



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată  
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **96-00417**

(22) Data de depozit: **29.02.1996**

(30) Prioritate:

(41) Data publicării cererii:  
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:  
**28.02.2000** BOPI nr. **2/2000**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:  
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:  
Nr.

(62) Divizată din cererea:  
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:  
Nr.

(87) Publicare internațională:  
Nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**dr. I. Ogradă, Bolile și dăunătorii  
albinelor, București, 1986; EP 0865278;  
WO 9720560**

(71) Solicitant: **INSTITUTUL DE CERCETĂRI PENTRU PROTECȚIA PLANTELOR, BUCUREȘTI, RO;**

(73) Titular: **INSTITUTUL DE CERCETĂRI PENTRU PROTECȚIA PLANTELOR, BUCUREȘTI, RO;**

(72) Inventatori: **OANCEA FLORIN, BUCUREȘTI, RO; VERNESCU SORIN VICTOR, BUCUREȘTI, RO;**

(74) Mandatar:

(54) **PRODUS PENTRU TRATAREA MICOZELOR ÎN APICULTURĂ ȘI  
PROCEDEU DE OBTINERE**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la un produs pentru tratarea micozelor în apicultură, alcătuit din 100...102 părți, în greutate, maltol, 67...68 părți, în greutate, bicarbonat de sodiu, 150...152 părți, în greutate, acid tartric, 14...16 părți, în greutate, stearat de magneziu și 64...67 părți, în greutate, zahăr

pudră. Procedeul de obținere a produsului prevede comprimarea directă a amestecului pe mașini de tabletat, la presiuni de 4...6.10<sup>7</sup> Pa, la temperaturi de 20...25°C și la umiditate relativă de maximum 80 %.

Revendicări: 2

RO 115411 B1



Prezenta invenție se referă la un produs pentru tratarea micozelor în apicultură și la un procedeu de obținere a acestuia.

Sunt cunoscute o serie întreagă de produse care sunt utilizate pentru combaterea bolilor micotice ale familiilor de albine. Esențele naturale, econazolul și sărurile de amoniu cuaternare [I.Ogradă, 1986, "*Bolile și dăunătorii albinelor*", Asociația Crescătorilor de albine din România, București, p.51] au o reproductibilitate limitată în combaterea agenților cauzali ai micozelor și, implicit, în tratarea bolilor micotice. Antisepticele diluate în zahăr pudră, [M.Marin, 1992, "*Codratin*", România apicolă, an LXXVI, nr.5, pp.5-7], destinate prăfuirii familiilor de albine, sunt dificil de aplicat. Fungicidele, selectate de obicei din marea clasă a pesticidelor utilizate pentru protecția plantelor cultivate, prezintă o eficacitate bună [Kish, L.P., Parlasigui, P.M., 1985, "*Effect of selected chemical treatments on spore germination of Ascosphaera apis (Ascosphaerales)*", Environ. Entomol. 14, 424-426; Youssef, N.N., McManu, W.R., 1985, "*Captan: a promising fungicide for management of chalkbrood diseases*", J.Econ.Entomol. 78, 428...431; Goettel, M.S., Duke, G.M., Schaalje, G.B., Richards, K.W., 1992, "*Effects of selected fungicides on in vitro spore germination and vegetative growth of Ascosphaera aggregata*", Apidologie, 23, 299...309] și se aplică relativ ușor. Utilizarea fungicidelor este însă însoțită de apariția de reziduuri care reduc valoarea comercială a mierii produse de familiile de albine.

Toate produsele de mai sus prezintă dezavantajul comun al unei dozări dificil de efectuat în condiții de teren.

