



Essential oils for wood preservation via a Box-Behnken experimental design

Uso de aceites esenciales en la preservación de madera mediante el diseño experimental Box-Behnken

Wuilver E. García-Reynoso¹; Carlos A. Urtis-Flores¹;
Mauro M. Martínez-Pacheco²; Mayra I. Carrillo-Gómez³;
Crisanto Velázquez-Becerra^{1*}

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Ingeniería y Tecnología de la Madera. Calle de Santiago Tapia 403, col. Centro. C. P. 58000. Morelia, Michoacán, México.

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Calle de Santiago Tapia 403, col. Centro. C. P. 58000. Morelia, Michoacán, México.

³Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Arquitectura. Calle de Santiago Tapia 403, col. Centro. C. P. 58000. Morelia, Michoacán, México.

*Corresponding author: cvelazquez@umich.mx

Abstract

Introduction. Wood is highly susceptible to damage by microbial agents, such as wood-decay fungi. Consequently, the industry has strived to keep wooden structures in mechanically stable conditions; however, environmental contamination and the social responsibility to minimize risks to human health have driven the search for new preservation strategies.

Objective. To define the conditions under which essential oils from *Syzygium* sp. and *Citrus* sp. preserve *Pinus* sp. Wood against damage by *Trametes versicolor* and *Gloeophyllum trabeum* using a Box-Behnken experimental design.

Materials and methods. The experiment was designed with three factors: *Syzygium* sp. essential oil (SEO), *Citrus* sp. essential oil (CEO), and time (6, 9 and 12 months), each with three levels -1, 0 and +1. The response variable was parallel-to-grain compression of *Pinus* sp. wood specimens, measured according to ISO 3345.

Results. *Pinus* wood exposed to the evaluated wood-decay fungi requires a concentration of 6.25 % SEO and 6.25 % CEO to maintain a standard parallel-to-grain compression strength of 355.5 kg·cm⁻². This preservative effect is expected to last between 8.4 and 8.7 months, depending on the fungal agent.

Conclusion. Essential oils from *Syzygium* sp. and *Citrus* sp. are promising candidates for use as wood preservatives. The inhibitory effect of naturally derived chemical compounds against wood-deteriorating organisms represents important scientific progress toward the adoption of environmentally friendly technologies.

Keywords: parallel-to-grain compression, *Citrus* sp., *Gloeophyllum trabeum*, *Syzygium* sp., *Trametes versicolor*.

Resumen

Introducción. La madera es altamente susceptible al daño por agentes microbianos como los hongos xilófagos. Por ello, la industria se ha esforzado por mantener las estructuras de madera en condiciones mecánicamente funcionales; sin embargo, la contaminación ambiental y la responsabilidad social para minimizar los riesgos a la salud humana han obligado a la búsqueda de nuevas estrategias.

Objetivo. Definir las condiciones en las cuales los aceites esenciales de *Syzygium* sp. y *Citrus* sp. preservan la madera de *Pinus* sp. ante el daño por *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum* mediante el diseño experimental Box-Behnken.

Materiales y métodos. El experimento se diseñó con tres factores: aceite esencial de *Syzygium* sp. (AES), aceite esencial de *Citrus* sp. (AEC) y tiempo (6, 9 y 12 meses), así como tres niveles por factor -1, 0 y +1. La variable de respuesta fue la compresión paralela en probetas (ISO 3345) de madera de *Pinus* sp.

Resultados. La madera de pino, expuesta a los hongos xilófagos evaluados, requiere una concentración de 6.25 % de AES y 6.25 % de AEC con el fin de mantener una resistencia estándar de 355.5 kg·cm⁻² en compresión paralela. Este efecto preservante perduraría entre los 8.4 y 8.7 meses según el agente xilófago.

Conclusión. Los aceites esenciales de *Syzygium* sp. y *Citrus* sp. son candidatos para ser empleados como preservantes de la madera. El efecto inhibitorio de sustancias químicas de origen natural contra organismos del deterioro de la madera es importante en el avance científico para migrar a tecnologías amigables con nuestro entorno.

Palabras clave: compresión paralela, *Citrus* sp., *Gloeophyllum trabeum*, *Syzygium* sp., *Trametes versicolor*.

Please cite this article as follows (APA 7): García-Reynoso, W. E., Urtis-Flores, C. A., Martínez-Pacheco, M. M., Carrillo-Gómez, M. I., & Velázquez-Becerra, C. (2026). Essential oils for wood preservation via a Box-Behnken experimental design. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 32, e25003. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2025.01.003>



Introduction

Understanding the chemical, mechanical, anatomical, and physical properties of wood is essential to ensure its efficient and responsible use (Ramage et al., 2017; Rodríguez-Anda et al., 2015). Mechanical strength values are particularly important in applications such as construction and the manufacture of products subjected to mechanical stresses. As an organic and renewable material, wood plays a significant role in the construction and furniture sector; however, one of the most serious limitations to the use of this material and its by-products is its susceptibility to degradation by biological agents, including fungi, bacteria, and termites (Goodell et al., 2020; Marais et al., 2020; Witomski et al., 2016).

Wood-decay fungi are the primary degraders of lignocellulose, as they assimilate some of the most recalcitrant organic polymers, a capacity largely attributed to their highly adaptive lifestyle (Kracher & Ludwing, 2016). The physical and chemical stability of lignocellulose requires fungi to synthesize extensive enzymatic systems to degrade wood. Basidiomycetes that rapidly metabolize cellulose and hemicellulose while minimally modifying lignin are known as brown-rot fungi (Zhu et al., 2020); examples of these include *Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana* and *Postia placenta*. In contrast, white-rot fungi such as *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* and *Trametes versicolor* can decompose all lignocellulosic components (lignin, cellulose, and hemicellulose). White-rot fungi degrade lignin more efficiently than brown-rot fungi because they possess a unique ability to fully mineralize it to CO₂ (Andlar et al., 2018; Goodell et al., 2020; Marais et al., 2020; Witomski et al., 2016).

Chemical processing (such as furfurylation or acetylation), thermal modification, and impregnation with chemical agents (Hunt et al., 2018; Sandberg et al., 2017) are methods and techniques used to extend the service life of wood and wood-derived products. Wood preservatives are fungistatic or fungitoxic chemicals, including oil-based products such as pentachlorophenol or creosote, which are still used industrially for wood with limited human contact, and water-based products such as chromated copper arsenate; however, the latter is a restricted chemical in most countries due to potential environmental and animal health risks (Morais et al., 2021; Zelinka et al., 2022). Environmental and health restrictions on traditional wood preservatives have driven the search for alternatives to extend the lifespan of this biomaterial. The use of natural substances, such as essential oils or extracts derived from various plant structures, show biological activity and is of interest

Introducción

El conocimiento de las características y propiedades químicas, mecánicas, anatómicas y físicas de la madera es indispensable para garantizar su uso racional y eficiente (Ramage et al., 2017; Rodríguez-Anda et al., 2015). Los valores de resistencia mecánica son importantes en aplicaciones como la construcción y elaboración de productos sujetos a esfuerzos mecánicos. La madera como material orgánico y renovable es importante en los campos de la construcción y el mueble; sin embargo, uno de los problemas más graves que limita el uso de este material y sus productos secundarios es la susceptibilidad a la degradación por agentes biológicos, incluidos hongos, bacterias y termitas (Goodell et al., 2020; Marais et al., 2020; Witomski et al., 2016).

Los hongos xilófagos son los principales organismos degradadores de lignocelulosa, ya que asimilan los polímeros orgánicos más recalcitrantes, lo que se atribuye principalmente a su estilo de vida altamente adaptativo (Kracher & Ludwing, 2016). La estabilidad física y química de la lignocelulosa hace que los hongos sintetizen grandes conjuntos de enzimas para degradar la madera. Los basidiomicetos que metabolizan rápidamente la celulosa y la hemicelulosa, mientras que solo modifican ligeramente la lignina, se les conoce como hongos de pudrición parda (Zhu et al., 2020); ejemplo de estos son *Gloeophyllum trabeum*, *Coniophora puteana* y *Postia placenta*. En cambio, los hongos de pudrición blanca como *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Trametes versicolor* son capaces de descomponer todos los constituyentes de la lignocelulosa (lignina, celulosa y hemicelulosa). Los hongos de pudrición blanca degradan la lignina de forma más eficaz que los hongos de pudrición parda, ya que poseen una capacidad única para su completa mineralización a CO₂ (Andlar et al., 2018; Goodell et al., 2020; Marais et al., 2020; Witomski et al., 2016).

El procesamiento químico (furfurilación o acetilación), la modificación térmica o la impregnación con sustancias químicas (Hunt et al., 2018; Sandberg et al., 2017) son métodos y técnicas que se aplican para prolongar la vida útil de la madera y los productos derivados. Los preservantes de la madera son productos químicos fungistáticos o fungitóxicos, incluidos los hechos a base de aceite como el pentaclorofenol o creosota, que aún se utilizan a nivel industrial en madera que estará en contacto limitado con los seres humanos, y los elaborados a base de agua como el arseniato de cobre cromatado; sin embargo, este es un producto químico restringido en la mayoría de los países, debido a los posibles riesgos ambientales y de salud animal (Morais et al., 2021; Zelinka et al., 2022). Las restricciones

in the development of new wood preservatives that are environmentally friendly and safe for human health (Ohgami et al., 2015; Wozniak, 2022).

