



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00930

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

(41) Data publicării cererii:
30/05/2017 BOPI nr. 5/2017

(71) Solicitant:
• 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;
• VLĂSCÉANU 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 TĂTIANA 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

(54) **PROCEDEU DE CREȘTERE A PRODUCȚIEI DE COMPUȘI
BIOACTIVI ÎN CULTURI DE PLANTE NUTRACEUTICE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de creștere a producției de compuși bioactivi de plante nutraceutice. Procedeuul conform invenției constă în realizarea unor granule pe bază de material vegetal de tip compost, având un conținut de minimum 2,5% siliciu, un material mineral de tip silicat de calciu, bioxid de siliciu coloidal, diatomee având un conținut de 22,5...40% siliciu,

amestecarea acestora în proporție de 5...10 părți material vegetal la 1...3 părți material mineral, și aplicarea granulelor ca tratament la sol în doze de 200...500 kg/ha, cu 15 zile înainte de fenofaza de înflorire a plantelor nutraceutice cultivate.

Revendicări: 4

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



PROCEDEU DE CREȘTERE A PRODUCȚIEI DE COMPUȘI BIOACTIVI ÎN CULTURILE DE PLANTE NUTRACEUTICE

Prezenta invenție se referă la un procedeu de creștere a:(i) conținutului de compuși bioactivi, cu efect benefic asupra sănătății umane, și (ii) a nivelului recoltei de plante nutraceutice cultivate, prin aplicarea de tratamente cu produse care eliberează siliciu solubil.

Sunt cunoscute o serie întregă de procedee prin care se stimulează producerea și/sau acumularea de compuși bioactivi în țesuturile vegetale. Aplicarea elicitorilor, respectiv a compușilor care declanșează răspunsul de apărare din plante, determină activarea metabolismului secundar și biosinteza compușilor bioactivi (a se vedea de ex. recenta trecere în revistă Baenas et al. 2014, *Molecules*, 19: 13541-13563). Procedeele de aplicare a elicitorilor pentru creșterea producției de compuși bioactivi de interes practic au fost dezvoltate inițial pentru culturile de celule / țesuturi vegetale. Brevetul SUA 5552307 descrie un procedeu de utilizare a unor elicitori, proteine (albumină serică bovină, lizozim), modificate prin oxidare / glicozilare, sau acid azetidin 2-carboxilic, pentru a stimula acumularea de metaboliți utili (nicotină, atropină, diosgenină, respectiv vincristină, vinblastină etc.) în culturile de celule de plante – tutun, *Belladonna atropa*, *Dioscorea deltoides*, respectiv, *Catharanthus roseus*.

Ulterior s-au realizat și procedee de utilizare a elicitorilor pentru stimularea producerii de compuși bioactivi în recolta culturilor agricole / horticole. Brevetul SUA 6720289 se referă la un procedeu de creștere a conținutului de uleiuri esențiale în plantele aromatice (în special *Pelargonium graveolens*, *Mentha arvensis*, *Chamomilla recutita*, *Artemisia pallens* și *Cymbopogon winterianus*) prin tratamente cu elicitori selecționați din grupul acidului aminobutiric / 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, 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 0.1 mM la circa 4 mM elicitor, cu 15 zile înainte de recoltarea plantelor în vârstă de 15 zile.

Brevetul SUA 6207712 revendică utilizarea acizilor grași conjugați cu aminoacizi, N(17-hidroxylinolenoil)-L-glutamină, N(linolenoil)-L-glutamină, derivații ai acestora și amestecuri, pentru a stimula producerea de compuși farmacologic importanți,

cum ar fi taxolul, a crește producția de compuși volatili odoranți de către flori, și de a crește conținutul de ulei esențial în plante.

Cererea de brevet US2006073121 prezintă un procedeu de creștere a gradului de iuțea al plantelor din familia *Solanaceae*, în special al ardeilor, care implică pulverizarea 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*, *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.

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 titanu pentru creșterea conținutului de substanțe fenolice bioactive în extractele din *Echinacea purpurea* L.

Cererea de brevet WO2007088024 protejează un procedeu de obținere a cel puțin a unui glucozinolat din exsudatele rădăcinilor unor plante din ordinul *Capparales*, care include 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 exsudatul rădăcinilor plantei cultivate 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 amestecă. 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).

Sunt deci 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 suficiente 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.

Studiile recente au dovedit că siliciul solubil este unul dintre puținii elicitori care amorsează în mod echilibrat diferitele căi metabolice implicate în răspunsul de apărare din plante (Van Bockhaven et al. 2013. *Journal of experimental botany*, 64:1281-1293). Acțiunea siliciului solubil nu se limitează doar la orchestrarea căilor metabolice implicate în apărarea plantelor față de atacul patogenilor și al dăunătorilor, dar are efecte și de: creștere a eficienței de utilizare a nutrienților; reducere a toxicității metalelor grele; limitare a efectelor stresului hidric (salin, secetă) și a stresului termic - îngheț, temperatură excesivă (Liang et al. 2015, *Silicon in Agriculture*, Springer Netherlands,

Dordrecht, 235 pg.). Siliciul solubil are deci toate caracteristicile unui biostimulant pentru plante (Savvas și Ntatsi 2015, *Scientia horticulturae*, 196:66-81).

