



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00163

(22) Data de depozit: 08/04/2021

(41) Data publicării cererii:
30/08/2021 BOPI nr. 8/2021

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,
ȘOS.PANDURI NR.90, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
TEHNOLOGII CRIOGENICE ȘI
IZOTOPICE-ICSI-, STR. UZINEI NR.4,
COD 240050, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO

(72) Inventatori:
• GHEORGHE IRINA,
STR.SERGENT APOSTOL CONSTANTIN,
NR.16A, BL.C1, PARTER, AP.03,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• CORBU VIORICA MARIA,
STR.DRUMUL FERMEI, NR.111B, BL.8,
SC.1, AP.14, POPEȘTI LEORDENI, IF, RO;
• AVRAMESCU SORIN,
STR.NICOLAE FILIMON, NR.30, BL.17,
AP.17, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MARINAȘ IOANA CRISTINA,
STR.BOZIENI, NR.9, BL.830 BIS, SC.2,
AP.64, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• GEANĂ ELISABETA- IRINA,
ALEEA OLĂNEȘTI, NR.14, BL.A1, SC.A,
AP.21, RÂMNICU VÂLCEA, VL, RO;
• CHIFIRIUC MARIANA CARMEN,
STR. COSTACHE STAMATE NR. 5, BL. A8,
SC. 1, ET. 9, AP. 37, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) O NOUĂ SOLUȚIE ECOLOGICĂ BAZATĂ PE EXTRACT
DE ALLIUM SATIVUM PENTRU COMBATAREA AGENȚILOR
BIODETERIOGENI AI UNOR OBIECTE DE PATRIMONIU
CULTURAL DIN ROMÂNIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui produs ecologic pentru combaterea procesului de biodeteriorare a unor obiecte de patrimoniu cultural. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: extracție asistată de ultrasunete a compușilor fenolici dintr-un material vegetal mărunțit de *A. sativum*, determinarea conținutului total de fenoli, flavonoide, tiolulfine, determinarea capacității antioxidante și identificarea compușilor fenolici prin cromatografie de lichide de înaltă performanță și analiza cantitativă și calitativă

a activității antimicrobiene, rezultând un produs care prezintă eficiență antimicrobiană ridicată (concentrații minime inhibitorii de 7,81...26,33 mg/mL) în combaterea a 90...91,93% dintre tulpinile de microfungi filamentoși și bacterii, izolate de pe obiecte de patrimoniu din lemn și piatră.

Revendicări: 2
Figuri: 4

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



Descrierea brevetului de invenție:

O NOUĂ SOLUȚIE ECOLOGICĂ BAZATĂ PE EXTRACT DE *ALLIUM SATIVUM* PENTRU COMBATEREA AGENȚILOR BIODETERIOGENI AI UNOR OBIECTE DE PATRIMONIUL CULTURAL DIN ROMÂNIA

elaborat de:

Irina Gheorghe, Viorica Maria Corbu, Sorin Avramescu, Ioana Cristina Marinaș, Elisabeta Irina Geană, Mariana Carmen Chifiriuc

1. Stadiul tehnicii

Patrimoniul cultural este expus acțiunii factorilor climatici și poluanților din mediu care pot determina modificări fizice, chimice sau estetice ce provoacă daune ireversibile asupra valorii acestuia, fenomen cunoscut sub numele de deteriorare.

Procesul de biodeteriorare este favorizat de capacitatea diferitelor microorganisme, îndeosebi a fungilor microscopici filamentoși, de a forma asociații de tipul biofilmelor pe diferite substraturi (de la piatră până la hârtie) și de a produce alterări materialului prin producerea de metaboliți de tipul acizilor organici, enzimelor, pigmentilor și micotoxinelor [Sterflinger și Pinar, 2013, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(22), 9637–9646. doi.org/10.1007/s00253-013-5283-1]. Dintre microorganisme, fungii sunt principalii agenți biologici care cauzează biodeteriorarea obiectelor casnice, arhivelor, colecțiilor din muzee, cărților, materialelor din lemn, textilelor, tablourilor, obiectelor de cult și a altor obiecte cu importanță istorică de neînlocuit. În timp ce unele specii de fungi produc doar simple pete cromatice sau decolorarea lemnului, altele pot distruge complet materialul de baza din care este confectionat obiectul fie ca este vorba de lemn, piatra, tesaturi (Koul și Upadhyay, 2018, *Springer*, doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7_32). Comunitățile mixte reprezentate de bacterii și fungi prezintă o capacitate mult mai mare biodegradativă a diferitelor materiale, comparativ cu speciile izolate, spre exemplu la concentrații scăzute de oxigen, care nu sunt tolerate de majoritatea fungilor, principali agenți biodeteriogeni rămân bacteriile [Kim și Singh, 2000, *IWA J.* 21 (2), 135–155, doi.org/10.1163/22941932-90000241].

Biodeteriorarea duce la o pierdere semnificativă a obiectelor patrimoniului cultural, justificând cercetările pentru dezvoltarea unor strategii eficiente de conservare în scopul prevenirii/limitării/combaterii acestui proces. O alternativă ecologică la substanțele antifungice este utilizarea extractelor vegetale. Numeroase studii au demonstrat că extractul de *Allium sativum* prezintă activitate antimicrobiană (antibacteriană și antifungică) [Khan și Sharma, 2017, *Asian J Pharm Clin Res*, 10(4), 207-210], în special datorită prezenței alicinei [Pânzaru și colab., 2009, *Ulster Med J.* 78(1), 13–15]. Alicina face parte din clasa tiosulfinelor. Alți compuși tiosulfinați identificați în literatura de specialitate sunt: alilmetantiosulfat (3-20%), trans-1-propenil-2-propentiosulfat (5-18%), metil-2-propentiosulfat (1,5-8%), aliltrans-1-propentiosulfat (1,5 –2%), metilmetantiosulfat (1-2%), trans-1-propenilmetantiosulfat (1-2%) și metil-trans-1-propentiosulfat (0,5%) [Olech, 2012, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 62(1), 23-29]. Conținutul de tiosulfinate din bulbi de *A. sativum* depinde de condițiile de cultivare: luminozitate, temperatură, umiditatea solului precum și de condițiile de depozitare.

2. Problema tehnică pe care invenția actuală o rezolvă constă în impactul negativ al biofilmelor microbiene polispecifice formate de către microorganismele colonizatoare ale obiectelor de patrimoniu cultural tangibil aflate în diferite nivele de conservare.

