



B01J 2/00 (2006.01),
C05G 5/00 (2006.01),
C05D 3/00 (2006.01),
C05D 3/04 (2006.01),
A01N 61/00 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00930**

(22) Data de depozit: **27/11/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/07/2019** BOPI nr. **7/2019**

(41) Data publicării cererii:

30/05/2017 BOPI nr. **5/2017**

(73) Titular:

• **HOFIGAL EXPORT - IMPORT S.A.**,
*INTRAREA SERELOR NR.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO*

(72) Inventatori:

• **MANEA ȘTEFAN**, *CALEA MOȘILOR
NR. 209, BL. 17, SC. A, ET. 2, AP. 6,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **NEGRU GEORGETA**, *STR. SOVEJA
NR. 44, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **VLĂȘCEANU GABRIELA ANTOANETA**,
*ALEEA DUMBRĂVIȚA NR. 2, BL. 28, SC. 2,
ET. 5, AP. 65, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;*
• **IONESCU DANIELA**,
*STR. ÎMPĂRATUL TRAIAN NR.3, BL.B 12,
SC.3, ET.2, AP.82, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO;*

• **POPESCU MARIANA**, *STR.VIIOR II NR.5,
PANTELIMON, IF, RO;*
• **OANCEA FLORIN**, *STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;*
• **ȘESAN TATIANA EUGENIA**,
*BD.IULIU MANIU NR.55, BL.17, SC.E, ET.9,
AP.208, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **JECU MARIA-LUIZA**,
*STR. PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR. 8,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;*
• **OANCEA ANCA**, *STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:

US 20110224080 A1; CN 101709003 B

(54)

PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR GRANULE CU CONȚINUT RIDICAT DE SILICIU, UTILIZATE ÎN CULTURILE DE PLANTE NUTRACEUTICE



RO 131870 B1

1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unor granule cu conținut ridicat
de siliciu, utilizate în culturile de plante nutraceutice. Granulele obținute conform procedeuului
3 descris, aplicate ca tratament la sol pe rândurile de plante nutraceutice, având capacitatea de
a elibera siliciu solubil, conduc la creșterea conținutului de compuși bioactivi, cu efect benefic
5 asupra sănătății umane, și a nivelului recoltei de plante cultivate.

Este cunoscută o serie întreagă de procedee prin care se stimulează producerea și/sau
7 acumularea de compuși bioactivi în țesuturile vegetale. Aplicarea elicitorilor, respectiv a com-
pușilor care declanșează răspunsul de apărare din plante, determină activarea metabolismului
9 secundar și biosinteza compușilor bioactivi (a se vedea, de exemplu, recenta trecere în revistă
Baenas et al. 2014, *Molecules*, 19: 13541-13563). Procedeele de aplicare a elicitorilor pentru
11 creșterea producției de compuși bioactivi de interes practic au fost dezvoltate inițial pentru
culturile de celule/țesuturi vegetale.

13 Cererea de brevet **US 5552307** descrie un procedeu de utilizare a unor elicitori, proteine
(albumină serică bovină, lizozim), modificate prin oxidare/glicozilare, sau acid azetidinic 2-
15 carboxilic, pentru a stimula acumularea de metaboliți utili (nicotină, atropină, diosgenină,
respectiv vincristină, vinblastină etc.) în culturile de celule de plante: tutun, *Belladonna atropa*,
17 *Dioscorea deltoidea*, respectiv *Catharanthus roseus*.

Ulterior, s-au realizat și procedee de utilizare a elicitorilor pentru stimularea producerii
19 de compuși bioactivi în recolta culturilor agricole/horticole. Brevetul **US 6720289** se referă la
un procedeu de creștere a conținutului de uleiuri esențiale în plantele aromatice (în special
21 *Pelargonium graveolens*, *Mentha arvensis*, *Chamomilla recutita*, *Artemisia pallens* și
Cymbopogon winterianus) prin tratamente cu elicitori selecționați din grupul acidului amino-
23 butiric/derivaților de acid aminobutiric, izonicotinamidă/derivați de izonicotinamidă, acid salicilic/
derivați de acid salicilic. Acești elicitori sunt formulați împreună cu un agent purtător, și, opțional,
25 împreună cu metaboliți secundari (alcaloizi, acizi grași, proteine și vitamine). Formulările sunt
aplicate prin tratament foliar (stropire), cu soluții/suspensii care au o concentrație de la circa
27 0,1 mM la circa 4 mM elicitor, cu 15 zile înainte de recoltarea plantelor în vârstă de 15 zile.

