



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2013 00895**

(22) Data de depozit: **25/11/2013**

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

(41) Data publicării cererii:
30/01/2015 BOPI nr. 1/2015

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

(72) Inventatori:
• **OANCEA FLORIN,** *STR. PAȘCANI NR.5,*
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **KUMBAKISAKA SYLVIU AMUNDALA**
RENAUD, *BD. NICOLAE TITULESCU*
NR. 94, BL. 14A, SC. 4, AP. 171, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **PĂTRAȘCU MARIANA,**
STR.GĂRII DE NORD NR.2, BL.C, SC.3,
AP.81, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
F. GUO ȘI AL., "SOLID ACID MEDIATED
HYDROLYSIS OF BIOMASS FOR
PRODUCING BIOFUELS", *PROGRESS*
ENERGY AND COMBUSTION SCIENCE,
VOL. 38, PP. 672-690, 2012; WO
2009/134816 A1; G. CRAVOTTO ȘI AL.,
"IMPROVED EXTRACTION OF
VEGETABLE OILS UNDER
HIGH-INTENSITY ULTRASOUND AND/OR
MICROWAVES", ULTRASONIC
SONOCHEMISTRY, VOL. 15, PP. 898-902,
2008

(54) **PROCEDEU DE RECUPERARE A COMPUȘILOR BIOACTIVI
DIN PLANTE AROMATICE**



1 Prezenta invenție se referă la un procedeu de recuperare a compușilor bioactivi din
2 plante aromatice. Invenția se referă la un procedeu de valorificare complexă a materialului
3 vegetal, în special a materialului vegetal din plante aromatice, prin extracție secvențială a
4 diferitelor componente active, hidrofobe și hidrofile și/sau amfifile, și prelucrarea ulterioară
5 a materialului extras, pentru obținerea de compuși cu utilizări diverse, ca ingrediente active
6 pentru produse cosmetice sau farmaceutice, aditivi alimentari sau furajeri, suplimente nutri-
7 tive, produse pentru stimularea și/sau protecția plantelor cultivate, materii prime pentru mate-
8 riale bio-compozite și fertilizanți/amelioratori de sol.

9 Sunt cunoscute procedee care au ca scop valorificarea cât mai completă a diferiților
10 compuși prezenți în materialul vegetal, provenit din plante aromatice și/sau medicinale. Prin
11 procedeele uzuale se extrag specific din plantele aromatice fie componente bio-active hidro-
12 fobe (uleiuri esențiale), fie componente hidrofile/amfifile (de exemplu polifenolii antioxidanți).
13 Materialul vegetal rezidual rămas după extragerea acestor componente continuă să fie o
14 sursă de diferite componente cu utilizări practice, inclusiv ingrediente pentru produse natu-
15 rale bio-active - a se vedea, de exemplu, review-ul **Santana Meridas et al., 2012,**
16 **Phytochem. Rev. 11:447-466.** Cererea de brevet **WO 0033859 A1** descrie un procedeu de
17 extracție (simultană) a uleiurilor esențiale și a antioxidanților (polifenolici) din plante aro-
18 matiche din familia *Labiatae/Lamiaceae*, prin folosirea unui amestec de solvenți. Procedeu
19 este destinat în special grupului de plante aromatice constituit de: rozmarin, salvie, isop,
20 oregano, maghiran, mentă, sovârv, lavandă. Amestecul de solvenți folosit este tetrafluor-
21 etanul, între 60 și 95%, și un solvent organic, acetona și/sau etanolul și/sau metanolul. Prin
22 înlăturarea amestecului de solvenți se obține un lichid uleios, cu activitate antioxidantă, și cu
23 o foarte bună miscibilitate cu uleiurile comestibile, cum este, de exemplu, uleiul de soia.
24 Procedeu nu revendică o etapă precis delimitată, prin care să se separe componentele
25 amfifile antioxidante de uleiul esențial hidrofob, deși include un exemplu prin care separă prin
26 distilare componentele unui ulei esențial, dintr-un extract obținut după eliminarea tetrafluor-
27 etanului din amestecul rezultat prin procesarea timp de 1 h, la o temperatură de 25...26°C
28 și la o presiune de 7 bar, a 1 parte material vegetal cu 10 părți solvenți, din care 80% tetra-
29 fluoretan, 12% metanol și 8% acetonă.

30 Un alt dezavantaj al procedeuului descris de cererea de brevet **WO 0033859** este
31 determinat de utilizarea ca solvent a tetrafluoretanului, compus a cărui utilizare este în curs
32 de restrângere datorită acțiunii sale de gaz de seră, cu potențial de încălzire global de 1300 -
33 a se vedea, de exemplu, Propunerea de Regulament a Parlamentului European și a
34 Consiliului privind gazele fluorurate cu efect de seră, COM (2012) 643 final. De asemenea,
35 procedeu nu include etape prin care să se valorifice în continuare materialul vegetal, rămas
36 ne-extras în amestecul inițial de solvenți, care mai conține o serie de compuși, din care se
37 pot obține produse cu valoare adăugată.

38 Întrucât procedeu descris prin **WO 0033859** nu revendică în mod specific etape prin
39 care să se realizeze o separare ulterioară a fracției antioxidante hidrofob/amfifilă de uleiurile
40 esențiale, autorii au perfecționat procedeu prin cererea de brevet **WO 01126472 A1**. În
41 cadrul acestui procedeu de extracție perfecționat, extractul rezultat după evaporarea solven-
42 tului este procesat prin evaporare, într-un evaporator pelicular sau cu fascicul (laminar) tubu-
43 lar, la temperaturi și presiuni care determină evaporarea uleiurilor esențiale, cu reținerea
44 compușilor antioxidanți în fracția reziduală, și condensarea uleiurilor esențiale într-un distilat.
45 Procedeu prezentat de cererea de brevet **WO 01126472 A1** continuă să folosească un
46 amestec de solvenți în care constituentul de bază, de la 60% până la 95%, este tetrafluor-
47 etanul. Nici în procedeu perfecționat nu sunt incluse etape prin care să se valorifice în
continuare materialul vegetal extras.

