



Şcoala Doctorală Interdisciplinară
Facultatea de Design de Mobilier şi Inginerie a Lemnului

Dana-Mihaela POP

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esenţiale pentru bioprotecţia antifungică a lemnului - oportunităţi şi limite în contextul eficienţă *versus* eco-impact

Research concerning utilisation of some essential oils for the antifungal bioprotection of wood - opportunities and limits in the context of efficiency *versus* eco-impact

REZUMAT

Domeniul de doctorat: Inginerie forestieră

Conducător ştiinţific

Prof.dr. Maria Cristina TIMAR

BRAŞOV, 2024

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

Cuprins

Rezumat/Teză

Lista de abrevieri.....	5/17
Introducere	6/18
Capitolul 1 - Stadiul actual a cunoștințelor privind natura, compoziția, efectul biocid și aplicațiile uleiurilor esențiale în bioprotecția lemnului	7/20
1.1. Istoricul uleiurilor esențiale.....	7/20
1.2. Definiție și surse	7/22
1.3. Proprietăți fizice.....	8/24
1.4. Metode de extracție a uleiurilor esențiale	8/24
1.5. Compoziția chimică a uleiurilor esențiale	8/32
1.6. Domenii de aplicabilitate	9/41
1.7. Efectul antifungic al uleiurilor esențiale	10/43
1.8. Cercetări privind utilizarea uleiurilor esențiale în bioprotecția lemnului.....	11/50
1.9. Toxicitatea și ecotoxicitatea uleiurilor esențiale.....	11/58
1.10. Concluzii.....	12/59
Capitolul 2 - Obiectivele cercetărilor experimentale.....	12/61
2.1. Scopul tezei	12/62
2.2. Prezentare generală a obiectivelor.....	12/62
Capitolul 3 - Metodologia de cercetare.....	13/65
3.1. Concept metodologic.....	13/65
3.2. Materiale.....	14/66
3.2.1. Hârtie suport pentru teste biologice tip screening	14/66
3.2.2. Material lemnos.....	14/66
3.2.3. Uleiuri esențiale	14/66
3.2.4. Produse biocide clasice.....	14/68
3.2.5. Material biologic – Fungi xilofage.....	15/69
3.2.6. Mediul de cultură – teste biologice	15/70
3.2.7. Semințe pentru teste de fito-toxicitate	15/71
3.3. Echipamente utilizate pentru pregătire probe și teste biologice	15/71
3.4. Metode de investigare și echipamente	15/73
3.5. Softuri utilizate.....	16/78
3.6. Teste biologice	17/80
Capitolul 4 - O1: Stabilirea și validarea unui protocol analitic de laborator	17/82
4.1. Teste screening.....	18/83
4.1.1. Evaluare calitativă și cantitativă.....	19/87
4.2. Teste minibloc	19/94

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

4.3. Test fitotoxicitate	20/ 103
4.4. Concluzii	21/ 106
Capitolul 5 - O2: Identificarea și caracterizarea unor uleiuri esențiale cu potențial efect biocid antifungic ..	21/ 107
5.1. Fișe caracterizare uleiuri esențiale	21/ 108
5.2. Analiză comparativă a celor 5 uleiuri esențiale.....	21/ 112
5.2.1. Proprietăți fizice.....	21/ 112
5.2.2. Compoziție chimică determinată prin GC-MS.....	22/ 112
5.2.3. Analiza FTIR	23/ 122
Capitolul 6 - O3: Evaluarea comparativă a efectului biocid antifungic – selectarea produselor cu potențial	24/ 125
6.1. Considerații generale asupra testelor screening efectuate și etape de cercetare.....	24/ 125
6.2. Rezultate testare și validare potențial antifungic prin teste screening.....	25/ 128
6.2.1. Fișe de rezultate testare și validare potențial antifungic.....	25/ 128
6.2.2. Analiza comparativă a potențialului biocid antifungic al uleiurilor esențiale testate...	25/ 129
6.2.3. Analiză comparativă a rezultatelor experimentale obținute în etapa de validare a potențialului antifungic pentru C-EO și T-EO.....	27/ 136
6.3. Concluzii	32/ 145
Capitolul 7 - O4: Determinarea eficienței biocide și a potențialului impact ecologic pentru două produse selectate (ulei esențial de Cuișoare C-EO, ulei esențial de Cimbru T-EO).....	33/ 147
7.1. Aspecte metodologice.....	33/ 147
7.1.1. Tratarea epruvetelor de lemn și pregătirea pentru testul minibloc	33/ 147
7.1.2. Testul minibloc	34/ 150
7.1.3. Testul de spălare probe lemn și testul de fitotoxicitate	34/ 150
7.2. Rezultate experimentale	35/ 152
7.2.1. Testul minibloc	35/ 152
7.2.2. Testul de fitotoxicitate	41/ 170
Capitolul 8 - O5: Teste preliminare de implementare în domeniul conservării bunurilor de patrimoniu din lemn	45/ 181
8.1. Argumente și obiective	45/ 181
8.2. -O5.1: Evaluarea eficienței EOs în tratamente de prevenire a atacului fungic activabil în condiții de umiditate (Test Pr).....	45/ 183
8.3. -O5.2: Evaluarea eficienței EOs în tratamente de combatere a unui atac fungic activ (ciuperci xilofage izolate de pe obiecte de patrimoniu).....	47/ 186
8.3.1. Rezultate și discuții.....	47/ 186
8.4. - O5.3: Teste de implementare în cazuri concrete de conservare lemn/artefacte muzeu.	49/ 197
8.4.1. Rezultate și discuții.....	50/ 199

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esenţiale pentru bioprotecţia antifungică a lemnului

8.5. - 05.4: Evaluarea influenţei tratamentelor cu EOs asupra culorii suprafeţelor de lemn şi comportării acestora la expunerea la lumină UV-VIS.....	52/201
8.6. - 05.5: Evaluarea compatibilităţii tratamentelor de bioprotecţie cu EOs cu finisarea ulterioară şi influenţa asupra culorii şi comportării la lumină a suprafeţelor finisate	53/202
8.6.1. Rezultate experimentale şi concluzii.....	53/202
Capitolul 9 -Concluzii finale, contribuţii originale, direcţii viitoare de cercetare	54/205
9.1. Concluzii finale.....	54/205
9.2. Contribuţii originale.....	56/207
9.3. Direcţii viitoare de cercetare.....	57/208
Bibliografie selectivă.....	58
Rezumat	63
Abstract	63

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

Lista de abrevieri

Nr.crt	Abreviere	Denumire completă	Observații
1	Ex.1.....3	Examen de specialitate	Original
2	R.1.....3	Raport științific	Original
3	P1.....P9	Publicații științifice proprii	Original
4	O1.....O5	Obiectivele tezei	Original
5	R-O1.....R-O5	Rezultatele obiectivelor tezei	Original
6	EO	Ulei esențial	Comun
7	B-EO	Ulei esențial de Busuioc	Original
8	C-EO	Ulei esențial de Cuișoare	Original
9	O-EO	Ulei esențial de Oregano	Original
10	S-EO	Ulei esențial de Scorțișoară	Original
11	T-EO	Ulei esențial de Cimbru	Original
12	LO	Ulei de in	Comun
13	BRE	Biocide clasice cu eficiență recunoscută	Original
14	RN	Romalit N	Original
15	FTIR	Spectrometrie în intraroșu cu transformată Fourier	Comun
16	GC-MS	Gaz cromatografie cuplată cu spectrometrie de masă	Comun
17	SEM	Microscopie electronică de scanare	Comun
18	TV	Ciuperca <i>Trametes versicolor</i>	Comun
19	CP	Ciuperca <i>Coniophora puteana</i>	Comun
20	PP	Ciuperca <i>Postia placenta</i>	Comun
21	GT	Ciuperca <i>Gloeophyllum trabeum</i>	Comun
22	SL	Ciuperca <i>Serpula lacrymans</i>	Comun
23	FC1-B, FC1-W, SW	Ciuperci izolate de pe obiecte de patrimoniu	Original
24	HP, HPI, CT, DH, R, RS, VM	Teste screening	Original
25	TF	Test fitotoxicitate	Original
26	TPr	Test tratare preventivă	Original
27	Tcu	Test tratare curativă	Original
28	TCuP	Test tratare curativă obiecte de patrimoniu	Original
29	I _{sol}	Indice de inhibiție pe mediu	Preluat
30	I _{paper}	Indice de inhibiție pe hârtie	Preluat
31	PM	Pierdere de masă	Original
32	RPM	Reducere de pierdere de masă	Original
33	U	Umiditate	Comun
34	Abs	Absorbție de produs	Comun
35	WPG	Reținere de produs	Comun
36	PG	Procent de germinare	Comun
37	LMG	Lungimea medie a germenilor	Comun
38	IG	Index de germinare	Comun
39	E1.....E10	Ape de spălare	Comun
40	FCA	Aria de acoperire cu miceliu	Original

Introducere

Lemnul reprezintă o resursă inestimabilă pentru omenire, dar în ciuda multiplelor sale calități, structura sa îl face vulnerabil la atacul agenților biologici de degradare (Eriksson et al., 1990; Zabel & Morrell, 2020). Produsele biocide de sinteză au fost multă vreme considerate soluția ideală pentru protejarea lemnului împotriva degradării biologice, dar cercetările ulterioare au scos la iveală efecte secundare îngrijorătoare ale acestor produse, atât asupra sănătății umane, cât și asupra mediului înconjurător (Jadon et al., 2022; Reinprecht, 2010). În fața acestei situații, autoritățile competente au fost nevoite să impună reglementări stricte privind utilizarea produselor biocide de sinteză. În acest context, atenția cercetătorilor și a specialiștilor s-a îndreptat către soluții naturale, iar o dată cu avansul tehnologic și dezvoltarea metodelor moderne de investigare științifică, uleiurile esențiale au început să fie considerate o opțiune promițătoare, datorită compoziției lor chimice, în care sunt prezenți compuși cu proprietăți remarcabile împotriva unei game largi de microorganisme, inclusiv fungi, bacterii și virusuri. Fiind produse naturale care susțin viața și imunitatea plantelor din care provin, este de așteptat ca aceste uleiuri să reprezinte o alternativă mult mai prietenoasă cu mediul în comparație cu biocidele sintetice tradiționale. Totuși, aspectele legate de posibilul impact ecologic datorită unor componenți cu activitate fitotoxică, au fost prea puțin studiate și necesită atenție și investigații (Ferraz et al., 2022). În plus față de potențiale beneficii ecologice, utilizarea uleiurilor esențiale în conservarea patrimoniului cultural ar putea aduce avantaje semnificative și din perspectiva sănătății ocupaționale. Specialiștii în conservare, restauratorii și alți profesioniști din domeniu sunt expuși în mod frecvent și pe termen lung la substanțele utilizate în tratamentele de conservare (Varnai et al., 2011).

Prin urmare, tranziția către utilizare a uleiurilor esențiale în conservarea lemnului nu este lipsită de provocări. Este necesară o cercetare aprofundată pentru a determina eficacitatea specifică a diferitelor uleiuri esențiale împotriva diverselor tipuri de agenți de degradare a lemnului. De asemenea, trebuie stabilite protocoale clare de aplicare și dozare, pentru a asigura eficiența tratamentului cu efecte secundare minime față de artefact, mediu, siguranța și sănătatea omului.

Teza de doctorat începe cu studiul de literatura privind uleiurile esențiale (Cap. 1), istoric, proprietăți, metode de obținere, compoziție și caracterul antifungic al acestor uleiuri, domenii de aplicabilitate și cu precădere domeniul tratării lemnului, toxicitate și ecotoxicitate. Obiectivele și fazele de cercetare (Cap.2) s-au bazat pe stadiul actual și scopul tezei. A fost elaborat și aplicat un concept metodologic original (Cap.3). Pe baza studiului bibliografic s-au ales, adaptat și realizat diferite tipuri de teste care s-au concluzionat într-un protocol analitic de analiză (Cap.4 - O1) folosit ulterior pe întregul parcurs al tezei pentru realizarea celorlalte obiective. Tot în urma studiului bibliografic s-au ales cinci uleiuri esențiale: **Busuioc (*Ocimum basilicum*) B-EO**, **Cuișoare (*Eugenia caryophyllata*) C-EO**, **Oregano (*Origanum vulgare*) O-EO**, **Scorțișoară (*Cinnamomum verum*) S-EO** și **Cimbru (*Satureja hortensis*) T-EO**, care s-au analizat, s-au caracterizat și comparat (Cap.5 – O2). Acestor cinci uleiuri esențiale li s-a testat potențialul antifungic (Cap.6-O3) prin teste screening din protocolul analitic și în urma lor s-au ales două uleiuri esențiale: **Cuișoare (*Eugenia caryophyllata*) C-EO** și **Cimbru (*Satureja hortensis*) T-EO**, cu care s-au continuat cercetările. Pentru cele două uleiuri s-a determinat efectul antifungic pe lemn, prin testul minibloc din protocolul analitic și s-a evaluat potențialul eco-impact prin testul de

fitotoxicitate din protocolul analitic (Cap. 7-04). Conform domeniului de aplicare urmărit în teză, aceste două uleiuri esențiale s-au utilizat în mai multe teste originale de implementare a lor în domeniul conservării-restaurării lemnului (Cap.8-05). Aceste teste dezvoltate completează protocolul analitic elaborat anterior. Rezultatele prezentate în această teză aduc o contribuție semnificativă la cunoștințele existente privind utilizarea uleiurilor esențiale în protecția lemnului împotriva fungilor xilofage. Studiul oferă o analiză detaliată a eficacității și impactului ecologic al acestor uleiuri, precum și a potențialului lor de utilizare în domeniul conservării-restaurării lemnului. Acest lucru este bine reflectat în concluziile tezei și direcțiilor viitoare de cercetare (Cap.9). Informațiile furnizate constituie o bază de date valoroasă, cu aplicații directe în conservarea științifică a lemnului, dar și în alte domenii conexe.

Teza în sine este structurată pe 9 capitole (192 de pagini), 46 de tabele, 92 de figuri și 162 de referințe. Anexele tezei (177 de pagini) reprezintă baze de date importante pentru subiectul studiat.

Capitolul 1 - Stadiul actual a cunoștințelor privind natura, compoziția, efectul biocid și aplicațiile uleiurilor esențiale în bioprotecția lemnului

Termenul "uleiuri esențiale" are o origine fascinantă, fiind derivat din expresia "uleiul cel mai important". Această denumire își are rădăcinile în filozofia aristotelică, care propunea că întreaga materie este alcătuită din patru elemente fundamentale: foc, aer, pământ și apă. În această concepție, se considera că există un al cincilea element, numit "quinta esență", care reprezenta spiritul sau forța vitală a materiei (Başer & Buchbauer, 2010).

1.1. Istoricul uleiurilor esențiale

Importanța și utilizarea uleiurilor esențiale în istoria omenirii sunt remarcabile, cu origini ce se întind până în antichitate. Dovezile istorice indică faptul că folosirea plantelor aromatice și a uleiurilor esențiale a fost o practică comună în civilizații străvechi precum China, India (5000 îHr.), Mesopotamia, Egipt sau Grecia(3000 îHr.). Există înscrisuri datând din aproximativ 4500 îHr care descriu utilizarea substanțelor balsamice aromatice în contextul ritualurilor religioase și al aplicațiilor medicale. (*Essential Oils pocket reference*, 2019) De la descoperirea lor uleiurile esențiale au fost utilizate pentru arome și aditivi în mâncăruri, ca și afrodisiace, parfumuri, în cosmetică, medicină și ritualuri religioase și ezoterice (Dima & Dima, 2015).

1.2. Definiție și surse

În conformitate cu a 7-a ediție a Farmacopeei europene, un ulei esențial este "*Produce odorizant, în general cu o compoziție complexă, obținut dintr-o materie primă definită botanic ca și plantă crudă, fie prin antrenare cu vapori de apă, fie prin distilare uscată sau printr-o procedură mecanică adecvată, fără încălzire. Un ulei esențial este de obicei separat din faza apoasă printr-o metodă fizică care nu conduce la modificări semnificative în compoziția sa chimică.*" (Asbahani et al., 2015).

Aproximativ 3000 de uleiuri esențiale sunt cunoscute, dintre care 300 sunt importante din punct de vedere comercial, în special pentru industria farmaceutică, agronomică, alimentară, sanitară, cosmetică

și parfumerie (Bakkali et al., 2008; Bhavaniramy et al., 2019; Butnariu & Sarac, 2018). Farmacopeea Europeană enumeră ca fiind sigure un număr de 28 de uleiuri esențiale (Sadgrove et al., 2021).

1.3. Proprietăți fizice

Uleiurile esențiale sunt compuși volatili, transparentți, incolori sau ușor colorați, variind de la nuanțe de albastru (specifice mușețelului) până la tonuri de brun (asociate cuișoarelor) sau galben-portocaliu (caracteristice portocalului), care se disting prin aroma lor inconfundabilă (Dhifi et al., 2016; Laur, 2022). Au solubilitatea excelentă în grăsimi și solvenți. Este important de menționat că uleiurile esențiale au un indice de refracție și o activitate optică foarte ridicată (Dhifi et al., 2016; Laur, 2022).

1.4. Metode de extracție a uleiurilor esențiale

Extracția uleiurilor esențiale este un proces complex și există o gamă variată de tehnici, așa cum este ilustrat în Fig. 1.1, care se pot utiliza. Alegerea metodei optime de extracție depinde de o serie de factori critici, printre care se numără tipul de plantă procesată, compoziția uleiurilor, cantitatea dorită de ulei esențial, calitatea finală a produsului, precum și considerente economice și de eficiență.

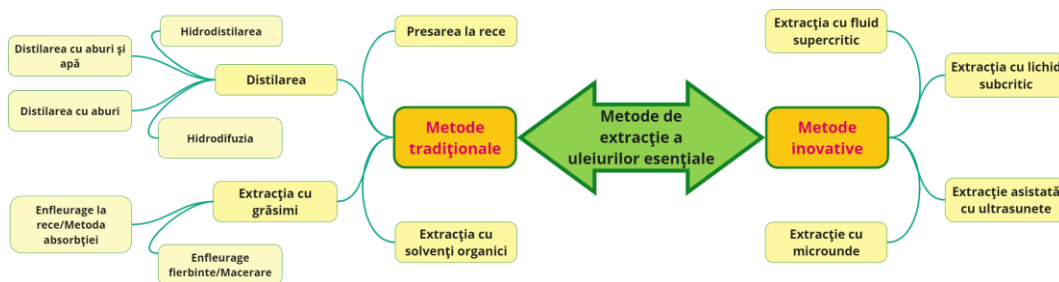


Fig. 1.1 Sinteza a tehnicilor de extracție a uleiurilor esențiale

1.5. Compoziția chimică a uleiurilor esențiale

Uleiurile esențiale reprezintă produse naturale complexe, caracterizate printr-o diversitate remarcabilă în ceea ce privește compoziția lor chimică, prezentând o variabilitate semnificativă atât în termeni calitativi, cât și cantitativi. (Dhifi et al., 2016; Jürgens & Viljoen, 2010). Compoziția chimică a uleiurilor esențiale poate varia semnificativ în funcție de factori precum genotipul plantei, chimiotipul, organul plantei, originea geografică, sezonul, condițiile de mediu, practicile agronomice, metodele de extracție și condițiile de depozitare (Butta et al., 2023; Shirzad et al., 2011). Compușii volatili sunt derivați în principal din trei căi de biosinteză, calea mevalonatului care duce la sesquiterpene, calea metil-eritritol care duce la mono- și diterpene și calea acidului shikimic din care rezultă fenilpropene. (Başer & Buchbauer, 2010) Aceste grupuri conțin compuși ciclici și aciclici din diferite clase, cum ar fi hidrocarburi, alcooli, esteri, fenoli, cetone, lactone, aldehide și oxizi (Fig. 1.2) (Turek & Stintzing, 2013).

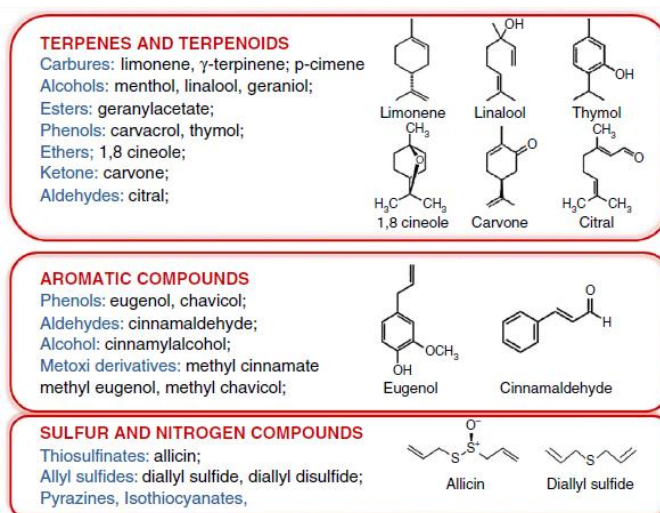


Fig. 1.2 Principalii compuși chimici ai uleiurilor esențiale¹

1.6. Domenii de aplicabilitate

Uleiurile esențiale au un spectru larg de aplicații în diferite industrii datorită complexității compoziției lor chimice și activității lor biologice. Au fost folosite în mare măsură pentru proprietățile lor deja observate în natură, adică pentru activitățile lor antibacteriene, antifungice și insecticide. Amestecul natural de monoterpene, sesquiterpene, diterpene și compuși aromatici, cu o varietate de grupe funcționale, oferă uleiurilor esențiale proprietăți: antibacteriene, antifungice, antitermite și insecticide. (Mohareb et al., 2013).

În sectoarele **farmaceutic, medical, terapeutic** și veterinar s-au raportat abordări promițătoare cu utilizarea uleiurilor esențiale sau a componentelor acestora în medicamente, fiind utilizate pentru potențialul lor ca tratamente pentru o serie de afecțiuni, inclusiv probleme respiratorii, infecții și probleme dermatologice (Bakkali et al., 2008; Dhifi et al., 2016; Fokou et al., 2020; Jerry Atoche Medrano, 2020; Laur, 2022; Mohammed et al., 2024). În **industria alimentară** uleiurile esențiale se folosesc ca și conservanți naturali datorită proprietăților lor antimicrobiene și antioxidante (Bhavaniramy et al., 2019), care ajută la prelungirea duratei de valabilitate a produselor alimentare. Ele sunt utilizate în ambalaje și conservarea alimentelor (Bakkali et al., 2008; Dima & Dima, 2015; Gatto et al., 2016; Juárez et al., 2015; Khalili et al., 2015; Nedorostova et al., 2009; Varona et al., 2013). **Sectorul agricol** beneficiază de proprietățile insecticide, fungicide și bactericide ale uleiurilor, care sunt utilizate pentru a proteja culturile și stocurile alimentare de dăunători, fără efectele adverse asociate cu substanțele chimice sintetice. (Bakkali et al., 2008; Butta et al., 2023; Gatto et al., 2016; Kumar et al., 2022; Righi-Assia et al., 2020). Uleiurile esențiale au potențial de utilizare în **bioprotecția lemnului** împotriva atacului ciupercilor mușcici și a celor xilofage (de putregai) datorită proprietăților lor antifungice. (Bahmani & Schmidt, 2018; Brischke, 2020; Cheng et al., 2008; Marcias et al., 2005; Mohareb et al., 2013; Pánek et al., 2014a; Šimůnková et al., 2022; Singh & Chittenden, 2008; Timar et al., 2022; Vettraino et al., 2022; S.-Y. Wang et al., 2005; Yang & Clausen, 2007; Zhang et al., 2016; Zyani

¹ (Dima & Dima, 2015)

et al., 2011). Aplicarea uleiurilor esențiale în **conservarea patrimoniului cultural** este promițătoare, în special datorită proprietăților lor antimicrobiene și toxicității scăzute (Varnai et al., 2011). De exemplu, uleiul esențial de oregano s-a dovedit a fi extrem de eficient împotriva ciupercilor izolate din pielea mumificată arheologică biodegradată, inclusiv *Aspergillus tabacinus*, *Aspergillus tennesseensis* și *Trichoderma longibrachiatum*, atât în testele in vitro, cât și în testele pe pergament (Sanchis et al., 2023). De asemenea, s-au obținut rezultate bune în conservarea cărților istorice și a materialelor de hârtie (Borrego et al., 2012; GÓMEZ DE SARAIVA et al., 2008). În zona de patrimoniu din lemn, uleiul esențial de oregano, cel de cuișoare și cel de busuioc au dovedit puternic efect antifungic împotriva unor tipuri de fungi izolate de pe lemn provenit dintr-o casă veche (Zyani et al., 2011). Tot oregano, într-o altă cercetare împotriva unor fungi izolate de pe obiecte din lemn de patrimoniu din Serbia, a arătat efecte antifungice comparabile cu un biocid (clorură de benzalconiu) folosit pentru comparație (Stupar et al., 2014).

1.7. Efectul antifungic al uleiurilor esențiale

Efectul uleiurilor esențiale asupra fungilor poate fi urmărit/observat atât la nivel macromorfologic, cât și la nivel celular. Unele dintre modificările macromorfologice sunt: lipsa sporulării sau a pigmentării, modificarea numărului de conidii, ramificarea crescută a hifelor sau modificarea dimensiunii acestora. Aceste modificări sunt consecința activităților componentelor uleiurilor asupra proceselor enzimatice implicate în formarea peretelui celular, care afectează creșterea ciupercii și morfogeneza, precum și alte mecanisme prin care are loc moartea miceliului (Butta et al., 2023; Plavsic et al., 2017). Proprietățile citotoxice ale EO, adesea datorate fenolilor, aldehydilor și alcoolilor, sunt cruciale pentru efectele lor antifungice, deoarece acești compuși pot pătrunde în celulele fungice mai eficient în timpul fazelor de creștere activă (Bakkali et al., 2008).