Brevetul **US6207712** descrie utilizarea acizilor grași conjugați cu aminoacizi, N(17-
29 hidroxylinolenol)-L-glutamină, N(linolenol)-L-glutamină, derivați ai acestora și amestecuri,
pentru a stimula producerea de compuși farmacologic importanți, cum ar fi taxolul, a crește
31 producția de compuși volatili odoranți de către flori, și pentru a crește conținutul de ulei esențial
în plante.

33 Cererea de brevet **US 2006073121** prezintă un procedeu de creștere a gradului de
iușeală al plantelor din familia *Solanaceae*, în special al ardeilor, care implică pulverizarea
35 plantelor, cu flori complet deschise, cu o soluție/suspensie de (i) 0,25...2% g/v dintr-un elicitor
biotic, selectat din grupul constând dintr-un extract de ciuperci microscopice *Aspergillus niger*,
37 *Aspergillus parasiticus*, *Rhizopus oligosporus* și amestecuri ale acestora, și (ii) 1...5 μM elicitor
abiotic, selectat din grupul constând din metil-jasmonat și acid salicilic.

39 Cererea de brevet **EP 1750507** dezvăluie utilizarea acidului jasmonic și/sau a derivaților
săi și a acidului salicilic și a derivaților săi, împreună cu săruri complexe de titaniu, pentru
41 creșterea conținutului de substanțe fenolice bioactive în extractele din *Echinacea purpurea* L.

43 Cererea de brevet **WO 2007088024** se referă la un procedeu de obținere a cel puțin unui
glucozinolat din exudatele rădăcinilor unor plante din ordinul *Capparales*, care include
45 următoarele etape: (a) cultivarea plantelor într-un sistem fără sol; (b) furnizarea unei soluții
nutritive cu un conținut ridicat de azot; (c) stimularea formării de glucozinolați prin administrarea
a cel puțin unui elicitor; (d) obținerea glucozinolatului din exudatul rădăcinilor plantei cultivate
47 în lipsa solului și stimulată cu elicitori.

Un dezavantaj al procedeelor care implică aplicare de elicitori rezultă din interacțiunile negative între diferitele căi metabolice implicate în răspunsul sistemic de apărare din plante. Elicitorii/factorii de stres biotici sau abiotici induc tipuri diferite de răspunsuri de apărare, care sunt reglate de diferiți fitohormoni - acid salicilic (SA), acid jasmonic (JA), etilenă (ET) și acid abscisic (ABC) (Pieterse et al. 2012. Annual review of cell and developmental biology, 28: 489-521). În general, SA este asociat cu rezistență la agenți patogeni biotrofi și la insectele care înțepă și sug, iar JA și ET/ABA sunt asociate cu rezistență la agenți patogeni necrotrofi și, respectiv, la insectele care rup și mestecă. Căile SA/JA - ET-ABA sunt antagoniste/în disonanță, generând o balansare între rezistență la biotrofi/insecte care înțepă și sug și necrotrofi/insecte care rup și mestecă. Diferitele forme de stres abiotic (temperaturi extreme, radiație solară, agenți chimici pro-oxidanți) intervin și ele în căile SA/JA-ET-ABA, în special prin modificarea nivelului speciilor reactive de oxigen și azot, inclusiv a celui de oxid nitric (Xia et al., 2015, Journal of experimental botany, 66:, 2839-2856). Toată această rețea de interacțiuni pozitive și negative determină, în anumite situații, o creștere a susceptibilității plantelor față de factori de stres biotici controlați de altă cale decât cea care a fost activată (Caarls et al. 2015, Frontiers in plant science, 6:170).

