



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00893

(22) Data de depozit: 24/11/2016

(41) Data publicării cererii:  
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,  
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,  
SECTOR 6, 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;  
• CONSTANTINESCU-ARUXANDREI  
DIANA, ȘOS. MIHAI BRAVU NR. 297,  
BL. 15A, SC. A, AP. 5, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• RĂUT IULIANA,  
ALEEA BARAJUL BISTRITA NR.12, BL.4,  
ET.4, AP.54, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• DONI MIHAELA, BD. CAMIL RESSU  
NR. 4, BL. 5, SC. C, AP. 115, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• DIMA ȘTEFAN-OVIDIU, STR. ODOBEȘTI  
NR. 5B-5C, BL. M7-M7B, SC. B, ET. 6,  
AP. 72, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ARSENE MELANIA LILIANA, STR. COZIA  
NR. 8, BL. A7, SC. 4, AP. 49, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• JECU MARIA-LUIZA,  
STR.PICTOR OCTAV BĂNCILĂ NR.8,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(54) PROCEDEU DE SOLUBILIZARE A SILICIULUI  
DIN MATERIAL VEGETAL

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui bioproduct utilizat ca biostimulant pentru plante. Procedeuul conform invenției constă în pretratamentul unui material vegetal bogat în siliciu, într-un solvent clorură de clorcolină-glicerol 1M:2M, într-un raport 1:10, adăugarea de 10 părți apă, cu omogenizarea amestecului, urmată de adăugarea peste suspensia de material lignocelulozic a 15 părți soluție apoasă conținând silicază și feruoil esterază, și incubarea timp de 15 h la

o temperatură de 45°C, separarea materialului vegetal recalitrant prin filtrare și extracția în n-butanol a complexului siliciu-acizi hidroxicinamici, urmată de concentrarea extractelor, produsul rezultat având un conținut de 5% substanță uscată, și cel puțin 0,7% acid silicic.

Revendicări: 1

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 SOLUBILIZARE A SILICIULUI DIN MATERIALUL VEGETAL

Prezenta invenție se referă la un procedeu prin care se solubilizează fitosiliciul, pentru a se obține bioproduse pe bază de acid silicic care acționează ca biostimulant pentru plante.

Sunt cunoscute diferite procedee care au ca scop solubilizarea siliciului din materialul vegetal. În materialul vegetal (fito)siliciul se regăsește sub două forme: complexat în hemicelulozele din matricea extracelulară (He et al. 2015, *New Phytologist*, 206: 1051-1062) sau precipitat ca dioxid de siliciu amorf,  $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (Epstein 1999, *Annual Review of Plant Biology*, 50: 641-664). Fitosiliciul, în special cel complexat în matricea extracelulară, complică semnificativ utilizarea materialului vegetal în procesele de biorafinare (Le et al. 2015, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9: 109-121), astfel încât solubilizarea lui încă din primele etape de biorafinare este utilă pentru o mai bună prelucrare a materialului vegetal în (bio)produse chimice.

Principala problemă în solubilizarea fitosiliciului este dată de tendința de policondensare a acidului ortosilicic la concentrații mai mari de 2 mM (McIntosh, 2012, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14: 996-1013). Din acest motiv majoritatea procedeele de solubilizare a fitosiliciului implică tratamente de extragere în medii alcaline ( $\text{pH} > 10$ ) sau cu cantități mari de apă fierbinte.

Brevetul SUA 7364640 B2 revendică un procedeu chemi-mecanic de desilicifiere a materialului vegetal fibros, 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. Acest procedeu este aplicabil în special materialului lemnos provenit din arbori, care are un conținut relativ mic de siliciu. În cazul aplicării acestui procedeu pentru desilicifierea unor materiale vegetale cu un conținut ridicat de siliciu, cum sunt paie de cereale de exemplu, riscurile de precipitare necontrolată a silicaților și de formare a crustei de silicați sunt semnificative.

