



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2014 00268**

(22) Data de depozit: **07/04/2014**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/08/2018** BOPI nr. **8/2018**

(41) Data publicării cererii:
29/05/2015 BOPI nr. **5/2015**

(73) Titular:
• **PRIMOSAL SRL,**
STR. GENERAL BUDIȘTEANU NR. 6,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN,** *STR. PAȘCANI NR.5,*
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **KUMBAKISAKA SYLVIU AMUNDALA**
RENAUD, *BD. NICOLAE TITULESCU*
NR. 94, BL. 14A, SC. 4, AP. 171, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;

• **PĂTRAȘCU MARIANA,**
STR.GĂRII DE NORD NR.2, BL.C, SC.3,
AP.81, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(74) Mandatar:
MIHAELA TEODORESCU &
PARTNERS-INTELLECTUAL PROPERTY
OFFICE S.R.L., *STR.VIORELE, NR.51,*
BL.37, AP.63, P.O. BOX 53-202, SECTOR 4,
BUCUREȘTI

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 8026086 (B2); RO 128904 (A)

(54) **PROCEDEU DE EXTRAȚIE SECVENȚIALĂ
A MATERIALULUI VEGETAL CU CONȚINUT SEMNIFICATIV
DE SILICIU**



RO 130242 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de valorificare complexă a materialului
vegetal cu un conținut ridicat de siliciu, prin care se valorifică integral diferitele ingrediente
3 active prezente în respectivul material vegetal, inclusiv bio-silicea, pentru obținerea de com-
puși cu utilizări diverse, ca ingrediente active pentru produse cosmetice sau farmaceutice,
5 aditivi alimentari sau furajeri, suplimente nutritive, produse pentru stimularea și/sau protecția
plantelor cultivate, materii prime pentru diverse noi biomateriale și fertilizanți/amelioratori de
7 sol.

Sunt cunoscute procedee care au ca scop valorificarea cât mai completă a diferiților
9 compuși prezenți în materialul vegetal cu un conținut ridicat de siliciu, provenit din plante
care acumulează siliciu, cum sunt, de exemplu, cele din genul *Equisetum* (denumite popular
11 coada-calului) sau din diferite subproduse de la industrializarea cerealelor (de exemplu
târâțele).

13 **FR 2610253 B1** se referă la un procedeu de obținere a unui extract standardizat, care
conține siliciu biogen, provenit din *Equisetum arvense*, caracterizat prin conținutul său în
15 siliciu și prin prezența complexelor $\text{Si}(\text{OR})_4$ și $\text{Si}(\text{OR})_2$, în care radicalul organic R poate fi
un catecol, o flavonă, o zaharidă, un acid organic, o vitamină - vitamina C etc.

17 Un tip similar de complecși ai siliciului solubil cu compuși organici se obține și în
cazul în care se aplică, unui material vegetal bogat în siliciu, procedeul descris în
19 **RO 128904 A0**, care include următoarele etape: extracția materialului vegetal cu o soluție
hidroalcoolică 40...46% etanol ÷ 60...54% apă timp de 10 zile, separarea resturilor de mate-
21 rial vegetal de extractul hidro-alcoolic; calcinarea resturilor de material vegetal separate de
la extracție, la temperatura de 800...1000°C; macerarea cenușii rezultate din materialul
23 vegetal extras cu extractul hidro-alcoolic timp de 24 h la temperatura 20...25°C; separarea
prin filtrare a extractului hidroalcoolic cu microelemente (siliciu) din cenușă chelatare în ingre-
25 dientele active extrase în soluția hidro-alcoolică, în care se regăsesc flavonele, zaharidele,
acizii organici, vitaminele cu acțiune de complexare a siliciului.

27 O atenție specială a fost acordată obținerii nano-particulelor de bio-siliciu, având în
vedere potențialul de aplicații în nanotehnologie (**Neethirajan et al., 2009, Trends Biotech.,**
29 **27, 461-467**). **US 8026086 B2** prezintă un procedeu pentru co-producerea din material
vegetal bogat în siliciu a bio-silicei și a unui alt produs chimic de interes, cum este bio-
31 etanolul. Procedeul include următoarele etape: pre-tratamentul materialului vegetal silicios,
pentru a obține o materie primă în care celuloza este expusă, hidroliza materialului vegetal
33 cu celuloză expusă, sub acțiunea unor agenți biologici, pentru a forma glucide fermentes-
cibile, care sunt transformate în bio-etanol, și un co-produs conținând bio-siliciu, care este
35 separat de soluția alcoolică, purificat și transformat în bio-silice sau în alte produse cu
aplicare practică conținând siliciu.

37 **US 7364 640 B2** revendică un procedeu de desilicifiere a materialului vegetal fibros
nelemnos, care include alcalinizarea materialului vegetal dezintegrat, până la solubilizarea
39 totală a siliciului, separarea prin filtrare a materialului celulozic nesolubilizat, precipitarea cu
acid a siliciului, înlăturarea siliciului precipitat și folosirea sa ca materie primă pentru diverse
41 aplicații.

CN 102512461 A dezvăluie un procedeu de extracție a unor compuși cu siliciu din
43 *Equisetum*, care implică solubilizarea cu apă fierbinte, purificare prin trecere pe coloană cu
rășini macroporoase, ultrafiltrarea soluției pre-purificate, urmată de concentrare și uscare prin
45 pulverizare.

US 7897648 B2 descrie un procedeu de preparare a bioxidului de siliciu expandat
47 (aerogel de siliciu) prin arderea târâțelor de orez, dizolvarea cenușii rezultate cu o soluție de
hidroxid de sodiu, cu formare de silicat de sodiu, adăugarea de acid sulfuric concentrat
49 pentru precipitarea unui hidrogel de siliciu, înlocuirea apei din hidrogel cu vapori de alcool
C1-C4, și uscarea alcoolgelului pentru generarea aerogelului de silice.