Cererea de brevet **US 20110224080** se referă la o formulare pe bază de calcit mineral natural micronizat și zeolit micronizat, la care se adaugă un aditiv, cum ar fi un extract vegetal din plante ca, de exemplu, urzică, grâu, ovăz, orz, porumb, alge marine și clorofilă, utilizată în culturile de plante în vederea stimulării creșterii, întărirea rezistenței la stresurile biotice și abiotice, îmbunătățirea absorbției nutrienților și creșterea producției.

Brevetul **CN101709003** prezintă un fertilizator binar siliciu-potasiu și procedeul de obținere al acestuia. Produsul conține, pe lângă oxid de potasiu, oxid de sodiu și apă, 50...55 părți dioxid de siliciu. Procedeul de obținere are loc prin parcurgerea următoarelor etape: amestecarea componentelor într-un recipient de agitare la o temperatură cuprinsă între 60...80°C, având un debit de 1500kg/h și o viteză de centrifugare cuprinsă între 1...15000 rpm, urmată de uscarea prin pulverizare și granulara amestecului la o dimensiune între 40...120 mesh.

Sunt așadar necesare procedee prin care să se folosească elicitori care să determine stimularea echilibrată și cu spectru larg a sistemului de apărare din plante, limitând antagonismul dintre căile de apărare a plantelor și favorizând producerea și acumularea de compuși bioactivi.

Pe de altă parte, activarea răspunsului de apărare din plante reprezintă un compromis între avantajele pentru individ și dezavantajele competitive la nivel de specie/populație (Neilson et al. 2013, Trends in plant science 18: 250-258). Consumul de energie metabolică pentru sinteza compușilor de apărare (care sunt și fitonutrienții de interes practic, ca, de exemplu, resveratrolul, care este o fitoalexină, respectiv un compus de apărare, din vița-de-vie - Gu et al. 2015, Journal of cellular and molecular medicine, 19: 2324-2328) se face în detrimentul creșterii și dezvoltării - producerii de fructe și, respectiv, semințe (recolta utilă). Acest compromis între cantitatea producției (asociată conservării speciei prin producerea de semințe) și calitatea recoltei (asociată conservării individului prin formarea compușilor de metabolism secundar cu rol de protecție) este un alt dezavantaj în stadiul actual de dezvoltare al domeniului. Acest dezavantaj este și mai pregnant în cazul plantelor de cultură la care nu s-au selectat destule varietăți suficient de tolerante la stresul termic/temperatură ambientală ridicată/scăzută în timpul antezei (formării florilor). Schimbările climatice pot amplifica această problemă, afectând dezvoltarea florilor și formarea fructelor/semințelor (Chayut et al. 2014, Plants, 3: 304-323). Influența semnificativă este și asupra plantelor de cultură care sunt introduse în alte areale decât cele de origine, în care nu sunt suficient de bine adaptate.

RO 131870 B1

1 Studiile recente au dovedit că siliciul solubil este unul dintre puţinii elicitori care
amorsează în mod echilibrat diferitele căi metabolice implicate în răspunsul de apărare din
3 plante (**Van Bockhaven et al. 2013. Journal of experimental botany, 64: 1281-1293**).
Acţiunea siliciului solubil nu se limitează doar la orchestrarea căilor metabolice implicate în
5 apărarea plantelor faţă de atacul patogenilor şi al dăunătorilor, dar are şi efecte de: creştere a
eficienţei de utilizare a nutrienţilor; reducere a toxicităţii metalelor grele; limitare a efectelor
7 stresului hidric (salin, secetă) şi a stresului termic - îngheţ, temperatură excesivă (**Liang et al.
2015, Silicon in Agriculture, Springer Netherlands, Dordrecht, pg. 235**). Siliciul solubil are,
9 deci, toate caracteristicile unui biostimulant pentru plante (**Savvas şi Ntatsi 2015, Scientia
horticulturae, 196: 66-81**).

