

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEN  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



**Département : Biologie**

# MEMOIRE

Présenté par

BENAZIZA Seifeddine  
BENDIOUIS Nesrine Baya

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En : Microbiologie Fondamentale

## Thème

**ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE  
*Thymus vulgaris***

Devant le jury composé de :

Encadrant	Dr. BOUALI Waffa	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice 1	Dr. MKEDDER Ilham	MCB	Université de Tlemcen
Examinatrice 2	Dr. M'HAMED Imane	MCB	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2020/2021**

## الملخص :

تقوم النباتات العطرية المختلفة بتجميع جزيئات الرائحة التي تشكل زيوتاً أساسية قادرة على إحداث تأثير مكافئ لتأثير المضادات الحيوية ، وذلك بفضل الطبيعة الكيميائية لمكوناتها

تهدف الدراسة الحالية إلى تحليل ثلاث مقالات كتبها **عبد الشاهي وآخرون. (2018)** ، و **Radünz et al** ، **Issepi et al. (2020)** ، **(2018)** حول دراسة النشاط المضاد للبكتيريا في المختبر وفي الجسم الحي *Thymus vulgaris* للزيت العطري من بطرق مختلفة: عن طريق نشر الأقراص على أجار و عن طريق تحديد الحد الأدنى لتركيز المثبط والجراثيم MIC / CMB مقابل البكتيريا سالبة الجرام وإيجابية الجرام.

أظهر زيت *Thymus vulgaris* الأساسي نشاطاً مضاداً للبكتيريا ضد جميع السلالات المختبرة. تم تسجيل تثبيط أفضل على البكتيريا سالبة الجرام مثل العصيات القولونية خلال 24 ساعة من التعرض ، مع تقليل 104 / CFU مل. كفاءة الزيت العطري المغلف عالية جداً بنسبة 88.9% ، وثبات حراري ممتاز وتشكل منتظم مع نشاط مضاد للميكروبات ، مما يسمح بالحفاظ على الطعام على المدى الطويل. الحد الأدنى للتركيزات المثبطة والجراثيم MIC / CMB المسجلة هي من 0.1 مجم / مل للبكتيريا الأربعة المختبرة *S.typhimurium* و *L. monocytogenes* و *S. aureus* و *E.coli*. أظهر الزيت العطري تأثيراً مثبطاً على السلالة البكتيرية *المكورات العنقودية* في مشروبات الزبادي Doogh.

في الختام ، تعمل الزيوت الأساسية بشكل مختلف على البكتيريا موجبة الجرام وسالبة الجرام. تظهر كفاءة كبيرة ومتغيرة. هذه تشير إلى أن استخدام زيت الزعتر الأساسي يمكن أن يحمي البشر بشكل أفضل من البكتيريا التي تسبب العدوى .

**الكلمات المفتاحية:** الزيوت الأساسية ، الغدة الصعترية ، الأنشطة المضادة للبكتيريا ، CMI

## Résumé :

Différentes plantes aromatiques synthétisent des molécules odorantes qui constituent les huiles essentielles capables d'exercer un effet équivalent à celui des antibiotiques, et cela grâce à la nature chimique de leurs constituants.

La présente étude vise à analyser trois articles de **Abdolshahi et al. (2018)**, **Radünz et al. (2020)** et **Issepi et al., (2018)** sur l'étude de l'activité antibactérienne *in vitro et in vivo* de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* par différentes méthodes : par diffusion des disques sur gélose et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide (CMI/CMB) vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a présenté une activité antibactérienne significative contre toutes les souches testées. Une meilleure inhibition a été enregistrée sur les bactéries à Gram négatif comme *E.coli* dans les 24 h d'exposition, avec une réduction de  $10^4$  UFC/ml. Une efficacité de l'huile essentielle encapsulée est très élevée 88,9%, une excellente stabilité thermique et une morphologie régulière avec une activité antimicrobienne élevée, ce qui permet une conservation de longue durée des aliments. Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI/CMB) enregistrées sont de l'ordre de 0.1 mg/ml pour les quatre bactéries testées *S.typhimurium*, *L.monocytogenes*, *S.aureus* et *E.coli*. L'huile essentielle a montré un effet inhibiteur sur la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* dans les boissons à base de yaourt (Doogh).

En conclusion, les huiles essentielles agissent différemment sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Elles montrent une efficacité importante et variable. Ceux-ci suggèrent que l'utilisation de l'huile essentielle de thym permettrait de mieux protéger l'homme contre les bactéries responsables des infections.

**Mots clés :** Huile essentielle, *Thymus vulgaris*, activités antibactériennes, CMI

- Abdolshahi, A., Naybandi-Atashi, S., Heydari-Majd, M., Salehi, B., Kobarfard, F., Ayatollahi, SA, ... & Sharifi-Rad, J. (2018). Activité antibactérienne de certaines espèces de Lamiacées contre *Staphylococcus aureus* dans la boisson à base de yaourt (Doogh). *Biologie cellulaire et moléculaire*, 64 (8). Pp : 71-77.

- Iseppi, R., Sabia, C., de Niederhäusern, S., Pellati, F., Benvenuti, S., Tardugno, R., ... & Messi, P. (2019). Activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et *Thymus vulgaris* L. et de leur combinaison contre les agents pathogènes d'origine alimentaire et les bactéries d'altération dans les légumes prêts à manger. *Recherche sur les produits naturels*, 33 (24). Pp : 3568-3572.

- Radünz, M., dos Santos Hackbart, HC, Camargo, TM, Nunes, CFP, de Barros, FAP, Dal Magro, J., ... & da Rosa Zavareze, E. (2020). Potentiel antimicrobien de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) encapsulée par atomisation sur la conservation des produits carnés de type hamburger. *Journal international de microbiologie alimentaire*, 330. Pp : 108696.

## **Abstract :**

Different aromatic plants synthesize scent molecules which constitute essential oils capable of exerting an effect equivalent to that of antibiotics, and this thanks to the chemical nature of their constituents.

The present study aims to analyze three articles by Abdolshahi et al. (2018), Radünz et al. (2020) and Issepi et al., (2018) on the study of the antibacterial activity *in vitro* and *in vivo* of the essential oil of *Thymus vulgaris* by different methods : by diffusion of discs on agar and by determining the minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC / CMB) against Gram-negative and Gram-positive bacteria.

*Thymus vulgaris* essential oil showed significant antibacterial activity against all strains tested. Better inhibition was recorded on Gram negative bacteria such as *E.coli* within 24 h of exposure, with a reduction of  $10^4$  CFU / ml. The efficiency of the encapsulated essential oil is very high 88.9%, excellent thermal stability and regular morphology with high antimicrobial activity, which allows long-term preservation of food. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC / CMB) recorded are of the order of 0.1 mg / ml for the four bacteria tested *S.typhimurium*, *L.monocytogenes*, *S.aureus* and *E.coli*. The essential oil has shown an inhibitory effect on the bacterial strain *Staphylococcus aureus* in yogurt drinks (Doogh).

In conclusion, essential oils act differently on Gram positive and Gram negative bacteria. They show significant and variable efficiency. These suggest that the use of thyme essential oil could better protect humans against the bacteria that cause infections.

**Keywords :** Essential oil, *Thymus vulgaris*, antibacterial activities, MIC



## **REMERCIEMENTS**

*Avant tout, en premier lieu nous tenons d'abord de remercier le dieu **Allah** le tout puissant, le maître de l'univers pour nous donner de la chance, courage et de la patience pour arriver à accomplir ce modeste travail.*

*En seconde lieu, on remercie humblement notre chère encadreur **Mme Bouali Waffa** pour tout ses conseils précieux et ses remarques, sa confiance, ses astuces, ses qualités humaines, et pour son aide durant toute la période de travail, ainsi ses sacrifices pour nous.*

*Nos sincères remerciements pour les membres du jury **Mme Mkkeder.I** Et **Mme Mhammedi.I...**, qui ont accepté d'examiner notre modeste travail et l'enrichir par leurs remarques professionnels et propositions.*

*Nous tenons aussi à remercier les techniciens de laboratoire de la faculté de la science de la nature et la vie et science de la terre et l'univers Tlemcen, sans oublier un chaleureux merci à **Mme Lemrini. W** et **Mme Mejdoub. H.***

*Nous remercions tous les enseignants de département de biologie pour leurs efforts durant tout le parcours universitaire.*

*En derniers mots on remercie chaque personne qui nous ont encouragé et soutenu tout ces années passées de près ou de loin....*

**De SEIFEDDINE ET NESRINE**

## **DÉDICACES**

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Ma chère mère **Zair Fadela***

*A mon cher père **Djamel***

*A mes sœurs **Imene , Chahineze ,Safaa , Douaa***

*A la mémoire de ma grande mère maternel, **Yamina***

*A toute ma grande famille **BENAZIZA , ZAIR***

*A tout mes amis et collègues*

*A mon cher binôme **Bendiouis Nesrine Baya***

*Aux étudiants de microbiologie fondamentale*

**De Seif**

---

*Je dédie ce modeste travail à :*

***À ma très chère grand-mère maternelle que j'aime plus que tous,***

*Je voulais tellement que tu sois là, à mes côtés mais c'est la vie. Tout d'abord que Dieu t'accueille dans son vaste paradis, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.*

***À mes chers parents,***

*Que dieu les gardes et les protèges. Je souhaite particulièrement exprimer ma reconnaissance envers mes parents qui ont toujours crus en moi et qui m'ont apportés leur soutien inconditionnel et leur confiance.*

***À la plus chère au monde entier MAMAN,***

*Tu représente pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien les études. Aucune dédicace ne saurait être exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte .*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation C'est grâce à vous que je suis arrivé là où j'en suis.*

***À mon père,***

*Qui s'est sacrifiés pour me prendre en charge tout au long de ma formation et qui est l'origine de ma réussite.*

*J'espère que ce mémoire sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous tes efforts.*

***À mon très cher frère,***

*Vous avez toujours été là présent pour les bons conseils, votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts*

***À mon adorable petite sœur,***

*Que Dieu illumine pour elle la voie du succès et de la réussite dans ses études.*

***À mon cher binôme,***

*Benaziza seifeddine Avec qui j'ai partagé de belles années d'études.*

***De Nesrine***

- **ANOVA** : analyse de la variance.
- **CCF** : plan composite central centré sur le visage.
- **CMI** : concentration minimale inhibitrice.
- **DSC** : calorimètre à balayage différentiel.
- **FICI** : l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire.
- **FTIR** : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.
- **HE** : huile essentielle.
- **HET** : huile essentielle *Thymus*
- **HETE** : huile essentielle *Thymus* encapsulée.
- **MEB** : microscope électronique a balayage.
- **Mg** : milligramme
- **ml** : millilitre
- **PAM** : prêt à manger.
- **RSM** : la méthode des surfaces de réponses.
- *S.aureus* : *Staphylococcus aureus*
- **T.I.A.C** : Les toxi-infections alimentaires collectives.
- *T.vulgaris* : *Thymus vulgaris*.
- **Ul** : microlitre.