RO 130242 B1

Astfel de procedee, de tipul celor descrise mai sus, nu recuperează și alți ingrediente activi prezenți în materialul vegetal silicios supus extracției.	1
CN 103330724 A descrie un procedeu de extracție a flavonoidelor din <i>Equisetum hyemale</i> , care implică uscarea la umbră, măcinarea, sitarea, pe sită de 100 mesh, extracția cu eter de petrol a componentelor hidrofobe, extracția flavonoidelor din materialul vegetal silicios delipidizat, cu etanol 50...90%, în raport de 1 g la 10...40 ml soluție etanolică, prin încălzire în câmp de microunde, timp de 5...15 min, la o putere de 300...100 W. Prin aplicarea procedeeului se recuperează flavonele totale, dar, deși sunt extrași compuși hidrofobi din materialul vegetal, nu sunt recuperate uleiurile esențiale, care au bune caracteristici de aromatizare și o semnificativă activitate anti-bacteriană (Radulovic et al. 2006, Phytother. Res., 20, 85-88). Procedeu descris în CN 103330724 A nu include nici modalități de recuperare și utilizare a celorlalți compuși prezenți în materialul vegetal silicios, ca, de exemplu, celuloza cristalină și bio-silicea.	3 5 7 9 11 13
WO 2014003197 A1 se referă la un procedeu de obținere a uleiului de tărâțe degresat, prin aplicarea unui prim tratament cu abur supraîncălzit, la 250...650°C, pentru 0,5...60 s, urmat de extracția uleiului și separarea tărâței degresate.	15
Procedeele menționate mai sus valorifică numai unele din componentele prezente în materialul vegetal bogat în siliciu, fără a recupera componente cu valoare adăugată semnificativă, cum este, de exemplu, nanoceluloza.	17 19
US 20120316330 A1 descrie un procedeu pentru conversia integrată a materialului lignocelulozic la zaharide sau biocombustibili și nano-celuloză/(ligno)celuloză nano-fibrilată. Procedeu implică tratarea materialului celulozic cu una sau mai multe enzime, pentru a obține zaharide fermentescibile și lignoceluloză recalcitrantă, urmată de prelucrarea mecanică a unei suspensii diluate de lignoceluloză recalcitrantă, între 0,3 și 1,5% (m/V) în apă deionizată, prin trecere repetată, la presiuni ridicate, prin camere microfluidice de 200 μm și 87 μm, pentru a produce (ligno)celuloză nano-fibrilată.	21 23 25
Procedeu nu include etape prin care să se valorifice compușii biologic activi prezenți în materialul vegetal (lignocelulozic), compuși care au o valoare adăugată mare, și nu menționează nimic despre procesarea ulterioară a ligninei recalcitrante, care nu se poate separa total de lignină, iar prelucrarea mecanică se realizează cu un echipament care este scump, ceea ce face ca ridicarea la scară a procedeeului să fie capital intensivă.	27 29 31
Sunt necesare procedee prin care să se realizeze o recuperare completă și complexă a diferitelor componente de interes prezente în materialul vegetal, provenit din plante care acumulează siliciu, într-un timp cât mai scurt, cu randament ridicat și consum redus de solvenți și energie. Pentru creșterea profitabilității este necesar și un procedeu complementar, prin care să se recupereze, din materialul vegetal, toate componentele care pot fi folosite ca materii prime pentru bio-produse cu valoarea adăugată mare. Un obiect al acestei invenții este acela de a descrie un astfel de procedeu, prin care să se realizeze extracția secvențială a diferitelor componente, hidrofobe și hidrofile și/sau amfifile, și prelucrarea ulterioară a materialului extras, pentru obținerea diferitelor materii prime pentru bio-produse - uleiuri esențiale, compuși amfifili anti-oxidanți, oligozaharide cu activitate de activare a rezistenței plantelor, polizaharide utilizabile ca aditivi alimentari și/sau suplimente nutritive/fibre solubile, nanoceluloză, bio-silice mezoporoasă, bio-ulei și bio-cărbune.	33 35 37 39 41 43
Procedeu, conform invenției, este alcătuit din următoarele etape: extracția enzimatică asistată de ultrasunete a agliconilor din conjugatele glicozidice, a materialului vegetal uscat și măcinat provenit din plante cu un conținut ridicat de siliciu, cu separarea prin filtrare a unui filtrat F1, care conține β-oligozaharide cu acțiune de elicitori/activatori ai rezistenței sistemice	45 47

RO 130242 B1

1 în plante și agliconi antioxidanți, și a materialului vegetal M1; precipitarea β -oligozaharidelor
din filtratul F1 și concentrarea compușilor antioxidanți; extracția uleiurilor prin încălzire în
3 câmp de microunde a materialului vegetal M1 în prezență de izopropanol, cu formarea
extractului uleios F2 și a materialului M2; extracția hidrotermală asistată de microunde a pro-
5 teinelor din materialul M2, separarea prin filtrare a filtratului F3 de materialul M3, și uscarea
prin pulverizare a proteinelor extrase în filtratul F3; extracția pectinei, hemicelulozei și
7 celulozei ușor solubile din materialul vegetal M3, prin amestecare cu lichide ionice și
încălzire în câmp de microunde, urmată de omogenizarea la înaltă presiune pentru suspen-
9 darea nano-celulozei; separarea prin filtrare tangențială a filtratului F4, cu polizaharide solu-
bilizate și/sau suspendate, de materialul lignocelulozic recalcitrant M4, separarea prin centri-
11 fugare a nano-celulozei și precipitarea cu alcool etilic a polizaharidelor solubile; conversia
materialului lignocelulozic recalcitrant M4 în bio-cărbune și bio-ulei; extracția bio-siliciului din
13 bio-cărbune cu soluții alcaline, sinteza bio-silicei mezoporoase din bio-siliciul solubilizat pe
o matriță de polietilenglicon, recuperarea bio-silicei mezoporoase prin centrifugare și
15 calcinarea ei.

Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:

17 - Extracția enzimatică asistată de ultrasunete a agliconilor anti-oxidanți din materialul
vegetal uscat și măcinat până la o granulație de 20 mesh/0,85 mm, prin tratare, timp de 4 h,
19 a 1 parte de material vegetal cu 25 părți soluție de alcool etilic 30% în apă, conținând
1,5 mg/ml complex de hidrolaze produs de *Trichoderma viride*, cu 200 unități β -glucan
21 *Botrytis* per g, la pH 5, temperatura de 50°C, cu ultrasonicare intermitentă, 5 min la fiecare
30 min, la 20 kHz și cu o putere de 500 W, urmată de separarea prin filtrare a materialului
23 vegetal ne-extras M1 de extractul hidro-alcoolic F1;

- Extracția uleiurilor din materialul vegetal M1, umectat și micronizat, prin încălzire
25 timp de 20 min în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500 W, la temperaturi de
maximum 92°C, în prezență de izo-propanol în raport de 2..3 părți la 1 parte de material
27 vegetal M1, cu formarea materialului M2 și recuperarea uleiurilor funcționale F2 din alcoolul
izopropilic, prin concentrare la sec sub vid;

29 - Precipitarea din filtratul hidro-alcoolic F1 a oligozaharidelor, prin adăugare de alcool
etilic 96%, în raport de 10 volume alcool etilic 96% la 1 volum filtrat, și concentrarea prin
31 evaporare până la 20% substanță uscată a soluției alcoolice, cu recuperarea azeotropului
etanol-apă 96%;

33 - Extracția hidrotermală asistată de microunde a proteinelor din materialul M2, prin
tratarea a 1 parte material M2 cu 4 părți apă distilată și încălzire timp de 25 min în câmp
35 incremental de microunde, de la 400 la 500 W, la temperaturi de maximum 150°C;

- Separarea prin filtrare a filtratului F3 de materialul M3, și uscarea prin pulverizare
37 a proteinelor extrase în filtratul F3, folosind un uscător prin pulverizare, la o temperatură
maximă de intrare de 170..175°C și o temperatură de ieșire de 75..80°C;

39 - Extracția pectinei și hemicelulozei din materialul vegetal M2, prin tratarea a 1 parte
material M3 cu 20 părți lichid ionic, sare de etil-sulfat a 1-etil-3-metilimidazol, în câmp de
41 microunde, timp de 6 min, la o putere de 300 W și la o temperatură de 85°C, urmată de omo-
genizarea sub presiune într-un omogenizator cu piston, 25 cicluri la 150 MPa, a amestecului
43 material M3 - lichid ionic;

- Separarea prin filtrare tangențială a filtratului F4, conținând polizaharide solubilizate
45 și/sau suspendate, de materialul lignocelulozic recalcitrant la solubilizare M4, urmată de
separarea prin centrifugare din filtratul F4 a fibrelor de nano-celuloză, și de precipitarea
47 polizaharidelor solubile din supernatant, prin adăugare de alcool etilic 96%, în raport de 10
volume alcool etilic 96% la 1 volum supernatant, și recuperarea azeotropului etanol-apă 96%
49 și a lichidului ionic prin distilare;

