

FRANCO PALLA<sup>1</sup>

## Oli essenziali da specie di Lamiaceae nella Conservazione dei Beni Culturali

<sup>1</sup> Università degli Studi di Palermo, Laboratorio di Biologia e Biotecnologie per i Beni Culturali (LaBBBC), Dip. Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche

### INTRODUZIONE

La ricerca scientifica applicata allo studio e alla conservazione dei beni culturali rappresenta una fonte rilevante di innovazioni nel rispetto dei dettami del restauro moderno. In particolare, innovazioni tecnologiche sono state prodotte per la comprensione dei fenomeni di degrado di manufatti d'interesse storico-artistico, per lo studio di materiali antichi e delle tecniche artistiche, per la valutazione di materiali compatibili e metodi di intervento.

Estratti biologicamente attivi (oli essenziali, idroalcolici) sono utilizzati da numerosi decenni in campo alimentare, cosmetico, farmaceutico e medico, per la loro spiccata azione antibatterica, antimicotica, antiossidante, antivirale (Abu-Shanab et al., 2004; Reichling et al., 2009; Raja et al., 2012; Fernandez-Lopes e Viuda-Martos 2018; Popovici et al., 2019). In questo ultimo decennio, proprio la sicurezza ambientale e il ridotto impatto sugli operatori hanno permesso di ipotizzare l'utilizzo di questi prodotti naturali per la conservazione e il restauro sostenibile dei beni culturali (Bakkali et al., 2008; Borrego et al., 2012; Campo et al., 2019; Palla et al., 2020, 2021).

I casi studio presentati in questo elaborato fanno riferimento a estratti da piante della famiglia delle Lamiaceae, che comprende diverse migliaia di specie presenti in numerosi ecosistemi naturali (Harley et al., 2004). In particolare oli essenziali di *Thymus vulgaris* L. e *Origanum vulgare* L., cui l'analisi gas-cromatografica ha evidenziato la presenza di mono-terpeni fenolici, principalmente timolo, carvacrolo, cimene e terpinolo (Klarić et al., 2007; Gavaric et al., 2015; Ebadollahi et al., 2020) sono stati utilizzati per contrastare colonizzazioni batteriche o fungine. Inoltre, oli essenziali di Timo e Origano sono stati utilizzati con successo anche nel contrasto di biofilm anche complessi (Rotolo et al., 2018; Nuță et al., 2021).

Oltre che da Lamiaceae, oli essenziali estratti da Apiaceae, Myrtaceae, Rutaceae, Verbenaceae e Zingiberaceae mostrano una vasta gamma di effetti letali e sub-letali su colonie microbiche, insetti e acari, permettendo la pianificazione di alternative ecologiche ai prodotti chimici di sintesi, come carbammati, piretroidi, organoclorurati e organofosfati (Nerio et al., 2009; Ebadollahi et al., 2021). Numerosi studi scientifici confermano che l'uso di sostanze chimiche di sintesi può dare origine a diversi effetti negativi sull'uomo, animali e ambiente (Arias-Estévez et al., 2008; Hernández et al., 2013, 2017).

Al fine di definire la corretta concentrazione è necessario utilizzare un approccio integrato basato su osservazioni al microscopio (ottico, fluorescenza, elettronico), colture microbiche *in vitro* (Sabouraud e Nutrient agar) e indagini molecolari (analisi di regioni target del DNA genomico microbico) che, oltre a identificare il maggior numero di taxa, permette correlare le specie microbiche ai componenti degli estratti vegetale.

I risultati, in accordo con i numerosi studi sinora pubblicati, confermano che composti naturali possono rappresentare una valida alternativa ai pesticidi chimici di sintesi, generalmente tossici e non degradabili, in grado di persistere a lungo nell'ambiente oltre che in grado di contaminare anche aree lontane dal sito di applicazione.

#### IDENTIFICAZIONE SPECIE MICROBICHE

Per l'identificazione del maggior numero di specie microbiche, coltivabili e non-coltivabili, che colonizzando un manufatto ne inducono il bio-deterioramento è necessario l'utilizzo di un approccio integrato, in cui le colture *in vitro* sono integrate da osservazioni in microscopia ottica ed elettronica, e indagini molecolari basate sull'analisi di specifiche sequenze del DNA genomico microbico.