<b>Listes des figures</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 01</b> : Aspect morphologiques de <i>Thymus</i>	<b>9</b>
<b>Figure 02</b> : Réduction logarithmique de <i>L. monocytogenes</i> dans des échantillons de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrigération en utilisant des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i>	<b>26</b>
<b>Figure 03</b> : Réduction logarithmique de <i>S. enteritidis</i> dans des échantillons de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrigération en utilisant des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i>	<b>27</b>
<b>Figure 04</b> : Réduction logarithmique de <i>Y. enterocolitica</i> dans des échantillon de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrigération en utilisant des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i>	<b>27</b>
<b>Figure 05</b> : Réduction logarithmique de <i>E.coli</i> dans des échantillons de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrigération en utilisant des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i>	<b>28</b>
<b>Figure 06</b> : Réduction logarithmique de <i>Pseudomonas spp</i> dans des échantillons de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrigération en utilisant des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> .	<b>28</b>
<b>Figure 07</b> : la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles encapsulées et non encapsulées de <i>T.vulgaris</i>	<b>35</b>
<b>Figure08</b> : la concentration minimale bactéricide des huiles essentielles encapsulées et non encapsulées de <i>T.vulgaris</i> ...	<b>35</b>

<b>Liste des tableaux</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 01</b> : classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	<b>10</b>

# Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	2
<b>Partie 01 : synthèse bibliographiques</b> .....	4
<b>Chapitre 01 : Plante médicinale, <i>Thymus vulgaris</i></b> .....	5
1 Les plantes médicinales .....	6
1.1. Généralités .....	6
1.2. La Phytothérapie .....	6
1.3. Utilisation des plantes médicinales .....	7
1.3.1. Pour un usage externe .....	7
1.3.2. Pour un usage interne .....	7
2. Généralités sur la plante .....	8
2.1. Famille des lamiacées .....	8
2.2. Genre <i>Thymus</i> .....	8
2.3. <i>Thymus vulgaris</i> .....	9
2.3.1. Présentation de la plante et sa répartition géographique .....	9
2.3.2. Description botanique de la plante.....	10
2.3.3. Classification .....	10
2.3.4. Nom vernaculaire .....	10
2.3.5. Composition chimique de <i>Thymus vulgaris</i> .....	11
2.3.6. Usage thérapeutique .....	11
2.3.7. Toxicité de <i>Thymus vulgaris</i> .....	12
<b>Chapitre 02 : les huiles essentielles</b> .....	13
1. Généralités.....	14
1.1 composition chimiques des huiles essentielles .....	15
2. Intérêt des huiles essentielles.....	16
3. Mécanisme des activités biologiques des huiles essentielles .....	16
3.1. Activité bactérienne et antifongique .....	16
3.2. Activité antivirale.....	17



<b>Chapitre 03 : <i>Thymus</i> et la conservation des aliments</b> .....	<b>18</b>
1. Intoxication alimentaire .....	19
1.1. Description .....	19
1.1.1. L'infection alimentaire .....	19
1.1.2 L'intoxication alimentaire .....	19
1.1.3. Les toxi-infections alimentaires collectives .....	20
2. Conservation des aliments .....	20
2.1. Applications et utilisation de <i>Thymus</i> pour la conservationDes aliments.....	20
2.1.1. Incorporation de thym dans le lait .....	20
2.1.2. Incorporation de thym dans les poissons et fruits de mer.....	21
2.1.3. Incorporation de thym dans la viande.....	22
<b>Partie 02 : Partie expérimentale :Traitement d'articles</b> .....	<b>23</b>
Analyse d'article 1 : Activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> et de <i>Thymus vulgaris L.</i> et leur combinaison contre les agents pathogènes d'origine alimentaire et les bactéries d'altération dans les légumes prêts à manger .....	25
Analyse d'article 2 : Potentiel antimicrobien de l'huile essentielle de thym ( <i>Thymus vulgaris</i> ) encapsulée par atomisation sur la conservation des produits carnés de type hamburger .....	31
Analyse d'article 3 : Activité antibactérienne de certaines espèces de Lamiacées contre <i>Staphylococcus aureus</i> dans les Boissons à base de yaourt (Doogh).....	38
<b>Conclusion</b> .....	<b>41</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>42</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>54</b>

# **Introduction générale**

Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments. Ce développement constitue une étape indispensable pour l'essor de tout un secteur lié aux besoins non seulement de la thérapie, mais aussi de l'industrie agroalimentaire, de la cosmétique et de la parfumerie. Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir inhibiteur des microorganismes et des capacités antioxydantes.

Les huiles essentielles, qui sont des mélanges complexes de substances biologiquement actives, sont classées comme des produits naturels ayant un potentiel pharmacologique pouvant présenter un intérêt thérapeutique dans le traitement et la gestion des maladies humaines, ce sont des substances naturelles ayant une riche source de composés aux propriétés antimicrobiennes et potentialisatrices d'antibiotiques. Avec l'écllosion de la résistance aux antimicrobiens dans le monde, les huiles essentielles et leurs composants sont avérés fournir des molécules modèles utiles pour le développement de médicaments antimicrobiens alternatifs **(Aumeeruddy-Elalfi et al., 2016)**.

*Thymus vulgaris* est une plante de la famille des lamiacées connu pour ses effets bénéfiques sur la santé de l'être humain, sous différents usages comme des infusions, des conservateurs alimentaires, ou même pour l'aromatisation des plats. Les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* agissent sur des différents microorganismes pathogènes **(Hosseinzadeh et al., 2015)**.

Les aliments peuvent être les vecteurs ou de véritables milieux de culture de microorganismes. Ils sont alors potentiellement capables de provoquer diverses affections chez le consommateur dont la gravité dépend d'abord de la nature et du nombre de microorganismes et/ou de la toxicité de leurs produits d'excrétion **(Schlundt et al., 2010)**.

Les plantes sont très utilisées dans le secteur agro alimentaire pour leurs effets multiples. Ces dernières sont aussi utilisées comme conservateur car elles peuvent limiter l'oxydation des lipides et agissent comme agent antimicrobien contre les micro-organismes pathogènes. L'incorporation des plantes dans les aliments peut avoir un impact positif sur la santé du consommateur.

Ce travail vise à analyser trois articles sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* vis-à-vis des souches bactériennes.

Ce travail est structuré en deux grandes parties :

✓ La première partie est d'ordre théorique comporte trois chapitres, nous aborderons dans le premier des données sur les plantes médicinales et les propriétés thérapeutiques de *Thymus vulgaris*, le deuxième est réservé pour l'étude des huiles essentielles et le troisième chapitre est consacré pour des applications et des utilisations de *Thymus vulgaris* pour la conservation des aliments.

✓ La deuxième partie est d'ordre expérimental, suite aux conditions sanitaires à cause de la pandémie mondiale du Covid-19, cette partie est présentée sous forme d'un traitement de trois articles sur l'évaluation d'efficacité des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*.

✓ Finalement, la dernière partie consacrée pour une conclusion générale

**PREMIERE**

**PARTIE**

**Synthèse**  
**Bibliographique**

**Chapitre 1.**  
**Plante médicinale,**  
*Thymus vulgaris*

## **1. Les plantes médicinales :**

### **1.1. Généralités**

Les plantes médicinales sont les plantes qui auraient une activité pharmaceutique pouvant mener à des emplois thérapeutiques, cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain (**Tefiani, 2015**).

En d'autres termes nous pouvons dire qu'une plante médicinale est une plante dont un des organes, comme la feuille ou l'écorce, contient des vertus curatives lorsqu'il est utilisé à un certain dosage et d'une manière précise (**Debuigne, 1974**). La plante est un organisme vivant, marque son identité par des caractéristiques morphologiques, à l'origine de la classification botanique, et même biochimiques, liées à des voies de biosynthèses inédites, qui représentent l'intérêt de l'usage des plantes médicinales (**Bruneton, 1987**).

### **1.2. La Phytothérapie :**

La phytothérapie est un mot grec qui signifie « se soigner par les plantes ». Elle repose en partie sur la pratique traditionnelle, basée sur l'utilisation ancestrale et locale des plantes. Les plantes médicinales renferment de nombreux métabolites actifs « plus de 250 » qui ont des activités thérapeutiques complémentaires. Ces derniers ont été étudiés et reproduits chimiquement pour être incorporés de nos jours dans de nombreux médicaments. La phytothérapie dans un autre sens c'est le traitement thérapeutique basé sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels, dans le but de soulager, guérir ou prévenir une maladie. Plusieurs produits de phytothérapie sont mis sur le marché, sous différentes galéniques : « comprimés, gélules en formes solides, fluides sous forme d'ampoules ou en flacon ». Rendant le choix difficile, il faut l'utilisation d'une plante fraîche, sèche, issue de l'agriculture biologique ou non biologique a un impact sur sa teneur et sa richesse en actifs, il ya différentes parties de la plante qui présentent des compositions chimiques différentes comme pétales, racines, écorce, feuilles, rhizome... (**Vidal, 2010**).

