

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **218627**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **391603**

(51) Int.Cl.
A01N 65/00 (2009.01)
A01P 7/02 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **23.06.2010**

(54)

Zastosowanie izolatu z cisa

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

02.01.2012 BUP 01/12

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.01.2015 WUP 01/15

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT PRZEMYSŁU ORGANICZNEGO,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

JERZY KAZIMIERCZAK, Warszawa, PL
WIESŁAW LONDZIN, Zabrzeg, PL
AGNIESZKA ŁYSIK, Warszawa, PL
DANUTA BOMBIŃSKA, Warszawa, PL
SYLWIA GARBACZEWSKA, Jabłonna, PL
MAŁGORZATA CHOLEWIŃSKA, Warszawa, PL

PL 218627 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie izolatu z cisa (*Cis*, *ang. Yew*, *łac. Taxus - Pacific yew tree, Taxus brevifolia; Taxus baccata*) do wytwarzania preparatu przeznaczonego do zwalczania roztoczy.

Roztocza występujące w otoczeniu człowieka, jak i inne występujące w środowisku naturalnym przenoszą patogenne drobnoustroje, odpowiedzialne za wiele chorób skórnych i ogólnoustrojowych. Odrębną grupę roztoczy stanowią *Varroa destructor*, atakujące owady, zwłaszcza owady użytkowe. Są szczególnie niebezpieczne dla pszczół gdyż wywołują warrozę, groźną chorobę niszczącą rodziny pszczele.

Dotychczasowe zwalczanie roztoczy polega głównie na stosowaniu pestycydów. Jako przykłady znanych środków stosowanych przeciwko roztoczom można wymienić fipronil, amikacynę, fluwalinat, kumafos, bromfenwinfos i inne. Preparaty te stosowano do ochrony zwierząt domowych przed kleszczami, jak również do leczenia pszczół z warrozą. Jednak chemiczne preparaty powinny być stosowane z wyjątkową ostrożnością ze względu na ich wysoką toksyczność.

W ostatnich latach w leczeniu pszczół zastosowano wiele preparatów pochodzenia roślinnego, np. olejki ekstrahowane z roślin (PL 186883), ekstrakt z piołunu (BG 104676), ekstrakt z melisy lekarskiej (BG 783), cytral i geraniol w połączeniu z amitrazą (US 5230894), izobaty z grzybów (US 200906880), terpeny (WO 9107875), ekstrakt z chmielu (WO 2008060591) i inne, jednak wiele z nich cechuje stosunkowo niska aktywność.

Wynalazcy zwrócili uwagę na preparaty pochodzenia naturalnego, zwłaszcza te, które od wieków stosowane są w medycynie naturalnej. Jedną z roślin stosowaną w lecznictwie ludzkim jest cis. Preparaty pochodzące z cisa szczególne zainteresowanie wzbudziły po wykryciu działania przeciwnowotworowego jakie wykazują występujące w cisie substancje aktywne. Najbardziej znanym aktywnym składnikiem występującym w cisie jest paklitaksel, popularnie zwany taksolem, nazwa handlowa "Taxol®" (Bristol-Myers Squibb Company, New York, N.Y.).

Wśród aktywnych związków występujących w cisie wyizolowano przede wszystkim taksol, pochodną diterpenowego związku taksonu, aktywną wobec nowotworów jajników, piersi i płuc [JP11046782], [CN1720935], przeciwko wywołującym zapalenie płuc *Mycobacterium tuberculosis* [CN1307890]; po usunięciu taksolu ekstrakty z rośliny z grupy cisowatych można stosować jako dodatek do wina i żywności w celu zapobiegania i zwalczania wzrostu pewnych nowotworów [CN1301542]. Dodatek paklitaksolu lub liści cisa do tytoniu zapobiega szkodliwym skutkom palenia [CN101061887]. Cis stosowano w chińskiej medycynie jako dodatek do mieszanki ziołowej zwalczającej nowotwory [CN101015645]. Liście - powodowały poprawę odpowiedzi immunologicznej, likwidowały zmęczenie, zapobiegały wysokiemu ciśnieniu krwi [CN101011434]. Nie znaleziono w literaturze informacji o tym aby produkty z cisa działały przeciwko roztoczom.

Istotą wynalazku jest zastosowanie izolatów z cisa do wytwarzania preparatu do zwalczania roztoczy.

Korzystnie stosuje się izolat z gałązek i/lub igieł cisa.