Colture *in vitro* su terreni agarizzati (Nutrient, Sabouraud) permettono di isolare colonie batteriche e fungine, i cui profili morfologici possono essere osservati mediante analisi microscopica, ricorrendo anche alla colorazione con il reagente di Lugol.

Le indagini molecolari, basate sull'amplificazione *in vitro* (PCR) di specifiche sequenze del genoma microbico (marcatori molecolari ITS), il sequenziamento e l'analisi delle sequenze (piattaforma BLAST) permettono di identificare anche le specie microbiche non-coltivabili. In particolare utilizzando la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR, uno strumento importante per la rapida identificazione di sistemi biologici), specifiche regioni genomiche possono essere amplificate *in vitro*. Dei prodotti di amplificazione è determinata la composizione nucleotidica (sequenziamento) e le relative

analisi di omologia delle sequenze, consultando banche dati nucleotidiche internazionali quali NIH, Stati Uniti ed EMBL, Germania, è possibile eseguire analisi filogenetiche e identificare anche nuove specie microbiche (González e Saiz-Jiménez 2004; Palla e Barresi, 2017; Palla et al., 2019).

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA E APPLICAZIONE DEGLI ESTRATTI VEGETALI

*Saggi in vitro*

La valutazione dell'attività antimicrobica degli estratti vegetali, può essere effettuata *in vitro* mediante Agar-disc diffusion, Well-plate diffusion e Micro-dilution (Balouiri et al., 2016; Barresi et al. 2017).

Nel metodo Agar disc diffusion si ricorre all'utilizzo di un disco di carta (6 mm di diametro), imbibito con 10µl di olio essenziale (a concentrazioni comprese tra il 6,25 e il 100%), posto sulla superficie di agar nutritivo (Nutrienti, Sabouraud) in capsule Petri (90 mm) precedentemente inoculato con un'aliquota di una coltura di singole colonie batteriche o fungine, rispettivamente ad una concentrazione di 1x10<sup>6</sup> CFU/ml o 1x10<sup>4</sup> conidi/ml (Borrego et al., 2012). Dopo incubazione per 24/48 ore a 30°C, si osserva una crescita microbica confluyente, tranne nelle "aree di inibizione della crescita microbica", il cui diametro (mm) permette di definire l'attività antimicrobica di un estratto vegetale nei confronti di una specifica specie microbica (sensibile > 9 mm, resistente < 6 mm); in parallelo sono eseguiti saggi controllo utilizzando biocidi commerciali (Barresi et al., 2015; Rotolo et al., 2018).

AGAR-DISCH DIFFUSION METHOD - DIAMETRO DELL'ALONE DI INIBIZIONE DELLA CRESCITA (MM)						
SOLUZIONE BIOCIDA	CONC (%)	BACILLUS SUBTILIS	MICROCOCCLUS LUTEUS	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	ASPERGILLUS FLAUS	PENICILLIUM CHRYSOGENUM
<i>Benzalconio cloruro</i>	3	2	7.5	14	5.5	4
OE – <i>Origanum vulgare</i>	12.5	25	28	24	11	21
OE – <i>Thymus vulgaris</i>	12.5	41	39	31	9	12.5

Tab. 1 Valutazione *in vitro* dell'attività antimicrobica di oli essenziali di Origano e Timo (12,5%) e del biocida commerciale Benzalconio cloruro (3%) nei confronti di specie batteriche e fungine. Il diametro dell'alone di inibizione corrisponde alla media corrispondente a due saggi/campione. In relazione al diametro degli aloni, l'attività antimicrobica è stata definita positiva ≥ 9 mm; moderata: 6 - 9 mm; Insufficiente ≤ 6mm. Soluzioni di Benzalconio cloruro e di Etanolo sono state utilizzate come controllo

### *Applicazione su manufatti*

La soluzione di olio essenziale non può essere applicata direttamente sulla superficie dei manufatti, ma bensì i manufatti sono esposti alla componente volatile dell'OE. Per fare ciò, *ad hoc* per ciascun manufatto, è costruita una “camera pulita” utilizzando film-barriera termosaldabile sorretto da una struttura tubolare che permetta di adattare la camera pulita alle dimensioni del manufatto. Il film barriera può essere inciso puntualmente e successivamente termosaldato, permettendo così di effettuare specifici campionamenti durante il periodo di esposizione (Palla et al., 2021; Sparacello et al., 2021).