RO 130242 B1

- Conversia în bio-cărbune și bio-ulei a materialului lignocelulozic recalcitrant M3, prin piroliza asistată de microunde, la o putere incidentă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub vacuum, care inițial este de 30 mbar, și care crește până la 0,3 bar la punctul maxim de încălzire. 1
 - Extracția bio-siliciului din bio-cărbune, răcit în prealabil la temperatura camerei prin purjare cu azot, într-o soluție alcalină 1 M NaOH, în raport de 1 parte bio-cărbune la 3 părți soluție alcalină, 3
 - Sinteza bio-silicei mezoporoase din bio-siliciul solubilizat, după reducerea pH-ului soluției alcaline de bio-siliciu la valoarea 9,0 cu o soluție de acid fosforic 1 M, pentru formarea unui silicat care conține $\text{SiO}_2:0,225 \text{ mol/l}$, $\text{Na}_2\text{O}:0,087 \text{ mol/l}$, prin adăugare de polietilenglicol cu masa moleculară de 20 KDa, în raport de 1 parte la 100 părți soluție, și reducerea treptată a pH-ului la valoarea 4,8, prin adăugare de volume de 0,5 ml acid fosforic 1 M timp de 30 min, finalizarea precipitării silicei mezoporoase timp de 15 min; 5
 - Recuperarea bio-silicei mezoporoase prin centrifugare la 8000 g, uscarea în cuptor cu microunde timp de 15 min, urmată de calcinarea bio-silicei mezoporoase la 500°C timp de 1 h. 7
- Procedeele conform invenției prezintă următoarele avantaje: 9
- asigură o recuperare complexă și completă a diferiților compuși utili din materialul vegetal, extracte de compuși antioxidanți, oligozaharide cu activitate de activare a rezistenței plantelor, uleiuri funcționale, proteine și polizaharide utilizabile ca aditiv alimentari și/sau suplimente nutritive, nanoceluloză, bio-ulei și bio-cărbune, silice mezoporoasă; 11
 - un timp mai scurt de extracție a uleiurilor din materialul vegetal, cu un randament superior, și o mai bună menținere în uleiurile funcționale a componentelor termolabile, comparativ cu metodele standard de extracție; 13
 - un randament crescut de extracție a compușilor antioxidanți datorită eliberării compușilor legați ca agliconi în glicozide, de către enzimele β -glucanazice, cu formare concomitentă de β -oligozaharide, care sunt elicitori/activatori ai sistemului de apărare din plante; 15
 - extrage pectinele, hemicelulozele și celuloza solubilă din materialul vegetal, care au utilizări ca aditivi alimentari și suplimente nutritive/fibre solubile; 17
 - produce celuloză nanofibrilată formată exclusiv din celuloză, cu utilizări în realizarea de materiale bio-compozite; 19
 - transformă lignoceluloza recalcitrantă în biocombustibil de focar (bio-ulei) și bio-cărbune; 21
 - convertește bio-siliciul amorf din materialul vegetal, cu o stabilitate termodinamică mai redusă față de cel mineral, în silice mezoporoasă, care are utilizări ca material purtător pentru catalizatori, ingrediente biologic-active, ș.a.m.d.; 23
 - reține în bio-cărbune o serie de elemente nutritive pentru plante, macro-, oligo- și micro-elemente, conferindu-i acestuia nu numai caracteristici de ameliorator de sol, ci și de fertilizant; 25
 - permite obținerea unei întregi serii de bio-produse care sunt utilizabile ca inputuri în tehnologiile agricole de cultivare a plantelor - β -oligozaharide care activează exprimarea sistemului de apărare din plante, bio-cărbune fertilizant/ameliorator de sol, asigurând în acest fel închiderea, cu valoare adăugată, a unui circuit biomimetic de producere și de valorificare bio-resurse. 27
- În continuare, se prezintă exemple de realizare care ilustrează invenția fără a o limita. 29
- Exemplul 1** 31
- 1000 g de părți aeriene de coada-calului (*Equisetum arvense*) uscate, măcinate până la o granulație de 20 mesh (0,85 mm), folosind o moară Retsch (Grindomix, Retsch, Haan, Germania), se trec într-un vas de sticlă Simax® de 50 l (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică, și un sistem de recirculare cu o celulă de flux 33

RO 130242 B1

1 FC100L1-1S (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germania), împreună cu 25 kg de soluție de
alcool etilic 30% în apă, cu pH-ul ajustat la 5. Soluția de alcoolic etilic conține 1,5 mg/ml
3 complex de hidrolaze produs de *Trichoderma viride*, cu minimum 200 unități β -glucan
Botrytis per g.

5 Complexul de hidrolaze folosit este Glucanex 200 G (Novozyme A/S, Bagsvaerd,
Danemarca), un amestec de enzime litice din *Trichoderma harzianum*, care include celuloze,
7 β 1-3 și β 1-6 glucanaze, proteaze și chitinaze. O unitate β -glucan *Botrytis* este definită ca
fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții standard, la 30,0°C, pH 4,4, timp de 10 min,
9 eliberează 1 mmol de grupări reducătoare carbohidrați (calculate ca glucoză) per min.
Suspensia de material vegetal - soluție alcoolică - enzime este amestecată cu agitatorul la
11 25 rpm și încălzită până la 50°C. Intermitent, 5 min la fiecare 30 min, se trece cu un debit de
5 l pe min prin celula de flux pe care este montată o sonotrodă UIP 1000 hd (Hielscher
13 Ultrasonics), omogenizându-se amestecul la 20 kHz și cu o putere de 500 W. După 4 h se
separă materialul vegetal ne-extras M1 de extractul hidro-alcoolic, prin filtrare pe un filtru cu
15 presiune (RPF T01, BHS-Sonthofen, Sonthofen, Germania), la 0,6 MPa. Materialul vegetal
M1, separat prin filtrare, se usucă de urmele de alcool etilic în etuvă sub vid la 50°C, timp de
17 4 h. Din extractul hidroalcoolic F1 se precipită oligozaharidele, prin adăugare de alcool etilic
96%, în raport de 10 volume alcool etilic 96% la 1 volum filtrat, și se separă prin centrifugare
19 continuă pe o centrifugă continuă de laborator Westfalia Laboratory Separator, model SA 1--
02-175 (GEA Westfalia Separator Group, Oelde, Germania), care este operată la o viteză
21 a discurilor de centrifugare de 10000 rpm, echivalent a 8500 x g; la o rată de alimentare de
1 l/min, cu separarea continuă a extractului hidro-alcoolic clarificat și discontinuă a concen-
23 tratului de compuși formați prin hidroliza enzimatică a materialului vegetal, în special β -
oligozaharide, ajuns la o densitate de 1100 kg/m³. Concentratul rezultat se usucă sub vid
25 la 75°C. Se separă circa 85 g de compuși formați prin hidroliza enzimatică a materialului
vegetal.

27 Supernatantul alcoolic este concentrat prin evaporare până la 20% substanță uscată
a soluției alcoolice, cu recuperarea azeotropului etanol-apă 96%, prin folosirea unui
29 Evaporator 25 l/h Simax® (Kavalier).

În extractul alcoolic s-a determinat conținutul de polifenoli totali prin metoda descrisă
31 de **Komes et al., 2011, Phytochem. Anal. 22:172-180**, folosind reactiv Folin-Ciocalteu
(Merck, Darmstadt, Germania) și o curbă etalon de acid galic (Sigma Aldrich, St. Louis, MO,
33 SUA). Conținutul de flavonoide totale s-a determinat după inițierea policondensării acestora
cu formaldehidă (Merck) și separarea prin filtrare a precipitatului format prin policondensare.
35 În filtratul obținut după separarea precipitatului de flavonoide policondensate s-au determinat
din nou polifenolii totali non-flavonoidici, cu reactiv Folin-Ciocalteu, flavonoidele totale fiind
37 calculate ca diferență.

S-a determinat și activitatea antioxidantă echivalent trolox, prin folosirea metodei **Re
39 et al., 1999, Free Radic Biol Med 26:1231-1237**, prin care se determină capacitatea de
stingere a radicalilor liberi cationici ABTS [acid 2,2' azinobis-(3- etilbenziazolin-6-sulphonic)].

41 S-a comparat cu un extract alcoolic realizat din extragerea aceluiași tip material
vegetal, părți aeriene uscate de *Equisetum arvense*, măcinate până la o granulație de
43 20 mesh, în raport de 1 parte material vegetal la 50 părți soluție alcool etilic 30%, timp de
4 h, la 50°C. Rezultatele determinărilor au fost raportate per gram de material vegetal uscat.