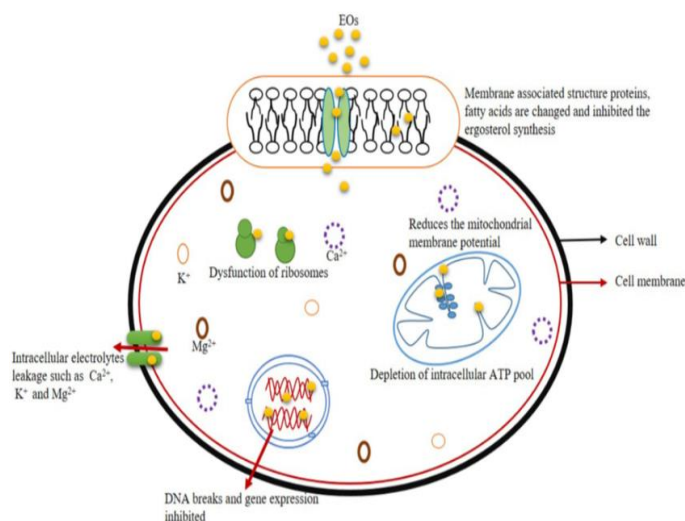


Fig. 1.3 Mecanismul de acțiune antifungic al uleiurilor esențiale²

În urma cercetării bibliografice din 15 articole s-au identificat 43 de uleiuri esențiale cu potențial antifungic, sintetizate tabelar în Baza de date anexată la finalul tezei (BD 1).

² (Maurya et al., 2021)

1.8. Cercetări privind utilizarea uleiurilor esențiale în bioprotecția lemnului

Ținând cont de caracteristicile compușilor chimici componenți ai uleiurilor esențiale, acestea au făcut obiectul mai multor cercetări și în ceea ce privește utilizarea lor pentru protecția lemnului împotriva fungilor lignicole din categoria ciuperci de mușegai, ciuperci de putregai brun, alb, moale (Cheng et al., 2008; Chittenden & Singh, 2011; Juárez et al., 2015; Mohareb et al., 2013; S.-Y. Wang et al., 2005; Zyani et al., 2011).

În cadrul cercetărilor efectuate asupra efectelor uleiurilor esențiale împotriva ciupercilor de putregai alb și brun, s-au evidențiat rezultate promițătoare și semnificative. Din analiza acestora au rezultat următoarele aspecte:

- O serie de uleiuri esențiale, printre care cele de oregano, cimbru, cuișoare, busuioc și scorțișoară, au demonstrat în mod constant eficacitate împotriva ambelor tipuri de fungi, fiind incluse în multiple studii.
- Aceste constatări sunt susținute și de investigațiile care au examinat compuși puri, unde cinamaldehida (componentul principal al uleiului de scorțișoară) și eugenolul (compusul predominant în uleiul de cuișoare) s-au remarcat ca fiind cei mai frecvent testați și cu o eficiență remarcabilă. De asemenea, carvacrolul, component esențial al uleiului de oregano, și metilchavicolul (estragol), constituent principal al uleiului de busuioc, au prezentat rezultate notabile în combaterea acestor agenți patogeni.
- Analizele comparative au relevat faptul că, în general, eficacitatea uleiurilor esențiale s-a dovedit a fi superioară împotriva ciupercilor de putregai brun în comparație cu cele de putregai alb.
- Aceste descoperiri oferă perspective valoroase pentru dezvoltarea de noi strategii de protecție a lemnului și a altor materiale susceptibile la atacul fungic, subliniind potențialul semnificativ al uleiurilor esențiale ca alternativă naturală și ecologică la tratamentele convenționale.

1.9. Toxicitatea și ecotoxicitatea uleiurilor esențiale

Ecotoxicitatea uleiurilor esențiale este un subiect cu mai multe fațete, cuprinzând efectele lor asupra diferitelor organisme și ecosisteme. Uleiurile esențiale, derivate din diferite părți ale plantelor, sunt bogate în compuși precum monoterpene, sesquiterpene și compuși fenolici, care conferă diverse activități biologice, inclusiv proprietăți insecticide, respingătoare și fungicide (Kumar et al., 2022).

În ciuda activităților lor biologice puternice, uleiurile esențiale prezintă în general toxicitate scăzută pentru mamifere și pești datorită absenței unor ținte specifice în aceste organisme, făcându-le potrivite pentru utilizare ca „pesticide verzi” în agricultură și producția de alimente ecologice (Kumar et al., 2022). Cu toate acestea, unele uleiuri esențiale pot provoca efecte adverse; de exemplu, uleiul de *Melaleuca alternifolia* a fost legat de toxicoza la animalele de companie (Kumar et al., 2022).

La om uleiurile esențiale sunt considerate destul de sigure în cazul respectării recomandărilor de utilizare / concentrației. Cu toate acestea, există uleiuri esențiale a căror compuși pot provoca efecte

adverse; de exemplu, uleiul de *Melaleuca alternifolia* a fost legat de dermatita de contact (Kumar et al., 2022).

1.10. Concluzii

Uleiurile esenţiale reprezintă o categorie de substanţe naturale cu o diversitate şi complexitate remarcabilă. Cercetările ştiinţifice au confirmat că uleiurile esenţiale prezintă o gamă largă de proprietăţi benefice, printre care se evidenţiază în mod deosebit efectele lor antifungice.

În domeniul protecţiei lemnului împotriva atacurilor fungice responsabile pentru putregaiul brun şi alb, s-au remarcat uleiurile de busuioc, oregano, cuişoare, scorţişoară, cimbru. Aceste uleiuri au demonstrat o eficacitate promiţătoare în inhibarea creşterii şi dezvoltării acestor agenţi patogeni, oferind o posibilă alternativă, potenţial mai ecologică, la tratamentele cu biocide convenţionale pentru protecţia lemnului.

Deşi uleiurile esenţiale sunt adesea considerate, apriori, doar produse naturale benefice, implicit fără riscuri de toxicitate şi eco-impact, este important să recunoaştem că acestea pot prezenta şi anumite riscuri. Este esenţial să se efectueze cercetări aprofundate privind eficacitatea pe termen lung şi impactul ecologic al utilizării uleiurilor esenţiale în protecţia lemnului.

Rezultatele obţinute vor putea contribui la dezvoltarea unor metode de alternative de bio-protecţie a lemnului care să fie atât eficiente, cât şi sustenabile. Doar prin cercetare aprofundată asupra oportunităţilor şi limitelor utilizării EOs se va putea aprecia corect în ce măsură utilizarea acestor uleiuri esenţiale reprezintă o soluţie viabilă şi responsabilă pentru bio-protecţia lemnului, respectiv aplicabilitatea în domeniul conservării-restaurării bunurilor culturale din lemn.

Capitolul 2 - Obiectivele cercetărilor experimentale

2.1.Scopul tezei

Scopul tezei este să identifice şi să testeze aplicabilitatea unor uleiuri esenţiale în protecţia antifungică a lemnului, urmărind în paralel eficienţa acestora şi impactul lor asupra mediului înconjurător. Ideea centrală a studiului este aceea de a identifica uleiuri esenţiale care să prezinte o eficienţă adecvată în protecţia antifungică a lemnului, având în acelaşi timp o nocivitate redusă pentru om şi mediu. Domeniul de aplicabilitate vizat în mod special este conservarea şi restaurarea lemnului/mobilierului istoric.

2.2. Prezentare generală a obiectivelor

Pentru atingerea scopului propus şi considerând concluziile studiului literaturii de specialitate, în cadrul acestei teze de doctorat au fost stabilite o serie de obiective experimentale clare şi bine definite, menite să ghideze întregul proces de cercetare (Tab. 2.1).

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

Tab. 2.1 Conținutul și Obiectivele experimentale ale tezei

Cod	Obiective
01	Stabilirea unui protocol analitic de laborator pentru identificarea produselor cu activitate biocidă antifungică (teste screening), testarea eficienței (teste minibloc) și impactului ecologic (teste de fito-toxicitate); validarea protocolului prin teste pe substanțe biocide clasice cu eficiență cunoscută (BRE)
02	Identificarea și caracterizarea unor uleiuri esențiale cu potențial efect biocid antifungic pentru protecția lemnului
03	Testarea efectului biocid antifungic prin teste screening și selectarea produselor cu potențial
04	Determinarea eficienței de protecție antifungică a lemnului și a potențialului impact ecologic pentru produsele selectate
05	Oportunități și limite de implementare în domeniul conservare-restaurare lemn/mobiler istoric

Capitolul 3 - Metodologia de cercetare

3.1. Concept metodologic

Conceptul metodologic reprezintă o componentă esențială a structurii generale a tezei, fiind integrat în aceasta (Fig. 3.1 - chenar negru). Acesta cuprinde procesul de selecție, adaptare și implementare practică a diferitelor tipuri de teste în vederea selectării variantelor adecvate pentru elaborarea protocolului analitic specific obiectivelor tezei, aplicarea acestuia pe parcursul întregii cercetări, precum și alegerea materialelor și a metodelor de investigație adecvate pentru caracterizarea acestora. Dezvoltarea conceptului metodologic s-a bazat inițial pe o cercetare aprofundată a literaturii de specialitate și pe identificarea necesităților specifice de cercetare, în vederea îndeplinirii obiectivelor tezei.

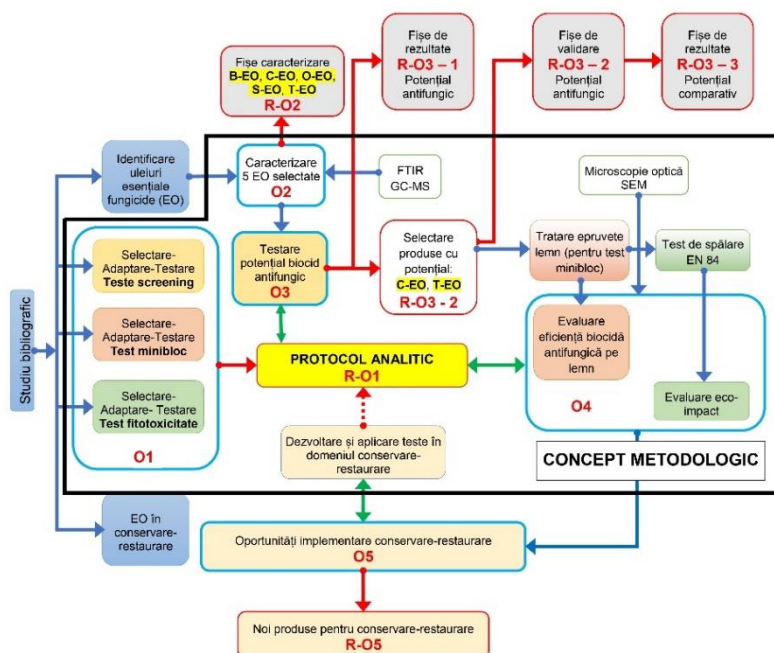


Fig. 3.1 Schema generală a tezei cu evidențierea conceptului metodologic complex specific tezei

3.2. Materiale

3.2.1. Hârtie suport pentru teste biologice tip screening

Hârtia de filtru cromatografică Whatman (nr.1 și nr.3) și Antibiotics test paper – Fisher Scientific (13 mm) au fost utilizate pe parcursul întregii cercetări.

3.2.2. Material lemnos

Materialul lemnos folosit în testele mini-bloc (metodă adaptată după EN 113:1995) și testele originale de evaluare a potențialului de utilizare în conservare-restaurare a fost lemn masiv de fag neaburit (*Fagus sylvatica* L.) și alburn de pin (*Pinus sylvestris* L.), acestea fiind speciile nedurabile de referință conform SR-EN 335:2002. S-au folosit epruvete cu dimensiuni de 20x20x5 mm (L x Ra x Tg), debitate din material sănătos, fără defecte.

3.2.3. Uleiuri esențiale

Cercetarea a fost realizată utilizând cinci uleiuri esențiale pure (concentrație 100%), ambalate în sticlule de 10 ml, comercializate sub marca Steaua Divină³ (Tab. 3.1). Pe parcursul experimentelor, aceste uleiuri esențiale au fost folosite atât în stare pură (C=100%), cât și diluate în doi solvenți diferiți: alcool etilic și ulei de in. Scopul acestei abordări a fost de a evalua eficacitatea și potențialul aplicativ al uleiurilor esențiale în diferite condiții și concentrații, permițând o analiză comparativă a rezultatelor obținute.

Tab. 3.1 Uleiurile esențiale (EO) utilizate experimental.

Nr.crt.	Ulei esențial	Denumire științifică	Sursă ulei esențial	Cod
1.	Busuioc	<i>Ocimum basilicum</i>	Steaua divină	B-EO
2.	Cuișoare	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Steaua divină	C-EO
3.	Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Steaua divină	O-EO
4.	Scorțișoară	<i>Cinnamomum verum</i>	Steaua divină	S-EO
5.	Cimbru	<i>Satureja hortensis</i>	Steaua divină	T-EO

3.2.4. Produse biocide clasice

În cadrul cercetării, au fost utilizate și unele substanțe biocide clasice cu eficiență recunoscută (BRE), precum sulfatul de cupru (CuSO_4), Romalit N (55% CuSO_4 / 45% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), Biotin T⁴ și Diffusit S⁵, unele cu scopul validării protocolului analitic și altele servind ca referință pentru evaluarea eficienței uleiurilor esențiale investigate în domeniul conservării-restaurării. Aceste substanțe au fost selectate datorită utilizării lor curente și a eficienței demonstrate în acest domeniu.

³ <https://www.steauadivina.ro/catalog/uleiuri-esentiale-10ml-71>

⁴ <https://ctsconservation.com/en/solvents-and-chemical-products/6080-biotin-t-pack-size-1-kg.html>

⁵ https://www.pannon-protect.eu/files/roman/M_Diffusit%20S%20ro.pdf

3.2.5. Material biologic – Funghi xilofage

În cadrul testelor biologice s-au utilizat, în diferite etape, cinci tipuri de funghi lignicole xilofage din familia *Basidiomycetes*, existente în colecția micologică a laboratorului din cadrul C11-ICDT (Tab. 3.2).

Tab. 3.2 Tipuri de funghi, denumire și coduri experimentale utilizate în teză⁶

Nr.Crt.	Tip	Denumire	Cod
1	Putregai alb	<i>Trametes versicolor</i>	TV
2	Putregai brun	<i>Coniophora puteana</i>	CP
3	Putregai brun	<i>Postia placenta</i>	PP
4	Putregai brun	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	GT
5	Putregai brun	<i>Serpula lacrymans</i>	SL

3.2.6. Mediul de cultură – teste biologice

În toate testele biologice s-a utilizat un mediu de cultură de tip MEA (extract de malț/agar).

3.2.7. Semințe pentru teste de fito-toxicitate

În cadrul studiului de fitotoxicitate, s-au utilizat inițial două specii de semințe, și anume salată (*Lactuca sativa* L.) și cresson (*Lepidium sativum* L.)

3.3. Echipamente utilizate pentru pregătire probe și teste biologice

Experimentele din cadrul tezei de doctorat s-au realizat în cadrul Laboratorului de teste biologice și îmbătrânire din cadrul Centrului de cercetare C11: Eco-design de mobilier, restaurare și certificare în industria lemnului, din cadrul ICDD al Universității Transilvania din Braşov, folosind echipamentele din dotare.

3.4. Metode de investigare și echipamente

În Tab. 3.3 sunt prezentate pe scurt metodele de investigare folosite pe parcursul prezentei cercetări pentru caracterizarea uleiurilor esențiale, identificarea/evidențierea biodegradării suferite de epruvetele expuse la funghi, unele particularități ale fungilor de putregai, analiza germenilor din cadrul testelor de fitotoxicitate.

⁶ <https://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esenţiale pentru bioprotecţia antifungică a lemnului

Tab. 3.3 Metode de investigare utilizate în cadrul cercetării

Metoda de investigare	Epruvete lemn	Uleiuri esenţiale	Epruvete lemn tratate	Funghi	Test fito	Echipament folosit	Localizare echipament
Macroscopic Evaluare vizuală - Foto	DA	DA	DA	DA	DA	Aparat Foto Canon 400D Telefon Samsung note 10 plus	ICDT Braşov
Microscopie optică	DA	NU	DA	DA	DA	Stereomicroscop Nikon SMZ25/SMZ18 Microscop portabil	ICDT Braşov
Spectrometrie FT-IR	NU	DA	DA	NU	NU	Spectrometrul FT-IR BRUKER ALPHA	ICDT Braşov
Gaz cromatografie cu spectroscopie de masă GC-MS	NU	DA	NU	NU	NU	Focus GC echipat cu un Spectrometru de masă DSQII şi un autosampler TriPlus (Thermo Electron Corporation)	FSIM UBB Cluj-Napoca
Microscopie electronică de scanare SEM	DA	NU	DA	NU	NU	FEI, Quanta 250	Ecole Supérieure du Bois from Nantes-France

3.5. Softuri utilizate

Pe parcursul cercetării şi a elaborării prezentei lucrări s-au utilizat diferite softuri pentru prelucrarea diferitelor tipuri de date. Acestea sunt prezentate în Tab. 3.4

Tab. 3.4 Softuri utilizate pe parcursul tezei

Nr.crt	Denumire	Scop
1	Microsoft Word	Editare documente
2	Microsoft Excel	Calcul tabelar
3	Opus	Prelucrare spectre FTIR
4	CorelDraw; Inkscape;	Scheme, măsurători creştere miceliu pe poze
5	ImageJ	Prelucrare foto, măsurători creştere miceliu pe poze
6	Photoshop, Paint	Prelucrare foto
7	Zotero	Soft gestionare referinţe bibliografice

3.6. Teste biologice

În cadrul acestei cercetări, au fost atent identificate/selectate, adaptate și realizate diverse tipuri de teste biologice standardizate sau consacrate prin cercetări anterioare. Totodată, au fost concepute și utilizate teste originale, pentru a răspunde nevoilor specifice ale obiectivelor de cercetare. Un sumar al testelor bio este prezentat în Tab. 3.5.

Tab. 3.5 Tipuri de teste realizate pe parcursul cercetării

Nr crt	Tip test	Denumire test	Cod
1	Testare potențial biocid	Metoda Humar and Pohleven	HP
2		Metoda Humar and Pohleven	HPI
3		Test Reinprecht	R
4		Test CT (test adaptat după testul Reinprecht)	CT
5		Test ICWSE	DH
6		Test RS (Reinprecht)	RS
7		Metoda diluției în mediu de agar	VM
8	Evaluare eficiență biocidă	Test minibloc	R
9	Evaluare eco-impact	Test fitotoxicitate	TF
10	Evaluare eficiență biocidă	Test tratare preventivă	TPr
11	Evaluare eficiență biocidă	Test tratare curativă	TCu
12	Evaluare eficiență biocidă	Test tratare curativă - studiu practic pe obiecte de patrimoniu	TCuP

Capitolul 4 - O1: Stabilirea și validarea unui protocol analitic de laborator

Acest capitol urmărește realizarea primului obiectiv al tezei, respectiv stabilirea unui protocol analitic, util în atingerea tuturor obiective propuse.

În Fig. 4.1 este prezentat schematic protocolul analitic care cuprinde trei tipuri de metode de testare. În primă fază se studiază potențialul antifungic al produselor utilizate. Astfel este necesar a se stabili o metodologie de testare care să permită stabilirea efectului biocid antifungic. După această primă fază în care s-a demonstrat eficiența produselor asupra fungilor, se poate trece la următoarea etapă care cuprinde alte două tipuri de teste, unul care evaluează efectul antifungic demonstrat prin testarea produsului pe lemn și în paralel se studiază impactul ecologic.

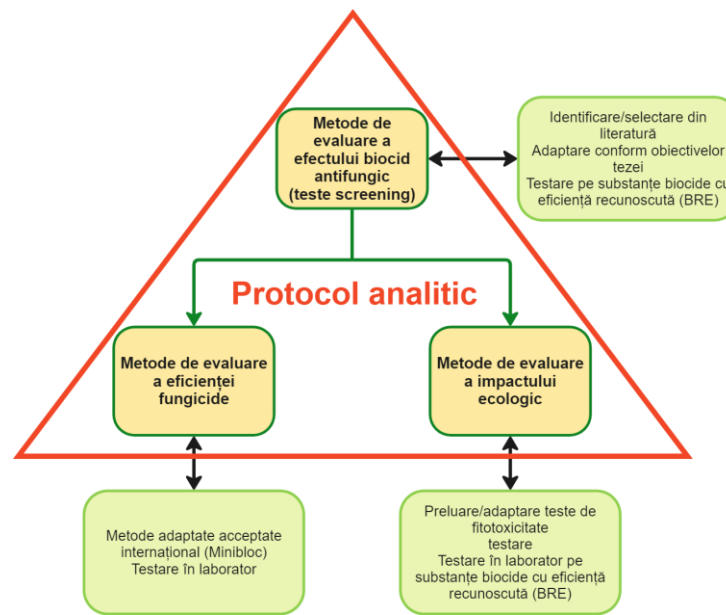


Fig. 4.1 Schema protocolului analitic

4.1. Teste screening

Testarea eficienței unui produs de protecția lemnului prin metoda clasică EN 113 este laborioasă și de lungă durată, astfel apare necesitatea unor teste screening pentru o primă selecție a substanțelor cu potențial biocid. În literatura de specialitate sunt prezentate diferite teste de tip screening, acestea fiind cu aplicabilitate generală sau specifică pe alte domenii decât protecția lemnului: protecția patrimoniului documentar (Borrego et al., 2012; GÓMEZ DE SARAVIA et al., 2008), agricultură (Ûrgeovă et al., 2013), nutriție (Gatto et al., 2016; Gurnani et al., 2016; Juárez et al., 2015; Varona et al., 2013; Viuda-Martos et al., 2008), medicină (Ullah et al., 2016).

Principial, testele screening urmăresc identificarea rapidă a substanțelor cu potențial biocid, relevat în test prin inhibarea dezvoltării/efectul letal asupra fungilor inoculate controlat pe un mediu de cultură steril.

Identificarea celei mai potrivite metodologii de testare preliminară a efectului biocid al uleiurilor esențiale a necesitat mai multe etape experimentale în care s-au realizat 7 tipuri de teste screening (Fig. 4.2), alese din literatură și adaptate. Pentru validarea testelor de tip screening s-au folosit substanțe biocide cu eficiență recunoscută (BRE- Sulfat de cupru (CuSO_4) și Romalit N (55% Sulfat de Cupru Cu SO_4 + 45% Bicromat de potasiu $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)) precum și o primă selecție de uleiuri esențiale, alese după studiul bibliografic.

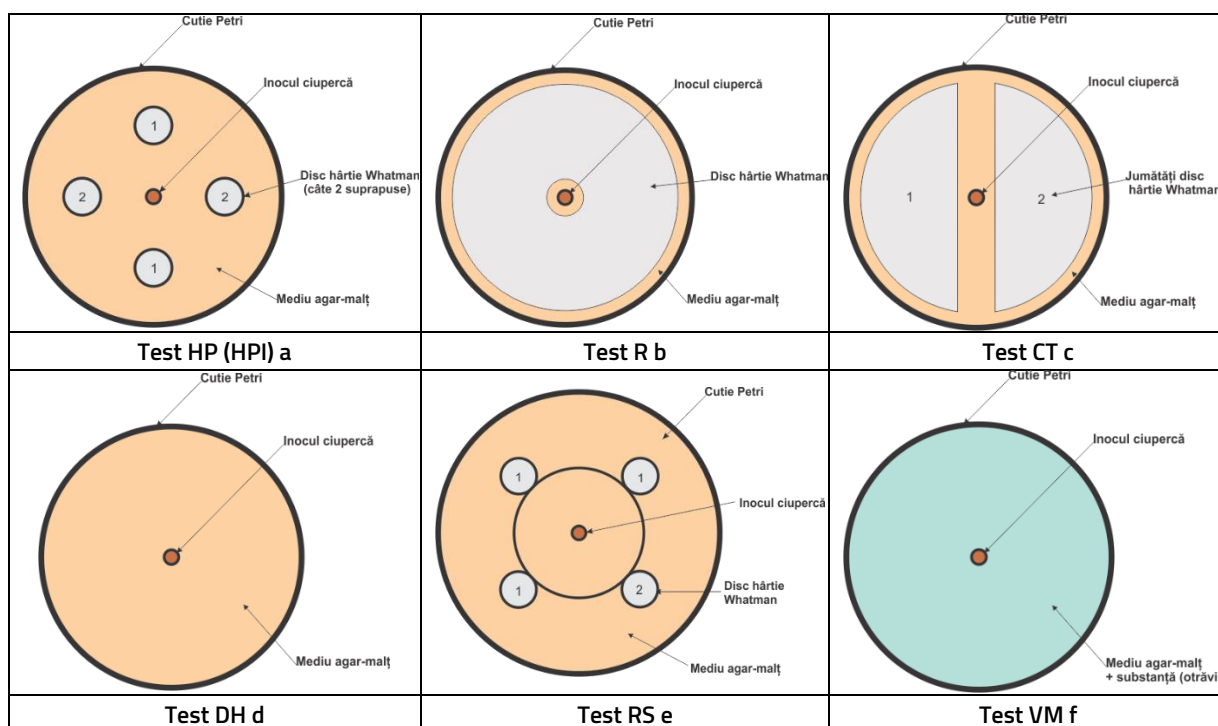


Fig. 4.2 Schemele principale ale testelor screening

4.1.1. Evaluare calitativă și cantitativă

Evaluarea calitativă s-a realizat prin analiză vizuală a modului de dezvoltare a ciupercii din inoculul inițial și documentare fotografică, după diferite intervale de timp de la inoculare. S-a urmărit gradul de dezvoltare/extindere a miceliului ciupercii precum și eventuala orientare preferențială (control *vs.* biocid). Acest lucru a fost necesar atât pentru a urmări evoluția dezvoltării ciupercii funcție de condițiile de testare cât și pentru a stabili perioadele de examinare relevante și duratele maxime de testare.