### 1.3. Utilisation des plantes médicinales :

Pour garantir l'action du médicament, il est important de traiter la plante, et de la transformer pour en extraire la substance ayant une action «spécifique». Etant donné la multiplicité des composants constituant les principes actifs de chaque plante et la spécificité d'action de chacun d'entre eux il a été nécessaire d'élaborer des méthodologies variées, qui permettent, selon l'objectif recherché leur extraction, ces manipulations sont au nombre de quatre : la décoction, la macération, l'infusion et l'extraction des sucs (Chiej, 1982; Tefiani, 2015).

Les plantes ont été utilisées uniquement en nature, sous forme de tisanes ou de poudres. Maintenant beaucoup sont présentées en gélules, mais il existe nombreuses formes d'utilisation des plantes médicinales. De plus en plus des plantes sont utilisées en mélange. Pour ces préparations, des règles de bonnes pratiques officinales ont été instaurées. Plusieurs paramètres sont à respecter comme le nombre de plantes, les associations possibles, ou encore le goût qui devra être adapté au client. L'âge d'acquéreur et son état devront également être pris en compte. Par exemple La menthe sera évitée chez une personne ulcéreuse (Bézanger-Beauquesne, 1986).

Les plantes médicinales peuvent être consommées sous différentes formes :

#### 1.3.1. Pour un usage externe :

Lotion, bain, fumigation (faire bouillir ou brûler des plantes et en respirer les vapeurs).

#### 1.3.2. Pour un usage interne :

- Sous leur forme classique connue : décoction, macération, infusion, plante séchée réduite en poudre incorporée aux aliments ou en gélules à avaler.
- Sous leur forme moderne : différents préparations : alcooliques « plante en dilution dans de l'alcool », huileuses ou à base d'autres solvants, à prendre en gouttes à avaler '**phytomédicaments**' vendus en pharmacie, utilisant des procédés plus standardisés « extraits secs mis en gélules, etc. ».

Il y a plusieurs techniques pour conserver les herbes comme la congélation, le séchage, la réfrigération, les vinaigres, les herbes confites dans des gelées, des préparations cosmétiques, des huiles essentielles, etc. (Valnet, 2001).



## 2. Généralités sur la plante :

### 2.1. Famille des lamiacées :

Le *Thymus* appartient à la famille des Lamiacées (anciennement Labiatae) est l'une des plus grandes familles de plantes (Kadereit, 2004; Mabberley, 2017). La plupart des membres de la famille accumulent des terpènes volatils, principalement dans les glandes épidermiques des feuilles, les tiges et les structures reproductrices et une série d'autres composants (iridoïdes, composés phénoliques et de l'acide rosmarinique) dans les feuilles, les tiges et les racines (Wink, 2003).

### 2.2. Genre *Thymus* :

Le nom *Thymus* dérive du mot grec « thymos » qui veut dire ‘parfumer ‘ parce que la plante dégage une agréable odeur (Pariante, 2001). Le genre *thymus* inclut environ 300 espèces à travers le monde dont 11 sont localisées en Algérie (Kabouche et al., 2005). Les *Thymus* sont caractérisés morphologiquement par leur habitude ou leurs formes de vie, ce sont des plantes très résistantes, ce qui leur permet de vivre sous des conditions climatiques extrêmes conditions concernant la température et l'approvisionnement en eau. Ils n'évitent ni le froid ni sécheresse. (Stahl-biskup; Sàez, 2002). Comprenant 220 espèces de plantes sauvages, à une taxonomie complexe. Les membres de ce genre représentent des herbes et des sous-arbustes pérennes aromatiques, originaires d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie. Le *Thymus* est couramment utilisé comme herbe culinaire dans de nombreux pays et son huile est utilisée comme agent aromatisant dans l'industrie alimentaire. Traditionnellement, le thym a été utilisé pour le traitement de nombreuses maladies liées à une infection des voies respiratoires supérieures, telles que la grippe, la toux, la bronchite aiguë et chronique. Le thymol, un constituant majeur de l'huile essentielle de *Thymus*, est un mono terpène phénolique, qui présente une activité antimicrobienne substantielle. Par conséquent, il a été utilisé efficacement comme antiseptique (Khadir et al., 2016). Une grande importance pharmacologique que le *Thymus* possède, vu son huile essentielle est dotée d'activités antibactériennes, antifongique et expectorante (Amarti et al., 2008).

### 2.3. *Thymus vulgaris* :

#### 2.3.1. Présentation de la plante et sa répartition géographique :

*Thymus vulgaris* est une espèce de plante à fleurs de la famille des menthes lamiacées, originaire du sud de l'Europe, de l'ouest de la Méditerranée au sud de l'Italie. C'est un sous-arbuste à feuilles persistantes touffues et ligneuses avec de petites feuilles gris-vert très aromatiques et des grappes de fleurs violettes ou roses au début de l'été. Le thym pousse bien dans un climat tempéré à chaud, sec et ensoleillé, et partout où les plantes ne semblent pas être ombragées. Les espèces de *thym* réussissent mieux dans les sols grossiers et rugueux qui peuvent ne pas convenir à plusieurs plantes alternatives (Christopher, 2003)



**Figure 01** : Aspect morphologiques de *Thymus* (Iserin, 2001).

*Thymus vulgaris* est une plante médicinale qui est plus utilisée que d'autres espèces sous des formes thérapeutiques, largement utilisée dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. En médecine traditionnelle, *T. vulgaris* est cultivé dans de nombreux pays par la plupart des gens, en particulier dans les zones rurales, en fonction des plantes médicinales pour soigner de nombreuses maladies, y compris les affections liées à l'inflammation comme les rhumatismes, les gonflements musculaires, les piqûres d'insectes, les douleurs, etc. (Hosseinzadeh et al., 2015).

### 2.3.2. Description botanique de la plante :

*Thymus vulgaris* L. est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, pouvant atteindre 40 cm de hauteur .Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncés, et qui sont recouvertes de poils et de glandes « appelés trichomes ». Les trichomes comprennent l'huile essentielle généralement composée de mono terpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en grappes et leur couleur varie du blanc au mauve en passant par le rose .*Thymus vulgaris* est caractérisé par un polymorphisme floral qui a été aussi étudié que son polymorphisme chimique (Bruneton, 1999; Morales, 2002).

### 2.3.3. Classification :

Ce classement se fonde à la classification botanique ancienne de Morales, (2002) synthétisée dans le tableau 01.

**Tableau 01** : classification botanique de *Thymus vulgaris* (Morales, 2002)

<b>Règne</b>	<i>Plantes</i>
<b>Sous règne</b>	<i>Plantes vasculaire</i>
<b>Embranchement</b>	<i>Spermaphytes</i>
<b>Sous embranchement</b>	<i>Angiosperme</i>
<b>Classe</b>	<i>Dicotylédones</i>
<b>Sous classe</b>	<i>Dialypétales</i>
<b>Ordre</b>	<i>Labiales</i>
<b>Famille</b>	<i>Lamiacées</i>
<b>Genre</b>	<i>Thymus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Thymus vulgaris</i> L

### 2.3.4. Nom vernaculaire :

Les noms vernaculaires « vulgaires » de l'espèce *Thymus vulgaris* sont les suivants :

- **Arabe** : zaïtra
- **Français** : thym vulgaire, thym de jardins, farigoule, farigoule et barigoule.
- **Allemande** : Thymian, Echter Thymian, Garten thymian, RÖmischer thymian, romischer quendel, welscher thymian kutteelkraut.
- **Anglais** : common thym, garden thym (Teuscher et al., 2005).

### 2.3.5. Composition chimique de *Thymus vulgaris* :

L'huile suprême de *Thymus vulgaris* a montré une teneur élevée en mono terpènes oxygénés (56,53%) et de faibles teneurs en hydrocarbures mono terpènes (28,69%), les hydrocarbures ses qui terpéniques (5,04%) et de ses qui terpènes oxygénés (1,84%). Le composé prédominant des composants d'huile peu supérieure était thymol (51,34%), la quantité ruée de tous les autres composants de l'huile est inférieure à 19% (Maher Ali Ahmed et al., 2015) Les plus abondant sont respectivement : thymol (44.4\_58,1%) p-cymene (9.1- 18.5 %), terpiène (6.9 -18.0%), carvacrol (2.4 – 4.2 %), linalol (4.0 -6.2 %). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée en thymol (Bouhdid et al., 2006).

### 2.3.6. Usage thérapeutique :

De nombreuses expériences pharmacologiques *in vitro* réalisées au cours de la dernière décennie ont révélé des activités pharmacologiques bien définies à la fois, l'huile essentielle de thym et les extraits de plantes. L'usage non médicinal du thym mérite l'attention, car le thym est utilisé dans les industries alimentaires et aromatiques; il est largement utilisé comme ingrédient culinaire et il sert de conservateur pour les aliments notamment en raison de son effet antioxydant. L'huile essentielle de thym constitue la matière première en parfumerie et en cosmétique grâce à un arôme particulier et caractéristique. L'huile de *Thymus vulgaris* est une combinaison de mono terpènes et ceux-ci agissent comme des activités anti-oxydantes, antimicrobiennes, médicamenteuses, anti-tissulaires, antispasmodiques et antibactériennes (Marculescu et al., 2007).

Les avantages importants revendiqués pour les utilisations thérapeutiques des plantes médicinales dans différentes affections sont leur sécurité en plus d'être économiques, efficaces et leur disponibilité facile. En raison de ces avantages, les plantes médicinales ont été largement utilisées par les praticiens de la médecine traditionnelle dans leur pratique quotidienne ( Cronquist, 1988 ) pour le traitement des petites plaies après lavage abondant ,en cas de nez bouché, pour soulager les piqûres d'insectes et les douleurs rhumatismales, en bain de bouche pour l'hygiène buccale, et aussi comme additif de bain préparé par décoction qui stimule l'écoulement de sang vers la surface du corps humain, qui soulageant par ce fait la dépression nerveuse (Poletti, 1988; Brunton, 1999). Parmi tous les métabolites secondaires végétaux qui agissent comme des antioxydants, les composés phénoliques

forment un groupe important et varié. Les composés phénoliques contribuent de manière significative au potentiel antioxydant de plusieurs espèces végétales (Cronquist, 1988).