RO 129987 B1

Brevetul **FR 2903016 B** dezvăluie un procedeu de extracție a unui material vegetal, 1
cât mai complet posibil, fără utilizare de solvenți, prin care părți dintr-una sau mai multe 3
plante, în prealabil tratate prin tehnica de detentă instantanee controlată (DIC), transferă toți 3
compuşii lipofili și hidrofilii solubilizabili din plante, ca fază mixtă uleios/apoasă sau ca emulsii 5
apă în ulei/ulei în apă, în formulări de compuși cosmetici. Procedeu poate să includă 5
eventual o etapă în care materialul vegetal este incubat într-o fază uleioasă, fază apoasă sau 7
emulsie apă în ulei sau ulei în apă. Detenta instantanee controlată este realizată cu presiuni 7
inițiale de la 1 la 12 bar, cu sau fără pre-hidratare cu ajutorul vaporilor de apă sau prin orice 9
altă metodă, implică sau nu utilizarea unor tehnici de încălzire, inclusiv cu microunde, iar tre- 9
cerea de la presiune la vid total sau parțial durează de la o miime de secundă la 2 s. Parti- 11
culele solide neextrase sunt eliminate prin filtrare pe câteva tipuri de filtre, cu porozități din 11
ce în ce mai fine. Materialul vegetal pe care este exemplificat procedeu este reprezentat de 13
Aloe barbadensis, emolient, stimulant, antiinflamator și catifelant; *Arnica montana*, calmant, 13
decongestionant și antiseptic; *Calendula officinalis*, calmant, vaso-protector, cicatrizant, 15
antiseptic și decongestionant; *Althea officinalis*, catifelant și hidratant; *Hamamelis virginiana* 15
decongestionant, calmant și astringent; *Lavandula angustifolia*, antiseptic și cicatrizant; 17
Quillaya saponaria, detergent, stimulant cutanat și keratinolitic; *Matricaria chamomilla*, 17
calmant, antiinflamator și decongestiv; *Panax ginseng*, revitalizant, tonifiant și stimulant; 19
Coffea arabica, cu acțiune de slăbire, protector antioxidant și restructurant; *Lawsonia 19*
inermis, antiseptic, astringent și colorant.

Procedeu necesită un echipament dedicat, al cărui cost este ridicat, prin care se 21
realizează detenta instantanee controlată, prin trecere de la presiuni de peste 1 bar la vid 23
parțial sau total într-un timp foarte scurt, de la o miime de secundă la 2 s. Un alt dezavantaj 23
al procedeuului este faptul că nu descrie modalități de valorificare a componentelor utile din 25
materialul vegetal neextras, separat prin filtrare de ingredientele active pentru produsele cos- 25
metice. De asemenea, procedeu extrage un amestec al acestor ingrediente active, hidro- 27
file/amfifile și hidrofobe, neincluzând etape prin care să se obțină separat compușii hidro- 27
fili/amfifili de cei hidrofobi, care să permită o flexibilitate mai ridicată în valorificarea ulterioară 29
a acestor compuși, nu numai pentru realizarea de produse cosmetice.

Cererea de brevet **CN 10305534 A** se referă la un procedeu de extracție a uleiurilor 31
esențiale din plante aromatice și medicinale (chinezești), cu utilizarea completă a celulozei 31
pentru obținerea de celuloză regenerată, acetat de celuloză sau glucoză. Plantele medicinale 33
și aromatice pentru care este revendicat procedeu includ: angelica, busuiocul, scorțișoara, 33
magnolia, menta, curcuma, rododendron, forsythia, eucaliptul. Extracția este realizată cu 35
lichide ionice, reprezentate de: clorură de 1-butil-3-metilimidazol; acetat de 1-butil-3- 35
metilimidazol; fosfat de 1-butil-3-metilimidazol dibutil; clorură de 1-etil-3-metilimidazol; acetat 37
de 1-etil-metilimidazol; clorură de 1-etil-3-metilimidazol, singure sau în amestec de două sau 37
mai multe. Raportul de extracție este de la 1:20 la 1:5, la o temperatură de 80...100°C, cu 39
distilare timp de 5...40 min pentru obținerea uleiurilor esențiale. Din amestecul lichid-ionic 39
material vegetal se regenerează celuloza prin centrifugare, după precipitare cu apă, etanol 41
sau acetonă. Acetatul de celuloză se obține prin reacția celulozei extrasă în lichidul ionic cu 41
anhidridă acetică, în raport de la 5:1 la 3:1, este precipitat din amestec cu apă sau izo-propil 43
alcool și se recuperează prin centrifugare. Glucoza se obține din celuloza dizolvată în lichide 43
ionice prin reacție de hidroliză cu acid clorhidric, sulfuric sau azotic.

Procedeu descris în cererea de brevet **CN 10305534 A** nu include etape de 45
recuperare a compușilor antioxidanți (polifenolici) hidrofilii/amfifili prezenți în materialul 45
vegetal și nu descrie modalități de recuperare și utilizare a celorlalți compuși asociați 47
celulozei în materialul vegetal, respectiv lignina, hemicelulozele, sărurile minerale.

RO 129987 B1

1 Cererea de brevet **SUA 2012/0316330** descrie un procedeu pentru conversia inte-
3 grată a materialului lignocelulozic la zaharide sau biocombustibili și nano-celuloză/(ligno)
celuloză nano-fibrilată. Procedeu implică tratarea materialului celulozic cu una sau mai multe
5 enzime, pentru a obține zaharide fermentescibile și lignoceluloză recalcitrantă, urmată de
prelucrarea mecanică a unei suspensii diluate de lignoceluloză recalcitrantă, între 0,3 și
7 1,5% (m/V) în apă deionizată, prin trecere repetată, la presiuni ridicate, prin camere micro-
fluidice de 200 și 87 μm, pentru a produce (ligno)celuloză nano-fibrilată.

Procedeu nu include etape prin care să se valorifice compușii biologici activi prezenți
9 în materialul vegetal (lignocelulozic), compuși care au o valoare adăugată mare, și nu
menționează procesarea ulterioară a ligninei recalcitrante, care nu se poate nano-fibrila prin
11 tratamente mecanice repetate. Nanofibrilele de celuloză obținute nu sunt separate total de
lignină, iar prelucrarea mecanică se realizează cu un echipament care este scump, ceea ce
13 face ca ridicarea la scară a procedurii să fie capital intensivă.

