



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

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

(22) Data de depozit: **07.04.2014**

(41) Data publicării cererii:
29.05.2015 BOPI nr. **5/2015**

(71) Solicitant:
• 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

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

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de extracție secvențială a materialului vegetal cu conținut semnificativ de siliciu. Procedeuul conform invenției constă în extracția enzimatică a compușilor antioxidanți, cu separarea unui filtrat F1 și a unui material vegetal M1, care este supus extracției uleiurilor prin încălzire în câmp de microunde, în prezență de izopropanol, cu formarea extractului uleios F2 și a unui material vegetal M2, care este supus în continuare extracției hidrotermale a proteinelor, separarea unui material vegetal M3 și a filtratului F3, din care se usucă prin pulverizare

proteinele extrase; urmează extracția pectinei, hemicelulozei și celulozei ușor solubile din materialul vegetal M3, cu lichide ionice și în câmp de microunde, continuată de omogenizarea la înaltă presiune, pentru suspendarea nanocelulozei, separarea polizaharidelor solubilizate de materialul M4, care este transformat în bio-ulei și bio-cărbune, din care se recuperează silica mezoporoasă, prin calcinare.

Revendicări: 12



PROCEDEU DE EXTRAȚIE SECVENȚIALĂ A MATERIALULUI VEGETAL CU CONTINUT SEMNIFICATIV DE SILICIU

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 active prezente în respectivul material vegetal, inclusiv bio-silicea, pentru obținerea de compuși cu utilizări diverse, ca ingrediente active pentru produse cosmetice sau farmaceutice, aditivi alimentari sau furajeri, suplimente nutritive, produse pentru stimularea și/sau protecția plantelor cultivate, materii prime pentru diverse noi biomateriale și fertilizanți / amelioratori de sol.

Sunt cunoscute procedee care au ca scop valorificarea cât mai completă a diferiților compuși prezenți în materialul vegetal cu un conținut ridicat de siliciu, provenit din plante care acumulează siliciu, cum sunt de ex. cele din genul *Equisetum* (denumite popular coada-calului) sau din diferite subproduse de la industrializarea cerealelor (tărâțele de exemplu). Brevetul francez FR2610253 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 siliciu și prin prezența complexele $\text{Si}(\text{OR})_4$ 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. 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 prin cererea de brevet RO 128904 A, care include următoarele etape: extracția materialului vegetal cu o soluție hidroalcoolică 40 - 46% etanol ÷ 60 - 54% apă timp de 10 zile, separarea resturilor de material 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 vegetal extras cu extractul hidro-alcoolic timp de 24 ore la temperatura 20...25°C; separarea prin filtrare a extractului hidroalcoolic cu microelemente (siliciu) din cenușă chelatare în ingredientele active extrase în soluția hidro-alcoolică, în care se regăsesc flavonele, zaharidele, acizii organici, vitaminele cu acțiune de complexare a siliciului.

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., 27, 461-467). Brevetul SUA 8 026 086 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-etanolul. Procedeu include următoarele etape: pre-tratamentul materialului vegetal silicios, pentru a obține o materie primă în care celuloza este expusă, hidroliza materialului vegetal cu celuloză expusă, sub acțiunea unor agenți biologici, pentru a forma glucide fermentescibile, care sunt transformate în bio-etanol, și un co-produs conținând bio-siliciu, care este separat de soluția alcoolică, purificat și transformat în bio-silice sau în alte produse cu aplicare practică conținând siliciu.

Brevetul SUA 7 364 640 B2 revendică un procedeu de desilicifiere a materialului vegetal fibros nelemnos, care include alcalinizarea materialului vegetal dezintegrat, până la solubilizarea 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 aplicații.

Cererea de brevet CN 102512461 A dezvăluie un procedeu de extracție a unor compuși cu siliciu din *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 pulverizare.

Brevetul 7 897 648 B2 descrie un procedeu de preparare a bioxidului de siliciu expandat (aerogel de siliciu) prin arderea tărâțelor de orez, dizolvarea cenușii rezultate cu o soluție de hidroxid de sodiu, cu formare de silicat de sodiu, adăugarea de acid sulfuric concentrat pentru precipitarea unui hidrogel de siliciu, înlocuirea apei din hidrogel cu vapori de alcool C1-C4, și uscarea alcoolgelului pentru generarea aerogelului de silice.