3. Soluția pe care o propune prezenta invenție este dezvoltarea unei soluții ecologice de combatere a agenților biodeteriogeni, bazată pe extractul vegetal de *A. sativum* cu efect antimicrobian. De noul produs ar putea să beneficieze obiectele de patrimoniu cultural tangibil din lemn și din piatră din România în eliminarea riscului de colonizare cu agenți deteriogeni și restabilirea valorii acestor resurse istorice de neînlocuit.

4. Avantajele invenției:

Soluția ecologică de *A. sativum* prezintă avantajul că exercită efect antimicrobian asupra agenților biodeteriogeni ai obiectelor de patrimoniu prin eficiența ridicată în combaterea unui număr semnificativ de tulpini de microfungi filamentoși și bacterii testate, izolate de pe obiecte și clădiri de patrimoniu din lemn și din piatră, incluse în lista patrimoniului cultural din jud. Arad, Hunedoara și București.

5. Prezentarea pe scurt a figurilor

Fig. 1. Schema generală a soluției ecologice alternative propuse pentru combaterea agenților biodeteriogeni ai obiectelor de patrimoniu cultural tangibil.

*Tabelul 1, 2, Fig. 2A și 2B. Caracterizarea soluției ecologice alternative pe bază de extract vegetal de *A. sativum*.*

*Fig.3. Reprezentarea grafică a diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii a tulpinilor de microfungi filamentoși (A) și bacterii (B) în prezența extractului de *A. sativum* transformate în unități arbitrare.*

*Fig. 4. Reprezentarea grafică a valorilor medii ale concentrației minime inhibitorii (CMI) obținute la testarea cantitativă a activității antimicrobiene a extractului de *A. sativum* pe tulpini de microfungi și bacteriene după sursa de izolare (A, F) și pe specii (B, C, D, G).*

6. Prezentarea în detaliu a trei exemple de realizare a invenției cu referire la figuri

EXEMPLUL 1. EXTRAȚIA COMPUȘILOR FENOLICI, DETERMINAREA CONȚINUTULUI TOTAL DE FENOLI, FLAVONOIDE, TIOSULFINE, DETERMINAREA CAPACITĂȚII ANTIOXIDANTE ȘI IDENTIFICAREA COMPUȘILOR FENOLICI PRIN HPLC

S-au cântărit aproximativ 5 g de material vegetal mărunțit peste care s-au adăugat 50 mL etanol de concentrație 50%. Amestecul a fost supus extracției asistată de ultrasunete la temperatura camerei. Metoda implică utilizarea de ultrasunete, cu frecvențe ce variază de la 20 kHz la 2000 kHz, permițând liza celulară, favorizând extracția de compuși de interes. Extractul astfel obținut s-a filtrat și s-a adus la 50 mL cu etanol 50%. Extractul a fost păstrat la -20°C până la momentul analizelor.

Conținutul total de fenoli a fost măsurat spectrofotometric conform metodei descrisă de Singleton și Rossi (1965) cu unele modificări (Singleton și colab., 1999, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178, doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1). Peste 100 μL de probă sau soluție standard de acid galic s-au adăugat 900 μL apă distilată. După adăugarea reactivului Folin Ciocâlteu (100 μL) se agită 5 minute, după care se adaugă 1 mL de Na_2CO_3 7% și s-a adus la un volum final de 2.5 mL cu H_2O d.d. După incubare la temperatura camerei, timp de 60 minute, s-au înregistrat valorile absorbanțelor la 765 nm. Curba de calibrare s-a realizat pentru concentrații de acid galic cuprinse între 0 – 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Conținutul total de flavonoide a fost determinat prin metoda clorurii de aluminiu (Formagio și colab., 2013, *BMC Complement Altern Med.* 11;13:14. doi: 10.1186/1472-6882-13-14) ce constă în tratarea a 0.1 mL probă/standard cu 0.1 mL de 10% acetat de sodiu. Peste acest amestec s-a adăugat 0.12 mL de soluție AlCl_3 2,5% și s-a adus la un volum final de 1 mL cu etanol 70%. După agitare această soluție a fost lăsată să stea timp de 45 minute la întuneric și s-a citit absorbanta amestecului la lungimea de undă, $\lambda = 430$ nm. Conținutul în flavonoide a fost exprimat în μg quercetin / mL probă. Curba de calibrare s-a realizat pentru concentrații de quercetin aparținând intervalului 0-200 $\mu\text{g} / \text{mL}$

Conținutul total de tiosulfinate (TS) s-a realizat conform literaturii de specialitate [Gonzalez și colab., 2009, *J Agric Food Chem.* 11;57(21), 10282-8. doi: 10.1021/jf9018189; Mansor și colab., 2016, *J of Medical and Bioengineering*, 5(1), 24-27]. Metoda este bazată pe reacția colorimetrică a DTNB cu tiosulfinate. S-a realizat un amestec de 625 μL soluție de cisteină 0,8 mM cu 375 μL de extract de usturoi sau apa distilată (martor). După agitare s-au păstrat 10 minute la temperatura camerei. S-au luat 200 μL de soluție de extract/ cisteină sau apă distilată / cisteină și s-a adăugat 800 μL de DTNB 200 μM care a fost preparată în tampon Hepes 50 mM (pH: 7,5). Proba de control s-a realizat prin adăugarea a 200 μL de apă în 800 μL DTNB în absența cisteinei. După agitare, tuburile au fost lăsate 10 minute. Absorbanta a fost măsurată la 412 nm, iar concentrațiile de tiosulfinat au fost calculate tinându-se cont de $\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Identificarea compușilor fenolici

Determinarea conținutului de polifenoli s-a realizat prin UHPLC-MS/MS cu ionizare ESI, folosind un spectrometru de masă de înaltă rezoluție Q Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (ThermoFisher Scientific) echipat cu HESI, cuplat la un cromatograf de lichide de înaltă performanță UltiMate 3000 UHPLC (ThermoFisher Scientific). Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană Kinetex® C18 (100 \times 2.1 mm, diametrul particulelor de 1.7 μm), la o temperatură de 30 °C. Faza mobilă: A – apă cu 0.1% acid formic și B – metanol cu 0.1% acid formic, eluția în gradient la un debit cuprins între 0.3-0.4 mL/min. Spectrul de masă s-a înregistrat în modul de ionizare negativă într-un domeniu cuprins între 100-800 m/z, la o rezoluție de 70.000. Azotul a fost folosit ca gaz de coliziune și gaz auxiliar la un debit de 11 și respectiv 48 unități arbitrare. Tensiunea aplicată a fost de la 2,5 kV și temperatura capilară a fost de 320 °C. Energia celulei de coliziune a variat între 30 eV și 60 eV. Datele au fost achiziționate și procesate folosind pachetul software Xcalibur (Versiunea 4.1). Calibrarea s-a realizat în intervalul de concentrație 50 - 1750 $\mu\text{g} / \text{L}$ pentru fiecare dintre acizii fenolici și flavonoizi, prin diluarea în serie cu metanol a amestecului standard de concentrație 10 mg/L [Marinaș și colab, 2021, *International Journal of Molecular Science*, 22, 33, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms22010033>].