45 Extracția hidrolitică conform procedurii propusă determină obținerea de 65,5 \pm
 \pm 8 mg/g fenoli totali, din care 44,6 \pm 1,9 mg/g flavonoide totale, cu o activitate antioxidantă
47 de 1,47 mM echiv. trolox, per gram de substanță uscată de material, comparativ cu 32 \pm
 \pm 6 mg/g fenoli totali, din care 18,2 \pm 1,6 mg/g flavonoide totale, cu o activitate antioxidantă
49 de 0,67 mM echiv. trolox, per gram de substanță uscată de material, în cazul extragerii cu
o soluție hidroalcoolică.

RO 130242 B1

Extracția hidrolitică a polifenolilor antioxidanți cu amestec de hidrolaze produs de *Trichoderma* determină formarea din materialul vegetal a unui amestec de compuși de hidroliză, în special β -oligozaharide, care prezintă un tipar molecular similar celui asociat distrugerilor (de perete celular). Un astfel de tipar molecular determină la plante activarea răspunsului de apărare din plante - a se vedea, de exemplu, review-ul **Hermosa et al., 2013, Int. Microb., 16:69-80.**

Activarea răspunsului de apărare din plante de către compușii separați prin precipitare cu alcool din soluția rezultată după extracție hidrolitică a fost verificată prin determinarea alcalinizării mediului de cultură a unei suspensii de celule de tutun pe mediu Murashige și Skoog cu pH inițial 5,8 (Duchefa Biochemie, Haarlem, Olanda), suplimentat cu $0,2 \text{ g l}^{-1}$ 2,4-D, 1 mg l^{-1} tiamină, 100 mg l^{-1} mio-inozitol, 200 mg l^{-1} KH_2PO_4 , și 30 g l^{-1} de zaharoză, conform metodei descrise de **Klarzynski et al. 2000, Plant Physiol, 124: 1027-1038.** S-a lucrat comparativ cu un produs standard reprezentat de laminarină din *Laminaria digitata* (Sigma Aldrich). O doză de $150 \text{ }\mu\text{g/ml}$ compuși totali precipitați cu etanol, conform procedurii de mai sus, a determinat o alcalinizare de 1,8 unități pH, similară cu cea produsă de $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ laminarină. Laminarina este omologată ca biofungicid pentru combaterea bolilor foliare la legume și pomi fructiferi, prin activarea sistemică a rezistenței plantelor de cultură, deci și compușii separați prin precipitare cu alcool din soluția rezultată după extracție hidrolitică, care conțin β -oligozaharide, obținuți prin procedeul descris mai sus, care au o activitate biologică similară, de elicitori ai răspunsului de apărare/rezistenței sistemice la plante, pot fi utilizați ca bio-fungicide, pentru protecția plantelor de cultură, în special a legumelor și a pomilor fructiferi, și inclusiv a plantelor aromatice.

Materialul vegetal M1, separat în etapa anterioară, se trece într-un vas de teflon de 3 l, proiectat pentru a fi rezistent la presiuni ridicate. Peste materialul vegetal M1 se adaugă alcool izopropilic, în raport de 2 părți alcool izopropilic la 1 parte material vegetal. Vasul de teflon se închide și se montează într-un reactor cu microunde (Minilabotron 2000, Sairem, Neyron, Franța). Se încălzește timp de 20 min în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500 W, la temperaturi de maximum 92°C . Se separă, prin filtrare, faza lichidă de materialul M2. Se concentrează sub vid, într-un evaporator rotativ, cu flacon de 3 l (Rotavapor® R-3, Buch Labortechnik AG, Flawil, Elveția). Uleiul obținut se recuperează, se usucă pe sulfat de sodiu anhidru, și se păstrează la 4°C până la utilizare.

În paralel, s-a extras o probă din același material, în raport de 1 parte material cu 2 părți izopropanol, într-un flacon Erlenmeyer din sticlă pyrex cu dop de cauciuc silionic, agitat cu agitator magnetic și menținut la 40°C timp de 20 min. Extracțiile s-au repetat de trei ori pentru fiecare tip de procedeu de extracție, folosind material cu aceleași caracteristici.

Randamentele de extracție au fost de $1,4 \pm 0,1 \text{ g}$ ulei la 100 g de părți aeriene uscate de *E. arvense*, în cazul extracției asistate de microunde, și de $0,8 \pm 0,3 \text{ g}$ ulei la 100 g de material uscat, în cazul extracției prin agitare cu solvenți. Creșterea cu peste 20% a randamentului de extracție în cazul procedurii asistate de microunde este asigurată statistic.

Din uleiurile provenite prin aplicarea procedurii de extracție asistat de microunde și prin agitare termostată, au fost prelevate probe care au fost analizate prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă (GC-MS/MS), folosind un sistem Agilent 7890 A/B GC 7000 C triplu quad MS/MS Bundle 11-134 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SUA). S-a folosit o coloană Agilent J&W DB-1ms Ultra Inert $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m}$ grosime film. Condițiile de operare au fost următoarele: volumul split-less injectat a fost de $1 \text{ }\mu\text{l}$, gazul purtător heliu, 40 cm/s , temperatura cuptorului: 62°C pentru 12,5 min, creștere cu 3°C/min până la 92°C , apoi cu 5°C/min până la 165°C , apoi cu 100°C/min până la 310°C , 2,5 min menținere, temperatura sursei MSD de 300°C , temperatura quadrupolului de 180°C , linia de transfer la 280°C . Interpretarea spectrelor și identificarea compușilor s-a realizat prin folosirea bibliotecii de spectre NIST 08.

RO 130242 B1

1 Rezultatele obținute în urma analizei probelor provenite din procedeul de extracție
a uleiurilor asistat de microunde, descris mai sus, și cel standard, de extracție prin agitare
3 cu solvenți, sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos. În acest tabel, sunt prezentate numai 15
5 componente din cele peste 25 identificate, componente care, împreună, reprezintă peste
7 90% din uleiul separat. Rezultatele arată că, pe lângă randamentul superior, procedeul de
9 extracție asistat de microunde determină și o mai bună menținere în uleiurile extrase a unor
11 componente cu sensibilitate la oxidare, cum sunt, de exemplu, (apo)carotenoizii-geranil-
13 acetonă, trans- β -lononă, trans- α -lononă).

Tabelul 1

11 *Valorile medii (mg/100 g) ale componentelor majore ale uleiului extras după încălzire*
13 *asistată de microunde, conform procedurii descris în invenție, și prin extracție*
cu agitare în solvenți

Componentă	Asistat microunde	Agitare solvenți
Hexahidrofarnesil acetonă	256,8 \pm 0,08	146,7 \pm 0,32
cis-Geranil acetonă	192,4 \pm 0,12	85,1 \pm 0,24
Timol	169,3 \pm 0,47	88,7 \pm 1,82
trans-Fitol	140,8 \pm 0,52	80,2 \pm 1,78
trans- β -lononă	93,1 \pm 0,08	44,1 \pm 0,02
Cariofilen oxid	84,1 \pm 0,04	47,5 \pm 0,03
β -Cariofilen	76,6 \pm 0,12	43,2 \pm 0,24
1,8-Cineol	72,7 \pm 0,06	41,3 \pm 0,02
trans, trans-Farnesil-acetonă	57,1 \pm 0,07	32,6 \pm 0,03
trans- α -lononă	38,9 \pm 0,02	17,3 \pm 0,01
linalool	38,8 \pm 0,04	24,7 \pm 0,03
1,3-propanedil ester	24,1 \pm 0,03	14,6 \pm 0,02
Nonanal	21,1 \pm 0,02	12,3 \pm 0,01
15-Octadecenal	17,4 \pm 0,04	9,7 \pm 0,03
Bornil acetate	15,5 \pm 0,03	8,6 \pm 0,02

31 Evaluarea organoleptică a extractelor realizate din părțile aeriene uscate de *E.*
33 *arvensis* nu a dus la evidențierea unor diferențe sesizabile între uleiul extras prin antrenare
cu solvenți și cel obținut prin extracție asistată de microunde, conform procedurii descris
mai sus.