Astfel de procedee, de tipul celor descrise mai sus, nu recuperează și alți ingredientii activi prezenți în materialul vegetal silicios supus extracției. Cererea de brevet CN 103330724 A protejează un procedeu de extracție a flavonoidelor din *Equisetum hyemale*, care implică uscarea la umbră, măcinarea, sitarea, pe sită de 100 mesh, extracția cu eter de petrol a componentelor hidrofobe, extracția flavonoidelor din materialului 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 300-100W. Prin aplicarea procedeuului se recuperează flavonele totale, dar, deși sunt extrași compușii hidrofobi din materialul vegetal, nu sunt recuperate uleiurile esențiale, care au buna caracteristici de aromatizare și o semnificativă activitate anti-bacteriană (Radulovic

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 aditiv alimentari și/sau suplimente nutritive / fibre solubile, nanoceluloză, bio-silice mezoporoasă, bio-ulei și bio-cărbune.

Procedeele conform invenției este alcătuit din următoarele etape: extracția enzimatică asistată de ultrasunete a agliconilor din conjugatele glicozidice, din materialul vegetal uscat și măcinat, cu separarea prin filtrare a unui filtrat F1, care conține β -oligozaharide cu acțiune de elicitori / activatori ai rezistenței sistemice în plante și agliconi antioxidanți, și a materialului vegetal M1; precipitarea β -oligozaharidelor din filtratul F1 și concentrarea compușilor anti-oxidanți; extracția uleiurilor prin încălzire în 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 proteinelor 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 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 suspendarea nanocelulozei; separarea prin filtrare tangențială a filtratului F4, cu polizaharide solubilizate și/sau suspendate, de materialul lignocelulozic recalcitrant M4, separarea prin centrifugare a nano-celulozei și precipitarea cu alcool etilic a polizaharidelor solubile; conversia materialului lignocelulozic recalcitrant M4 în biocărbune și bioulei; extracția biosiliciului din biocărbune cu soluții alcaline, sinteza biosilicei mezoporoase din biosiliciul solubilizat pe o matriță de polietilenglicon, recuperarea biosilicei mezoporoase prin centrifugare și calcinarea acesteia.

Aspectele preferate ale procedeei descris mai sus sunt:

- ✓ 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 ore 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 Botrytis per g, la pH 5, temperatura de 50°C, cu ultrasonicare intermitentă, 5 min la fiecare 30 min, la 20 kHz și

putere de 500 W, urmată de separarea prin filtrare a materialului vegetal ne-extras M1 de extractul hidro-alcoolic F1.

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

✓ 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 evaporare până la 20% substanță uscată a soluției alcoolice, cu recuperarea azeotropului etanol-apă 96%;

✓ 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 incremental de microunde, de la 400 la 500W, la temperaturi de max. 150°C;

✓ Separarea prin filtrare a filtratului F3 de materialul M3, și uscarea prin pulverizare 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;

✓ Extracția pectinei și hemicelulozei din materialul vegetal M2, prin tratarea 1 parte material M3 cu 20 părți lichid ionic, sare de etil-sulfat a 1-etil-3-metilimidazol, în câmp de micro-unde, 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;

✓ Separarea prin filtrare tangențială a filtratului F4, conținând polizaharide solubilizate 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 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;

✓ Conversia în bio-cărbune și bio-ulei a materialului lignocelulozic recalcitrant M3, prin piroliza asistată de micro-unde, la o putere incidentă de 1200 W și

frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub vacuum, care inițial este de 30 mbari, și care crește până la 0,3 bari la punctul maxim de încălzire.

- ✓ Extracția biosiliciului din biocărbune, răcit în prealabil la temperatura camerei prin purjare cu azot, într-o soluție alcalină 1 M NaOH, în raport de 1 parte biocărbune la 3 părți soluție alcalină,
- ✓ Sinteza biosilicei mezoporoase din biosiliciul solubilizat, după reducerea pH-ului soluției alcaline de biosiliciu 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;
- ✓ Recuperarea biosilicei mezoporoase prin centrifugare la 8.000 g, uscarea în cuptor cu microunde timp de 15 min, urmată de calcinarea biosilicei mezoporoase la 500°C timp de 1 oră.