Korzystnie izolat z cisa stosuje się w preparatach do zwalczania *Varroa destructor* lub *Typhlodromus pyri* Sch., najkorzystniej do zwalczania warrozy u pszczół.

Izolat z cisa stosuje się w ten sposób, że do ula wprowadza się kształtkę nasączoną lub inkorporowaną izolatem z cisa albo kształtkę pokrytą mikrowarstwą zawierającą izolat z cisa. Korzystnie wkładka wykonana jest z materiału naturalnego lub z tworzywa sztucznego.

Możliwe jest również stosowanie izolatu z cisa bezpośrednio do wylewania i/lub opryskiwania w rodzinach pszczelich.

Korzystnie stosuje się izolat z cisa uzyskany za pomocą rozdrabniania części cisa, ekstrahowania rozdrobnionych części rozpuszczalnikiem organicznym i usuwania rozpuszczalnika z ekstraktu. Jako rozpuszczalniki organiczne do ekstrakcji stosuje się węglowodory, estry organicznych kwasów, alkohole, etery i inne, zwłaszcza octan etylu lub etanol. Korzystnie ekstrakcję prowadzi się w temperaturze od 15 do 30°C, w czasie od 2 do 48 godzin. Korzystnie jest, jeżeli podczas ekstrakcji co najmniej jeden raz prowadzi się naświetlanie ultradźwiękami w czasie od 10 do 30 minut. Najkorzystniej naświetlanie ultradźwiękami prowadzi się trzykrotnie.

Można także stosować izolat uzyskany za pomocą wymywania z kolumny wypełnionej rozdrobnionymi częściami cisa.

Po zakończeniu ekstrakcji odsącza się części stałe, przemywa rozpuszczalnikiem organicznym i po połączeniu przesącze zatęży się do sucha.

Jako materiał roślinny korzystnie stosuje się młode (miękkie) gałązki cisa o długości ok. 10-15 cm, zbierane w okresie maja.

Izolaty z cisa można stosować samodzielnie lub w połączeniu z innymi środkami ochrony pszczoł, takimi jak chemiczne środki roztoczebójcze, takie jak fipronil, amikacyna, fluwalinat, kumafos, bromfenwinfos, amitraza, oraz tymol lub olejki eteryczne, np. olejek rozmarynowy. Możliwe jest również stosowanie terapii zamiennej, np. w jednym roku jednego z chemioterapeutyków, na przykład, amitrazu, zaś w następnym izolatów z cisa, co pozwoli na zmniejszenie zagrożeń spowodowanych narastaniem oporności lub innych zagrożeń związanych z gromadzeniem produktów aktywnych lub produktów rozkładu w miodzie lub w wosku. Możliwa jest też strategia stosowania bezpieczniejszych izolatów z cisa w czasie małego lub średniego nasilenia warrozy, zaś dopiero w przypadkach bardzo silnego porażenia wykorzystania chemioterapeutyków.

Przedmiot wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach.

Badania biologiczne obejmowały próby na dwóch bioindykatorach: roztoczu drapieżnym *Typhlodromus pyri* Sch. oraz na *Varroa destructor*.

Do oceny aktywności roztoczebójczej naturalnych ekstraktów z cisa wobec roztocza *V. destructor* zastosowano zmodyfikowaną metodę opracowaną przez Milaniego (Milani N., 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* 26, s. 415-429; Milani N., 2001. Activity of oxalic and citric acids on the mite *Varroa destructor* in laboratory assays. *Sciences*, s. 127-138, 1995, 2001). Roztocza *Typhlodromus pyri* Sch., zamknięte w szczelnych urządzeniach testowych, narażane były na kontaktowe działanie badanej substancji. Ocena aktywności roztoczebójczej badanych substancji polegała na określeniu procentu śmiertelności oraz nietypowego zachowania roztoczy, poddanych działaniu ekstraktów z cisa. Badania wykazały wysoką aktywność izolatów z cisa, sięgającą do 100% (np. etanolowe ekstrakty lub ekstrakty octanem etylu w stężeniu poniżej 1%).

Przykład 1

Przygotowanie octanowego izolatu (ekstraktu) z cisa - ekstrakt I

Zmielono świeżo ścięte gałązki cisa. Do 900 g zmielonego cisa dodano 1250 ml octanu etylu i zostawiono na jeden dzień w ciemnym miejscu. W międzyczasie trzykrotnie po 20 minut poddano działaniu ultradźwięków w urządzeniu laboratoryjnym do wytwarzania ultradźwięków. Następnie zlano około 600 ml ekstraktu i dodano 610 ml octanu etylu. Zlano kolejną porcję ekstraktu (około 750 ml) i dodano 750 ml octanu etylu. Postępowanie powtórzono jeszcze dwukrotnie. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika otrzymano 24,2 g pozostałości (ekstrakt I).