Identificarea compușilor cu sulf

Determinarea conținutului de tiosulfine s-a realizat prin UHPLC-MS/MS cu ionizare ESI, după o metodă adaptată adaptată [Sut și colab, 2020, *Molecules*, 25(12), 2837, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25122837>], folosind un spectrometru de masă de înaltă rezoluție Q Exactive™ Focus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (ThermoFisher Scientific) echipat cu HESI, cuplat la un cromatograf de lichide de înaltă performanță UltiMate 3000 UHPLC (ThermoFisher Scientific). Separarea cromatografică s-a realizat pe o coloană Kinetex® C18 (100 × 2.1 mm, diametrul particulelor de 1.7 μm), la o temperatură de 30 °C. Faza mobilă: A – apă cu 0.1% acid formic și B – acetonitril, eluția în gradient la un debit cuprins între 0.4 mL/min. Spectrul de masă s-a înregistrat în modul de ionizare pozitiv într-un domeniu cuprins între 80-1200 m/z, la o rezoluție de 70.000. Azotul a fost folosit ca gaz de coliziune și gaz auxiliar la un debit de 11 și respectiv 48 unități arbitrare. Tensiunea aplicată a fost de la 2,5 kV și temperatura capilară a fost de 320 °C. Energia celulei de coliziune a variat între 30 eV și 60 eV. Datele au fost achiziționate și procesate folosind pachetul software Xcalibur (Versiunea 4.1). Pentru identificarea compușilor din extract s-au consultat baze de date spectrale de referință precum ChemSpider (www.chemspider.com).

Activitatea antioxidantă

a. DPPH: Măsurarea activității de captare a radicalului DPPH (1,1,-difenil-2-picrilhidrazil) a fost efectuată printr-o metodă adaptată [Madhu, 2013, *Asian J of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6(2)]. Amestecul de reacție a constat în adăugarea a 100 μl de probă/standard și 100 μl de soluție de radical DPPH 0,3 mM în etanol 50%. Când DPPH reacționează cu un compus antioxidant, care poate dona hidrogen, acesta este redus, fapt care duce la virarea culorii de la violet la galben deschis. Citirea absorbanțelor s-a realizat la $\lambda=517$ nm după 30 min de reacție, folosind un spectrofotometru UV-VIS. Ca martor s-a utilizat etanol. Concentrațiile utilizate pentru curba de calibrare cu Trolox au fost: 50 - 0 μM.

b. Metoda CUPRAC se bazează pe reducerea unui complex cupric, neocuproină (Cu (II)-Nc) de către antioxidanți în forma cuproasă (Cu (I)-Nc). Reducerea ionului cupric (CUPRAC) s-a realizat conform unei metode adaptate [Meng și colab.,2011, *Food Research International*, 44(9), 2830-2836, doi: 10.1016/j.foodres.2011.06.032], astfel: s-au amestecat 20 μL de probă/soluții standard de diferite concentrații cu 60 μL CuSO₄ (5 mM), neocuproină 60 μL (3,75 mM) și apă distilată (560 μL), ajungându-se la un volum final de 700 μL. După 30 de minute, absorbanta a fost măsurată la 450 nm. Soluțiile standard de Trolox necesare pentru curba de calibrare s-au preparat dintr-o soluție stoc de 5 mM, iar concentrațiile luate în lucru au fost între: 1 - 0 mM.

c. Metoda FRAP se bazează pe abilitatea antioxidanților de a reduce complexul tripiridiltriazină - Fe³⁺ (Fe(III)-TPTZ) la complexul tripiridiltriazină-Fe²⁺ (Fe(II)-TPTZ) de colorație albastră, având ca mecanism de reacție cedarea de electroni de către antioxidant. Determinarea puterii antioxidante de reducere a fierului s-a realizat prin metoda descrisă de Benzie și Strain în 1996 cu unele modificări. S-au preparat următoarele soluții: tampon acetat de 300 mM, pH 3,6, soluția stoc de 10 mM TPTZ în 40mM HCl și soluția de 20mM FeCl₃ în apă. Se prepară reactivul FRAP prin amestecarea a 10 părți de soluție tampon acid acetic – acetat de sodiu 300 mM, pH 3,6 cu o parte soluție TPTZ 10mM și o parte soluție de FeCl₃ 20mM (10:1:1). Reactivul FRAP este preparat zilnic (cu excepția soluției tampon) și ținut pe

baie de apă la 37°C. La 15 µL probă/ soluția standard, 285 µL reactiv FRAP și se incubează timp de 30 minute la 37°C la întuneric. După incubare se citește absorbanta la $\lambda = 593$ nm. Trolox este folosit ca substanță standard, curba de calibrare fiind trasată pentru intervalul de concentrații 50 ÷ 250 µM Trolox/mL, pornind de la o soluție stoc de Trolox 10 mM.

Totalul de compuși fenolici obținuți este inclus în intervalul de concentrații identificate în literatura: 28.35 mg GAE/g (Chhouk si colab., 2017, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 117, 113-119, doi.org/10.1016/j.cep.2017.03.023), 0.44 mg GAE/g [Chekki si colab., 2014, *Mediterranean J of Chemistry*, 3(4), 947-956, doi.org/10.13171/mjc.3.4.2014.09.07.11]. Conținutul în flavonoide se corelează cu datele de literatură încadrându-se în limitele 42,45 – 18,23 µg echivalenți rutin / g [Trifunsi și colab., 2015, *International Current Pharmaceutical J*, 4(5), 382-385, https://doi.org/10.3329/icpj.v4i5.22861] sau 0,132 – 0,0042 mg echivalent quercetin/g [Chekki si colab., 2014, *Mediterranean J of Chemistry*, 3(4), 947-956, doi.org/10.13171/mjc.3.4.2014.09.07.11]