11 În plante, însă, siliciul îndeplineşte două funcţii majore, una structurală şi cealaltă
fiziologică/biochimică (de biostimulant). Funcţia structurală este asociată răspunsului inteligent
13 al apoplastului (**Nishitani şi Demura 2015, Plant and cell physiology, 56, 177-179**) şi implică,
în cazul plantelor care acumulează siliciu, şi formarea de fitolite cu rol analog unui endo-schelet
15 (**Schoelynck et al. 2014, Journal of vegetation science, 25: 301-313**). Această funcţie
structurală are şi un rol de apărare împotriva patogenilor şi dăunătorilor, generând diferite
17 bariere care limitează pătrunderea agenţilor fitopatogeni şi care au un efect repelent asupra
dăunătorilor. Funcţia fiziologică, implicată în reglarea fină/orchestrarea căilor metabolice
19 aferente răspunsului de apărare, necesită transportul acidului ortosilicic (H_4SiO_4) prin simplast
şi implică un sistem cooperat, prezent doar în rădăcini, format din acvaporine (proteine
21 membranare care constituie canale pentru transportul facilitat al apei şi al moleculelor mici,
neutre/neionizate), din subfamilia NIP-26(nodulin-26-like proteins), denumite şi metaloido-porine
23 (**Pommerrenig et al., 2015. Plant science, 238: 212-22**), şi proteine de transport activ/„pompe”
moleculare de siliciu, care transferă acidul ortosilicic în xilem (**Ma şi Yamaji, 2015, Trends in
25 plant science, 20: 435-442**).

27 Termenul "acid silicic" se referă la un grup de specii moleculare alcătuite din atomi de
siliciu, hidrogen şi oxigen. Acizii silicici simpli includ acidul metasilicic (H_2SiO_3), acidul ortosilicic
(H_4SiO_4), acidul disilicic ($H_2Si_2O_5$) şi acidul piroxilic ($H_6Si_2O_7$), şi reprezintă speciile moleculare
29 cu o solubilitate mai ridicată în soluţiile apoase. În soluţia solului, acidul ortosilicic există ca
specie unică la concentraţii reduse, de maximum 2 mM (**Cornelis, et al 2011, Biogeosciences,
31 8: 89-112**). În anumite condiţii (concentraţii ridicate, tărie ionică crescută, pH alcalin, prezenţa
unor aminoacizi/peptide sau poliamine), acizii silicici (poli)condensează pentru a forma polimeri
33 de acizi silicici, cu o structură complexă. Produsul de polimerizare avansată ($SiO_2 \cdot nH_2O$) este
denumit silicagel, în stare semnificativ hidratată, silice amorfă atunci când este parţial
35 deshidratat, şi opal când procesul de condensare şi de deshidratare este avansat. Structurile
formate în ţesuturile plantelor prin precipitarea şi condensarea acidului silicic sunt denumite opal
37 biogen, bioopal, fitolite (**Belton et al. 2012, FEBS Journal, 279:, 1710-1720**).

39 Siliciul aplicat foliar este preluat exclusiv de apoplast şi generează structuri morfologice
care cresc rezistenţa la atacul patogenilor şi dăunătorilor (**Rodrigues si Datnoff, 2015, Silicon
and Plant Disease, Springer, Cham, 148 pg.**). Declanşarea răspunsului de apărare şi activarea
41 biosintezei care duce la acumularea fitonutrienţilor produşi prin metabolismul secundar este
realizată numai de către siliciul absorbit de plante prin sistemul radicular. Diferenţe semnificative
43 ale răspunsului fiziologic apar însă atunci când siliciul solubil este furnizat direct ca acid orto-
silicic, în concentraţie la limita oligo-condensării, sau ca săruri/oxizi din care se eliberează acid
45 ortosilicic treptat, de exemplu: rezistenţa plantelor de soia la atacul de cercosporioză este
reduşă de acidul silicic aplicat radicular ca soluţie de concentraţie 2 mM (**Nascimento et al.
47 2014, Phytopathology, 104: 1183-1191**) şi este mărită de silicatul de calciu încorporat în sol
(**Nolla et al. 2006. Journal of plant nutrition, 29: 2049-2061**).