Przykład 2

Przygotowanie etanolowego izolatu (ekstraktu) z cisa - ekstrakt II

Zmielono świeżo ścięte gałązki cisa. Do 900 g zmielonego cisa dodano 1250 ml etanolu i zostawiono na jeden dzień w ciemnym miejscu. W międzyczasie zawieszinę trzykrotnie po 20 minut poddawano działaniu ultradźwięków w urządzeniu laboratoryjnym do wytwarzania ultradźwięków. Następnie zlano około 800 ml ekstraktu i dodano 850 ml etanolu. Zlano kolejną porcję ekstraktu (około 1000 ml) i dodano 1000 ml etanolu. Postępowanie powtórzono jeszcze dwukrotnie.

Po oddestylowaniu etanolu otrzymano 19 g kleistej pozostałości, którą rozpuszczono w 70% wodnym roztworze etanolu i ekstrahowano chlorkiem metylenu. Po oddestylowaniu chlorku metylenu uzyskano 4,9 g pozostałości (etanolowy ekstrakt z cisa - II).

Przykład 3

Etanolowy ekstrakt z cisa oczyszczany heksanem

Gałązki cisa o długości ok. 10 cm (z końcówek gałęzi) pocięto i zmielono. Porcję o masie 470 g, zalano 1000 ml etanolu, poddano działaniu ultradźwięków w laboratoryjnej łaźni ultradźwiękowej i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Odsączono części stałe i przesącz zatężyło do sucha. Otrzymano 35,3 g pozostałości, którą ekstrahowano 50 ml heksanu, mieszając w temperaturze pokojowej przez 3 godziny i zostawiając na noc bez mieszania. Oddzielono ekstrakt heksanowy i po oddestylowaniu heksanu otrzymano 0,604 g pozostałości (ekstrakt III).

Przykład 4

Ekstrakt octanem etylu z cisa oczyszczany heksanem

Gałązki cisa o długości ok. 10 cm (z końcówek gałęzi) pocięto i zmielono. Porcję o masie 520 g, zalano 1000 ml octanu etylu, poddano działaniu ultradźwięków w laboratoryjnej łaźni ultradźwiękowej i pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Odsączono części stałe i przesącz zatężyło

do sucha. Otrzymano 10,5 g pozostałości. Pozostałość tę ekstrahowano 50 ml heksanu, mieszając w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę i zostawiając na noc bez mieszania. Oddzielono ekstrakt heksanowy i po oddestylowaniu heksanu otrzymano 0,017 g pozostałości (ekstrakt IV).

Przykład 5

Badanie aktywności roztoczebójczej izolatów z cisa

Do oceny aktywności roztoczebójczej naturalnych ekstraktów z cisa wobec roztocza *V. destructor* zastosowano zmodyfikowaną metodę opracowaną przez Milaniego (1995, 2001). Modelowe urządzenia badawcze tej metody to komory składające się z dwóch szklanych płytek pokrytych woskiem i łączącej je gumowej uszczelki. Roztwory preparatów nanoszono poprzez oprysk za pomocą węża Pottera na szklane płytki pokryte woskiem, a po wyschnięciu opryskaną powierzchnią skierowaną do środka montowano w zamknięte komory. Kontakt *V. destructor* z traktowanym podłożem trwał nieprzerwanie 24 h od momentu wpuszczenia roztoczy do komór testowych. W doświadczeniach stosowano 3 powtórzenia po 10 dorosłych osobników dla każdej badanej substancji. Równolegle z serią badaną prowadzono kontrolę (3 x 10 sztuk roztoczy w jednym powtórzeniu), która nie miała kontaktu z badanym materiałem. Śmiertelność roztoczy oceniano po 24 h od momentu przeniesienia roztoczy do urządzeń testowych. Do obserwacji wykorzystano mikroskop stereoskopowy. Używając pędzelka klasyfikowano je w następujące kategorie:

- roztocza żywe - kiedy poruszały się spontanicznie, nie wykazując oznak porażenia;
- roztocza porażone - kiedy wykazywały oznaki zmniejszonej koordynacji w porównaniu do kontroli;
- roztocza w stanie agonii - kiedy wciąż drgały, lecz były niezdolne do ruchu;
- roztocza martwe - kiedy nie reagowały na trzykrotną stymulację.