Determinarea continutului de compusi organosulfurici s-a realizat printr-o metoda indirectă ce are la baza reacția dintre L-cisteina și DTNB formându-se NTB ce se determină prin citirea absorbantei la 412 nm cu un coeficient de extincție molară de 14150 pentru anionul NTB. Conținutul de compuși organosulfurici este mai scăzut față de datele raportate până în prezent [Gonzalez si colab., 2009, *J Agric Food Chem*. 11;57(21), 10282-8. doi: 10.1021/jf9018189]. În general, tiosulfinatele, inhibă dezvoltarea microorganismelor datorită grupărilor -S (O) -S-, care reacționează cu grupările -SH din constituția proteinelor celulare formând disulfuri mixte. Activitatea antimicrobiană a tiosulfinelor poate fi inhibată de compușii sulfhidrilici, cum ar fi cisteina. Eficacitatea extractului alcoolic de usturoi este dată de ușurința prin care moleculele trec prin membranele celulare și reacționează la nivelul legăturilor tiol din aminoacizi [Chekki si colab., 2014, *Mediterranean J of Chemistry*, 3(4), 947-956, doi.org/10.13171/mjc.3.4.2014.09.07.11]. Atât compușii fenolici, cât și compușii organosulfurici sunt componenți bioactivi cu puternic efect antioxidant, captarea radicalilor fiind dependentă de doză, putând acționa ca prooxidantă în concentrații ridicate.

Rezultatele activității antioxidante sunt ușor diferite și se pot datora diferențelor dintre principiile metodelor care evidențiază inactivarea radicalilor liberi (Santos-Sánchez si colab., 2019, *IntechOpen*, doi.org/10.5772/intechopen.85270). Se poate observa că acest extract prezintă o capacitate reductoare mai pronunțată prin metoda DPPH, comparativ cu metodele CUPRAC și FRAP. Rezultatele obținute pentru conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă prin diferitele metode sunt redată în tabelul 1.

Cromatograma obținută în urma analizei UHPLC-MS/MS a extractului de *A. sativum* este prezentată în figura 2A. Concentrațiile principalilor compuși identificați (acid galic, acid 3, 4-hidroxibenzoic, acid 4-hidroxibenzoic, catechină, acid clorogenic, acid cafeic, epi – catechină, acid siringic, acid vanilic, acid p-cumaric, acid ferulic, naringenină, hesperidina, rutina, resveratrol, acid elagic, acid abscisic, acid cinamic, quercitina, kaemferol, isorhamnetin, apigenina, pinocembrina, cryosina, galangina, pinostrobină) în concordanță cu standardele existente sunt prezentate în tabelul 2. Compușii identificați și cuantificați sunt raportați în studiile de specialitate anterioare ca având activitate antimicrobină, implicit antifungică, independentă la concentrații mai mari decât cele obținute prin prezentul procedeu

de extracție (Martínez și colab., 2017, *Pestic Biochem Physiol*, 140, 30-35, doi.10.1016/j.pestbp.2017.05.012; Zhu și colab., 2019, *Physiol Mol Plant Pathol*, 107, 46-50, ; Carvalho și colab., 2018, *S Afr J Bot*, 114, 181-187, doi.org/10.1016/j.sajb.2017.11.010) însă efectul sinergic al acestor compuși inhibă atât germinarea sporilor cât și dezvoltarea miceliului fungilor microscopici filamentoși implicați în biodeteriorarea obiectelor din patrimoniul cultural al României.

În fig 2B este redată cromatograma obținută pentru separarea compușilor tiosulfonici care ulterior au fost identificați prin spectrometrie de masă. S-au identificat 5 compuși: aliin, gama-glutamyl-S-metilcisteină, gamma-glutamyl-(S)-alilcisteină, gama-glutamyl-S-trans-propenilcisteina și alicină. Acești compuși sunt considerați responsabili de proprietățile antimicrobiene. Reactivitatea tiosulfonatelor față de grupările tiolice reprezintă componentă importantă a activității antimicrobiene. În cazul aliicinei, pe lângă faptul că este redox activ, aceasta este destul de lipofilă și permite permeabilizarea membranelor celulare. Diverse studii au evidențiat că alicina este capabilă să formeze pori tranzitorii în membranele artificiale și bio-membrane [Miron și colab., 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1463, 20–30; Gruhlke și colab., 2015, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)* 1850, 602–611; Leontiev și colab., 2018, *Scientific Reports*, 8, Article ID: 6763]. Deși mecanismul de acțiune al compușilor organosulfurici nu a fost încă pe deplin elucidat, principalul efect antimicrobian ar putea să se datoreze interacției cu grupările tiolice prezente în enzimele implicate în metabolismul microbial, cum ar fi succinat dehidrogenază, alcool dehidrogenază, tioredoxin reductază, ureaze și alți (Sorlozano-Puerto și colab., 2021, *Pharmaceuticals* 14, 21).

EXEMPLUL 2. ANALIZA CALITATIVĂ A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A EXTRACTULUI DE *A. SATIVUM* ASUPRA TULPINILOR DE MICROFUNGI FILAMENTOȘI ȘI BACTERII IZOLATE DOI ANI CONSECUTIV (2018 SI 2019) DIN BISERICI DE PATRIMONIU DIN JUD. ARAD, HUNEDOARA ȘI BUCUREȘTI

Screening-ul calitativ al activității antimicrobiene a extractului vegetal s-a realizat folosind o metodă disc-difuzimetrică adaptată. Astfel, suspensii standardizate (1McFarland) ale tulpinilor de microfungi (n=152 tulpini) aparținând speciilor *Penicillium chrysogenum*, *P. corylophylum*, *P. expansum*, *P. digitatum*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. clavatus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *A. ustus*, *A. sydowi*, *Rhizopus oryzae*, *T. orientale*, *Byssochlamys spectabilis*, *Alternaria alternata*, *Purpurelocinum lilacinum*, *Fusarium proliferatum*, *F. cerealis culmorum group*, *Cladosporium* sp., și 0.5 McFarland în cazul a 62 de tulpini bacteriene aparținând speciilor *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. mojavensis*, *B. atrophaeus*, *B. subtilis*, *B. endophyticus*, *B. thuringiensis*, *A. aurascens*, *A. globiformis*, *A. bergeri*, *P. abietaniphila*, *P. koreensis* și *R. erythropolis* au fost distribuite în pânză pe mediu agarizat (Potato Dextrose Agar=PDA și Mueller Hinton Agar=MH) iar extractul vegetal în etanol (100 mg/mL) au fost distribuite sub formă de spot. Plăcile inoculate au fost incubate timp de 5-7 zile la temperatura camerei / 24h la 37°C, rezultatul pozitiv fiind indicat de apariția unei zone de inhibiție a creșterii culturii microbiene în vecinătatea spotului conținând soluția de extract vegetal. Diametrul zonei de inhibiție a fost

convertit în unități arbitrare: „0” indicând lipsa activității antifungice, valoarea „1” fiind atribuită intervalului 1-10 mm, „2” pentru zonele de inhibiție a creșterii cu dimensiunea diametrului cuprinsă între 11 și 20 mm, „3” pentru zonele de inhibiție cu diametru cuprins în intervalul 21-30 mm respectiv „4” pentru zonele de inhibiție a creșterii mai mari de 31 mm.

