



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00073

(22) Data de depozit: 13/02/2020

(41) Data publicării cererii:  
30/08/2021 BOPI nr. 8/2021

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI  
PETROCHIMIE - ICECHIM BUCUREȘTI,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.202,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• UNIVERSITATEA DIN PITEȘTI,  
STR. TÂRGUL DIN VALE NR.1, PITEȘTI,  
AG, RO;  
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN  
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI  
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
BIOTEHNOLOGII ÎN HORTICULTURĂ  
ȘTEFĂNEȘTI-ARGEȘ,  
ȘOS. BUCUREȘTI-PITEȘTI NR.37,  
ȘTEFĂNEȘTI, AG, RO

(72) Inventatori:  
• FIERĂSCU IRINA, STR. ION MANOLESCU,  
NR.2, BL.129, SC.B, ET.1, AP.49,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• FIERĂSCU RADU CLAUDIU,  
STR. DUNĂRII, BL. D4, ET. 4, AP. 18,  
ROȘIORI DE VEDE, TR, RO;  
• FISTOȘ TOMA, STR. SPICULUI, NR.31,  
ONEȘTI, BC, RO;  
• SOARE LILIANA CRISTINA,  
ALEEA SENESLAU, NR.6A, PITEȘTI, AG,  
RO;  
• UNGUREANU CAMELIA, ALEEA DOLINA  
NR.1, BL.134, ET.2, SC.1, AP.12,  
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• VIZITIU DIANA ELENA,  
STR. COASTA CAMPULUI, NR.155B,  
ȘTEFĂNEȘTI, AG, RO

(54) COMPOZIȚIE NATURALĂ FUNGICIDĂ  
PENTRU COMBATAREA MANEI VIȚEI DE VIE ȘI METODA  
DE OBTINERE A ACESTEIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții naturale fungicidă pentru combaterea manei viței de vie cauzată de ciuperca *Plasmopara viticola*. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: obținere a unui extract alcoolic de *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott din rizomii plantei, măcinați până la dimensiuni sub 100 μm, utilizând etanol de puritate 96%, la un raport molar material vegetal: solvent de 1:6, la o temperatură sub temperatura de fierbere a solventului, timp de 3...10 h, filtrarea extractului, amestecarea cu o solu-

ție de azotat de argint de concentrație  $0,5 \times 10^{-4}$ ...0,5M, în rapoarte extract:soluție de 3...1:1...3, cu menținerea amestecului la lumină timp de 2...8 h, din care rezultă nanoparticule de argint fitosintetizate cu dimensiuni de 35...140 nm, aflate în dispersie în extract alcoolic din rizomi de ferigă, având o acțiune antifungică bună asupra microorganismului *P. viticola*.

Revendicări: 2

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 2020 00073</u>
Data depozit <u>13-02-2020</u>

21.

## COMPOZITIE NATURALA FUNGICIDA PENTRU COMBATerea MANEI VITEI DE VIE SI METODA DE OBTINERE A ACESTEIA

Prezenta invenție se referă la o compoziție naturală fungicidă pentru combaterea manei vitei de vie cauzată de *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, (1888), bazată pe nanoparticule de argint fitosintetizate utilizând extractul obținut din rizomi de *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott.

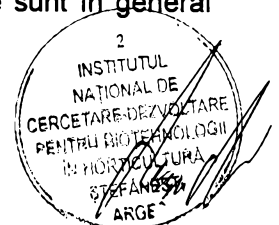
Sunt cunoscute numeroase boli ale plantelor cauzate de agenți patogeni, cum ar fi ciuperci, mușcari, oomicete, bacterii și viruși. Multe dintre ele, de obicei legate de condițiile climatice care favorizează debutul și difuzia lor, au consecințe dramatice, ducând la pierderi de randament ale culturilor care pot avea un impact profund și, uneori, catastrofal asupra economiei agricole, în special atunci când boala își asumă statutul de epidemie.

Producția agricolă la nivel mondial este amenințată permanent de numeroasele ciuperci și bacterii fitopatogene. Pentru protecția randamentului și a calității produselor și pentru evitarea pierderilor economice, aplicarea agenților care controlează bolile plantelor este o cerință absolută. În acest sens acestea trebuie să îndeplinească exigentele de mediu: să nu dauneze mediului și sănătății umane, prin acumularea lor, sau prin aplicare directă.