Procedeul conform invenție prezintă următoarele avantaje:

- ✓ Asigură o recuperare complexă și completă a diferiților compuși utili din materialul vegetal, extracte de compuși anti-oxidanți, 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;
- ✓ 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;
- ✓ 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;
- ✓ Extrage pectinele, hemicelulozele și celuloza solubilă din materialul vegetal, care au utilizări ca aditivi alimentari și suplimente nutritive / fibre solubile;
- ✓ Produce celuloză nanofibrilată formată exclusiv din celuloză, cu utilizări în realizarea de materiale bio-compozite;
- ✓ Transformă lignoceluloza recalcitrantă în biocombustibil de focar (bio-ulei) și bio-cărbune;

- ✓ 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, șamd;
- ✓ 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;
- ✓ Permite obținerea unei întregi serii de bio-produse care sunt utilizabile ca input-uri 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.

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

Exemplu 1. 1000 g de părți aeriene uscate de coada-calului (*Lavandula angustifolia* Mill.) 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 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică, și un sistem de recirculare cu o celulă de flux 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 complex de hidrolaze produs de *Trichoderma viride*, cu minimum 200 unități β-glucan *Botrytis* per g.

Complexul de hidrolaze folosit este Glucanex 200 G (Novozyme A/S, Bagvaerd, Danemarca), un amestec de enzime litice din *Trichoderma harzianum*, care include celuloaze, 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, eliberează 1 mmol de grupări reducătoare carbohidrați (calculate ca glucoză) per min. Suspensia de material vegetal – soluție alcoolică - enzime este amestecată cu agitatorul la 25 rpm și încălzită până la 50°C. Intermitent, 5 min la fiecare 30 min, se trece cu un debit de 5 litri pe min prin celula de flux pe care este montată o sonotrodă UIP 1000 hd (Hielscher Ultrasonics), omogenizându-se amestecul la 20 kHz și cu o putere de 500 W. După 4 ore se separă materialului vegetal ne-extras M1 de extractul hidroalcoolic, prin filtrare pe un filtru cu 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 4 ore. Din extractul hidroalcoolic F1 se precipită oligozaharidelor, prin adăugare de alcool etilic 96%, în raport de 10 volume alcool etilic 96% la 1 volum filtrat, și se separă prin centrifugare 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 a discurilor de centrifugare de 10.000 rpm, echivalent a 8500 x g; la o rată de alimentare de 1 litru/min, cu separarea continuă a extractului hidro-alcoolic clarificat și discontinuă a concentratului 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 la 75°C. Se separă cca 85 g de compuși formați prin hidroliza enzimatică a materialului vegetal.

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

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

S-a determinat și activitatea anti-oxidantă echivalent trolox, prin folosirea metodei Re *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)].

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 20 mesh, în raport de 1 parte material vegetal la 50 părți soluție alcool etilic 30%, timp de 4 ore la 50°C. Rezultatele determinărilor au fost raportate per gram de material vegetal uscat.

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

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 ex, 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 digitala* (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 bofungicid 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 litri, 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 500W, la temperaturi de max. 92°C. Se separă prin filtrare faza lichidă de materialul M2. Se concentrează sub vid, într-un evaporator rotativ, cu flacon de 3 litri (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 siliconic, 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 $1,4 \pm 0,1$ g ulei la 100 g de părți aeriene uscate de *E. arvense*, în cazul extracției asistate de microunde, și de $0,8 \pm 0,3$ 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 asistat 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 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m grosime film. Condițiile de operare au fost următoarele: volumul split-less injectat a fost de 1 μ 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 minute menținere, temperatura sursei MSD 300°C, temperatura quadrupolului 180°C, linia de transfer la 280°C. Interpretarea spectrelor și identificarea compușilor s-a realizat prin folosirea bibliotecii de spectre NIST 08.