35 Din materialul M2 se realizează o extracție hidrotermală asistată de microunde a
37 proteinelor. Materialul vegetal M2 se trece într-un vas de teflon de 5 l, proiectat pentru a fi
39 rezistent la presiuni ridicate. Peste materialul vegetal M2 se adaugă apă distilată, în raport
de 4 părți apă distilată la 1 parte material vegetal. Se încălzește timp de 25 min în câmp
incremental de microunde, de la 400 la 500 W, la temperaturi de maximum 150°C.

41 Amestecul se răcește, iar filtratul F3 se separă, prin filtrare, de materialul M3. Din
43 filtratul F3 se usucă, prin pulverizare, proteinele extrase, folosind un uscător prin pulverizare
de mici dimensiuni (Niro Minor Unit™, GEA Process Engineering A/S, Søborg, Danemarca),
la o temperatură maximă de intrare de 160...170°C și o temperatură de ieșire de 75...80°C.

RO 130242 B1

În materialul vegetal M2 s-a determinat conținutul de proteină prin metoda Kjeldahl, după mineralizare cu acid sulfuric. Materialul vegetal M2 conține 12,8% proteină. Din 870 g material M2 (substanță uscată) s-au extras, prin procedeul descris mai sus, 84,3 g proteină, corespunzând unui randament de extracție de 75,7%. Proteina din *Equisetum* are o valoare biologică ridicată pentru păsări, în special găște (Thomas și Prevett, 1982, *Oecologia* 53: 359-363), și prezintă proprietăți anti-proliferative și imunostimulatoare (Yukitake și Yamamoto, 2011, *J. Anal. Bio-Sci.*, 34:339-344).

Materialul vegetal ne-extras M3, separat prin filtrare în etapa anterioară, și care este 785 g, se trece într-un vas de reacție de 25 l Simax® (Kavalier) și se tratează cu 15,7 l lichid ionic, sare de etil-sulfat a 1-etil-3-metilimidazoliu (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Germania). Din vasul de reacție se trece continuu, cu o pompă peristaltică, printr-un reactor de sticlă pyrex montat în flux în câmpul de microunde al unui reactor cu microunde (Minilabotron 2000, Sairem), timp de 6 min, la o putere de 300 W și la o temperatură de 85°C. Suspensia de material vegetal, încălzită la 85°C, se omogenizează într-un omogenizator cu piston, GEA Niro Soavi Arriete NS2006 (GEA Niro Soavi, Parma, Italia), prevăzut cu o valvă tip „muchie de cuțit”, 25 cicluri la 150 MPa.

Polizaharidele solubilizate și/sau suspendate se separă de materialul lignocelulozic recalcitrant la solubilizare M4 prin filtrare tangențială pe un echipament Sartocon® care conține cartușe de filtrare Slice Hydrosart® (Sartorius, Goettingen, Germania). Din filtratul F4 se separă prin centrifugare continuă concentratul de nanoceluloză, prin centrifugare pe o centrifugă continuă model SA 1-02-175 (GEA Westfalia), care este operată la o viteză a discurilor de centrifugare de 10000 rpm, echivalent a 8500 x g. Din supernatant se precipită polizaharidelor, prin adăugare de alcool etilic 96%, în raport de 10 volume alcool etilic 96% la 1 volum supernatant. Polizaharidele precipitate se recuperează prin centrifugare, iar recuperarea azeotropului etanol-apă 96% și a lichidului ionic se realizează prin folosirea unui Evaporator 25 l/h Simax® (Kavalier).

Se separă 55,2 g de nanoceluloza și 85,4 g de polizaharide solubile. Nanoceluloza obținută conform procedurii de mai sus a fost caracterizată prin spectrometrie IR cu transformantă Fourier, pe un spectrometru Tensor 27 (Bruker, Billerica, MA, SUA), și prin difracție de raze X pe un difractometru D8 Advance (Bruker), folosind CuKa cu o lungime de undă de 0,154 nm în domeniul 2θ - 10...40%, la o tensiune de 40 kV și un curent de 40 mA. Cristalinitatea s-a calculat prin metoda Segal et al., 1959, *Text. Res. J.* 29:786-794. Dimensiunile nanocelulozei au fost determinate prin microscopie electronică, prin folosirea unui crio-TEM Hitachi HT 7700 (Hitachi, Tokyo, Japonia), operat la 120 kV. Banda de absorbție de la 1734 cm^{-1} , atribuită grupărilor C=O din lignină și hemiceluloze, nu mai este prezentă în probele de nanoceluloză obținute, care poate fi considerată ca fiind pură. Cel mai mare procentaj al diametrului și raportului de aspect l/d pentru nanoceluloza obținută conform procedurii descris mai sus este 20...30, cu o frecvență a diametrului de 68% și cu o frecvență a raportului de aspect l/d de 55%. Cristalinitatea a fost determinată a fi de 72,54%. Aceste date arată că nanoceluloza fibrilată obținută prin procedeul descris mai sus poate fi utilizată cu bune rezultate ca agent de ranforsare a bio(nano)compozitelor.

Polizaharidele solubile precipitate cu etanol au fost analizate prin folosirea de enzime specifice, conform metodei Navarro et al. 2010, *Microb, cell factor.* 9:58. S-a determinat o proporție de 24% pectină, 48% hemiceluloze și 28% (oligo)celuloză solubilă. Aceste polizaharide solubile sunt utilizabile ca aditivi alimentari sau suplimente nutritive (fibre solubile).

Materialul lignocelulozic recalcitrant M4 se convertește în bio-cărbune și bio-ulei, prin piroliză asistată de microunde. Tratamentul cu microunde se realizează folosind un reactor cu microunde (Minilabotron 2000, Sairem), cu un modul de vacuum amplasat în serie (VA 2000, Milestone, Sorisole, Italia), după o trapă de vacuum răcită cu apă pentru colectarea și condensarea vaporilor produși în timpul pirolizei. 500 g de material lignocelulozic

RO 130242 B1

1 recalitrant se introduc într-un reactor de sticlă pirex de 3 l. Se expune materialul vegetal la
o putere incidentă constantă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub
3 vacuum, care inițial este de 30 mbar, și care crește până la 0,3 bari la punctul maxim de
încălzire. Se obține o cantitate de 174,4 g bio-cărbune, corespunzând unei conversii de
5 34,4% în bio-cărbune, și de 137,3 g bio-ulei, corespunzând unei conversii de 28,7% a mate-
rialului vegetal inițial în bio-ulei.

7 Bio-cărbunele rezultat prin aplicarea procedurii de mai sus a fost analizat conform
EBC (2012), „**European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production
9 of Biochar.**”, **European Biochar Foundation (EBC), Arbaz, Switzerland.**
<http://www.european--biochar.org/en/download.>, Version 4.7 of 18th October 2013. Pro-
11 bele au fost analizate din punct al vedere al conținutului de apă, conform DIN 51718, cu un
aparat HR 73 Halogen Moisture Analyzer (Metler Toledo, Columbus, OH, SUA), conținutul
13 de cenușă după carbonizare la 550°C, prin analogie cu prevederile standardului de analiză
DIN 51719/EN 14775, conținutul de carbon, hidrogen, azot, sulf și oxigen (calculat), conform
15 metodelor standard de analiză DIN 51732, DIN 51732, DIN 51724-3, respectiv DIN 51733,
prin folosirea unui aparat de analiză elementală 2400 series II CHNS/O Analyzer (Perkin
17 Elmer, Waltham, MA, SUA), elementele potențial toxice și microelementele, respectiv Pb,
Cd, Cu, Ni, Hg, Zn, Cr, B, Mn, după digestie cu microunde conform EN ISO 17294-2 /EN
19 1483, utilizând un digester cu microunde Speed Vave (Bergoff, Eningen, Germania) și un
spectrometru ICP-OES Optima 2100 (Perkin Elmer), elementele principale, P, Mg, Ca, K, Na,
21 Fe, S, conform EN ISO 11885/EN ISO 17294-2, hidrocarburile policiclice aromatice conform
EN 15527, după extracție cu toluen, prin gaz-cromatografie cuplată cu spectrometrie de
23 masă, folosind sistem Agilent 7890 A/B GC 7000 C triplu quad MS/MS Bundle 11-134
(Agilent Technologies), valoarea pH conform metodei standard DIN ISO 10390 (CaCl₂),
25 folosind un aparat multiparametric C932 T (Consort, Turnhout, Belgia), suprafața specifică
conform metodei BET (Brunauer, Emmett and Teller) conform ISO 9277 folosind un analizor
27 Gemini 2375 (Micromeritics, Norcross, GA, SUA).