Cererea de brevet **RO 128904 A** prezintă un procedeu de valorificare complexă a
15 ingredientelor active benefice din materialul vegetal provenit de la plante care conțin alergeni
și/sau compuși toxici, care include următoarele etape: extracția materialului vegetal cu o
17 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 sepa-
19 rate de la extracție, la temperatura de 800...1000°C; macerarea cenușii rezultate din mate-
rialul vegetal extras cu extractul hidro-alcoolic, timp de 24 h, la temperatura 20...25°C; sepa-
21 rarea prin filtrare a extractului hidroalcoolic cu microelemente din cenușă chelatare în
polifenolii (antioxidanți) extrași.

23 Acest procedeu nu include modalități prin care să se asigure o recuperare cu un
randament superior a uleiurilor esențiale prezente în materialul vegetal, care au o acțiune
25 benefică și sunt lipsite de efect alergen și/sau toxic, și nu include etape de valorificare a
polizaharidelor din matricea extracelulară a țesuturilor vegetale.

27 Lucrarea științifică **F. Guo et al. "Solid acid mediated hydrolysis of biomass for
producing biofuels" Progress Energy and Combustion Science, 2012, vol. 38, pp. 672-
29 690** trece în revistă tehnicile convenționale pentru pretratarea și hidroliza biomasei. Astfel,
se face referire la hidroliza biomasei în câmp de microunde sau în prezență de ultrasunete,
31 menționând totodată că hidroliza materialelor lignocelulozice se poate efectua în lichide
ionice, în câmp de microunde, pentru a crește procentul de solubilizare al celulozei.

33 Cererea internațională de brevet **WO 2009/134816 A1** descrie un procedeu de prelu-
crare a materialelor lignocelulozice cu obținerea de materiale care pot fi convertite apoi mai
35 ușor de microorganisme în produse folositoare, ca hidrogen, alcoolii, acizi organici, hidro-
carburi, proteine, ș.a. Procedeu cuprinde o etapă de pregătire a probei, o etapă de pratra-
37 tament și o etapă de fermentare. Etapa de pretratament poate conține una sau mai multe
etape de iradiere, de exemplu cu microunde, de sonicare, de oxidare sau de piroliză. Aceste
39 etape pot fi aplicate în orice ordine sau simultan, în scopul de a extrage compuși folositori
și de a degrada parțial materialul vegetal. În funcție de compușii care se doresc a fi obținuți,
41 în etapa de prefermentare se pot folosi diferite microorganisme sau enzime.

Din stadiul tehnicii se cunoaște că extracția uleiurilor naturale din materiale vegetale
43 se poate efectua în câmp de microunde și/sau ultrasunete (**G. Cravotto et al, "Improved
extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves",
45 Ultrasonic Sonochemistry, 2008, vol. 15, pp. 898-902**).

Sunt necesare procedee prin care să se realizeze o recuperare completă și complexă
47 a diferitelor componente de interes prezente în materialul vegetal provenit din plantele aro-
matiche și/sau medicinale, într-un timp cât mai scurt, cu randamente ridicate și consumuri
49 reduse de solvenți și energie. Pentru creșterea profitabilității este necesar și un procedeu

RO 129987 B1

complementar, prin care să se recupereze și alte componente, materii prime pentru bio-produse cu valoarea adăugată mare, din materialul vegetal rămas după extracția uleiurilor esențiale și a antioxidanților. Un obiect al acestei invenții este acela de a descrie un astfel de procedeu, prin care să se realizeze extracția secvențială a diferitelor componente, hidrofobe și hidrofile și/sau amfifile, și prelucrarea ulterioară a materialului extras, pentru obținerea diferitelor materii prime pentru bio-produse - uleiuri esențiale, extracte polifenolice antioxidante, oligozaharide cu activitate de activare a rezistenței plantelor, polizaharide utilizabile ca aditivi alimentari și sau suplimente nutritive/fibre solubile, nanoceluloză, steroli cu acțiune de stimulare a plantelor și de repelent pentru insecte, bio-ulei și bio-cărbune utilizabil ca fertilizant/ameliorator de sol.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape: extracția uleiurilor esențiale prin încălzirea materialului umectat în câmp de microunde; extracția hidrolitică asistată de ultrasunete a polifenolilor antioxidanți din materialul vegetal din care s-au extras uleiurile esențiale, cu formare de β -oligozaharide, care acționează ca elicitori/activatori ai rezistenței sistemice în plante, și a materialului vegetal neextras M1; extracția pectinei, hemicelulozei și celulozei ușor solubile din materialul vegetal M1, prin amestecare cu lichide ionice și încălzire în câmp de microunde, urmată de omogenizarea la înaltă presiune pentru solubilizarea nano-celulozei; separarea prin filtrare tangențială a polizaharidelor solubilizate și/sau suspendate de materialul lignocelulozic recalcitrant M2, urmată de separarea prin centrifugare a nano-celulozei și de precipitarea cu alcool etilic a polizaharidelor solubile; extracția hidrolitică a sterolilor și a acizilor grași din materialul lignocelulozic recalcitrant M2, cu separarea materialului lignocelulozic recalcitrant M3; conversia în bio-ulei și bio-cărbune a materialului lignocelulozic recalcitrant M3 prin piroliză asistată de microunde.