Rezultatele obținute în urma analizei probelor provenite din procedeu de extracție a uleiurilor asistat de microunde, descris mai sus, și cel standard, de extracție prin agitare cu solvenți, sunt prezentate în tab. 1 de mai jos. În acest tabel sunt prezentate numai 15 componente din cele peste 25 identificate, componente care împreună reprezintă peste 90% din uleiul separat. Rezultatele arată că, pe lângă randamentul superior, procedeu de extracție asistat de

microunde determină și o mai bună menținere în uleiurile extrase a unor componente cu sensibilitate la oxidare, cum sunt de exemplu (apo)carotenoizii – geranil-acetonă, trans- β -lononă, trans- α -lononă).

Tab.1. Valorile medii (mg/100g) ale componentelor majore ale uleiului extras după încălzire 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

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

Din material M2 se realizează o extracție hidrotermală asistată de microunde a proteinelor. Materialul vegetal M2 se trece într-un vas de teflon de 5 litri, proiectat pentru a fi 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 500W, la temperaturi de max. 150°C.

Amestecul se răcește și se separă prin filtrare filtratul F3 de materialul M3. Din 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.

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 grame proteină, corespunzând unui randament de extracție de 75,7%. Proteina din *Equisetum* are o valoare biologică ridicată pentru păsări, și 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 litri 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 Sartocor® 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 10.000 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 25l/h Simax® (Kavalier).

Se separă 55,2 grame de nanoceluloză și 85,4 grame 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, Bilerica, MA, SUA), și prin difracție de raze X pe un difractometru D8 Advance (Bruker), folosind CuK α cu o lungime de undă de 0,154 nm în domeniul 2 θ - 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 procedului 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 este 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 biocărbune 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 grame de material lignocelulozic recalcitrant se introduc într-un reactor de sticlă pirex de 3 litri. Se expune materialul vegetal la o putere incidentă constantă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub vacuum, care inițial este de 30 mbari, și care crește până la 0,3 bari la punctul maxim de încălzire. Se obține o cantitate de 174,4 g de biocărbune, corespunzând unei conversii de 34,4% în bio-cărbune și de 137,3 grame bio-ulei, corespunzând unei conversii de 28,7% a materialului vegetal inițial în bio-ulei.

Bio-cărbunele rezultat prin aplicarea procedurii de mai sus a fost analizat conform EBC (2012), „European Biochar Certificate - Guidelines for a Sustainable Production of Biochar.”, European Biochar Foundation (EBC),Arbaz,Switzerland. <http://www.european-biochar.org/en/download>., Version 4.7 of 18th October 2013. Probele 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 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 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 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 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, 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 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), folosind un aparat multiparametric C932 T (Consort, Turnhout, Belgia), suprafața specifică conform metodei BET (Brunauer, Emmett and Teller) conform ISO 9277 folosind un analizor Gemini 2375 (Micromeritics, Norcross, GA, SUA).

Rezultate obținute sunt prezentate în tab. 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, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant, se încadrează în categoria premium stabilită de EBC.

Biocărbunele astfel obținut reprezintă un ameliorator de sol. Biocărbunele aplicat ca ameliorator de sol reprezintă o formă durabilă de stocare a carbonului în sol, care determină o serie de efecte benefice din punct de vedere al mediului (de ex. reducerea spălării și levigării produselor agrochimice din sol) și al producțiilor agricole (Xu *et al.*, 2012. 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 (Elad *et al.*, 2010, Phytopathology, 100: 913-921).

Tab. 2. Parametrii de calitate ai bio-cărbunelui obținut prin aplicarea procedurii conform invenției, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant provenit din *E. arvense*.

Caracteristică calitate	Limite Euro-Char premium	Bio-cărbune conform procedeu
Umiditate	<5%	4,07%
Carbon total	>50%	59,2%
Carbon organic	10-40%	37,7%
Raport molar H/C	<0,6	0,48
Raport molar H/O	<0,4	0,32
Elemente nutritive	1-40%	5,51%
P		2,14%
Mg		0,48%
Ca		0,87%
K		1,52%
Fe		0,02%
S		0,48%
Metale grele / microelemente		
Pb	Pb < 120 g/t SU;	27,3±1,9
Cd	Cd < 1 g/t SU;	0,43±0,08
Cu	Cu < 100 g/t SU;	12,8±1,7
Ni	Ni < 30 g/t SU;	6,8±0,9
Hg	Hg < 1 g/t SU;	0,06±0,01
Zn	Zn < 400 g/t SU;	282,2±17,3
Cr	Cr < 80 g/t SU	37,8±4,21
Suprafață specifică	>150 m ² /g	298 m ² /g
pH	<10	8,2

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 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.