Brevetul SUA 5735916 dezvăluie un procedeu de producere a etanolului, ligninei, suplimentelor proteice și a silicatului alcalin, care implică măcinarea materialului vegetal până la 40-60 mesh, de preferabil 50 mesh, extracția în contra-curent, cu un solvent apos, cu pH cuprins între 3 și 5.0, de preferabil 4.0,

menținut între 40 și 60°C, preferabil 50°C. După extracția acidă, materialul solid este re-extras în mediu alcalin, în contra-curent cu soluții de KOH sau NaOH, de preferabil NaOH, de concentrații cuprinse între 5 și 50%, de preferabil 50%. Amestecul de silicat alcalin – lignină se separă prin ultrafiltrare pe un dispozitiv de formă specială, în care o membrană de polisulfonă este depusă peste un miez ceramic perforat. Materialul ne-extras, constituit predominant din celuloză, este hidrolizat cu acizi și trimis al fermentare. Procedul prezintă riscuri de formare a crustei de silicat și nu recuperează siliciu pentru aplicații în agricultură.

Cererea de brevet CN 102512461 A protejează un procedeu de extracție a fitosiliciului 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. Și în acest caz riscul ca soluțiile de acid silicic concentrate să policondenseze necontrolat cu formarea de crustă de silicat sunt considerabile.

A fost propusă recuperarea fitosiliciului și după biorafinarea microbiană a materialului vegetal. Brevetul CN 102260116 se referă la un procedeu de recuperare a fitosiliciului din pleava de orz, care implică: amestecarea a 50-75% pleavă orz, cu 0,5-1,5% consorțiu microbian și cu apă până la 100%; fermentarea semisolidă a amestecului timp de 72 ore; extracția substratului fermentat, cu 20% (procente de masă) soluție NaOH, la 95°C timp de 6 ore; filtrarea pentru a îndepărta reziduurile după extracție și obținerea extractului de biosiliciu. Consorțiul microbian este alcătuit din *Bacillus subtilis*, *Bacillus laterosporus*, și drojdie într-un raport în greutate de: 50 până 80%, 0 până la 50% și, respectiv, 0 până la 35%. Procedul de solubilizare a fitosiliciului implică utilizarea unei soluții alcaline, la temperaturi ridicate. Si în acest caz există un risc ridicat de formare a crustei de silicat.

Brevetul SUA 8026086 prezintă un procedeu prin care se produc concomitent siliciu și cel puțin un alt produs chimic de interes industrial, cum ar fi etanolul, care include următoarele etapele: pre-tratarea materialului vegetal cu conținut ridicat de siliciu, ca de ex. plante din genul *Equisetum*, pentru a crea o materia primă cu celuloza expusă; introducerea respectivei materii prime într-un reactor, conținând un agent biologic eficient în desfacerea celulozei în cel puțin un produs util pentru reacțiile chimice ulterioare, și un co-produs care conține siliciu; separarea a cel puțin unui produs util organo-chimic în reactor; separarea co-produselor care conțin fitosiliciu și rafinarea acestora la silice sau alte forme de

siliciu cu utilizări industriale. Agentul biologic utilizat poate fi constituit din bacterii anaerobe termofile (*Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermohydro-sulfuricum* și *Thermoanaerobacter ethanolicus*), enzime (în special cu activitate celulozolică, produse de exemplu de *Trichoderma reesei*), sau un amestec de enzime și drojdii. Materialul vegetal rezultat după extragerea fitosiliciului este utilizat pentru biorafinare, dar fitosiliciul este utilizat pentru producere de carbură de siliciu sau tetraclorură de siliciu, și nu pentru obținerea de produse utilizabile ca inputuri în tehnologiile agricole.

Reducerea riscului de formare a crustei de silicat se realizează prin folosirea unor agenți de solubilizare prin complexare a siliciului. S-a demonstrat că o serie de catecolați naturali, ca de exemplu acidul protocatehuic / acidul 3,4-dihidroxibenzoic sau acidul galic / acidul 3,4,5-trihidroxibenzoic (Demadis et al 2011, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50: 13866-13876) sau o serie de aminoacizi ca histidina sau fenil-alanina (Demadis și Mavredaki, 2005, *Environmental Chemistry Letters*, 3: 127-131) au capacitatea de crește rata de dizolvare a siliciului, prin formare de complecși.