L'utilisation aveugle d'antibiotiques pour lutter contre les bactéries pathogènes a accru leur résistance aux antibiotiques. Les bactéries multi résistantes sont un problème croissant ces dernières années et posent de sérieuses difficultés thérapeutiques en raison de leur niveau de résistance plus élevé. Une alternative à ce problème sérieux consiste à utiliser des huiles essentielles de diverses plantes pour le contrôle bactérien. La plupart des études se sont concentrées sur des tests *in vitro* de la propriété antimicrobienne de ces huiles et ont même comparé l'utilisation de ces huiles à des antibiotiques commerciaux (Horváth et al., 2016).

*Thymus vulgaris* contient une grande quantité des huiles essentielles que les autres espèces de thym, qui présente des effets anti-tissulaires et expectorants considérables (Verpoorte, 2000). Les huiles essentielles, qui sont des mélanges complexes de substances biologiquement actives, sont classées comme des produits naturels ayant un potentiel pharmacologique pouvant présenter un intérêt thérapeutique dans le traitement et la gestion des maladies humaines. Les huiles essentielles extraites d'herbes médicinales et de plantes alimentaires sont de plus en plus intéressants pour leurs multiples propriétés. La prise de conscience accrue des substances naturelles alternatives pousse la communauté de recherche à trouver de nouvelles voies pour les agents pharmacologiques naturels. Dans cette quête, les huiles essentielles ont été mises en évidence comme des substances naturelles ayant une riche source de composés aux propriétés antimicrobiennes et potentialisatrices d'antibiotiques. Avec l'éclosion de la résistance aux antimicrobiens dans le monde, les huiles essentielles et leurs composants se sont avérés fournir des molécules modèles utiles pour le développement de médicaments antimicrobiens alternatifs (Aumeeruddy-Elalfi et al., 2016).

### 2.3.7. Toxicité de *thymus vulgaris* :

*Thymus vulgaris* L. est largement utilisé comme ingrédient en cuisine et en phytothérapie. Cependant, il existe peu d'informations sur sa toxicité. L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a une toxicité orale modérée. Il est conseillé de ne pas utiliser de fortes doses pour éviter d'éventuels effets néfastes sur la santé (Rojas-Armas et al., 2019).

# **Chapitre 2.**

## **Les huiles essentielles**

### 1. Généralités :

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques et volatils extraits de matière végétale, comme les fleurs, les racines, l'écorce, les feuilles, les graines, la peau, les fruits, le bois et la plante entière (**Deans et Ritchie, 1987; Hammer et al., 1999; Sánchez et al., 2010**). Les huiles essentielles sont utilisées depuis des siècles en parfumerie, en médecine, en cosmétique et ont été ajoutées aux aliments dans le cadre d'épices ou d'herbes. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, offrant une forte concentration en principes actifs.

Près de 3000 huiles essentielles différentes sont connues et 300 sont utilisées commercialement sur le marché des arômes et des parfums (**Burt, 2004**). En effet, ces essences végétales se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces groupées en 60 familles botaniques comme par exemple chez les Myrtacées (eucalyptus, ...), Lamiacées (lavande, basilic, menthe, ...), les Apiacées (coriandre, cumin, persil, ...) et les Lauracées (cannelle et sassafras) et (**Ritchter, 1993**).

Les huiles essentielles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent, regroupées en canaux ou en poches sécréteurs et sont ensuite transportées dans les différentes parties de la plante, lors de la croissance de cette dernière. Beaucoup de travaux sont réalisés dans ce sens, du fait de l'importance incontestable des huiles essentielles dans divers secteurs économiques, comme par exemple, l'industrie de la cosmétique et de la parfumerie, l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique et plus particulièrement, la branche de l'aromathérapie qui utilise leurs propriétés fongicides et bactéricides (**Bakkali, 2008**).

Une huile essentielle n'est pas forcément huileuse, il s'agit d'une essence volatile contenue dans une partie de plante aromatique. Cette essence possède des propriétés biochimiques qui peuvent avoir un impact positif et important sur la santé (**Festy et Pacchioni, 2016**).

### 1.1.Composition chimique des huiles essentielles :

La composition chimique des huiles essentielles est complexe et peut se varier selon l'organe, les facteurs climatiques, la nature du sol, les pratiques culturales et la technique d'extraction. Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices, et s'assemblent dans des cellules glandulaires, localisées en surface de la cellule. Ensuite, elles sont stockées dans les cellules dites « cellules à huiles essentielles » ou dans des poils sécréteurs, ou dans des poches sécrétrices (**Bruneton, 1999 ; Hazzit, 2002 ; Boz et al., 2009**).

Les huiles essentielles sont des mélanges de 20 à 55 composants à des concentrations assez différentes, certains composés à des concentrations assez élevées (30 à 70%) et d'autres à l'état de traces. Les composants à fortes concentrations (terpènes, terpénoïdes, molécules à anneau aromatique) jouent un rôle majeur dans l'effet antimicrobien et biologique des HE (**Bakkali et al., 2008**). Certains composés importants des HE sont les mono et sesquiterpènes, les glucides, les phénols, les alcools, les éthers, les aldéhydes et les cétones (**Speranza et Corbo, 2010**). Les composés phénoliques ont également été reconnus comme des composants bioactifs (**Tabassum et Vidyasagar, 2013**).

Les huiles essentielles contenant des aldéhydes ou des phénols comme composants principaux « cinnamaldéhyde, citral, carvacrol, eugénol ou thymol » sont les plus efficaces, suivies des HE contenant des alcools terpéniques (**Bassolé et Juliani, 2012**). Les huiles essentielles avec des cétones ou des esters «  $\beta$ -myrcène,  $\alpha$ -thuyone ou acétate de géranyle » possèdent une activité plus faible (**Dormans et Deans, 2000 ; Barros et al., 2009**). Bien que les composants majeurs des huiles essentielles soient très importants pour leur activité biologique, les composants mineurs jouent un rôle important, car ils peuvent renforcer les effets des composants majeurs, bien qu'antagonistes, et des effets additifs ont également été observés (**Bassolé et Juliani, 2012**).

La composition des huiles essentielles dépend des saisons de récolte et des sources géographiques (**Burt, 2004**), ainsi que de la partie de la plante, par exemple, l'HE des graines de coriandre (*Coriandrum sativum* L.) présente une composition différente de l'HE de la coriandre, produit à partir de feuilles immatures (**Delaquis et al., 2002**).



## 2. Intérêt des huiles essentielles :

L'utilisation de substances naturelles a suscité un intérêt croissant et certaines questions concernant la sécurité des composés synthétiques ont encouragé des études plus détaillées des ressources végétales. Les huiles essentielles ont une large application dans la médecine, la conservation alimentaire, ainsi que dans les industries de la parfumerie. Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles sont connues depuis de nombreux siècles ainsi leur propriétés antioxydants. Ces dernières années « 1987-2001 », un grand nombre d'huiles essentielles et de leurs constituants ont été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes contre certaines bactéries et champignons dans plus de 500 rapports (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

## 3. Mécanisme des activités biologiques des huiles essentielles :

Jusqu'à présent, aucune étude ne peut nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des huiles essentielles. Compte tenu de la complexité de leur composition chimique, tout suggère que ce mode d'action est complexe et qu'il est difficile d'identifier le voie d'action. Il est très probable que chacun des constituants des huiles essentielles ait son propre mécanisme d'action (**Djilani et Dicko, 2012**).

### 3.1. Activité bactérienne et antifongique :

En raison de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probablement que leur activité antimicrobienne n'est pas due à un seul mécanisme, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire. Ensuite, différents modes d'action sont impliqués dans l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. L'une des possibilités d'action est la génération de dommages irréversibles à la membrane de cellules bactériennes, qui induisent des pertes de matière (cytoplasmique), des fuites d'ions, des pertes d'énergie substrat (glucose, ATP), conduisant directement à la lyse des bactéries (cytolyse) et donc à sa mort. Une autre possibilité d'action est l'inhibition de la production d'amylase et de protéase qui arrêtent la production de toxines, le flux d'électrons et entraînent la coagulation du contenu cellulaire (**Burt, 2004; Di Pasqua et al., 2007; Hammer et al., 2008 Bakkali et al., 2008** )

Les actions antifongiques sont assez similaires à celles décrites pour les bactéries. Cependant, deux autres phénomènes inhibant l'action de la levure méritent

d'être mentionnés: l'établissement d'un gradient pH à travers la membrane cytoplasmique et le blocage de la production d'énergie des levures qui impliquent la rupture de la membrane bactérienne. Dans une étude le carvacrol avait l'effet le plus puissant contre *Listeria monocytogenes*, suivi par le thymol, l'eugénol, le cinnamaldéhyde et l'isoeugénol. Dans des études comparatives incluant les huiles essentielles de thym, les huiles se sont révélées une activité antibactérienne remarquable. Les huiles essentielles de deux espèces de *Thymus* (*T. vulgaris* L., *T. serpyllum* L.) ont montré un effet inhibiteur suffisant contre souches de référence de *E. coli*, *E. coli* O157: H7, *S.aureus* et *Y. enterocolitica* (Alma et al., 2003).

