



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00578

(22) Data de depozit: 18/08/2017

(41) Data publicării cererii:
28/02/2019 BOPI nr. 2/2019

(71) Solicitant:
• STAȚIUNEA DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU VITICULTURĂ ȘI
VINIFICAȚIE IAȘI,
ALEEA MIHAIL SADOVEANU NR. 48, IAȘI,
IS, RO

(72) Inventatori:
• NECHITA ANCUȚA,
ALEEA MIHAIL SADOVEANU 16B, BL.V1,
SC.B, AP.5, IAȘI, IS, RO;

• DELEANU CONSTANTIN,
COMUNA CEPLENIȚA, IAȘI, IS, RO;
• NICULAU MARIUS,
ALEEA MIHAIL SADOVEANU 16B, BL.V1,
SC.B, AP.5, IAȘI, IS, RO;
• FILIMON VASILE RĂZVAN,
STR.MOLDOVEI NR.4, BL.MOLDOVA,
SC.C, ET.7, AP.27, PAȘCANI, IS, RO;
• MIHAI COSMIN TEODOR,
STR.PĂCURARI NR.128, BL.586, SC.A,
ET.2, AP.8, IAȘI, IS, RO;
• PAȘA RODICA, STR.DE NORD NR.14,
IAȘI, IS, RO

(54) METODĂ DE PURIFICARE ȘI PROCEDEU DE EXTRAȚIE
A PROANTOCIANIDINELOR CONDENSATE POLIMERICE
DIN SEMINȚELE DE STRUGURI, PENTRU OBTINEREA
UNUI BIOPRODUS NATURAL

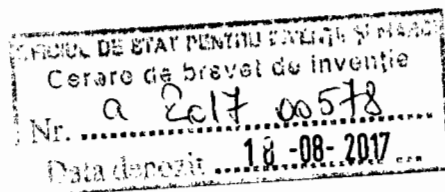
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de purificare a unui preparat brut de proantocianidine condensate polimerice, obținut din deșeu de semințe de struguri delipidat, prin extracția etapizată a compușilor fenolici cu alcool etilic 96%, concentrarea extractului polifenolic până la o densitate de 1,0...1,1 g/ml și extracția lichid/lichid cu eter dietilic. Procedeu, conform invenției, nu necesită operațiuni complexe, având la bază pro-

prietatea de insolubilizare în apă a proantocianinelor polimerice, rezultând un preparat bioactiv cu puritate de 95%, cu activitate antioxidantă și antibacteriană, care poate fi valorificat în industria farmaceutică, cosmetică și alimentară.

Revendicări: 3
Figuri: 5





METODA DE PURIFICARE SI PROCEDEU DE EXTRAȚIE A PROANTOCIANIDINELOR CONDENSATE POLIMERICE DIN SEMINȚELE DE STRUGURI PENTRU OBTINEREA UNUI BIOPRODUS NATURAL

DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la extracția etapizată a compușilor fenolici cu alcool etilic, din semințele de struguri delipidate, extracția lichid/lichid (L/L) a extractului concentrat polifenolic cu eter dietilic, pentru obținerea precipitatului brut de proantocianidine (PA) condensate și purificarea acestuia prin o metodă bazată pe proprietatea de insolubilizare în apă distilată.

Proantocianidinele (PA) numite și taninurile condensate au ca structură de bază unități de flavan-3-ol, secvențial polimerizate, prin legături $4\beta \rightarrow 6$; $4\beta \rightarrow 8$; $4\beta \rightarrow 8 \cdot 2\beta \rightarrow 7$.

În acest context proantocianidinele denumite în continuare PA condensate de la dimeri la pentameri, sunt numite proantocianidine oligomerice, iar de la hexameri sau cu grad mai înalt de polimerizare sunt numite PA condensate polimerice.

Semințele de struguri reprezintă sursă cea mai bogată în compuși fenolici extractibili în care grupul compușilor flavonidelor este cel mai abundent, incluzând monomeri flavan-3-ol, PA condensate oligomerice și PA condensate polimerice.

PA condensate reprezintă o sursă naturală importantă datorită proprietăților biologice active cu efect anti-inflamator, anti-viral, anti-tumoral, anti-bacterian, anti-fungic și antioxidant (EN-QIN XIA et. al., 2010; BHISE S. et. al., 2014). Astfel, PA condensate din semințele de struguri pot fi utilizate, ca principii bioactive în industria farmaceutică și cosmetică ca antioxidanți naturali în industria alimentară și în agricultură în combaterea unor boli.

Sunt cunoscute diferite procedee de extracție a compușilor fenolici oligomerici și metode de purificare a preparatelor brute. Acestea sunt prezentate în literatura nonbrevet din bibliografia anexată și brevetele EP 0 632 480 (1986), US 5 484 594 (1996), US 5 273 262 (1998), US 6 800 433 (2004). În aceste brevete extracțiile compușilor fenolici PA oligomerice s-au realizat folosind ca solvent apă sau amestec apă solvent (acetonă, alcool) la temperaturi între 5°C - 55°C, timpul de extracție, de la câteva ore la 10 zile, extracțiile fiind repetate de două sau mai multe ori.