Cuantificarea rezultatelor vizuale (evaluare cantitativă) s-a realizat astfel:

Pentru testele **HP**, **HPI**, **R**, **CT**, **DH** și **VM** s-a elaborat o metodă de măsurare a dezvoltării miceliului ciupercii făcută pe fotografii, în softul CorelDraw și de calculare a unui **Indice de dezvoltare (I)** care reprezintă raportul dintre creșterea ciupercii înspre/pe soluția de testat și creșterea ei înspre/pe soluția control (inițial).

Pentru Testul **RS** s-a preluat metoda de evaluare cantitativă de la laboratorul de teste micologice de la Universitatea tehnică din Zvolen și anume măsurare cu rigla a creșterii miceliului pe mediu și pe hârtie, pentru a putea calcula ulterior **indicele de inhibiție a creșterii ciupercii pe mediu (I_{sol} , %)** și **indicele de inhibiție a creșterii ciupercii pe hârtie (I_{paper} , %)**

4.2. Teste minibloc

Testele minibloc au ca scop verificarea efectului biocid (fungicid) pe lemn al unor produse cu potențial efect biocid prefigurat anterior prin teste screening. S-au realizat două tipuri de teste (Fig. 4.3, Fig. 4.4)

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

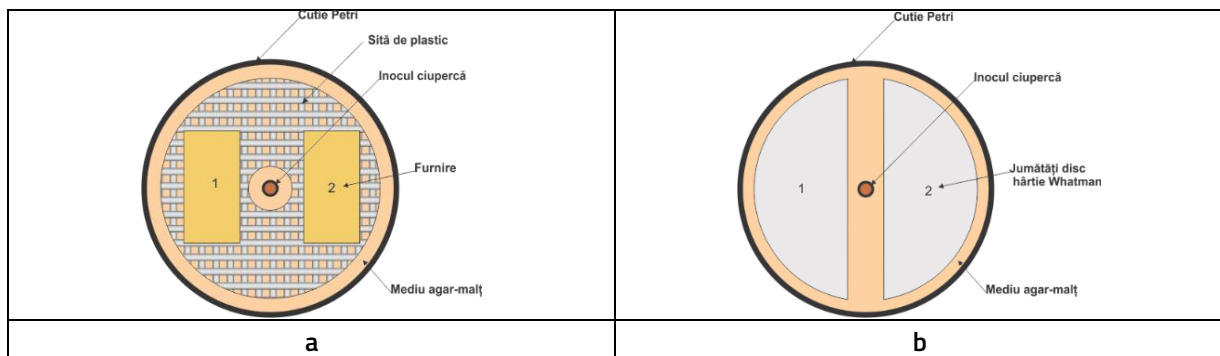


Fig. 4.3 Aspecte comparative privind modul de dispunere a epruvetelor între testul minibloc A (a) și testul screening CT (b)

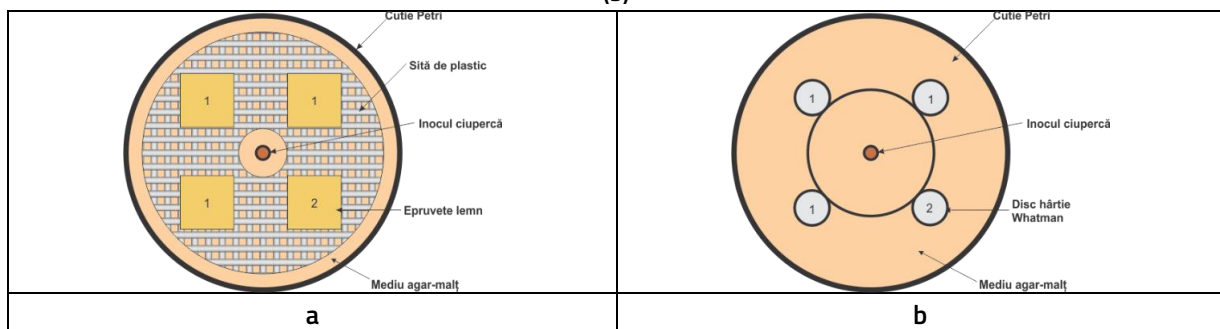


Fig. 4.4 Aspecte comparative privind modul de dispunere a epruvetelor între testul minibloc R (a) și testul screening RS (b)

Aceste teste sunt realizate conform principiilor de testare din EN 113, dar cu epruvete de mici dimensiuni, pentru reducerea timpului de testare. Testele minibloc urmăresc pierderea de masă a epruvetelor în urma atacului fungic, epruvetele fiind plasate pe un mediu de cultură inoculat cu ciuperca de testare. Validarea acestor teste a folosit două uleiuri esențiale, alese după studiul bibliografic.

4.3. Test fitotoxicitate

În contextul protecției lemnului impactul ecologic poate să fie atât direct (în momentul aplicării tehnologiei de tratare a lemnului) cât și indirect (prin substanțele care ajung să influențeze diferite componente de mediu prin folosirea lemnului tratat).

În urma cercetărilor bibliografice s-a ales un test de fitotoxicitate realizat pe semințe, în care se analizează atât calitativ – vizual cât și cantitativ modul în care o substanță influențează germinarea și creșterea germenilor (Roccotiello et al., 2011). Teste asemănătoare testului ales se găsesc de cumpărat și sub formă de kit.⁷ Pentru a putea fi testat cât mai corect potențialul efect fitotoxic al produselor folosite în tratarea lemnului (epruvetele de la testul minibloc R) a fost necesară efectuarea unui test anterior testului de fitotoxicitate, cu scopul de a obține soluțiile folosite în test. Astfel s-a realizat un test de spălare a epruvetelor de lemn tratate pentru testul minibloc R, conform SR EN 84:2000.

⁷<https://www.microbiotests.com/toxkit/phytotoxicity-test-with-phytotokit-liquid-samples/>

4.4. Concluzii

Atât testul **RS** cât și testul **CT** au avut rezultate similare sau cu aceeași tendință, dar datorită faptului că pentru testul **RS** metoda de măsurare s-a dovedit mai fezabilă și că pentru acest test există și referințe în literatură (ex. Pánek et al., 2014b), s-a decis folosirea acestui test mai departe în prezenta cercetare.

Testul minibloc **R** este validat pentru a se folosi în continuare, atât datorită rezultatelor obținute în această primă etapă de folosire, cât și datorită apropierii de cerințele standardului EN 113.

Evaluarea impactului asupra mediului se va evalua pe baza rezultatelor obținute prin testul de fitotoxicitate **TF** completat cu test anterior de spălare.

Capitolul 5 - O2: Identificarea și caracterizarea unor uleiuri esențiale cu potențial efect biocid antifungic

Acest capitol se concentrează pe analiza detaliată a compoziției chimice a unor uleiuri esențiale, aspect deosebit de important pentru înțelegerea și explicarea modului în care acestea interacționează cu fungile lignicole, precum și cu solvenții/mediile de diluare sau suportul lemnos tratat.

Pe baza unei analize bibliografice amănunțite, au fost identificate în literatura de specialitate diverse uleiuri esențiale cu potențial antifungic, care ar putea fi utilizate împotriva ciupercilor de putregai ce afectează lemnul. Astfel, pentru cercetările efectuate în cadrul acestei teze de doctorat s-au ales inițial cinci uleiuri esențiale: **B-EO** (*Ocimum basilicum*), **C-EO** (*Eugenia caryophyllata*), **O-EO** (*Origanum vulgare*), **S-EO** (*Cinnamomum verum*) și **T-EO** (*Satureja hortensis*).

5.1. Fișe caracterizare uleiuri esențiale

Prin compilarea rezultatelor obținute în urma analizelor de laborator (FTIR, GC-MS) cu informațiile furnizate de comerciant și cu alte date din bibliografia consultată, s-a realizat o evaluare detaliată a profilului și calității fiecărui ulei esențial. Aceste date au fost sintetizate în mod original în **fișe de caracterizare** pentru fiecare **ulei esențial**, oferind o imagine completă asupra acestor produse (BD-O2).

5.2. Analiză comparativă a celor 5 uleiuri esențiale

În această secțiune se prezintă o analiză comparativă a principalelor proprietăți fizice și a compoziției chimice determinate experimental (analize GC-MS și FTIR) pentru cele 5 uleiuri esențiale: **B-EO** (**Busuioc**), **C-EO** (**Cuișoare**), **O-EO** (**Oregano**), **S-EO** (**Scorțișoară**) și **T-EO** (**Cimbru**) considerate în această teză de doctorat. Analiza a fost realizată pe baza datelor și rezultatelor experimentale din fișele individuale de caracterizare a uleiurilor esențiale.

5.2.1. Proprietăți fizice

Datele comparative pentru cele 5 uleiuri esențiale sunt centralizate în tabelul Tab. 5.1

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului
Tab. 5.1 Proprietăți fizico-chimice comparative ale celor 5 uleiuri esențiale utilizate

Nr	Caracteristică	B-EO	C-EO	O-EO	S-EO	T-EO
1	Aspect	lichid omogen limpede				
2	Culoare	galben pal	galben, galben-brun	galben pal – brun roșcat	galben– brun roșcat	galben – brun gălbui
3	Miros	caracteristic	caracteristic	aromatic, fenolenic	caracteristic: puternic, picant, cald	caracteristic. fenolic
4	Punct de inflamabilitate	> 110°C	+100°C	+65°C	115°C	+64°C
5	Densitate la 20 °C, [g/cm ³]	0.936 (25°C)	1.042-1.065	0.940-0.980	0.990-1.050	0.875-0.954
6	Indice de refracție la 20°C	1.5042 (25°C)	1.528-1.538	1.495-1.525	1.545-1.600	1.486-1.505
7	Rotație optică la 20°C	- 6.1°	nespecificat	-3 ° la +1°	-3 ° la +2°	-5° la +4°
8	Solubilitate	Etanol, Clorofom	Etanol	Etanol Uleiuri	Etanol Uleiuri	Etanol

5.2.2. Compoziție chimică determinată prin GC-MS
Tab. 5.2 Compoziția chimică comparativă a celor 5 uleiuri esențiale utilizate determinată experimental prin GC-MS: compuși chimici cu concentrații relative 3% față de total compuși identificați

Nr. Crt.	Component chimic identificat	Concentrații relative [%] (Procent arie pic / total arii picuri identificate)					Obs.
		B-EO	C-EO	O-EO	S-EO	T-EO	
1	γ -Terpinen			3,49		11,37	MT
2	α -Terpinen					15,07	MT
3	p-Cimen			13,79	3,59		MT ar.
4	Mircen						MT
5	β -Caryophyllene		17,12			7,28	ST
6	α -Linalool	25,63		5,11	3,85	9,42	Alcool
7	Carvacrol			53,16		32,22	Fenol
8	Eugenol		77,34				Fenol
9	Eugenyl acetate						Ester
10	Taragon (Estragol, metil-chavicol)	60,55					Eter
11	Cinam aldehydă				47,03		Aldehydă aromatică
12	Cinamil acetat				7,96		Ester
13	2-Norpinen	3,21					MT
14	α -Pinen			6,91	3,26	7,23	MT
15	Camphene					4,99	MT
16	Eucaliptol (Cineole)			3,36	3,37	4,63	Eter
17	α -Caryophyllene (Humulen)					3,73	ST
18	meta-Eugenol				12,87		Fenol
19	Caryophyllene oxide			3,72			Eter
20	para-Isopropil-benzoat de etil				7,75		Ester
21	Cicoundecatrina	4,92					Trienă
	Total	94,31	94,46	89,54	89,68	95,94	

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

Rezultatele privind compoziția chimică comparativă, determinată experimental prin GC-MS, pentru cele 5 uleiuri esențiale sunt centralizate în Tab. 5.2 care prezintă procente de arii relativ la total arii componenți identificați, exclusiv pentru componenții identificați cu procent $\geq 3\%$.

Datele experimentale confirmă informațiile privind compușii chimici majoritari din compoziția EO specificate în fișele tehnice de produs, dar reliefează în același timp diferențe de concentrație, precum și existența în procentaj de minimum 3% și a altor compuși. Aceștia sunt monoterpene (2-Norpinen, α -Pinen, camphene), sesquiterpene (α -Caryophyllene sin. Humulen), eteri terpenici (eucaliptol, caryophyllene oxide), fenoli (meta -Eugenol), esterii (p-isopropil-benzoat de etil) și se regăsesc diferențiat în compoziția uleiurilor analizate. Deși datele centralizate se referă exclusiv la componenți cu concentrație de minimum 3%, datele experimentale reliefează complexitatea compozițională a uleiurilor esențiale, precum și individualitatea acestora dpdv compozițional.

În acest context, este important de specificat faptul că există în general o variabilitate a compoziției uleiurilor esențiale dintr-o anumită sursă vegetală funcție de o multitudine de factori incluzând condițiile de vegetație, perioada de vegetație, vârsta plantei, perioada de recoltare, timpul de stocare (ex. (Toncer et al., 2017); (Liyana et al., 2017); (Skubij & Dzida, 2019); (Mohtashami et al., 2018)).

5.2.3. Analiza FTIR

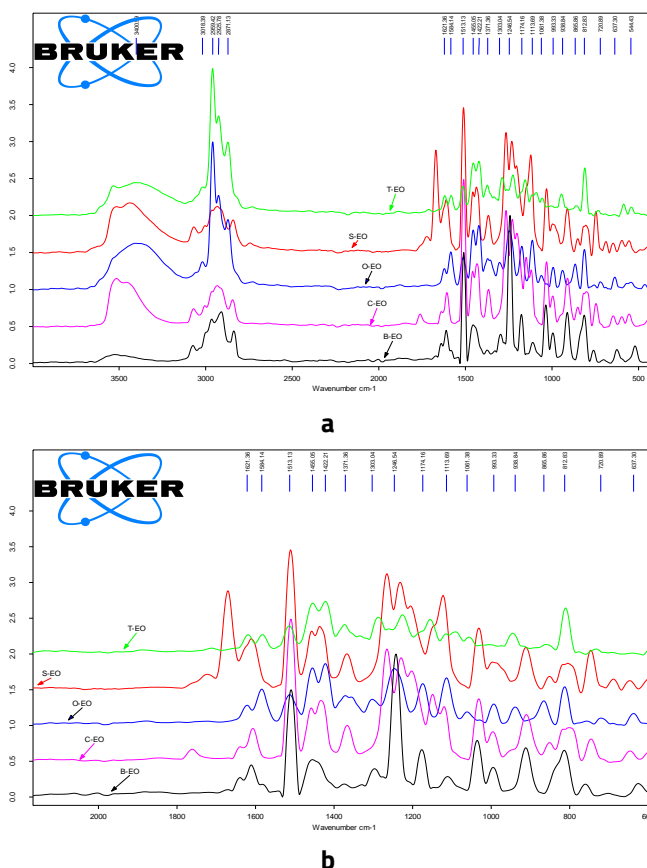


Fig. 5.1 Spectre FTIR_Atr comparative pentru cele 5 uleiuri esențiale, înregistrate pe tot domeniul $4000-6000\text{ cm}^{-1}$ (a) și zona de amprentă digitală $1800-600\text{ cm}^{-1}$ (b)

În Fig. 5.1 se prezintă spectrele FTIR-ATR comparative ale celor 5 uleiuri esențiale analizate. În concordanță cu concluziile analizei GC-MS spectrele FTIR vin să confirme complexitatea și individualitatea compozițională a uleiurilor esențiale analizate. Astfel, deși se evidențiază unele asemănări între spectre (O-EO cu T-EO, C-EO cu B-EO), respectiv existența unor benzi de absorbție comune pentru diverse EOs, spectrele nu se suprapun, fiind strict specifice, cu precădere în zona de amprentă digitală.

În concluzie, rezultatele investigațiilor din acest capitol reliefează particularitățile fizico-chimice și compoziționale, asemănările și deosebiriile dintre cele 5 uleiuri esențiale investigate (B-EO, C-EO, O-EO, S-EO, T-EO), oferind o bază fundamentală în înțelegerea/explicarea proprietăților lor biologice, inclusiv caracterul fungicid. Caracterul activ antifungic al unor componente majoritari ai acestor uleiuri, cum ar fi eugenolul, carvacrolul, aldehida cinamică a fost demonstrat prin teste specifice (ex. (Xie et al., 2017)) și constituie un argument pentru un potențial biocid al EOs testate. Diferența de compoziție a EOs va determina foarte probabil diferențe de potențial antifungic, iar eficiența va fi influențată de tipul fungilor.

Capitolul 6 - O3: Evaluarea comparativă a efectului biocid antifungic – selectarea produselor cu potențial

În capitolul de față este detaliată procedura de testare și evaluare a potențialului fungicid al celor cinci uleiuri esențiale (EOs) selectate: B-EO (*Ocimum basilicum*), C-EO (*Eugenia caryophyllata*), O-EO (*Origanum vulgare*), S-EO (*Cinnamomum verum*) și T-EO (*Satureja hortensis*) și rezultatele obținute. Pentru a determina potențialul lor antifungic față de o serie de fungi lignicole xilofage importante în biodegradarea lemnului, uleiurile esențiale au fost supuse unor teste de screening, urmând protocolul analitic prezentat în capitolul 4.

6.1. Considerații generale asupra testelor screening efectuate și etape de cercetare

Pentru realizarea obiectivului O3 al tezei, cercetările efectuate și prezentate în acest capitol au vizat următoarele:

- Evaluarea potențialului antifungic față de ciuperci xilofage reprezentative pentru biodegradarea lemnului pentru fiecare dintre cele 5 uleiuri esențiale considerate;
- Evaluarea comparativă a rezultatelor obținute pentru cele 5 uleiuri esențiale în vederea unei ierarhizări a acestora dpdv al potențialului biocid antifungic;
- Selectarea a două uleiuri esențiale cu potențial pentru continuarea cercetărilor (O4, O5)
- Validarea rezultatelor prin retestarea uleiurilor esențiale cu potențial selectate.

Cele 5 uleiuri esențiale utilizate au fost testate la diverse diluții în doi solvenți diferiți: ulei de in sicativat (cod LO) și etanol (alcool etilic pa, 96%), variantele de testare fiind prezentate în Tab. 6.1.

Tab. 6.1 Teste screening RS: date privind concentrațiile uleiurilor esențiale, solvenții și materialul biologic utilizate în testarea și validarea potențialului antifungic (etape de realizare O3)

Etapă O3	Obiectiv	Test screening	EOs	Solvent	Concentratie EO in solvent [ml/100 ml]	Material biologic
1	Testare potențial antifungic (Zvolen) Selectare 2 EOs	RS	B-EO C-EO O-EO S-EO T-EO	Etanol	0,25	Putregai brun: <i>Serpula lacrymans</i> (Wulfen) Putregai alb: <i>Trametes versicolor</i> (L.)
					1	
					10	
					100	
2	Validare potențial antifungic (Braşov) EOs selectate	RS	C-EO T-EO	Etanol	0 / Control	Putregai brun: <i>Postia placenta</i> (Fr.) Putregai alb: <i>Trametes versicolor</i> (L.)
					1*	
					5	
					10	
		RS	C-EO T-EO	Ulei de in (LO)	0 / Control LO	Putregai brun: <i>Postia placenta</i> (Fr.) Putregai alb: <i>Trametes versicolor</i> (L.)
					1*	
					5	
					10	

NOTĂ: * Concentrația de 1% ulei esențial s-a folosit doar pentru uleiul esențial de Cuișoare C-EO.

6.2. Rezultate testare și validare potențial antifungic prin teste screening

Rezultatele testelor, concretizate în documentarea fotografică a evoluției dezvoltării fungice pe parcursul testului, indicii de inhibiție specifici calculați, precum și o serie de reprezentări grafice au fost sintetizate în fișe de evaluare a potențialului fungicid pentru fiecare ulei și experiment în parte.

6.2.1. Fișe de rezultate testare și validare potențial antifungic

Datele experimentale rezultate în urma testelor screening au fost sintetizate în 3 tipuri de fișe:

- Fișe de rezultate potențial antifungic (R-O3-1), în număr de 5 fișe realizate separat pentru fiecare tip de ulei esențial (BD-O3/1);
- Fișe de validare potențial antifungic (R-O3-2), în număr de 2 fișe de validare realizate separat pentru fiecare tip de ulei esențial ce a fost selectat după faza 1 de testare (BD-O3/2);
- Fișe de rezultate potențial antifungic comparativ funcție de tipul de fungi (R-O3-3), în număr de 2 fișe realizate pentru fiecare tip de ciupercă testată, cuprinzând comparativ rezultatele cu ambele uleiuri selectate (BD-O3/3).

6.2.2. Analiza comparativă a potențialului biocid antifungic al uleiurilor esențiale testate

Potențialul antifungic pentru fiecare tip de ulei studiat și concentrație funcție de tipul de ciupercă utilizată, respectiv *Trametes versicolor* - putregai alb și *Serpula lacrymans* - putregai brun este ilustrat

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

În Fig. 6.1(a,b), unde sunt prezentate sub formă grafică rezultatele experimentale obținute la finalul testului, respectiv indicii de inhibiție în ultima zi a testului, ce poate fi diferită în funcție de caz.

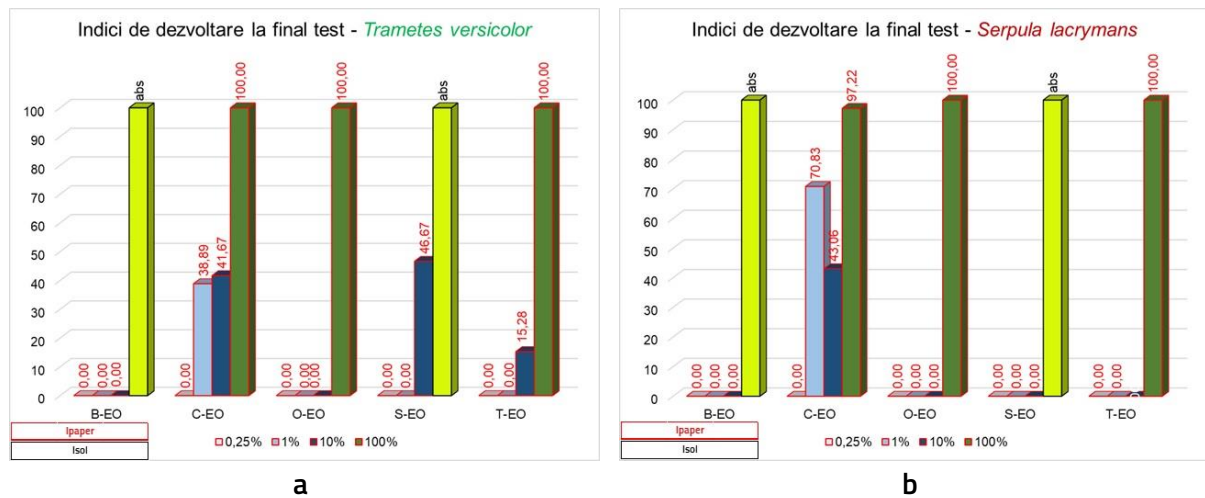


Fig. 6.1 Indicele de inhibiție a creșterii ciupercii (I_{sol} sau I_{paper}) determinat la finalul testului (zile diferite pentru fiecare ulei și concentrație), comparativ pe tipul de ciupercă *Trametes versicolor*- putregai alb - a și *Serpula lacrymans*- putregai brun - b pentru toate uleiurile esențiale testate la concentrațiile studiate.

Concluzie TV: Datele obținute pentru uleiul esențial de **Cuișoare C-EO**, indică potențialul biocid cel mai ridicat față de putregaiul alb (*Trametes versicolor*), prin faptul că acesta se manifestă de la concentrația de 1%. Potențial antifungic față de TV prezintă și uleiurile esențiale de **Scorțișoară S-EO** și de **Cimbru T-EO**, după cum se poate observa din valorile comparative înregistrate pentru indicii de inhibiție a creșterii ciupercii pe hârtie. La concentrația de 10% valoare maximă $I_{\text{paper}}=46,67\%$ a fost obținută pentru **S-EO**.

Concluzie SL: Uleiul esențial de **Cuișoare C-EO** este singurul ulei esențial care prezintă potențial biocid antifungic, începând cu concentrația de 1% până la 100%. Uleiul de **Cimbru (10%)** prezintă un efect inițial de inhibiție a dezvoltării miceliului pe mediu, dar acesta dispare după 7 zile de la inoculare, când ciuperca ajunge pe hârtie.

Pentru a cumula rezultatele analizei comparative a datelor experimentale înregistrate privind potențialul biocid antifungic al celor 5 EO la toate concentrațiile analizate, funcție de tipul ciupercii, s-a realizat o schemă sub formă de "tablă de șah", prezentată în Fig. 6.2. În această schemă sunt marcate cu culoarea verde uleiurile esențiale la concentrațiile la care au arătat eficiență antifungică.

Ulei esențial	Conc.	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Serpula lacrymans</i>
B-EO	0.25%		
	1%		
	10%		
	100%	Z_14 (abs)	Z_14 (abs)
C-EO	0.25%		
	1%	Z_10 (38.89%)	Z_10 (70.83%)
	10%	Z_7 (41.67%)	Z_7 (43.06%)
	100%	Z_14 (100%)	Z_14 (97.22%)
O-EO	0.25%		
	1%		
	10%		Z_7 (54.39%)
	100%	Z_14 (100%)	Z_14 (100%)
S-EO	0.25%		
	1%		
	10%	Z_10 (46.67%)	
	100%	Z_14 (abs)	Z_14 (abs)
T-EO	0.25%		
	1%		
	10%	Z_7 (15.28%)	Z_7 (53.33%)
	100%	Z_14 (100%)	Z_14 (100%)
Indice de inhibiție înregistrat la finalul testului I_{sol} / I_{paper} (Zx – funcție de caz)			
Indice de inhibiție pe parcursul testului, pînă în ziua Zy			

Fig. 6.2 Prezentare schematică, tip "tabla de șah", a uleiurilor esențiale la concentrațiile studiate, cu reliefaarea concentrațiilor pentru care s-a demonstrat potențial biocid antifungic, comparativ pentru cele două ciuperci testate *Trametes versicolor* (putregai alb) și *Serpula lacrymans* (putregai brun)

Concluzie: În urma evaluării comparative a potențialului biocid antifungic a celor 5 uleiuri testate, au fost selectate două uleiuri esențiale pentru continuarea cercetărilor: uleiul esențial de Cuișoare C-EO (*Eugenia caryophyllata*) și uleiul esențial de Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*).