Maltolul, substanța activă antimicotică utilizată în realizarea produsului propus prin prezenta invenție, este un produs natural cunoscut încă din secolul trecut [Brand, J., 1894, "*Ueber maltol*", Chem.Ber., 27, 806-810]. Sinteza acestui compus prin hidroza în mediu alcalin a streptomisinei a fost publicată în 1945 [Schneck, J.R., Spielman, M.A., 1945, "*The formation of maltol by the degradation of strptomycin*", J.Am.Chem.Soc., 67, 2908-2911;]. Obținerea maltolului de la acid kojic a fost brevetată în 1968 [Stephens, C.R.Jr., Alligham, R.P., 1968, "*2-Ethylpyromeconic acid as aroma and flavor component*", **US 3376317**]. Utilizările propuse pentru acest produs au fost cele de potențator de aromă [Hodge, J.E., Moser, H.A., 1961, "*Flavor of bread and pastry upon addition of maltol, isomaltol, and galactosysomaltol*", Cereal Chem., 38, 221-226] și de gust dulce [Bouchard, E.F., Hetzel, C.P., Olsen, R.D., 1968, "*Process of sweetening food with maltol and sugar*", **US 3409441**]. Proprietățile antimicrobiene ale maltolului, ca unul din componentele uleiurilor volatile ale plantelor din genul *Helichrysum* au fost publicate în 1968 [Lassack, E.V., Pinhey, J.T., 1968, "*The constituent of some helichrysum species (family compositae)*", Aust.J.Chem., 21, 1927-1932], însă utilizarea comercială a maltolului ca agent antimicrobian nu a fost încă realizată.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un produs pentru tratarea micozelor în apicultură, care: (i) să fie ușor de dozat în condiții de teren; (ii) să prezinte o eficacitate ridicată și (iii) să nu reducă valoarea comercială a mierii prin poluare cu reziduuri.

Produsul conform invenției constă în aceea că este alcătuit din 100...102 părți, în greutate maltol, 67...68 părți în greutate, bicarbonat de sodiu, 150...152 părți în greutate, acid tartric, 14...16 părți în greutate, stearat de magneziu și 64...67 părți în greutate, zahăr pudră.

Procedeu de obținere a produsului prevede comprimarea directă a amestecului pe mașini de tabletat, la presiuni de 4...6.10<sup>7</sup> Pa, la temperaturi de 20... 25°C și la umiditate relativă de maximum 80 %.