Essential oils are complex mixtures of volatile secondary metabolites that perform diverse functions, including the protection of plants against pathogens and environmental stress. Terpenes and terpenoids are the principal chemical compounds of essential oils (Broda, 2020; Isah, 2019; Pang et al., 2021; Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Monoterpenes account for approximately 90 % of essential oils; among the most prominent are limonene, α -pineno and α -terpineno. Terpenoids are terpene-related compounds that contain oxygenated functional groups or structural rearrangements; thymol, carvacrol, and geraniol are among the most widely recognized (Nazzaro et al., 2017). Essential oils show antifungal properties against wood-decaying fungi; for example, the essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry inhibits the growth of *G. trabeum*, *T. versicolor* and *Laetioporus sulphureus*, while the essential oil of *Thymus vulgaris* L. retards the growth of *G. trabeum*, *T. versicolor* and *T. hirsuta* (Elshafie et al., 2015; Yen & Chang, 2008).

The objective of this study was to determine the concentrations at which clove (*Syzygium* sp.) and lemon (*Citrus* sp.) essential oils can preserve wood from damage caused by *T. versicolor* and *G. trabeum*, using a Box-Behnken experimental design. The application of this model has proven to be an important strategy for the optimization of experimental designs; for example, in optimizing microbial growth, lipase production by filamentous fungi (Demeriel et al., 2022; Zhang et al., 2017), establishing parameters or conditions for the remediation of contaminated soils intended for agricultural use (Dbik et al., 2022), as well as in the mycosynthesis of silver nanoparticles (Barabadi et al., 2019). The implementation of experimental designs such as the Box-Behnken models is considered reliable and promising for defining the effective range of preservative compound mixtures (essential oils) for wood within emerging fields such as green chemistry (Pizzi, 2016). This contributes to the development of technologies and strategies for the preservation of wood and its derivatives, facilitating the gradual replacement of compounds that are toxic to the environment and human health (Vani et al., 2022).

Materials and methods

Study material

The fungi *Gloeophyllum trabeum* (strain BAM Ebw 109, GenBank ID: EF524032.1) and *Trametes versicolor* (strain CTB-863 A, GenBank ID: EF524040.1) were provided by

medioambientales y sanitarias de los preservantes tradicionales para madera conducen a la búsqueda de alternativas para extender la vida útil del biomaterial. El uso de sustancias naturales como los aceites esenciales o extractos obtenidos de diversas estructuras vegetales presentan efecto biológico y resultan de interés en el desarrollo de nuevos preservantes de la madera que sean respetuosos con el medio ambiente y la salud humana (Ohgami et al., 2015; Wozniak, 2022).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de metabolitos secundarios volátiles que desempeñan diversas funciones, incluida la protección de las plantas contra los patógenos y el estrés ambiental. Los terpenos y terpenoides son los principales compuestos químicos de los aceites esenciales (Broda, 2020; Isah, 2019; Pang et al., 2021; Tongnuanchan & Benjakul, 2014). Los monoterpenos constituyen 90 % de los aceites esenciales, entre los principales se encuentran el limoneno, α -pineno y α -terpineno. Los terpenoides son compuestos relacionados con los terpenos, con alguna funcionalidad de oxígeno o reordenamiento estructural: el timol, carvacrol y geraniol son los más conocidos (Nazzaro et al., 2017). Los aceites esenciales exhiben propiedades antifúngicas contra hongos xilófagos; por ejemplo, el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry inhibe el crecimiento de los hongos *G. trabeum*, *T. versicolor* y *Laetioporus sulphureus*, y el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. ralentiza el crecimiento de *G. trabeum*, *T. versicolor* y *T. hirsuta* (Elshafie et al., 2015; Yen & Chang, 2008).

El objetivo de este estudio fue determinar las concentraciones en las cuales los aceites esenciales de clavo (*Syzygium* sp.) y limón (*Citrus* sp.) puedan preservar la madera del daño ocasionado por *T. versicolor* y *G. trabeum*, utilizando el diseño experimental Box-Behnken. El uso de este modelo ha resultado una estrategia importante para la optimización de diseños experimentales; por ejemplo, en la optimización del crecimiento microbiano, producción de lipasa por hongos filamentosos (Demeriel et al., 2022; Zhang et al., 2017), establecimiento de parámetros o condiciones para la limpieza de suelos contaminados destinados a la agricultura (Dbik et al., 2022), así como en la micosíntesis de nanopartículas de plata (Barabadi et al., 2019). La implementación de diseños experimentales como el modelo Box-Behnken resultan confiables y prometedores para establecer el alcance de mezclas de compuestos preservantes (aceites esenciales) para la madera en áreas emergentes como la química verde (Pizzi, 2016). Esto contribuye a la generación de tecnologías y estrategias para la preservación de la madera y sus derivados en sustitución paulatina de compuestos tóxicos para el medio ambiente y la salud humana (Vani et al., 2022).

the Department of Wood, Cellulose, and Paper (DMCyP in Spanish) at the University of Guadalajara. *Pinus* sp. wood was obtained from a sawmill operating under forest management practices in San Miguel del Monte, Morelia, Michoacán, Mexico (longitude: -101.134167, latitude: 19.620278, elevation: 2140 m). Aliquots of the evaluated essential oils (*Syzygium* sp. and *Citrus* sp.) were obtained from local industry and diluted with soybean oil. The chemical composition of the clove and lemon essential oils was determined by Martínez-Pacheco et al. (2022).

Sensitivity of wood-decaying fungi to essential oils

The inhibitory concentration of essential oils from SEO (*Syzygium* sp.) and CEO (*Citrus* sp.) was determined using the disk diffusion method. Five concentrations were evaluated: 10, 5, 2.5, 1 and 0.5 %. The essential oils were diluted in soybean oil as a vehicle (v/v) until required concentrations. Petri dishes (60 mm x 15 mm) containing potato dextrose agar (Bioxon®) supplemented with an antibiotic (amikacin 1 g·L⁻¹) to prevent bacterial contamination were used. Sterile filter paper discs (5 mm in diameter) impregnated with 6 µL of each essential oil concentration were placed on the agar surface. Fungal propagules (125 mm³) of *G. trabeum* (strain BAM Ebw 109, GenBank ID: EF524032.1) and *T. versicolor* (strain CTB-863 A, GenBank ID: EF524040.1) were then placed on the discs. The plates were sealed and incubated at 25 °C. The inhibitory effect was assessed after 120 h. Photographs of each sample were taken and analyzed using Photoshop software (version 21.0.3). The inhibitory effect was calculated using the expression: $IC = Ct / Cc$; where IC is the growth index, Ct is the growth area of the treatment (cm²) and Cc is the growth area of the control (cm²). An IC value equal to 1 indicates no effect of the treatment on the microorganism; IC > 1 indicates that the treatment promotes microbial growth; and IC < 1 indicates that the treatment inhibits microbial growth.

Box-Behnken experimental design

Based on the results of the previous assay, a Box-Behnken experimental design was conducted with three study factors: 1) time, 2) CEO concentration, and 3) SEO concentration, each evaluated at three levels (Table 1):

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$$

where, y is the predicted response; β_0 is the model constant; x_1 , x_2 and x_3 are the independent variables; β_1 , β_2 and β_3 are the linear coefficients; β_{12} , β_{13} and β_{23} are the interaction (cross-product) coefficients; and β_{11} , β_{22} and β_{33} are the quadratic coefficients.

The Box-Behnken experimental design for three factors consisted of 12 fractional treatments and three center

Materiales y métodos

Material de estudio

Los hongos *Gloeophyllum trabeum* (cepa BAM Ebw 109, ID GenBank: EF524032.1) y *Trametes versicolor* (cepa CTB-863 A, ID GenBank: EF524040.1) fueron proporcionados por el Departamento de Madera Celulosa y Papel (DMCyP) de la Universidad de Guadalajara. La madera de *Pinus* sp. se adquirió de un aserradero con manejo forestal en San Miguel del Monte, Morelia, Michoacán, México (longitud: -101.134167, latitud: 19.620278, altitud: 2140 m). Las alícuotas de los aceites esenciales evaluados (*Syzygium* sp. y *Citrus* sp.) se obtuvieron de la industria local y se diluyeron con aceite de soya. La composición de los aceites esenciales de clavo y limón fue identificada por Martínez-Pacheco et al. (2022).

Sensibilidad de hongos xilófagos a los aceites esenciales

La concentración inhibitoria de los aceites esenciales de AES (*Syzygium* sp.) y AEC (*Citrus* sp.) se determinó por el método de difusión en disco. Se evaluaron cinco concentraciones: 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 %, para lo cual, los aceites esenciales se diluyeron en aceite de soya como vehículo (v/v) hasta obtener las concentraciones requeridas. Posteriormente, se utilizó el sistema de placas de Petri de 60 mm x 15 mm que contenían medio de crecimiento agar papa dextrosa (Bioxon®) adicionado con antibiótico (Amikacina 1 g·L⁻¹) para el control de bacterias. En las placas se colocaron discos de papel filtro estériles de 5 mm de diámetro impregnados con 6 µL de las concentraciones de aceites esenciales, sobre los que se colocaron propágulos de 125 mm³ de los hongos *G. trabeum* (cepa BAM Ebw 109, ID GenBank: EF524032.1) y *T. versicolor* (cepa CTB-863 A, ID GenBank: EF524040.1). Las placas se sellaron y colocaron en incubación a 25 °C. El efecto inhibitorio se determinó a las 120 h, se tomaron fotografías de cada muestra y se procesaron con el software Photoshop versión 21.0.3. El efecto inhibitorio se determinó mediante la expresión: $IC = Ct / Cc$; donde, IC es el índice de crecimiento, Ct es el área del crecimiento del tratamiento (cm²) y Cc es el área del crecimiento del control (cm²). Un IC igual a 1 significa que no hay efecto del tratamiento sobre el microorganismo, IC > 1 indica que el tratamiento promueve el crecimiento del microorganismo y un IC < 1 significa que el tratamiento inhibe al microorganismo.