Un exemplu de brevet care implică formarea unor complecși ai acidului silicic este brevetul francez FR 2610523 B1, care 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 prezenta complexe  $\text{Si}(\text{OR})_4$  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. Procedeu implică însă consumuri ridicate de energie și mari volume de apă, este specific pentru materialul vegetal provenit din plante de coada calului, la care se regăsesc concomitent cantități semnificative de siliciu și de agenți de complexare a acidului ortosilicic, ca de ex. catecoli sau flavone, și este destinat obținerii de suplimente nutritive cu siliciu biologic, și nu unor produse destinate utilizării ca inputuri în tehnologiile agricole, de ex. biostimulanți pentru plante.

S-au revendicat compoziții pentru aplicarea foliară a acidului silicic în care complexanții siliciului sunt declarați ca având o activitate de creștere a biodisponibilității acestuia pentru plante (Cerere de brevet SUA 20140116103). De asemenea există evidențe care sugerează translocarea prin xilem a acidului monosilicic sub formă complexată. Concentrația acidului monosilicic în xilem este, uneori, cu mult peste limita de solubilitate (circa 2 mM) în apă, fără a se produce

formarea precipitatelor de silice coloidală (Mitani și Ma 2005, *Journal of Experimental Botany*, 56: 1255-1261).

Un procedeu prin care s-ar recupera fitosiliciul din materialul vegetal, care ar fi apoi utilizat pentru realizarea unor inputuri agricole ar contribui la reducerea impactului pe care agricultura actuală îl are asupra ciclului biogenic al siliciului (Carey și Fulweiler. 2016, *Functional Ecology*, 30, 1331-1339). În pofida abundenței sale în scoarța pământului, rezervorul de siliciu biodisponibil pentru plante în sol este limitat, reciclarea fitosiliciului fiind esențială pentru asigurarea pe termen lung a fertilității solurilor (Haynes, 2014, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177: 831-844). Rolul benefic al siliciului pentru plante a fost demonstrat prin utilizarea unor mutante care au o capacitate redusă de preluare a siliciului din sol (Ma și Yamaji, 2015. *Trends in Plant Science*, 20:435-442). Exportul de siliciu din sol prin biomasa recoltată de plante cultivate, fără reciclare, determină reducerea rezervorului de siliciu solubil / biodisponibil (Vandevenne, 2012, *Frontiers in Ecology and the Environment*, 10: 243-248), iar preconizata utilizare pe scară largă în procesele de biorafinare a resturilor vegetale, în special a celor cu un conținut ridicat de biosiliciu, cum sunt paiele de grâu sau tuleii de porumb, va accentua fenomenele de desiliciere a solurilor.

Sunt necesare deci procedee prin care să se recupereze fitosiliciul din materialul vegetal, sub forme cu biodisponibilitate cât mai ridicată pentru plante. Optim ar fi ca această recuperare să se realizeze în cadrul etapelor de pre-tratament al materialului vegetal, premergătoare biorafinării propriu-zise.

Autorii au constatat că acizi hidroxicinamici, formați sub acțiunea feruoil-esterazei acționează sinergic cu silicaza, solubilizând cantități semnificative de fitosiliciu.

Silicaza este o polipeptidă care catalizează hidroliza diferitelor forme de dioxid de siliciu / silice, inclusiv cel amorf, cu formare de acidul silicic. Această polipeptidă a fost identificată și în tulpini bacteriene din genurile *Methanosarcina* și *Bacillus*. Aplicațiile ei brevetate sunt pentru modificarea sticlei, nisipului, azbestului, chip-urilor siliconice pentru computere, vatei de sticlă, fibrei de sticlă, fibrelor optice și din siliciu, pentru îndepărtarea nisipului din nisipurile bituminoase, pentru îndepărtarea azbestului și pentru sablare (Brevet SUA 8822188). Nu a fost descrisă încă utilizarea ei pentru solubilizarea siliciului din materialul vegetal.