RO 131870 B1

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția o constituie stimularea echilibrată și cu spectru larg a sistemului de apărare din plante, limitând antagonismul dintre căile de apărare a plantelor și favorizând producerea și acumularea de compuși bioactivi în culturile de plante nutraceutice.

Procedeul conform invenției este constituit din următoarele etape:

- realizarea unor granule pe bază de material vegetal în curs de mineralizare, cu un conținut de siliciu de minimum 2,5%, și un material mineral cu un conținut de siliciu cuprins între 22,5 și 40%, amestecate în proporție de 5...10 părți material vegetal la 1...3 părți material mineral;

- aplicarea granulelor ca tratament la sol, pe rândurile de plante nutraceutice, în doze cuprinse între 200 și 500 kg/ha, cu 15 zile înainte de fenofaza de înflorire a plantelor nutraceutice cultivate.

Granularea materialului vegetal și a materialului mineral se realizează prin amestecarea materialului vegetal și a celui mineral într-un amestecător de compost, în proporțiile corespunzătoare, cu o rată de adăugare de maximum 200 kg/h, urmată de granularea propriu-zisă într-un ciur rotativ, la viteze radiale cuprinse între 2 și 5 rot/min și pe o sită de 5...8 mm.

Materialul vegetal în curs de mineralizare este reprezentat de compost format din material vegetal cu un conținut ridicat de fitosiliciu (paie de grâu, tulei de porumb, borhot de orz) sau din substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* pe paie de grâu sau tulei de porumb, la care conținutul de siliciu total este de minimum 2,5%.

Materialul mineral este reprezentat de silicat de calciu, bioxid de siliciu coloidal, diatomee, la care conținutul de siliciu total este cuprins între 22,5 și 40%.

Procedeul conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- furnizează în mod continuu plantelor nutraceutice/cultivate pe solul astfel tratat cantități mici de acid ortosilicic, eliberat din biosiliciul prezent în materialul vegetal în curs de mineralizare și din materialul mineral cu un conținut ridicat de siliciu;

- stimulează concomitent sinteza de compuși bioactivi/fitonutrienți datorită activării echilibrate a sistemului de apărare din plantele tratate, și formarea recoltei utile, datorită protejării plantelor față de factorii de stres biotici și abiotici, inclusiv stresul termic moderat în timpul antezei;

- favorizează acumularea de biosiliciu cu biodisponibilitate ridicată în recolta de plante nutraceutice tratate.

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

Exemplul 1

Se realizează un compost din material vegetal, de preferat paie de grâu, conform procedeelor cunoscute. În materialul vegetal supus procesului de compostare se determină siliciul total prin ICP-OES, după calcinare la 950°C și extracție în acid clorhidric (**Liang et al 2015, Analysis of Silicon in Soil, Plant and Fertilizer, în Silicon in Agriculture, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 19-44**). Conținutul inițial de siliciu trebuie să fie de cel puțin 1,5%, pentru a asigura formarea unui compost matur cu minimum 2,5% siliciu, ca urmare a consumării a circa 35...38% din nutrienții materialului vegetal inițial (în special carbon și azot), în timpul procesului de compostare.

Compostul realizat se granulează împreună cu bioxid de siliciu coloidal (**Aerosil® 150, Evonik Resource Efficiency GmbH, Hanau-Wolfgang, Germania**). Granularea materialului vegetal și a materialului mineral se realizează prin amestecarea materialului vegetal și a celui mineral într-un amestecător de compost, în raport de 5 părți material vegetal la 1 parte material mineral, cu o rată de adăugare de maximum 200 kg/h, urmată de granularea propriu-zisă într-un ciur rotativ, la viteze radiale cuprinse între 2 și 5 rot/min, și pe o sită de 5...8 mm.