Metodele de obținere a PA oligomerice din extractele polifenolice brute cunoscute s-au efectuat în mai multe etape, prin filtrări pe membrane speciale urmate de extracții și precipitări repetate cu solvenți. Eliminarea contaminanților: acizi fenolici, monomeri, săruri, proteine, zaharuri s-a efectuat prin cromatografia pe coloane, obținându-se în final preparate PA oligomerice cu diferite grade de puritate de la 60% la 90%.

În studiile analitice cunoscute extracția compușilor fenolici din semințe de struguri s-a

efectuează utilizând concentrații mari de solvenți (acetonă, alcool etilic) în amestec cu apă 80 % v/v cât și direct 100% solvent, la diferite temperaturi, 25°C, 35°C și 50°C, timp de 3 -12 ore, sau mai îndelungat în funcție de temperatură. Scopul urmărit de autori în procesele extractive cu solvenții menționați a fost de a evalua cantitativ diferite clase de compuși fenolici (NEGRO C. et al., 2003, WANG C.Z., et al 2005), de a extrage PA condensate cu alcool etilic 96% (DUCA Ghe., 2006), de a optimiza extracțiile compușilor fenolici cu etanol folosind diferite concentrații de la 0 - 100% (CHEW K. K. et. al., 2011) sau de a verifica eficiența solvenților organici (etanol, acetonă) în amestec cu apa v/v și 100% solvent (VAYUPHARP B. et. al., 2012). În ce privește extracția compușilor fenolici, obișnuit s-a utilizat metoda de extracție pe principiu Soxhlet.

Informațiile obținute relevă faptul că PA condensate cu grad de polimerizare înalt, pot fi extrase când se utilizează solvenți în concentrații mari.

Noutatea invenției constă într-o metoda nouă de extracție și de purificare a preparatului brut de proantocianidine (PA) condensate polimerice obținut din semințele de struguri delipidat aparținând soiului Fetească neagră.

Metoda propusă, originală constă într-o serie de procese și operațiuni care conduc la obținerea preparatului brut de proantocianidine condensate polimerice astfel:

A. Extracția etapizată a compușilor fenolici cu alcool etilic 96% din deșeurile de semințe de struguri delipidat

B. Concentrarea extractului polifenolic cumulat până la un volum și densitate determinată.

C. Extracția lichid/lichid (L/L) a extractului polifenolic concentrat /solvent eter dietilic și obținerea precipitatului brut de PA condensate polimerice.

D. Purificarea precipitatului brut de PA condensate polimerice.

Prezentarea detaliată a metodei propuse de inventatori pentru extracția și purificarea preparatului brut de proantocianidine:

A. Extracția etapizată a compușilor fenolici din deșeurile vegetale delipidate s-a efectuat în trei etape la temperatură de 30°C utilizând ca solvent alcoolul etilic 96%. Prima extracție s-a efectuat cu raportul solid/lichid de 1/4, în condiții de agitare intermitentă timp de 24 ore. Extractul polifenolic 1 obținut a fost separat de reziduu vegetal. Au urmat încă două extracții a reziduuului vegetal în care raportul solid/lichid a fost de 1/3 și 1/2, obținându-se astfel extractele polifenolice 2 și 3. Extractele 1, 2 și 3 au fost reunite în extractul cumulat, care a fost depozitat timp de 6 zile la temperatura de 4°C.

Această metodă de abordare a proceselor extractive este mult mai eficientă din punct de vedere economic comparativ cu metoda de extracție Soxhlet deoarece:

- ✓ permite prelucrarea unor cantități mari de material vegetal în procesul de extracție a compușilor fenolici;
- ✓ previne saturarea solventului în compuși fenolici prin separare fazială a extractelor obținute;
- ✓ reduce consumul de solvent în etapele II și III, deoarece în prima etapă la raportul 1/4 se extrage cea mai mare cantitate de compuși fenolici;
- ✓ consumul de energie pentru menținerea temperaturii de 30°C este redus, comparativ cu metoda Soxhlet, în care procesul extractiv se realizează la 70 - 80°C;
- ✓ agitarea intermitentă pe parcursul proceselor extractive favorizează reducerea timpului de extracție.

B. Extractul fenolic cumulat, din etapa A, se filtrează, iar filtratul este concentrat sub vid la temperatura de 37°C în două trepte. În prima treaptă, concentrarea este efectuată pînă la un volum de 300 - 500 mL, urmată de centrifugare timp de 30 minute la 8000 rpm pentru eliminarea particulelor fine de material vegetal. În a doua treaptă concentrarea extractului s-a efectuat pînă la un volum determinat cu densitate de 1,0 - 1,1 g/mL.

În această etapă s-a recuperat solventul, alcoolul etilic, care poate fi reutilizat în etapa A, pentru extracția compușilor fenolici din deșeurile de semințe de struguri delipidat fără a afecta randamentul de extracție. De asemenea, reziduu vegetal rezultat din procesul de extracție poate fi utilizat ca îngrășământ organic natural, nefiind poluant, fapt demonstrat după administrarea în sol, prin analizele microbiologice și analiza enzimatică a dehidrogenazei active și potențiale în sol, utilizată ca enzimă de referință în testarea poluanților.