Rezultatele *screening*-ului calitativ al activității antimicrobiene a extractului vegetal de *A. sativum* pe 152 tulpini de microfungi (figura 3A) a demonstrat eficiența foarte ridicată pentru majoritatea tulpinilor testate (90%). Ca și în cazul microfungilor *screening*-ul calitativ al activității antimicrobiene a extractului vegetal de *A. sativum* pe tulpini bacteriene (n=62) a demonstrat eficiența foarte ridicată în cazul majorității tulpinilor testate (91.93%), efectul nefiind datorat solventului, rezultatele fiind evidențiate în figura 3B.

EXEMPLUL 3. ANALIZA CANTITATIVĂ A ACTIVITĂȚII ANTIMICROBIENE A EXTRACTULUI DE *A. SATIVUM* ASUPRA TULPINILOR DE MICROFUNGI FILAMENTOȘI ȘI BACTERII TESTATE ANTERIOR PRIN METODA CALITATIVĂ

Pentru evaluarea cantitativă a activității antimicrobiene s-a utilizat metoda microdiluțiilor seriale binare. În acest caz, s-au realizat diluții seriale binare ale soluțiilor de nanoparticule în mediu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 / MH Broth în volum final 100 μ L. Ulterior, fiecare godeu a fost inoculat cu suspensie fungică/bacteriană de aproximativ $0.4-5 \times 10^5$ UFC/mL. Monitorizarea creșterii s-a realizat prin determinarea densității optice la 620 nm după 5-7 zile de incubare la temperatura camerei / 24h la 37°C. Concentrația minimă inhibitorie a fost stabilită ca fiind cea mai mică concentrație care a inhibat complet dezvoltarea culturii fungice.

Rezultatele testării cantitative a activității antimicrobiene a extractului de *A. sativum* pe tulpinile de microfungi izolate de pe obiecte de patrimoniu au demonstrat că cele mai susceptibile au fost tulpinile provenite de pe hârtie (CMI = 7.81 mg/mL) iar cele mai rezistente au fost tulpinile izolate de pe materiale textile și piatră (CMI = 26.33 și 22.46 mg/mL), rezultatele fiind cuprinse în figura 4A. În ceea ce privește distribuția pe specii susceptibilitatea cea mai mare a fost înregistrată în cazul tulpinilor aparținând speciilor *Byssochlamys spectabilis*, *Cladosporium* sp., și *T. orientale* iar la polul opus s-au situat tulpinile aparținând genurilor *Alternaria*, *Penicillium* și *Aspergillus*, rezultatele fiind prezentate în figura 4B. Rezultatele au demonstrat că extractul vegetal de *A. sativum* a prezentat activitate antimicrobiană pe tulpinile aparținând genurilor predominant izolate de pe obiectele de patrimoniu cultural (*Penicillium* sp. și *Aspergillus* sp.) (fig. 4C și 4D) cu eficiență mai ridicată asupra tulpinilor de *A. versicolor* (CMI = 4.16 mg/mL).

Rezultatele testării cantitative a activității antimicrobiene a extractului de *A. sativum* pe tulpinile bacteriene analizate anterior la *screening*-ul calitativ au demonstrat că cele mai sensibile au fost tulpinile provenite din colecțiile Muzeului Țăranului Român din București (CMI = 3.64 mg/mL) iar cele mai rezistente cele izolate de pe picturi murale (CMI = 12.5 mg/mL), rezultate prezentate în figura 4F. Sensibilitatea cea mai mare în ceea ce privește distribuția pe specii bacteriene a fost detectată în cazul tulpinilor aparținând speciilor *R. erythrophyllus* și *B. thuringiensis* (CMI = 3.12 mg/mL), rezultatele fiind incluse în figura 4G.

REVEDICĂRILE INVENȚIEI

1. Procedeu de obținere și caracterizare a soluției ecologice de combatere a bacteriilor și microfungilor biodeteriogeni bazată pe extractul vegetal de *A. sativum*.
2. Produs obținut conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că prezintă eficiență antimicrobiană ridicată (concentrații minime inhibitorii cuprinse între 7.81 și 26.33 mg/mL) în combaterea unui procent semnificativ (90-91,93%) dintre tulpinile de microfungi filamentoși (152) și bacterii testate (62) testate, izolate de pe obiecte și clădiri de patrimoniu din lemn și din piatră, incluse în lista patrimoniului cultural din jud. Arad, Hunedoara și București.

Figuri explicative pentru invenție

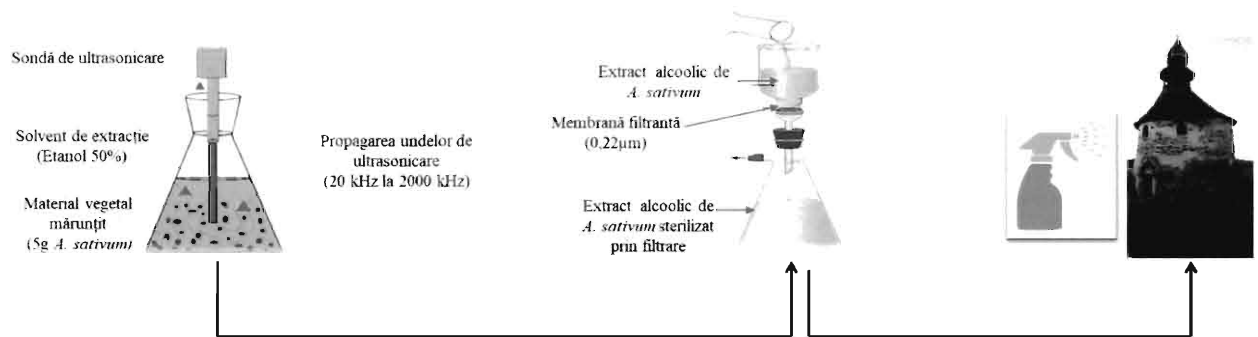


Fig. 1. Schema generală a soluției ecologice alternative în combaterea agenților biodeteriogeni ai obiectelor de patrimoniu cultural tangibil.

Tabelul 1. Rezultatele obținute pentru conținutul total de polifenoli și activitatea antioxidantă prin diferite metode.

