare ulei vegetal sau ceară, ulei esențial, un cuplu de substanțe tensioactive și apă, se răcește controlat amestecul, rezultând o suspensie de nanoparticule lipidice solide, nanoparticulele având o coajă formată din ulei vegetal hidrogenat sau ceară și un miez lichid constituit din uleiuri esențiale, iar suspensia se completează cu săruri de potasiu ale acizilor grași.

Principalul dezavantaj al utilizării uleiurilor esențiale ca biopesticid / biofungicid pentru combaterea bolilor este cea a fenomenului de hormeză, respectiv a răspunsului dual în funcție de doză. Diferența dintre dozele aplicate uzual pentru combaterea bolilor plantelor și dozele fitotoxice este relativ mică (Abd-ElGawad et al., 2021). Aplicarea repetată (de trei ori la 20 zile), la tomate, a unei formulări pe bază de ulei de eucalipt și rozmarin de tip concentrat emulsionabil, a determinat o ușoară creștere a producției de tomate, asociată însă cu o scădere a calității recoltei – proporție mai mare de fructe crăpate, fermitate scăzută, conținut de polifenoli scăzut (Chrysargyris et al., 2020).

O soluție la această problemă tehnică este utilizarea unor compuși purtători hidrofobi, în care să fie încorporate uleiuri esențiale și din care să se elibereze treptat doze mici de componente volatile, eficiente contra agenților de dăunare și care să nu fie fitotoxice. Brevetul US 11134689 B2 descrie utilizarea unei matrici din ceară și/sau parafină și uleiuri vegetale, în care sunt dizolvate uleiuri esențiale și din care componentele volatile sunt eliberate treptat. O astfel de compoziție nu poate fi aplicată prin pulverizare pe organele plantelor – pulverizarea fiind principala modalitate de aplicare a tratamentelor în timpul vegetației. Un alt dezavantaj al acestei compoziții este dat de riscul de volatilizarea a unor componente în timpul încorporării uleiurilor esențiale în matricea de parafină/ceară fluidizată prin încălzire.

Cererea de brevet US 2021259242 A descrie utilizarea unei suspensii de 1% parafină pentru formularea uleiurilor esențiale destinate tratării bolilor plantelor. Această cerere de brevet dezvăluie și o soluție tehnică pentru reducerea efectului fitotoxic al uleiurilor esențiale – folosirea unui biostimulant pentru plante, triacontanol (C30-OH). Compoziția este utilizată și pentru tratamentul rănilor rezultate în timpul tăierilor pomilor fructiferi și/sau a viței-de-vie. Dezavantajul acestei compoziții este determinat de lipsa de aderență la tăieturi a suspensiei de ulei esențial. Suspensia de ulei esențial este emulsionată în apă prin folosirea laurilsulfatului de sodiu, un

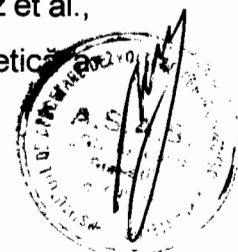
emulsionant care reduce semnificativ fluiditatea suspensiilor. Formularea propusă prin cererea de brevet US 2021259242 A favorizează depunerea pe suprafețe hidrofobe, cum este de exemplu cuticula frunzelor, dar nu aderă pe suprafețele hidrofile, cum sunt de exemplu rănille plantelor provenite din tăieri. De asemenea, un alt dezavantaj al compoziției propuse este stabilitatea redusă datorită conținutului ridicat de apă.

Cancerul bacterian al plantelor este o boală produsă de tulpini bacteriene care au capacitatea de colonizare genetică a țesuturilor vegetale, prin introducerea plasmidei Ti. Plasmida Ti determină formarea unor țesuturi tumorale (Lacroix & Citovsky, 2019). În prezent, tulpinile bacteriene care produc cancer bacterian sunt incluse în 10 specii clasificate în cadrul genurilor înrudite, *Agrobacterium*, *Rhizobium* și *Allorhizobium* (Flores-Félix et al., 2020).