Tab. 3. Caracteristicile fizico-chimice ale bio-uleiului obținut conform procedurii descris, prin piroliza asistată de micro-onde 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 calorifică	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 descris, prin piroliza asistată de micro-onde a materialului lignocelulozic recalcitrant provenit din *E. arvense*, este similar altor tipuri de bio-ulei.

Biocărbunele obținut se răcește la temperatura camerei prin purjare cu azot, și se trece într-un vas Simax (Kavalier) de 5 litri. 500 g de biocărbune se tratează cu 1500 g soluție alcalină 1 M NaOH, în raport de 1 parte biocărbune la 3 părți soluție alcalină. Se agită timp de 30 min și apoi se separă biosilicea solubilizată de biocărbune prin filtrare. Biosilicea mezoporoasă se sintetizează din biosiliciul solubilizat, după reducerea pH-ului soluției alcaline de biosiliciu la valoarea 9.0 cu o soluție de acid fosforic 1 M. Se formează un silicat care conține SiO_2 :0,225 mol/l, Na_2O :0,087 mol/l. La 100 g din soluția acestui silicat se adăugă 1 g polietilenglicol cu masa moleculară de 20 KDa (Bioultra 20,000, Sigma Aldrich). După omogenizarea soluției se reduce treptat pH-ul 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 8.000 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 oră, 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 silice mezoporoasă a fost determinată a fi de 752.3 m²/g, iar spectrul FTIR prezintă benzile caracteristice silicei.

Exemplu 2. Se realizează procedeul conform invenției, ca în exemplu descris mai sus, folosindu-se 1000 grame de tărâțe de grâu, cu singura diferență că se folosesc în etapa de extragere a uleiurilor din materialul M1 3 părți de izopropilic la 1 parte material vegetal.

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 concentratul au relevat un conținut de 12,5±0,8 mg/g fenoli totali, din care 5,6±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±0,2 mg/g fenoli totali, din care 0,8±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 tărâțele de grâu prin procedeul de extragere enzimatic propus prin prezenta invenției se datorează eliberării unor compuși fenolici, care în mod uzual sunt legați de matricea polizaharidică a tărâțelor 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 μg/ml oligozaharide, precipitate cu etanol din filtratul F1, a determinat o alcalinizare de 1.8 unități pH, similară cu cea produsă de 100 μg/ml laminarină.

În cazul extracției uleiului randamentele de extracție au fost de 7,8±1,2 g ulei la 100 g de tărâțe, în cazul extracției asistate de microunde, și de 5,6±0,4 ulei la 100 g de material uscat, în cazul extracției prin agitare cu solvent. Creșterea cu

11

peste 35% a randamentului de extracție în cazul procedurii asistat 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 tărâțe 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 grame proteină, corespunzând unui randament de extracție de 71,7%. Proteina din tărâțele de grâu are o valoare biologică ridicată, recuperarea ei având un semnificativ potențial comercial (Apprich, et al., 2014. LWT-Food Sci. Techn., 56: 222-231).

S-au separat 64,2 grame de nanoceluloză și 92,5 grame 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 cu o frecvență 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 tărâțe 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 biocărbune și bio-ulei a materialului lignocelulozic recalcitrant M4 provenit din tărâțele de grâu se obține o cantitate de 174,5 g de biocărbune, corespunzând unei conversii de 34,9% în bio-cărbune și de 133,6 grame bio-ulei, corespunzând unei conversii de 27,1% a materialului vegetal inițial în bio-ulei.