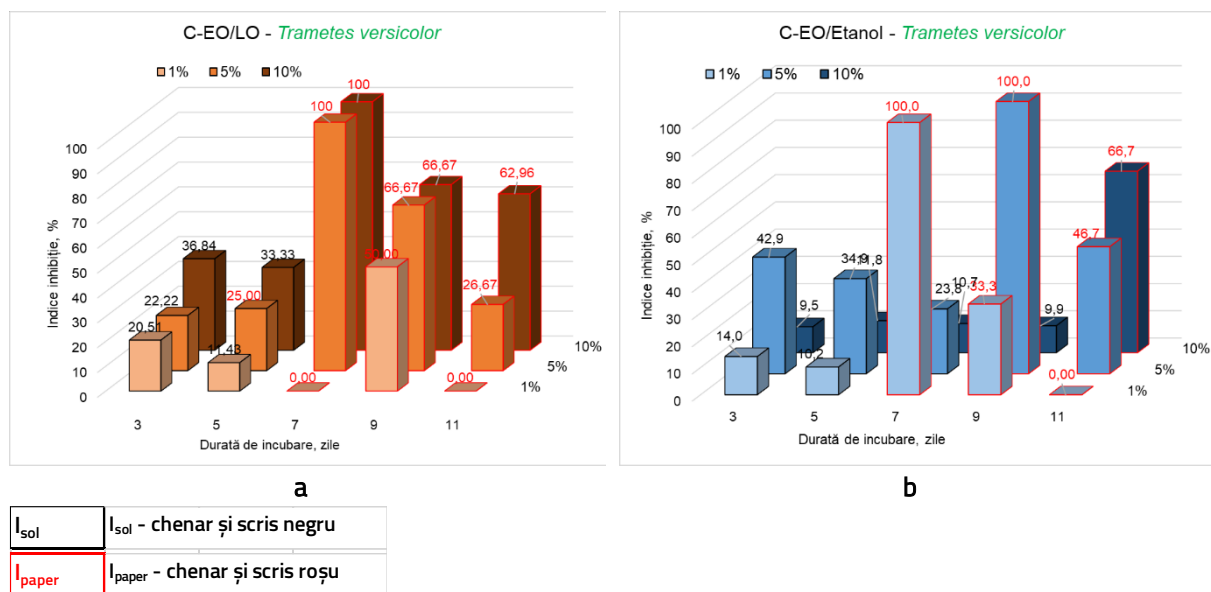
6.2.3. Analiză comparativă a rezultatelor experimentale obținute în etapa de validare a potențialului antifungic pentru C-EO și T-EO

Pentru a aprofunda cercetările privind potențialul biocid al celor două uleiuri esențiale selectate: uleiul esențial de Cuișoare C-EO (*Eugenia caryophyllata*) și cel de Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*) și validarea rezultatelor ce au fundamentat selecția acestora, s-a realizat din nou un test pe tip screening RS, în cadrul ICDD Braşov.

Validarea potențialului antifungic s-a realizat prin testarea celor două uleiuri selectate diluate în doi solvenți diferiți: ulei de in fiert sicativat (cod LO) și etanol (alcool etilic pa, 96%, cod ET), variantele de testare fiind prezentate anterior în Tab. 6.1. Ciupercile utilizate în testul de validare au fost *Postia placenta* -putregai alb și *Trametes versicolor* -putregai alb.

6.2.3.1. Validarea potențialul biocid pentru uleiul esențial de Cuișoare C-EO (*Eugenia caryophyllata*)

Conform celor prezentate anterior uleiul esențial de Cuișoare C-EO a demonstrat potențial biocid începând cu concentrația de 1%. Rezultatele obținute în testul de validare a potențialului biocid al C-EO, la diverse diluții în cele două medii considerate (LO, etanol), față de cele două ciuperci TV și PP sunt reprezentate grafic prin evoluția indicilor de inhibiție calculați. Graficele complexe prezintă evoluția indicilor de inhibiție a creșterii pe mediu (I_{sol}) și pe hârtie (I_{paper}) pe toată perioada de monitorizare, pentru fiecare concentrație a uleiului esențial de Cuișoare C-EO (*Eugenia caryophyllata*) în cei doi solvenți studiați.



La concentrația de 1% C-EO în ambii solvenți utilizați ciuperca se dezvoltă aparent uniform (BD-O3/2 – R-O3-2/C-EO) în primele zile de monitorizare, cu ușoare tendințe înspre control. În ziua 7 ciuperca TV ajunge de pe mediu doar pe hârtia control, în cazul C-EO/Etanol, prezența marcajului de chenar roșu, prezentând la acel moment inhibiție totală de 100%. Aceasta se diminuează pe parcurs, indicele de inhibiție (I_{paper}) scăzând de la 100% la 0% valoare înregistrată la sfârșitul testului (ziua 11). În cazul C-EO/LO în ziua 7 ciuperca TV începe să urce pe hârtie, neobservându-se însă vreo preferință (BD-O3/2 – R-O3-2/C-EO). Ulterior, în ziua 9 se poate vedea un efect de inhibare ($I_{paper}=50\%$), care însă nu se va menține, la finalul testului toate hârtiile fiind acoperite de miceliu ($I_{paper}=0\%$).

La concentrația de 5% C-EO/LO în ziua 7 ciuperca ajunge pe hârtie, preferând hârtia control și până la sfârșitul testului se menține această tendință de inhibare a ciupercii TV, în ziua 11 indicele de inhibiție (I_{paper}) fiind 26,67%. C-EO/Etanol la această concentrație (5%) prezintă efect de inhibare a dezvoltării ciupercii TV. Abia în ziua 9 ciuperca ajunge pe hârtia control ($I_{paper}=100\%$), dar până la sfârșitul testului valoare indicelui (I_{paper}) ajunge la 46,7%.

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

La concentrația de 10% C-EO/LO ciuperca TV ajunge pe hârtia control ($I_{paper}=100\%$) în ziua a 7 a de monitorizare. Efectul inhibitor se menține până la sfârșitul testului, dar valoarea indicelui (I_{paper}) scade de la 100% la 62,96%, valoare obținută în ziua 11. În ceea ce privește C-EO/Etanol la concentrația de 10% se observă clar o întârziere în dezvoltarea ciupercii TV, prin faptul că aceasta ajunge pe hârtie doar la finalul testului, iar indicele de inhibiție (I_{paper}) are la final valoare 66,7%.

Pentru putregaiul brun *Postia placenta* se observă inhibiție în dezvoltare în testele efectuate cu ulei esențial de Cuișoare, acest efect este prezentat grafic în Fig. 6.4 unde se poate observa evoluția indicilor de inhibiție a creșterii pe mediu (I_{sol}) și pe hârtie (I_{paper}) pe parcursul celor 11 zile de monitorizare, pentru fiecare concentrație a uleiului esențial de Cuișoare C-EO în cei doi solvenți studiați (ulei de in – Fig. 6.4 a; etanol – Fig. 6.4 b).

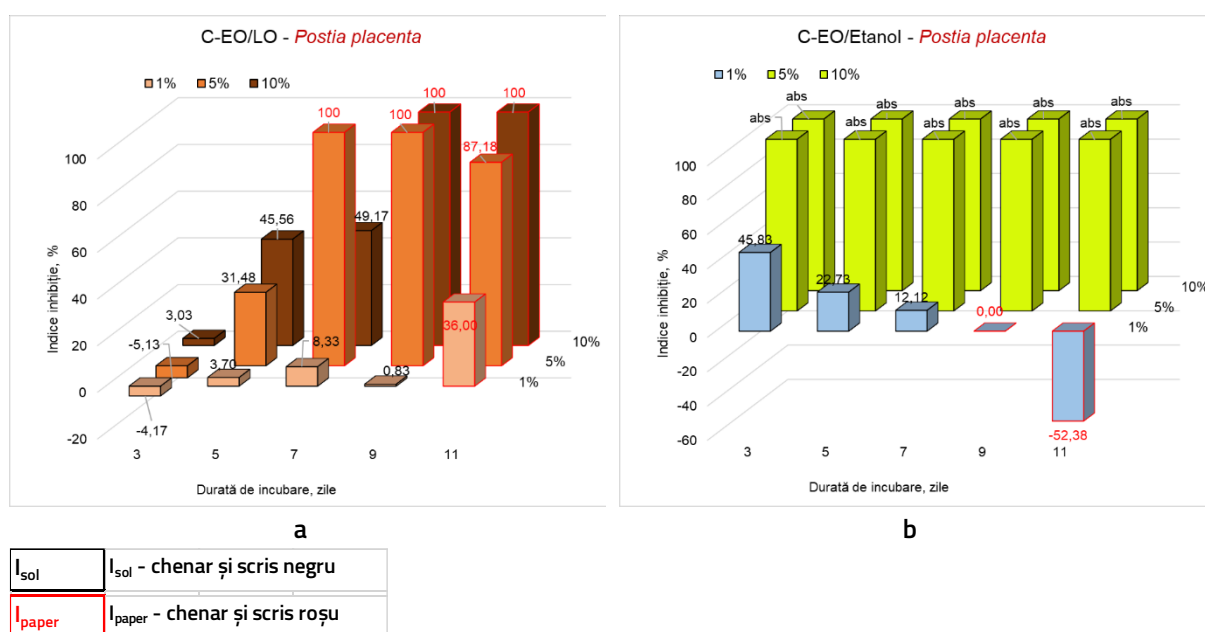


Fig. 6.4 Evoluția indicilor de inhibiție a creșterii pe mediu (I_{sol}) și pe hârtie (I_{paper}) pe toată durata de monitorizare, pentru uleiul esențial de Cuișoare C-EO (*Eugenia caryophyllata*) la concentrațiile testate cu cei doi solvenți studiați (ulei de in – a; etanol – b) pentru putregaiul brun *Postia placenta*.

La concentrația de 1% C-EO/LO, ciuperca PP are întârzieri în dezvoltare, ajungând pe hârtie doar în ziua 11 la finalul testului, când valoare indicelui de inhibiție calculate (I_{paper}) este 36%. La această concentrație de 1% și în cazul C-EO/Etanol, ciuperca PP se comportă diferit. Ciuperca ajunge pe hârtie doar din ziua 9, moment în care avem inhibiție absolută ($I_{paper}=100\%$), dar la finalul testului (ziua 11), indicele de inhibiție are o valoare negativă mare ($I_{paper} = -52,38$), ceea ce ar arăta că tratamentul C-EO/Etanol 1% ar favoriza creșterea ciupercii PP.

La concentrația de 5% C-EO/LO în ziua 7 ciuperca PP ajunge pe hârtie, având inhibiție totală ($I_{paper}=100\%$), dar până la finalul testului, ziua 11 indicele (I_{paper}) are valoarea 87,18%. C-EO/Etanol la această concentrație prezintă efect de inhibare absolută a dezvoltării ciupercii PP, care se menține până la sfârșitul testului.

La concentrația de 10% C-EO/LO ciuperca PP este încetinită în dezvoltare, ea ajungând pe hârtie doar din ziua 9 și preferința ei de creștere este evidentă înspre zona control. Atât în ziua 9 cât și la finalul testului se întâlnește cazul de inhibiție totală, indicele (I_{paper}) având valoare de 100%. În ceea ce privește C-EO/Etanol la concentrația de 10% situația este similară cu C-EO/Etanol 5%, adică prezintă efect de inhibare absolută a dezvoltării ciupercii PP și se menține pe întreaga durată a testului.

6.2.3.2. Validarea potențialul biocid pentru uleiul esențial de Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*)

Validarea potențialul biocid al uleiului esențial de Cimbru T-EO în cele două tipuri de medii de diluție (LO și Etanol) se cuantifică și de această dată prin determinarea indicilor de inhibiție a dezvoltării ciupercilor utilizate în testare.

Astfel, pentru putregaiul alb *Trametes versicolor* evoluția indicilor de inhibiție a creșterii pe mediu (I_{sol}) și pe hârtie (I_{paper}) pe toată perioada de monitorizare, pentru fiecare concentrație a uleiului esențial de Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*) cu cei doi solvenți studiați (ulei de in – Fig. 6.5 a; etanol – Fig. 6.5 b) se prezintă sub formă grafică în Fig. 6.5.

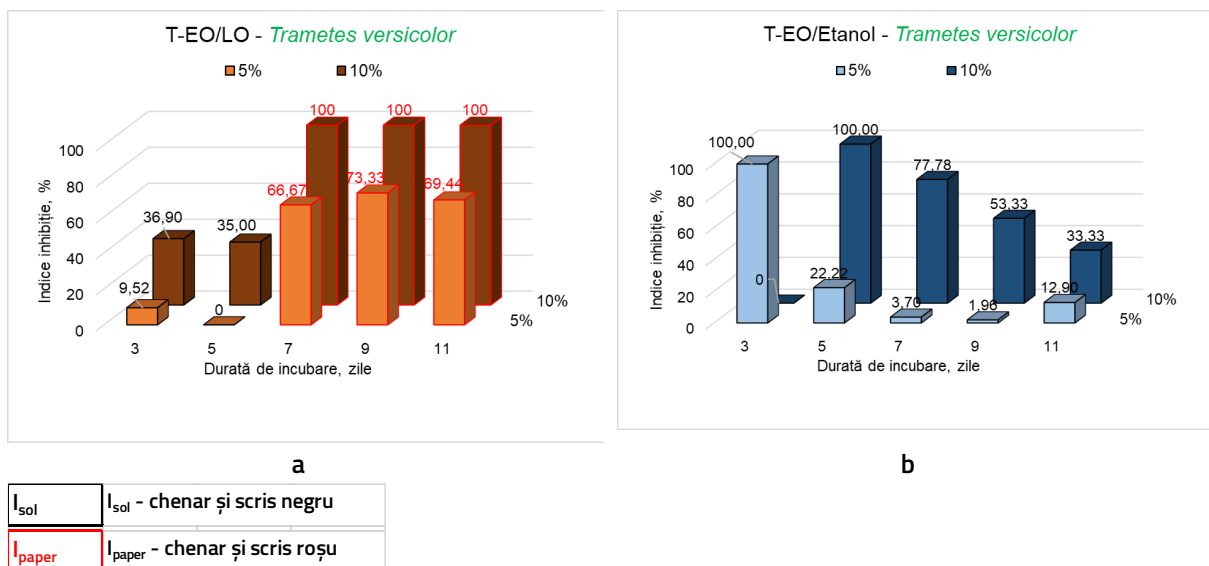


Fig. 6.5 Evoluția indicilor de inhibiție a creșterii pe mediu (I_{sol}) și pe hârtie (I_{paper}) pentru uleiul esențial de Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*) la concentrațiile testate cu cei doi solvenți studiați (ulei de in – a; etanol – b) pentru putregaiul alb *Trametes versicolor*.

La concentrația de 5% T-EO/LO în ziua 7 ciuperca TV ajunge pe hârtie (apare marcajul roșu, respectiv indicele de inhibiție I_{paper}), preferând hârtia control și până la sfârșitul testului se menține această inhibare când indicele de inhibiție (I_{paper}) este de 69,44%. T-EO/Etanol la această concentrație prezintă efect de inhibare a dezvoltării ciupercii TV, până la finalul testului (ziua 11) ciuperca neajungând încă pe hârtie.

La concentrația de 10% T-EO/LO din ziua 7 se manifestă inhibiție totală ($I_{paper}=100\%$) și se menține până la finalul testului. Față de concentrația de 5% T-EO/LO, la sfârșitul testului ciuperca TV este mai slab dezvoltată. În ceea ce privește T-EO/Etanol la concentrația de 10% avem două situații diferite în cele două cutii Petri. Una dintre ele prezintă inhibiție absolută (ciuperca nu s-a dezvoltat deloc după

inoculare), iar cealaltă prezintă inhibiție totală ($I_{sol} = 33,33\%$, la finalul testului) (BD-O3/2 - R-O3-2/T-EO).

Pentru putregaiul brun *Postia placenta* în Fig. 6.6 se prezintă sub formă grafică evoluția indicilor de inhibiție a creșterii pe mediu (I_{sol}) și pe hârtie (I_{paper}) pe parcursul celor 11 zile de monitorizare, pentru fiecare concentrație a uleiului esențial de Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*) cu cei doi solvenți studiați (ulei de in – Fig. 6.6 a; etanol – Fig. 6.6 b).

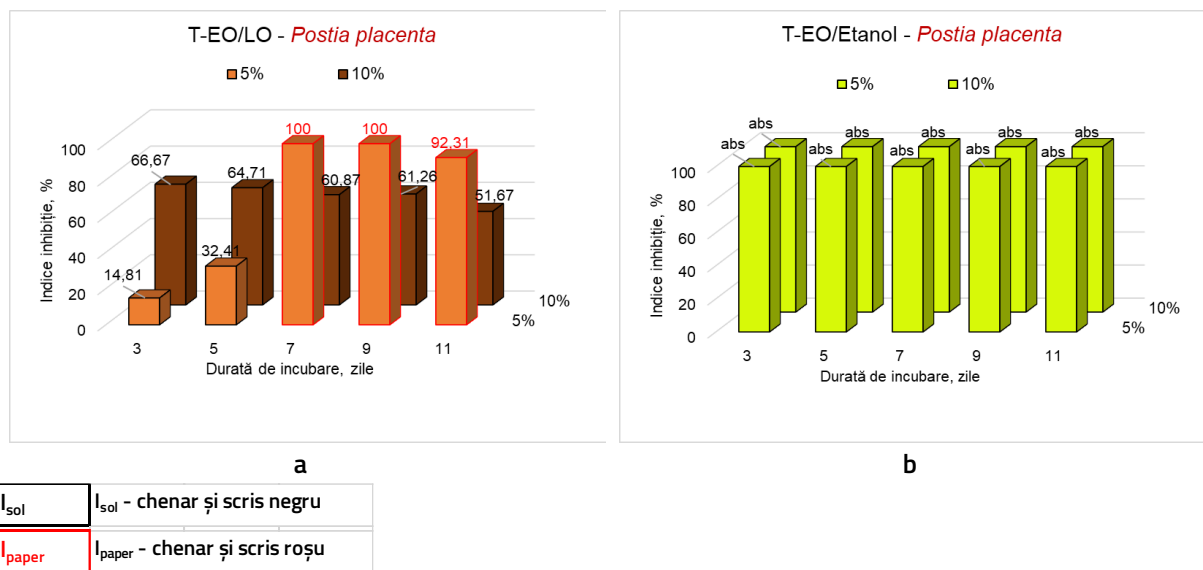


Fig. 6.6 Evoluția indicilor de inhibiție a creșterii pe mediu (I_{sol}) și pe hârtie (I_{paper}) pe toată durata de monitorizare, pentru uleiul esențial de Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*) la concentrațiile testate cu cei doi solvenți studiați (ulei de in – a; etanol – b) pentru putregaiul brun *Postia placenta*.

La concentrația de 5% T-EO/LO prezintă potențial antifungic prin inhibarea de dezvoltare a ciupercii PP, în ziua 11 indicele de inhibiție (I_{paper}) este de 92,31%, fiind aproape de o inhibare totală. T-EO/Etanol la această concentrație prezintă efect de inhibare absolută a dezvoltării ciupercii PP, care se menține până la sfârșitul testului.

Pentru concentrația de 10% T-EO/LO ciuperca PP este mult încetinită în dezvoltare, cu o preferință clară înspre control. În ultima zi de testare ciuperca încă nu a ajuns pe hârtie, iar indicele de inhibiție (I_{sol}) este 51,67%. În ceea ce privește T-EO/Etanol 10% se menține efectul de inhibare absolută a dezvoltării ciupercii PP până la sfârșitul testului.

6.2.3.3. Analiza rezultatelor experimentale obținute funcție de tipul de fungi

Valorile celor doi indici: de inhibiție a creșterii pe mediu (I_{sol}) și de inhibiție a creșterii pe hârtie (I_{paper}) la sfârșitul testului (ziua 11) pentru cele două uleiuri esențiale: Cuișoare C-EO (*Eugenia caryophyllata*) și Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*), utilizând ca solvenți uleiul de in LO și alcoolul etilic la toate concentrațiile studiate sunt prezentate în comparativ în Fig. 6.7, pentru ambele tipuri de ciuperci.

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

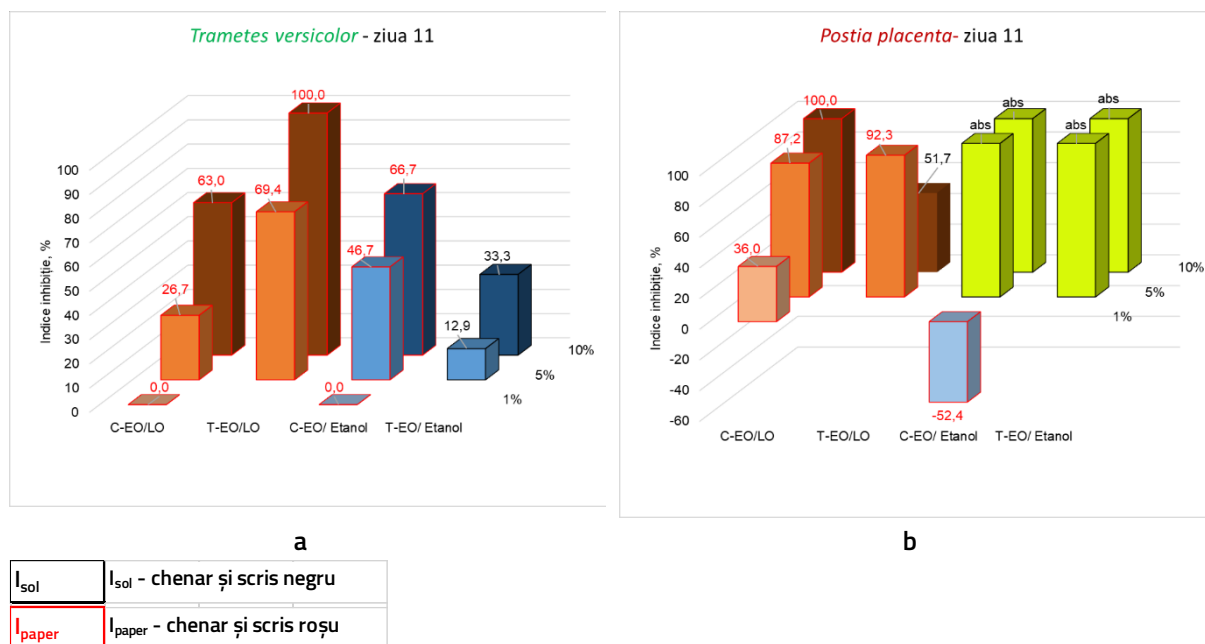


Fig. 6.7 Evoluția indicilor de inhibiție a creșterii pe mediu (I_{sol}) și hârtie (I_{paper}) la final de test, pentru uleiul esențial de Cuișoare C-EO și uleiul esențial de Cimbru T-EO la concentrațiile testate în cele două medii de diluție pentru putregaiul alb – *Trametes versicolor* - a și putregaiul brun *Postia placenta* - b.

În cazul utilizării C-EO și T-EO în etanol la concentrații de 5% și 10%, ambele uleiuri esențiale produc inhibiție absolută a ciupercii de putregai brun *Postia placenta* (PP), datorată foarte probabil volatilizării EO și sterilizării incinței de tratare:

În cazul diluției în etanol, la concentrațiile de 5% și 10% uleiul esențial de Cimbru T-EO are un potențial antifungic mai ridicat față de uleiul esențial de Cuișoare C-EO împotriva putregaiului alb *Trametes versicolor* (TV), pentru care ciuperca ajunge pe hârtie (C-EO).

În cazul utilizării C-EO și T-EO în LO, nu s-au obținut inhibări absolute pentru niciuna din cele două ciuperci testate, la nici una dintre concentrațiile 1-10%, ceea ce s-ar putea corela cu o fixare în hârtia suport a EO datorită uleiului de în, astfel încât nu se produce sterilizarea incinței de testare. S-au obținut însă indici de inhibiție totală ($I_{paper} = 100\%$) pentru T-EO/LO 10% pentru de *Trametes versicolor* și C-EO/LO 10% pentru *Postia placenta*.

6.3. Concluzii

- Toate cele 5 uleiuri esențiale studiate B-EO, C-EO, O-EO, S-EO, T-EO prezintă potențial biocid antifungic față de ciupercile de putregai alb (*Trametes versicolor*) și brun (*Serpula lacrymans*, *Postia placenta*) testate, dacă acestea sunt folosite ca atare, adică la concentrația maximă de 100%.
- În baza indicilor de inhibiție a dezvoltării fungice la finalul testelor screening de evaluare comparativă a potențialului biocid antifungic al EO testate, au fost selectate două uleiuri esențiale pentru continuarea cercetărilor: uleiul esențial de Cuișoare C-EO (*Eugenia caryophyllata*) și uleiul esențial de Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*).

- Uleiul esențial de Cimbru T-EO (*Satureja hortensis*) prezintă un potențial de inhibiție mai mare față de uleiul esențial de Cuișoare C-EO (*Eugenia caryophyllata*) pentru ambele ciuperci TV (*Trametes versicolor*) și PP (*Postia placenta*), indiferent de tipul de mediu de diluție și de concentrație.
- Uleiul esențial de Cuișoare C-EO (la 5% și 10%) a prezentat un potențial antifungic mai crescut față de ciuperca de putregai brun *Postia placenta*, decât față de ciuperca de putregai alb *Trametes versicolor*, indiferent de mediul de diluție folosit.
- Uleiul esențial de Cimbru T-EO (la 5% și 10%) a prezentat un potențial antifungic mai crescut față de ciuperca de putregai brun *Postia placenta*, decât față de ciuperca de putregai alb *Trametes versicolor*, indiferent de mediul de diluție folosit.
- Potențialul antifungic mai redus al uleiurilor esențiale (C-EO și T-EO) față de *Trametes versicolor*, în comparație cu *Postia placenta* se corelează cu capacitatea ciupercii de putregai alb (TV) de a degrada compușii fenolici, inclusiv eugenolul și carvacrolul, componenții chimici principali ai C-EO și T-EO (Pánek et al., 2014b; Voda et al., 2003).