Diseño experimental Box-Behnken

Con base en los resultados del ensayo anterior se realizó el diseño experimental Box-Behnken con tres factores de estudio: 1) tiempo, 2) concentración de AEC y 3) concentración de AES, con tres niveles por factor (Cuadro 1):

Table 1. Factors and levels selected in the Box-Behnken experimental design to define the conditions at which essential oils from *Syzygium* sp. (SEO) and *Citrus* sp. (CEO) protect *Pinus* sp. wood against damage caused by *Trametes versicolor* and *Gloeophyllum trabeum*.

Cuadro 1. Factores y niveles seleccionados en el diseño experimental Box-Behnken para definir las condiciones en las cuales los aceites esenciales de *Syzygium* sp. (AES) y *Citrus* sp. (AEC) preservan la madera de *Pinus* sp. ante el daño por *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*.

Control factors / Factores de control	-1	0	+1
SEO [%]/AES [%]	2.5	5	10
CEO [%]/AEC [%]	2.5	5	10
Time (months)/Tiempo (meses)	6	9	12

points, generating a total of 15 treatments, which were replicated twice, using $n = 5$ per treatment (Table 2). The treatments were randomized to avoid biased results during implementation of the design. The quantified response variable was compressive strength parallel to the grain.

Preparation of *Pinus* sp. test specimens

In accordance with ISO 3345 (International Organization for Standardization [ISO], 2019), 480 *Pinus* sp. wood specimens with dimensions of 20 mm x 20 mm x 60 mm were prepared. The specimens were sterilized in an autoclave (AESA model CV-300) at 15 lb of pressure and 121 °C for 30 min; subsequently, they were treated by immersion for 24 hours in soybean oil (Member's Mark®), essential oil solutions (Table 1), or a control treatment with 2 % chromated copper arsenate (Pro-MADERA®). The saturated specimens were then removed from the preservative solutions and dried at 30 °C until constant weight (OHAUS model Adventurer®-Pro AV213); with measurements taken at 24-hour intervals.

Wood-fungus interaction bioassay

The wood-fungus interaction bioassay was conducted on the previously treated specimens using a variation of the soil-block test system. Plastic containers with a capacity of 3 L were filled with a substrate consisting of 50 % pine-oak forest soil (NUTRIGARDEN®) and 50 % horticultural-grade vermiculite (ACCIMIN®), which was previously sterilized in an autoclave (AESA model CV-300) at 15 lb of pressure and 121 °C for 30 min. Fungal suspensions were prepared separately in 1 L of sterile distilled water, and the concentration was adjusted to 10^6 CFU·mL⁻¹ using a spectrophotometer (Thermo Scientific model Multiskan GO) at 530 nm. The pretreated wood specimens were inoculated by immersion in the respective fungal suspensions of *G. trabeum* (strain BAM Ebw 109, GenBank ID: EF524032.1) and *T. versicolor* (strain CTB-863 A, GenBank ID: EF524040.1) and incubated for 12 months in a dark

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$$

donde, y es la respuesta predictiva; β_0 es la constante del modelo; x_1 , x_2 y x_3 son las variables independientes; β_1 , β_2 y β_3 son los coeficientes lineales; β_{12} , β_{13} y β_{23} son los coeficientes de los productos cruzados y β_{11} , β_{22} y β_{33} son los coeficientes cuadráticos.

El diseño experimental Box-Behnken para tres factores constó de 12 tratamientos fraccionarios y tres centrales, generando 15 tratamientos en total, los cuales se replicaron dos veces, empleando $n = 5$ por tratamiento (Cuadro 2). Los tratamientos se aleatorizaron para evitar resultados sesgados en la aplicación del diseño. La variable de respuesta cuantificada fue la compresión paralela.

Habilitación de las probetas de *Pinus* sp.

De acuerdo con la norma ISO 3345 (International Organization for Standardization [ISO], 2019), se habilitaron 480 probetas de madera de *Pinus* sp. con dimensiones 20 mm x 20 mm x 60 mm, las cuales se esterilizaron en autoclave (AESA modelo CV-300) a 15 lb de presión y 121 °C durante 30 min; posteriormente, se trataron con aceite de soja (Member's Mark®), solución de aceites esenciales (Cuadro 1) y tratamiento control tratado con arseniato de cobre cromatado (Pro-MADERA®) al 2 % durante 24 h por el método de inmersión. Las probetas saturadas se retiraron de las soluciones preservantes y se secaron a 30 °C hasta obtener peso constante (OHAUS modelo Adventurer®-Pro AV213); las mediciones se hicieron en intervalos de 24 h.

Bioensayo de interacción madera-hongo

El bioensayo de interacción madera-hongo se realizó sobre las probetas previamente tratadas con una variación del sistema conocido como prueba suelo-bloque. Para ello, se emplearon contenedores de plástico de 3 L de capacidad que contenían un sustrato de 50 % de tierra forestal de pino-roble (NUTRIGARDEN®) y 50 % de vermiculita de grado hortícola (ACCIMIN®),

Table 2. Treatments of the Box-Behnken experimental design with coded factor levels to define the conditions at which essential oils from *Syzygium* sp. (SEO) and *Citrus* sp. (CEO) protect *Pinus* sp. wood against damage caused by *Trametes versicolor* and *Gloeophyllum trabeum*.

Cuadro 2. Tratamientos del diseño experimental Box-Behnken con los niveles de factores codificados para definir las condiciones en las cuales los aceites esenciales de *Syzygium* sp. (AES) y *Citrus* sp. (AEC) preservan la madera de *Pinus* sp. ante el daño por *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum*.

Treatment/Tratamiento	SEO (%) / AES (%)	CEO (%)	Time (months)
	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Coded factor levels: SEO and CEO = -1 (2.5 %), 0 (5 %) and +1 (10 %); Time = -1 (6 months), 0 (9 months) and +1 (12 months).

Niveles de los factores codificados: AES y AEC = -1 (2.5 %), 0 (5 %) y +1 (10 %); Tiempo = -1 (6 meses), 0 (9 meses) y +1 (12 meses).

chamber (Lumina model V-120) at 25 ± 2 °C and 70 ± 5 % substrate moisture. The wood specimens were analyzed according to the Box-Behnken model at 6, 9 and 12 months (Table 2). At the end of each period, the specimens were carefully cleaned with a stainless-steel laboratory spatula and dried at 30 °C until constant weight (OHAUS model Adventurer®-Pro AV213), with measurements taken at 24-hour intervals.

Parallel-plate compression test

Parallel compression was evaluated in accordance with ISO 3345 (ISO, 2019) on the specimens obtained from the bioassay (6, 9 and 12 months), using a SHIMADZU SEISAKUSHO universal testing machine, model 70133, with a capacity of 10 t. The specimens were subjected to a constant force at a compression rate of $6 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ until failure occurred. Parallel compression strength was calculated using the following expression: $\sigma = P_{\text{max}}/bl$; where, σ = proportional limit ($\text{N} \cdot \text{mm}^{-2}$), P_{max} = maximum load capacity (N), b = specimen width (mm) and l = specimen length (mm).

Data analysis

The results for determining the sensitivity of wood-decaying fungi to CEO and SEO were analyzed using ANOVA and Tukey's multiple comparison test ($p < 0.05$) with STATISTICA software, version 10. The prediction of optimal values from the Box-Behnken experimental

previamente esterilizado en autoclave (AESA modelo CV-300) a 15 lb de presión y 121 °C durante 30 min. Las soluciones fúngicas se prepararon por separado en 1 L de agua destilada estéril y la concentración se ajustó a $10^6 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ en espectrofotómetro (Thermo Scientific modelo Multiskan GO) a 530 nm. Las probetas de madera previamente tratadas se inocularon en las soluciones respectivas de los hongos xilófagos *G. trabeum* (cepa BAM Ebw 109, ID GenBank: EF524032.1) y *T. versicolor* (cepa CTB-863 A, ID GenBank: EF524040.1) por el método de inmersión e incubaron durante 12 meses en cámara de oscuridad (Lumina modelo V-120) a 25 ± 2 °C y 70 ± 5 % de humedad del sustrato. Las probetas de madera se analizaron de acuerdo con lo establecido con el modelo Box-Behnken 6, 9 y 12 meses (Cuadro 2). Al final de cada periodo, las probetas se limpiaron cuidadosamente con espátula de laboratorio de acero inoxidable y se colocaron a 30 °C hasta obtener peso constante (OHAUS modelo Adventurer®-Pro AV213), realizando mediciones en intervalos de 24 h.

Ensayo mecánico de compresión paralela

La compresión paralela se evaluó de acuerdo con la norma ISO 3345 (ISO, 2019) en las probetas obtenidas del bioensayo (6, 9 y 12 meses), en una máquina universal de ensayos mecánicos SHIMADZU SEISAKUSHO modelo 70133 de 10 t de capacidad. Las probetas se sometieron a una fuerza constante a una velocidad de compresión de $6 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ hasta el

design and the Pareto chart were performed using MINITAB software, version 19.2 ($p < 0.05$).