C. Extracția lichid/lichid (L/L) a extractului polifenolic concentrat, obținut în etapa B, cu eter dietilic conduce la obținerea unui preparat brut de PA condensate sub forma unui precipitat solid consistent, care se separă de faza lichidă după 20 - 30 minute. Precipitatul brut de PA condensate format este adus la greutate constantă la temperatura de 40°C. După dizolvarea precipitatului brut de PA condensate în alcool etilic s-a determinat concentrația totală de polifenoli (CFT) exprimată în mg GAE/mg preparat prin metoda Folin-Ciocalteu (Singleton și Rossi, 1965) și activitatea antioxidantă (AA%/100 μg preparat) cu reactivul DPPH, conform metodei propuse de Brand-Williams și colab. (1994), cu modificarea adusă de Miliauskas și colab. (2004). Din analizele efectuate s-a constatat că preparatul brut de PA condensate conține 0,676 mg GAE/mg preparat brut și activitatea antioxidantă 94,18% /100 μg. În această etapă, s-a recuperat solventul eter dietilic din faza lichidă.

D. Metoda de purificare propusă a preparatului brut de PA condensate nu necesită operații complexe deoarece se bazează pe proprietatea de insolubilizare în apă a PA condensate. În vederea utilizării precipitatului brut de PA condensate ca substrat pentru obținerea unui bioprodus natural cu posibilitate de comercializare în industria farmaceutică, cosmetică și alimentară este necesară etapa de purificare.

Prin solubilizarea în alcool etilic a preparatului brut de PA condensate și efectuarea analizei la UHPLC (metoda Castellari et al., 2008), conform cromatogramei din figura 1, s-au identificat pe lângă peak-ul amplu al PA condensate polimerice, peak-uri ale acizilor fenolici (galic, protocatehic, p-hidroxibenzoic, m-hidroxibenzoic, sirinic), peak-uri ale monomerilor de catechină și epicatechină și un număr de peak-uri neidentificate. De asemenea, este posibilă prezența și altor contaminanți, de exemplu zaharuri și proteine, însă cantitativ sunt minimalizați datorită utilizării în procesele extractive a solventului concentrat alcool etilic 96%, care nu favorizează antrenarea acestora din deșeurile de semințe de struguri delipidat.

Protocolul de lucru al metodei de purificare, cuprinde următoarele operațiuni:

1. Precipitatul brut de PA condensate, obținut după 20 - 30 minute, în etapa C, se reia în 20 - 50 mL apă distilată cu pH 7,0 și se omogenizează pînă la dispariția aglomerărilor de precipitat.

2. Produsul omogenizat se dispersează în 1,950 L apă distilată cu pH 7,0. După 10 minute se instalează procesul de depunere gravitațională a PA condensate, care continuă timp de 60 minute, formându-se în final un depozit dens. Această operațiune se execută încă o dată.

3. Supernatantele s-au eliminat prin sifonare și au fost analizate la UHPLC, iar depozitul de PA condensate s-a centrifugat la 8000 rpm timp de 30 minute. După eliminarea apei distilate din cuvele de centrifugare, precipitatul de PA condensate purificat a fost reluat în 20 - 40 mL alcool etilic 96%.

4. Următoarele operațiuni au fost eliminarea solventului la temperatura de 40°C, pînă la greutate constantă și condiționarea PA condensate purificate în stare solidă în flacoane de sticlă brună la temperatura de - 10°C.

Proprietatea de solubilizare în alcool etilic 96% a preparatului de PA condensate purificat nu a fost afectată în urma acestui tratament. De asemenea, valorile activității antioxidante (AA%) și cantitatea de fenoli totală (CFT) a preparatului purificat au crescut comparativ cu valorile preparatului nepurificat de la 94,118% la 94,919% și respectiv de la 0,685 mg GAE/mg preparat brut la 0,898 mg GAE/mg preparat purificat.

Din analiza cromatogramelor la UHPLC (figurile 2, 3 și 4) a probelor de apă rezultate în procesul de purificare a precipitatului brut de PA condensate, s-a constatat reducerea progresivă a amplitudinii peak-urilor acizilor fenolici și a monomerilor catechină și epicatechină.

Preparatul de PA condensat purificat dizolvat în alcool metilic a fost analizat UHPLC. Conform figurei nr. 5, în cromatogramă nu mai apar peak-urile acizilor fenolici și monomerilor, ci doar un peak larg, amplu, spre finalul cromatogramei, care corespunde PA condensate polimerice cu o distribuție a indicelui de polimerizare larg comparabil cu metodele de exclusiune sterică de minim cinci ordine dimensionale (n indicele de polimerizare).