|   |    |
|---|----|
| <p>Produsul prezentat, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- aplicarea ușoară cu respectarea riguroasă a dozei, chiar în condiții de teren;</li> <li>- eficacitate ridicată în combaterea bolilor micotice ale albinelor, însoțită de o creștere de productivitate, datorită unui efect biostimulator secundar;</li> <li>- neafectarea valorii comerciale a mierii produse de familiile de albine tratate.</li> </ul>  | 50 |
| <p>Produsul realizat, conform prezentei invenții, este ușor de aplicat pentru că:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- se utilizează ca soluție de stropit;</li> <li>- o tabletă este astfel concepută, încât să reprezinte doza pentru 1 l de apă, conținutul standard al unei pompe manuale de stropit;</li> <li>- conținutul de substanță activă este în așa fel calculat, încât o gradatie de pe corpul pompei de stropit, 100 ml, corespunde volumului de lichid necesar pentru tratarea unei familii de albine;</li> <li>- tableta se dezagregă rapid în apă, datorită compoziției efervescente;</li> <li>- omogenizarea soluției de stropit se realizează în paralel cu dezagregarea, prin autodispersarea componentelor datorită degajării de bioxid de carbon.</li> </ul>  | 55 |
| <p>Produsul realizat prin prezenta invenție este un amestec efervescent, care conține maltol ca substanță activă și care se poate realiza sub formă de tablete, prin comprimare directă la presiuni reduse.</p>   | 60 |
| <p>Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției.</p> <p>512 g streptomycină se dizolvă în 3 l soluție de NaOH 1N. Se încălzește la fierbere timp de 3 min, după care soluția se răcește la temperatura camerei, se adaugă 3 kg Amberlit IR 112, se agită 1h la temperatura camerei și apoi se filtrează. Filtratul obținut, care conține numai maltol, se usucă prin atomizare obținându-se 100...102 g maltol cu umiditate reziduală de 3...4 %, ceea ce corespunde unei conversii utile streptomycină-maltol de 0,85...0,88. Cele 100...102 g maltol se amestecă cu 67...68 g bicarbonat de sodiu, cu 150...152 g acid tartric, 14...16 g stearat de magneziu și 64...68 g bicarbonat de sodiu, cu 150...152 g acid tartric, 14...6 g stearat de magneziu și 64...67 g zahăr pudră. Toate substanțele amestecate mai sus au o pierdere prin uscarea la 105°C (umiditate reziduală) de cel mult 3...4 %. Cele 400 g de compoziție reziduală se introduc în coșul de alimentare a unei mașini de tabletat, cu excentric, și se tabletează în tablete de 1 g, într-o matrită teflonată cu un singur locaș activ de 15 mm și cu un poanson teflonat adecvat, la o presiune de 4...6.10<sup>7</sup> Pa, la o temperatură obișnuită de 20...25°C și la o umiditate relativă de maximum 80 %.</p> | 65 |
| <p>Eficacitatea produsului obținut, conform exemplului de realizare a invenției, a fost testată atât <i>in vitro</i>, cât și <i>in vivo</i>. S-a lucrat utilizând ca substanțe etalon maltolul pur (99,8 %) și iprodione, un fungicid cu eficacitate ridicată în combaterea ciupercilor patogene pentru albine [Goettel, M.S., Duke, G.M., Schaalje, G.B., Richards, K.W., 1992, "Effects of selected fungicides on <i>in vitro</i> spore germination and vegetative growth of <i>Ascosphaera aggregata</i>", <i>Apidologie</i>, 23, 299-309 ].</p>   | 70 |
| <p>Pentru testarea eficacității <i>in vitro</i> s-a aplicat o variantă a testului de cultivare pe mediu conținând indus produsul de analizat [Baicu, T., 1968, "Culegere de metode utilizate pentru încercarea produselor fitofarmaceutice", CIDAS, București, pp.10...12].Soluția rezultată prin dizolvarea unei tablete efervescente sau a cantității echivalente de substanțe etalon în 200 ml apă distilată a fost sterilizată prin filtrare. 100 ml din soluția astfel sterilizată au fost trecuți aseptice peste 100 ml mediu de malt agarizat (4 g malt, 2 g peptonă, 0,1 g acid citric, 4 g agar)menținut lichid pe baie de apă la 60°C. Mediul rezultat a fost diluat serial(1:1) în condiții aseptice cu câte 100 ml mediu de malt agarizat (2 g malt, 1 g peptonă, 0,05 g acid citric, 2 g agar)</p>   | 75 |
|   | 80 |
|   | 85 |
|   | 90 |
|   | 95 |

menținut lichid pe baie de apă la 60°C. Diluțiile seriale s-au aplicat apoi pe plăci Petri  
 100  $\Phi$ 9 cm (12,5 ml/placă) câte 6 plăci pentru fiecare variantă de concentrație (200  
 mg/l; 100 mg/l; 50 mg/l; 12,5 mg/l; 6,75 mg/l; 3,4 mg/l; 1,7 mg/l; 0,85  
 mg/l; 0,42 mg/l). După răcire, s-au inoculat cu rondelile de ciupercă test (*Ascosphaera*  
*apis*, *Aspergillus flavus*) tăiate din culturi-gazon de 2 săptămâni pe mediu de malt  
 105 agarizat. Plăcile Petri, inoculate cu rondelile, au fost menținute la 30°C până când ga-  
 zonul format de ciupercă test a ocupat întreaga suprafață la varianta martor. În final,  
 s-a măsurat diametrul culturii de ciupercă formate, iar acest diametru a fost utilizat  
 pentru a stabili doza inhibitorie 50% (logaritm doză-probit inhibiție).

Datele din tabelul 1 demonstrează faptul că formularea ca tabletă efervescentă  
 nu modifică semnificativ activitatea fungicistatică/fungicidă a maltolului testat *in vitro*.  
 110 Se remarcă și faptul că fungicidul Orpdione este mult mai activ *in vitro* decât maltolul.