Feruoil-esteraza este cunoscută ca fiind o enzimă cu o mare versatilitate pentru biorafinarea biomasei (Gopalan et al. 2015, *Bioresource technology*, 193, 534-544), dar nu a fost descrisă încă utilizarea ei pentru solubilizarea siliciului din materialul vegetal.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie un procedeu care integrează această combinație sinergică de enzime cu pre-tratamentul materialului vegetal bogat în siliciu pentru recuperarea prin solubilizare a fitosiliciului și obținerea unor bioproduse cu acțiune de biostimulant pentru plante.

Procedeul dezvoltat prin această invenție constă în următoarele etape:

- ✓ Gonflarea timp de 2 ore a materialului lignocelulozic măcinat până la 2-5 mm, într-un solvent eutectic intens, clorură de clorcolină – glicerol 1M : 2M, în raport de 1 parte material vegetal la 10 părți solvent eutectic;
- ✓ Omogenizarea materialului lignocelulozic într-un mixer rotor-stator, urmată de încălzirea materialului omogenizat timp de 3 ore la 85°C;
- ✓ Adăugarea a 10 părți apă și ultra-omogenizarea amestecului, prin trei treceri printr-un microfluidizator cu camere ceramice zirconice, la un debit de 50 ml/min și o presiune de 1500 bari;
- ✓ Adăugarea peste suspensia de material lignocelulozic ultra-omogenizat a unui 15 părți soluție apoasă care conține  $1,5 \times 10^{-3}$  katali/kg silicază și  $2,5 \times 10^{-3}$  katali/kg feruoil esterază și incubarea timp de 12 ore sub agitare, la o temperatură de 45°C;
- ✓ Separarea materialului vegetal recalcitrant prin filtrare și extracția în 2 părți *n*-butanol a complexelor siliciu – acizi hidroxicinamici, urmată de concentrarea extractelor până la 25% substanță uscată.

Procedeul prezintă următoarele avantaje:

- Solubilizează fitosiliciul și previne depunerea lui ca (poli) silicat datorită complexării în acizi hidroxicinamici;
- Determină obținerea unui compus care are caracteristici de biostimulant pentru plante
- Produce un material lignocelulozic pretratată care este în continuare ușor hidrolizabil prin utilizare de celulaze.

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

*Exemplu 1.* Într-un vas de sticlă Simax® de 25 litri (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică, se adaugă 10 kg de solvent eutectic intens clorură de clorcolină – glicerol 1M : 2M (Scionex, Londra, Marea Britanie) și 1 kg de pleavă de orez și se lasă timp de 2 ore la gonflat. Alternativ solventul eutectic se poate prepara prin amestecare la 80°C a clorurei de clorcolină și a glicerolului, în raportul molar 1:2, și agitare până se formează un lichid omogen transparent (Abbott et al. 2011, *Green Chemistry*, 13, 82–90).

În vasul de sticlă se introduce un mixer rotor-stator Ultra-Turrax® UTC (IKA Werke, Staufen) și se omogenizează materialului lignocelulozic. După omogenizarea completă, dovedită de menținerea în suspensie a materialului vegetal, se ridică temperatura la 85°C, unde se menține timp de 3 ore.

Se răcește amestecul și se adaugă 10 Kg apă distilată. Amestecul de omogenizează din nou cu mixerul rotor-stator, iar apoi se ultra-omogenizează prin trei treceri printr-un microfluidizator cu camere ceramice zirconice, la un debit de 50 ml/min și o presiune de 1500 bari (Microfluidics, Westwood, MA, SUA)

Peste suspensia de material lignocelulozic ultra-omogenizat se adăugă 15 kg soluție apoasă care conține  $1,5 \times 10^{-3}$  katali/kg silicază și 2 și  $2,5 \times 10^{-3}$  katali/kg feruol esterază. Se incubă timp de 12 ore sub agitare, la o temperatură de 45°C.

Preparatul de silicază din compoziția de mai sus este un extract proteic (parțial) purificat din bacterii producătoare de astfel de enzime care hidrolizează legătura oxo-silicice, și are o activitate de min.  $1,5 \times 10^{-3}$  katali/kg, respectiv  $1,5 \times 10^{-3}$  moli acid ortosilicic,  $H_4SiO_4$ , eliberat din silicagel,  $SiO_2 \cdot nH_2O$ , la temperatura camerei și la pH 7,5, în timp de o secundă, per kg de proteină.