ADN-ul din plasmida Ti conține două seturi majore de gene funcționale, respectiv genele metabolismului opinelor și oncogenele. Unele oncogene induc biosinteza hormonilor vegetali de tip auxină și citochinină, în timp ce alte oncogene cresc sensibilitatea țesutului vegetal la acești hormoni (Tzfira & Citovsky, 2007). Nivelurile ridicate de auxină și citochinină și sensibilitatea crescută a țesuturilor vegetale la acești hormoni stimulează diviziunea celulară necontrolată și rapidă, ceea ce duce la producerea de țesuturi tumorale asemănătoare unor gale supra-dimensionate (Gohlke & Deeken, 2014). O a doua clasă de gene funcționale induce biosinteza opinelor derivate din carbohidrați și aminoacizi, care acționează ca sursă unică de carbon, energie și azot pentru agrobacteriile prezente în țesutul tumoral. Agrobacteriile sunt sigurele organisme capabile să metabolizeze opinele. Prin existența opinelor se favorizează delimitarea unui habitat prielnic dezvoltării preponderente a patogenilor biotrofi purtători de gene Ti (Gonzalez-Mula et al., 2019).

Uleiurile esențiale și-au dovedit eficacitatea în limitarea dezvoltării diferitelor tulpini de agrobacterii tumorigene, încadrate taxonomic în diferite genuri (El-Zemity et al., 2008; Habbadi et al., 2018). Mecanismul de acțiune al uleiurilor esențiale implică distrugerea sistemului de membrane celulare ale agrobacteriilor tumorigene ca urmare a formării speciilor reactive de oxigen (Lee et al., 2020).

Pentru o combatere eficientă a cancerului bacterian este necesar ca uleiurile esențiale să acționeze nu numai asupra bacteriilor oncogene, dar și asupra țesuturilor vegetale. A fost dovedit efectul uleiurilor esențiale de stimulare a răspunsului de reparare a rănilor și de amplificare a producerii de acid jasmonic (Vega-Vásquez et al., 2021). Rănille sunt poarta de intrare a agrobacteriilor pentru colonizarea genetică



țesuturilor vegetale și formarea tumorii, iar acidul jasmonic acționează în disonanță cu auxinele și citochininele, limitând sensibilitatea țesuturilor vegetale la acești hormoni (Jang et al., 2020).

Pentru o combatere eficientă a cancerului bacterian este deci necesară o compoziție de uleiuri esențiale care să adere la suprafața răni rezultate prin tăiere și să o sigileze formând o peliculă. Din această peliculă eliberarea componentelor uleiurilor esențiale trebuie să se realizeze atât spre exterior, pentru a preveni contaminarea cu agrobacterii, cât și spre interior, pentru a eradica agrobacteriile eventual prezente, a stimula vindecarea răni și a reduce sensibilitatea la auxine și citochinine datorită stimulării producerii de acid jasmonic.

Pentru a simplifica utilizarea în practică a respectivei compoziții de uleiuri esențiale ideal ar fi aplicarea prin pulverizare concomitent cu tăierea. O astfel de aplicare este posibilă prin utilizarea unor dispozitive de tăiere care au asociate dispozitive de stropit atașate – cum este de exemplu dispozitivul protejat prin brevetul EP 0259478 B1.

Atașarea de suprafața răni și formarea unei pelicule sigilante presupune formarea unui hidrogel adeziv, urmată de maturarea / uscarea acestuia. Vâscozitatea ridicată, specifică hidrogelului, nu este însă compatibilă cu aplicarea prin stropire. Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție care să fie hidrogel vâscos în recipientele asociate dispozitivelor de tăiere și pe suprafața țintă a răni și fluide ușor pulverizabile în momentul aplicării pulverizării.

Este un alt obiectiv al acestei invenții de a descrie o compoziție care să fie ușor peliculabilă, sigilând astfel suprafața răni.

Este un alt obiectiv al acestei invenții de a descrie o compoziție sub formă de emulsie din care să se elibereze treptat componentele uleiurilor esențiale.

Compoziția conform invenției este alcătuită din 73,2 – 75,4 grame miere polifloră, 16 – 18 grame amestec de solvenți hidrofobi care conțin 1,6 – 1,8 grame de amestec 1:1 ulei esențial de cimbru și ulei esențial de scorțișoară și 8,6 – 8,8 grame chitosan.

Chitosanul este un chitosan provenit din ciuperci, are o masă moleculară de 260-280 kDa și un grad de deacetilare de 85-88%.