Parametru	Extract raportat la cantitatea luată în lucru
TPC (mg GAE/g)	0.95 ± 0.011
Flavonoide (μg quercetin/g)	64.33 ± 12.11
Totalul de tiosulfine (mM)	1,043 ± 0,013
Activitate antioxidantă	Extract (0.1g/mL)
DPPH (μM Trolox/mL)	66.39 ± 5.50
CUPRAC (μM Trolox/mL)	52.25 ± 3.01
FRAP (μM Trolox/mL)	43.51 ± 1.49

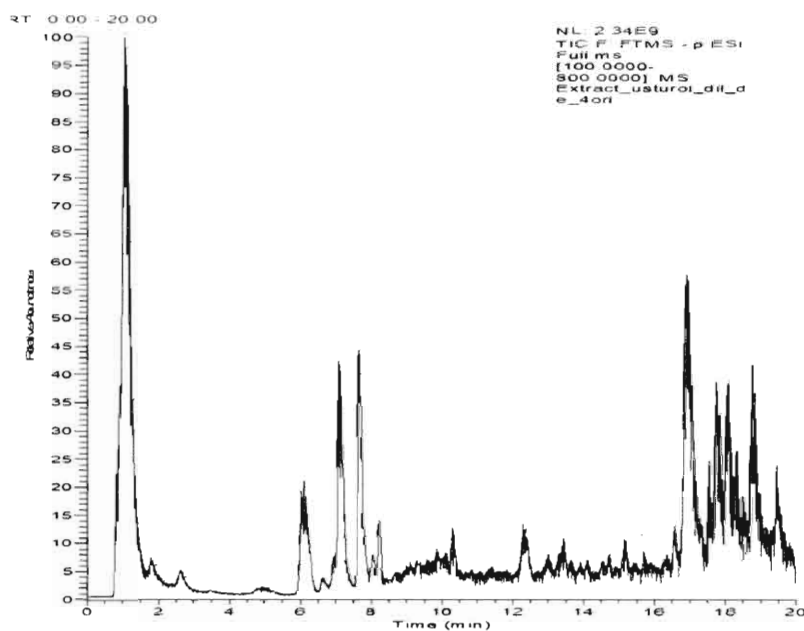


Figura 2A. Cromatograma obținută pentru separarea compușilor fenolici din extractul de *A. sativum* prin U-HPLC utilizând un sistem de detecție ESI- Quadrupole-OrbiTrap MS pe modul de ionizare negativă.

Tabelul 2. Concentrațiile compușilor identificați în extractul lichid.

Clasa de compuși	Compus identificat	Timp de retenție (min)	Concentrație (ng/mL)
Acizi fenolici C1-C6	Acid 4-hidroxibenzoic	4,92	4
	Acid vanilic	8,27	65,2
	Acid galic	0,81	0,4
	Acid siringic	8,04	7,2
	Acid 3,4-dihidroxibenzoic	1,50	0,8
	Total		
Acizi fenolici C6-C3	Acid p-cumaric	8,60	1,2
	Acid cafeic	7,67	6,4
	Acid ferulic	8,82	18,8
	Acid cinamic	10,35	7,6
	Acid clorogenic	7,54	0,8
	Total		
Dimer al acidului galic	Acid elagic	9,69	13,2
Flavan-3-ol	Catechina	6,46	nd
	Epicatechina	7,96	41,2
Flavanone	Pinocembrin	12,71	1,6
	Pinostrobin	14,91	2,8

Flavone	Crysin	13,51	3,6
	Apigenin	11,65	4,4
Flavonoli	Quercetin	10,75	0,8
	Isorhamnetin	11,81	9,6
	Kaempferol	11,68	2,8
	Galangin	13,75	2,8
	Total agliconi C6-C3-C6		69,6
Heterozide cu nucleu flavonoidic	Rutin	9,41	10
	Hesperidin	9,33	14
	Naringin	9,22	3,6
	Total heterozide C6-C3-C6		27,6
Stilbenoide (C6-C2-C6)	Resveratrol	9,46	0,8
Hormoni sesquiterpenoidici	Acid abscisic	10,05	2,4

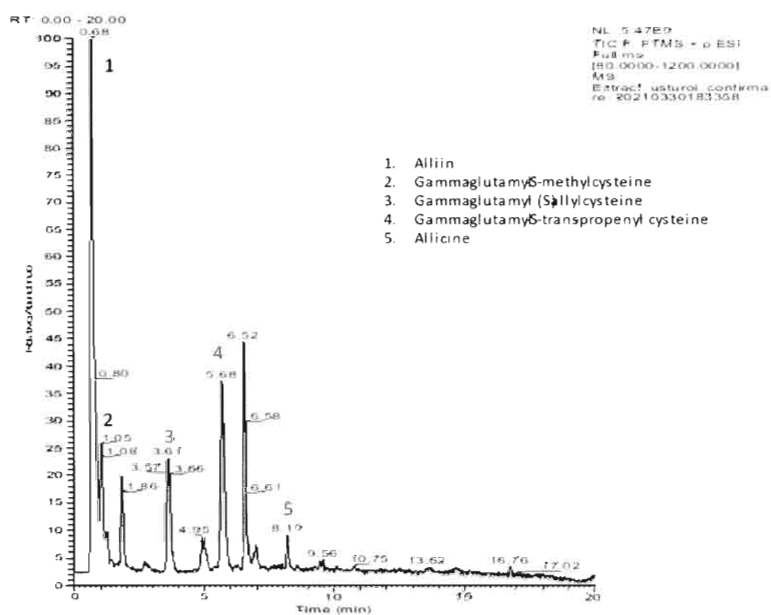


Fig. 2B. Cromatograma obținută pentru separarea compușilor organosulfurici din extractul de *A. sativum* prin U-HPLC utilizând un sistem de detecție ESI- Quadrupole-OrbiTrap MS pe modul de ionizare pozitivă.