Orice preparat enzimatic cu acțiune silicazică poate fi utilizat pentru realizarea compoziției de mai sus, cum este de exemplu cel realizat pe baza brevetului US 8822188 B2, din culturi de *Methanosarcina thermophila*. În realizarea compoziției conform exemplului s-a folosit un preparat enzimatic silicazic obținut dintr-o tulpină de *Brevibacillus parabrevis* B50, depozitată cu numărul de depozit NCAIM (P) B 001413 la National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Universitatea Corvinus din Budapesta, care a fost selectată pentru degradarea accelerată a materialului vegetal provenit tulpinile de cereale, cu un conținut ridicat de biosiliciu.

Preparatul de feruol-esterază din compoziția de mai sus este un extract proteic (parțial) purificat din bacterii producătoare de astfel de enzime care

hidrolizează esterii acidului ferulic, și are o activitate de min.  $2,5 \times 10^{-3}$  katali/kg, respectiv  $2,5 \times 10^{-3}$  moli p-nitrofenil eliberat din p-nitrofenil ferulat, la temperatura camerei. În cadrul acestui exemplu s-a folosit un produs Prozomix (Prozomix, Northumberland, Marea Britanie). Orice preparat enzimatic cu aceleași caracteristici poate fi folosit.

După terminarea perioadei de hidroliză se materialului vegetal recalcitrant prin filtrare sub vacuum de min. -0,5 bar, folosind o unitate Sartolab<sup>®</sup> (Sartorius, Goettingen, Germania). Filtratul se extrage în contracurent, pe o instalație de sticlă Pilot Column (Sulzer Chem, Stockton-on-Tees, Marea Britanie), cu 2 kg de n-butanol. În extractul butanolic se determină conținutul de acid ortosilicic liber și substanța uscată totală, determinată refractometric. Conținutul de acid ortosilicic liber este determinat cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Concentrația de acid silicic este calculată după construcția unei curbe de calibrare, folosind un standard de acid silicic (Merck 170236, Merck-Millipore). Extractul butanolic rezultat după extracția în contracurent conține cel puțin 5% substanță uscată, cu cel puțin 1,2% acid silicic. Se concentrează extractul care include complexe de siliciu, prin evaporare sub vid, cu recuperarea butanolului, prin folosirea unui Rotavapor<sup>®</sup> R-300, (Buchi, Flawil, Elveția).

Materialul lignocelulozic prelucrat conform procedurii se hidrolizează mai repede sub acțiunea celulelor fungice, comparativ cu pleavă de orez gonflată în același solvent eutectic.

*Exemplu 2.* Se procedează ca în exemplu 1, numai că se folosesc tulpini de porumb. Se obține în final un extract cu 5% substanță uscată și cel puțin 0,8% acid silicic.

*Exemplu 3.* Se procedează ca în exemplu 1, numai că se folosesc paie de grâu. Se obține în final un extract cu 5% substanță uscată și cel puțin 0,9% acid silicic.

*Exemplu 4.* Se procedează ca în exemplu 1, numai că se folosește borhot de orz de la fabricarea berii. Se obține în final un extract cu 5% substanță uscată și cel puțin 0,7% acid silicic.

*Exemplu 5.* Extractul rezultat conform Exemplu 1 a fost aplicată pe plante de mazăre, cultivate pe un sistem hidroponic (cu soluții Hoagland complete). Plantele de mazăre erau separate de mediul nutritiv cu tampoane de vată hidrofobă, pentru a evita contaminarea soluției nutritive cu soluție aplicată foliar. A



fost aplicat un tratament de stropire cu o soluție de 0,5% extract conform Exemplu 1 și un tratament martor, realizat cu 0,12% acid silicic. Produsele au fost aplicate prin stropire cu un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Healthcare, Somerset, PA, SUA), câte 2 ml pe fiecare plantă. La 3 zile de la tratament au fost prelevate frunzele și s-a separat fracția citosolică prin tehnica descrisă de Hernandez et al. 2000, *Plant, Cell & Environment*, 23: 853-862. În fracția citosolică s-a determinat acidul ortosilicic cu un kit Merck (Merck Silicate Assay, 1.14794, Merck-Millipore). Rezultatele au demonstrat o creștere cu peste 80% a nivelului de acid ortosilicic în plantele tratate cu extract 0,5 % din compoziția conform Exemplu 1, comparativ cu plante martor, tratate cu acid silicic.