Amestecul de solvenți hidrofobi este alcătuit din 75 grame cetil-palmitat și 25 grame acid oleic, sau din trigliceride caprice / caprilice.

Procedul de obținere conform invenției implică următoarele etape:



- ✓ Realizarea unui amestec de 1 parte ulei esențial de cimbru și 1 parte ulei esențial de scorțișoară;
- ✓ Dizolvarea prin ultrasonicare, timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, a 10 grame de amestec ulei esențial în 90 grame amestec de solvenți hidrofobi;
- ✓ Aducerea peste 732 - 754 grame de miere a 160 -180 grame de soluție uleioasă de polifenoli și a 86-88 grame de chitosan, și omogenizarea energetică prin ultrasonicare timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, cu menținerea temperaturii la 30°C;

Compoziția rezultată se utilizează prin diluare cu apă, 1 parte compoziție la 1 părți apă.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Prezintă o stabilitate ridicată la păstrare datorită unei activități reduse a apei și a efectului anti-microbian combinat al chitosanului, uleiurilor esențiale și a mierii,
- ✓ Are un comportament de fluid non-newtonian / tixotrop, datorită conținutului ridicat de chitosan, care modifică și comportamentul reologic al mierii poliflore. Datorită caracteristicilor tixotropice ale amestecului miere – chitosan compoziția este vâscoasă în condiții normale și devine fluidă în momentul aplicării forței necesare stropirii.
- ✓ Formează după stropire hidrogeluri peliculizabile pe suprafața rănilor rezultate ca urmare a tăierilor.
- ✓ Formează o emulsie fază hidrofobă cu ulei esențial în miere, stabilizată de chitosan, din care se eliberează treptat uleiurile esențiale.
- ✓ Are o activitate de limitare a dezvoltării agrobacteriilor ridicată, datorită combinării efectului anti-microbian combinat al chitosanului, uleiurilor esențiale și a mierii.
- ✓ Stimulează vindecarea rănilor rezultate în urma tăierii datorită efectului combinat al uleiurilor esențiale, a mierii și a chitosanului.
- ✓ Limitează exudarea rănilor datorită conținutului ridicat de zaharuri din compoziția aplicată.
- ✓ Reduce sensibilitatea țesutului vegetal la auxine și citochine datorită acțiunii componentelor uleiurilor esențiale, care stimulează producerea de acid jasmonic, hormon cu acțiune consonantă auxinelor și citochininelor.

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



Exemplul 1. Se realizează un amestec de o parte ulei esențial de cimbru și o parte ulei esențial de scorțișoară, prin amestecarea a 10 grame ulei esențial de cimbru și o parte ulei esențial de scorțișoară. Într-un pahar Berzelius de 250 ml se dizolvă prin ultrasonicare, timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, 20 grame amestec 1:1 ulei esențial de cimbru și ulei esențial de scorțișoară în 180 grame amestec alcătuit din 135 grame cetil-palmitat și 45 grame acid oleic. Un exemplu de aparat de ultrasonicare folosit este VibraCell V505 (Sonic, Newtown, CT, SUA). Orice alt echipament de ultrasonicare cu caracteristici echivalente poate fi folosit.

Se iau 732 grame de miere și se aduc într-un vas de inox de 2 litri termostatat. Peste aceste 732 grame de miere se aduc 180 grame de soluție uleioasă care conține amestecul de uleiuri esențiale, și 88 grame de chitosan. Se omogenizează prin ultrasonicare timp de 5 min, intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, menținându-se temperatura sub 30°C.

Compoziția rezultată se păstrează în condiții ferite de căldură, umiditate și lumină excesive. Se utilizează după diluare energetică cu apă, 1 parte compoziție la 1 parte apă. Soluția diluată se introduce în rezervorul pompei de stropit atașat foarfecilor de tăiere pomi fructiferi / viță-de-vie.

Exemplu 2. Se lucrează ca în Exemplul 1, cu următoarele diferențe. Amestecul de solvenți hidrofobi este constituit din trigliceride caprice / caprilice, 754 grame de miere, 160 grame de soluție uleioasă care conține amestecul de uleiuri esențiale, și 86 grame de chitosan.