### 3.2. Activité antivirale :

Le mélange complexe d'huiles essentielles montre généralement une activité antivirale plus élevée que composés individuels « due probablement à des phénomènes de synergie » à l'exception de  $\beta$ -caryophyllène, qui est le composé antiviral le plus connu dans de nombreuses huiles essentielles de différentes familles de plantes. Différents mécanismes d'activité antivirale de différentes huiles essentielles et leurs constituants semblent être présentes. L'activité antivirale de l'huile essentielle est principalement due à des effets virucides directs (en dénaturant la structure virale protéines ou glycoprotéines). Les mécanismes proposés suggèrent que les huiles essentielles interfèrent avec l'enveloppe virale en inhibant des processus spécifiques dans le cycle de réplication virale ou en masquant les composants viraux, qui sont nécessaires pour l'adsorption ou l'entrée dans les cellules hôtes, ainsi, ils empêchent la diffusion du virus de cellule à cellule (Saddi et al., 2007).

# **Chapitre 3.**

## ***Thymus* et la conservation des aliments**

## **1. Intoxication alimentaire :**

### **1.1. Description :**

Les maladies d'origine alimentaire sont une menace omniprésente qui peut être provoqué par les produits chimiques, les métaux lourds, les parasites, les champignons, les virus et les bactéries. L'intoxication alimentaire liée aux bactéries est la plus courante, mais moins de 20 des milliers de bactéries différentes en sont les coupables. Plus de 90% des cas d'intoxication alimentaire sont chacun causés par *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* entéropathogène. Ces bactéries se trouvent couramment dans de nombreux aliments crus. Une mauvaise hygiène personnelle, un mauvais nettoyage des zones de stockage et de préparation et des ustensiles sales provoquent la contamination des aliments crus et cuits. Une mauvaise manipulation des aliments crus et cuits permet aux bactéries de se développer. Une cuisson insuffisante ou une transformation inadéquate des aliments en conserve à la maison peuvent provoquer des intoxications alimentaires très graves (**Wagner, 1989**).

#### **1.1.1. L'infection alimentaire :**

Les infections alimentaires sont des maladies d'origine alimentaire qui surviennent lors de l'ingestion d'aliments ou de boissons contaminées par des microorganismes pathogène (bactéries, virus, parasites), suivie d'une multiplication dans l'hôte, accompagnée par une invasion tissulaire et / ou la libération de toxines qui causent par la suite des troubles (**Prescott et al., 2010**).

#### **1.1.2. L'intoxication alimentaire :**

Les intoxications alimentaires sont causées par l'ingestion de toxines secrétées dans l'aliment par des germes pathogènes. Par exemple une toxine botulinique, entérotoxine Staphylococcique, une mycotoxine, les symptômes de la maladie sont seulement due à les toxines libérées non a leur bactéries productrices (**Bousseboua, 2005**).

### 1.1.3. Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) :

Une toxi-infection alimentaire collective est une maladie souvent infectieuse causée par l'ingestion des aliments contaminés par quelques agents infectieux ou par leur toxine. Une toxi-infection alimentaire collective est une maladie à déclaration obligatoire qui a lieu lorsqu'il existe au moins deux cas groupés, avec des manifestations similaires dues à une contamination par un micro-organisme « bactéries en général » ou une toxine (Diallo, 2010).

Les agents infectieux les plus souvent en cause sont les bactéries (*Salmonella*, *Staphylococcuse*, *Clostridium*, *Camphylobacter*) et certains virus comme les rota virus (Diallo, 2010).

## 2. Conservation des aliments :

### 2.1. Applications et utilisations de *Thymus* pour la conservation des aliments :

Les plantes produisent des composés phytochimiques pour se protéger des bactéries, virus et champignons, L'incorporation des plantes dans les aliments peut les protéger des altérations microbiennes (Carocho et al., 2014).

Les herbes et les épices font partie des composés naturels actuellement utilisés comme aliments conservateurs, contiennent des composés qui présentent des propriétés antimicrobiennes efficaces (Frag et al., 1989).

#### 2.1.1. Incorporation de thym dans le lait :

Les effets de la supplémentation de l'alimentation animale avec des dérivés du thym et leur influence sur la qualité de lait ont été rapportés par Kraszewski et al. (2004). Ces auteurs ont étudié les effets de la supplémentation de l'alimentation des vaches avec un mélange de plantes aromatiques contenant de la menthe poivrée (*Mentha piperita* L.), camomille (*Matricaria chamomilla* L.), ortie (*Urtica dioica* L.), achillée millefeuille (*Achillea millefolium* L.) et le thym (*Thymus vulgaris* L.), et ils ont obtenu des résultats positifs en matière de rendement laitier et la composition technologique du lait (Sharma et al., 1998).

L'activité antioxydante du thym est particulièrement utile dans la conservation des aliments. Par exemple, l'incorporation de feuilles de « *T.zygis* » dans les aliments pour chèvres a donné des fromages et du lait additionnés de valeurs bromatologiques,

qui ont augmenté la stabilité à l'oxydation d'un fromage typique (**Boutoial et al., 2013**). Dans ce cas, les composés du thym interfèrent avec les réactions de propagation d'oxydation (**Nieto, 2020**).

### 2.1.2. Incorporation de thym dans les poissons et fruits de mer :

La stratégie d'utilisation d'extraits naturels comme agents de conservation des poissons et fruits de mer est une réponse à les préoccupations des consommateurs concernant les additifs industriel et les incidences sur l'environnement (**Román, et al., 2017**). En général, pour ce type d'application, l'huile essentielle de thym et les extraits sont utilisés pour l'immersion « pendant 30 min, suivi par drainage du produit » ou appliqué sur des films ou ajouté à la surface du poisson (des deux côtés).

Différentes études sur l'utilisation du thym dans les poissons et fruits de mer ont appliqué des concentrations allant de 0,1 à 3%. Une autre alternative est l'inclusion de l'HE dans les revêtements et les films d'emballage sur les fruits de mer pour contribuer à leurs effets conservateurs. Pour explorer les effets des films polymères contenant de l'huile essentielle de thym, **Jouki et al. (2014)** ont étudié l'inclusion de 2% d'huile de thym dans des films de mucilage de graines de coing intégré dans l'arc en ciel réfrigéré filets de truite. Ces auteurs ont rapporté que le thym inhibait le développement des bactéries lactiques, bactéries psychrophiles, *Pseudomonas spp.* et *Enterobacteriaceae*

De plus, **Gómez-Estaca et al. (2010)** ont étudié les effets de différents HE (y compris le thym) contre 18 souches bactériennes dans l'extrait de muscle de poisson et a conclu que l'huile de clou de girofle était la meilleure antimicrobienne ; la deuxième meilleure était le romarin, suivi des huiles de thym et de lavande. Ces huiles essentielles étaient capables d'inhiber *Pseudomonas fluorescens* et *Pseudomonas aeruginosa* ; cependant, en accord avec ces résultats, **Huang et al. (2018)** ont montré que l'HE de thym n'était pas capable d'inhiber *Pseudomonas spp.*

### 2.1.3. Incorporation de thym dans la viande :

Différentes études ont été menées sur le thym pour étudier ses propriétés de stabilisation des lipides chez viande et produits carnés. **Harpaz et al. (2003)** ont rapporté l'effet de l'addition directe d'HE de thym dans des aliments commerciaux.

L'activité antimicrobienne du thym a été démontrée *in vitro* (**Burt, 2004**) et de son application directe dans les produits animaux en général, ainsi que dans le veau (**Skandamis et al., 2002**) et l'agneau en particulier (**Moñino et al., 2008**).

Dans le même ordre d'idées, des chercheurs précédents ont signalé que des niveaux élevés des huiles essentielles qui sont nécessaires pour obtenir une activité bactériostatique contre les agents pathogènes dans les aliments ne seraient pas applicables aux denrées alimentaires car ils entraînent des propriétés organoleptiques négatives (**Holley et al., 2005; Nieto, 2020**).

**DEUXIEME**

**PARTIE**

**Traitement d'articles**



NATURAL PRODUCT RESEARCH, 2018  
<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1482894>



SHORT COMMUNICATION



## Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables

Ramona Iseppi , Carla Sabia, Simona de Niederhäusern, Federica Pellati , Stefania Benvenuti , Roberta Tardugno, Moreno Bondi and Patrizia Messi

Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

### ABSTRACT

The antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils (EOs), and their combination against food-borne and spoilage bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas* spp.) was determined. The EOs inhibitory effect was evaluated both *in vitro* by using the disk diffusion assay and the minimum inhibitory concentration (MIC) determination, and *on food* by using an artificially contaminated ready-to-eat (RTE) vegetables. The results showed that the lowest MIC values were obtained with *R. officinalis* and *T. vulgaris* EOs against *E. coli* (4 and 8  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , respectively). The incorporation of the EOs alone or their combination in RTE vegetables reduced the viable counts of all the tested strains. Lastly, in the *on food* study we simulated the worst hygienic conditions, obtaining results that can be considered a warranty of safety.

### ARTICLE HISTORY

Received 20 March 2018  
Accepted 28 May 2018

### KEYWORDS

Ready-to-eat products; EOs antibacterial activity; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella enteritidis*; *Yersinia enterocolitica*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas* spp

### 1. Titre d'article :

Activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis L.* et de *Thymus vulgaris L.* et leur combinaison contre les agents pathogènes d'origine alimentaire et les bactéries d'altération dans les légumes prêts à manger.

### 2. Problématique et objectif :

Les légumes prêts-à-manger (**PAM**) comprennent principalement les légumes frais ,vendu dans des contenants en plastique scellés, après lavage, épluchage, tranchage, désinfection, rinçage, séchage et conditionnement pour prolonger leur durée de conservation, sans autre manipulation par le consommateur. Cependant, les légumes PAM peuvent être contaminés par des bactéries d'altérations d'origine alimentaire, pathogènes à toutes les étapes du processus de production jusqu'à la consommation. Les légumes coupés prêts-à-manger, peuvent être les vecteurs ou de véritables milieux de culture de microorganismes. Ils sont alors potentiellement capables de provoquer diverses affections chez le consommateur (**Brandl, 2006**).

Plus récemment, un intérêt accru pour de nouvelles méthodes de conservations basées sur l'utilisation de substances naturelles. Les huiles essentielles, sont aussi utilisées comme conservateur elles peuvent agir comme agent antimicrobien contre les micro-organismes pathogènes cette étude a été déjà approuvée par la Food and Drug Administration.