RO 131870 B1

1 Se poate utiliza orice dioxid de siliciu coloidal dacă are o suprafață specifică BET cuprinsă între 129 și 155 m²/g, și un conținut de siliciu de minimum 40%.

3 Granulele se aplică ca tratament la sol, pe rândurile de plante nutraceutice, în doze de 200 kg/ha, cu 15 zile înainte de fenofaza de înflorire a plantelor nutraceutice cultivate.

5 Procedeu conform exemplului de mai sus a fost testat în privința acumulării compușilor biologic activi în plantele nutraceutice *Passiflora incarnata* L. Plantele nutraceutice au fost cultivate pe preluvosol roșcat molic, fertilizat echilibrat conform recomandărilor agrochimice. Tratamentele la sol s-au aplicat în a doua decadă a lunii aprilie 2015, cu 15 zile înainte de fenofaza de înflorire a plantelor nutraceutice. La 45 zile de la tratament s-a recoltat material vegetal pentru analiză.

11 Materialul vegetal (frunze *P. incarnata*, fructe *M. charantia*) a fost uscat la 50°C și apoi a fost extras în etanol 70% (v/v), într-un raport de 1,5:10 (m/v), la temperatura camerei, timp de 13 zile. Extractele au fost filtrate, iar filtratele au fost stocate la 4°C până la utilizare. Greutatea în stare uscată a fost determinată folosind un analizator de umiditate (Radwag, Radom, Polonia). În extractul din materialul vegetal de *P. incarnata* s-a determinat activitatea antioxidantă, prin măsurarea capacității respectivelor extracte de stinge: cationii radicalici produși de acidul 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulphonic (ABTS) și radicalii stabili generați de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Rezultatele au fost exprimate ca echivalent Trolox (TEAC)/g s.u. și, respectiv, ca % inhibarea DDPH (Gaspar et al. 2014, Romanian Biotechnological Letters, 19: 9353-9365).

Tabelul 1

23 *Activitatea antioxidantă în extractul de material vegetal
provenit din plante de Passiflora incarnata*

Varianta experimentală	TEAC/g s.u.	%DDPH
Martor, crescut pe sol netratat conform exemplului 1	72,91 ± 7,82b	27,24 ± 1,62b
Plante crescute pe sol tratat conform exemplului 1	124,21 ± 14,84a	48,70 ± 2,23a

29 Rezultatele prezentate în tabelul 1 demonstrează că aplicarea procedurii conform exemplului 1 determină o creștere a activității antioxidante de peste 50% în frunzele de *P. incarnata*. Activitatea antioxidantă este în directă legătură cu utilizările fitoterapeutice ale plantelor de *Passiflora* (Sarris et al. 2013, CNS Drugs, 27: 301-319). La finalul experimentului s-a constatat o creștere a masei vegetale recoltate la plantele tratate de peste 12,3%.

Exemplul 2

35 Se granulează substrat epuizat de la cultura ciupercilor *Pleurotus* (cu un conținut de siliciu total determinat prin ICP-OES, după calcinare la 950°C și extracție în acid clorhidric de minimum 2,5%) împreună cu diatomită (din cariera de la Pătârlagele, România). Granularea materialul vegetal și a materialului mineral se realizează prin amestecarea materialului vegetal și a celui mineral într-un amestecător de compost, în raport de 7 părți material vegetal la 2 părți material mineral, cu o rată de adăugare de maximum 200 kg/h, urmată de granularea propriuzisă într-un ciur rotativ, la viteze radiale cuprinse între 2 și 5 rot/min, și pe o sită de 5...8 mm.

43 Se poate utiliza orice diatomită în compoziția de mai sus schelet de silice cu minimum 85% SiO₂ și conținut de siliciu de minimum 39%.

45 Granulele se aplică ca tratament la sol, pe rândurile de plante nutraceutice, în doze de 300 kg/ha, cu 15 zile înainte de fenofaza de înflorire a plantelor nutraceutice cultivate.