În câmpurile agricole actuale, diferiți agenți patogeni pot apărea în același timp și pot fi controlați cu greu de un singur ingredient activ al fungicidului de sinteză. Compozițiile produselor de protecție a plantelor sunt dorite să arate o eficiență mai mare la o doză mai mică față de bolile plantelor rezistente la fungicide convenționale. Pentru a preveni dezvoltarea rezistenței la fungicidele convenționale, sunt dorite compoziții ecologice inovatoare care pot combate cu ușurință bolile aparute.

*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, (1888) este fungul responsabil cu mana vitei de vie, foarte des întâlnită în țara noastră și care poate să ducă la pierderi ale producției până la chiar 80%.

Mana vitei de vie are două faze sexuată și asexuată, cu semnificație epidemiologică diferită. În faza de înmulțire sexuată se formează oosporii, organe de rezistență și iernare ale agentului patogen, care se găsesc pe sol, în resturile de frunze puternic atacate. Oosporii sunt gata să germineze la sfârșitul iernii și își păstrează capacitatea de germinație până la începutul verii. În primăvară, oosporii germinează la suprafața solului îmbibat cu apă, la temperaturi de peste 10°C. O parte din oosporii poate să rămână în repaus mai mult de un an și să germineze în anul următor. Prin germinarea oosporului se formează un promicelium terminat cu o macroconidie care conține zoosporii biflagelați. Frunzele vitei de vie sunt în general



etalate, în această perioadă, astfel încât infecția primară poate să aibe loc dacă pe frunze este apă suficientă. Numai în această fază, deteriorarea sau inhibarea zoosporilor poate preveni sau reduce infecția. Infecția primară este umată de o perioadă de incubare în care agentul patogen se dezvoltă în frunză, fără niciun simptom vizibil. În această perioadă, tratamentul infecției nu mai este posibil. Creșterea și dezvoltarea patogenului sunt dependente de temperatură, astfel încât la temperaturi ridicate țesuturile sunt invadate rapid de miceliu și petele undelemnii apar mai curând decât la temperaturi mai scăzute. La sfârșitul perioadei de incubare așa numitele pete undelemnii apar ca semn vizibil al infecției fungice. Atunci când umiditatea relativă crește la peste 95% noaptea și temperaturile la peste 12°C, conidioforii cu conidii (microconidii) ies prin stomatele frunzei infectate. Răspândirea conidiilor la distanțe mari se face prin curenții de aer. Ajunse pe organele viței de vie, conidiile germinează în prezența apei și produc filamente ce pătrund prin stomate în țesuturile plantei gazdă. Aceste infecții produse de zoospori care iau naștere prin geminarea microconidiilor poartă denumirea de infecții secundare. *Plasmopara viticola* poate infecta frunzele, bracteele, tulpinile, bacele, apexurile tulpinilor dacă acestea au stomate și umezeală. Chiar și picăturile mici de apă sunt suficiente pentru infecție, dar condițiile pentru infecție sunt mai favorabile dacă udarea cu apă este extinsă și de lungă durată. După fiecare infecție umează perioada de incubație și formarea conidioforilor cu conidii, dacă este suficientă umiditate noaptea. *Plasmopara viticola* este unul dintre patogenii policiclici ce poate să aibă mai multe cicluri de dezvoltare asexuată într-un sezon de vegetație. Lipsa apei întârzie răspândirea la *Plasmopara viticola*. Este posibil să fie prevăzute local perioadele cu risc ridicat de apariție a infecțiilor și să se ia măsuri de protecție a culturilor. Având în vedere condițiile climatice predominante din zona noastră geografică, infecțiile cauzate de *Plasmopara* pot să fie așteptate anual. În ce măsură aceste infecții duc la apariția unor epidemii depinde în mare măsură de evoluția condițiilor meteo și nu este previzibil la începutul perioadei de vegetație. Atacurile de mană (*Plasmopara viticola*) pot să fie foarte violente în cazul soiurilor clasice înalt susceptibile, în numai câteva zile cu ploaie. De aceea, această infecție trebuie detectată și controlată în stadii timpurii. Controlul ulterior nu mai este posibil dacă atacul este avansat. Din acest motiv, cultura eficientă a plantelor este posibilă numai cu luarea unor măsuri de prevenire a unor astfel de infecții.

Prin urmare, este esențial să protejăm culturile viticole de astfel de infecții fungice și, prin urmare, să asigurăm protecția producției de struguri. Lista actuală a pesticidelor cu activitate antimicotică enumeră diversi compuși chimici (pe baza de triazoli, imidazoli, carboxiamide, triazolopirimidine, valinamide, dicarboxiimide, compuși organoclorurari, morfolina, triazolopirimidine, benzimidiazole, chinoline, aniline sau tiazolidine) și compuși de cupru. Preparatele care conțin



cupru sunt singurul mijloc care poate fi utilizat în agricultura ecologică. Tratamentele cu preparate care conțin cupru pentru controlul fungicilor au doar un efect parțial și își ating limitele imediat ce densitatea inoculului de ciuperci a depășit un anumit prag.