Capitolul 7 - O4: Determinarea eficienței biocide și a potențialului impact ecologic pentru două produse selectate (ulei esențial de Cuișoare C-EO, ulei esențial de Cimbru T-EO)

În conformitate cu conceptul de bază al tezei, obiectivul 4 a vizat evaluarea a două aspecte deosebit de importante în dezvoltarea unor potențiale noi produse pentru bioprotecția antifungică a lemnului și anume: eficiența lor biocidă și potențialul lor eco-impact. Punerea în balanță și evaluarea în aceeași etapă de dezvoltare a acestor aspecte reprezintă o necesitate într-o abordare ecologică și sustenabilă în bio-protecția lemnului, respectiv dezvoltarea și testarea de noi produse aplicabile în domeniu.

Pentru atingerea acestui obiectiv s-au realizat în paralel două tipuri de teste:

- Test minibloc pentru validarea efectului antifungic și evaluarea eficienței pe probe de lemn tratat;
- Test de fitotoxicitate pentru evaluarea potențialului eco-impact datorită fenomenului de spălare de pe lemnul tratat a unor posibil compuși toxici (Fig. 7.1).

7.1. Aspecte metodologice

7.1.1. Tratarea epruvetelor de lemn și pregătirea pentru testul minibloc

Cele două uleiuri selectate pe baza potențialului fungicid demonstrat anterior prin testele screening au fost uleiul de cuișoare C-EO și uleiul de cimbru T-EO. Cele două EO au fost diluate în două medii diferite: ulei de in (LO) și etanol la diferite concentrații, souțiile obținute fiind folosite pentru a trata

materialul lemnos. Pentru C-EO s-au folosit diluții 1%, 5% și 10%, iar în cazul T-EO diluțiile au fost 5% și 10%, în ambii solvenți. Materialul lemnos folosit a fost lemn de fag neaburit (*Fagus sylvatica* L.) și alburn de pin (*Pinus sylvestris* L.), care constituie speciile de referință nedurabile. Rezultatele prezentate în acest capitol sunt exclusiv pentru lemn de fag. Epruvetele cu dimensiuni de (20x20x5), mm pe direcțiile L, Tg, Ra au fost pregătite pentru a intra în teste prin parcurgerea mai multor procese succesive (Fig. 7.1). Modul de debitare a probelor și procedurile de tratare și pregătire pentru testare sunt similare principal cu cele raportate de Reinprecht și colaboratorii ((Pánek et al., 2014c)).

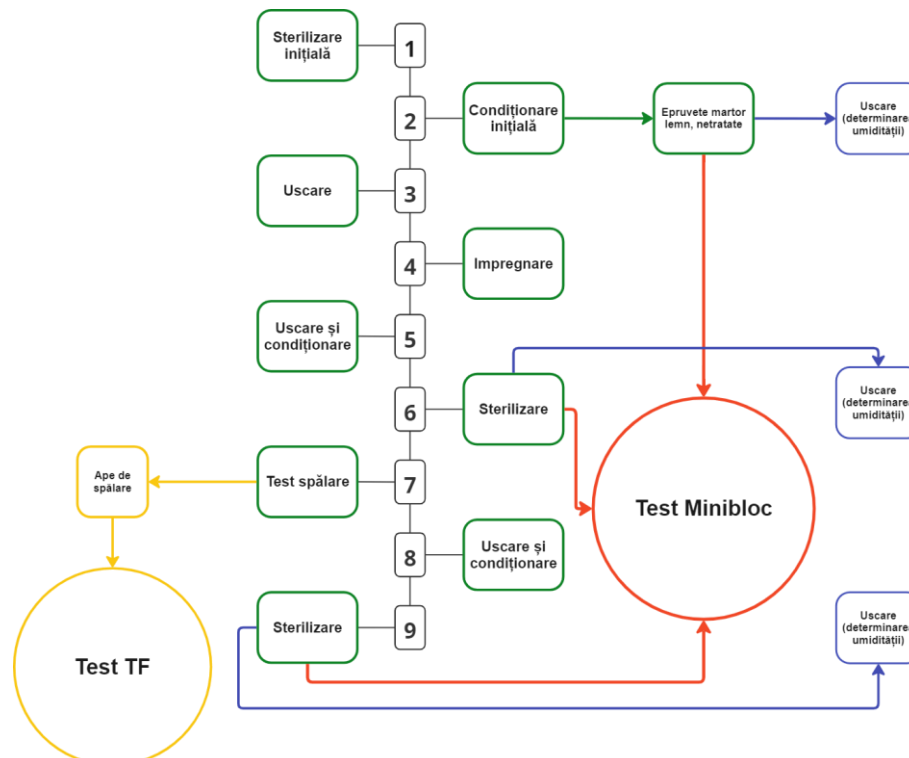


Fig. 7.1 Schema proceselor de pregătire a epruvetelor de lemn pentru testul minibloc și obținerea apelor de spălare pentru testul de fitotoxicitate

7.1.2. Testul minibloc

Testul minibloc R folosit este cel prezentat pe larg în capitolul 4. Testarea s-a făcut în paralel cu două tipuri de fungi, una de putregai brun *Postia placenta* PP și una de putregai alb *Trametes versicolor* TV.

7.1.3. Testul de spălare probe lemn și testul de fitotoxicitate

Testul de fito-toxicitate (TF) completat cu testul de spălare conform EN 84:2000 aplicat anterior, sunt cele prezentate în detaliu în capitolul 4. Pe lângă indicii determinați prezentați în capitolul 4, procentul de germinare și lungimea medie a germenilor s-a mai calculat și indicele relativ de germinare (GI, %), indicator complex ce cumulează indicii anteriori (Bae et al., 2014; Di Salvatore et al., 2008).

7.2. Rezultate experimentale

7.2.1. Testul minibloc

Testele minibloc pentru uleiurile esențiale de **Cuișoare (C-EO)** și **Cimbru (T-EO)** diluate în cei doi solvenți: ulei de in (LO) și etanol au fost realizate în două etape de cercetare plasate diferențiat în timp. În Tab. 7.1 se prezintă un sumar al testelor realizate în cele 2 etape.

Tab. 7.1 Sumarul testelor minibloc realizate în teză

Fungi testate	An	EO	Tip probe	Etanol			Ulei de in (LO)		
				1/100	5/100	10/100	1/100	5/100	10/100
PP	2019	C-EO	Nespălate	DA	DA	DA	DA	DA	DA
			Spălate	DA	DA	DA	DA	DA	DA
C-EO		Nespălate	DA	DA	DA	DA	DA	DA	
		Spălate	DA	DA	DA	DA	DA	DA	
TV	2020	C-EO	Nespălate	NU	DA	DA	NU	DA	DA
			T-EO	Nespălate	NU	DA	DA	NU	DA
C-EO		Nespălate	NU	DA	DA	NU	DA	DA	
		T-EO	Nespălate	NU	DA	DA	NU	DA	DA

În continuare se prezintă rezumativ exclusiv rezultatele din etapa 2020 și concluziile ambelor etape de testare. Rezultatele în extenso pe etape sunt disponibile în teza de doctorat.

7.2.1.1. Lemn tratat cu uleiuri esențiale în ulei de in

7.2.1.1.1. Analiza pierderilor de masă C-EO/LO

Rezultatele testelor minibloc din etapa 2 (2020), realizate cu soluții de C-EO și T-EO în LO, exclusiv pe probe nesupuse testului de spălare au arătat următoarele:

Pentru testul cu C-EO/LO:

Variabilitate extrem de mare a valorilor PM pentru probele martor netratate: 10.89 ± 23.35 pt **PP** și 54.21 ± 15.26 pt **TV**, respectiv deviații standard foarte mari, în special pentru **PP**, corelate cu diferențe notabile de dezvoltare miceliu pe probe similare în aceleași cutii sau cutii diferite. Existența unor diferențe de valori între probele martor și control independent, pentru ambele tipuri de fungi, ceea ce indică un efect al tratării cu LO asupra biodegradării de către ciupercile testate, cu observația că pentru **PP** valoare PM pentru controlul independent ($37.95 \pm 4.69\%$) este mai mare decât la martor ($10.89 \pm 23.35\%$), iar în cazul **TV** situația este inversată: ($30.98 \pm 4.35\%$) față de $54.21 \pm 15.06\%$. Diferențele de PM asociate testelor cu **PP** și **TV**, superioară pentru aceasta din urmă, se explică prin preferința fungilor de putregai alb (**TV**) pentru specii de foioase, contrar fungilor de putregai brun (**PP**) ce preferă rășinoase. Testele fiind făcute pe fag, atacul mai pronunțat al **TV** față de **PP** este explicabil pentru

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

probele martor, dar valorile PM pentru probele control independent ($37.95 \pm 4.69\%$) și total ($34.98 \pm 9.42\%$) mai mari decât pentru proba martor (10.89 ± 23.35) în cazul **PP** sunt total neașteptate. Acestea ar indica că ciuperca **PP** nu este inhibată ci din contră stimulată în prezența LO. Abaterile standard foarte mari, cu precădere pentru probele martor, dar și control de diverse categorii și pentru probele tratate cu **C-EO/LO 10%**, reliefează, o variabilitate extremă în colonizarea și atacul fungic.

Pentru PP, valorile PM pentru probele tratate cu **C-EO/LO** comparate cu valoarea control total NU arată un efect antifungic, ci contrar un efect negativ de creștere a sensibilității la biodegradare cu circa 25-40%. Rezultatul este contrar rezultatelor testului screening.

Pentru TV, valorile PM pentru probele tratate cu **C-EO/LO** comparate cu valoarea control total NU arată un efect antifungic la concentrație de 5% ci contrar creștere de PM cu circa 40% , și doar un ușor efect de protecție (scădere PM cu 8%) la concentrație **C-EO** de 10%. Cu toate acestea, valorile PM la ambele concentrații ale **C-EO** în LO sunt mai mici decât pentru lemnul martor netratat. Deci LO ca atare are un efect pozitiv, dar acesta se diminuează prin adaosul de **C-EO** în LO.

Pentru testul cu **T-EO/LO**:

Existența unor diferențe de valori între probele martor și control independent, pentru ambele tipuri de fungi și deviații standard mari. Valorile PM control total și independent arată că tratarea cu LO are un efect negativ asupra rezistenței la atacul **PP** ce este stimulată de tratamentul cu ulei. Contrar, valorile în cazul probelor control total și independent în testul cu **TV** arată un efect pozitiv de creștere a rezistenței la atacul **TV**.

Pentru PP, valorile PM pentru probele tratate cu **T-EO/LO** comparate cu valoarea control total arată un efect antifungic (scădere PM cu circa 10-45%).

Pentru TV, valorile PM pentru probele tratate cu **T-EO/LO** comparate cu valoarea control total arată un efect contrar (creștere a PM cu 6- 31%)

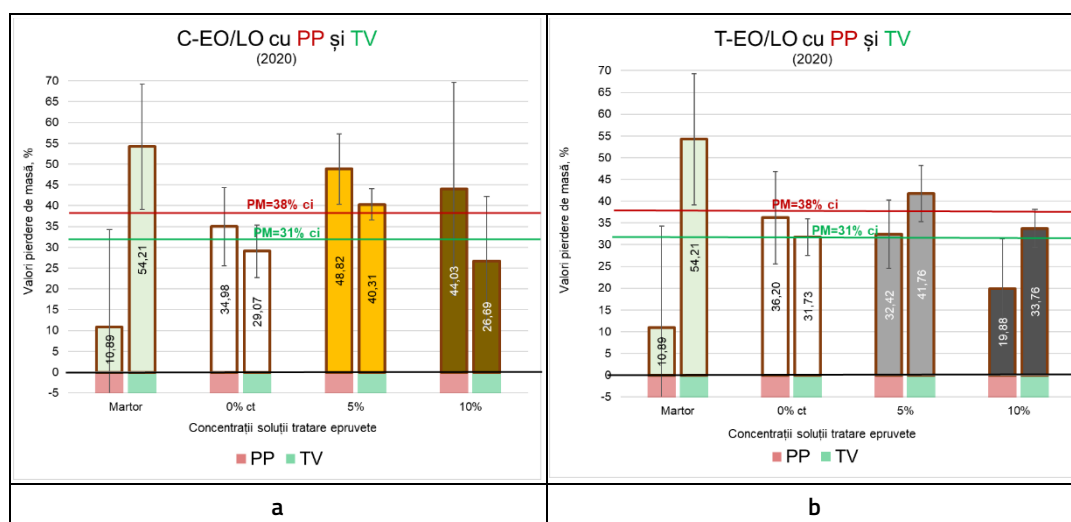


Fig. 7.2 Influența tratării lemnului de fag cu EO/LO asupra pierderilor de masă în test minibloc cu *Postia placenta* (PP) și *Trametes versicolor* (TV), comparativ pentru probe cu C-EO/LO (a) și probe cu T-EO/LO (b)

Variația valorilor medii ale pierderilor de masă prin biodegradare funcție de tipul de probă/ tratamentul aplicat sunt reprezentate grafic în Fig. 7.2, pentru ambele tipuri de fungi (PP, TV), comparativ pentru probe tratate cu C-EO și probe tratate cu T-EO, exclusiv probe nespălate. Acestea reflectă aspectele prezentate anterior.

7.2.1.1.2. Aspecte macroscopice și microscopice

În analiza anterioară a datelor s-a insistat pe variabilitatea extremă a acestora în anumite situații, ceea ce face uneori imposibilă formularea unei concluzii. În acest context este important de arătat că această situație nu presupune implicit deficiențe în realizarea testului ci cauze interne/specifice testelor biologice, greu de explicat și înțeles.

Detaliile microscopice din figurile (Fig. 7.3, Fig. 7.4, Fig. 7.5) ilustrează nu numai diferite grade de degradare pe probe cu colonizare diferențiată, ci și diferențierile între tipurile de degradare pentru *Postia placenta* (putregai brun, cubic) și *Trametes versicolor* (putregai alb, fibros)

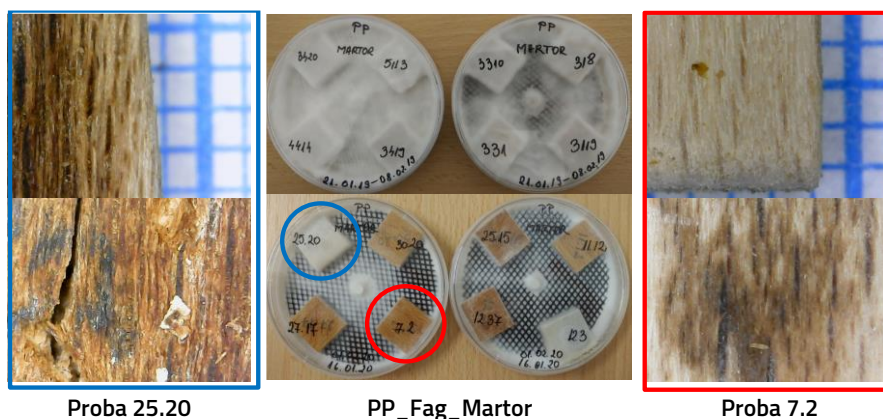


Fig. 7.3. Exemplificare variabilitate dezvoltare fungică și grad de atac pe diverse probe similare, în condiții identice de testare, pentru fag martor după test minibloc cu PP (2019 și 2020): imagini macro cutii Petri și detalii microscopice atac

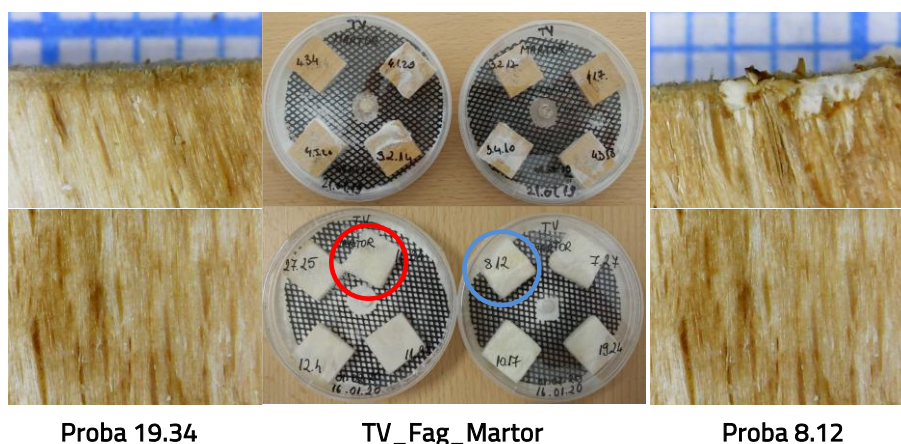


Fig. 7.4 Exemplificare dezvoltare fungică pentru două teste în condiții similare și detalii grad de atac pe două probe martor de fag după test minibloc cu TV (2019 și 2020): imagini macro cutii Petri și detalii microscopice atac

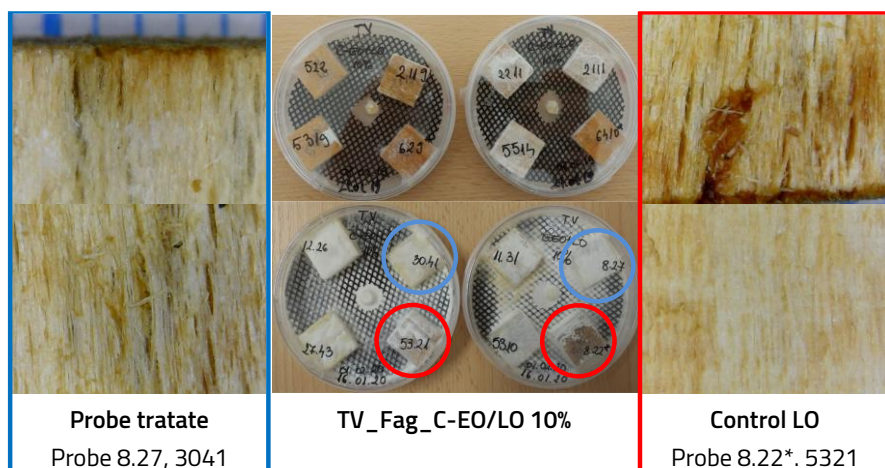


Fig. 7.5 Exemplificare variabilitate dezvoltare fungică pentru două teste în condiții similare și detalii grad de atac pe probe de fag control și tratate cu C-EO/LO după test minibloc cu TV (2019 și 2020): imagini macro cutii Petri și detalii microscopice atac, aspect putregai alb, fibros

7.2.1.1.3. Concluzii EO/LO

În testele minibloc cu C-EO și T-EO în mediu de LO realizate în cele două etape au existat unele diferențe ca retenții de produs, durată de testare, virulență fungi și valori efective ale PM determinate, dar s-au conturat o serie de concluzii:

- Rezultatele testului minibloc sunt, cel puțin parțial, în contradicție cu cele ale testului screening pentru că acestea au testat în fapt aspecte și stări diferite ale LO: compuși cu potențial antifungic ce au putut migra în mediul de cultură, respectiv film solidificat în interiorul structurii lemnului protejând prin izolare și caracter hidrofob.
- Efectul concret de reducere a pierderilor de masă depinde de ciupercă și virulența acesteia, ce poate varia și genera o mare variabilitate a datelor și dificultăți în interpretare: în testul din 2019 LO proteja mai bine față de PP decât TV, iar în testul din 2020 situația a fost contrară;
- Modificarea LO cu C-EO are un efect negativ în sensul creșterii PM prin atacul ambelor ciuperci PP și TV, dar mai pronunțat pentru PP;
- Modificarea LO cu T-EO are un efect pozitiv asupra rezistenței lemnului tratat față de PP, dar reduce rezistența față de atacul TV;
- Utilizarea LO ca mediu de diluție pentru uleiurile esențiale testate nu este recomandată, efectul de protecție al acestora fiind diminuat prin interferența acestora în procesul oxidativ de întărire.
- Întârzierea/ împiedicarea formării unei pelicule reduce sau anulează efectul de protecție al LO. Această ipoteză a fost dezvoltată într-o publicație anterioară la care autorul tezei este coautor (Timar et al., 2021)

7.2.1.2. Lemn tratat cu uleiuri esențiale diluate în etanol

7.2.1.2.1. Analiza pierderilor de masă

Din analiza rezultatelor testelor minibloc din etapa 2 (2020), realizate cu soluții de **C-EO** și **T-EO** în etanol, exclusiv pe probe nesupuse testului de spălare rezultă următoarele:

Pentru testul cu **C-EO/Etanol**:

Existența unor diferențe de valori între probele martor și control independent, pentru ambele tipuri de fungi, cu observația că pentru **PP** valoarea PM pentru controlul independent ($10.89 \pm 23.35\%$) este mai mare decât la martor ($37.89 \pm 20.15\%$), iar în cazul **TV** situația este inversată: $54.21 \pm 15.06\%$ față de $24.91 \pm 23.24\%$. Diferențele de PM asociate testelor cu **PP** și **TV**, superioară pentru aceasta din urmă, se explică prin preferința fungilor de putregai alb (**TV**) pentru specii de foioase, contrar fungilor de putregai brun (**PP**) ce preferă rășinoase. Testele fiind făcute pe fag, atacul mai pronunțat al **TV** față de **PP** este explicabil. Abaterile standard foarte mari, cu precădere pentru probele martor (Fig. 7.3, Fig. 7.4) și control de diverse categorii, dar și pentru probele tratate cu **C-EO** 5% în testul cu **TV**, reliefează, o variabilitate extremă în colonizarea și atacul fungic.

Pentru PP, valorile PM pentru probele tratate cu **C-EO/Etanol** comparate cu valoarea control total arată un efect antifungic (scădere PM cu circa 90%), deși valorile PM mici calculate (circa 2%) sunt ușor mai mari decât valorile pentru controlul din cutiile cu probe. Se confirmă deci efectul de inhibare a fungilor datorită volatilității unor compuși toxici pentru fungi.

Pentru TV, valorile PM pentru probele tratate cu **C-EO/Etanol** comparate cu valoarea control total NU arată un efect antifungic (contrar creștere PM cu până la 20%), deși valorile PM calculate (circa 32-39%) sunt mai mici decât valorile pentru martor netratat (54%).

Pentru testul cu **T-EO/Etanol**:

Existența unor diferențe de valori între probele martor și control independent, pentru ambele tipuri de fungi și deviațiile standard mari:

Pentru PP, valorile PM pentru probele tratate cu **T-EO/Etanol** comparate cu valoarea control total arată un efect antifungic (scădere PM cu circa 10-45%).

Pentru TV, valorile PM pentru probele tratate cu **T-EO/Etanol** comparate cu valoarea control total arată un efect antifungic (scădere PM cu circa 81-94%), dovedind o eficiență mai mare față de fungile de putregai alb (**TV**) comparativ cu cele de putregai brun (**PP**),

Variația valorilor medii ale pierderilor de masă prin biodegradare funcție de tipul de probă/ tratamentul aplicat sunt reprezentate grafic în Fig. 7.6, pentru ambele tipuri de fungi (**PP**, **TV**), comparativ pentru probe tratate cu **C-EO** și probe tratate cu **T-EO**, exclusiv probe nespălate. Acestea reflectă aspectele prezentate anterior.

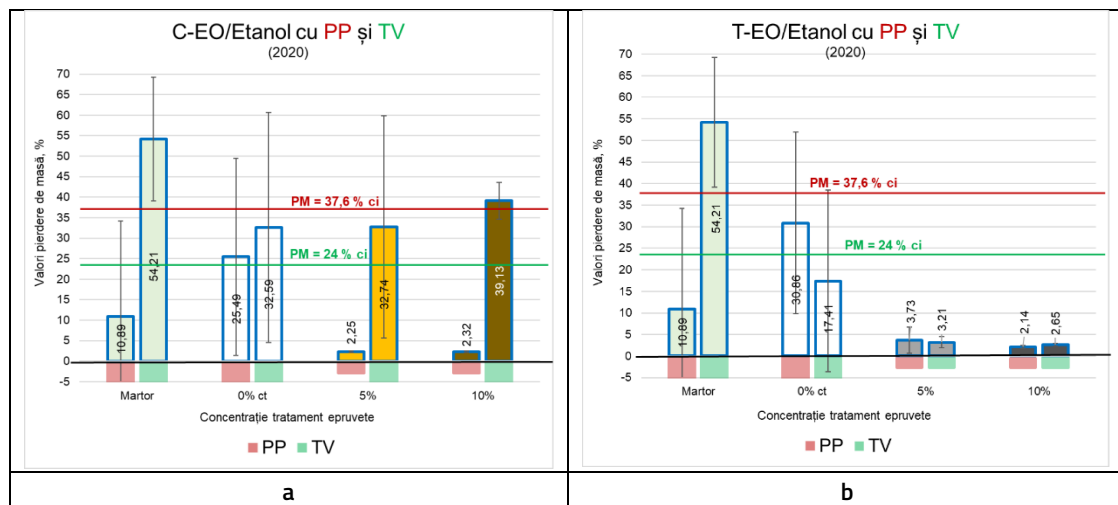


Fig. 7.6 Influența tratării lemnului de fag cu C-EO/Etanol (a) și T-EO/Etanol (b) asupra pierderilor de masă în test minibloc cu *Postia placenta* (PP) și *Trametes versicolor* (TV)

7.2.1.2.2. Concluzii C-EO și T-EO /Etanol

În testele minibloc cu C-EO și T-EO în etanol realizate în cele două etape au existat unele diferențe ca retenții de produs, durată de testare, virulență fungi și valori efective ale PM determinate, dar s-au conturat o serie de concluzii comune:

- Testele minibloc cu C-EO și T-EO în alcool confirmă rezultatele testelor screening, evidențiindu-se efect antifungic pe lemnul tratat de la concentrații de 5%;
- Soluțiile de C-EO și T-EO cu concentrații de 5-10% în etanol prezintă potențial ca produse alternative pentru protecția antifungică a lemnului, dar prezintă eficiență specifică diferențiată corelată cu compoziția lor chimică;
- C-EO este bogat în eugenol și are activitate antifungică față de ciuperca de putregai brun PP (ce degradează celuloza și hemicelulozele din lemn, dar nu poate scinda lignina), reducând pierderile de masă cu 90% față de control;
- C-EO nu are eficiență antifungică față de ciuperca de putregai alb TV, ce are capacitatea de a degrada compuși polifenolici complecși precum lignina din lemn; eugenolul este un fenol cu structură fenil-propanică asemănătoare unităților de bază din structura ligninei.
- T-EO este bogat în carvacrol și terpineni prezintă activitate antifungică atât față de PP (reducere PM cu 45%) cât și față de TV (reducere PM cu 80-90%).