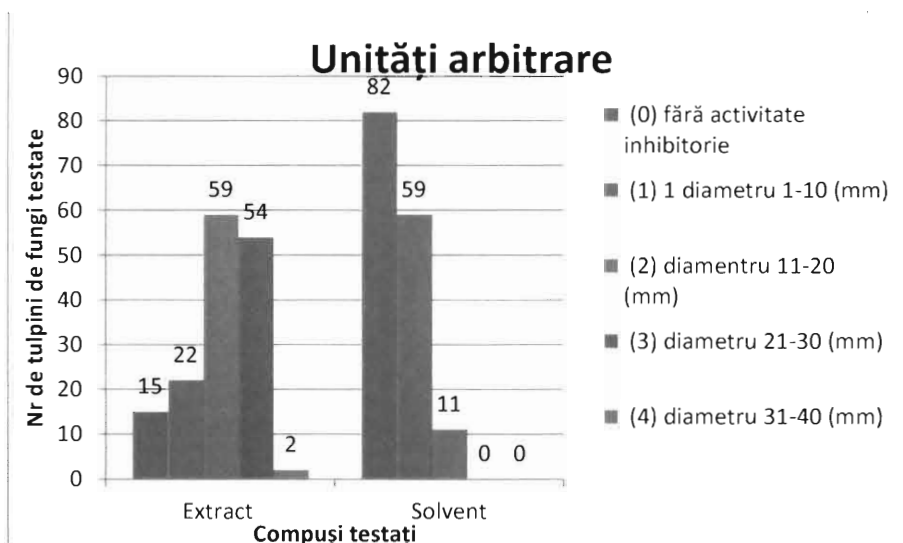


Figura 3A. Reprezentarea grafică a diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii a celor 152 de tulpini de microfungi filamentosi în prezența extractului de *A. sativum* transformate în unități arbitrare.

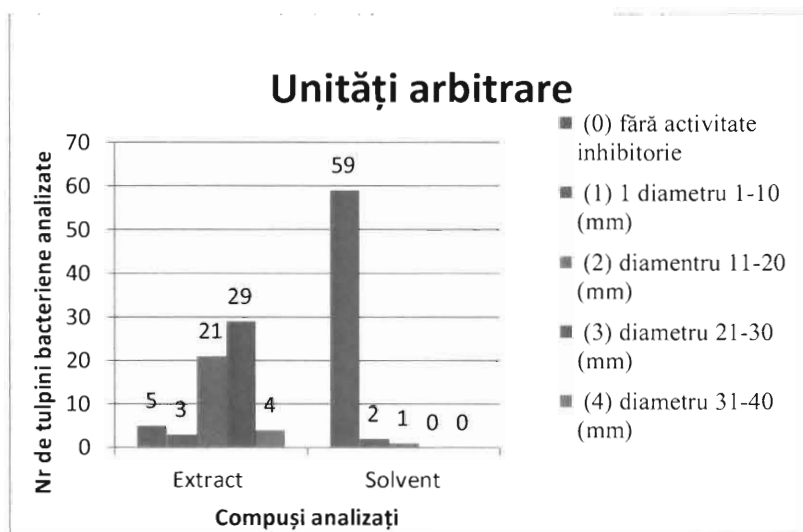


Figura 3B. Reprezentarea grafică a diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii a celor 62 de tulpini bacteriene în prezența extractului de *A. sativum* transformate în unități arbitrare.

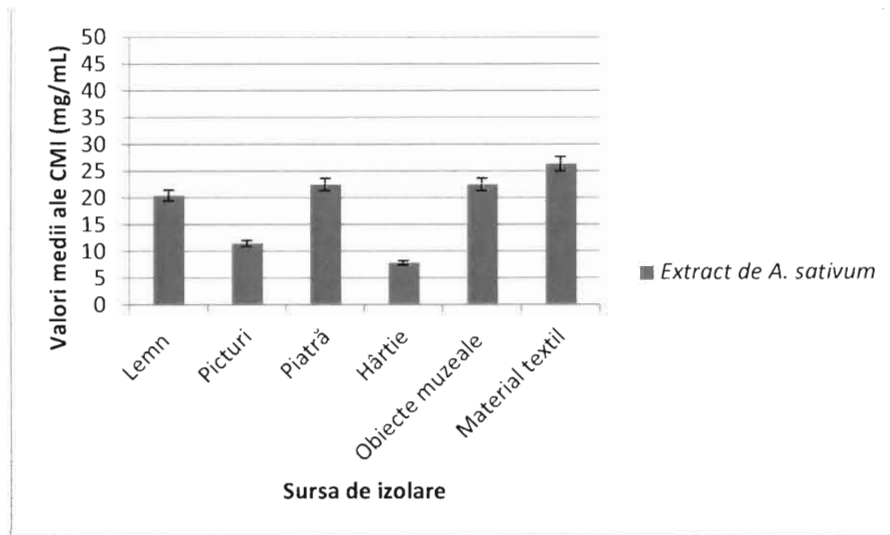


Figura 4A. Reprezentarea grafică a valorilor medii ale CMI obținute la testarea cantitativă a activității antimicrobiene a extractului de *A. sativum* pe tulpini de microfungi după sursa de izolare.

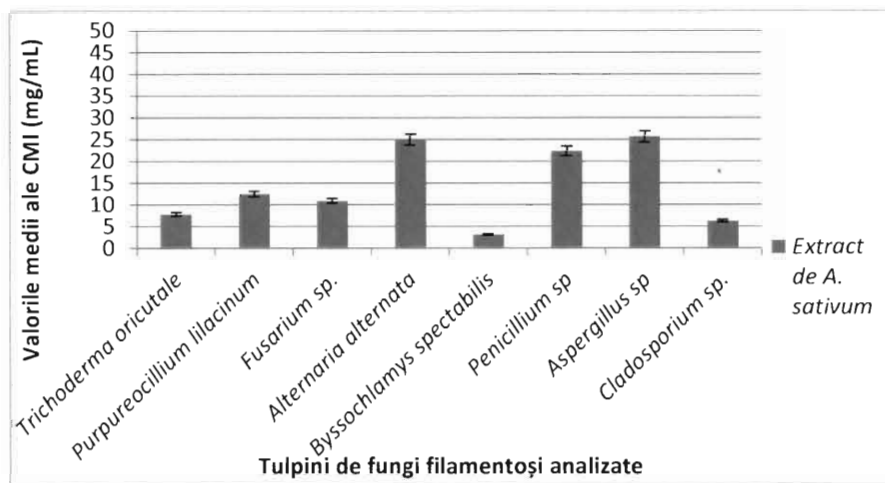
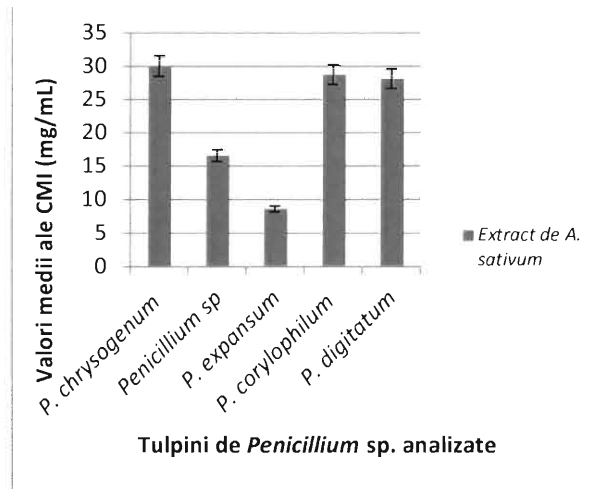
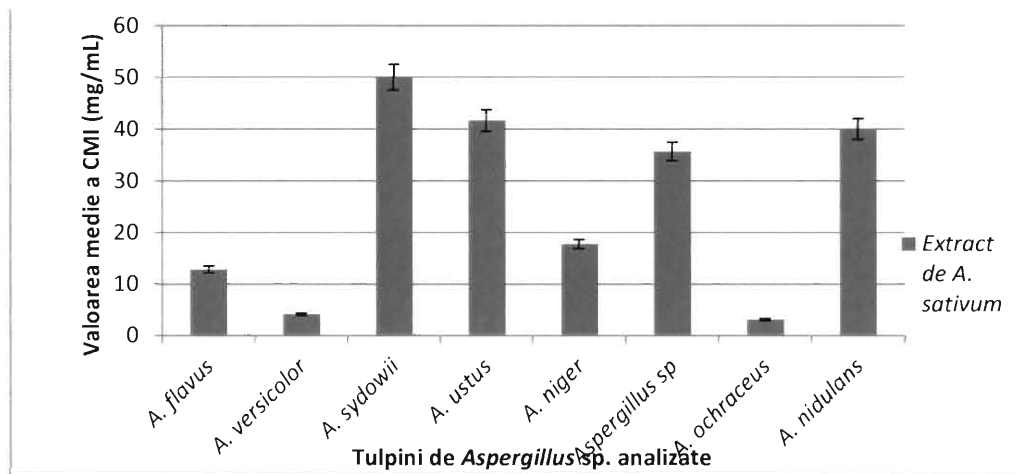