29 Rezultate obținute sunt prezentate în tabelul 2, comparativ cu valorile stabilite de
European Biochar Foundation (EBC) pentru bio-cărbunele din categoria premium. Aceste
rezultate demonstrează că bio-cărbunele obținut prin aplicarea procedurii conform invenției,
31 prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalitrant, se încadrează
în categoria premium stabilită de EBC.

33 Bio-cărbunele astfel obținut reprezintă un ameliorator de sol. Bio-cărbunele aplicat
ca ameliorator de sol reprezintă o formă durabilă de stocare a carbonului în sol, care deter-
35 mină o serie de efecte benefice din punct de vedere al mediului (de exemplu reducerea
spălării și levigării produselor agrochimice din sol) și al producțiilor agricole (**Xu et al., 2012.**
37 **CLEAN-Soil, Air, Water, 40(10), 1093-1098**), inclusiv datorită creșterii rezistenței la secetă
(**Kammann et al., 2011. Plant and Soil, 345: 195-210**) și activării rezistenței plantelor
39 (**Elad et al., 2010,. Phytopathology, 100: 913-921**).

41 *Tabelul 2*

43 *Parametrii de calitate ai bio-cărbunelui obținut prin aplicarea procedurii conform
invenției, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalitrant
provenit din E. arvense*

45 Caracteristică calitate	Limite Euro-Char premium	Bio-cărbune conform procedeu
Umiditate	< 5%	4,07%
47 Carbon total	> 50%	59,2%
Carbon organic	10...40%	37,7%

Tabelul 2 (continuare)

Caracteristică calitate	Limite Euro-Char premium	Bio-cărbune conform procedeu	
Raport molar H/C	< 0,6	0,48	3
Raport molar H/O	< 0,4	0,32	
Elemente nutritive	1...40%	5,51%	5
P		2,14%	
Mg		0,48%	7
Ca		0,87%	
K		1,52%	9
Fe		0,02%	
S		0,48%	11
Metale grele/microelemente			
Pb	Pb < 120 g/tSU;	27,3 ± 1,9	13
Cd	Cd < 1 g/t SU;	0,43 ± 0,08	
Cu	Cu < 100 g/t SU;	12,8 ± 1,7	15
Ni	Ni < 30 g/t SU;	6,8 ± 0,9	
Hg	Hg < 1 g/t SU;	0,06 ± 0,01	17
Zn	Zn < 400 g/t SU;	282,2 ± 17,3	
Cr	Cr < 80 g/t SU	37,8 ± 4,21	19
Suprafață specifică	> 150 m ² /g	298 m ² /g	
pH	< 10	8,2	21

Bio-uleiul rezultat prin aplicarea procedurii conform invenției a fost analizat conform următoarelor metode: conținutul de cenușă a fost determinat conform procedurii ASTM D 482-80 pentru produsele petroliere. Conținutul de solide a fost determinat ca material insolubil în etanol, conform metodei Millipore de filtrare (No. 4, Whatman). pH-ul a fost determinat cu un electrod de sticlă și un aparat C932 T (Consort). Conținutul de minerale în bio-ulei a fost determinat spectrometru ICP-OES Optima 2100 (Perkin Elmer). Valoarea calorică a fost măsurată folosind o bombă calorimetrică Parr 1341 Oxygen (Parr Instrument Co., Moline, IL, SUA). Raportul elementelor (C/H/N/O/S) a fost determinat prin folosirea unui aparat de analiză elementală 2400 series II CHNS/O Analyzer (Perkin Elmer). Apa în bio-ulei a fost determinată prin folosirea unui Titrator Karl Fischer titrator (Schott, Mainz, Germany; ASTM D 1744).

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3 de mai jos, comparativ cu valorile uzuale ale bio-uleiului convențional.

Caracteristicile fizico-chimice ale bio-uleiului obținut conform procedurii descrise, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant provenit din *E. arvense*

Caracteristică	Unitate măsură	Bio-ulei cf. Ex.	Bio-uleiuri convenționale *
pH		2,92	2,0...3,8
Umiditate	m%	15,8	15...30
Densitate la 20°C	g/mk	1,27	1,1...1,4
Valoarea calorică	MJ/kg	18,12	15...19
Compoziție elementală	m%		
C		60,33	55,3...63,5
H		6,43	5,2...7,0
N		0,08	0,07...0,39
S		0,04	0,00...0,05
Conținut cenușă	m%	0,12	0,03...0,30
Conținut solide	m%	0,25	< 1

*Date din Yu et al., 2007, Appl. Biochem. Biotech. 136-140:957-970

Bio-uleiul obținut conform procedurii descrise, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant provenit din *E. arvense*, este similar altor tipuri de bio-ulei.

Bio-cărbunele obținut se răcește la temperatura camerei prin purjare cu azot, și se trece într-un vas Simax (Kavalier) de 5 l. 500 g de bio-cărbune se tratează cu 1500 g soluție alcalină 1 M NaOH, în raport de 1 parte bio-cărbune la 3 părți soluție alcalină. Se agită timp de 30 min și apoi se separă bio-silicea solubilizată de bio-cărbune prin filtrare. Bio-silicea mezoporoasă se sintetizează din bio-siliciul solubilizat, după reducerea pH-ului soluției alcaline de bio-siliciu la valoarea 9,0 cu o soluție de acid fosforic 1 M. Se formează un silicat care conține $\text{SiO}_2:0,225 \text{ mol/l}$, $\text{Na}_2\text{O}:0,087 \text{ mol/l}$. La 100 g din soluția acestui silicat se adăugă 1 g polietilenglicol cu masa moleculară de 20 KDa (Bioultra 20,000, Sigma Aidrich). După omogenizarea soluției, pH-ul se reduce treptat la valoarea 4,8, prin adăugare unor volume mici de acid fosforic 1 M, timp de 30 min. După atingerea acestei valori de pH de 4,8, se așteaptă finalizarea precipitării silicei mezoporoase, timp de 15 min.

Silicea mezoporoasă se recuperează prin centrifugare la 8000 g, pe o centrifugă Eppendorf 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, Germani) și se usucă într-un cuptor cu microunde timp de 15 min. Silicea nano-poroasă se calcinează mezoporoasă la 500°C timp de 1 h, într-un cuptor L1003 (Caloris, București, România).

Silicea mezoporoasă obținută a fost caracterizată prin determinarea suprafeței specifice și prin determinarea spectrelor IR cu transformantă Fourier. Suprafața specifică s-a determinat conform metodei BET (Brunauer, Emmett and Teller), folosind un analizor Gemini 2375 (Micromeritics, Norcross, GA, SUA). Spectrele FTIR s-au realizat pe un spectrometru Tensor 27 (Bruker, Bilerica, MA, SUA). Suprafața specifică pentru silicea mezoporoasă a fost determinată a fi de 752,3 m²/g, iar spectrul FTIR prezintă benzile caracteristice silicei.