Results

Sensitivity of wood-decaying fungi to essential oils

T. versicolor and *G. trabeum* showed low growth indices in response to essential oil of *Syzygium* sp. (SEO) (Table 3). *T. versicolor* was the most sensitive to SEO, with IC < 1 at all tested concentrations; fungal growth was observed only at 0.5 % (Figure 1). In contrast, *G. trabeum* was less

fallo de la pieza. La compresión paralela se determinó mediante la expresión $\sigma = P_{\max}/bl$; donde, σ = límite de proporcionalidad ($N \cdot mm^{-2}$), P_{\max} = capacidad de carga máxima (N), b = anchura de la probeta (mm) y l = longitud de la probeta (mm).

Análisis de datos

Los resultados para determinar la sensibilidad de hongos xilófagos a AEC y AES se analizaron mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) con el

Table 3. Growth indices of *Trametes versicolor* and *Gloeophyllum trabeum* exposed to concentrations (%) of essential oils from *Syzygium* sp. (SEO) and *Citrus* sp. (CEO) over a 120-hour evaluation period. IC \leq 0.5 indicates microbial inhibition.

Cuadro 3. Índices de crecimiento de los hongos xilófagos *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum* expuestos a concentraciones (%) de los aceites esenciales de *Syzygium* sp. (AES) y *Citrus* sp. (AEC) en un período de evaluación de 120 h. IC \leq 0.5 indica inhibición del microorganismo.

Wood-decaying fungi/ Hongo xilófago	Essential oil/ Aceite esencial	Growth indices (GI)/ Índices de crecimiento (IC)				
		10 %	5 %	2.5 %	1 %	0.5 %
<i>T. versicolor</i>	SEO/AES	0.03 \pm 0.0 a	0.03 \pm 0.0 a	0.03 \pm 0.0 a	0.05 \pm 0.0 b	0.25 \pm 0.0 c
<i>G. trabeum</i>	SEO/AES	0.18 \pm 0.0 a	0.18 \pm 0.0 a	0.43 \pm 0.0 b	0.58 \pm 0.0 c	0.71 \pm 0.0 d
<i>T. versicolor</i>	CEO/AEC	0.32 \pm 0.0 a	0.42 \pm 0.0 b	0.50 \pm 0.0 c	0.65 \pm 0.0 d	0.67 \pm 0.0 d
<i>G. trabeum</i>	CEO/AEC	0.21 \pm 0.0 a	0.62 \pm 0.0 b	0.80 \pm 0.0 c	0.87 \pm 0.0 c	0.92 \pm 0.0 c

\pm Standard error of the mean. The same letters in the same row indicate no statistically significant difference between concentrations according to Tukey's test ($p = 0.05$).

\pm Error estándar de la media. Letras iguales en la misma fila no presentan diferencia estadística significativa entre concentraciones de acuerdo con la prueba de Tukey ($p = 0.05$).

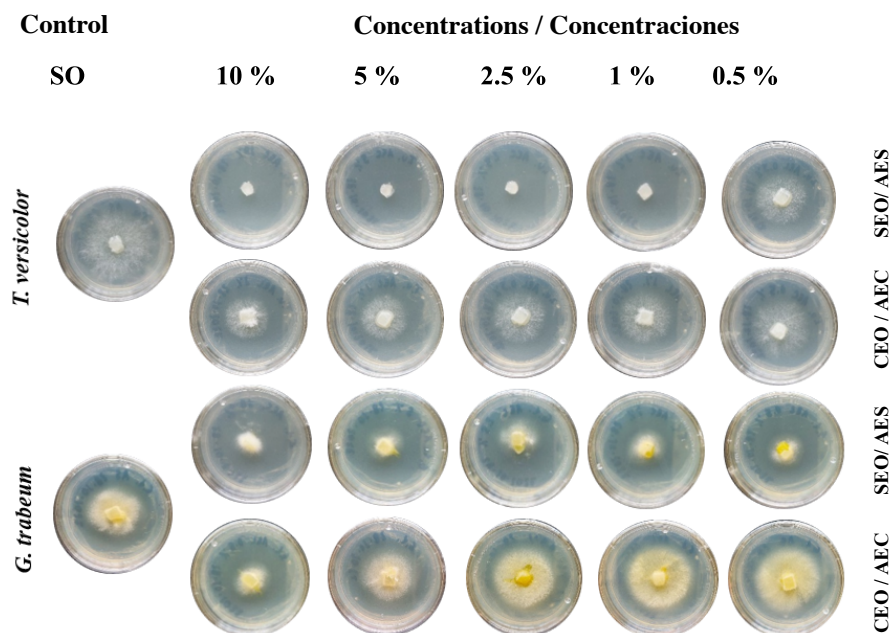


Figure 1. Representative images of the inhibition zones from the assay with *Trametes versicolor* and *Gloeophyllum trabeum* at different concentrations of essential oils from *Syzygium* sp. (SEO) and *Citrus* sp. (CEO). SO: soybean oil.

Figura 1. Imágenes representativas de los halos de inhibición del ensayo entre los hongos xilófagos *Trametes versicolor* y *Gloeophyllum trabeum* a diferentes concentraciones de aceites esenciales de *Syzygium* sp. (AES) y *Citrus* sp. (AEC). AS: aceite de soya.

sensitive to clove essential oil, showing low IC values at 10 and 5 %, whereas mycelial growth occurred at 2.5, 1 and 0.5 % (Figure 1). Moreover, the *T. versicolor* and *G. trabeum* were less sensitive to the essential oil of *Citrus* sp. (CEO), because they showed higher IC values compared to SEO (Table 3). At 10 and 5 % CEO, *T. versicolor* showed minimal mycelial growth, which increased at 2.5, 1 and 0.5 % (Figure 1). Regarding *G. trabeum*, the highest sensitivity was observed at 10 % CEO with $GI = 0.21 \pm 0.0$. In contrast, at 5, 2.5, 1 and 0.5 %, $GI > 0.5 \text{ cm}^2$ were recorded, reflecting greater mycelial growth (Figure 1).

Based on the sensitivity of *T. versicolor* and *G. trabeum* to essential oils from *Citrus* sp. and *Syzygium* sp., concentrations of 10, 5 and 2.5 % were selected for the three-factor, three-level Box-Behnken experimental design -1, 0 and +1 (Table 1), with parallel compression in *Pinus* sp. wood as the response variable.

Box-Behnken surface design for *Trametes versicolor*

The three-factor Box-Behnken experimental design (CEO, SEO and time) demonstrated that the model was statistically significant ($p < 0.05$) (Table 4), with

software STATISTICA versión 10. La predicción de los valores óptimos del diseño experimental Box-Behnken y el diagrama de Pareto se hicieron con el software MINITAB versión 19.2 ($p < 0.05$).

Resultados

Sensibilidad de hongos xilófagos a los aceites esenciales

Los hongos xilófagos *T. versicolor* y *G. trabeum* presentaron índices bajos de crecimiento frente al aceite esencial de *Syzygium* sp. (AES) (Cuadro 3). El hongo *T. versicolor* fue el más sensible al AES con $IC < 1$ en todas las concentraciones; solo se observó crecimiento fúngico a 0.5 % (Figura 1). En cambio, *G. trabeum* fue menos sensible al aceite esencial de clavo; el hongo presentó IC bajos al 10 y 5 %, mientras que a 2.5, 1 y 0.5 % sí hubo crecimiento micelial (Figura 1). Por otra parte, los hongos xilófagos *T. versicolor* y *G. trabeum* fueron menos sensibles al aceite esencial de *Citrus* sp. (AEC), ya que mostraron mayores IC en comparación con AES (Cuadro 3). En concentraciones de 10 y 5 % de AEC, *T. versicolor* presentó crecimiento micelial mínimo, pero este fue mayor con las concentraciones de 2.5, 1 y 0.5 % (Figura

Table 4. Analysis of variance of the Box-Behnken experimental design for parallel compression values of *Pinus* sp. exposed to *Trametes versicolor*.

Cuadro 4. Análisis de varianza del diseño experimental de Box-Behnken para los valores de compresión paralela de la madera de *Pinus* sp. expuesta a *Trametes versicolor*.

Source/ Fuente	DF/ GL	Adjusted SS/ SC ajustado	Adjusted MS / MC ajustado	F-value/ Valor F	p-value/ Valor p
Model/Modelo	6	55 616.0	9 269.3	61.94	0.000
Linear/Lineal	3	54 940.9	18 313.6	122.38	0.000
SEO/AES	1	374.0	374.0	2.50	0.153
CEO/AEC	1	83.9	83.9	0.56	0.476
t	1	54 483.0	54 483.0	364.07	0.000
Quadratic/Cuadrado	3	675.1	225.0	1.50	0.286
SEO*SEO/AES*AES	1	40.4	40.4	0.27	0.617
CEO*CEO/AEC*AEC	1	19.4	19.4	0.13	0.728
t*t	1	597.1	597.1	3.99	0.081
Error	8	1 197.2	149.6		
Lack of fit/Falta de ajuste	6	1 075.0	179.2	2.93	0.276
Pure error/Error puro	2	122.2	61.1		
Total	14	56 813.2			
Model summary					
S	R ²	Adjusted R ² / R ² ajustada	Predicted R ² / R ² predicha		
12.2331	97.89 %	96.31 %	91.95 %		

SEO: *Syzygium* sp. essential oil, CEO: *Citrus* sp. essential oil, t: time, DF: degrees of freedom, SS: sum of squares, MS: mean squares, S: standard error of the regression.