Utilizzato questa metodologia, oli essenziali di Origano e Timo sono utilizzati per contrastare lo sviluppo di colonie fungine e batteriche presenti sulla superficie di sculture lignee (*Aspergillus flavus*) o di manufatti etnoantropologici in pergamena (*Bacillus subtilis*, *Georgenia* sp., *Ornithinibacillus* sp.). Inoltre, considerando l'effetto di repellenza di OE di Lamiaceae (Ebadollahi et al., 2021) di questi oli essenziali sono state utilizzate su teste lignee di pupi siciliani infestate da *Anobium punctatum* De Geer (famiglia Anobiidae).

In un particolare caso studio, una soluzione al 15% di OE di *T. vulgaris* L. è stata utilizzata per bloccare lo sviluppo di un complesso biofilm rivelato al di sotto di tessere del mosaico pavimentale, della Casa di Leda nel Parco Archeologico di Solunto, Palermo (Rotolo et al., 2018).

Il complesso biofilm, rivelato durante le attività di restauro, era presente tra la parte inferiore delle tessere e la malta di allettamento delle stesse, provocandone il distacco. I diversi taxa che componevano il biofilm, riferibili ai generi *Bacillus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, oltre a cianobatteri *Chroococcus* e alghe verdi *Chlorella*, sono stati identificati mediante un approccio polifasico, basato su osservazioni al microscopio ottico, colture microbiche *in vitro* e analisi molecolare (Palla e Barresi, 2017). Considerando la localizzazione del biofilm, la soluzione di olio essenziale è stata direttamente iniettata mediante siringa e ago, inserito tra gli interstizi delle tessere. Dopo sette giorni è stato riscontrato che la soluzione di Timo, diffondendosi concentricamente dal punto di iniezione, ha fortemente influenzato la vitalità con il biofilm che ne è venuto a contatto. Ciò si evince dalla figura 1, in cui solo la parte del biofilm non raggiunta dalla soluzione di OE presenta una colorazione vitale (verde), vitalità confermata dall'osservazione al microscopio in fluorescenza (Leica DMR-40).



Fig. 1 Tessere del mosaico dopo trattamento con soluzione al 15% di OE di *T. vulgaris*, che diffondendosi in direzione concentrica rispetto al punto di ingresso (OE) evidenzia una perdita di vitalità del biofilm, tranne nell'area evidenziata in alto a sinistra, in cui il biofilm presenta ancora una colorazione verde

### *Implementazione dell'efficienza antimicrobica*

Al fine di implementare l'efficienza antimicrobica o di ridurre i tempi di esposizione, sono state definite due diverse metodologie.

In una, l'esposizione ai vapori dell'OE di *T. vulgaris* (eseguita in camera pulita realizzata con film barriera) è preceduta dall'applicazione del corrispondente estratto idro-alcolico sulla superficie di un manufatto ligneo, colonizzato da microrganismi dei generi *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Micrococcus*.

Nell'altra, l'esposizione di manufatti in pelle alla componente volatile dell'OE di *T. vulgaris* è stata eseguita in condizioni di vuoto (utilizzando una pompa a diaframma e una camera pulita in plexiglass), per contrastare sia la colonizzazione batterica (*Bacillus* sp., *Georgenia* sp., *Ornithinibacillus* sp. e *Streptomyces* sp.) sia fungina (*Aspergillus* sp); i risultati mostrano che in condi-

zioni di vuoto i tempi di esposizione posso essere notevolmente ridotti (D'A-gostino et al., 2021).

Indipendentemente dalla metodologia, durante tutto il periodo di esposizione (4-7 settimane) alle componenti volatili degli oli essenziali (mantenendo satura l'atmosfera interna della camera), i parametri termo-igrometrici (Temp=22+2°C, U.R.=56+3%) esterni e interni alla camera d'esposizione sono stati monitorati in continuo.

L'analisi della composizione chimica degli oli essenziali di Origano e Timo e dell'estratto idro-alcologico di Timo è stata eseguita ricorrendo alla tecnica Gas Cromatografia – Spettrometria di massa. (Adams, 2007). I composti fenolici, quali carvacrolo e timolo, *p*-cymene e  *$\alpha$* -pinene, sono risultati i principali.