Dans ce cadre, l'objectif de la présente étude consiste à évaluer l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis L.* et *Thymus vulgaris L.*, à la fois *in vitro* et *in vivo* directement sur les légumes **PAM**, artificiellement contaminés par cinq bactéries (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas spp.*).

### 3. Les activités réalisées dans ce travail :

✓ L'analyse chimique des huiles essentielles selon la méthode de **Tardugno Pellati et al. (2018)**.

✓ Détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de diffusion des disques sur gélose vis-à-vis des microorganismes d'altérations d'origine alimentaire

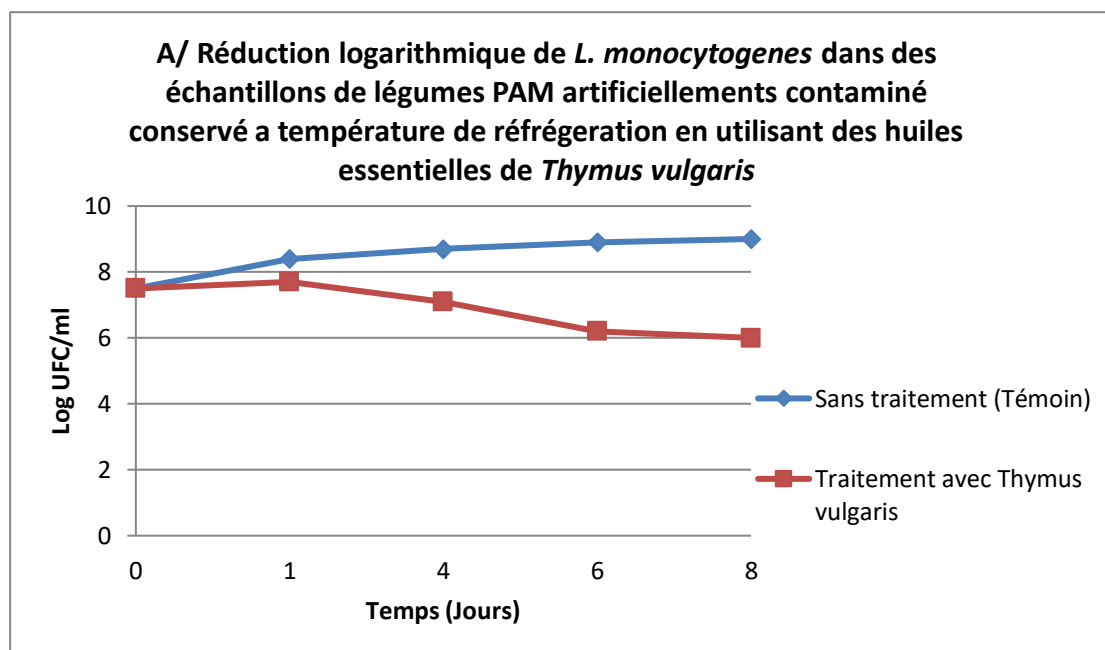
✓ Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

✓ Evaluation de l'activité antibactérienne *in vivo* des huiles essentielles dans les légumes PAM artificiellement contaminés.

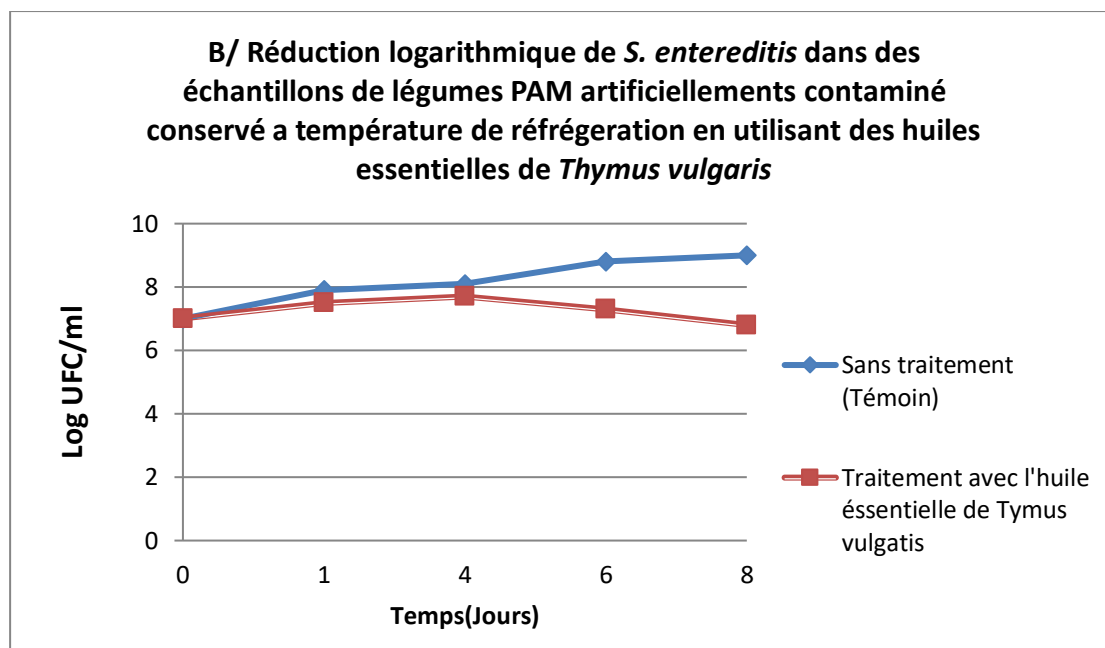
#### 4. Résultats et discussion

Les résultats des analyses chimiques montrent que *p*-cymene est le composé majoritaire de l'huile essentielle de *T.vulgaris* avec 39.18%, suivi de thymol (25.05%) et  $\gamma$ -terpinene (5.25%).

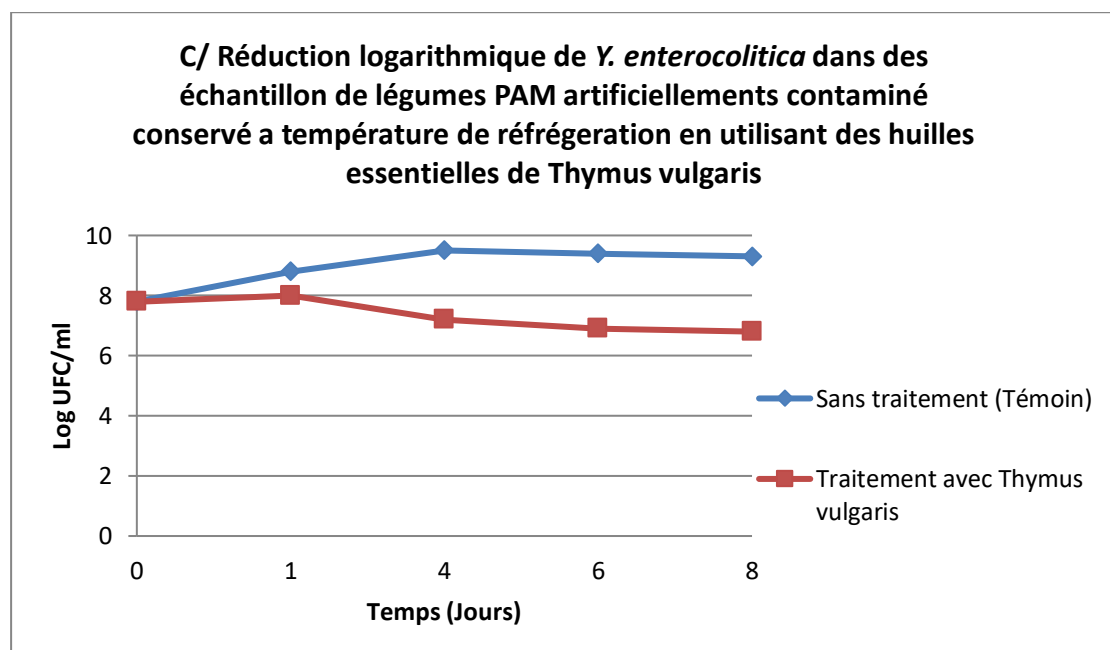
Les résultats obtenus de l'effet antibactérien des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. sur la réduction logarithmique des bactéries pathogènes dans des échantillons de légumes PAM artificiellement contaminés sont présentés dans les figures suivantes:



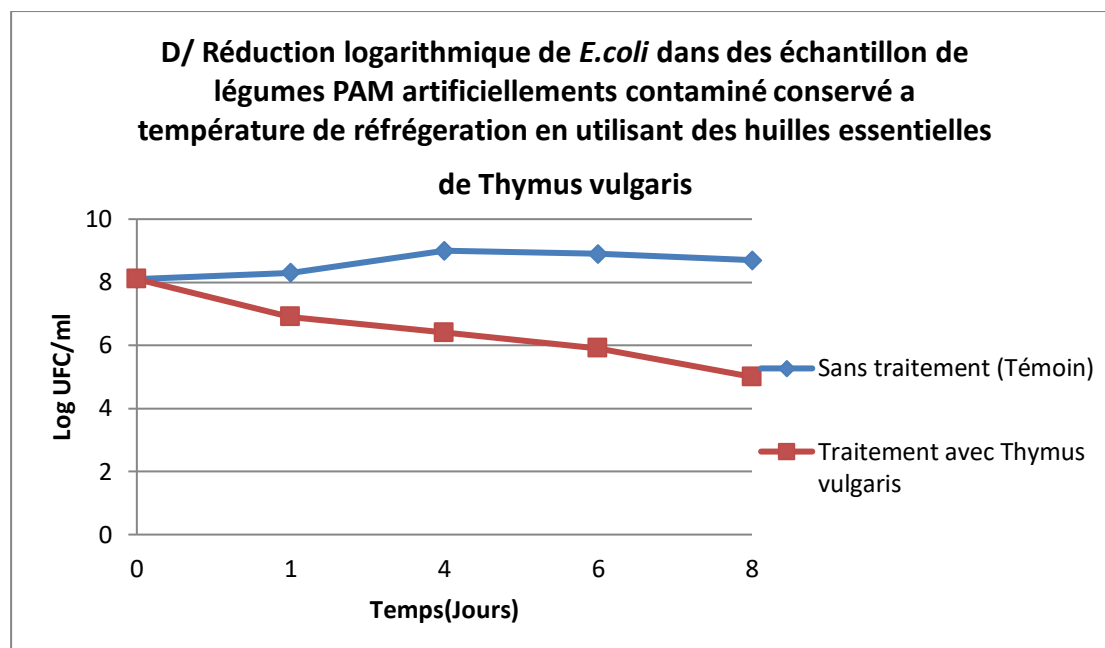
**Figure 02 :** Réduction logarithmique de *L. monocytogenes* dans des échantillons de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrigération en utilisant des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*.