*Exemplul 4.* A fost testat efectul tratamentului cu extract rezultat conform Exemplu 1, 0,5% asupra eficienței de utilizare a zincului. S-a lucrat cu plantule de piersici (*Prunus persica* (L.) Batsch) cv. Suncred. Două semințe de piersic au fost plantate în vase VC10 (diametru 10 mm, înălțime 7,6 cm; volum 0,41 litri) umplut cu nisip spălat, clasificat și calcinat (Făget, Begaminerale, SiO<sub>2</sub> min. 96%, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> max. 0,4%). După germinarea a fost lăsat în fiecare vas numai o plantă, cele mai puțin dezvoltate fiind eliminate. În plantulele rămase a fost eliminată cotiledonul. Plantulele au fost cultivate în condiții hidroponice cu o soluție Hoagland cu un deficit de 10% Zn. Baza tulpinii a fost învelită cu o vată hidrofobă și suprafața vasului de creștere a fost acoperită cu o folie din material plastic și două straturi de hârtie - prosop pentru a preveni contaminarea zonelor radiculare cu soluțiile aplicate prin stropire.

S-a aplicat două tratamente de stropire, la 7 și 21 zile de la eliminarea cotiledonelor, cu o soluție de 0,5% compoziție conform Exemplu 1 și 0,12% martor, acid silicic. Produsele au fost aplicate prin stropire cu un atomizor de sticlă cu dop metalic și pară de cauciuc (model 15-RD, DeVilbiss Healthcare), câte 5 ml pe fiecare plantă.

La 2 săptămâni de la ultimul tratament s-a desființat experiența. S-a determinat suprafața foliară primară, suprafața radiculară și conținutul de zinc în țesuturile foliare. O probă de material foliar de 0,5 g, cântărită cu precizie a fost mineralizată cu un amestec de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, SUA) și HNO<sub>3</sub> 65% (Merck, Germania), (3:5, v/v). Mineralizarea probelor s-a realizat într-un digester cu microunde (Berghof, Eningen, Germania). După mineralizare probele au fost transferate într-un balon cotat de 50 ml și diluate cu apă pură

miliQ. În soluția rezultată s-a determinat conținutul de zinc, folosind un sistem Optima 2100 DV ICP-OES (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, SUA). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.

Tab. 1. Influența tratamentelor foliare cu extract de fitosiliciu asupra eficienței de preluare și utilizare a zincului

Tratament	Suprafață foliară (cm <sup>2</sup> )	Suprafață radiculară (cm <sup>2</sup> )	Conținutul de zinc în țesuturi (mg/kg)
Martor, tratat cu apă distilată	46,2	54,6	6,1
Martor, acid silicic 0,12%	58,6	62,2	6,4
Extract cf. Ex.1, 0,5%	86,6	108,7	8,9
DL5%	6,7	8,8	1,4

Rezultatele din tabelul 3 dovedesc că aplicarea prin stropire a compoziției obținute conform Exemplu 1 determină o semnificativă ameliorare a preluării și utilizării zincului. Acest fapt este deja cunoscut pentru siliciul aplicat radicular (Mehrabanjoubani et al. 2015, Pedosphere, 25, 192-201).