Fișă bibliografică

- Abd-ElGawad, A. M., El Gendy, A. E.-N. G., Assaeed, A. M., Al-Rowaily, S. L., Alharthi, A. S., Mohamed, T. A., Nassar, M. I., Dewir, Y. H., & Elshamy, A. I. (2021). Phytotoxic effects of plant essential oils: A systematic review and structure-activity relationship based on chemometric analyses. *Plants*, 10(1), 36.
- Chrysargyris, A., Charalambous, S., Xylia, P., Litskas, V., Stavrinides, M., & Tzortzakis, N. (2020). Assessing the Biostimulant Effects of a Novel Plant-Based Formulation on Tomato Crop. *Sustainability*, 12(20), Article 8432. <https://doi.org/10.3390/su12208432>
- El-Zemity, S. R., Radwan, M. A., El-Monam Mohamed, S. A., & Sherby, S. M. (2008). Antibacterial screening of some essential oils, monoterpenoids and novel N-methyl carbamates based on monoterpenoids against *Agrobacterium tumefaciens* and *Erwinia carotovora*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 41(6), 451-461.
- Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Peix, A., García-Fraile, P., & Velázquez, E. (2020). History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. *Systematic and applied microbiology*, 43(1), 126046.
- Gohlke, J., & Deeken, R. (2014). Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 155.
- Gonzalez-Mula, A., Lachat, J., Mathias, L., Naquin, D., Lamouche, F., Mergaert, P., & Faure, D. (2019). The biotroph *Agrobacterium tumefaciens* thrives in tumors by exploiting a wide spectrum of plant host metabolites. *New Phytologist*, 222(1), 455-467.
- Habbadi, K., Meyer, T., Vial, L., Gaillard, V., Benkirane, R., Benbouazza, A., Kerzaon, I., Achbani, E. H., & Lavire, C. (2018). Essential oils of *Origanum compactum* and *Thymus vulgaris* exert a protective effect against the phytopathogen *Allorhizobium vitis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 29943-29952.
- Jang, G., Yoon, Y., & Choi, Y. D. (2020). Crosstalk with jasmonic acid integrates multiple responses in plant development. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 305.
- Lacroix, B., & Citovsky, V. (2019). Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species. In J. E. Leach & S. E. Lindow (Eds.), *Annual Review of Phytopathology, Vol 57, 2019* (Vol. 57, pp. 231-251). <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100101>
- Lee, J.-E., Jung, M., Lee, S.-C., Huh, M.-J., Seo, S.-M., & Park, I.-K. (2020). Antibacterial mode of action of trans-cinnamaldehyde derived from cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) essential oil against *Agrobacterium tumefaciens*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 165, 104546.
- Tzfira, T., & Citovsky, V. (2007). *Agrobacterium: from biology to biotechnology*. Springer Science & Business Media.
- Vega-Vásquez, P., Mosier, N. S., & Irudayaraj, J. (2021). Hormesis-Inducing Essential Oil Nanodelivery System Protects Plants against Broad Host-Range Necrotrophs. *ACS nano*, 15(5), 8338-8349.



Revendicări

1. Compoziție conform invenției **caracterizată prin aceea că** este alcătuită din 73,2-75,4 grame miere polifloră, 16 – 18 grame amestec de solvenți hidrofobi care conțin 1,6-1,8 grame de amestec 1:1 ulei esențial de cimbru și ulei esențial de scorțișoară și 8,6 - 8,8 grame chitosan.
 2. Compoziție conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** include un chitosan provenit din ciuperci, care are o masă moleculară de 260-280 kDa și un grad de deacetilare de 85-88%.
 3. Compoziție conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** amestecul de solvenți hidrofobi este alcătuit din 75 grame cetil-palmitat și 25 grame acid oleic, sau din trigliceride caprice / caprilice.
- ✓ Procedul de obținere a compoziției conform invenției **caracterizată prin aceea că** implică următoarele etape: realizarea unui amestec de 1 parte ulei esențial de cimbru și 1 parte ulei esențial de scorțișoară; dizolvarea prin ultrasonicare, timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, a 10 grame de amestec ulei esențial în 90 grame amestec de solvenți hidrofobi; aducerea peste 732 - 754 grame de miere a 160 -180 grame de soluție uleioasă de polifenoli și a 86 - 88 grame de chitosan, și omogenizarea energetică prin ultrasonicare timp de 5 min intermitent câte 30 s, la o putere de min 400 W, cu menținerea temperaturii la 30°C.