## CONCLUSIONI

I molteplici progressi delle biotecnologie e microbiologia applicata forniscono da alcuni anni strategie innovative per la conservazione sostenibile del patrimonio culturale.

I risultati di numerosi studi scientifici mostrano che molecole bioattive estratte da matrici vegetali possono rappresentare una valida alternativa ai pesticidi chimici di sintesi generalmente tossici, non degradabili e persistenti a lungo nell'ambiente, oltre che in grado di contaminare anche aree lontane dal sito di applicazione (Arias-Estévez et al., 2008; Hernández et al., 2013,2017).

Gli estratti da piante aromatiche sono costituiti da miscele complesse di terpeni, componenti aromatici e alifatici e, a parte alcune eccezioni, non mostrano tossicità per gli animali omeotermi e sono generalmente riconosciuti come sicuri dall'*Environmental Protection Agency* e dalla *Food and Drug Administration*, USA (Burt, 2004), possono rappresentare una generazione di biocidi *green* che adeguatamente incapsulati o con un rilascio controllato, possono persistere più a lungo nell'ambiente con effetti negativi molto ridotti o pari a zero.

Infine ma non ultimo, è lo sviluppo di sistemi per la diffusione a freddo di oli essenziali al fine di migliorare la qualità dell'aria in ambienti indoor utilizzati per l'esposizione/conservazione del patrimonio culturale (Díaz-Alonso et al., 2021).

## RIASSUNTO

Per la definizione di strategie per la conservazione sostenibile del patrimonio culturale, trovano sempre maggiore applicazione prodotti naturali, quali gli oli essenziali o estratti

idro-alcologici da matrici vegetali. In questo decennio oli essenziali (OE) contenenti miscele complesse di composti aromatici con attività antimicrobica (o repellenza di insetti), sono stati utilizzati nell'industria alimentare, cosmetica, farmaceutica e medica. Considerando l'attività antimicrobica, la eco-compatibilità e bassa tossicità, oli essenziali ed estratti idroalcolico da piante della famiglia delle Lamiaceae, sono stati utilizzati in progetti di conservazione preventiva di manufatti d'interesse storico artistico. In particolare estratti di *Thymus vulgaris* L. e *Origanum vulgare* L., la cui attività antimicrobica è preliminarmente saggiata *in vitro* (metodi Well plate diffusion e Agar disc diffusion), sono utilizzati per contrastare colonizzazioni microbiche o lo sviluppo di biofilm. Al fine di definire l'adeguata concentrazione di prodotto correlandola a generi/specie microbiche, l'identificazione dei taxa è eseguita ricorrendo ad un approccio polifasico basato su analisi morfologica (microscopia ottica), colture *in vitro* su terreni agarizzati (Nutrient o Sabouraud) e indagini molecolari (analisi del DNA microbico genomico, sequenziamento e analisi delle sequenze). L'azione antimicrobica di oli essenziali di Timo e Origano è stata valutata nei confronti di colonie fungine e batteriche, oltre che di un complesso biofilm. Inoltre è stata valutata l'azione repellente in sculture lignee infestate da *Anobium punctatum* De Geer. La possibile implementazione dell'azione antimicrobica dell'olio essenziale di *T. vulgaris*, è stata valutata combinando l'applicazione dell'estratto idro-alcologico sulla superficie di una scultura lignea con la successiva esposizione alle componenti volatili dell'olio essenziale, oppure eseguendo l'esposizione in condizioni controllate di vuoto. Questi studi confermano il possibile utilizzo di estratti da piante aromatiche come valida alternativa ai biocidi chimici di sintesi utilizzati nel campo del restauro, in quanto rispettosi della salute degli operatori e dell'ambiente. I risultati forniscono utili informazioni per la definizione di protocolli "green" standardizzati.