Śmiertelność roztoczy obliczono dodając osobniki w stanie agonii do osobników martwych. Obserwacje śmiertelności w grupach badanych odnoszono odpowiednio do grupy kontrolnej. Wyniki zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Wpływ izolatów z cisa na śmiertelność roztoczy *Varroa destructor*

ekstrakt	Stężenie [%]	Śmiertelność [%]
I (etanolowy)	6,25	50,00
II (octanowy)	4,37	60,00
III (etanolowy oczyszczony heksanem)	2,1	100,00
	0,2	60,00
IV (octanowy oczyszczony heksanem)	2,4	95,00
	0,2	45,00
kontrola DMF		16,66
kontrola		10,00

Przykład 6

Do oceny aktywności roztoczebójczej izolatów (ekstraktów) z cisa wobec drapieżnego roztocza *Typhlodromus pyri* Sch. zastosowano „metodę wyspową”: "Laboratory residual contact test with the predatory mite *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari: Phytoseiidae) for regulatory testing of plant protection products" Blümel S. *et al.*, 2000.

Modelowe urządzenie składa się ze szklanej tacy napełnionej do odpowiedniego poziomu wodą, mieszczącej 5 stanowisk badawczych. Podstawowy zestaw, to krążki o średnicy 45 mm i grubości 0,1 mm (tzw. „szkiełka wyspowe”), pływające w szalkach Petriego o średnicy 54 mm na powierzchni wody. Płytki Petriego z krążkami umieszcza się na szklanym statywie wyposażonym w odpowiednie korki do montowania naczyń badawczych, a statyw wstawia się do tacy z wodą. Woda w zestawie badawczym jest zabezpieczeniem przed ucieczką roztoczy oraz służy im do picia. Badany materiał nanoszony jest na krążki podczas oprysku, które po wyschnięciu przenosi się do szalek Petriego, a całość do skonstruowanego urządzenia badawczego. Kontakt roztoczy z opryskanym podłożem trwa nieprzerwanie 4 dni od momentu przełożenia osobników na krążki.

Opryskiwanie „szkiełek wyspowych” wykonano za pomocą wieży Pottera, składającej się z dwóch rozpylaczy do pośredniego i końcowego oprysku, po uprzedniej kalibracji urządzenia. Przed opryskaniem, szkiełka odtłuszczono, zważono, a sprzęt do spryskiwania wykalibrowano wodą destylowaną, w celu uzyskania odpowiedniej ilości cieczy roboczej na szklanych płytkach. Do przeprowadzenia kalibracji użyto 0,7 ml wody destylowanej na jedno szkiełko o powierzchni 16 cm². Kalibrację przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Ciśnienie podczas oprysku wynosiło 0,4 bar. Urządzenie wykalibrowano tak, aby na 1 cm² szkiełka padało 2 mg cieczy roboczej (±0,2 mg/1 cm² szkiełka). Po oprysku szkiełka ponownie zważono, celem obliczenia ilości cieczy opryskowej.

W doświadczeniu stosowano 3 powtórzenia po 10 dorosłych osobników w każdym.

Równoległe z serią badaną prowadzono kontrolę (3 x 10 sztuk roztoczy w jednym powtórzeniu), która nie miała kontaktu z badanym materiałem. Kontrolne „szkiełka wyspowe” opryskiwano rozpuszczalnikiem użytym do przygotowania roztworów badanego materiału.

Po opryskaniu szkiełek i wyschnięciu cieczy na ich powierzchni (1-1,5 godziny), dodawano na każde pokarm w postaci pyłku sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*), a następnie przekładano delikatnym pędzelkiem dorosłe roztocza, umieszczając całość w naczyniach badawczych, gdzie odbywał się ich dalszy rozwój. W czasie doświadczenia, roztocza miały stały dostęp do wody, a pokarm uzupełniano w miarę potrzeby. Obserwacje śmiertelności prowadzono po 4 dniach narażenia.

Badanie śmiertelności przeprowadzono w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, wymaganych dla badanego organizmu. Monitoring temperatury i wilgotności rejestrowano w sposób ciągły za pomocą termohigrografu, typ TZ-18 td. Temperatura wynosiła 23-29°C, wilgotność względna powietrza 55-87%, cykl świetlny 16 h dzień: 8 h noc, natężenie światła 766-768 lx.