Gradul de puritate al produsului de PA a fost verificat și prin extracția selectivă cu solvenți a compușilor monomerice și oligomerici (fracția F1 + F2), și a fracției polimerice (F3) prin separarea pe cartuș de tip C18 Sep - PAC. Eluția s-a efectuat cu apă distilată pH 7,0. După uscarea cartușului, s-a continuat eluția cu acetat de etil pentru a separa PA oligomerice și monometrice și apoi eluția cu alcool etilic pentru separarea PA polimerice. Frațiile obținute (F1 + F2) și (F3) au fost evaporate, iar reziduurile uscate la 105°C au fost cântărite. Reziduiul fracției (F1 + F2) a fost de 2,8 mg/100 mg preparat purificat, iar al fracției polimerice F3 de 95 mg/100 mg preparat purificat. Aceste rezultate relevă că prin metoda propusă de purificare a precipitatului brut de PA condensate s-a obținut un preparat de PA condensate polimerice cu o puritate de 95%.

Se prezintă în continuare un exemplu de metoda de realizare a invenției:

1 kg de deșeu de semințe de struguri delipidat a fost utilizat în extracția etapizată a compușilor fenolici cu raporturile solid/lichid: 1/4, 1/3 și 1/2, folosind ca solvent alcoolul etilic de 96%, la temperatura de 30°C, timp de 24 ore în fiecare etapă. În total s-au consumat 9 L solvent. Volumul cumulat al extractelor (1 + 2 + 3) a fost după filtrare de 7,650 L.

Extractul cumulat, conform etapelor prezentate în descrierea detaliată a proceselor extractive a fost concentrat pînă la 500 mL (A), urmat de centrifugare timp de 20 minute la 8000 rpm și concentrarea pînă la volumul de 225 mL (B). Din totalul de 7,650 litri solvent s-au recuperat 7,300 litri.

Urmează apoi extracția lichid/lichid a extractului concentrat B cu 675 mL eter dietilic pentru obținerea precipitatului brut de proantocianidine (PA) condensate și recuperarea din faza lichidă a eterului dietilic, respectiv 615 mL.

Precipitatul brut de PA condensate a fost purificat, conform metodei prezentate detaliat la punctul D, iar în final s-a obținut 30,693 g preparat PA condensat purificat, solubil în alcool etilic și insolubil în apă distilată. Inducerea proprietății de solubilizare în apă a PA condensate purificate s-a efectuat prin tratamentul fizico - chimic cu H₂O₂, în condiții optime determinate privind cantitatea de agent oxidant/preparat PA condensate purificat, temperatură și timp de contact al reactanților. Rezultatul tratamentului fizico -chimic a condus la obținerea unui bioprodus natural solubil în apă distilată cu activitate AA de 91,38%, activitate antibacteriană față de bacteriile test *Staphilococcus aureus* și *Escherichia coli*, precum și activitate antifungică

METODA DE PURIFICARE SI PROCEDEU DE EXTRAȚIE A PROANTOCIANIDINELOR CONDENSATE POLIMERICE DIN SEMINȚELE DE STRUGURI PENTRU OBȚINEREA UNUI BIOPRODUS NATURAL

REVENDICĂRI

Metoda si procedeul de extracție și purificare a proantocianidinelor condensate polimerice, **caracterizate prin aceea ca procedul de extracție si metoda purificare** are patru revendicari descrise in cadrul fircarei etape (1, 2, 3, 4) a compușilor fenolici și a PA condensate polimerice din deșeul de semințe de struguri delipidat astfel:

1. **Extracția compușilor fenolici din deșeul de semințe de struguri delipidat** cu alcool etilic 96%, la temperatura de 30°C, în condiții de agitare intermitentă, timp de 24 ore, în trei etape la raporturile solid/lichid 1/4, 1/3,1/2.

Extracția etapizată a compușilor fenolici din deșeul vegetal delipidat s-a efectuat în trei etape la temperatură de 30°C utilizând ca solvent alcoolul etilic 96%. Prima extracție s-a efectuat cu raportul solid/lichid de 1/4, în condiții de agitare intermitentă timp de 24 ore. Extractul polifenolic 1 obținut a fost separat de reziduu vegetal. Au urmat încă două extracții a reziduuului vegetal în care raportul solid/lichid a fost de 1/3 și 1/2, obținându-se astfel extractele polifenolice 2 și 3. Extractele 1, 2 și 3 au fost reunite în extractul cumulat, care a fost depozitat timp de 6 zile la temperatura de 4°C.