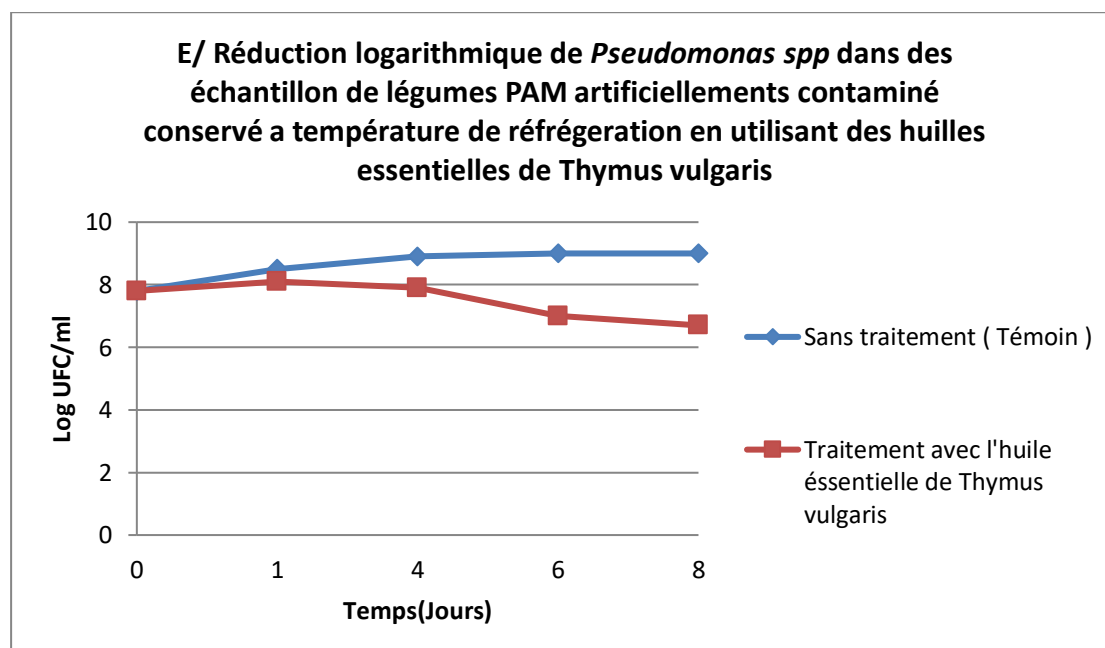
**Figure 03 :** Réduction logarithmique de *S. entereditis* dans des échantillons de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrégeration en utilisant des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*.



**Figure 04 :** Réduction logarithmique de *Y. enterocolitica* dans des échantillon de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrégeration en utilisant des huilles essentielles de *Thymus vulgaris* .



**Figure 05 :** Réduction logarithmique de *E.coli* dans des échantillons de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrigération en utilisant des huilles essentielles de *Thymus vulgaris*.



**Figure 06 :** Réduction logarithmique de *Pseudomonas spp* dans des échantillons de légumes PAM artificiellement contaminé conservé a température de réfrigération en utilisant des huilles essentielles de *Thymus vulgaris*.

L'étude réalisée consiste à évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus vulgaris L.* dans les légumes PAM artificiellement contaminés par cinq souches bactériennes (*L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* et *Pseudomonas spp.* )

Il y a une diminution significative par rapport au témoin dans les 5 cas contaminés par les différentes souches bactériennes

Les résultats montrent que l'extrait de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a présenté une activité antibactérienne significative contre toutes les souches testées. Les valeurs d'inhibition variaient d'une souche à une autre, une meilleure inhibition a été enregistrée sur les bactéries à Gram négatif comme *E. coli* dans les 24 h d'exposition, avec une réduction de  $10^4$  ufc /ml ( $p < 0,03$ ).

La démonstration de l'activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif peut être le signe de la présence d'un principe actif à large spectre et ça sera un grand avantage dans la lutte contre de nombreux agents pathogènes très fréquents ces derniers temps (**Doughari, 2006**).

Il en ressort de cette analyse que les huiles essentielles agissent différemment sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Elles montrent une efficacité importante et variable. Cette dernière est en fonction des composés phénoliques, tels que le thymol, et d'autres composés aromatiques, tels que le p-cymène, bien connus pour leur forte activité antibactérienne agit de façon très active sur l'ensemble de bactéries.

De ce fait, une étude plus approfondie sera nécessaire sur la purification du principe actif de ces extraits, afin d'ouvrir la voie au développement de nouveaux médicaments potentiels pour traiter des infections bactériennes opportunistes résistantes.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)



Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products



Marjana Radünz<sup>a,\*</sup>, Helen Cristina dos Santos Hackbart<sup>a</sup>, Taiane Mota Camargo<sup>a</sup>,  
Camila Francine Paes Nunes<sup>a</sup>, Felipe Antonio Primon de Barros<sup>b</sup>, Jacir Dal Magro<sup>b</sup>,  
Pedro José Sanches Filho<sup>c</sup>, Eliezer Avila Gandra<sup>d</sup>, André Luiz Radünz<sup>e</sup>,  
Elessandra da Rosa Zavareze<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Comunitária da Região de Chapadão, CEP 89409-900, Chapadão, SC, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Riograndense – Campus Pelotas, CEP 95574-000, Pelotas, RS, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Ciências Químicas, Farmacológicas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96016-900 Pelotas, RS, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Chapadão, CEP 89815-899, Chapadão, SC, Brazil

ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Thymol  
Spray drying  
Morphology  
Antioxidant  
Escherichia coli  
Thermotolerant coliforms

ABSTRACT

Synthetic preservatives can have harmful effects on the body, so plant essential oils appear to be an attractive natural alternative. However, the use of essential oils is limited due to the low stability and possible negative effects on the sensory properties of food. Oil encapsulation was suggested as a way to overcome these drawbacks. The objective of this study was to encapsulate thyme essential oil and to evaluate its antioxidant and antimicrobial potential in vitro and in situ in of hamburger-like meat products. The casein-maltodextrin capsules produced by spray-drying were assessed for encapsulation efficiency, thermal stability, chemical compounds and morphology. Antioxidant activity was evaluated by DPPH, hydroxyl and nitric oxide methods, while antimicrobial activity was evaluated in vitro against four bacteria and in situ in hamburger-like products. The capsule showed high encapsulation efficiency and thermal stability, and spherical and irregular morphology. The casein-maltodextrin encapsulated essential oil showed antioxidant and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* tested in vitro and against thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* in situ, showing potential for application as a natural preservative in food.

### **1. Titre d'article :**

Potentiel antimicrobien de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) encapsulée par atomisation sur la conservation des produits carnés de type hamburger.

### **2. Problématique :**

Les conservateurs synthétiques peuvent avoir des effets nocifs sur le corps, car selon l'agence internationale de recherche sur le cancer, Organisation mondiale de la santé, les conservateurs synthétiques utilisés dans les produits carnés tels que le nitrite peuvent avoir un potentiel cancérigène en raison de la production de nitrosamine (Sindelar et Milkowski, 2011; OMS, 2015). Les huiles essentielles végétales semblent donc être une alternative naturelle attrayante. Cependant, l'utilisation des huiles essentielles est limitée en raison de la faible stabilité et des effets négatifs possibles sur les propriétés sensorielles des aliments.

### **3. Objectif :**

L'objectif de cette étude consiste à évaluer le potentiel antioxydant et antimicrobien *in vitro* et *in situ* de l'huile essentielle de thym encapsulée et non encapsulée dans des produits carnés de type hamburger

### **4. Matériels utilisés :**

- Huile essentielle de thym (Blanc, Food Chemicals Codex, CAS : 8007-46-3).
- La caséine sodique (CAS : 9005-46-3).
- La maltodextrine (CAS 9050-36-6).

Ont été obtenues commercialement auprès de Sigma-Aldrich.

### **5. Les activités réalisées dans ce travail :**

- ✓ Caractérisation des huiles essentielles : Les composés d'huile essentielle de thym ont été évalués par chromatographie en phase gazeuse.
- ✓ Détermination des composés phénoliques : La teneur en composés phénoliques de l'huile essentielle de thym a été déterminée par la méthode de



Folin-Ciocalteu (**Swain et Hillis, 1959**) adaptée aux lecteurs de microplaques.

✓ Encapsulation des huiles essentielles : L'huile essentielle de thym a été encapsulée par séchage par atomisation en utilisant de la caséine et de la maltodextrine comme matériaux de paroi selon la méthodologie proposée par **Tomazelli Júnior et al. (2018)**.

✓ Caractérisation de l'huile essentielle encapsulée : comprend plusieurs méthodes :

- **Efficacité d'encapsulation :**

L'efficacité d'encapsulation a été déterminée par spectrophotométrie pour la teneur en composés phénoliques, suivant la méthode de **Swain et Hillis (1959)**.

- **Propriétés thermiques :**

Les propriétés thermiques, de la capsule de l'huile essentielle de thym et la capsule témoin ont été évaluées par calorimètre à balayage différentiel (DSC 2010, TA Instruments, New Castle, États-Unis).