Aspectele preferate ale procedurii descris mai sus sunt:

- extracția uleiurilor esențiale din materialul vegetal umectat timp de 10 min, prin imersare în apă distilată, în raport de 1 parte material vegetal uscat la 4 părți apă distilată, prin încălzire timp de 20 min în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500 W, la temperaturi de maximum 92°C, și recuperarea gravitațională a condensatului de uleiuri esențiale;

- extracția hidrolitică asistată de ultrasunete a polifenolilor antioxidanți din materialul vegetal din care s-au extras uleiurile esențiale, prin tratare, timp de 4 h, a 1 parte de material vegetal cu 25 părți soluție de alcool etilic 30% în apă, conținând 1,5 mg/ml complex 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 neextras M1 de extractul hidro-alcoolic, precipitarea din filtratul hidro-alcoolic 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 pectinei și hemicelulozei din materialul vegetal M1, separat prin filtrare în etapa anterioară, prin tratarea a 1 parte material M1 cu 20 părți lichid ionic, sare de etil-sulfat a 1-etil-3-metilimidazol, în câmp de microunde, timp de 6 min, la o putere de 300 W și la o temperatură de 85°C, urmată de omogenizarea sub presiune într-un omogenizator cu piston, 25 cicluri la 150 MPa, a amestecului material M1- lichid ionic;

- separarea prin filtrare tangențială a polizaharidelor solubilizate și/sau suspendate, de materialul lignocelulozic recalcitrant la solubilizare M2, urmată de separarea prin centrifugare 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;

RO 129987 B1

1 - extracția hidrolitică a steroidelor și acizilor grași din materialul lignocelulozic recal-
citrant la solubilizare M2, prin tratare, timp de 4 h, a 1 parte de material vegetal cu 20 părți
3 soluție de alcool etilic 40% în apă, conținând 2 mg/ml lipaza B din *Candida antarctica*, cu
5 minimum 9 unități lipazice per mg, la pH 7,5, temperatura de 50°C, cu ultrasonicare inter-
7 mitentă, 5 min la fiecare 30 min, la 20 kHz și cu o putere de 500 W, urmată de separarea prin
filtrare a materialului vegetal rezidual M3 de extractul hidro-alcoolic, și de concentrarea prin
evaporare până la sec a soluției alcoolice, cu recuperarea azeotropului etanol-apă 96%, și
reluarea extractului solid în etanol 96%, soluție 20% substanță uscată;

9 - conversia în bio-cărbune și bio-ulei a materialului lignocelulozic recalcitrant M3, prin
piroliza asistată de microunde, la o putere incidentă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz,
11 timp de 20 min, sub vaccum, care inițial este de 30 mbar, și care crește până la 0,3 bar la
punctul maxim de încălzire.

13 Procedeu conform invenției prezintă următoarele avantaje:

15 - asigură o recuperare complexă și completă a diferiților compuși utili din materialul
vegetal, uleiuri esențiale, extracte polifenolice antioxidante, oligozaharide cu activitate de
17 activare a rezistenței plantelor, polizaharide utilizabile ca aditiv alimentari și/sau suplimente
nutritive/fibre solubile, nanoceluloză, steroli cu acțiune de stimulare a plantelor și de repelent
pentru insecte, bio-ulei și bio-cărbune;

19 - un timp mai scurt de extracție a uleiurilor esențiale din materialul vegetal, cu un
randament superior, și o mai bună menținere în uleiurile esențiale a componentelor (esterice)
21 (termo)hidrolizabile, ca, de exemplu, acetatul de linalil, și cu o formare mai redusă a
compușilor de termodegradare, de exemplu 4-terpineolul format din linalool, comparativ cu
23 metoda standard de hidrodistilare/antrenare cu vapori;

25 - un randament crescut de extracție a fenolilor antioxidanți datorită eliberării agli-
conilor din glicozide de către enzimele β -glucanazice, cu formare concomitentă de β -oligo-
zaharide, care sunt elicitori/activatori ai sistemului de apărare din plante;

27 - extrage pectinele, hemicelulozele și celuloza solubilă din materialul vegetal, care
au utilizări ca aditivi alimentari și suplimente nutritive/fibre solubile;

29 - valorifică steroidele din plante, care au acțiune de stimulare a creșterii și dezvoltării
plantelor (brassinosteroide) sau de repelenți pentru insecte (saponine steroidice);

31 - produce celuloză nanofibrilată formată exclusiv din celuloză, cu utilizări în realizarea
de materiale bio-compozite;

33 - transformă lignoceluloza recalcitrantă în biocombustibil și bio-cărbune;

35 - 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;

37 - permite obținerea unei întregi serii de bio-produse care sunt utilizabile ca inputuri
în tehnologiile agricole de cultivare a plantelor - β -oligozaharide care activează exprimarea
39 sistemului de apărare din plante, sterioide care au acțiune de stimulare a creșterii și dez-
voltării plantelor sau de repelenți pentru insectele dăunătoare culturilor agricole, bio-cărbune
41 fertilizant/ameliorator de sol, asigurând în acest fel închiderea, cu valoare adăugată, a unui
circuit biomimetic de producere și de valorificare bio-resurse.

43 În continuare, se prezintă un exemplu de realizare care ilustrează invenția fără a o
limita.

45 Exemplu

47 1000 g de inflorescențe de levănțică (*Lavandula angustifolia Mill.*) uscate, sunt
umectate prin imersare timp de 10 min în 4 l apă distilată. Materialul vegetal se scurge de
49 excesul de lichid prin presare ușoară și se introduce într-un flacon de sticlă pyrex de 3 l, pre-
văzut cu capac cu gât rodat, care include și o frită de reținere material vegetal. Se fixează

RO 129987 B1

capacul pe reactorul de sticlă cu cleme de teflon și se montează într-un reactor cu microunde (Minilabotron 2000, Sairem, Neyron, Franța), cu gâtul rodat în jos, în afara incintei iradiate cu microunde. Pe gâtul rodat se fixează un refrigerent spiralat, care se ancorează pe diagonală de 2 din picioarele de sprijin ale stativului de susținere a reactorului cu microunde și căruia i se adaugă un flacon erlenmeyer receptor în partea finală. Se încălzește timp de 20 min în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500 W, la temperaturi de maximum 92°C. Datorită atracției gravitaționale, un amestec de vapori de apă și uleiuri esențiale, eliberat de acțiunea aburului generat *in situ* de încălzirea cu microunde, se scurge în partea inferioară a reactorului de sticlă, trece în refrigerent, în afara câmpului de microunde, unde condensează, și de unde este continuu colectat în flaconul colector. Condensatul este trecut în pâlnie de separare, unde faza hidrofobă este separată de faza hidrofilă. Uleiul esențial separat se usucă pe sulfat de sodiu anhidru și se păstrează la 4°C până la utilizare. Faza hidrofilă, care reprezintă hidrolatul, respectiv apa, care a solubilizat componente cu polaritate mai ridicată din uleiul esențial, se trece în flacon de sticlă brună și se păstrează la fel la rece până la utilizare.