Exemplul 2

Se realizează procedeul conform invenției, ca în exemplul descris mai sus, folosindu-se 1000 g de tărâțe de grâu, cu singura diferență că în etapa de extragere a uleiurilor din materialul M1 se folosesc 3 părți de alcool izopropilic la 1 parte material vegetal.

RO 130242 B1

În prima etapă se separă 87 g de compuși formați prin hidroliza enzimatică a materialului vegetal, prin precipitarea oligozaharidelor din filtratul F1. Analizele conținutului de polifenoli (echivalent acid ferulic) și a activității antioxidante din concentrat au relevat un conținut de $12,5 \pm 0,8$ mg/g fenoli totali, din care $5,6 \pm 0,3$ mg/g flavonoide totale, cu o activitate antioxidantă de 0,94 mM echiv. trolox, per gram de substanță uscată de material, comparativ cu $1,3 \pm 0,2$ mg/g fenoli totali, din care $0,8 \pm 0,1$ mg/g flavonoide totale, cu o activitate antioxidantă de 0,08 mM echiv. trolox, per gram de substanță uscată de material, în cazul extragerii cu o soluție hidroalcoolică. Creșterea semnificativă a fenolilor extrași din târâțele de grâu prin procedeul de extragere enzimatic propus prin prezenta invenție se datorează eliberării unor compuși fenolici, care, în mod uzual, sunt legați de matricea polizaharidică a târâțelor de grâu (Piironen et al., 2009, în K. Khalil, P. R. Shewry (Eds.), *Wheat: Chemistry and Technology*, AACC International, St. Paul, pp. 179-222).

O doză de 125 μ g/ml oligozaharide, precipitate cu etanol din filtratul F1, a determinat o alcalinizare de 1,8 unități pH, similară cu cea produsă de 100 μ g/ml laminarină.

În cazul extracției uleiului, randamentele de extracție au fost de $7,8 \pm 1,2$ g ulei la 100 g de târâțe, în cazul extracției asistate de microunde, și de $5,6 \pm 0,4$ g ulei la 100 g de material uscat, în cazul extracției prin agitare cu solvent. Creșterea cu peste 35% a randamentului de extracție în cazul procedurii asistate de microunde este asigurată statistic. În uleiul obținut s-a determinat indicele de refracție (ISO 6320:2000), indicele de aciditate (ISO 660:2009) și indicele de peroxid (ISO 3960:2007), rezultatele obținute fiind similare cu cele raportate pentru uleiul de târâțe de grâu obținut prin extracția cu bioxid de carbon supercritic (Jung, et al. 2012, *J. Ind. Eng. Chem.*, 18: 360-363).

În materialul vegetal M2 s-a determinat conținutul de proteină prin metoda Kjeldahl, după mineralizare cu acid sulfuric. Materialul vegetal M2 conține 13,2% proteină. Din 852 g material M2 (substanță uscată) s-au extras, prin procedeul descris mai sus, 80,7 g proteină, corespunzând unui randament de extracție de 71,7%. Proteina din târâțele de grâu are o valoare biologică ridicată, recuperarea ei având un semnificativ potențial comercial (Aprich, et al., 2014. *LWT-Food Sci. Techn.*, 56: 222-231).

S-au separat 64,2 g de nanoceluloză și 92,5 g de polizaharide solubile. Nanoceluloza obținută a fost caracterizată conform metodelor descrise mai sus. Banda de absorbție de la 1734 cm^{-1} , atribuită grupărilor C=O din lignină și hemiceluloze nu mai este prezentă în probele de nanoceluloză obținute, care poate fi considerată ca fiind pură. Cel mai mare procentaj al diametrului și raportului de aspect l/d pentru nanoceluloza obținută conform procedurii descris mai sus este 20...30%, cu o frecvență a diametrului de 64% și a raportului de aspect l/d de 62%. Cristalinitatea a fost determinată a fi de 78,54%. Aceste date arată că nanoceluloza fibrilată, obținută prin procedeul descris, din târâțe de grâu, poate fi utilizată ca agent de ranforsare a bio(nano)compozitelor.

Polizaharidele solubile precipitate cu etanol au fost analizate prin folosirea de enzime specifice, conform metodei Navarro et al. 2010, *Microb, cell factor*. 9:58. S-a determinat o proporție de 20% pectină, 57% hemiceluloze și 23% celuloză solubilă. Aceste polizaharide solubile sunt utilizabile ca aditivi alimentari sau suplimente nutritive (fibre solubile).

Prin piroliza asistată în bio-cărbune și bio-ulei a materialului lignocelulozic recalcitrant M4, provenit din târâțele de grâu, se obține o cantitate de 174,5 g de bio-cărbune, corespunzând unei conversii de 34,9% în bio-cărbune, și de 133,6 g bio-ulei, corespunzând unei conversii de 27,1% a materialului vegetal inițial în bio-ulei.

RO 130242 B1

Tabelul 4

Parametrii de calitate ai bio-cărbunelui obținut prin aplicarea procedurii conform invenției, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant, provenit din tărâțe de grâu

Caracteristică calitate	Limite Euro-Char premium	Bio-cărbune conform procedeu
Umiditate	< 5%	4,17%
Carbon total	> 50%	56,4%
Carbon organic	10...40%	38,3%
Raport molar H/C	< 0,6	0,44
Raport molar H/O	< 0,4	0,34
Elemente nutritive	1-40%	5,82%
P		2,41%
Mg		0,46%
Ca		0,92%
K		1,56%
Fe		0,03%
S		0,44%
Metale grele/microelemente		
Pb	Pb < 120 g/t SU;	29,4 ± 1,6
Cd	Cd < 1 g/t SU;	0,53 ± 0,07
Cu	Cu < 100 g/tSU;	14,6 ± 1,9
Ni	Ni < 30 g/t SU;	7,6 ± 0,8
Hg	Hg < 1 g/t SU;	0,05 ± 0,01
Zn	Zn < 400 g/tSU;	274,6 ± 16,8
Cr	Cr < 80 g/t SU	38,4 ± 4,12
Suprafață specifică	> 150 m ² /g	306 m ² /g
pH	<10	8,3

Tabelul 5

Caracteristicile fizico-chimice ale bio-uleiului obținut conform procedurii descrise, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant, provenit din tărâțe de grâu

Caracteristică	Unitate măsură	Bio-ulei cf. Ex.	Bio-uleiuri convenționale *
pH		3,2	2,0...3,8
Umiditate	m%	16,3	15...30
Densitate la 20°C	g/mk	1,22	1,1...1,4
Valoarea calorică	MJ/kg	18,24	15...19

Tabelul 5 (continuare)

Caracteristică	Unitate măsură	Bio-ulei cf. Ex.	Bio-uleiuri convenționale *
Compoziție elementală	m%		
C		60,66	55,3...63,5
H		6,32	5,2...7,0
N		0,05	0,07...0,39
S		0,03	0,00...0,05
Conținut cenușă	m%	0,07	0,03...0,30
Conținut solide	m%	0,22	< 1

*Date din Yu et al., 2007, Appl. Biochem. Biotech. 136-140:957-970

Bio-cărbunele și bio-uleiul rezultate au fost analizate conform metodelor deja descrise mai sus, pentru a se stabili conformitatea caracteristicilor acestora cu cele ale altor produse similare, obținute prin diverse procedee. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 4 și 5. Bio-cărbunele rezultat îndeplinește condițiile de utilizare ca ameliorator de sol, iar bio-uleiul corespunde caracteristicilor combustibilului de focar.

Din bio-cărbune din tărâțe se obține o mezosilice poroasă care are o suprafață specifică de 790,7 m²/g, spectrul FTIR prezentând benzile caracteristice silicei (mezoporoase).