Aceste concluzii sunt în acord cu cercetări similare din literatura de specialitate (Cheng et al., 2008; Medeiros et al., 2016; Páneek et al., 2014c; Voda et al., 2003; Xie et al., 2017; Yingprasert et al., 2015; Zhang et al., 2016; Zyani et al., 2011).

7.2.2. Testul de fitotoxicitate

Potențialul eco-impact al noilor produse alternative de bioprotecție antifungică a lemnului a fost evaluat cu un test de fitotoxicitate cu semințe de salată (*Lactuca sativa*), conform procedurii din protocolul analitic (capitolul 4). Indexul de germinare (germination index), GI, %, este recomandat în literatura de specialitate ca un indicator complex care combină cele două posibile efecte de toxicitate ale compușilor toxici lavabili asupra germinării semințelor și dezvoltării germenilor, respectiv numărul de semințe germinate și lungimea germenilor. Mai mult, acest indice este un indice procentual relativ față de parametrii de germinare obținuți folosind apă (distilată) ca probă control.

Probele analizate au fost extractele apoase (E1, E5, E10) obținute prin testul de spălare cu apă conform EN 84/2000. Raportarea la o probă control comună, respectiv apa distilată din același lot cu apa distilată folosită în testele de spălare, permite o comparare univocă a tuturor probelor analizate. Biotin și Diffusit sunt două produse clasice de bioprotecția lemnului, incluse în cercetare ca produse de comparație.

7.2.2.1. Rezultate experimentale

În figura Fig. 7.7 se ilustrează prin imagini finalul testului și diferențierea diferitelor extracte (E5) din lemn tratat (5%) față de proba control cu apă distilată.

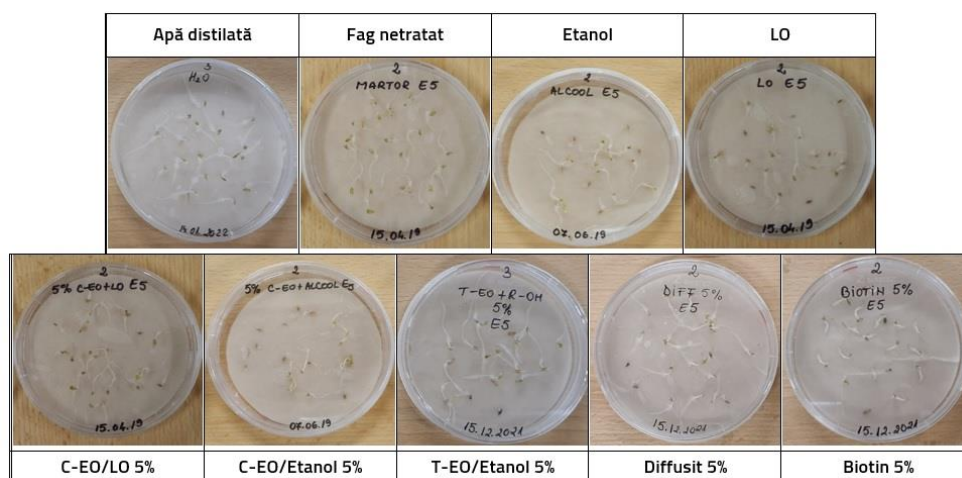


Fig. 7.7 Final de test pentru extractele apoase (E5) din lemn de fag martor și tratat cu diverse soluții de bioprotecție cu concentrație 5%: C-EO și T-EO în etanol (ET) și ulei de in (LO), două produse clasice de bioprotecție a lemnului Biotin și Diffusit și apă distilată

Din analiza datelor experimentale se constată următoarele:

- Indexul de germinare a variat descrescător de la E1 la E10, cu valoare medie 105.75%, față de control apă distilată 100%. Aceste date arată că pentru lemnul de fag netratat nu se constată un potențial eco-impact negativ dpdv al fitotoxicității compușilor lavabili în apă.
- Pentru lemnul de fag tratat cu etanol (control etanol) indexul de germinare GI a fost 88.28% ca medie pe 3 extracte, ceea ce indică un potențial eco-impact redus.

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

- Pentru lemnul de fag tratat cu ulei de in (control LO) indexul de germinare GI = 75.59% ca medie pe 3 extracte, indică un potențial eco-impact negativ mai crescut comparativ cu lemnul martor și controlul cu etanol.
- Pentru lemnul de fag tratat cu soluții de **C-EO** în etanol (concentrații 1%, 5%, 10%) per global, GI mediu pentru cele 3 extracte E1, E5, E10, au fost de 90.41%, 70.56% și 50.64%. Deci efectul de fitotoxicitate se manifestă începând de la concentrații de 5% și acest fapt trebuie considerat în aplicarea practică, impunându-se tratamente suplimentare de izolare față de apă pentru a conserva eficiența tratării și a evita un eco-impact negativ.
- Pentru lemnul de fag tratat cu soluții de **T-EO** în etanol (concentrații 1%, 5%, 10%) valorile GI globale (medie pentru E1, E5, E10) au variat descrescător de la 108.6% la 101.5% și 78.5% odată cu creșterea concentrației de **T-EO**. Efectul de fitotoxicitate este mai mic decât pentru **C-EO**.
- Pentru lemnul de fag tratat cu soluții de **C-EO** în LO variația indicilor de fitotoxicitate funcție de extract și concentrația de **C-EO** nu prezintă un trend clar, dar valorile GI globale (medii 3 extracte) se situează în intervalul 88.6-92%, superioare față de control LO (GI= 75.6), ceea ce înseamnă că uleiul de in prin calitățile sale peliculogene, fixează mai bine pe lemn compușii toxici din **C-EO**, chiar dacă întărirea acestuia este parțial disturbată de efectul antioxidant puternic al **C-EO**.
- Pentru lemnul de fag tratat cu soluții de Biotin 5% și 10% s-au obținut valori ale GI de 44.2%, respectiv 41.4% pentru concentrațiile de 5% și respectiv 10%. Acestea au fost cele mai mici valori din toată seria de experimente și arată un potențial impact ecologic negativ important prin fitotoxicitate, dacă nu se iau măsuri de reducere a lavabilității prin fixare pe lemn, spre exemplu prin peliculizare sau hidrofugare, fapt susținut și de constatarea experimentală a fitotoxicității maxime pentru primul extract E1.
- Pentru lemnul de fag tratat cu soluții de Diffusit S (5%, 10%) valorile GI globale au fost de 91.4% și 83.6%. Deci și acest produs prezintă un risc de impact prin fitotoxicitate în lipsa unor măsuri de fixare pe lemn.
- O privire de ansamblu asupra rezultatelor, considerând valorile indexului de germinare global GI, %, ca medie a valorilor independente pentru cele 3 extracte (E1, E5, E10), arată că nu ar prezenta eco-impact negativ prin fitotoxicitate doar lemnul de fag martor și cel tratat cu soluții **T-EO**/etanol cu concentrații de 1% și 5%. Un eco-impact redus, asociat unor valori GI \geq 90% (valoare propusă de autor), ar fi posibil pentru lemnul de fag tratat cu **C-EO**/etanol 1%, **C-EO**/LO 5% și Diffusit 5%, pentru toate celelalte variante obținându-se GI sub 90%, cu valori minime de 44-41 % pentru soluții Biotin 5-10%.

Toate aceste aspecte sunt clar reliefate prin graficele din figurile Fig. 7.8, Fig. 7.9, care reflectă și diferențele de fitotoxicitate între extracte succesive.

Efectul concentrației soluției de tratare este evident important și cuprins în discuția anterioară, dar o comparație a diferitelor produse/tratamente la o concentrație constantă (ex. 5%, 10%) este mai bine ilustrată de graficele din Fig. 7.10, Fig. 7.11.

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

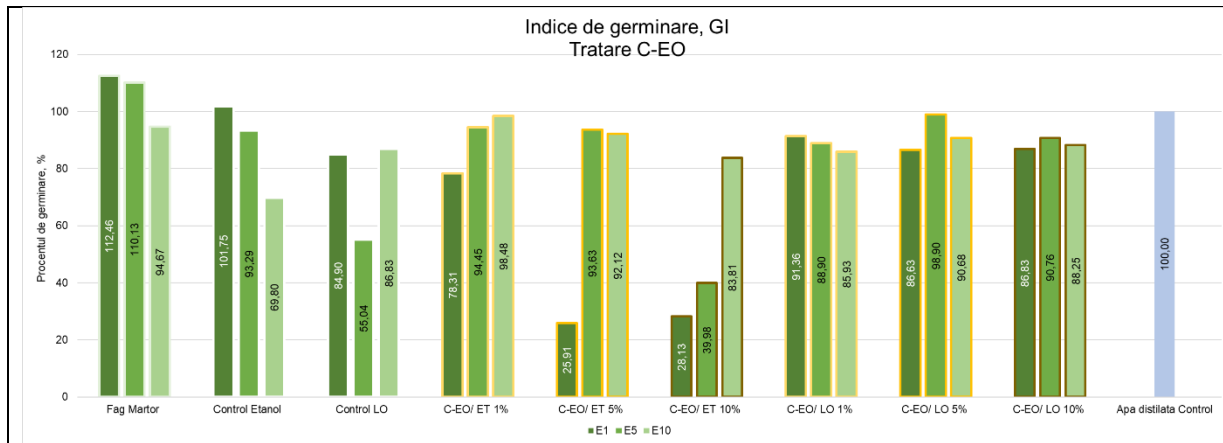


Fig. 7.8 Indicele de germinare pentru extractele apoase din lemn de fag martor și tratat cu soluții de C-EO în etanol (ET) și ulei de in (LO), comparativ cu control apă distilată.

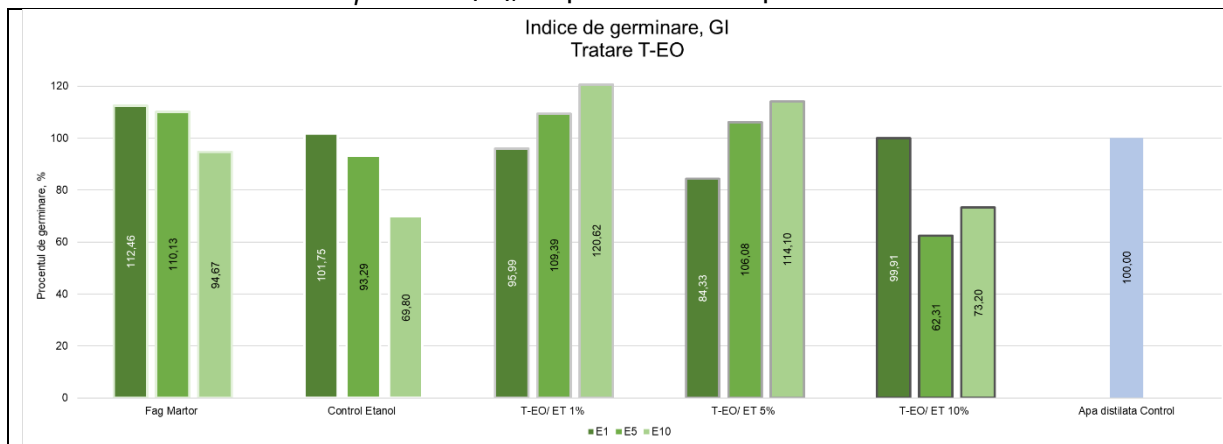


Fig. 7.9 . Indicele de germinare pentru extractele apoase din lemn de fag martor și tratat cu soluții de T-EO în etanol (ET), comparativ cu control apă distilată

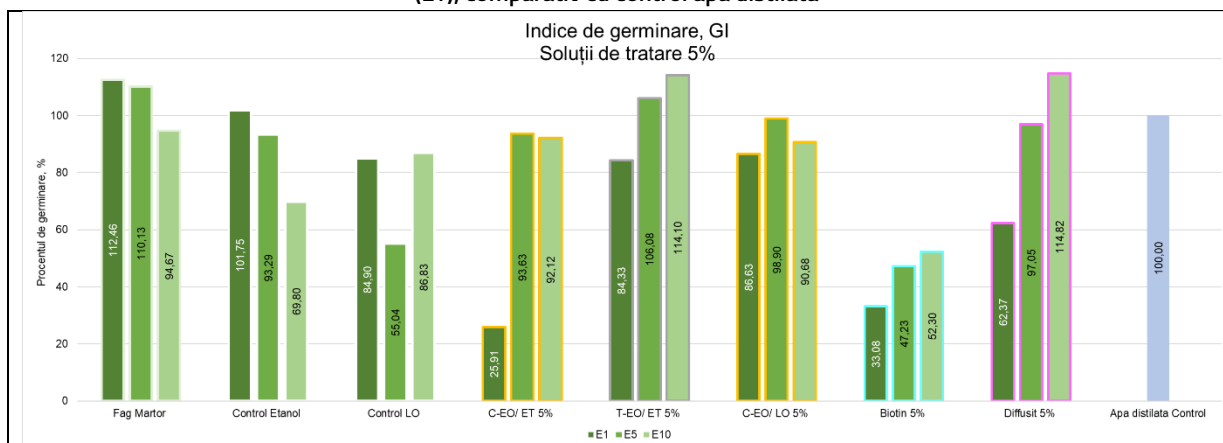


Fig. 7.10 Indicele de germinare pentru extractele apoase din lemn de fag martor și tratat cu diverse soluții de bioprotecție cu concentrație 5%: C-EO și T-EO în etanol (ET) și ulei de in (LO) comparativ cu două produse clasice de bioprotecție a lemnului Biotin și Diffusit și apă distilată

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esenţiale pentru bioprotecţia antifungică a lemnului

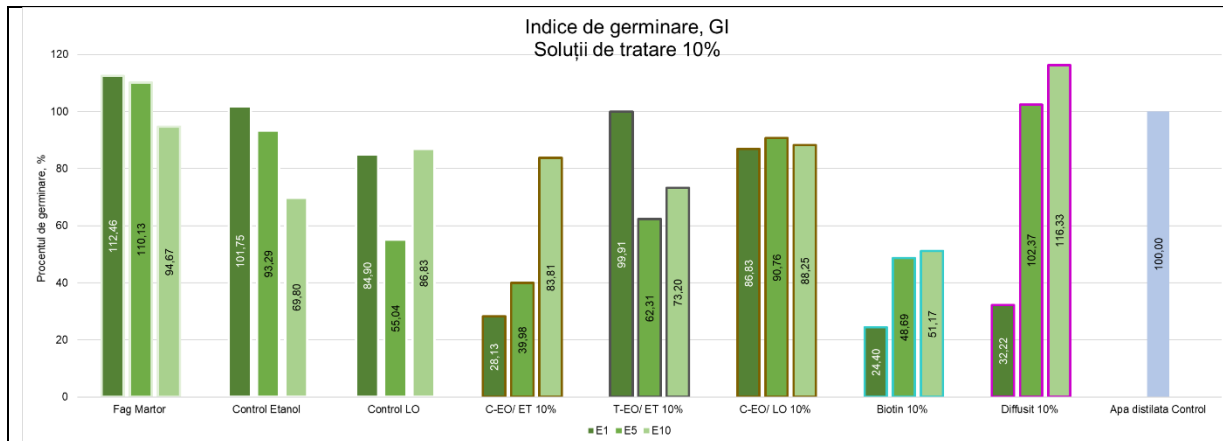


Fig. 7.11 Indicele de germinare pentru extractele apoase din lemn de fag martor și tratat cu diverse soluții de bioprotecție cu concentrație 10%. C-EO și T-EO în etanol (ET) și ulei de in (LO) comparativ cu două produse clasice de bioprotecție a lemnului Biotin și Difusit și apă distilată

7.2.2.2. Concluzii test fitotoxicitate

- Realizarea acestui test în corelație cu testul minibloc de verificare a activității de protecție antifungică a celor două uleiuri esențiale pe probe de lemn tratat reprezintă implementarea în demersul de cercetare a ideii fundamentale a tezei de doctorat: **eficiență versus eco-impact**.
- Utilizarea în test a apelor de spălare obținute conform EN 84 ancorează testarea potențialului eco-impact prin fitotoxicitate în metodologia de testare a produselor biocide în vederea implementării și constituie un element de noutate și originalitate a tezei.
- Datele experimentale subliniază un potențial eco-impact negativ mai mare pentru **C-EO** comparativ cu **T-EO**. De asemenea completează cu date concrete informațiile de ordin ecologic pentru produsele clasice de bioprotecție folosite pentru comparație (Difusit, Biotin). Considerând larga utilizare a acestor produse clasice, informațiile din teză pot contribui la o utilizare mai prietenoasă cu mediul, în sensul necesității unor măsuri/ tratamente de reducere a lavabilității.
- Datele din teză relevă informații importante privind potențialul eco-impact al tratamentelor cu ulei de in/uleiuri sicative, cu o lungă istorie în utilizare, aplicabilitate largă, dar mai puțin studiate din acest punct de vedere.
- Dintre toate variantele de tratare a lemnului de fag studiate, eco-impact negativ minim prin fitotoxicitate s-a obținut pentru tratamentele cu soluții de **T-EO** în etanol la concentrații de 1 și 5%, iar potențial eco-impact negativ maxim pentru soluțiile de Biotin (la concentrațiile testate de 5 și 10%).

Capitolul 8 - 05: Teste preliminare de implementare în domeniul conservării bunurilor de patrimoniu din lemn

8.1. Argumente și obiective

Patrimoniul cultural este "*o expresie a identității culturale, un ansamblu de valori materiale și spirituale moștenite pentru a fi păstrate, valorizate și transmise viitoarelor generații*", fiind în acest sens protejat prin lege.

Obiectivele de cercetare urmărite au fost corelate direct cu practica conservării-restaurării artefactelor din lemn (operații necesare, materiale) și o serie de cerințe specifice impuse materialelor pentru conservare-restaurare (C-R), precum compatibilitatea cu materiale naturale originale și celelalte materiale utilizate în procesul de C-R și limitarea modificării culorii suprafețelor.

Astfel, cercetarea s-a focusat pe următoarele obiective concrete:

- **05.1:** Evaluarea eficienței EOs în tratamente de prevenire a atacului fungic activabil în condiții de umiditate pentru lemn nou, aparent sănătos, infestat natural în condițiile normale de depozitare;
- **05.2:** Evaluarea eficienței EOs în tratamente de combatere a unui atac fungic activ (ciuperci xilofage izolate de pe obiecte de patrimoniu);
- **05.3:** Teste de implementare în cazuri concrete de conservare lemn/artefacte muzeu, cu evaluarea eficienței tratării printr-un test micologic de laborator (original) dezvoltat în acest scop;
- **05.4:** Evaluarea influenței tratamentelor cu EOs asupra culorii suprafețelor de lemn și comportării acestora la exunerea la lumină UV-VIS (test accelerat)
- **05.5:** Evaluarea compatibilității tratamentelor de bioprotecție cu EOs cu finisarea ulterioară cu ceară de albine și șelac și influența asupra culorii și comportării la lumină a suprafețelor finisate.

Realizarea obiectivelor **05.1-05.3** a presupus și conceperea unor teste micologice de laborator originale, specifice fiecărui obiectiv. Realizarea obiectivelor **05.4-05.5** a presupus realizarea unui test accelerat de expunere la lumină UV-VIS, în condiții de simulare a efectului luminii naturale în condiții de interior, respectiv lumină naturală filtrată prin sticlă, măsurători de culoare și investigații FTIR. Toate testele implicate în realizarea experimentelor pentru atingerea obiectivelor prezentate, au fost făcute comparativ pentru EOs considerate și două produse biocide clasice, considerate ca produse de comparație: Diffusit S și Biotin T (similar fitotoxicitate).

8.2.-05.1: Evaluarea eficienței EOs în tratamente de prevenire a atacului fungic activabil în condiții de umiditate (Test Pr)

În cadrul acestui studiu, s-a urmărit demonstrarea importanței aplicării unui tratament preventiv asupra lemnului nou de fag (*Fagus sylvatica*) și alburn de pin (*Pinus sylvestris*), aparent sănătos, ce este folosit în intervenții de conservare-restaurare pentru completarea elementelor lipsă. Lemnul nou, aparent sănătos care este depozitat în condiții obișnuite este practic infectat cu spori de fungi și alte microorganisme omniprezente în mediul înconjurător și transportate de curenții de aer. Riscul este

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

accentuat de includerea lemnului nou în contact cu lemn vechi deja infectat/biodegradat, chiar dacă se iau măsuri de conservare activă prin tratamente curative de bioprotecție. În condiții favorabile de umiditate și temperatură, respectiv un substrat organic biodegradabil (ex. Lemn) și a unei umidități atmosferice peste 70 %, respectiv umiditate în lemn peste 20%, se crează condițiile prielnice pentru incubare și dezvoltare fungică, cu consecințe negative evidente pentru bunurile culturale din lemn sau alte materiale organice biodegradabile. Pe lângă demonstrarea acestui risc real, obiectivul principal a fost evaluarea eficacității soluțiilor de EOs, comparativ cu produse biocide clasice în prevenirea degradării lemnului datorită acestei infestări naturale inevitabile. S-a utilizat ulei esențial de **Cuișoare C-EO** diluat în etanol (la concentrații de 5% și 10%) și Diffusit S (Diff) diluat în apă distilată (de asemenea la 5% și 10%), ca produs de comparație. Documentarea evoluției procesului de colonizare s-a făcut prin observații și fotografii de rezoluție înaltă. O evaluare (semi)cantitativă s-a făcut utilizând o metodă bazată pe softul ImageJ. Mărimea FCA, %, calculată reprezintă procentul din suprafața cutiei Petri acoperită de miceliu.

Rezultatele testului au confirmat ipoteza inițială, demonstrând că lemnul aparent sănătos, depozitat în condiții normale, poate fi infestat și că această infestare se poate manifesta în condiții favorabile de temperatură și umiditate.

Incubation		50 days	100 days	150 days
Beech (<i>Fagus sylvatica</i>)	Control			
	FCA	100%	100%	100%
	Diffusit S 5%			
	FCA	100%	100%	100%
	C-EO 5 %			
	FCA	0%	0%	23.2%
	Diffusit S 10 %			
	FCA	100%	100%	100%
	C-EO 10 %			
	FCA	0%	0%	0%

Fig. 8.1 Lemn de fag: influența soluțiilor de Diffusit S și C-EO (5, 10%) asupra dezvoltării fungice după 50, 100 și 150 de zile de incubare, ca și rezultat al infestării naturale a lemnului nou în condiții de laborator⁸

⁸ (D.-M. Pop et al., 2021) https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-221X2022000100411

În Fig. 8.1 se prezintă o exemplificare a rezultatelor calitative și cantitative ale acestui test (la finalul său), pentru lemnul de fag și toate tratamentele. Observațiile au arătat că ambele specii lemnoase analizate au prezentat semne de infestare fungică, incluzând preponderent fungi de mușegai, dar și fungi de putregai, după doar o săptămână de incubare, iar atacul fungic a evoluat și s-a diversificat în timp, pe durata de testare. În ceea ce privește eficacitatea tratamentelor aplicate, s-a constatat că soluțiile **C-EO**, atât în concentrație de 5%, cât și de 10%, s-au dovedit a fi eficiente în combaterea infestării. Mai mult, comparativ cu produsul biocid recunoscut Diffusit S, tratamentele cu **C-EO** au demonstrat o eficiență net superioară.

8.3.-05.2: Evaluarea eficienței EOs în tratamente de combatere a unui atac fungic activ (ciuperci xilofage izolate de pe obiecte de patrimoniu)

Această parte a cercetării a avut ca obiectiv evaluarea eficacității a două uleiuri esențiale - cel de **Cuișoare (C-EO)** și cel de **Cimbru (T-EO)** - diluate în etanol, în comparație cu două biocide recunoscute și utilizate în domeniul conservării lemnului: Diffusit S și Biotin T, în cadrul unui tratament curativ. În acest test s-au folosit epruvete de lemn de fag (*Fagus sylvatica*) și alburn de pin (*Pinus sylvestris*), care au fost infectate în mod controlat în laborator cu fungi de putregai izolate de pe elemente de lemn, obiecte de patrimoniu. Probele infectate au fost incubate pentru a se instala și dezvolta un atac fungic activ.

Studiul s-a concentrat pe trei tulpini fungice izolate din lemn provenit dintr-o clădire istorică din Braşov, respectiv un obiect de mobilier prezentând lemn fragilizat prin atac fungic. Aceste fungi au fost izolate prin repicări succesive pe mediu steril și au fost codificate în corelație cu proveniența (FC1, S), respectiv aspectul microscopic, în speță culoarea miceliului pe ciuperca matură: brun (B). sau alb (W). Cele 3 ciuperci izolate au avut următoarele coduri: **FC1-B**, **FC1-W** și **SW**.