Procedeul descris mai sus a fost utilizat pentru extracția a 1000 g de inflorescențe de levănțică uscată, provenite dintr-o cultură amplasată lângă Silistra, Bulgaria. În paralel, s-a realizat un extract prin antrenare cu vapori, din același tip de inflorescențe, folosind un aparat de tip Clevenger, conform European Pharmacopoeia (5th edition, European Pharmacopoeia Commission. Ed. Council of Europe: Strasbourg, France, 2004). S-au repetat extracțiile de trei ori.

Randamentele de extracție au fost de $4,4 \pm 0,1$ g ulei esențial la 100 g de inflorescențe uscate de levănțică, în cazul extracției asistate de microunde, și de $3,8 \pm 0,3$ ulei esențial la 100 g de inflorescențe uscate de levănțică, în cazul extracției prin antrenare cu vapori. Creșterea cu 10% a randamentului de extracție în cazul procedurii asistate de microunde este asigurată statistic. Timpul de extracție necesar procedurii de antrenare prin vapori a fost de cel puțin 60 min, comparativ cu cel de 20 min necesar procedurii de extracție asistată de microunde.

Din uleiurile esențiale provenite prin aplicarea procedurii de extracție asistate de microunde și prin antrenare cu vapori, au fost prelevate probe care au fost analizate prin gascromatografie 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 x 0,25 mm x 0,25 μm grosime film. Condițiile de operare au fost următoarele: volumul split-less injectat a fost de 1 μl, 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 quadropolului 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 procedeul de extracție a uleiurilor esențiale asistate de microunde, descris mai sus, și cel standard, de extracție a uleiurilor esențiale prin antrenare cu vapori, sunt prezentate în tabelul 1 de mai jos. În acest tabel sunt prezentate numai 12 componente din cele peste 33 identificate în uleiul esențial de levănțică, componente care, împreună, reprezintă peste 90% din uleiul esențial de levănțică. Rezultatele arată că, pe lângă randamentul superior și timpul mult mai scurt de extracție, procedeul de extracție asistat de microunde determină și o mai bună menținere în uleiurile esențiale a componentelor (esterice) (termo)hidrolizabile, ca, de exemplu, acetatul de linalil, și cu o formare mai redusă a compușilor de termodegradare, de exemplu 4-terpineolul format din linalool, comparativ cu procedeul standard de hidrodistilare/antrenare cu vapori.

1
3
5
7
9
11
13
15
17

Valorile medii ale componentelor majore ale uleiului esențial de levănțică extras prin hidrodistilare și gravitațional, după încălzire asistată de microunde, conform procedurii descris în invenție

Componentă	Antrenare vapori	Asistat microunde
Eucaliptol	3,32 ± 0,08	4,24 ± 0,32
Camfor	6,24 ± 0,12	6,51 ± 0,24
Linalol	49,15 ± 0,47	38,71 ± 1,82
Acetat de linalil	15,42 ± 0,52	29,82 ± 1,78
4-Terpineol	2,42 ± 0,08	1,41 ± 0,02
Acetat de lavandulil	2,12 ± 0,04	1,75 ± 0,03
Lavandulol	4,8 ± 0,12	4,92 ± 0,24
Acetat de geranil	1,53 ± 0,06	0,32 ± 0,02
Nerol	0,82 ± 0,07	0,33 ± 0,03
Geraniol (E)	1,52 ± 0,02	0,87 ± 0,01
α-Cadinol	1,09 ± 0,04	0,87 ± 0,03
α-Bisabolol	2,25 ± 0,03	1,46 ± 0,02

19
21

Evaluarea organoleptică nu a dus la evidențierea unor diferențe sesizabile între uleiul esențial extras prin antrenare cu vapori și cel obținut prin extracție asistată de microunde, conform procedurii descris mai sus.

23
25
27

Materialul vegetal din care s-au extras uleiurile esențiale se trece într-un vas de sticlă Simax® de 50 l (Kavalier, Sazava, Cehia), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică, și un sistem de recirculare cu o celulă de flux 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 alcool etilic conține 1,5 mg/ml complex de hidrolaze produs de *Trichoderma viride*, cu minimum 200 unități β-glucan *Botrytis* per g.

29
31
33
35
37
39
41
43

Complexul de hidrolaze folosit este Glucanex 200 G (Novozyme A/S, Bagsvaerd, Danemarca), un amestec de enzime litice din *Trichoderma harzianum*, care include celuloze, 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 l 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 h, se separă materialului vegetal neextras M1 de extractul hidro-alcoolic, prin filtrare pe un filtru cu presiune (RPF T01, BHS-Sonthofen, Sonthofen, Germania), la 0,6 MPa. Din extractul hidroalcoolic se precipită oligozaharidele, prin adăugare de alcool etilic 96%, în raport de 10 volume alcool etilic 96% la 1 volum filtrat, și se separă prin centrifugare 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 10000 rpm, echivalent a 8500 x g; la o rată de alimentare de 1 l/min, cu