Tabelul 1

115 Valoarea  $DE_{50}$  *in vitro* față de *Ascosphaera* și *Aspergillus flavus* pentru produsele  
 testate

| Produs testat | $DE_{50}$<br><i>A. apis</i> | $DE_{50}$<br><i>A. flavus</i> |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Iprodione     | 1,12                        | 1,88                          |
| Maltol pur    | 21,4                        | 16,8                          |
| produs cf.ex  | 23,5                        | 15,4                          |
| DL 5%         | 7,35                        | 6,17                          |

Eficacitatea *in vivo* a produsului realizat conform prezentei propuneri de  
 invenție a fost stabilită prin aplicarea tratamentului la stupi. S-au folosit aceleași sub-  
 125 stanțe etalon, aplicându-se toate în aceeași doză de 25 mg/stup. În cazul tabletelor  
 obținute conform exemplului de realizare a invenției, o tabletă efervescentă a fost  
 dizolvată într-un litru de apă de robinet, iar soluția rezultată a fost aplicată prin stro-  
 pire cu o pompă de mână la 10 familii de albine - câte 100 ml/familie. În cazul sub-  
 stanțelor etalon, s-a procedat la directă dizolvare a 250 mg într-un litru, aplicarea fiind  
 130 identică. Tratamentele s-au repetat de 3 ori la intervalul de trei zile. După tratamente  
 s-a procedat săptămânal la cântărirea stupilor tratați, comparativ cu a unui martor  
 realizat din stupi netratați, de mărimi aproximativ egale cu ale celor tratați. De ase-  
 menea, s-au efectuat săptămânal estimări ale mortalității puietului datorită ascofe-  
 rozei, prin numărarea larvelor moarte scoase de lucrătoare la urdiniș. În aceste  
 condiții experimentale, s-a calculat eficacitatea produsului ca fiind diferența dintre 100  
 135 și raportul dintre mortalitatea medie la varianta tratată și cea de la martorul netratat.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 2. Eficacitatea tuturor produselor  
 testate este foarte ridicată, de peste 95 %. Se remarcă însă faptul că maltolul, atât  
 ca atare cât și condiționat ca tabletă efervescentă, crește suplimentar productivitatea  
 familiilor tratate. Acest fapt se datorează probabil efectului biostimulator exercitat de  
 140 maltol asupra albinelor.

Eficacitatea in vivo a produselor testate

| Varianta experimentală                | Larve moarte de ascosferoză * | Producție miere (kg/stup/lună) |
|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Martor netratat                       | 787 ± 134                     | 12,34 ± 6,03                   |
| Iprodione 25 mg/stup                  | 25 ± 7                        | 16,52 ± 4,76                   |
| Maltol 25 mg/stup                     | 23 ± 6                        | 22,14 ± 3,83                   |
| Produs cf ex. 1<br>1 tabletă/10 stupi | 121 ± 9                       | 23,12 ± 4,27                   |
| DL 5%                                 | 187                           | 4,23                           |

\* media lunară pentru 20 de stupi, trei ani experimentali (1992 - 1994)

Acest efect biostimulator asupra albinelor poate fi explicat chiar prin caracterul său de potențator natural al aromei și al gustului dulce. Datorită potențării aromelor și a gustului dulce albinele devin mai receptive la nectarul florilor și sunt deci mai eficiente la cules.

Pe de altă parte, datorită caracterului de potențator natural al aromei și al gustului dulce, utilizarea maltolului nu afectează valoarea comercială a mierii produse de familiile de albine tratate. Fiind un produs natural, maltolul este rapid biodegradat și astfel, probabilitatea de acumulare în miere este foarte redusă. Dar chiar în condițiile în care ar fi prezent sub forme de urme în miere, singurul său efect secundar s-ar reduce la potențarea naturală a gustului și parfumului mierii.

### Revendicări

1. Produs pentru tratarea micozelor în apicultură, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din 100...102 părți în greutate, maltol, 67...68 părți în greutate, bicarbonat de sodiu, 150...152 părți în greutate, acid tartric, 14...16 părți în greutate, stearat de magneziu, și 64...67 părți în greutate, zahăr pudră.

2. Procedeu de obținere a produsului definit în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** prevede comprimarea directă a amestecului pe mașini de tabletat, la presiuni de 4...6.10<sup>7</sup> Pa, la temperaturi de 20...25°C și la umiditate relativă de maximum 80 %.

Președintele comisiei de examinare: **chim. Hăulică Mariela**

Examinator: **biochim. Crețu Adina**