#### ABSTRACT

In sustainable conservation strategies for cultural heritage, natural products are increasingly used, such as essential oils or hydro-alcoholic extracts from plant. In this decade essential oils (EOs) containing complex mixtures of aromatic compounds with antimicrobial (or insect repellent) activity, have been used in the food, cosmetic, pharmaceutical and medical industries. Considering the antimicrobial activity, eco-compatibility and low toxicity, essential oils and hydro-alcoholic extracts from plants of the Lamiaceae family, have been used in preventive conservation of cultural assets. In particular, extracts of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L., whose antimicrobial activity is preliminarily tested *in vitro* (Well plate diffusion and Agar disc diffusion methods), are used to counteract microbial colonization or development of biofilms. In order to define the adequate concentration of the product correlating it to genera/microbial species, the identification of taxa is performed using an polyphasic approach based on morphological analysis (Optical microscopy), *in vitro* cultures on agar media (Nutrient or Sabouraud) and molecular investigations (genomic microbial DNA analysis, sequencing and sequence analysis). The antimicrobial action of Thyme and Oregano essential oils was evaluated against fungal and bacterial colonies, as well as a complex biofilm. The repellent action in wooden sculptures infested with *Anobium punctatum* De Geer was also evaluated. The possible implementation of the antimicrobial action of *T. vulgaris* essential oil was evaluated by combining the application of the corresponding alcoholic extract on the



surface of a wooden sculpture with the subsequent exposure to the volatile components of the essential oil, or performing exposure under controlled vacuum conditions. These studies confirm the possible use of extracts from aromatic plants as a valid alternative to synthetic chemical biocides used in the field of conservation/restoration, as they respect the health of operators and the environment. The results provide useful information for the definition of standardized "green" protocols.

## BIBLIOGRAFIA

- ABU-SHANAB B., ADWAN G., ABU-SAFIYA D., JARRAR N., ADWAN K. (2004): *Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine*, «Turk. J. Biol.», 28, pp. 99-102.
- ADAMS R.P. (2007): *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*, 4th ed., Allured, Publishing: Carol Stream, IL, USA.
- ARIAS-ESTÉVEZ M., LÓPEZ-PERAGO E., MARTINEZ-CARBALLO E., SIMAL-GANDARA J., JUAN-MEJUTO J.C., GARCIA-RIO L. (2008): *The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources*, «Agric. Ecosyst. Environ.», 123, pp. 247-260.
- BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBACK D., IDAOMAR M. (2008): *Biological effects of essential oils - A review*, «Food Chem. Toxicol.», 46, pp. 446-475.
- BALOURI M., SADIKI M., IBNSOUDA S.K. (2016): *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review*, «J Pharm Anal.», 6 (2), pp. 71-79.
- BARRESI G., DI CARLO E., TRAPANI M.R., PARISI M.G., CHILLÈ C., MULÈ M.F., CAMMARATA M., PALLA F. (2015): *Marine organisms as source of bioactive molecules applied in restoration projects*, «Heritage Science», 3, 17.
- BARRESI G., CAMMARATA M., PALLA F. (2017): *Biocides*, in Palla F. & Barresi G. (eds), *Biotechnology and Conservation of Cultural Heritage*, Springer Intern. Publishing Switzerland, pp. 49-65.
- BORREGO S., VALDÉS O., VIVAR I. ET AL. (2012): *Essential oils of plants as biocides against microorganisms isolated from Cuban and Argentine documentary heritage*, «Intern. Scholarly Res.», Network ISRN Microbiol., 1-7.
- BURT S. (2004): *Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. A review*, «Int. J. Food Microbiol.», 94, pp. 223-253.
- CAMPOS E.V.R., PROENÇA P.L.F., OLIVEIRA J.L. (2019): *Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives*, «Ecological Indicators», 105, pp. 483-495.
- DÍAZ-ALONSO J., BERNARDOS A., REGIDOR-ROS J.L., MARTÍNEZ-MANEZ R., BOSCH-ROIG P. (2021): *Innovative use of essential oil cold diffusion system for improving air quality on indoor cultural heritage spaces*, «International Biodeterioration & Biodegradation», 162, 105251.
- FERNANDEZ-LOPES J., VIUDA-MARTOS M. (2018): *Application of essential oils in food systems*, «Foods», 7, pp. 1-4.
- EBADOLLAHI A., ZIAEE M., PALLA F. (2020): *Essential oils extracted from different species of the Lamiaceae plant family as prospective bioagents against several detrimental pests*, «Molecules», 25, 1556.
- GAVARIC N., MOZINA S.S., KLADAR N., BOZIN B. (2015): *Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of Thyme and Oregano essential oils, Thymol and Carvacrol and their possible synergism*, «J. Essent. Oil Bear. Plants», 18, pp. 1013-1021.