RO 129987 B1

separarea continuă a extractului hidroalcoolic 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/m ³ . Concentratul rezultat se usucă sub vid la 75°C. Se separă cca 85 g de compuși formați prin hidroliza enzimatică a materialului vegetal.	1 3
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).	5 7
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-Ciocalteu (Merck, Darmstad, 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-Ciocalteu, flavonoidele total fiind calculate ca diferență.	9 11 13 15
S-a determinat și activitatea antioxidantă 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-sulfonic)].	17
S-a comparat cu un extract alcoolic realizat din extragerea aceluiși material vegetal, din care s-au extras anterior uleiurile esențiale prin procedeul asistat de microunde, în raport de 1 parte material vegetal la 50 părți soluție alcool etilic 30%, timp de 4 h, la 50°C. Rezultatele determinărilor au fost raportate per gram de material vegetal uscat.	19 21
Extracția hidrolitică conform procedurii propusă determină obținerea de 114 ± 18 mg fenoli totali, din care 74 ± 9 mg flavonoide totale, cu o activitate antioxidantă de 2,04 mM echiv. trolox, per gram de substanță uscată de material, comparativ cu 42 ± 8 mg fenoli totali, din care 18 ± 6 mg flavonoide totale, cu o activitate antioxidantă de 0,87 mM echiv. trolox, per gram de substanță uscată de material, în cazul extragerii cu o soluție hidroalcoolică.	23 25 27
Extracția hidrolitică a polifenolilor antioxidanți cu amestec de hidrolaze produs de <i>Trichoderma</i> 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 - a se vedea, de exemplu, review-ul Hermosa et al., 2013, Int. Microb., 16:69-80.	29 31 33
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 g l ⁻¹ 2,4-D, 1 mg l ⁻¹ tiamină, 100 mg l ⁻¹ mio-inozitol, 200 mg l ⁻¹ KH ₂ PO 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 <i>Laminaria digitala</i> (Sigma Aldrich). O doză de 175 μ 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 μ g/ml laminarină. Laminarina este omologată ca biofungicid pentru combaterea bolilor foliare la legume și pomi fructiferi, prin activarea sistemică a rezistenței plantelor de cultură, deci și compușii separați prin precipitare cu alcool din soluția rezultată după extracție hidrolitică, care conțin β -oligozaharide, obținuți prin procedeul descris mai sus, care au o activitate biologică similară, de elictori 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.	35 37 39 41 43 45 47 49

RO 129987 B1

1 Materialul vegetal neextras M1, separat prin filtrare în etapa anterioară, și care este
2 875 g, se trece într-un vas de reacție de 25 l Simax® (Kavalier) și se tratează cu 18,5 l lichid
3 ionic, sare de etil-sulfat a 1-etil-3-metilimidazoliu (BASF, Ludwigshafen am Rhein, Germania).
4 Din vasul de reacție se trece continuu cu o pompă peristaltică printr-un reactor de sticlă
5 pyrex montat în flux în câmpul de microunde al unui reactor cu microunde (Minilabotron
6 2000, Sairem), timp de 6 min, la o putere de 300 W și la o temperatură de 85°C. Suspensia
7 de material vegetal, încălzită la 85°C, se omogenizează într-un omogenizator cu piston, GEA
8 Niro Soavi Arriete NS2006 (GEA Niro Soavi, Parma, Italia) prevăzut cu o valvă tip „muchie
9 de cuțit”, 25 cicluri la 150 MPa.

10 Polizaharidele solubilizate și/sau suspendate se separă de materialul lignocelulozic
11 recalcitrant la solubilizare M2 prin filtrare tangențială pe un echipament Sartocoon® care
12 conține cartușe de filtrare Slice Hydrosart® (Sartorius, Goettingen, Germania). Din filtrat se
13 separă prin centrifugare continuă concentratul de nanoceluloză, prin centrifugare pe o centri-
14 fugă continuă model SA 1-02-175 (GEA Westfalia), care este operată la o viteză a discurilor
15 de centrifugare de 10000 rpm, echivalent a 8500 x g. Din supernatant se precipită polizaha-
16 ridele, prin adăugare de alcool etilic 96%, în raport de 10 volume alcool etilic 96% la 1 volum
17 supernatant. Polizaharidele precipitate se recuperează prin centrifugare, iar recuperarea
18 azeotropului etanol-apă 96% și a lichidului ionic se realizează prin folosirea unui Evaporator
19 25 l/h Simax® (Kavalier).

20 Se separă circa 52 g de nanoceluloză și 80 g de polizaharide solubile. Nanoceluloza
21 obținută conform procedurii de mai sus a fost caracterizată prin spectrometrie IR cu trans-
22 formantă Fourier, pe un spectrometru Tensor 27 (Bruker, Billerica, MA, SAU), și prin difracție
23 de raze X pe un difractometru D8 Advance (Bruker), folosind CuK α cu o lungime de undă de
24 0,154 nm în domeniul 2 θ - 10...40%, la o tensiune de 40 kV și un curent de 40 mA. Cristalini-
25 tatea s-a calculat prin metoda Segal et al., 1959, Text. Res. J. 29:786-794. Dimensiunile
26 nanocelulozei au fost determinate prin microscopie electronică, prin folosirea unui crio-TEM
27 Hitachi HT 7700 (Hitachi, Tokyo, Japonia), operat la 120 kV. Banda de absorbție de la
28 1734 cm⁻¹, atribuită grupărilor C=O din lignină și hemiceluloze, nu mai este prezentă în
29 probele de nanoceluloză obținute, care pot fi considerate ca fiind pure. Cel mai mare
30 procentaj al diametrului și raportului de aspect l/d pentru nanoceluloza obținută conform
31 procedurii descris mai sus este 20...30, cu o frecvență a diametrului de 68% și cu o
32 frecvență a raportului de aspect l/d de 55%. Cristalinitatea a fost determinată a fi de 72,54%.
33 Aceste date arată că nanoceluloza fibrilată obținută prin procedura descrisă mai sus poate fi
34 utilizată ca agent de ranforsare a bio(nano)compozitelor.

35 Polizaharidele solubile precipitate cu etanol au fost analizate prin folosirea de enzime
36 specifice, conform metodei Navarro et al. 2010, Microb, cell factor. 9:58. S-a determinat o
37 proporție de 34% pectină, 42% hemiceluloze și 24% celuloză solubilă. Aceste polizaharide
38 solubile sunt utilizabile ca aditivi alimentari sau suplimente nutritive (fibre solubile).

39 725 g din materialul lignocelulozic recalcitrant la solubilizare M2 se trece într-un vas
40 de sticlă Simax® de 25 l (Kavalier), prevăzut cu manta de termostatare, agitare mecanică,
41 și un sistem de recirculare cu o celulă de flux FC100L1-1S (Hielscher Ultrasonics), împreună
42 cu 14,5 kg de soluție de alcool etilic 40% în apă, cu pH-ul ajustat la 7,5, conținând 2 mg/ml
43 lipază B din *Candida antarctica*, cu minimum 9 unități lipazice per mg.