În aceste sens s-a realizat un test micologic de laborator prin care să putem evalua eficiența unui **tratament curativ pentru lemn cu atac activ de ciuperci de putregai codificat testul TCu** (capitol 3)

8.3.1.Rezultate și discuții

Această cercetare s-a făcut în două etape:

- Prima etapă a avut ca scop atât testarea eficienței uleiului esențial de **Cuișoare** în etanol cu Diffusit S, cât mai ales dezvoltarea acestui test **TCu** și stabilirea metodologiei.
- Cea de-a doua etapă a cuprins testarea comparativă a eficienței celor două uleiuri esențiale (**C-EO** și **T-EO**) (10%) diluate în etanol comparativ cu cele două produse biocide recunoscute (Diffusit S și Biotin T) în aceeași concentrație.

Astfel în urma etapei 1 s-a constatat că per total tratamentul cu **C-EO** 10% în etanol este mai bun decât tratamentul cu Diffusit, dar eficiența a variat în funcție de tipul de ciupercă: de la inhibiție absolută a dezvoltării fungice în cazul **FC1-B** prin tratare cu **C-EO** 10%, la dezvoltare (mai redusă) în ambele probe paralele pentru atacul cu **SW**. (D.-M. Pop et al., 2021)

În **etapa a doua** s-au testat în paralel pe lemn de fag și de pin, ambele uleiuri esențiale (**C-EO** și **T-EO**)

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

diluate în etanol, la concentrația de 10% comparativ cu Diffusit și Biotin la aceeași concentrație.








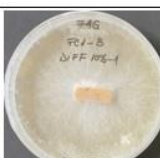






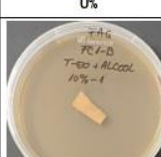
		Ziua 7	Ziua 42	Ziua 90	
FC1-B	Fag (<i>Fagus sylvatica</i>)	Control			
		FCA	51,73%	100%	100%
		Biotin T 10%			
		FCA	0%	0%	0%
		Diffusit S 10%			
		FCA	0%	100%	100%
		C-EO 10%			
		FCA	0%	0%	0%
		T-EO 10%			
		FCA	0%	0%	0%

Fig. 8.2 Eficiența comparativă a soluțiilor de Biotin, Diffusit, C-EO și T-EO (10%) în tratamentul curativ antifungic al lemnului de fag, degradat în urma unei infestări controlate cu ciuperca 1 FC1-B: evoluția dezvoltării după 7, 42 și 91 de zile de incubare

Tab. 8.1 Centralizarea rezultatelor privind eficiența tratamentelor curative cu produse biocide clasice Diffusit S, Biotin T și soluții alcoolice de C-EO și T-EO, la concentrație constantă de 10%, funcție de tipul ciupercii xilofage și specia lemnoasă: valori FCA (Fungal coverage area), %, după 90 zile incubare după tratament

Produce tratate (c=10%)	FC1-B		FC1-W		S-W	
	Fag	Pin	Fag	Pin	Fag	Pin
Control netratat	100%	100%	86,79%	86,67%	97,48%	73,34%
Biotin 10%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Diffusit 10%	100%	100%	100%	100%	88,75%	100%
C-EO/ET	0%	0%	37,57%	90,19%	11,57%	0%
T-EO/ET	0%	0%	0%	34,23%	5,06%	0%

În figura Fig. 8.2 se prezintă ca exemplu evoluția dezvoltării fungice (FC1-B) pentru probe din lemn de fag, control și probe tratate cu EO: soluții C-EO și T-EO în etanol (c=10%), respectiv produse biocide clasice: Diffusit S și Biotin în soluții apoase de aceeași concentrație.

În tabelul Tab. 8.1 se prezintă o centralizare a valorilor FCA, %, determinate prin prelucrarea cu softul ImageJ. Valorile reprezintă valoarea procentuală a ariei acoperite de miceliu în cutiile Petri, după 90 de zile incubare de la tratarea curativă. Pentru C-EO valorile FCA au variat între 0% (FC1-B), 11,57% (SW) și 37,57% (FC1-W) pentru lemnul de fag și respectiv între 0% (FC1-B), 0% (SW) și 90,19% (FC1-W) pentru alburn de pin. Pentru T-EO valorile FCA au variat între 0% (FC1-B), 0% (FC1-W) și 5,06% (SW) pentru lemnul de fag și respectiv între 0% (FC1-B), 0% (SW) și 34,23% (FC1-W) pentru alburn de pin. Produsul de comparație Diffusit a fost net inferior din punct de vedere eficiență de tratare curativă, valorile FCA determinate fiind 100% cu excepția cazului lemnului de fag atacat de SW (FCA=88,78%). Produsul de comparație Biotin a contracarat total atacul (FCA=0%) activ pentru toate ciupercile testate, atât pentru fag cât și pentru pin, dovedind eficiență maximă în condițiile de testare. Specificăm faptul că acest produs este recomandat a se utiliza la concentrații de până la 3%. În practică există situații în care se folosește la concentrație de 5%. Concentrația de 10% folosită în experimentări a fost motivată de o comparație a produselor la aceeași concentrație. Este probabil că și la o concentrație de 5%, eficiența să fie satisfăcătoare.

8.4.- 05.3: Teste de implementare în cazuri concrete de conservare lemn/artefacte muzeu

Acest subcapitol prezintă o analiză detaliată și comparativă a eficacității biocide antifungice a uleiului esențial de **Cuișoare (C-EO)** (5,10%) în etanol în raport cu două produse biocide recunoscute (Biotin T (5%) și Diffusit S (10%)), utilizate în mod curent în domeniul conservării lemnului.

Testul dezvoltat și codificat **TcuP** a cuprins atât acțiuni *in situ* cât și în laborator. Două obiecte din lemn vechi, cu degradare accentuată, aparținând Muzeului Astra din Sibiu, au fost alese pentru a fi studii de caz în prezentul studiu, în cadrul unei tabere de restaurare organizate 2019. Primul obiect supus analizei a fost o capră (Fig. 8.3), din lemn de fag, un element tradițional din gospodăria rurală, reprezentativ pentru patrimoniul etnografic al țării. Cel de-al doilea obiect a fost un zdrobitor de fructe (Fig. 8.4), confecționat din lemn de plop, o specie lemnoasă frecvent întâlnită în artefactele tradiționale datorită disponibilității sale și proprietăților de prelucrare. În timpul taberei de restaurare obiectele alese au fost supuse procesului de restaurare și conservare, în care s-a făcut și tratarea cu diferitele produse antifungice. Atât inițial cât și după tratare și condiționare în condiții naturale din fiecare element/parte tratată (pentru fiecare obiect) s-au prelevat probe de lemn. În cadrul Laboratorului de teste biologice L5 ICDT Braşov, toate aceste probe lemnoase prelevate în timpul taberei de restaurare s-au pus pe mediu de cultură (MEA) steril.

Documentarea evoluției procesului de colonizare s-a făcut prin observații și fotografii de rezoluție înaltă și s-a recurs la o evaluare cantitativă utilizând software-ul ImageJ, care a permis procesarea și analiza avansată pe imaginilor obținute

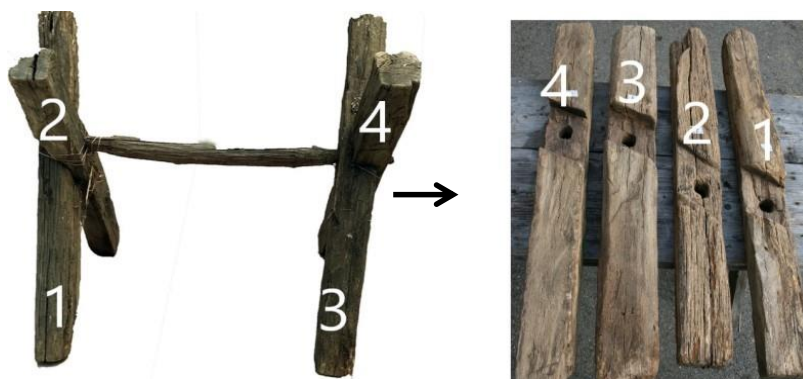


Fig. 8.3 Studiu de caz: Capră din lemn de fag aparţinând patrimoniului Muzeului Astra din Sibiu: imaginea obiectului asamblat – stânga şi elementele componente – dreapta⁹



Fig. 8.4 Studiu de caz: Zdrobitor de fructe din lemn de plop aparţinând patrimoniului Muzeului Astra din Sibiu: imaginea obiectului asamblat -stânga şi bucăţi - dreapta

8.4.1. Rezultate şi discuţii

Rezultatele testului obţinute în cazul primului studiu de caz, Capra sunt publicate şi pot fi accesate¹⁰ Concluzia a fost că tratamentele cu C-EO/Etanol atât la concentraţia de 5% cât şi la 10% au arătat eficienţă mai ridicată, faţă de tratamentele cu Biotin 5% şi Diffusit 10%, chiar dacă nu au stopat de tot dezvoltarea fungică.

Pentru cel de-al doilea studiu de caz, Zdrobitorul de fructe, după 7 zile se poate observa (Fig. 8.5) deja un atac fungic complex, atât în cazul martorului control, cât şi în cazul tratării cu paraloid B72, care arată o contaminare severă a lemnului. La ziua 7 în cazul tratamentului cu Diff 10% nu au apărut semne de

⁹ Extras din (D. M. Pop et al., 2020) <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/combined-testing-approach-to-evaluate-the-antifungal-efficiency-of-clove-eugenia-caryophyllata-essential-oil-for-potential-application-in-wood-conservation/>

¹⁰ <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/combined-testing-approach-to-evaluate-the-antifungal-efficiency-of-clove-eugenia-caryophyllata-essential-oil-for-potential-application-in-wood-conservation/>

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

dezvoltare fungică, dar în cazul C-EO 10% se observă o dezvoltare incipientă, având o valoare FCA=1,4%, față de FCA=0% Diff (Fig. 8.5)





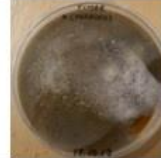

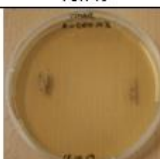








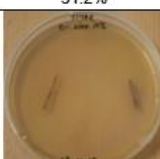


Durata de incubare		Ziua 7	Ziua 48	Ziua 140	
Studiu de caz – lemn de plop degradat (<i>Poplar spp</i>)	A	Control			
		FCA	84.9%	100%	100%
		Paraloid B72 5%			
		FCA	79.7%	100%	100%
		C-EO 10 %			
	FCA	1.4%	23.9%	60.4%	
	B	Control			
		FCA	97.9%	100%	100%
		Paraloid B72 5%			
		FCA	31.2%	98.5%	100%
Diffusit S 10 %					
FCA	0%	100%	100%		

Fig. 8.5 Eficiența comparativă a soluțiilor de C-EO și Diffusit (10%) în tratamentul curativ antifungic al lemnului de plop, față de lemn netratat (control) și consolidat cu Paraloid B72 (5%), provenind dintr-un obiect de patrimoniu: Zdrobitor de fructe. Monitorizare făcută la 7, 48 și 140 zile.

În ziua 48 se observă că în cazul probelor de lemn martor (control), lemn din partea A consolidat cu Paraloid B72 și de asemenea în cazul probelor tratate cu Diffusit, mixul de fungi au acoperit în totalitate suprafața cutiei Petri (FCA=100%). Proba de lemn cu Paraloid B72 din partea B a obiectului arată o ușoară întârziere în dezvoltarea fungilor cu o valoare FCA=98,5%. Tratamentul cu C-EO 10% se dovedește a avea un efect bun de inhibare a dezvoltării mixului de fungi, cu o valoare a FCA=23,9%. La finalul testului, ziua 140, în toate cutiile Petrii cu probe de lemn control, consolidat cu Paraloid B72 și tratat cu Diffusit 10%, FCA=100%, adică fungii au acoperit în totalitate suprafața cutiei Petri. În cazul

probei tratate cu C-EO 10%, la finalul testului valoarea FCA=60,4%, ceea ce arată efect inhibitor pronunțat.

În concluzie, în urma testului TcuP efectuat pe obiectul 2: Zdrobitor de fructe, uleiul esențial de Cuișoare C-EO a arătat o eficiență net superioară, tratamentului cu Diffusit S și chiar dacă nu a omorât mixul de fungi existent în lemn, se poate observa clar efectul de întârziere puternică în dezvoltarea fungică. Analizând aspectul macroscopic al fungiiilor dezvoltate în cutiile Petri, se poate observa o diferență puternică între fungii din cutia cu tratament C-EO 10% și toate celele cutii, conținând lemn tratat sau nu. Astfel se poate înțelege că din tot mixul de fungi existent pe lemnul martor control, asupra unora dintre ele C-EO a avut efect biocid, dar că au fost și unele specii de fungi rezistente.

8.5.- 05.4: Evaluarea influenței tratamentelor cu EOs asupra culorii suprafețelor de lemn și comportării acestora la expunerea la lumină UV-VIS

Materialele și tratamentele utilizate în conservare–restaurare (C-R) trebuie să îndeplinească o serie de condiții specifice domeniului, precum compatibilitatea cu materialele tradiționale originale, reversibilitatea, rezistența la îmbătrânire, respectiv păstrarea nealterată a proprietăților în timp. Totodată, materiale pentru C-R nu trebuie să modifice (semnificativ) culoarea suportului tratat. În cazul lemnului, vorbim de specii foarte diferite care diferă în mod natural prin culoare și care se comportă diferit în timp dpdv al stabilității culorii (Liu, 2017)(Timar et al 2016). Culoarea suprafețelor de lemn se poate modifica în urma unor tratamente cu materiale colorate, dar și prin finisarea cu diferite materiale peliculogene, funcție de natura și culoarea acestora. Totodată, fenomenul de îmbătrânire va afecta suprafețele de lemn finisate, efectul fiind dependent de specia lemnoasă și materialul de finisare, dar și de factorii îmbătrânire (lumină UV-Vis, temperatură), timpul de îmbătrânire (naturală sau artificială accelerată), condițiile de mediu și variația acestora.

Cercetarea din această teză a reliefat potențialul antifungic al C-EO și T-EO ca soluții în etanol (capitolele 6,7), dar și un anumit efect de fitotoxicitate (capitolul 7) în cazul în care ar exista riscul spălării de pe lemn a unor compuși toxici. Totodată, testele prezentate anterior în acest capitol au relevat eficacitatea tratamentelor preventive și curative cu aceste EOs și potențialul de aplicare în C-R. În acest context, s-au considerat necesare evaluarea modificărilor de culoare asociate tratamentelor cu C-EO și T-EO și influența acestora asupra modificărilor de culoare datorate expunerii la lumină, în condiții de interior. Aceste cercetări au fost anterior publicate¹¹ (Beldean et al., 2024) și se prezintă doar rezumativ.

Pentru testare s-a optat pentru lemn de paltin (*Acer pseudoplatanus*), acesta fiind un lemn deschis la culoare și în același timp foarte sensibil la lumină (Timar & Beldean, 2022). Aceste caracteristici au fost considerate importante pentru atingerea obiectivelor propuse. Pentru evaluarea modificărilor de culoare, s-au făcut măsurători de culoare în sistem CIELab, înainte și după pretratere, și s-au calculat diferențele de culoare, procedura fiind descrisă în lucrarea publicată (Beldean et al., 2024).

¹¹ <https://doi.org/10.35511/978-963-334-518-4>

8.6.- O5.5: Evaluarea compatibilității tratamentelor de bioprotecție cu EOs cu finisarea ulterioară și influența asupra culorii și comportării la lumină a suprafețelor finisate

În practica C-R, tratamentele de bioprotecție preventivă sunt urmate de finisare cu materialele pelculogene tradiționale identificate pe artefact (ex. Ceară, ulei de in, șelac), iar pentru suprafețele ce nu au fost finisate se aplică 1 strat de ceară de albine pentru a asigura o izolare a lemnului față de variațiile de umiditate. Prin urmare, s-a conturat obiectivul O5.5, care a vizat compatibilitatea suprafețelor pre-tratate cu EOs cu șelac și ceară de albine, materiale tradiționale de finisare. Totodată, s-au evaluat modificările de culoare ale suprafețelor finisate ca urmare a expunerii la lumină în test accelerat, pentru a reliefa influența posibilă a pre-tratamentelor cu **C-EO** și **T-EO**.

Expunerea la lumină s-a făcut în cameră climatică dotată cu lampă UV-VIS și filtru H2 pentru asimula lumina naturală care trece prin sticla ferestrei, descrisă în (Timar & Beldean, 2022).

8.6.1. Rezultate experimentale și concluzii

Parte din rezultatele experimentale sunt concentrate în Fig. 8.6 cumulat pentru obiectivele O5.4 și O5.5, o prezentare în extenso fiind inclusă în lucrarea anterior publicată (Beldean et al., 2024).

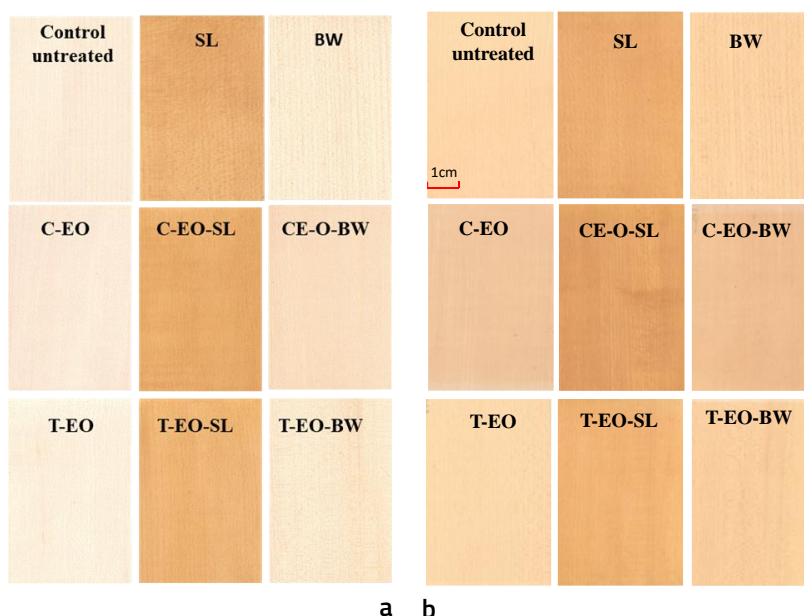


Fig. 8.6 Aspectul general al probelor de paltin (*Acer pseudoplatanus*), control și pretratate cu C-EO și T-EO, nefinisate și finisate cu șelac (SL) și ceară de albine (BW): a. înainte de expunere la lumină; b. după expunere la lumină UV-VIS în test accelerat 96h¹²

Din imaginile epruvetelor nefinisate, neexpuse la lumină (coloana din stanga în Fig. 8.6 a) se poate observa ca pretratarea cu **T-EO** nu schimbă perceptibil culoarea lemnului de paltin, iar pretratarea cu **C-EO** modifică foarte puțin culoare, în sensul de închidere și virare spre roșu greu perceptibile. Din acest punct de vedere tratamentele pot fi acceptabile în C-R.

¹² (preluat din Beldean et al 2024).

Pre-tratamentele cu **C-EO** și **T-EO** au fost compatibile cu finisarea ulterioară cu șelac și ceară de albine, dar au fost necesare perioade prelungite de uscare între straturi.

Concluzii:

- Pre-tratarea lemnului de paltin cu **C-EO** și **T-EO** a modificat abia perceptibil culoarea lemnului de paltin nefinisat și nu a influențat semnificativ modificările de culoare prin expunere la lumină.
- Culoarea suprafețelor finisate este determinată primordial de tipul și culoarea materialului pelicologen (SL sau BW) și ușor influențată de pre-tratarea cu **C-EO** și **T-EO**; influență maximă se observă la pre-tratare cu **C-EO** urmată de finisare cu ceară.
- Pre-tratarea lemnului de paltin cu **C-EO** urmată de finisare cu SL și BW a determinat modificări mai mari de culoare în urma expunerii la lumină UV-VIS.
- Pre-tratarea lemnului de paltin cu **T-EO** urmată de finisare cu SL și BW nu a influențat negativ rezistența la lumină UV-VIS a suprafețelor finisate, ci în mod contrar se observă o îmbunătățire ușoară a acesteia în cazul **T-EO**.

În baza tuturor acestor rezultate, se poate recomanda utilizarea uleiului de **Cimbru** (*Satureja hortensis*) **T-EO** (soluții 5-10% în etanol) ca un produs alternativ de bioprotecție preventivă și curativă în conservarea-restaurarea bunurilor de patrimoniu din lemn. Utilizarea **C-EO** nu poate fi total contraindicată, dar se recomandă cercetări mai aprofundate.

Capitolul 9 — Concluzii finale, contribuții originale, direcții viitoare de cercetare

9.1. Concluzii finale

Pentru atingerea scopului propus, au fost formulate și urmărite în teză un număr de cinci obiective de cercetare majore (O1-O5), intercorelate într-un concept metodologic original și rațional. Formularea obiectivelor de cercetare, identificarea metodelor posibile de realizare, verificarea și validarea rezultatelor s-a bazat pe un studiu aprofundat al literaturii de specialitate.

Prin modul de concepere a tezei, cercetările realizate, centralizarea și interpretarea laborioasă și rațională a rezultatelor s-au rezolvat integral obiectivele propuse, în corelație cu care se pot formula următoarele concluzii:

- S-a stabilit și validat un **protocol analitic de laborator complex**, cuprinzând inițial trei categorii de metode de testare, pentru a răspunde necesităților de cercetare asociate obiectivelor tezei. Protocolul analitic stabilit a servit îndeplinirii tuturor obiectivelor tezei (O1).
- În baza unui studiu extensiv și aprofundat al literaturii de specialitate, sintetizării informației și corelațiilor dintre compoziția și proprietățile uleiurilor esențiale, s-au identificat și selectat un număr de 5 uleiuri esențiale cu potențial biocid antifungic pentru testare în cadrul tezei de doctorat: ulei esențial de **Busuioc** (*Ocimum basilicum*) **B-EO**, ulei esențial de **Cuișoare** (*Eugenia*

caryophyllata) C-EO, ulei esențial de Oregano (*Origanum vulgare*) O-EO, ulei esențial de Scorțișoară (*Cinnamomum verum*) S-EO și ulei esențial de Cimbru (*Satureja hortensis*) T-EO.

- S-a realizat o **caracterizare complexă a celor 5 uleiuri esențiale** prin cumulara și coroborarea informațiilor din fișele tehnice/de securitate ale produselor, cu rezultatele investigațiilor experimentale proprii privind compoziția chimică a acestora, determinată prin gaz-cromatografie asociată cu spectrometrie de masă (GC-MS) și FTIR și date de comparative din alte cercetări întreprinse la nivel mondial. Toate aceste informații valoroase s-au cumulate în fișe originale de caracterizare a uleiurilor esențiale, ce reprezintă rezultate ale tezei, dar și un suport științific util, tip bază de date, pentru cercetări viitoare (BD-O2).
- **Potențialul biocid antifungic al celor 5 uleiuri esențiale**, față de ciuperci xilofage reprezentative pentru putregaiul brun (*Serpula lacrymans*, *Postia placenta*) și putregaiul alb (*Trametes versicolor*) în degradarea lemnului, a fost evaluat și comparat prin teste screening. Fișele de rezultate cuprinzând detalii privind modul de testare, monitorizarea imagistică a dezvoltării fungice, evaluarea cantitativă prin indicii de inhibiție specifici, reprezentări grafice privind evoluția acestora, cu interpretare și concluzii, pentru fiecare dintre cele 5 uleiuri esențiale, reprezintă rezultate originale valoroase, constituindu-se într-o bază de date utilă pentru cercetări viitoare (BD-O3).
- În urma testării potențialului biocid antifungic al celor 5 uleiuri esențiale prin teste screening s-au selectat două uleiuri esențiale, uleiul de Cuișoare (C-EO) și uleiul de Cimbru (T-EO)(O3), pentru care s-au efectuat ulterior teste minibloc de evaluare a eficienței antifungice pe lemn tratat și teste de fito-toxicitate, aplicând metodele stabilite și validate cuprinse în protocolul analitic.
- **Testele minibloc au confirmat potențialul antifungic al soluțiile alcoolice de C-EO și T-EO** cu concentrații de 5-10% și au relevat eficacitatea diferită și specifică față de fungi de putregai brun sau alb, în corelație cu compoziția lor chimică și specificul modului de atac al acestor fungi; C-EO este mai activ față de putregaiul brun, iar T-EO este mai activ față de putregaiul alb (O4).
- **Testele minibloc cu C-EO și T-EO în ulei de in** au demonstrat că această **variantă nu este viabilă**, în special pentru C-EO, deoarece acesta interferează negativ, datorită proprietăților antioxidante, în procesul de întărire prin polimerizare oxidativă a LO (O4).
- **Testele de fitotoxicitate** au relevat un potențial eco-impact negativ prin fitotoxicitate pentru produsele clasice de bioprotecție, uleiul de in și uleiurile esențiale studiate, mai accentuat pentru C-EO comparativ cu T-EO (O4).
- Dintre toate variantele de tratare a lemnului de fag studiate, **eco-impact negativ minim** prin fitotoxicitate s-a obținut pentru tratamentele cu soluții de T-EO în etanol la concentrații de 1 și 5%, iar potențial **eco-impact negativ maxim** pentru soluțiile de Biotin T (la concentrațiile testate de 5 și 10%) (O4).

- Conștientizarea acestor aspecte este un prim pas necesar pentru cuplarea tratamentelor de bioprotecție cu tratamente de hidrofugare sau peliculizare în cazul unor aplicații în care există riscul de lavabilitate de pe lemn a produselor de tratare și afectarea, în consecință, a mediului.
- Teste preliminare de implementare a **C-EO** și **T-EO** (soluții 5-10% în etanol) ca produse alternative pentru **bio-protecția preventivă și curativă în domeniul conservării-restaurării bunurilor culturale** din lemn au relevat o eficiență antifungică cel puțin egală sau superioară produselor clasice de bioprotecție considerate pentru comparație (O5).
- Tratamentele de bioprotecție cu **C-EO** și **T-EO** sunt **compatibile cu finisare ulterioară cu șelac și ceară de albine**. Considerând și aspecte legate de menținerea nechimbată a culorii și rezistența la lumină, coroborate cu date de fito-toxicitate, considerăm la acest moment că soluțiile de **T-EO** au **potențial de aplicare în domeniul conservării bunurilor de patrimoniu din lemn** și recomandăm testarea în studii de caz pe obiecte reale. Pentru **C-EO** se impun o serie de teste suplimentare (O5).
- Testele de implementare în C-R au generat două noi **metode micologice de laborator specifice** pentru protecție preventivă și curativă și un test combinat original, ce îmbogățesc protocolul analitic elaborat inițial (O5, O1).