- GONZÁLEZ J.M., SAIZ-JIMÉNEZ C. (2004): *Microbial diversity in biodeteriorated monuments as studied by denaturing gradient gel electrophoresis*, «J. Sep. Sci.», 27 (3), pp. 174-180.
- HARLEY R.M., ATKINS S., BUDANTSEV A.L., CANTINO P.D., CONN B.J., GRAYER R.J., HARLEY M.M., DE KOK P.J., KRESTOVSKAJA T.V., MORALES R. (2004): *Labiatae*, in the *Families and Genera of Vascular Plants*, 1st ed., Kubitzki K., Kadereit J.W., Eds., Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, Volume 7, pp. 167-275.
- HERNÁNDEZ A.F., PARRON T., TSATSAKIS M.A., REQUENA M., ALARCÓN R., LÓPEZ-GUARNIDO O. (2013): *Toxic effects of pesticide mixtures at molecular level: Their relevance to human health*, «Toxicology», 307, pp. 136-145.
- HERNÁNDEZ A.F., GIL F., LACASAGÑA M. (2017): *Toxicological interactions of pesticide mixtures: An update*, «Arch. Toxicol.», 91, pp. 3211-3223.
- KLARIĆ M.Š., KOSALEĆ I., MASTELIĆ J., PIECKOV E., PEPELJNAK S. (2007): *Antifungal activity of thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings*, «Lett. Appl. Microbiol.», 44, pp. 36-42.
- NERIO L.S., OLIVERO-VERBEL J., STASHENKO E. (2009): *Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera)*, «J. Stored Prod. Res.», 45 (3), pp. 212-214.
- NUȚĂ D.C., LIMBAN C., IONIȚĂ C.C., NICOLAU I., ZARAFU I. (2021): *The Use of Essential Oils as a Strategy to Combat Microbial Biofilms. A Review*, «Processes», 9, 537.
- PALLA F. & BARRESI G. (2017): *Biotechnology for Conservation of Cultural Heritage*, Springer Life Science, the Netherland.
- PALLA F., ROTOLO V., GIORDANO A. (2019): *Biotechnology a source of knowledge in agreement with green strategies for the conservation of cultural assets*, «Cons. Sci. in Cultural Heritage», 19, pp. 69-80.
- PALLA F., BRUNO M., MERCURIO F. ET AL. (2020): *Essential oil as natural biocides in conservation of cultural heritage*, «Molecules», 25, 730.
- PALLA F., CARUANA E., DI CARLO E., ROTOLO V. (2021): *Plant essential oils in controlling fungal colonization on wooden substrate*, «Borziana», 2, pp. 5-14.
- POPOVICI R.A., VADUVA D.A., PINZARU I., DEHELEAN C.A., FARCAS C.G., CORICOVAC D., DANCIU C., POPESCU I., ALEXA E., LAZUREANU V. (2019): *A comparative study on the biological activity of essential oil and total hydro-alcoholic extract of Satureja hortensis L.*, «Exp. Ther. Med.», 18, pp. 932-942.
- RAJA R.R. (2012): *Medicinally potential of plant of Labiatae (Lamiaceae) family: An overview*, «Res. J. Med. Plants», 9, pp. 203-213.
- REICHLING J., SCHNITZLER P., SUSCHKE U., SALLER R. (2009): *Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral and cytotoxic properties. An overview*, «Complementary Med. Res.», 16, pp. 79-90.
- ROTOLO V., DE CARO M.L., GIORDANO A., PALLA F. (2018): *Solunto archaeological park in Sicily: Life under tesserae*, «Flora Medit.», 28, pp. 233-245.
- SAAD N., MULLER C.D.; LOBSTEIN A. (2013): *Major bioactivities and mechanism of action of essential oil and their components*, «Fragance & Flavours J.», 28, pp. 269-279.
- SPARACELLO S., GALLO G., FADDETTA T., MEGNA B., NICOTRA G., BRUNO B., GIAMBRA B., PALLA F. (2021): *Thymus vulgaris Essential Oil and Hydro-Alcoholic Solutions to Counteract Wooden Artwork*, «Microbial Colonization», 11, 8704.