44 Lipaza folosită este Lipozyme Cal B1, (Novozyme A/S, Bagsvaerd, Danemarca), lipaza
45 B din *Candida antarctica*, exprimată în *Aspergillus niger*, cu minimum 9 unități lipazice per
46 mg. O unitate lipazică este definită ca fiind acea cantitate de enzimă care, în condiții
47 standard, la 40,0°C, pH 7,0, eliberează 1 μ mol de acid butiric per min din tributirină folosită

RO 129987 B1

ca substrat. 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 l 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 h, se separă materialul lignocelulozic recalcitrant M3 de extractul hidroalcoolic, prin filtrare pe un filtru cu presiune (RPF T01, BHS-Sonthofen), la 0,6 MPa. Extractul hidroalcoolic se concentrează până la circa 1 l prin folosirea unui Evaporator 25 l/h Simax® (Kavalier), cu recuperarea azeotropului etanol-apă 96%, după care se evaporă la sec prin folosirea unui evaporator rotativ Rotavapor 251 R (Buchi Labortechnik, Flawil, Switzerland). Se separă cca 45 g de compuși, amestec de steroide și acizi grași, care sunt reluați în alcool etilic 96%, soluție 20% substanță uscată.

În amestecul de steroide și acizi grași separat conform procedurii de mai sus au fost determinate activitățile de stimulare a creșterii plantelor și de repelent pentru insectele dăunătoare, prin folosirea unor bioteste. Activitatea de stimulare a creșterii și dezvoltării plantelor, corespunzătoare brassinosteroidelor, a fost determinată prin biotestul plantulelor de *Raphanus sativus L.*, după metoda descrisă de Takatsuto et al., 1983, Phytochem. 22:2437-2441, cu mici modificări. S-au folosit plantule în vârstă de 4 până la 5 zile, în cinci repetiții, care au fost introduse în soluțiile test, reprezentate de diferite diluții, și menținute la întuneric pentru 24 h la 25 ± 2°C. După 24 h s-a măsurat lungimea hipocotilului, care a fost comparată cu lungimea hipocotilului unor plantule martor tratate numai cu apă. Biotestul s-a repetat de două ori, calculându-se procentul de creștere suplimentară față de martor. S-a folosit și un produs standard, castasteron (Bk) [(22R,23R,24S)-2α,3α,22,23-tetrahidroxi-24-metil-5α-cholestan-6-on], OlChemIm, Olomuc, Cehia, în concentrație de 10⁻¹⁰ M. O diluție de 100 ori a soluției de amestec de steroide și acizi grași are aceeași activitate cu soluția standard de castasteron 10⁻¹⁰ M, ceea ce înseamnă un echivalent de 4,64 μg în amestecul extras dintr-un kg inițial de material vegetal uscat. Având în vedere dozele cuprinse între 10 și 30 mg de brassinosteroidelor (a se vedea, de exemplu, Serna et al., 2012, Plant Growth Reg. 68:333-342), concentrația obținută prin acest procedeu permite aplicarea în practică a procedurii.

Pentru testarea efectului repelent și antifeeding al amestecului de steroide și acizi grași, s-a utilizat biotestul larvelor de gândac de Colorado, determinându-se inhibarea hrănirii $FI = [1 - (T/C)] \times 100$, unde T și C sunt consumurile de discuri de frunze tratate și, respectiv, netratate (martor), conform metodei descrise de Reina et al., 2002, J. Nat. Prod. 65:448-153. Diluația de 100 ori a extractului concentrat 20% de amestec de steroide și acizi grași a determinat o inhibare a hrănirii FI de 97,5 ± 1,8%, ceea ce este semnificativ pentru utilizarea practică a produselor rezultate prin ridicarea la scară a procedurii.

Materialul lignocelulozic recalcitrant M3 se convertește în bio-cărbune și bio-ulei, prin piroliză asistată de microunde. Tratamentul cu microunde se realizează folosind un reactor cu microunde (Minilabotron 2000, Sairem), cu un modul de: vacuum amplasat în serie (VA 2000, Milestone, Sorisole, Italia), după o trapă de vacuum răcită cu apă pentru colectarea și condensarea vaporilor produși în timpul pirolizei. 500 g de material lignocelulozic recalcitrant se introduc într-un reactor de sticlă pirex de 3 l. Se expune materialul vegetal la o putere incidentă constantă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz, timp de 20 min, sub vacuum, care inițial este de 30 mbar, și care crește până la 0,3 bar la punctul maxim de încălzire. Se obține o cantitate de 163,5 g de bio-cărbune, corespunzând unei conversii de 32,7% în bio-cărbune și de 141,5 g bio-ulei, corespunzând unei conversii de 28,7% a materialului vegetal inițial în bio-ulei.

RO 129987 B1

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 de 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 analog DIN 51719/EN 14775, conținutul de carbon, hidrogen, azot, sulf și oxigen (calculat), conform 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, 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, Si, 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 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 tabelul 2, comparativ cu valorile stabilite de European Biochar Foundation (EBC) pentru bio-cărbunele din categoria premium. Aceste rezultate demonstrează că bio-cărbunele obținut prin aplicarea procedurii conform invenției, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant, se încadrează în categoria premium stabilită de EBC:

Tabelul 2

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

Caracteristică calitate	Limite Euro-Char premium	Bio-cărbune conform procedeu
Umiditate	< 5%	3,87%
Carbon total	> 50%	57,2%
Carbon organic	10...40%	38,7%
Raport molar H/C	< 0,6	0,48
Raport molar H/O	< 0,4	0,32
Elemente nutritive	1...40%	6,865
P		2,34%
Mg		0,43%
Ca		0,87%
K		1,48%
Fe		0,03%
S		0,28%
Si		1,43%

Tabelul 2 (continuare)

Caracteristică calitate	Limite Euro-Char premium	Bio-cărbune conform procedeu
Metale grele/microelemente		
Pb	Pb < 120 g/t SU;	25,3 ± 1,5
Cd	Cd < 1 g/t SU;	0,52 ± 0,07
Cu	Cu < 100 g/t SU;	10,8 ± 1,2
Ni	Ni < 30 g/t SU;	5,8 ± 0,8
Hg	Hg < 1 g/t SU;	0,07 ± 0,01
Zn	Zn < 400 g/t SU;	210,2 ± 18,6
Cr	Cr < 80 g/t SU	34,5 ± 4,72
Suprafață specifică	> 150 m ² /g	292 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 prin folosirea unui aparat de analiză elementală 2400 series II CHNS/O Analyzer (Perkin Elmer); apa în bio-ulei a fost determinată prin folosirea unui Titrator Karl Fischer titrator (Schott, Mainz, Germany; ASTM D 1744).