Această metodă de abordare a proceselor extractive este mult mai eficientă din punct de vedere economic comparativ cu metoda de extracție Soxhlet deoarece:

- ✓ permite prelucrarea unor cantități mari de material vegetal în procesul de extracție a compușilor fenolici;
 - ✓ previne saturarea solventului în compuși fenolici prin separare fazială a extractelor obținute;
 - ✓ reduce consumul de solvent în etapele II și III, deoarece în prima etapă la raportul 1/4 se extrage cea mai mare cantitate de compuși fenolici;
 - ✓ consumul de energie pentru menținerea temperaturii de 30°C este redus, comparativ cu metoda Soxhlet, în care procesul extractiv se realizează la 70 - 80°C;
 - ✓ agitarea intermitentă pe parcursul proceselor extractive favorizează reducerea timpului de extracție.
2. **Concentrarea extractului polifenolic cumulat obținut în etapele extractive I, II și III** la densitate de 1,0 - 1,1.
Extractul fenolic cumulat, din etapa A, se filtrează, iar filtratul este concentrat sub vid la temperatura de 37°C în două trepte. În prima treaptă, concentrarea este efectuată pînă la un volum de 300 - 500 mL, urmată de centrifugare timp de 30 minute la 8000 rpm pentru eliminarea particulelor fine de material vegetal. În a doua treaptă concentrarea extractului s-a efectuat pînă la un volum determinat cu densitate de 1,0 - 1,1 g/mL. În această etapă s-a recuperat solventul, alcoolul etilic, care poate fi reutilizat în etapa A, pentru extracția compușilor fenolici din deșeul de semințe de struguri delipidat fără a afecta randamentul de extracție.

3. **Metoda de purificare a precipitatului brut de PA condensate polimerice** prin reluarea precipitatului brut de PA condensate, în etape, în solvent apă distilată pH 7,0, care a conduce la depunerea gravitațională, timp de 60 minute a preparatului PA condensat. În final după centrifugare și recuperarea precipitatului, acesta se reia în 20 - 40 mL alcool etilic 96%, urmat de eliminarea solventului și condiționarea preparatului la 40°C până la greutatea constantă.

Metoda de purificare a preparatului brut propusă de PA condensate nu necesită operații complexe deoarece se bazează pe proprietatea de insolubilizare în apă a PA condensate. În vederea utilizării precipitatului brut de PA condensate ca substrat pentru obținerea unui bioprodus natural cu posibilitate de valorificare în industria farmaceutică, cosmetică și alimentară este necesară etapa de purificare.

Prin solubilizarea în alcool etilic a preparatului brut de PA condensate și efectuarea analizei la UHPLC (metoda Castellari et al., 2008), conform cromatogramei din figura 1, s-e identifica pe lângă peak-ul amplu al PA condensate polimerice, peak-uri ale acizilor fenolici (galic, protocatehic, p-hidroxibenzoic, m-hidroxibenzoic, siringic), peak-uri ale monomerilor de catechină și epicatechină și un număr de peak-uri neidentificate. De asemenea, prezența altor contaminanți, de exemplu zaharuri și proteine, cantitativ minimalizați datorită utilizării în procesele extractive a solventului concentrat alcool etilic 96%, care nu favorizează antrenarea acestora din deșeurile de semințe de struguri delipidat.

Protocolul de lucru al metodei de purificare, cuprinde următoarele operațiuni:

1. Precipitatul brut de PA condensate, obținut după 20 - 30 minute, în etapa C, se reia în 20 - 50 mL apă distilată cu pH 7,0 și se omogenizează pînă la dispariția aglomerărilor de precipitat.
2. Produsul omogenizat se dispersează în 1,950 l apă distilată cu pH 7,0. După 10 minute se instalează procesul de depunere gravitațională a PA condensate, care continuă timp de 60 minute, formându-se în final un depozit dens. Această operațiune se execută încă o dată.
3. Supernatantele s-e elimin prin sifonare și sunt analizate la UHPLC, iar depozitul de PA condensate s-e centrifugează la 8000 rpm timp de 30 minute. După eliminarea apei distilate din cuvele de centrifugare, precipitatul de PA condensate purificat trebuie reluat în 20 - 40 mL alcool etilic 96%.
4. Următoarele operațiuni constau în: eliminarea solventului la temperatura de 40°C, pînă la greutate constantă și condiționarea PA condensate purificate în stare solidă în flacoane de sticlă brună la temperatura de - 10°C.

Proprietatea de solubilizare în alcool etilic 96% a preparatului de PA condensate purificat nu este afectată în urma acestui tratament. De asemenea, valorile activității antioxidante (AA%) și cantitatea de fenoli totală (CFT) a preparatului purificat crește comparativ cu valorile preparatului nepurificat de la 94,118% la 94,919% și respectiv de la 0,685 mg GAE/mg preparat brut la 0,898 mg GAE/mg preparat purificat.

Analiza cromatogramelor la UHPLC a probelor de apă rezultate în procesul de purificare a precipitatului brut de PA condensate, impune reducerea progresivă a amplitudinii peak-urilor acizilor fenolici și a monomerilor catechină și epicatechină.

Preparatul de PA condensat purificat dizolvat în alcool metilic trebuie analizat UHPLC. pentru verificarea purității, care trebuie să corespundă PA condensate polimerice cu o distribuție a indicelui de polimerizare larg comparabil cu metodele de exclusiune sterică de minim cinci ordine dimensionale (n indicele de polimerizare).