Din cauza efectelor ecotoxicologice cunoscute (asupra sănătății umane și asupra mediului) ale compușilor de cupru și ai altor produse agrochimice, există preocupări cu privire la utilizarea pesticidelor ecologice.

**Brevetul US5169646A** revendica folosirea alchil fosfitilor ca agenti antifungici.

**Brevetul IL82311A** revendica folosirea compozitiilor bactericide bazate pe derivati ai acidului fosforic.

**Brevetul US20100068299A1** revendica utilizarea compozitiilor lignosulfonate, a sarurilor metalice si a acidului fosforic pentru controlul patogenilor

**Brevetul EP3071039A1** revendica utilizarea hidroxiapatitei simple sau dislocuite ca mediu de transport a compusilor activi impotriva patogenilor.

**Brevetul EP0406103** revendica compoziții pesticide bazate pe microorganisme, procese pentru prepararea lor și utilizarea lor în agronomie

**Brevetul LT3225B** revendica utilizarea complexilor de cupru cu activitate antibacteriana si fungicida pentru utilizare in agricultura.

**Brevetul RU2265331C2** revendica utilizarea cloroxidului de cupru utilizat in diverse proportii pentru utilizare in agricultura la combaterea diverselor boli.

**Brevetul CN1198163A** revendica utilizarea halobenzimidazolilor ca si compozitii antifungice.

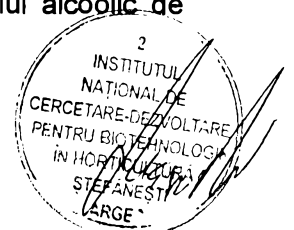
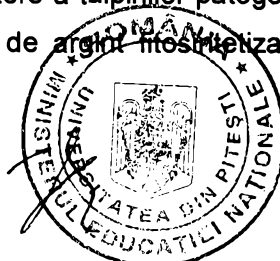
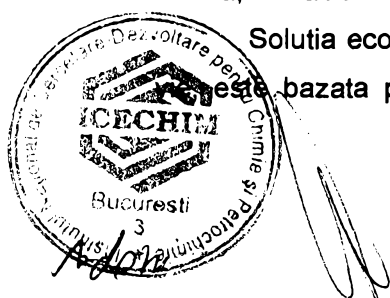
**Brevetul SK282830B6** revendica compozitiile pe baza de alcoximino amide ale acidului acetic ca si agenti de control ai bolilor ce apar la diverse culturi.

**Brevetul US5514643A** revndica utilizarea derivatilor de 2-aminotiazolcarboxamidea pentru controlul fitopatogenilor ce afecteaza culturile.

Scopul acestei inventii este gasirea unei solutii ecologice, ieftine și eficiente, cu aplicare directa, de combatere a tulpinilor patogene care afecteaza culturile de vita de vie si metoda de obtinere a acesteia.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția consta în obținerea unui nou tip de agent antifungic, impotriva manei vitei de vie, concomitent cu proprietatea de a nu fi toxic pentru mediul inconjurator si sanatatea umana si a fi ieftin si eficient, si a avea proprietatea de aplicare directa in cultura, fara a necesita alte substante ca vectori de transport.

Solutia ecologica de combatere a tulpinilor patogene care afecteaza culturile de vita de vie este bazata pe nanoparticule de argint fosforizate cu ajutorul extractului alcoolic de



*Dryopteris filix-mas* (L.) Schott, planta din resursa vegetala autohtona, extract obtinut prin metoda clasica de extractie la temperatura,

Pentru obtinerea extractului alcoolic de *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott materialul vegetal (rizomii plantei) se macina până la dimensiuni sub 100  $\mu\text{m}$ , apoi se extrage prin folosirea etanolului de puritate 96%, la o temperatură sub temperatura de fierbere a solventului, pentru o perioadă de timp variabilă între 3-10 ore (utilizand un raport material vegetal:solvent de 1:6). Extractul se filtrează pentru îndepărtarea materialului vegetal. Fitosinteza nanoparticulelor de argint se realizează prin amestecul extractului cu o soluție de azotat de argint (concentrație între  $0.5 \times 10^{-4} \dots 0,5 \text{ M}$ ) în rapoarte variabile între 3:1 și 1:3 (extract:soluție). Amestecul se păstrează la lumină pentru o perioadă de timp între 2...8 ore. Se formează nanoparticule de argint cu dimensiuni între 35-140 nm aflate în dispersie în extractul utilizat. Soluția conținând nanoparticule de argint astfel obținută se păstrează la întuneric sau în recipiente brune, putând fi utilizată o perioadă de cel puțin 4 luni.