9.2. Contribuții originale

Teza de doctorat aduce o serie de contribuții originale în domeniul investigat (bioprotecția lemnului), începând de la tematica în sine, respectiv potențialul unor uleiuri esențiale în bioprotecția antifungică a lemnului, și continuând cu ideea de bază a dezvoltării întregului demers științific, respectiv sintagma eficiență *versus* eco-impact, ca o abordare sustenabilă și responsabilă.

Rezolvarea acestei tematici îndrăznețe a impus studiu aprofundat de literatură, crearea de instrumente specifice de cercetare, utilizarea unor metode diverse de cercetare, înregistrarea, prelucrarea și analiza unui volum imens de date experimentale, capacitate de sinteză, toate acestea fiind eforturi considerabile ce au condus la o serie de elemente de originalitate, dintre care se evidențiază:

1. Conceptul metodologic al tezei de doctorat;
2. Protocolul analitic complex dezvoltat, incluzând teste micologice originale pentru evaluarea aplicabilității și eficienței unor produse în domeniul conservării bunurilor de patrimoniu din lemn;
3. Sinteza datelor din literatură privind uleiuri esențiale cu potențial biocid antifungic, cu corelații utile compoziție chimică-eficiență biocidă; (BD1)
4. Bază de date rezultate validare 5 tipuri de teste screening realizate cu substanțe biocide clasice cu eficacitate recunoscută (BRE) (BD-01/1-BD-01/5)
5. Bază de date caracterizare complexă 5 uleiuri esențiale (BD-02)
6. Baze de date potențial biocid antifungic față de ciuperci xilofage reprezentative pentru putregaiul brun (*Serpula lacrymans*, *Postia placenta*) și putregaiul alb (*Trametes versicolor*), determinat prin teste

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

screening RS, pentru 5 uleiuri esențiale (ulei esențial de **Busuioc (*Ocimum basilicum*) B-EO**, ulei esențial de **Cuișoare (*Eugenia caryophyllata*) C-EO**, ulei esențial de **Oregano (*Origanum vulgare*) O-EO**, ulei esențial de **Scorțișoară (*Cinnamomum verum*) S-EO** și ulei esențial de **Cimbru (*Satureja hortensis*) T-EO**) (BD-03/1), fișe de validare potențial antifungic funcție de mediul de diluție (BD-03/2) și tipul ciupercii xilofage (BD-03/3)

7. Testare și date experimentale privind efectul biocid antifungic față de *Postia placenta* (putregai brun) și *Trametes versicolor* (putregaiul alb) determinat prin test minibloc pentru C-EO și T-EO în două medii de diluție (etanol, ulei de in)

8. Testare și date experimentale privind potențialul eco-impact prin fitotoxicitate pentru C-EO și T-EO funcție de mediul de diluție și concentrație, comparativ cu două produse biocide clasice și apa distilată.

9. Dezvoltare concept testare și teste micologice specifice pentru evaluarea potențialului de implementare a uleiurilor esențiale ca produse alternative antifungice pentru tratamente preventive și curative în conservarea patrimoniului.

9.3. Direcții viitoare de cercetare

Considerăm că pe baza rezultatelor și concluziilor din teză, bazate pe un volum de muncă și efort considerabile, se justifică aprofundarea și diversificarea cercetărilor în acest domeniu. Ca direcții viitoare de cercetare, se întrevăd (nelimitativ), următoarele:

1. Testarea unor amestecuri de uleiuri esențiale (din cele 5) pentru a spori eficiența protecției antifungice.
2. Teste minibloc și de fitotoxicitate pentru amestecuri uleiuri esențiale cu eficiență antifungică crescută, comparativ pentru tratamente ca atare și tratamente succedate de hidrofugare cu ceruri.
3. Teste de implementare a uleiului de cimbru T-EO în practica conservării-restaurării mobilierului istoric/artefactelor din lemn vechi (studii de caz combinate cu teste micologice).
4. Colaborarea cu specialiști în microbiologie/micologie pentru identificarea fungilor izolate de pe bunuri de patrimoniu pentru o mai bună înțelegere a rezultatelor obținute și extinderea cercetărilor cu alte uleiuri esențiale individuale și în amestec.
5. Dezvoltarea unor eco-produse eficiente pe bază de uleiuri esențiale încapsulate în nanoparticule.

Protocolul analitic dezvoltat în teză, precum și rezultatele experimentale sub formă de fișe de caracterizare uleiuri esențiale, evaluare și validare potențial antifungic al uleiurilor esențiale constituite în baze de date originale, pot constitui un suport metodologic și informațional util pentru cercetări viitoare, fără a fi limitativ dpdv al direcțiilor identificate în această teză.

Bibliografie selectivă

- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1–2), 220–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Bae, J., Mercier, G., Watson, A. K., & Benoit, D. L. (2014). Seed germination test for heavy metal phytotoxicity assessment. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(8), 1519–1521. <https://doi.org/10.4141/cjps-2014-018>
- Bahmani, M., & Schmidt, O. (2018). Plant essential oils for environment-friendly protection of wood objects against fungi. *Maderas. Ciencia y Tecnología, ahead*, 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2018005003301>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (Ed.). (2010). *Handbook of essential oils: Science, technology, and applications*. CRC Press/Taylor & Francis.
- Beldean, E. C., Timar, M. C., & Pop, D.-M. (2024). Influence of pretreatments with essential oils on the colour and light resistance of maple (*Acer pseudoplatanus*) wood surfaces coated with shellac and beeswax. *11th Hardwood Conference Proceedings*. <https://doi.org/10.35511/978-963-334-518-4>
- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, MS., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2019.03.001>
- Borrego, S., Valdés, O., Vivar, I., Lavin, P., Guiamet, P., Battistoni, P., Gómez De Saravia, S., & Borges, P. (2012). Essential Oils of Plants as Biocides against Microorganisms Isolated from Cuban and Argentine Documentary Heritage. *ISRV Microbiology*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2012/826786>
- Brischke, C. (2020). *WOOD PROTECTION AND PRESERVATION*. MDPI AG.
- Butnariu, M., & Sarac, I. (2018). Essential Oils from Plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*, 1(4), 35–43. <https://doi.org/10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489>
- Butta, L. D., Neacșu, A., Smuleac, L. I., Pascalau, R., Imbrea, F., Bătrîna, Ștefan L., & Imbrea, I. M. (2023). ANTIFUNGAL AND ANTI-MYCOTIC PROPERTIES OF ESSENTIAL OILS EXTRACTED FROM DIFFERENT PLANTS ON PATHOGENIC FUNGI THAT BIOSYNTHESIZE MYCOTOXINS. *Scientific Papers. Series A. Agronomy, Vol 66*(1), 251.
- Cheng, S.-S., Liu, J.-Y., Chang, E.-H., & Chang, S.-T. (2008). Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology*, 99(11), 5145–5149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.013>
- Chittenden, C., & Singh, T. (2011). Antifungal activity of essential oils against wood degrading fungi and their applications as wood preservatives. *International Wood Products Journal*, 2(1), 44–48. <https://doi.org/10.1179/2042645311Y.0000000004>
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3(4), 25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
- Di Salvatore, M., Carafa, A. M., & Carratù, G. (2008). Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 73(9), 1461–1464. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.061>
- Dima, C., & Dima, S. (2015). Essential oils in foods: Extraction, stabilization, and toxicity. *Current Opinion in Food Science*, 5, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>
- Eriksson, K. E. L., Blanchette, R. A., & Ander, P. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer.
- Essential Oils pocket reference* (8-lea ed). (2019). Life Science Publishing.
- Ferraz, C. A., Pastorinho, M. R., Palmeira-de-Oliveira, A., & Sousa, A. C. A. (2022). Ecotoxicity of plant extracts and essential oils: A review. *Environmental Pollution*, 292, 118319. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118319>
- Fokou, J. B. H., Dongmo, P. M. J., & Boyom, F. F. (2020). *Essential oil's chemical composition and pharmacological properties*. IntechOpen.

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

- Gatto, M. A., Sergio, L., Ippolito, A., & Di Venere, D. (2016). Phenolic extracts from wild edible plants to control postharvest diseases of sweet cherry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 120, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.06.010>
- GÓMEZ DE SARAVIA, S. G., DE LA PAZ NARANJO, J., Guiamet, P., ARENAS, P., & Borrego, S. F. (2008). Biocide activity of natural extracts against microorganisms affecting archives. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(1), 25–29.
- Gurnani, N., Gupta, M., Mehta, D., & Mehta, B. K. (2016). Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.06.011>
- Jadon, P. K., Yadav, S., & Dr. Bhimrao Ambedkar University, Agra, U.P (INDIA). (2022). Toxicity of Heavy Metals to the Human Health and Environment. *Journal of Ultra Chemistry*, 18(4), 44–50. <https://doi.org/10.22147/juc/180401>
- Jerry Atoche Medrano, J. (2020). Essential Oils in the Development of New Medicinal Products. În H. A. El-Shemy (Ed.), *Essential Oils—Oils of Nature*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86572>
- Juárez, Z. N., Hernández, L. R., Bach, H., Sánchez-Arreola, E., & Bach, H. (2015). Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. *Xolocotziana* and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens. *Industrial Crops and Products*, 74, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.058>
- Jürgens, A., & Viljoen, A. M. (2010). Chemical diversity and biological functions of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, 76(4), 607–611. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.09.008>
- Khalili, S. T., Mohsenifar, A., Beyki, M., Zhavah, S., Rahmani-Cherati, T., Abdollahi, A., Bayat, M., & Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.054>
- Kumar, S., Mahapatro, G. K., Yadav, D. K., Tripathi, K., Koli, P., Kaushik, P., Sharma, K., & Nebapure, S. (2022). Essential oils as green pesticides: An overview. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 92(11). <https://doi.org/10.56093/ijas.v92i11.122746>
- Laur, A. (2022). *Aromaterapia în viața de zi cu zi* (2-lea ed).
- Liu, X. Y. (2017). *Contributions to the study of ageing phenomena of wooden substrate and traditional materials for transparent finishes – a comparative approach for Europe and China with applicability in furniture conservation/restoration*. Universitatea Transilvania din Braşov.
- Liyanage, T., Madhujith, T., & Wijesinghe, K. G. G. (2017). Comparative study on major chemical constituents in volatile oil of true cinnamon (*Cinnamomum verum* Presl. Syn. *C. zeylanicum* Blum.) and five wild cinnamon species grown in Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research*, 28(3), 270. <https://doi.org/10.4038/tar.v28i3.8231>
- Marcias, F. A., Torres, A., Maya, C. C., & Fernández, B. (2005). Natural biocides from citrus waste as new wood preservatives. *Fourth World Congress on Allelopathy 2005 „Establishing the scientific base“*.
- Maurya, A., Prasad, J., Das, S., & Dwivedy, A. K. (2021). Essential Oils and Their Application in Food Safety. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 653420. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.653420>
- Medeiros, F. C. M. D., Gouveia, F. N., Bizzo, H. R., Vieira, R. F., & Del Menezzi, C. H. S. (2016). Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 114, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.003>
- Mohammed, H. A., Sulaiman, G. M., Khan, R. A., Al-Saffar, A. Z., Mohsin, M. H., Albukhaty, S., & Ismail, A. (2024). Essential oils pharmacological activity: Chemical markers, biogenesis, plant sources, and commercial products. *Process Biochemistry*, 144, 112–132. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.05.021>
- Mohareb, A. S. O., Badawy, M. E. I., & Abdelgaleil, S. A. M. (2013). Antifungal activity of essential oils isolated from Egyptian plants against wood decay fungi. *Journal of Wood Science*, 59(6), 499–505. <https://doi.org/10.1007/s10086-013-1361-3>
- Mohtashami, S., Rowshan, V., Tabrizi, L., Babalar, M., & Ghani, A. (2018). Summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil constituent oscillation at different storage conditions. *Industrial Crops and Products*, 111, 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.055>
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20(2), 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.007>

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

- Pánek, M., Reinprecht, L., & Hulla, M. (2014a). Ten Essential Oils for Beech Wood Protection—Efficacy Against Wood-destroying Fungi and Moulds, and Effect on Wood Discoloration. *BioResources*, *9*(3), 5588–5603. <https://doi.org/10.15376/biores.9.3.5588-5603>
- Pánek, M., Reinprecht, L., & Hulla, M. (2014b). Ten Essential Oils for Beech Wood Protection—Efficacy Against Wood-destroying Fungi and Moulds, and Effect on Wood Discoloration. *BioResources*, *9*(3), 5588–5603. <https://doi.org/10.15376/biores.9.3.5588-5603>
- Pánek, M., Reinprecht, L., & Hulla, M. (2014c). Ten Essential Oils for Beech Wood Protection—Efficacy Against Wood-destroying Fungi and Moulds, and Effect on Wood Discoloration. *BioResources*, *9*(3), 5588–5603. <https://doi.org/10.15376/biores.9.3.5588-5603>
- Pant, A., Agarwal, S., Jha, K., & Singh, M. (2019). PHARMACOLOGICAL NEUROPROTECTIVE EFFICACY OF ESSENTIAL OILS (EO) BASED AROMATHERAPY: AN INSIGHT. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research*, *8*(5). <https://doi.org/10.32553/jbpr.v8i5.646>
- Plavsic, D., Dimic, G., Psodorov, D., Saric, L., Cabarkapa, I., & Kosutic, M. (2017). Antifungal Activity of Mentha Piperita and Carum Carvi Essential Oils. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 201–207. <https://doi.org/doi:10.2298/ZMSPN1733201P>
- Pop, D. M., Timar, M. C., Beldean, E. C., & Varodi, A. M. (2020). Combined testing approach to evaluate the antifungal efficiency of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil for potential application in wood conservation. *BioResources*, *15*(4), 9474–9489. <https://doi.org/10.15376/biores.15.4.9474-9489>
- Pop, D.-M., Timar, M. C., Varodi, A. M., & Beldean, E. C. (2021). An evaluation of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil as a potential alternative antifungal wood protection system for cultural heritage conservation. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, *24*. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2022000100411>
- Raut, J. S., & Karuppaiyl, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, *62*, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Reinprecht, L. (2010). Fungicides for Wood Protection—World Viewpoint and Evaluation/Testing in Slovakia. În O. Carisse (Ed.), *Fungicides*. InTech. <https://doi.org/10.5772/13233>
- Righi-Assia, A. F., Khelil, M. A., Medjdoub-Bensaad, F., & Righi, K. (2020). Efficacy of oils and powders of some medicinal plants in biological control of the pea weevil (*Callosobruchus chinensis* L.). *African Journal of Agricultural Research*, *5*(12), 1474–1481. <https://doi.org/10.5897/AJAR09.618>
- Roccoliello, E., Viale, I., & Cornara, L. (2011). Phytotoxicity tests with higher plants for environmental risk assessment. *Journal of Biological Research - Bollettino Della Società Italiana Di Biologia Sperimentale*, *84*(1). <https://doi.org/10.4081/jbr.2011.4489>
- Sadgrove, N., Padilla-González, G., Leuner, Melnikovova, I., & Fernandez-Cusimamani, E. (2021). Pharmacology of Natural Volatiles and Essential Oils in Food, Therapy, and Disease Prophylaxis. *Front Pharmacol.*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.740302>
- Sanchis, C. M., Bosch-Roig, P., Moliner, B. C., & Miller, A. Z. (2023). Antifungal properties of oregano and clove volatile essential oils tested on biodeteriorated archaeological mummified skin. *Journal of Cultural Heritage*, *61*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2023.02.006>
- Shankar, S., Prasad, S., Owaiz, M., Yadav, S., Manhas, S., & Yaqoob, M. (2021). ESSENTIAL OILS, COMPONENTS AND THEIR APPLICATIONS: A REVIEW. *PLANT ARCHIVES*, *27*(Suppliment-1), 2027–2033. <https://doi.org/10.51470/PLANTARCHIVES.2021.v21.S1.331>
- Shirzad, H., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Finidokht, R., & Meshkatalsadat, M. (2011). Assessment of the Antifungal Activity of Natural Compounds to Reduce Postharvest Gray Mould (*Botrytis Cinerea* Pers.: FR.) of Kiwifruits (*Actinidia Deliciosa*) During Storage. *Journal of Plant Protection Research*, *5*(1), 1–6. <https://doi.org/10.2478/v10045-011-0001-4>
- Šimůnková, K., Hýsek, Š., Reinprecht, L., Šobotník, J., Lišková, T., & Pánek, M. (2022). Lavender oil as eco-friendly alternative to protect wood against termites without negative effect on wood properties. *Scientific Reports*, *12*(1), 1909. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05959-5>
- Singh, T., & Chittenden, C. (2008). In-vitro antifungal activity of chilli extracts in combination with *Lactobacillus casei* against common sapstain fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *62*(4), 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.10.009>

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

- Skubij, N., & Dzida, K. (2019). Essential oil composition of summer savory (*Satureja hortensis* L.) cv. Saturn depending on nitrogen nutrition and plant development phases in raw material cultivated for industrial use. *Industrial Crops and Products*, *135*, 260–270. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.057>
- Stević, T., Beriç, T., Šavikin, K., Soković, M., Gođevac, D., Dimkić, I., & Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, *55*, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.011>
- Stupar, M., Grbić, M. Lj., Džamić, A., Unković, N., Ristić, M., Jelikić, A., & Vukojević, J. (2014). Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. *South African Journal of Botany*, *93*, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.03.016>
- Timar, M. C., & Beldean, E. C. (2022). Modification of Shellac with Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Thyme (*Satureja hortensis*) Essential Oils: Compatibility Issues and Effect on the UV Light Resistance of Wood Coated Surfaces. *Coatings*, *12*(10), 1591. <https://doi.org/10.3390/coatings12101591>
- Timar, M. C., Buchner, J., Pop, D. M., & Irle, M. (2021). The Protection of Beech Wood ("Fagus Sylvatic"a) against the brown Rot "Postia Placenta" using Clove ("Eugenia Caryophyllata") Essential Oil in a Linseed Oil Medium. *Series II: Forestry Wood Industry Agricultural Food Engineering*, *14*(63)(2), 61–74. <https://doi.org/10.31926/but.fwiafe.2021.14.63.2.6>
- Timar, M. C., Buchner, J., Pop, D. M., & Irle, M. (2022). The Protection of Beech Wood ("Fagus Sylvatic"a) against the brown Rot "Postia Placenta" using Clove ("Eugenia Caryophyllata") Essential Oil in a Linseed Oil Medium. *Series II: Forestry Wood Industry Agricultural Food Engineering*, *14*(63)(2), 61–74. <https://doi.org/10.31926/but.fwiafe.2021.14.63.2.6>
- Toncer, O., Karaman, S., Diraz, E., & Tansi, S. (2017). Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different phenological stages in semi-arid environmental conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, *26*(8), 5441–5446.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Ullah, N., Parveen, A., Bano, R., Zulfiqar, I., Maryam, M., Jabeen, S., Liaqat, A., & Ahmad, S. (2016). In vitro and in vivo protocols of antimicrobial bioassay of medicinal herbal extracts: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *6*(8), 660–667. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61106-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61106-4)
- Ürgeová, E., Vulganová, K., & Polívka, L. (2013). Content of selected secondary metabolites in wild hop. *Chemical Papers*, *67*(3). <https://doi.org/10.2478/s11696-012-0213-8>
- Varnai, V. M., Macan, J., Ljubicic Calusic, A., Prester, L., & Kanceljak Macan, B. (2011). Upper respiratory impairment in restorers of cultural heritage. *Occupational Medicine*, *61*(1), 45–52. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqq170>
- Varona, S., Rodríguez Rojo, S., Martín, Á., Cocero, M. J., Serra, A. T., Crespo, T., & Duarte, C. M. M. (2013). Antimicrobial activity of lavender essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products*, *42*, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.020>
- Vettraino, A. M., Zikeli, F., Humar, M., Biscontri, M., Bergamasco, S., & Romagnoli, M. (2022). *Essential oils as natural biocide against common brown- and white-rot fungi in degradation of wood products: Antifungal activity evaluation by in vitro and FTIR analysis*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1903709/v1>
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, *19*(12), 1130–1138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.12.003>
- Voda, K., Boh, B., Vrtačnik, M., & Pohleven, F. (2003). Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *51*(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00075-6)
- Wang, L.-H., & Sung, W.-C. (2011). Rapid evaluation and quantitative analysis of eugenol derivatives in essential oils and cosmetic formulations on human skin using attenuated total reflectance–infrared spectroscopy. *Spectroscopy*, *26*(1), 43–52. <https://doi.org/10.1155/2011/176163>
- Wang, S.-Y., Chen, P.-F., & Chang, S.-T. (2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, *96*(7), 813–818. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.07.010>

Cercetări privind utilizarea unor uleiuri esențiale pentru bioprotecția antifungică a lemnului

- Xie, Y., Wang, Z., Huang, Q., & Zhang, D. (2017). Antifungal activity of several essential oils and major components against wood-rot fungi. *Industrial Crops and Products*, 108, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.041>
- Yang, V. W., & Clausen, C. A. (2007). Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(4), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.09.004>
- Yingprasert, W., Matan, N., Chaowana, P., & Matan, N. (2015). FUNGAL RESISTANCE AND PHYSICO–MECHANICAL PROPERTIES OF CINNAMON OIL- AND CLOVE OIL-TREATED RUBBERWOOD PARTICLEBOARDS. *Journal of Tropical Forest Science*.
- Zabel, R. A., & Morrell, J. J. (2020). *Wood Microbiology Decay and Its Prevention*. Elsevier Academic Press.
- Zhang, Z., Yang, T., Mi, N., Wang, Y., Li, G., Wang, L., & Xie, Y. (2016). Antifungal activity of monoterpenes against wood white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 106, 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.018>
- Zyani, M., Mortabit, D., Abed, S. E., Remmal, A., & Ibsouda, S. (2011). Antifungal activity of Five Plant Essential Oils against wood decay fungi isolated from an old house at the Medina of Fez. *International Research Journal of Microbiology*, 2(3), 104–108.

Rezumat

Teza de doctorat abordează tema bioprotecţiei lemnului în sintagma eficienţă *versus* eco-impact, explorând în acest context oportunităţile şi limitele unor uleiuri esenţiale ca potenţiale soluţii alternative pentru bioprotecţia antifungică a lemnului. Domeniul de aplicabilitate vizat cu precădere este cel al conservării bunurilor de patrimoniu cultural, în care artefactele din lemn/pe suport lemn ocupă un loc important ca pondere, diversitate, semnificaţie, valoare. Rezistenţa limitată la biodegradare a lemnului reprezintă însă un element de vulnerabilitate, iar atacul fungic al lemnului, în condiţii improprii de conservare, reprezintă un factor de degradare agresiv şi un risc semnificativ, pentru a cărui contracarare sunt necesare tratamente preventive şi curative, Teza de doctorat propune, validează şi implementează un concept metodologic şi un protocol analitic care permit testarea şi promovarea responsabilă a unor produse antifungice eficiente şi cu eco-impact redus. Au fost identificate şi testate din punct de vedere al potenţialului biocid antifungic, faţă de ciuperci xilofage de putregai brun şi alb, cinci uleiuri esenţiale (EOs): ulei esenţial de busuioc (B-EO), cuişoare (C-EO), oregano (O-EO), scorţişoară (S-EO) şi cimbru (T-EO). C-EO şi T-EO au fost selectate pentru testarea eficacităţii pe lemn şi evaluarea potenţialului impact ecologic al tratamentelor, prin fitotoxicitatea apelor de spălare a lemnului tratat. Soluţiile de C-EO şi T-EO cu concentraţii de 5% prezintă eficacitate şi impact ecologic acceptabile. Testele preliminare de implementare în conservarea bunurilor de patrimoniu din lemn au demonstrat o eficacitate antifungică cel puţin egală cu a unor produse biocide clasice considerate pentru comparaţie (Diffusit S, Biotin T), precum şi compatibilitatea tratamentelor cu finisare ulterioară cu ceară de albine şi şelac. Rezultatele experimentale obţinute în teză au generat baze de date utile pentru cercetări viitoare.

Abstract

The doctoral thesis addresses the topic of wood bioprotection in terms of efficiency *versus* eco-impact, exploring in this context the opportunities and limits of some essential oils as potential alternative solutions for antifungal bioprotection of wood. The main concerned applicability area is that of the cultural heritage conservation, considering the importance of wooden cultural assets (artefacts) in terms of percentage representation, diversity, significance and value. However, the limited resistance to biodegradation of wood represents an element of vulnerability, while the fungal attack of wood, occurring under inappropriate conservation conditions, represents an aggressive degradation factor and a significant risk, requesting preventive and curative treatments as counteractions. The doctoral thesis proposes, validates and implements a methodological concept and an analytical protocol that allow the testing and responsible promotion of effective antifungal products with low eco-impact. Five essential oils (EOs) were identified and tested for their antifungal potential against xylophagous brown and white rot fungi: basil essential oil (B-EO), clove (C-EO), oregano (O-EO), cinnamon (S-EO) and thyme (T-EO). C-EO and T-EO were selected for further testing their antifungal effectiveness on wood and evaluation of the potential ecological impact of these treatments, by the phytotoxicity of the water leachates from treated wood. The C-EO and T-EO solutions at 5% concentration demonstrated adequate efficacy and low ecological impact. Preliminary implementation tests in the active conservation of wooden heritage goods have demonstrated an antifungal efficacy at least equal to that of some classical biocidal products considered for comparison (Diffusit S, Biotin T), as well as the compatibility of these treatments with subsequent finishing with beeswax and shellac. The experimental research data and results from this thesis have generated useful databases for future research.