AES: aceite esencial de *Syzygium* sp., AEC: aceite esencial de *Citrus* sp., t: tiempo, GL: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, MC: cuadrados medios, S: error estándar de la regresión.

an adjusted R^2 of 96.31 % and R^2 of 91.95 %. The time (t) factor was significant in the model; likewise, the Pareto chart (Figure 2) shows the significance of this same factor (C) on parallel compression as the response variable.

It is important to note that the Box-Behnken design demonstrated that a target value of $355.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ in parallel compression for *Pinus* wood (standardized value; Ross, 2010) requires concentrations of 6.25 % CEO and 6.25 % SEO. According to the following model, this target value can be maintained for up to 8.46 months:

$$\text{CP (kg}\cdot\text{cm}^{-2}) = 693.7 + 4.76\text{SEO} - 2.90\text{CEO} - 52.9t - 0.235\text{SEO}*\text{SEO} + 0.163\text{CEO}*\text{CEO} + 1.413t*t$$

Box-Behnken response surface design for *Gloeophyllum trabeum*

For *G. trabeum*, the Box-Behnken model with factors CEO, SEO, and time was also significant ($p < 0.05$) (Table 5), with an adjusted R^2 of 97.21 % and a predicted R^2 of 93.66 %. In the linear analysis of SEO, CEO, and time, the time factor was significant in the model, and

1). Con respecto a *G. trabeum*, este fue más sensible a una concentración de 10 % de AEC con $\text{IC} = 0.21 \pm 0.0$, pero en las concentraciones de 5, 2.5, 1 y 0.5 %, el $\text{IC} > 0.5 \text{ cm}^2$ generó mayor desarrollo micelial (Figura 1).

De acuerdo con la sensibilidad de *T. versicolor* y *G. trabeum* a los aceites esenciales de *Citrus* sp. y *Syzygium* sp., las concentraciones 10, 5 y 2.5 % se seleccionaron para el diseño experimental Box-Behnken de tres factores y tres niveles por factor -1, 0 y +1 (Cuadro 1) con la compresión paralela en la madera de pino como variable de respuesta.

Diseño de superficie Box-Behnken para *Trametes versicolor*

El diseño experimental Box-Behnken de tres factores (AEC, AES y tiempo) demostró que el modelo fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) (Cuadro 4) con valores de R^2 ajustada de 96.31 % y R^2 predictiva de 91.95 %. El factor tiempo (t) fue significativo en el modelo; asimismo, el diagrama de Pareto (Figura 2) muestra la significancia del mismo factor (C) sobre la compresión paralela como variable de respuesta.

Table 5. Analysis of variance of the Box-Behnken experimental design for parallel compression values of *Pinus* sp. exposed to *Gloeophyllum trabeum*.

Cuadro 5. Análisis de variancia del diseño experimental de Box-Behnken para los valores de compresión paralela de la madera de *Pinus* sp. expuesta a *Gloeophyllum trabeum*.

Source	DF/ GL	Adjusted SS/ SC ajustado	Adjusted MS / MC ajustado	F-value/ Valor F	p-value/ Valor p
Model/Modelo	6	23892.3	3982.0	82.38	0.000
Linear/Lineal	3	21623.8	7207.9	149.11	0.000
SEO/AES	1	91.1	91.1	1.89	0.207
CEO/AEC	1	4.5	4.5	0.09	0.768
t	1	21528.1	21528.1	445.36	0.000
Quadratic/Cuadrado	3	2268.5	756.2	15.64	0.001
SEO*SEO/AES*AES	1	0.5	0.5	0.01	0.923
CEO*CEO/AEC*AEC	1	196.1	196.1	4.06	0.079
t*t	1	2133.4	2133.4	44.13	0.000
Error	8	386.7	48.3		
Lack of fit/Falta de ajuste	6	383.1	63.8	34.89	0.028
Pure error/Error puro	2	3.7	1.8		
Total	14	24279.0			
Model summary					
S		R^2	Adjusted R^2 / R^2 ajustada		Predicted R^2 / R^2 predicha
6.95263		98.41 %	97.21 %		93.66 %

SEO: *Syzygium* sp. essential oil, CEO: *Citrus* sp. essential oil, t: time, DF: degrees of freedom, SS: sum of squares, MS: mean squares, S: standard error of the regression.

AES: aceite esencial de *Syzygium* sp., AEC: aceite esencial de *Citrus* sp., t: tiempo, GL: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, MC: cuadrados medios, S: error estándar de la regresión.

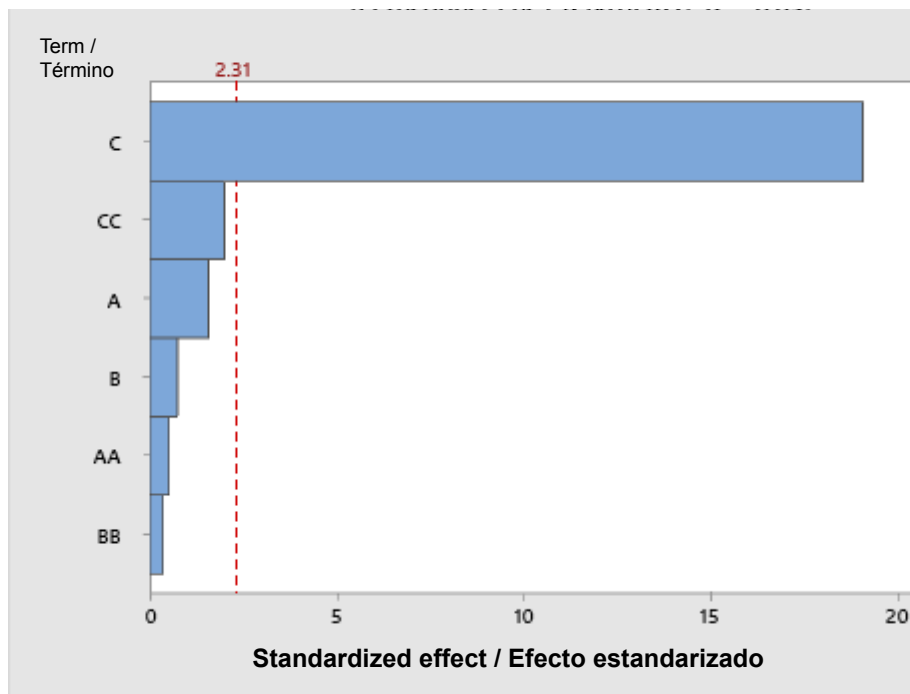


Figure 2. Pareto chart showing the effectiveness of significant factors affecting parallel compression values of *Pinus* sp. wood exposed to *Trametes versicolor* with statistical significance ($p = 0.05$). The length of the bars corresponds to the absolute value of the standardized effect, and the vertical line represents the tabulated value of 2.31 at a 95 % confidence level. A = concentration of *Syzygium* sp. essential oil; B = concentration of *Citrus* sp. essential oil; C = time.

Figura 2. Diagrama de Pareto, eficacia de los factores significativos que afectan los valores de la compresión paralela de la madera de *Pinus* sp. expuesta a *Trametes versicolor* con significancia estadística ($p = 0.05$). La longitud de las barras corresponde al valor absoluto del efecto estandarizado y la línea vertical muestra un valor de tabla de 2.31 para un nivel de confianza del 95 %. A = concentración del aceite esencial de *Syzygium* sp.; B = concentración del aceite esencial de *Citrus* sp.; C = tiempo.

the quadratic term (t^2) was also significant ($p < 0.05$). Figure 3 shows the Pareto chart, highlighting the significance of the linear term 'time' (C) and the quadratic term time*time (CC).

The Box-Behnken model indicated that, to achieve a target value of 355.5 kg·cm⁻² in parallel compression, a concentration of 6.25 % CEO and 6.25 % SEO is required, corresponding to a duration of 8.70 months, according to the following polynomial:

$$CP \text{ (kg·cm}^{-2}\text{)} = 734.5 + 1.22\text{SEO} - 6.28\text{CEO} - 65.37t - 0.026\text{SEO}^2 + 0.518\text{CEO}^2 + 2.671t^2$$

Discussion

T. versicolor and *G. trabeum* are microorganisms responsible for white and brown rot, respectively, which is why they are used as models in wood mechanical resistance studies (Fang et al., 2023). These organisms are aggressive, resilient, and widely distributed geographically. Control of decay caused by these microorganisms has traditionally relied on first-generation conventional chemical preservatives,

Resulta importante mencionar que el diseño Box-Behnken demostró que un valor objetivo de 355.5 kg·cm⁻² en compresión paralela para la madera de pino (valor estandarizado; Ross, 2010) requiere una concentración de 6.25 % de AEC y 6.25 % de AES. De esta manera, se estaría alcanzando el valor objetivo hasta por 8.46 meses de acuerdo con el modelo siguiente:

$$CP \text{ (kg·cm}^{-2}\text{)} = 693.7 + 4.76\text{AES} - 2.90\text{AEC} - 52.9t - 0.235\text{AES}^2 + 0.163\text{AEC}^2 + 1.413t^2$$

Diseño de superficie Box-Behnken para *Gloeophyllum trabeum*

Para *G. trabeum*, el modelo Box-Behnken con los factores AEC, AES y tiempo también fue significativo ($p < 0.05$) (Cuadro 5) con valores de R^2 ajustada de 97.21 % y R^2 predictiva de 93.66 %. Asimismo, en el análisis lineal de AES, AEC y tiempo, el factor tiempo es significativo en el modelo, al igual que el término cuadrático (t^2) muestra también significancia ($p < 0.05$). La Figura 3 muestra el diagrama de Pareto donde se aprecia la significancia del término lineal 'tiempo' (C) y el término cuadrático tiempo*tiempo (CC).