Procedeul descris conform invenției se poate utiliza și pentru alte tipuri de material vegetal provenit din alte plante care acumulează siliciu, respectiv alte monocotiledonate (cereale, în special) și subproduse ale industrializării lor (diferite tipuri de tărâțe, paie, borhot de distilieri de la fabricarea etanolului ș.a.m.d.), biomasă de plante aromatice, și în special cârciumareasă (*Zinnia elegans*), salvie (*Salvia x sylvestris*) și rozmarin (*Rosmarinus officinalis*), care au un conținut ridicat de uleiuri volatile și polifenoli anti-oxidanți, și un conținut ridicat de siliciu (Hogendorp et al., 2012, Hortscience 47:1593-1595, 2012), urzică, și alte ferigi care acumulează siliciu. Din materialul vegetal provenit de la aceste plante care acumulează siliciu se pot extrage, prin procedeul propus, diferitele componente care au o valoare adăugată semnificativă, care permite recuperarea costurilor investiționale necesare ridicării la scară a procedurii.

RO 130242 B1

Revendicări

1

3 1. Procedeu de extracție secvențială a materialului vegetal cu conținut semnificativ
5 de siliciu, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: extracția enzima-
7 tică, asistată de ultrasunete, a agliconilor din conjugatele glicozidice, a materialului vegetal
9 uscat și măcinat provenit din plante cu un conținut ridicat de siliciu, cu separarea prin filtrare
11 a unui filtrat F1, care conține β -oligozaharide cu acțiune de elicatori/activatori ai rezistenței
13 sistemice în plante și agliconi antioxidanți, și a materialului vegetal M1; precipitarea β -oligo-
15 zaharidelor din filtratul F1 și concentrarea compușilor antioxidanți; extracția uleiurilor prin
17 încălzire în câmp de microunde a materialului vegetal M1 în prezență de izopropanol, cu for-
19 marea extractului uleios F2 și a materialului M2; extracția hidrotermală asistată de microunde
21 a proteinelor din materialul M2, separarea prin filtrare a filtratului F3 de materialul M3, și
23 uscarea prin pulverizare a proteinelor extrase în filtratul F3; extracția pectinei, hemicelulozei
și celulozei ușor solubile din materialul vegetal M3, prin amestecare cu lichide ionice și
25 încălzire în câmp de microunde, urmată de omogenizarea la înaltă presiune pentru suspen-
27 darea nano-celulozei; separarea prin filtrare tangențială a filtratului F4, cu polizaharide solu-
29 bilizate și/sau suspendate, de materialul lignocelulozic recalcitrant M4, separarea prin
centrifugare a nano-celulozei și precipitarea cu alcool etilic a polizaharidelor solubile;
31 conversia materialului lignocelulozic recalcitrant M4 în bio-cărbune și bio-ulei; extracția bio-
siliciului din bio-cărbune cu soluții alcaline, sinteza bio-silicei mezoporoase din bio-siliciul
solubilizat pe o matriță de polietilenglicon, recuperarea bio-silicei mezoporoase prin
centrifugare și calcinarea ei.

23 2. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extracția enzimatică,
asistată de ultrasunete, a agliconilor antioxidanți din materialul vegetal uscat și măcinat până
25 la o granulație de 20 mesh/0,85 mm este realizată prin tratare, timp de 4 h, a 1 parte de
material vegetal cu 25 părți soluție de alcool etilic 30% în apă, conținând 1,5 mg/ml complex
27 de hidrolaze produs de *Trichoderma viride*, cu 200 unități β -glucan *Botrytis* per g, la pH 5,
temperatura de 50°C, cu ultrasonicare intermitentă, 5 min la fiecare 30 min, la 20 kHz și cu
29 o putere de 500 W, urmată de separarea prin filtrare a materialului vegetal neextras M1 de
extractul hidro-alcoolic F1.

31 3. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extracția uleiurilor
din materialul vegetal M1, umectat și micronizat, se efectuează prin încălzire timp de 20 min
33 în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500 W, la temperaturi de maximum 92°C,
în prezență de izo-propanol în raport de 2...3 părți la 1 parte de material vegetal M1, cu
35 formarea materialului M2 și recuperarea uleiurilor funcționale F2 din alcoolul izopropilic, prin
concentrare la sec sub vid.

37 4. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** precipitarea din
filtratul hidro-alcoolic F1 a oligozaharidelor, are loc prin adăugare de alcool etilic 96%, în
39 raport de 10 volume alcool etilic 96% la 1 volum filtrat, fiind urmată de concentrarea prin eva-
porare până la 20% substanță uscată a soluției alcoolice, cu recuperarea azeotropului
41 etanol-apă 96%.

43 5. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extracția hidroter-
mală asistată de microunde a proteinelor din materialul M2 este efectuată prin tratarea a 1
parte material M2 cu 4 părți apă distilată și încălzire timp de 25 min în câmp incremental de
45 microunde, de la 400 la 500 W, la temperaturi de maximum 150°C.

47 6. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** separarea a filtra-
tului F3 de materialul M3 se realizează prin filtrare, fiind urmată de uscarea prin pulverizare
a proteinelor extrase în filtratul F3, prin folosirea unui uscător prin pulverizare, la o tempera-
49 tură maximă de intrare de 170...175°C și o temperatură de ieșire de 75...80°C.

RO 130242 B1

7. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extracția pectinei și hemicelulozei din materialul vegetal M2 se face prin tratarea a 1 parte material M3 cu 20 părți lichid ionic, sare de etil-sulfat a 1-etil-3-metilimidazol, în câmp de microunde, timp de 6 min, la o putere de 300 W și la o temperatură de 85°C, urmată de omogenizarea sub presiune într-un omogenizator cu piston, 25 cicluri la 150 MPa, a amestecului material M3 - lichid ionic, pentru suspendarea nanocelulozei. 1
3
5
8. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** separarea filtratului F4, conținând polizaharide solubilizate și/sau suspendate, de materialul lignocelulozic recalcitrant la solubilizare M4 se realizează prin filtrare tangențială, fiind urmată de separarea prin centrifugare din filtratul F4 a fibrelor de nano-celuloză, și de precipitarea polizaharidelor solubile din supernatant, prin adăugare de alcool etilic 96%, în raport de 10 volume alcool etilic 96% la 1 volum supernatant, și recuperarea azeotropului etanol-apă 96% și a lichidului ionic prin distilare. 7
9
11
13
9. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** etapa de conversie în bio-cărbune și bio-ulei a materialului lignocelulozic recalcitrant M3, prin piroliza asistată de microunde se realizează la o putere incidentă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub vacuum, care inițial este de 30 mbar și care crește până la 0,3 bar la punctul maxim de încălzire. 15
17
10. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extracția bio-siliciului din bio-cărbune, răcit în prealabil la temperatura camerei prin purjare cu azot, se efectuează într-o soluție alcalină 1 M NaOH, în raport de 1 parte bio-cărbune la 3 părți soluție alcalină. 19
21
11. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** sinteza bio-silicei mezoporoase din bio-siliciul solubilizat, se realizează după reducerea pH-ului soluției alcaline de bio-siliciu la valoarea 9,0 cu o soluție de acid fosforic 1 M, pentru formarea unui silicat care conține $\text{SiO}_2:0,225 \text{ mol/l}$, $\text{Na}_2\text{O}:0,087 \text{ mol/l}$, prin adăugare de polietilenglicol cu masa moleculară de 20 KDa, în raport de 1 parte la 100 părți soluție, urmată de reducerea treptată a pH-ului la valoarea 4,8, prin adăugare de volume de 0,5 ml de acid fosforic 1 M timp de 30 min, cu finalizarea precipitării silicei mezoporoase timp de 15 min. 23
25
27
12. Procedeu, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** recuperarea bio-silicei mezoporoase se face prin centrifugare la 8000 g, uscarea în cuptorul cu microunde timp de 15 min, urmată de calcinarea bio-silicei mezoporoase la 500°C timp de 1 h. 29
31