Figura 4B. Reprezentarea grafică a valorilor medii ale concentrației minime inhibitorii (CMI) obținute la testarea cantitativă a activității antimicrobiene a extractului de *A. sativum* pe tulpini de microfungi pe specii.



4C



4D

Figura 4. Reprezentare grafică a valorilor medii ale CMI obținute la testarea cantitativă a activității antimicrobiene a extractului de *A. sativum* pe tulpini aparținând diferitelor specii ale genului *Penicillium* (C) și *Aspergillus* (D).

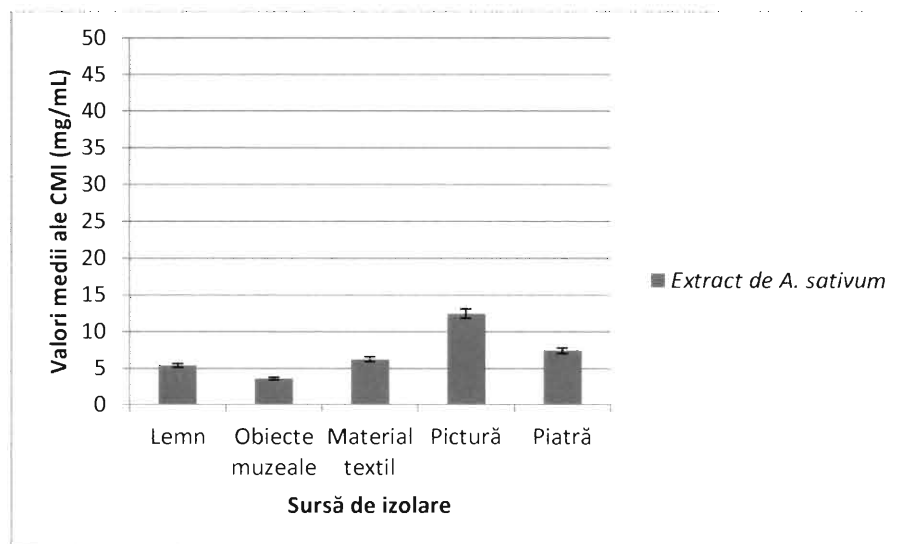


Figura 4F. Reprezentarea grafică a valorilor medii ale CMI obținute la testarea cantitativă a activității antimicrobiene a extractului de *A. sativum* pe tulpini bacteriene după sursa de izolare.

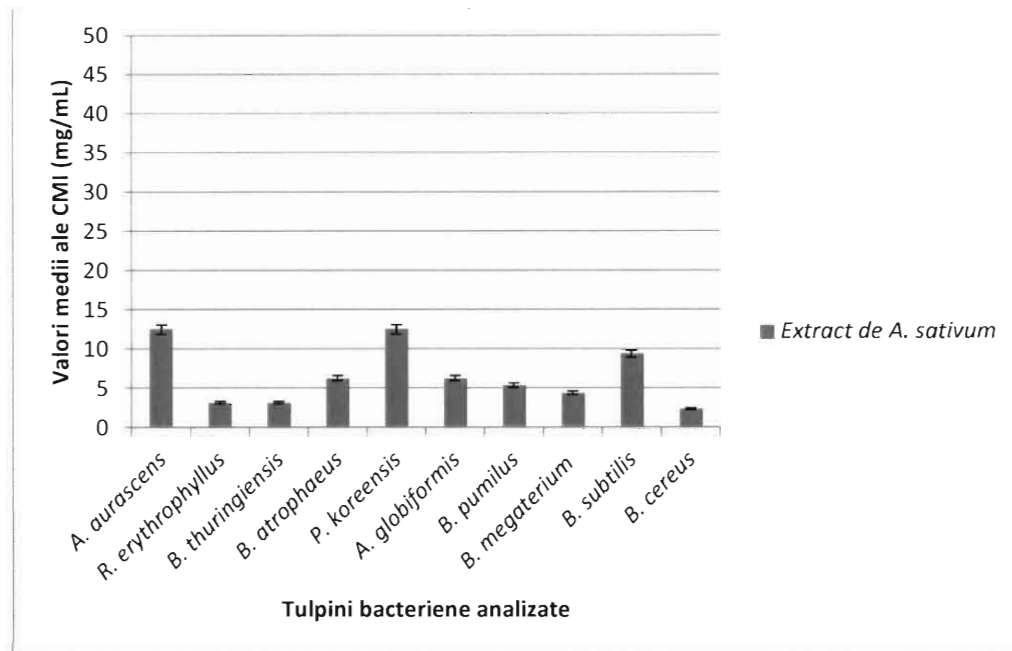


Figura 4G. Reprezentarea grafică a valorilor medii ale CMI obținute la testarea cantitativă a activității antimicrobiene a extractului de *A. sativum* pe tulpini bacteriene după specie.