Tab. 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/t SU;	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/t SU;	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

Tab. 5. Caracteristicile fizico-chimice ale bio-uleiului obținut conform procedurii descris, prin piroliza asistată de micro-unde 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 calorifică	MJ/kg	18,24	15–19
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

Biocărbunele și bio-uleiul rezultat au fost analizate conform metodelor deja descrise mai sus, pentru a se stabili conformitatea caracteristicilor lor 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 biocărbune din târâțe se obține o mezosilice poroasă care are o suprafață specifică de $790.7 \text{ m}^2/\text{g}$, 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 târâțe, paie, borhot de distilieri de la fabricarea etanolului samd), biomasă de plante aromatice, și în special cârciumăreasă (*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, alte ferigi care acumulează siliciu. Din materialul vegetal provenit de la aceste plante care acumelează 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 procedului.

Revendicări

1. Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: extracția enzimatică asistată de ultrasunete a agliconilor din conjugatele glicozidice, din materialul vegetal uscat și măcinat, cu separarea prin filtrare a unui filtrat F1, care conține β -oligozaharide cu acțiuni de elictori / activatori ai rezistenței sistemice în plante și agliconi antioxidanți, și a materialului vegetal M1; precipitarea β -oligozaharidelor din filtratul F1 și concentrarea compușilor anti-oxidanți; extracția uleiurilor prin încălzire în 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 proteinelor 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 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 suspendarea nano-celulozei; separarea prin filtrare tangențială a filtratului F4, cu polizaharide solubilizate și/sau suspendate, de materialul lignocelulozic recalcitrant M4, separarea prin centrifugare a nano-celulozei și precipitarea cu alcool etilic a polizaharidelor solubile; conversia materialului lignocelulozic recalcitrant M4 în biocărbune și bioulei; extracția biosiliciului din biocărbune cu soluții alcaline, sinteza biosilicei mezoporoase din biosiliciul solubilizat pe o matriță de polietilenglicon, recuperarea biosilicei mezoporoase prin centrifugare și calcinarea ei.

2. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** 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, este realizată prin tratare timp de 4 ore 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 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 vegetal ne-extras M1 de extractul hidro-alcoolic F1.

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 în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500W, la temperaturi de max. 92°C, în prezență de izo-propanol în raport de 2..3 părți la 1 parte de material vegetal M1, cu formarea materialului M2 și recuperarea uleiurilor funcționale F2 din alcoolul izopropilic, prin concentrare la sec sub vid.

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 raport de 10 volume alcool etilic 96% la 1 volum filtrat, fiind urmată de concentrarea prin evaporare până la 20% substanță uscată a soluției alcoolice, cu recuperarea azeotropului etanol-apă 96%.

5. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** extracția hidrotermală 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 microunde, de la 400 la 500W, la temperaturi de max. 150°C.

6. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** separarea a filtratului 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 temperatură maximă de intrare de 170..175°C și o temperatură de ieșire de 75..80°C.

7. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** extracția pectinei și hemicelulozei din materialul vegetal M2, se face prin tratarea 1 parte material M3 cu 20 părți lichid ionic, sare de etil-sulfat a 1-etil-3-metilimidazol, în câmp de micro-unde, 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.

8. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** separarea filtratului F4, conținând polizaharide solubilizate și/sau suspendate, de materialul lignocelulozic recalitrant la solubilizare M4 se realizează prin filtrare tangențială, fiind urmată de separarea prin centrifugare din filtratul F4 a fibrelor de nanoceluloză, 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.

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 micro-unde, 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 mbari, și care crește până la 0,3 bari la punctul maxim de încălzire.
10. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** extracția biosiliciului din biocărbune, răcit în prealabil la temperatura camerei prin purjare cu azot, se efectuează într-o soluție alcalină 1 M NaOH, în raport de 1 parte biocărbune la 3 părți soluție alcalină.
11. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** sinteza biosilicei mezoporoase din biosiliciul solubilizat, se realizează după reducerea pH-ului soluției alcaline de biosiliciu la valoarea 9.0 cu o soluție de acid fosforic 1 M, pentru formarea unui silicat care conține SiO_2 :0,225 mol/l, Na_2O :0,087 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.
12. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** recuperarea biosilicei mezoporoase se face prin centrifugare la 8.000 g, uscarea în cuptor cu microunde timp de 15 min, urmată de calcinarea biosilicei mezoporoase la 500°C timp de 1 oră.