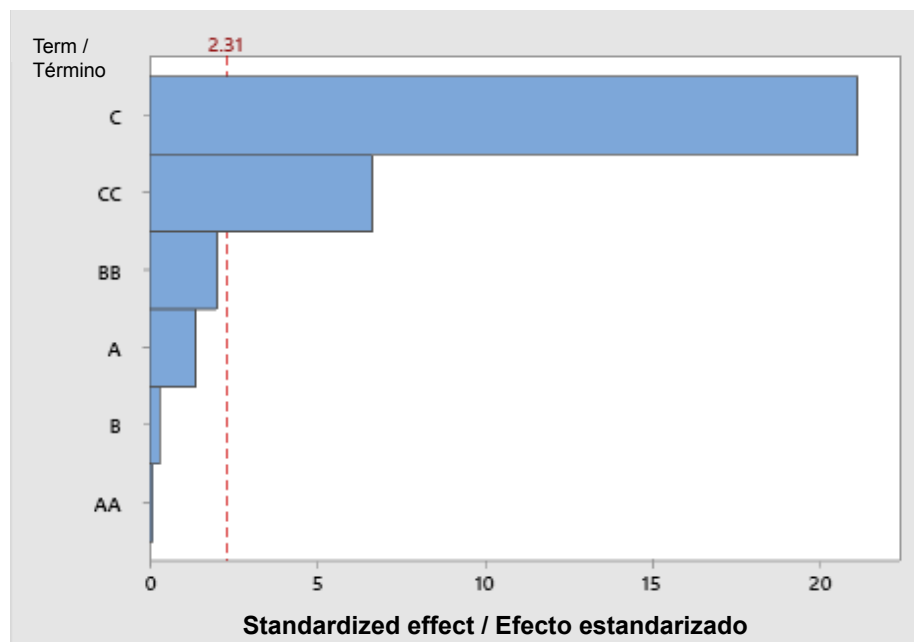


Figure 3. Pareto chart shows the effectiveness of significant factors affecting parallel compression values of *Pinus* sp. wood exposed to *Gloeophyllum trabeum* with statistical significance ($p = 0.05$). The length of the bars corresponds to the absolute value of the standardized effect, and the vertical line represents the tabulated value of 2.31 at a 95 % confidence level. A = concentration of *Syzygium* sp. essential oil; B = concentration of *Citrus* sp. essential oil; C = time.

Figura 3. Diagrama de Pareto, eficacia de los factores significativos que afectan los valores de la compresión paralela de la madera de *Pinus* sp. expuesta a *Gloeophyllum trabeum* con significancia estadística ($p = 0.05$). La longitud de las barras corresponde al valor absoluto del efecto estandarizado y la línea vertical muestra un valor de tabla de 2.31 para un nivel de confianza del 95 %. A = concentración del aceite esencial de *Syzygium* sp.; B = concentración del aceite esencial de *Citrus* sp.; C = tiempo.

such as creosote, pentachlorophenol, or chromated copper arsenate (CCA). These preservatives offer broad-spectrum activity against diverse microorganisms, are low-cost, and can remain effective for years. However, the use of these toxic conventional preservatives limits their application in residential construction and in products that come into contact with humans, due to their ecotoxicity (Gosselin & Zagury, 2020; King et al., 2019; Morais et al., 2021; Vani et al., 2022). Therefore, research focused on the development and use of alternative preservative compounds is highly valuable. Naturally derived products are notable for their diverse chemical composition, which show broad antimicrobial activity. Among these are essential oils, tannins, wood extractives, alkaloids, waxes, lectins, polypeptides, propolis, and chitosan, all of which have been shown to inhibit fungal growth (Broda, 2020; González-Laredo et al., 2015; Hu et al., 2015; Khademibami & Bobadilha, 2022; Kirker et al., 2024; Martínez-Pacheco et al., 2022; Teacă et al., 2019; Wozniak, 2022).

In the sensitivity assay, *T. versicolor* was susceptible to four of the five concentrations tested (10, 5, 2.5 and 1 %) of the essential oil from *Syzygium* sp. (SEO); fungal growth was observed only at the lowest concentration (0.5 %). This sensitivity can be explained by the chemical

El modelo Box-Behnken indicó que para un valor objetivo de $355.5 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ en compresión paralela es necesaria una concentración de 6.25 % de AEC y 6.25 % de AES, para un tiempo de 8.70 meses, de acuerdo con el polinomio siguiente:

$$\text{CP (kg}\cdot\text{cm}^{-2}) = 734.5 + 1.22\text{AES} - 6.28\text{AEC} - 65.37t - 0.026\text{AES}\cdot\text{AES} + 0.518\text{AEC}\cdot\text{AEC} + 2.671t\cdot t$$

Discusión

Los hongos xilófagos *T. versicolor* y *G. trabeum* son microorganismos responsables de la pudrición blanca y marrón, respectivamente, motivo por el cual se utilizan como modelo en estudios de resistencia mecánica en madera (Fang et al., 2023); dichos organismos son agresivos, resilientes y con amplia distribución geográfica. El control de daños de pudrición asociada a estos microorganismos ha consistido en el uso de preservantes químicos convencionales de primera generación como la creosota, el pentaclorofenol o el arseniato de cobre cromado (CCA), los cuales presentan un espectro amplio de actividad contra diversos microorganismos, son de bajo costo y su efectividad puede prolongarse por años. No obstante, el uso de preservantes convencionales tóxicos limita su aplicación

composition of the oil, in which eugenol has documented antimicrobial activity (Martínez-Pacheco et al., 2022; Xie et al., 2017; Zhang et al., 2016). It has also been reported that clove essential oil (*Eugenia caryophyllata* Thunb. and *S. aromaticum*) shows antifungal activity against *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *G. trabeum* and certain molds at a concentration of 400 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ using the agar diffusion method (Wozniak, 2022). In the present study, wood-decaying fungi showed lower sensitivity to the essential oil from *Citrus* sp. (CEO) with growth indices that were close to 1. Elgat et al. (2020) reported the antifungal activity of essential oils against *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus* and *Fusarium culmorum*, with minimum inhibitory concentrations of 25, 8, 12 and 12 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *Citrus aurantium* and 12, 6, 6 and 6 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *C. sinensis*, respectively, as well as for a combination of both oils (30, 8, 10 and 40 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$), using the radial growth method. Because *G. trabeum* exhibited lower sensitivity to SEO and CEO, mixtures of both oils were prepared to enhance their synergistic effect. Although essential oils are complex mixtures of secondary metabolites and their chemical components may be lost through leaching or volatilization, resulting in limited efficacy in wood, the protective action of the combined essential oils from *Syzygium* sp. and *Citrus* sp. is expected to be applicable to sawn wood. This approach could help reduce the need for early or widespread treatments with chromated copper arsenate.

The main challenge associated with lignocellulosic materials, particularly wood, is their high susceptibility to microbial attack by wood-decaying fungi. *Pinus* sp. wood is considered to have low natural durability against fungal degradation; however, it is widely used worldwide (Chen et al., 2020). For this reason, microbial deterioration compromises its stability and mechanical reliability. Studies have shown that wood with more than 5 % loss in dry weight shows reduced resistance to compression parallel to the grain (Arriaga et al., 2023; Díaz-Rivera et al., 2021), because this parameter is a key indicator of the load-bearing capacity of wood along its longitudinal fibers. A clear example is conventional load-bearing columns supporting roofs, which may lose mechanical reliability and pose a risk to users when degraded. Some studies have established a compressive strength value of 355.5 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ parallel to the grain as a standard for *Pinus* sp. (Ross, 2010). Therefore, the target value defined for the compression-parallel test in this study, based on a Box-Behnken experimental design, corresponds to the standard load that wood can sustain without compromising its mechanical reliability.

The Box-Behnken model results showed that, at concentrations of 6.25 % SEO and 6.25 % CEO, pine wood exposed to fungal attack by *T. versicolor* can withstand a compressive load 355.5 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ parallel to the grain for a period of 8.46 months. Similarly, the model indicated that pine wood exposed to *G. trabeum* under the same compressive load (355.5 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) remains viable for

en la construcción residencial, en productos que estén en contacto con el hombre y poseen ecotoxicidad (Gosselin & Zagury, 2020; King et al., 2019; Morais et al., 2021; Vani et al., 2022). Por ello, las investigaciones enfocadas en el desarrollo y uso de compuestos preservantes alternativos son valiosas. Los productos de origen natural destacan por la variedad de compuestos químicos que exhiben amplia actividad antimicrobiana. Entre ellos se encuentran los aceites esenciales, taninos, compuestos extractivos de madera, alcaloides, ceras, lectinas, polipéptidos, propóleos o quitosano son productos de origen natural que presentan inhibición sobre el crecimiento fúngico (Broda, 2020; González-Laredo et al., 2015; Hu et al., 2015; Khademibami & Bobadilha, 2022; Kirker et al., 2024; Martínez-Pacheco et al., 2022; Teacă et al., 2019; Wozniak, 2022).