RO 131870 B1

Produsul realizat conform exemplului de mai sus a fost testat în privința acumulării compușilor biologic activi în plantele nutraceutice *Momordica charantia* L. Plantele nutraceutice au fost cultivate pe preluvosol roșcat molic, fertilizat echilibrat conform recomandărilor agrokimice. Tratamentele la sol s-au aplicat în a doua decadă a lunii aprilie 2015, cu 15 zile înainte de fenofaza de înflorire a plantelor nutraceutice. La 45 zile de la tratament s-a recoltat material vegetal pentru analiză.

În extractul de material vegetal de *M. charantia* s-a determinat activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, o proteină transmembranară majoră, cu rol în diabetul de tip II, non-insulino-dependent, care este inhibată de sapogenine triptenice de tip cucurbitan din *M. charantia* (Zeng et al. 2014. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 81: 176-180). S-a folosit metoda descrisă de Lund et al. 2004 (**Journal of Biological Chemistry**, 279:, 24226-24235), folosind ca substrat pNPP (para-nitro-fenil fosfat). Tamponul de testare (pH = 7,4) a fost constituit din 50 mM 3,3-dimetilglutarate, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotritol a fost ajustat la o tărie ionică de 0,15 M prin adăugarea de NaCl. S-a lucrat în placă de microtitrare cu 96 godeuri, din polipropilenă volum de lucru 250 μl (Nune™ 96-Well Polypropylene MicroWell™ Plates, Thermo Scientific, Waltham, MA, SUA). Concentrațiile corespunzătoare de extracte (0 și 30 μl) au fost adăugate la tamponul de testare conținând 0 sau 2,5 mM pNPP (concentrație finală) în volum total de 200 μl. Reacția a fost inițiată de adăugarea de 20 μl, conținând 10 unități protein-tirozinfosfatază (PTP1B, Prospec, Rehovot, Israel). S-a incubat timp de 30 min la temperatura de 37°C. Reacția a fost stopată prin adăugarea a 30 μl de soluție 0,5 M NaOH. S-a măsurat absorbanta în placa de microtitrare la 405 nm folosind un cititor de plăci (FluoroStar Omega, BMG LabTech, Offenburg, Germania) cu posibilitatea corecției absorbantei cauzate de substrat în absența enzimei și compuși. Ca martor pozitiv, activitatea de PTP1B a fost determinată în prezența vanadatului de sodiu, Na₃VO₄, un inhibitor cunoscut al activității protein-tirozinfosfatazei 1B. Rezultatele s-au exprimat ca % de inhibare și sunt prezentate în tabelul 2:

Tabelul 2

Activitatea de inhibare a protein-tirozinfosfatazei 1B, PTP1B, în extractele din materialul vegetal provenit din plante de *Momordica charantia*

Varianta experimentală	% inhibare PTP1B
Martor, crescut pe sol netratat conform exemplului 1	28,52 ± 8,28b
Plante crescute pe sol tratat conform exemplului 1	51,27 ± 12,33a

Rezultatele demonstrează că aplicarea demonstrează că aplicarea procedurii conform exemplului 2, determină o creștere a activității de inhibare a enzimei implicate în diabetul de tip II, protein-tirozinfosfatazei 1B, cu peste 50% în fructele de *Momordica charantia*. La finalul experimentului s-a constatat o creștere a masei vegetale recoltate la plantele tratate de peste 14,8%.

Exemplul 3

Se realizează un compost din material vegetal, de preferat paie de grâu, conform procedurilor cunoscute. În materialul vegetal supus procesului de compostare se determină siliciul total prin ICP-OES, după calcinare la 950°C și extracție în acid clorhidric (Liang et al 2015, **Analysis of Silicon in Soil, Plant and Fertilizer, în Silicon in Agriculture, Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 19-44**). Conținutul inițial de siliciu trebuie să fie de cel puțin 1,5%, pentru a asigura formarea unui compost matur cu minimum 2,5% siliciu, ca urmare a consumării a circa 35...38% din nutrienții materialul vegetal inițial (în special carbon și azot), în timpul procesului de compostare.