*Exemplu 5.* Compoziția obținută conform Exemplu 1 a fost testată din punct de vedere a acțiunii de biostimulant pentru plantele nutraceutice, determinându-se influența tratamentelor foliare asupra acumulării compușilor biologic activi în *Passiflora caerulea* L. Plantele nutraceutice au fost cultivate pe preluvosol roșcat molic, fertilizat echilibrat conform recomandărilor agrochimice. Tratamentele foliare s-au aplicat în a doua decadă a lunii mai și la începutul lunii iulie, când plantele erau la începutul înfloritului, și, respectiv, la sfârșitul perioadei de înflorit. S-au aplicat doze echivalente a 1 litri/ha de extract conform exemplu la începutul înfloritului, și, respectiv, 2 litri/ha la sfârșitul înfloritului. S-au aplicat o soluții de 0,5% din extractul conform Exemplu 1, într-o normă de stropire echivalentă a 200 l/ha la începutul înfloritului, și de 400 l/ha la sfârșitul înfloritului. Aplicarea soluțiilor s-a realizat cu ajutorul unei pompe de spate SG20 (Stihl AG, Waiblingen, Germania), prin stropire de la 40 cm, cu o presiune de stropire stabilită la 275 kPa, folosind o duză cu jet plat și derivă limitată (TeeJett® flat-fan TT11002 model, Spraying Systems Co., Wheaton, IL, SUA). Tratamentele s-au realizat într-un experiment care a inclus și un martor netratat cu siliciu, amplasat randomizat în 4 repetiții.

La 2 săptămâni de la tratament s-au prelevat probe în care s-au determinat principalele ingrediente biologice active.

Materialul vegetal (frunze *P. caerulea*) 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. caerulea* s-a determinat activitatea antioxidantă, prin măsurarea capacității respectivelor extracte de stinge: cationii radicalici produși de acidul 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-sulphonat) (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 DPPH (Gaspar et al. 2014, *Romanian Biotechnological Letters*, 19: 9353-9365).

Tab. 2. Activitatea antioxidantă în extractul de material vegetal provenit din plante de *Passiflora caerulea*.

Varianta experimentală	TEAC / g s.u.		%DDPH	
	Primul tratament	Al doilea tratament	Primul tratament	Al doilea tratament
Martor, netratat cu siliciu	75,24 ± 4,15b	76,92 ± 5,64b	27,32 ± 1,28a	26,24 ± 1,64b
Tratament extract cf. ex.1, 1 tratament 1 l/ha, după 3 săptămâni 1 tratament 2 l/ha	91,42 ± 4,8a	92,37 ± 6,42a	28,42 ± 1,65a	34,72 ± 1,93a

Rezultatele prezentate în tab. 2. demonstrează că aplicarea foliară a extractului obținut conform Exemplu 1, determină o creștere a activității antioxidante de peste 20% în frunzele de *P. caerulea*. Activitatea antioxidantă este în directă legătură cu utilizările fitoterapeutice ale plantelor de *Passiflora* (Sarris et al. 2013, *CNS Drugs*, 27: 301-319).

Extractul pe bază de siliciu obținut conform Exemplu 1 prezintă caracteristicile unui biostimulant pentru plante pentru că determină creșterea eficienței de utilizare a nutrienților și favorizează acumularea de compuși biologici activi în culturile de plante nutraceutice.

## Revendicare

1. Procedul de solubilizare a siliciului din material vegetal caracterizat prin aceea că este alcătuit din următoarele etape: gonflarea timp de 2 ore a materialului lignocelulozic măcinat până la 2-5 mm, într-un solvent eutectic intens, clorură de clorcolină – glicerol 1M : 2M, în raport de 1 parte material vegetal la 10 părți solvent eutectic; omogenizarea materialului lignocelulozic într-un mixer rotor-stator, urmată de încălzirea materialului omogenizat timp de 3 ore la 85°C; adăugarea a 10 părți apă și ultra-omogenizarea amestecului, prin trei treceri printr-un microfluidizator cu camere ceramice zirconice, la un debit de 50 ml/min și o presiune de 1500 bari; adăugarea peste suspensia de material lignocelulozic ultra-omogenizat a unui 15 părți soluție apoasă care conține  $1,5 \times 10^{-3}$  katali/kg silicază și  $2,5 \times 10^{-3}$  katali/kg feruoil esterază și incubarea timp de 12 ore sub agitare, la o temperatură de 45°C; separarea materialului vegetal recalcitrant prin filtrare și extracția în 2 părți *n*-butanol a complexelor siliciu – acizi hidroxicinamici, urmată de concentrarea extractelor până la 25% substanță uscată.