En el ensayo de sensibilidad, *T. versicolor* fue sensible a cuatro de las cinco concentraciones evaluadas (10, 5, 2.5 y 1 %) de aceite esencial de *Syzygium* sp. (AES); el crecimiento fúngico se observó solo en la concentración más baja (0.5 %). Esta sensibilidad se explica por la composición química del aceite, donde el eugenol tiene actividad antimicrobiana reportada (Martínez-Pacheco et al., 2022; Xie et al., 2017; Zhang et al., 2016). También se ha señalado que el aceite esencial de clavo (*Eugenia caryophyllata* Thunb. y *S. aromaticum*) muestra actividad antifúngica sobre *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *G. trabeum* y algunos mohos a una concentración de 400 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ por el método de difusión en agar (Wozniak, 2022). En el presente estudio, los hongos xilófagos expusieron menor sensibilidad al aceite esencial de *Citrus* sp. (AEC) con índices de crecimiento cercanos a 1. Elgat et al. (2020) reportaron la actividad antifúngica de aceites esenciales sobre *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *Fusarium culmorum* en concentraciones mínimas inhibitorias de 25, 8, 12 y 12 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *Citrus aurantium* y 12, 6, 6 y 6 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *C. sinensis*, así como la combinación de ambos aceites (30, 8, 10 y 40 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) con el método de crecimiento radial. Debido a que *G. trabeum* reveló menor sensibilidad a los aceites AES y AEC, se optó por hacer mezclas de ambos para potenciar su efecto sinérgico. Si bien, los aceites esenciales son mezclas complejas de metabolitos secundarios y sus compuestos químicos se pueden perder por lixiviación o volatilización, dando como resultado un efecto limitado de los aceites esenciales en la madera, se espera que la acción protectora de la mezcla de aceites esenciales de *Syzygium* sp. y *Citrus* sp. se utilice en madera aserrada. Esto evitaría el uso de tratamientos tempranos o generalizados con arseniato de cobre cromado.

La problemática de los materiales lignocelulósicos, en específico la madera, es su alta susceptibilidad al ataque microbiano por hongos xilófagos. La madera de *Pinus* sp. es considerada de baja durabilidad natural a la degradación fúngica; sin embargo, es utilizada de

8.70 months when treated with 6.25 % SEO and 6.25 % CEO. These results demonstrated that the combination of essential oils protects pine wood against early-stage attack by *T. versicolor* and *G. trabeum*. For longer exposure periods, however, the wood loses mechanical reliability due to the action of the evaluated xylophagous agents. The use of essential oils in wood protection represents a potential alternative to conventional treatments in early-stage applications, rather than a long-term solution, as wood treated with CCA can have a service life of up to 30 years (Fritz & Garay, 2026; Hadi et. al., 2025; He et. al., 2025).

The key distinction between previous studies and the present results is the use of mixtures of essential oils from *Syzygium* sp. and *Citrus* sp. as wood preservatives and their relationship with compression parallel to the grain. Furthermore, the concentration required to maintain standard compressive strength is defined, ensuring reliability in use.

Conclusions

Essential oils from *Syzygium* sp. and *Citrus* sp. are promising candidates for use as wood preservatives, because they inhibit the growth of *T. versicolor* and *G. trabeum* without affecting the parallel compression strength of the wood. The inhibitory effect of naturally derived chemical substances against wood-decay organisms is an important scientific advancement in the transition toward environmentally friendly technologies.

Acknowledges

The authors thank the Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) for the support that made this research possible. They also thank the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo and the Wood, Pulp, and Paper Department (DMCyP) at the University of Guadalajara.

Conflict of interest declaration

The authors declare that they have no economic conflicts of interest or known personal relationships that could have influenced the research presented in this article.

Declaration of artificial intelligence (AI) use

The authors declare that no generative AI or AI-assisted technology was used in the preparation of this manuscript.

End of English version

manera masiva a nivel mundial (Chen et al., 2020). Por esta razón, la degradación microbiana compromete su estabilidad y confiabilidad mecánica. Estudios demuestran que la madera con más de 5 % de pérdida de peso seco, compromete su resistencia a la compresión paralela (Arriaga et al., 2023; Días-Rivera et al., 2021), ya que este valor es el principal indicador al esfuerzo que la madera soporta en las fibras longitudinalmente. Ejemplo de ello son las columnas convencionales que soportan un techo, pueden perder su fiabilidad mecánica y poner en riesgo a los usuarios. En algunos trabajos se ha establecido una carga de 355.5 kg·cm⁻² en compresión paralela como estándar para la madera de *Pinus* sp. (Ross, 2010). Por ello, el valor objetivo establecido en los ensayos de compresión paralela de este estudio, mediante el diseño experimental Box-Behnken, corresponden al estándar que la madera puede soportar sin perder su confiabilidad.

Los resultados del modelo Box-Behnken mostraron que, con una concentración de 6.25 % de AES y 6.25 % de AEC, la madera de pino expuesta al ataque fúngico por *T. versicolor* soporta una carga de 355.5 kg·cm⁻² en compresión paralela por un período de 8.46 meses. Por su parte, con resultados semejantes, el modelo Box-Behnken mostró que la madera de pino expuesta a *G. trabeum* y a una carga en compresión paralela de 355.5 kg·cm⁻² es viable para un periodo de 8.70 meses cuando es tratada con una concentración de 6.25 % de AES y 6.25 % de AEC. Los resultados muestran que la combinación de aceites esenciales protege la madera de pino del ataque de los hongos xilófagos *T. versicolor* y *G. trabeum* en estadios tempranos. Para períodos superiores a los obtenidos, la madera pierde confiabilidad mecánica por la acción de los agentes xilófagos evaluados. La preservación de madera con aceites esenciales es una alternativa para sustituir a los preservantes convencionales en intervenciones tempranas del preservado, no como sustituyentes a largo plazo, ya que una madera preservada con CCA tiene una vida útil de 30 años (Fritz & Garay, 2026; Hadi et. al., 2025; He et. al., 2025).

La diferencia más sustancial entre las publicaciones anteriores y los resultados de este estudio fue el uso de mezclas de aceites esenciales de *Syzygium* sp. y *Citrus* sp. como preservantes y su relación con la compresión paralela en la madera; además, se especifica la concentración necesaria para preservarla en un estándar de resistencia a la compresión paralela, lo cual asegura su confiabilidad de uso.

Conclusiones

Los aceites esenciales de *Syzygium* sp. y *Citrus* sp. son candidatos para ser empleados como preservantes de la madera, ya que inhiben el crecimiento de los

References / Referencias

- Andlar, M., Rezic, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwing, R., & Santek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18, 768-778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
- Arriaga, F., Wang, X., Íñiguez-González, G., Llana, D. F., Esteban, M., & Niemz, P. (2023). Mechanical properties of wood: A review. *Forest*, 14, 1202. <https://doi.org/10.3390/f14061202>
- Barabadi, H., Honary, S., Ebrahimi, P., Alizadeh, A., Naghibi, Farzaneh & Saravanan, Muthupandian (2019). Optimization of myco-synthesized silver nanoparticles by response surface methodology employing Box-Behnken design. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 49(2), 33-43. <https://doi.org/10.1080/24701556.2019.1583251>
- Broda, M. (2020). Natural compounds for wood protection against fungi – A review. *Molecules*, 25(15), 3538. <https://doi.org/10.3390/molecules25153538>
- Chen, C., Kuang, Y., Zhu, S., Burgert, I., Keplinger, T., Gong, A., Li, T., Berglund, L. Eichhorn, S. J., & Hu, L. (2020). Structure–property–function relationships of natural and engineered wood. *Nature Reviews Materials*, 5(9), 642-666. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0195-z>
- Dbik, A., El Messaoudi, N., Bentahar, S., El Khomri, M., Lacherai, A., & Faska, N. (2022). Optimization of methylene blue adsorption on agricultural solid waste using Box–Behnken design (BBD) combined with response surface methodology (RSM) modeling. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(4), 4567-4583. <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.45674583>
- Demeriel, C., Kabutey, A., Herák, D., Sedlacek, A., Mizera, C., & Dajbych, O. (2022). Using Box-Behnken design coupled with response surface methodology for optimizing rapeseed oil expression parameters under heating and freezing conditions. *Processes*, 10, 490. <https://doi.org/10.3390/pr10030490>
- Días-Rivera, E., Montejó-Mayo, W., Martínez-Pacheco, M., Munro-Rojas, A., Ambríz-Parra, E., & Velázquez-Becerra, C. (2021). Daños químico-mecánicos causados por el hongo de pudrición café *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill en madera de *Pinus pseudostrobus* Lindl. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 27(2), 199-214. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2020.05.033>
- Elgat, W. A. A., Kordy, A. M., Böhm, M., Cerný, R., Abdel-Megeed, A., & Salem, M. Z. M. (2020). *Eucalyptus camandulensis*, *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* essential oils as antifungal activity against *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Fusarium culmorum*. *Processes*, 8, 1003. <https://doi.org/10.3390/pr8081003>
- Elshafie, H. S., Mancini, E., Camele, I., De Martino, L., & De Feo, V. (2015). *In vivo* antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. *Industrial Crops and Products*, 66, 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.031>
- Fang, X., Xiong, Y., Li, J., & Ma, X. (2023). Treatability changes of radiata pine heartwood induced by white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Forests*, 14(5), 1040. <https://doi.org/10.3390/f14051040>
- hongos xilófagos *T. versicolor* y *G. trabeum* y no afectan la compresión paralela de la madera. El efecto inhibitorio de sustancias químicas de origen natural contra organismos del deterioro de la madera es importante en el avance científico para migrar a tecnologías amigables con nuestro entorno.