Gradul de puritate al produsului de PA trebuie verificat și prin extracția selectivă cu solvenți

a compușilor monomerici și oligomerici (fracția F1 + F2) și a fracției polimerice (F3) prin separarea pe cartuș de tip C18 Sep - PAC. Eluția se efectuează cu apă distilată pH 7,0. După uscare cartușului, se continuă eluția cu acetat de etil pentru a separa PA oligomerice și monometrice și apoi eluția cu alcool etilic pentru separarea PA polimerice. Frațiile obținute (F1 + F2) și (F3) trebuie evaporate, iar reziduurile uscate la 105°C trebuie cântărite. Reziduiul fracției (F1 + F2) este de 2,8 mg/100 mg preparat purificat, iar al fracției polimerice F3 de 95 mg/100 mg preparat purificat. Aceste rezultate relevă că prin metoda propusă de purificare a precipitatului brut de PA condensate se obține un preparat de PA condensate polimerice cu o puritate de 95%.

față de *Botritis cinerea*.

Prezentam în continuare cromatogramele preparatului brut în diverse faze ale procesului de purificare.

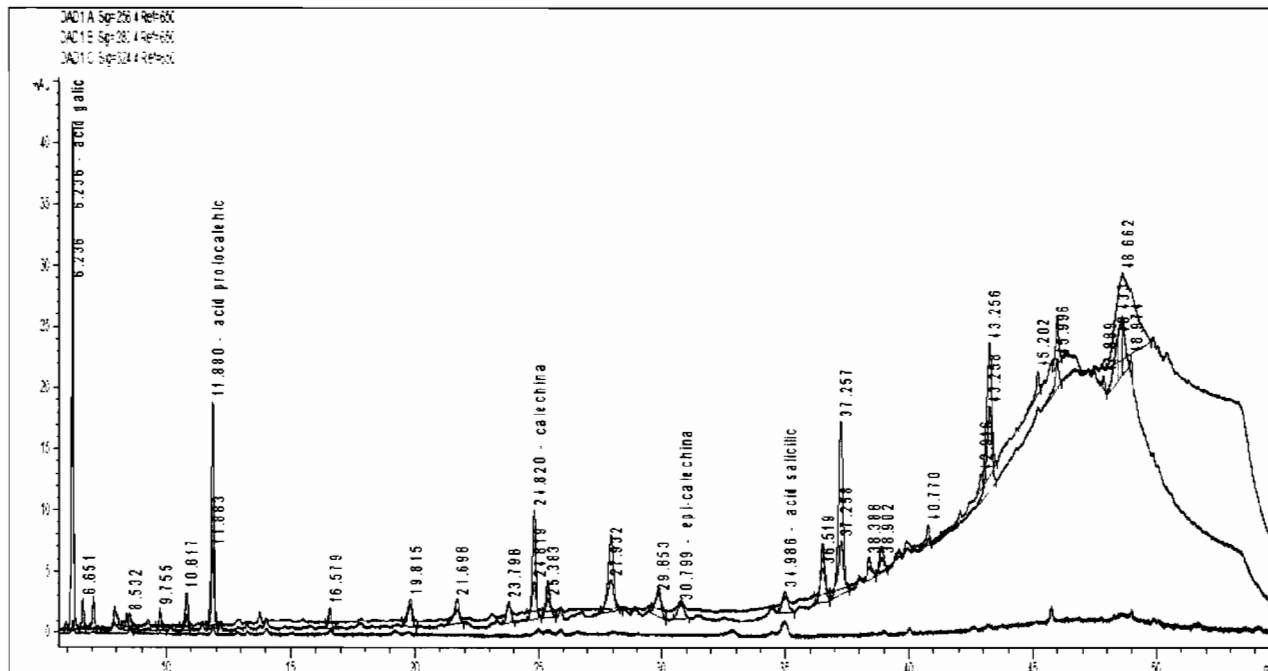


Fig. 1 - Cromatograma preparatului brut de PA condensate

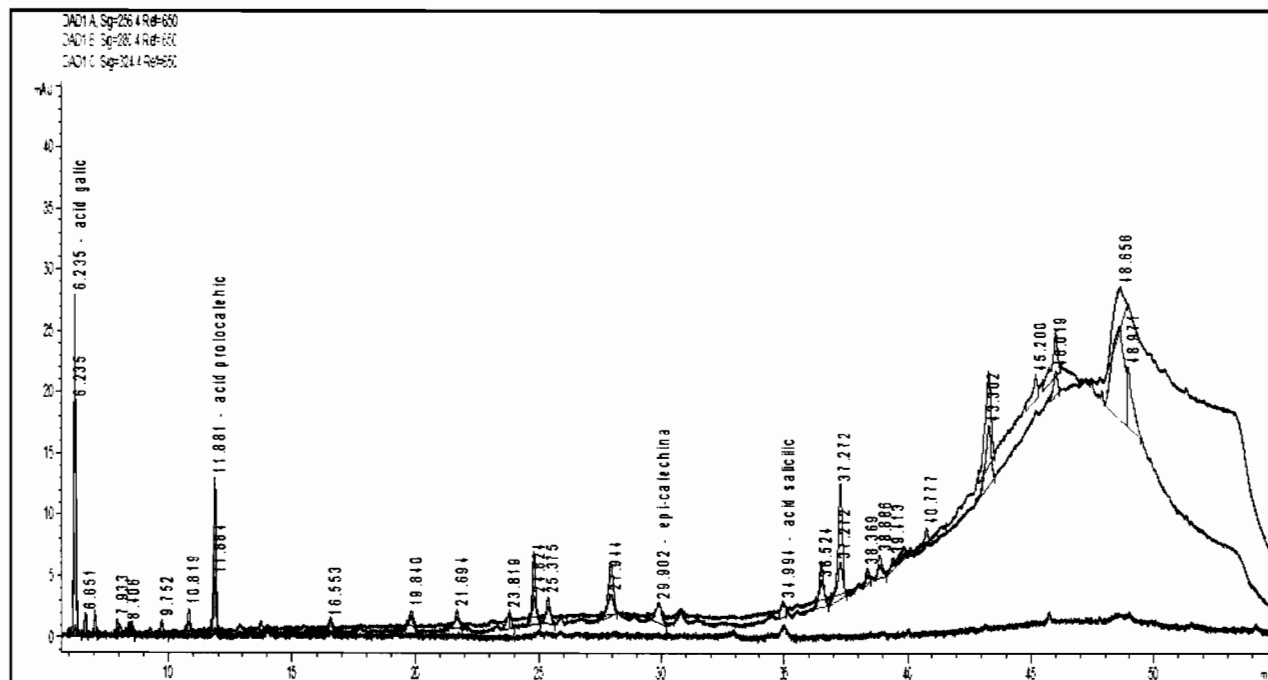


Fig. 2 - Cromatograma rezultată în prima etapă de purificare a preparatului brut de PA condensate

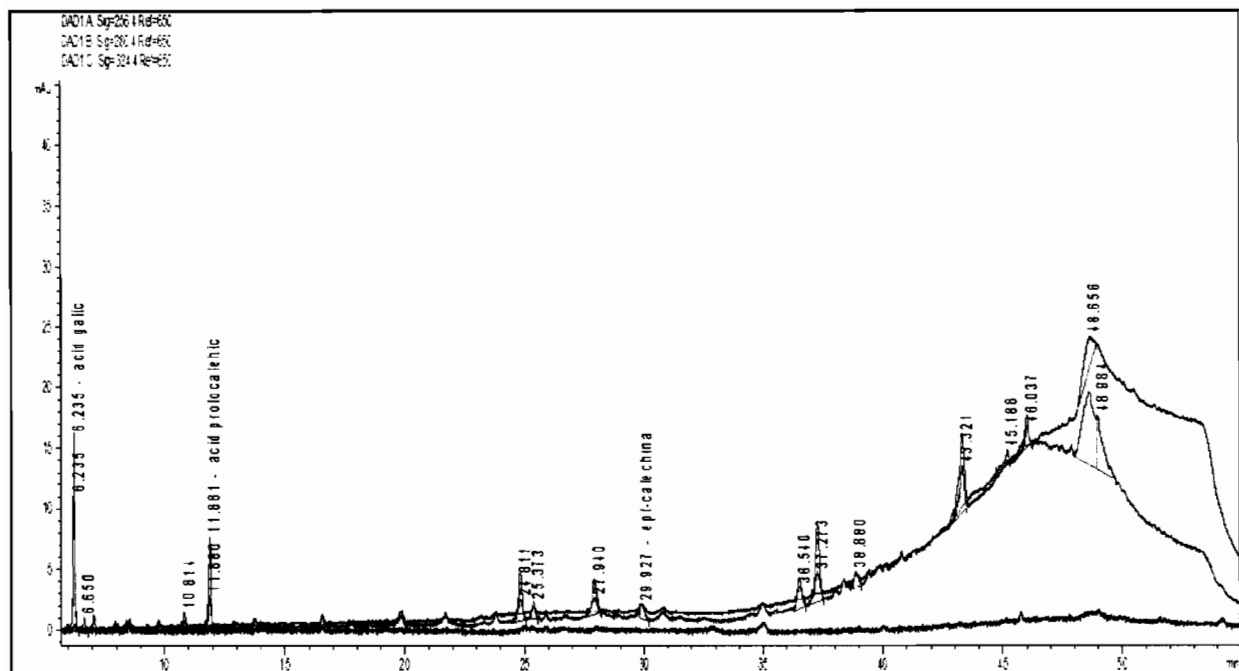


Fig. 3 - Cromatograma rezultată în a doua etapă de purificare a preparatului brut de PA condensate