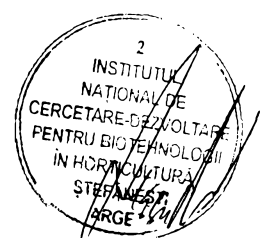
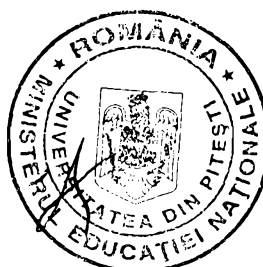
Soluția propusă, conform invenției, **înlătură dezavantajele** utilizarii substantelor chimice de sinteza, prin aceea că utilizează materiale ieftine ce se pot recolta din natura, nu necesita substante si solventi toxici si/sau periculosi, si este fără acțiune negativă asupra mediului și sănătății umane.

**Avantajul** utilizarii acestei solutii ecologice de combatere a tulpinilor patogene care afecteaza culturile de vita de vie este ca utilizeaza solventi netoxici, este naturala si fara reactii adverse, este ieftina, si nu prezinta acțiune negativă asupra mediului și sănătății umane, si are proprietatea de aplicare directa in cultura, fara a necesita alte substante chimice ca vectori de transport.

**Se prezintă în continuare un exemplu de aplicare al invenției.**

### Exemplu

Nanoparticulele de argint au fost fitosintetizate utilizând un extract alcoolic (etanol 96%) obținut conform descrierii de mai sus, din rizomi de ferigă *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott (extract obținut utilizând un raport material vegetal:solvent de 1:6, la temperatura de 66°C, timp de 4 ore) și sare de azotat de argint la o concentrație de  $0.9 \times 10^{-3} \text{ M}$  (raport extract:soluție de azotat de argint 1:1).

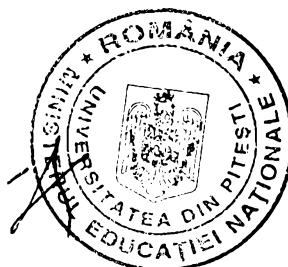


Soluția nanostructurată obținută a fost testată din punct de vedere antifungic împotriva manei viței-de-vie cauzată de ciuperca *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni, (1888).

Microorganismul testat a fost izolat în laborator de pe frunze de viță de vie și cultivat pe mediul de cultură Potato Dextroză Agar la 37°C (mediul de cultură a avut următoarea compoziție: 4 g/L amidon din porumb, 20 g/L dextroză și 15 g/L agar) suplimentat cu 1% cloramfenicol pentru evitarea infectării bacteriene.

Metoda utilizată pentru determinarea activității antifungice s-a bazat pe măsurarea diametrului de zonei de inhibiție [Behiry, S.I., EL-Hefny, M., Salem, M.Z.M., Toxicity effects of *Eriocephalus africanus* L. leaf essential oil against some molecularly identified phytopathogenic bacterial strains, Natural Product Research, 2019].

S-a observat un diametru al zonei de inhibiție de 25 mm asupra microorganismului *P. viticola* față de rezultatul obținut în cazul matorului pozitiv, Shavit 80 (50 mm). Acțiunea antifungică este considerată bună în raport cu acțiunea matorului pozitiv.



## Revendicări

1. Compoziție antifungică pentru tratarea manei viței-de-vie **caracterizată prin aceea că** este constituită din nanoparticule fitosintetizate aflate în dispersie în extract alcoolic obținut din rizomi ai ferigii *Dryopteris filix-mas (L.) Schott* (extract obținut la 66°C și un raport extract:soluție de azotat de argint  $0.9 \times 10^{-3}$  M de 1:1).
2. Metoda de obtinere a compozitiei antifungice nanostructurate, **caracterizată prin aceea că** este constituită din nanoparticule de argint fitosintetizate pe baza unui extract alcoolic obținut prin extracție termică (utilizând etanol de puritate 96%) din rizomii unei plante autohtone, *Dryopteris filix-mas (L.) Schott*, utilizând o soluție de azotat de argint (concentrație între  $0.5 \times 10^{-4}$  M și 0,5 M) în rapoarte variabile între 3:1 și 1:3 (extract:soluție), timp de 2-8 ore.