Obserwacje śmiertelności w grupach badanych odnoszono odpowiednio do grupy kontrolnej i zapisywano w karcie odczytu wyników.

Śmiertelność roztoczy obliczono dodając osobniki martwe do osobników zaginionych. Wartość tę porównano do liczby roztoczy, występujących na początku doświadczenia. Za martwe przyjmowano te organizmy, które były wysuszone i pomarszczone oraz te, które były nieruchome nawet po dotknięciu ich delikatnym pędzelkiem. Osobniki zaginione to roztocza, które nie można odnaleźć w obszarze badawczym lub utopione w obszarze płytek Petriego.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki badań wrażliwości roztoczy *T. pyri* na naturalne ekstrakty z cisa.

T a b e l a 2

Badania wrażliwości roztoczy *T. pyri* na naturalne ekstrakty z cisa

EKSTRAKT	Cp [%]	Śmiertelność roztoczy po 1 dniu [%]	Śmiertelność roztoczy po 2 dniach [%]	Śmiertelność roztoczy po 3 dniach [%]
I	4,7	10,0	15,0	20,0
II	5,2	8,0	15,0	15,0
III	2,1	100,0	100,0	100,0
	0,2	0	50,0	60,0
IV	3,0	90	100	100
	0,3	0	50	70
KONTROLA DMF	0,0	0	0	10

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie izolatu z cisa do wytwarzania preparatu do zwalczania roztoczy.
2. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że stosuje się izolat z gałązek i/lub igieł cisa.
3. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że izolat z cisa stosuje się do zwalczania *Varroa destructor* i/lub *Typhlodromus pyri* Sch.
4. Zastosowanie według zastrz. 1 albo 3, **znamiennie tym**, że izolat z cisa stosuje się do zwalczania warrozy u pszczoł.

5. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że do ula wprowadza się kształtkę nasączoną, lub inkorporowaną izolatem z cisa.
6. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że do ula wprowadza się kształtkę pokrytą mikrowarstwą zawierającą izolat z cisa.
7. Zastosowanie według zastrz. 5 albo 6, **znamiennie tym**, że wkładka wykonana jest z materiału naturalnego lub z tworzywa sztucznego.
8. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że izolat z cisa stosuje się bezpośrednio do wylewania i/lub opryskiwania w rodzinach pszczelich.
9. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że stosuje się izolat z cisa uzyskany za pomocą rozdrabniania części cisa, ekstrahowania rozdrobnionych części rozpuszczalnikiem organicznym i usuwania rozpuszczalnika z ekstraktu.
10. Zastosowanie według zastrz. 9, **znamienny tym**, że częściami cisa, z których prowadzi się ekstrakcję są igły lub gałęzie.
11. Zastosowanie według zastrz. 9, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalniki organiczne do ekstrakcji stosuje się węglowodory, estry organicznych kwasów, alkohole, etery.
12. Zastosowanie według zastrz. 9, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalniki stosuje się octan etylu lub etanol.
13. Zastosowanie według zastrz. 9, **znamiennie tym**, że ekstrakcję prowadzi się w temperaturze od 15 do 30°C, w czasie od 2 do 48 godzin.
14. Zastosowanie według zastrz. 9 albo 13, **znamiennie tym**, że podczas ekstrakcji co najmniej jeden raz prowadzi się naświetlanie ultradźwiękami w czasie od 10 do 30 minut.
15. Zastosowanie według zastrz. 14, **znamiennie tym**, że naświetlanie ultradźwiękami prowadzi się trzykrotnie.
16. Zastosowanie według zastrz. 9, **znamiennie tym**, że izolat uzyskuje się za pomocą wmywania z kolumny wypełnionej rozdrobnionymi częściami cisa.
17. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że izolat z cisa stosuje się w mieszaninie z olejkami eterycznymi i/lub tymolem i/lub z chemicznym środkiem roztopczobójczym, takim jak fipronil, mikacyna, fluwalinat, kumafos, bromfenwinfos, amitraza.
18. Zastosowanie według zastrz. 17, **znamiennie tym**, że stosuje się izolat z cisa w mieszaninie z olejkami rozmarynowym i/lub tymolem.
19. Zastosowanie według zastrz. 16, **znamiennie tym**, że izolat z cisa stosuje się naprzemiennie z chemicznymi środkami zwalczającymi roztocza, takim jak fipronil, amikacyna, fluwalinat, kumafos, bromfenwinfos, amitraza.