RO 131870 B1

1 Compostul realizat se granulează împreună cu silicat de calciu (Vansil W-10, Vanderbilt
Minerals, Norwalk, CT, SUA), cu un conținut de siliciu de minimum 22,5%. Granularea mate-
3 rialul vegetal și a materialului mineral se realizează prin amestecarea materialului vegetal și a
celui mineral într-un amestecător de compost, în raport de 10 părți material vegetal la 3 părți
5 material mineral, cu o rată de adăugare de maximum 200 kg/h, urmată de granularea propriu-
zisă într-un ciur rotativ, la viteze radiale cuprinse între 2 și 5 rot/min, și pe o sită de 5...8 mm.

7 Se poate utiliza orice silicat de calciu, care are o granulație medie, 5% reținut pe sita de
325 mesh, și un conținut de siliciu de minimum 22,50%.

9 Granulele se aplică ca tratament la sol, pe rândurile de plante nutraceutice, în doze de
500 kg/ha, cu 15 zile înainte de fenofaza de înflorire a plantelor nutraceutice cultivate.

11 Produsul realizat conform exemplului de mai sus a fost testat în privința acumulării
compușilor biologic activi în plantele nutraceutice *Mentha x piperita*. Plantele nutraceutice au
13 fost cultivate pe preluvosol roșcat molic, fertilizat echilibrat conform recomandărilor agrochimice.
Tratamentele la sol s-au aplicat în a doua decadă a lunii aprilie 2015, cu 15 zile înainte de
15 fenofaza de înflorire a plantelor nutraceutice. La 45 zile de la tratament a fost recoltat material
vegetal pentru analiză. În probele prelevată s-a analizat conținutul de ulei esențial și compoziția
17 acestuia, conform metodei Gershenzon et al., 2000, Plant Physiology 122: 205-213, după
hidrodistilare combinată cu extracție cu pentan și analiza uleiurilor esențiale prin gaz-
19 cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3:

21 *Tabelul 3*

23 *Conținutul de ulei esențial și compoziția acestuia în probele de Mentha x piperita analizate*

Varianta experimentală	Conținut ulei esențial (mg/g s.p.)	% compoziție ulei esențial					
		Limonen	Cineol	Mentonă	Mentofuran	Pulegon	Mentol
Martor	18	24	38	459	169	83	65
Exemplul 3	26	22	34	461	167	81	84

29 Aplicarea procedurii conform invenției determină o creștere cu 44,5% a conținutului
de ulei esențial în plantele de mentă tratate, cu o acumulare semnificativ mai mare de mentol.
31 La finalul experimentului s-a constatat o creștere a masei vegetale recoltate la plantele tratate de
peste 9,2%.

RO 131870 B1

Revendicări

1

1. Procedeu de obținere a unor granule cu conținut ridicat de siliciu, utilizate în culturile de plante nutraceutice, **caracterizat prin aceea că** se amestecă într-un amestecător de compost 5...10 părți material vegetal în curs de mineralizare având un conținut de siliciu de minimum 2,5%, cu 1...3 părți material mineral având un conținut de siliciu cuprins între 22,5...40%, cu o rată de adăugare de maximum 200 kg/h, se granulează într-un ciur rotativ la viteze radiale cuprinse între 2...5 rpm, pe o sită de 5...8 mm, granulele obținute urmând a fi aplicate ca tratament la sol, pe rândurile de plante nutraceutice, în doze cuprinse între 200...500 kg/ha, cu 15 zile înainte de fenofaza de înflorire a acestora. 3 5 7 9

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul vegetal în curs de mineralizare este reprezentat de compost format din material vegetal cu un conținut ridicat de fitosiliciu: paie de grâu, tulei de porumb, borhot de orz sau din substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor *Pleurotus* pe paie de grâu sau tulei de porumb, la care conținutul de siliciu total este de minimum 2,5%. 11 13 15

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul mineral este reprezentat de silicat de calciu, bioxid de siliciu cooidal, diatomee, la care conținutul de siliciu total este cuprins între 22,5% și 40%. 17



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 282/2019