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

Tabelul 3

Caracteristicile fizico-chimice ale bio-uleiului obținut conform procedurii descris, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant

Caracteristică	Unitate măsură	Bio-ulei cf. Ex.	Bio-uleiuri convenționale*
pH		2,87	2,0...3,8
Umiditate	wt%	15,2	15...30
Densitate la 20°C	g/mk	1,25	1,1...1,4
Valoarea calorică	MJ/kg	17,51	15...19
Compoziție elementală	wt%		
C		60,66	55,3...63,5
H		7,70	5,2...7,0
N		2,02	0,07...0,39
S		0,15	0,00...0,05
Conținut cenușă	wt%	0,04	0,03...0,30
Conținut solide	wt%	0,22	< 1

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

RO 129987 B1

- 1 Bio-uleiul obținut conform procedurii descrise, prin piroliza asistată de microunde a materialului lignocelulozic recalcitrant, este similar altor tipuri de bio-ulei.
- 3 Procedura descrisă conform invenției se poate utiliza și pentru material vegetal provenit din alte plante aromatice în afară de levănțică, în special pe plante aromatice din familia
- 5 *Labiatae/Lamiaceae*, care au concomitent un conținut ridicat de uleiuri volatile și polifenoli antioxidanți, și din care se pot extrage, prin prelucrarea ulterioară a materialului extras,
- 7 diferite alte materii prime pentru bio-produse - oligozaharide cu activitate de activare a rezistenței plantelor, polizaharide utilizabile ca aditivi alimentari și sau suplimente nutritive/fibre solubile, nanoceluloză, steroli cu acțiune de stimulare a plantelor și de repelent pentru
- 9 insecte, bio-ulei și bio-cărbune utilizabil ca fertilizant/ameliorator de sol.

1. Procedeu de recuperare a compușilor bioactivi din plante aromatice, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: extracția uleiurilor esențiale prin încălzirea materialului umectat în câmp de microunde; extracția hidrolitică asistată de ultrasunete a polifenolilor antioxidanți din materialul vegetal din care s-au extras uleiurile esențiale, cu formare de β -oligozaharide, care acționează ca elicitori/activatori ai rezistenței sistemice în plante, și a materialului vegetal neextras M1; extracția pectinei, hemicelulozei și celulozei ușor solubile din materialul vegetal M1, prin amestecare cu lichide ionice și încălzire în câmp de microunde, urmată de omogenizarea la înaltă presiune pentru solubilizarea nano-celulozei; separarea prin filtrare tangențială a polizaharidelor solubilizate și/sau suspendate de materialul lignocelulozic recalcitrant M2, urmată de separarea prin centrifugare a nano-celulozei și de precipitarea cu alcool etilic a polizaharidelor solubile; extracția hidrolitică a sterolilor și a acizilor grași din materialul lignocelulozic recalcitrant M2, cu separarea materialului lignocelulozic recalcitrant M3; conversia în bio-ulei și bio-cărbune a materialului lignocelulozic recalcitrant M3 prin piroliză asistată de microunde.

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extracția uleiurilor esențiale se realizează din materialul vegetal umectat timp de 10 min, prin imersare în apă distilată, în raport de 1 parte material vegetal uscat la 4 părți apă distilată, prin încălzire timp de 20 min în câmp incremental de microunde, de la 400 la 500 W, la temperaturi de maximum 92°C, și recuperarea gravitațională a condensatului de uleiuri esențiale.

3. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extracția hidrolitică asistată de ultrasunete a polifenolilor antioxidanți din materialul vegetal din care s-au extras uleiurile esențiale se realizează prin tratare, timp de 4 h, a 1 parte de material vegetal cu 25 părți soluție de alcool etilic 30% în apă, conținând 1,5 mg/ml complex 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 neextras M1 de extractul hidroalcoolic, precipitarea din filtratul hidroalcoolic, 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%.

4. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extracția pectinei și hemicelulozei din materialul vegetal M1 separat prin filtrare în etapa anterioară se realizează prin tratarea a 1 parte material M1 cu 20 părți lichid ionic, sare de etil-sulfat a 1-etil-3-metilimidazol, în câmp de microunde, timp de 6 min, la o putere de 300 W și la o temperatură de 85°C, urmată de omogenizarea sub presiune într-un omogenizator cu piston, 25 cicluri la 150 MPa, a amestecului material M1 - lichid ionic.

5. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** separarea prin filtrare tangențială a polizaharidelor solubilizate și/sau suspendate, de materialul lignocelulozic recalcitrant la solubilizare M2, urmată de separarea prin centrifugare a fibrelor de nano-celuloză, și de precipitarea polizaharidelor solubile din supernatant, se realizează 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.

6. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** extracția hidrolitică a steroidelor și acizilor grași din materialul lignocelulozic recalcitrant la solubilizare M2 se realizează prin tratare, timp de 4 h, a 1 parte de material vegetal cu 20 părți soluție de alcool etilic 40% în apă, conținând 2 mg/ml lipază B din *Candida antarctica*, cu minimum 9 unități

RO 129987 B1

1 lipazice per mg, la pH 7,5, 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 mate-
3 rialului vegetal rezidual M3 de extractul hidro-alcoolic, și de concentrarea prin evaporare
până la sec a soluției alcoolice, cu recuperarea azeotropului etanol-apă 96%, și reluarea
5 extractului solid în etanol 96%, soluție 20% substanță uscată.

7. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** etapa de conversie
7 în bio-cărbune și bio-ulei a materialului lignocelulozic recalcitrant M3 se realizează prin
piroliză asistată de microunde, la o putere incidentă de 1200 W și o frecvență de 2450 MHz,
9 timp de 20 min, sub vaccum, care inițial este de 30 mbar, și care crește până la 0,3 bar la
punctul maxim de încălzire.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 384/2018