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

Termenul "acid silicic" se referă la un grup de specii moleculare alcătuite din atomi de siliciu, hidrogen și oxigen. Acizii silicici simpli includ acidul metasilicic (H_2SiO_3), acidul ortosilicic (H_4SiO_4), acidul disilicic ($H_2Si_2O_5$) și acidul piroxilic ($H_6Si_2O_7$) și reprezintă speciile moleculare cu o solubilitate mai ridicată în soluțiile apoase. În soluția solului acidul ortosilicic există ca specie unică la concentrații reduse, de maximum 2 mM (Cornelis, et al 2011, *Biogeosciences*, 8: 89-112). În anumite condiții (concentrații ridicate, tărie ionică crescută, pH alcalin, prezența unor aminoacizi / peptide sau poliamine), acizii silicici (poli)condensează pentru a forma polimeri 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 parțial deshidratat, opal când procesul de condensare și de deshidratare este avansat. Structurile formate în țesuturile plantelor prin precipitarea și condensarea acidului silicic sunt denumite opal biogen, bioopal, fitolite (Belton et al. 2012, *FEBS Journal*, 279: 1710-1720).

Siliciul aplicat foliar este preluat exclusiv de apoplast și generează structuri morfologice care cresc rezistența la atacul patogenilor și dăunătorilor (Rodrigues și Datnoff, 2015, *Silicon and Plant Disease*, Springer, Cham, 148 pg.). Declanșarea răspunsului de apărare și activarea biosintezei care duce la acumularea fitonutrienților produși prin metabolismul secundar, este realizată numai de către siliciul absorbit de plante prin sistemul radicular. Diferențe semnificative ale răspunsului fiziologic apar însă atunci când siliciul solubil este furnizat direct ca acid orto-silicic, în concentrație la limita oligo-condensării, sau ca săruri / oxizi din care se eliberează acid ortosilicic treptat – de ex. rezistența plantelor de soia la atacul de cercosporioză este redusă de acidul silicic aplicat radicular ca soluție de concentrație 2 mM (Nascimento et al. 2014, *Phytopathology*, 104: 1183-1191) și este mărită de silicatul de calciu încorporat în sol (Nolla et al. 2006. *Journal of plant nutrition*, 29: 2049-2061).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a stabili un procedeu de aplicare a unor produse care eliberează treptat acid ortosilicic în sol, prin care să se detalieze modalitatea de administrare, momentul optim de aplicare și dozele cu eficacitate maximă, pentru creșterea: (i) conținutului de compuși bioactivi, cu efect benefic asupra sănătății umane, și (ii) a nivelului recoltei de plante nutraceutice cultivate.

Procedeu conform invenției este constituit din următoarele etape:

- Realizarea unor granule pe bază de material vegetal în curs de mineralizarea 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 rotații pe minut 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 tului 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 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 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.

Compostul realizat se granulează împreună cu bioxid de siliciu coloidal (Aerosil® 150, Evonik Resource Efficiency GmbH, Hanau-Wolfgang, Germania). 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 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 rotații pe minut și pe o sită de 5-8 mm.

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 min. 40%.

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.

Procedeul 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.

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 10 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).

Tab. 1. 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 Exemplu 1	72,91 ± 7,82b	27,24 ± 1,62b
Plante crescute pe sol tratat conform Exemplu 1	124,21 ± 14,84a	48,70 ± 2,23a

Rezultatele prezentate în tab. 1. demonstrează că aplicarea procedurii conform Exemplu 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%.

Exemplu 2. 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 min 2,5%) împreună cu diatomită (din cariera de la Pătărlagele, România). 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 7 părți material vegetal la 2 părți 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 rotații pe minut și pe o sită de 5-8 mm.

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

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.

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 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.

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 (Nunc™ 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 μ l. Reacția a fost inițiată de adăugarea de 20 μ l, 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 μ l 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, Na_3VO_4 , un inhibitor cunoscut al activității protein-tirozinfosfatazei 1B. Rezultatele s-au exprimat ca % de inhibare și sunt prezentate în tabelul 2.

Tab. 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 Exemplu 1	28,52 \pm 8,28b
Plante crescute pe sol tratat conform Exemplu 1	51,27 \pm 12,33a

Rezultatele demonstrează că aplicarea demonstrează că aplicarea procedurii conform Exemplu 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 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.

Compostul realizat se granulează împreună cu silicat de calciu (Vansil W-10, Vanderbilt Minerals, Norwalk, CT, SUA), cu un conținut de siliciu de min. 22,5%. 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 10

părți material vegetal la 3 părți material mineral, cu o rată de adăugare de maximum 200 kg/h, urmată de granulara propriu-zisă într-un ciur rotativ, la viteze radiale cuprinse între 2 și 5 rotații pe minut și pe o sită de 5-8 mm.

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 min. 22,50%.

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.

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 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 a fost recoltat material vegetal pentru analiză. În probele prelevate s-a analizat conținutul de ulei esențial și compoziția 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-cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă. Rezultatele sunt prezentate în tab. 3

Tab. 3. 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	1,8	2,4	3,8	45,9	16,9	8,3	6,5
Exemplu 3	2,6	2,2	3,4	46,1	16,7	8,1	8,4

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. La finalul experimentului s-a constatat o creștere a masei vegetale recoltate la plantele tratate de peste 9,2%.

Revendicări

1. Procedeu conform invenției **caracterizat prin aceea că** 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.
2. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** granulara materialul 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 granulara propriu-zisă într-un ciur rotativ, la viteze radiale cuprinse între 2 și 5 rotații pe minut și pe o sită de 5-8 mm.
3. 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%
4. Procedeu conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** 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%.