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo otorgado para el desarrollo de la investigación. A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Departamento de Madera Celulosa y Papel (DMCyP) de la Universidad de Guadalajara.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaramos que no tenemos conflictos de intereses económicos ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

Declaración del uso de inteligencia artificial (IA)

Los autores declaramos no haber utilizado IA generativa o tecnología asistida por IA para el desarrollo del presente manuscrito.

Fin de la versión en español

- Fritz, C., & Garay, R. (2025). Advancing sustainable timber protection: A comparative study of international wood preservation regulations and Chile's framework under environmental, social, and governance and sustainable development and sustainable. *Buildings*, 15, 1564. <https://doi.org/10.3390/buildings15091564>
- González-Laredo, R. F., Rosales-Castro, M., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., & Karchesy, J. J. (2015). Wood preservation using natural products. *Madera y Bosques*, 21(SPE), 63-76. <https://www.scielo.org.mx/pdf/mb/v21nspe/v21nspea5.pdf>
- Goodell, B., Winandy, J. E., & Morrell, J. J. (2020). Fungal degradation of wood: Emerging data, new insights and changing perceptions—a review. *Coatings*, 10, 1210. <https://doi.org/10.3390/coatings10121210>
- Gosselin, M., & Zagury, G. J. (2020). Metal(loid)s inhalation bioaccessibility and oxidative potential of particulate matter from chromated copper arsenate (CCA)-contaminated soils. *Chemosphere*. 238, 124557. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124557>
- Hadi, Y. S., Yosi, C., Marai, P., Mubarak, M., Abdillah, I. B., Pari, R., Pari, G., Syukur, A., Zaini, L. H., Hermawan, D., & Liao, J. (2025). Performance of polystyrene-impregnated and CCA-preserved tropical woods against subterranean termites in

- PNG Field and treatment-induced in color change. *Polymers*, 17, 1945. <https://doi.org/10.3390/polym17141945>
- He, Y., Li, Y., Li, Q., Xiao, W. & Xie, G. (2025). Research progress of nanotechnology on efficient and green technologies for wood preservation: A review. *Journal of Renewable Materials*, 13(4). <https://doi.org/10.32604/jrm.2025.058349>
- Hu, J., Chang, S., Peng, K., Hu, K. & Thévenon, M. F. (2015). Bio-susceptibility of shells of *Camellia oleifera* Abel fruits to fungi and termites. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 219-223. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.011>
- Hunt, C. G., Zelinka, S. L., Frihart, C. R., Lorenz, L., Yelle, d., Gleber, S. C., Vogt, S., & Jakes, J. E. (2018). Acetylation increases relative humidity threshold for ion transport in wood cell walls – A means to understanding decay resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 133, 230-237. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.06.014>
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52, 39. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
- International Organization for Standardization (ISO). (2019). *ISO 3345. Wood sampling methods and general requirements for physical and mechanical testing of small clear wood specimens*. Geneva, Switzerland. <https://www.iso.org/standard/74839.html>
- Khademibami, L., & Bobadilha, G. S. (2022). Recent developments studies on wood protection research in academia: A review. *Frontiers in Forests and Global Change*, 5, 793177. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2022.793177>
- King, C. M. D., Dozier, C. S., Campbell, J. L., Curry, E. D., & Pollitt, K. J. G. (2019). Long-term leaching of arsenic from pressure-treated playground structures in the northeastern United States. *Science of the Total Environment*, 656, 834-842. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.315>
- Kirker, G. T., Hassan, B., Mankowski, M. E., & Eller, F. J. (2024). Critical review on the use of extractives of naturally durable woods as natural wood protectants. *Insects*, 15(1), 69. <https://doi.org/10.3390/insects15010069>
- Kracher, D., & Ludwing, R. (2016). Cellobiose dehydrogenase: An essential enzyme for lignocellulose degradation in nature-A review. *Journal of Land Management Food and Environment*, 67, 145-163. <https://doi.org/10.1515/boku-2016-0013>
- Marais, B. N., Brischke, C., & Militz, H. (2020). Wood durability in terrestrial and aquatic environments-a review influence factors. *Wood Material Science & Engineering*, 17, 82-105. <https://doi.org/10.1080/17480272.2020.1779810>
- Martínez-Pacheco, M. M., García-Reynoso, W. E., Cruz de León, J., Raya-González, D., Flores-García, A., Munro-Rojas, A., & Velázquez-Becerra, C. (2022). Pinewood protection against sapstain using citrus essential oils. *Árvore*, 46, e4616. <https://doi.org/10.1590/1806-9088202200000016>
- Morais, S., Fonseca, H. M. A. C., Oliveira, S. M. R., Oliveira, H., Gupta, V. K., Sharma, B. & De Lourdes, P. M. (2021). Environmental and health hazards of chromated copper arsenate-treated wood: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 5518. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115518>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10, 86. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Ohgami, N., Yamanoshita, O., Thang, N. D., Yajima, I., Nakano, C., Wenting, Wu., Ohuma, S., & Kato, M. (2015). Carcinogenic risk of chromium, copper and arsenic in CCA-treated wood. *Environmental Pollution*, 206, 456-460. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.07.041>
- Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J., & Cheng, Y. (2021). Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: A review. *Frontiers in Plant Science*, 12, 300. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.621276>
- Pizzi, A. (2016). Wood products and green chemistry. *Annals of Forest Science*, 73, 185-203. <https://doi.org/10.1007/s13595-014-0448-3>
- Ramage, M. H., Burridge, H., Busse-Wicher, M., Fereday, G., Reynolds, T., Shah, D. U., Wu, G., Yu, L., Fleming, P., Densley-Tingley, D., Allwood, J., Dupree, P., Linden, P. F., & Scherman, O. (2017). The wood from the trees: The use of timber in construction. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 68, 33-359. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.107>
- Rodríguez-Anda, R., Ramírez-Arango, A. M., Palacios-Juárez, H., Fuentes-Talavera, F. J., Silva-Guzmán, J. A., & Saucedo-Corona, A. R. (2015). Anatomical, physical-mechanical and machining characteristics of the wood of velvet mesquite (*Prosopis velutina* Wooton). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), 156-173. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200711322015000200011
- Ross, R. J. (2010). *Wood handbook: wood as an engineering material. General Technical Report FPL-GTR-190*. USDA Forest Service, Forest Products Laboratory. <https://doi.org/10.2737/FPL-GTR-190>
- Sandberg, D., Kutnar, A., & Mantanis, G. (2017). Wood modification technologies a review. *Forest Biogeosciences and Forestry*, 10, 895. <https://doi.org/10.3832/ifor2380-010>
- Teacă, C. A., Roșu, D., Mustață, F., Rusu, T., Roșu, L., Roșca, I., & Varganici, C. D. (2019). Natural bio-based products for wood coating and protection against degradation: A review. *BioResources*, 14(2). <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.Teaca>
- Tonguanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential oils: Extraction, bioactivities and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), 1231-1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Vani, C. N., Prajwal, S., Sundararaj, R., & Dhamodaran, T. K. (2022). Chemical preservatives in wood protection. In *Science of Wood degradation and its protection* (pp. 559-587). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-8797-6_16
- Witomski, P., Olek, W., & Bonarski, J. T. (2016). Changes in strength of Scots pine wood (*Pinus silvestris* L.) decayed by brown rot (*Coniophora puteana*) and whit rot (*Trametes versicolor*). *Construction and Building Materials Journal*, 102, 162-166. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.10.109>
- Wozniak, M. (2022). Antifungal agents in wood protection-A review. *Molecules*, 27, 6392. <https://doi.org/10.3390/molecules27196392>
- Xie, Y., Wang, Z., Huang, Q., & Zhang, D. (2017). Antifungal activity several oils and major components against wood-rot fungi. *Industrial Crops & Products*, 108, 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.041>
- Yen, T. B., & Chang, S. T. (2008). Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 99, 232-236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.022>

- Zelinka, S. L., Altgen, M., Emmerich, L., Guigo, N., Keplinger, T., Kymalainen, M., Thybring, E. E., & Thygesen, L. G. (2022). Review of wood modification and wood functionalization technologies. *Forests*, *13*, 1004. <https://doi.org/10.3390/f13071004>
- Zhang, B., Shu, G., Bao, C., Cao, J., & Tan, Y. (2017). Optimization of culture medium for *Lactobacillus bulgaricus* using Box-Behnken design. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology*, *21*(1), 3-10. <https://doi.org/10.1515/auaft-2017-0001>
- 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>
- Zhu, Y., Plaza, N., Kojima, Y., Yoshiida, M., Zhang, J., Jellison, J., Pingali, S. V., O'Neill, H., & Goodell, B. (2020). Nanostructural analysis of enzymatic and non-enzymatic brown-rot fungal deconstruction of the lignocellulose cell wall. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01389>