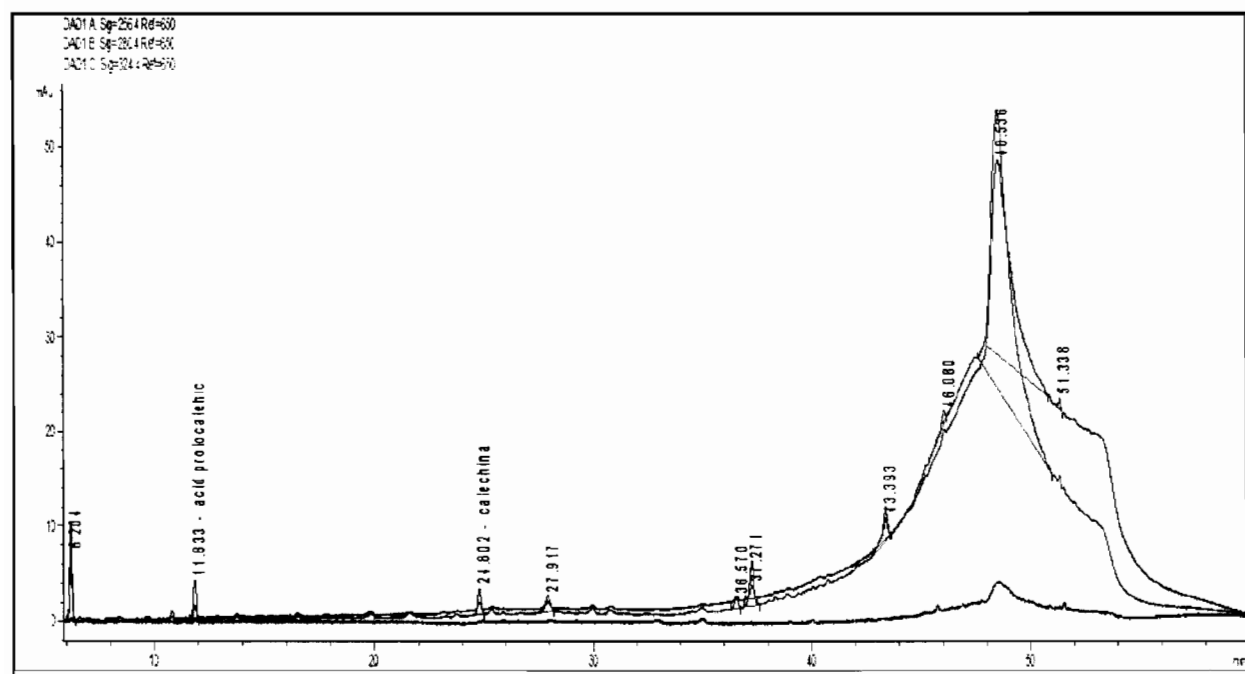


Fig. 4 - Cromatograma rezultată după centrifugarea preparatului de PA condensate în procesul de purificare

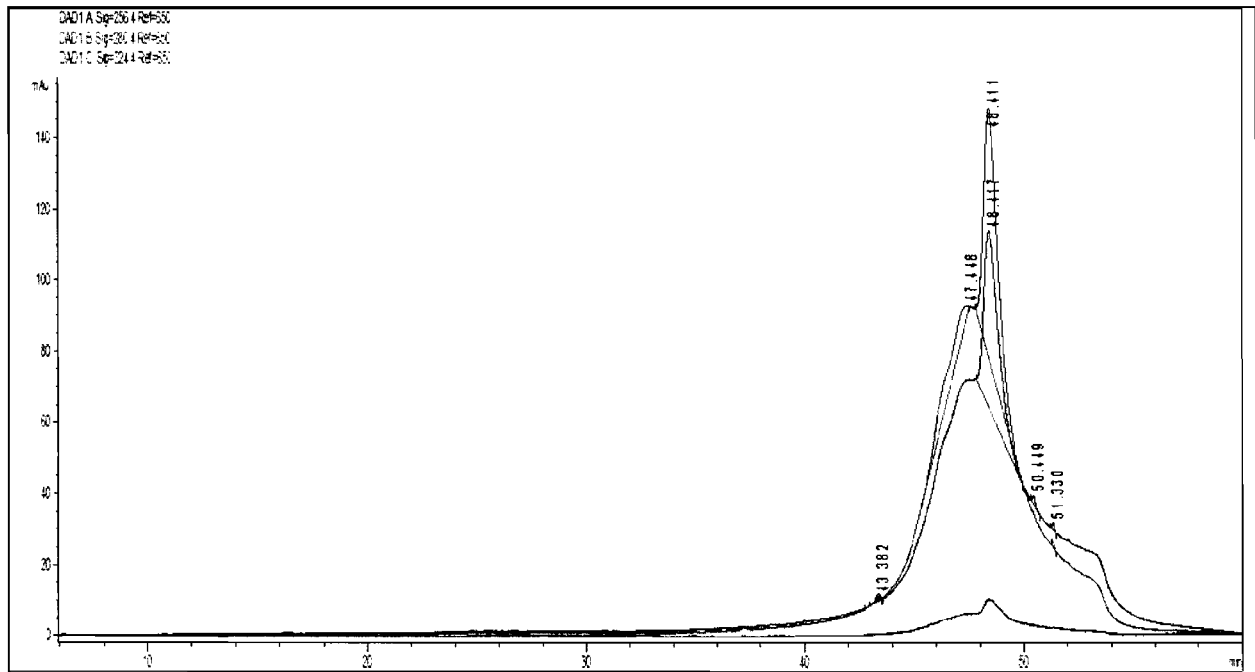


Fig. 5 - Cromatograma preparatului de PA condensate purificate