- **Analyse thermogravimétrique :**

Analyse thermogravimétrique, de la capsule de l'huile essentielle de thym et la capsule témoin a été réalisée à l'aide d'un analyseur thermogravimétrique (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japon).

- **Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) :**

L'huile essentielle de thym, la capsule de l'huile essentielle de thym et la capsule de contrôle ont été analysés sur un spectromètre **FTIR** (IRAffinity-1, Shimadzu, Japon).

- **Morphologie :**

La morphologie de la capsule de l'huile essentielle de thym et de la capsule témoin a été évaluée au microscope électronique à balayage (**MEB**) (JSM6610LV, Jeol).

- ✓ **Activité antibactérienne *in vitro* :**

Pour déterminer l'activité antibactérienne *in vitro* de l'huile essentielle de thym encapsulée et non encapsulée, des souches de références des espèces bactériennes ont été utilisées : *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Escherichia coli* O157 : H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC7644) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). Deux méthodes différentes ont été utilisées pour la détermination de l'activité antibactérienne, *in vitro* :

- **Diffusion sur géloge (méthode des disques):**

La détermination des zones d'inhibition a été réalisée selon le protocole proposé par le Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (**CLSI, 2015**).

- **Concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (CMB)**

La détermination de la CMI et CMB a été réalisée selon la méthode décrite par **Cabral *et al.* (2009)** avec des modifications mineures.

- ✓ **Activité antibactérienne *in situ* :**

L'activité antibactérienne *in situ* de l'huile essentielle de thym encapsulée et non encapsulée a été évaluée en utilisant des produits carnés de type hamburger comme aliment test conformément aux recommandations de **Terra (2005)**, avec quelques modifications.

- ✓ **analyses statistiques :**

L'analyse statistique a été réalisée par analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de Student avec une signification de 5% dans le programme Statistica 7.0 (Statsoft, États-Unis).

## 6. Résultats et discussion:

Les résultats correspondent à l'activité antibactérienne *in vitro et in situ* de l'huile essentielle de thym encapsulée réalisés par les deux méthodes : par diffusion sur milieu Muller Hinton Agar et par la détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide (CMI/CMB) ont montré un effet inhibiteur sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

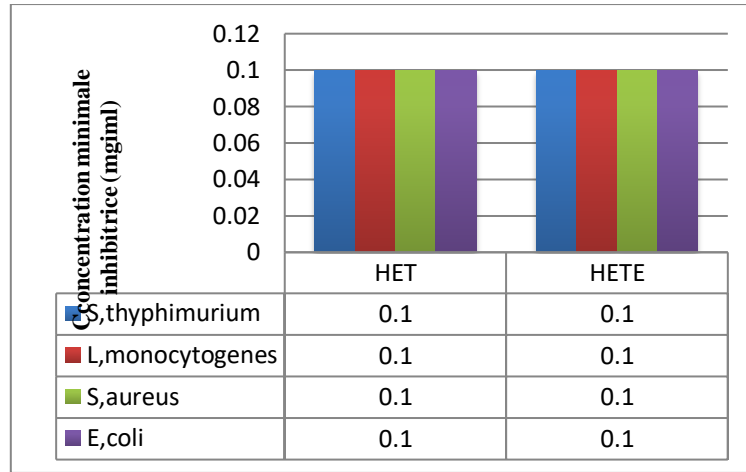
Dans la présente étude l'efficacité d'encapsulation d'huile par séchage et par pulvérisation avec de la caséine et de la maltodextrine est très élevée 88,9%, une excellente stabilité thermique et une morphologie régulière avec une activité antimicrobienne élevée, cette technique permet une bonne conservation de la viande (hamburgers). Ce résultat est supérieur à celui trouvé dans d'autres études qui visaient à encapsuler de l'huile essentielle de thym en immersion.

La réduction de la croissance bactérienne dans la viande avec l'utilisation d'huile essentielle de thym par rapport au groupe témoin a également été prouvée dans l'étude de **Zengin et Baysal (2014)**.

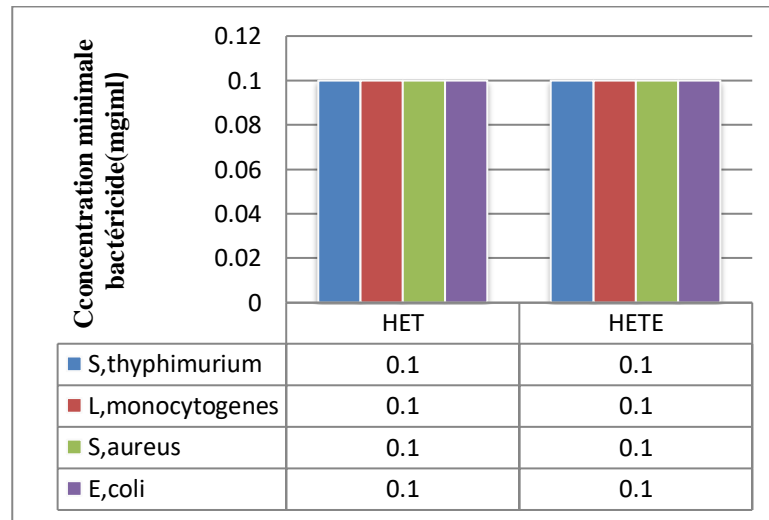
Thymol et carvacrol possèdent une activité antimicrobienne capable d'affecter la membrane externe des bactéries à Gram négatif (**Nazzaro et al., 2013; Tomazelli Júnior et al., 2018**).

Thymol est le constituant majeur des huiles essentielles de thym encapsulé et non encapsulé avec des concentrations variables de l'ordre 36.0% et 58.5% respectivement, cependant l'encapsulation avait un effet positif sur l'augmentation de la concentration de thymol.

Les résultats obtenus de l'effet antibactérien des huiles essentielles encapsulés et non encapsulés de *Thymus vulgaris L.* par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) sont présentés dans les figures suivantes (figure 07 et 08):



**Figure 07:** la concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles encapsulées et non encapsulées de *T.vulgaris*.



**Figure08 :** la concentration minimale bactéricide des huiles essentielles encapsulées et non encapsulées de *T.vulgaris*.

Les valeurs CMI et CMB sont de l'ordre de 0.1 mg/ml pour les quatre bactéries testées *S.typhimurium* ,*L.monocytogenes*, *S.aureus* et *E.coli*.

Selon la classification proposée par **Duarte et al. (2006)**, une huile essentielle avec une valeur CMI jusqu'à 0,5 mg/ml est considéré comme un agent antimicrobien robuste, lorsque les valeurs sont comprises entre 0,6 et 1,5 mg/ml l'effet est modéré et au-dessus de 1,6 mg/ml l'activité est réduite. Les valeurs CMI de l'huile essentielle de thym encapsulée et non encapsulée pour tous les bactéries testées

étaient de 0,1 mg/m. elles peuvent donc être considérées comme des agents antimicrobiens puissants. Pour l'huile non encapsulée, ces valeurs étaient inférieures à ceux trouvés dans d'autres études allant de 0,125 mg/ml pour *S. aureus*, de 0,20 à 0,64 mg/ml pour *E. coli* et de 0,25 à 1,83 mg/ml pour *S. Typhimurium*; alors que pour l'huile encapsulée, les valeurs étaient inférieures à ceux rapportés dans la littérature, allant de 0,23 mg/ml pour *S. aureus*, de 0,38-0,85 mg/ml pour *E. coli* et 0,41 mg/ml pour *Salmonella* (**Hoffman-Pennesi et Wu, 2010 ; Tao et al., 2014 ; Gonçalves et al., 2017**). Ces résultats peuvent s'expliquer par l'utilisation des différentes méthodes d'extraction et d'encapsulation de l'huile essentielle ainsi qu'aux facteurs édaphoclimatiques de la culture du thym.

L'huile essentielle de thym à un effet bactéricide à des concentrations plus faibles de l'ordre de 0.1 mg/ml par rapport à l'étude de **Oulkheir et al. (2017)**, où les valeurs varient de 5 à 10 mg/ml. Une autre étude réalisée par **Tao et al. (2014)** indique que le complexe d'inclusion de thym encapsulé a un effet bactéricide à une concentration de l'ordre de 1,91 mg/ml pour *E. coli*, ces résultats sont similaires aux résultats obtenus dans la présente étude mais avec des concentrations plus faibles. cette activité bactéricide de l'huile essentielle de thym est peut-être lié à l'interaction entre les composés présents avec les protéines de la membrane cellulaire bactérienne, provoquant une fuite du contenu, augmentant la perméabilité, ce qui entraîne par conséquent la mort (**Falcone et al., 2007**).

Les résultats de l'effet antimicrobien montrent une efficacité de l'huile essentielle encapsulée à partir de 14<sup>ème</sup> jour, Ces résultats peuvent s'expliquer par la libération lente de composés volatils qui sont protégés par la paroi, ce qui permet une conservation de longue durée.



Original Research

Antibacterial activity of some Lamiaceae species against *Staphylococcus aureus* in yoghurt-based drink (Doogh)

Anna Abdolshahi<sup>1</sup>, Sahar Naybandi-Atashi<sup>2</sup>, Mojtaba Heydari-Majd<sup>3</sup>, Bahare Salehi<sup>4,5\*</sup>, Farzad Kobarfard<sup>6,7</sup>, Seyed Abdulmajid Ayatollahi<sup>8,9</sup>, Athar Ata<sup>9\*</sup>, Giulia Tabanelli<sup>10</sup>, Mehdi Sharifi-Rad<sup>11\*</sup>, Chiara Montanari<sup>10</sup>, Marcello Iriti<sup>12</sup>, Javad Sharifi-Rad<sup>6,9\*</sup>

<sup>1</sup> Food Safety Research Center (salt), Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

<sup>2</sup> Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, P.O. Box: 91775-1163, Mashhad, Iran

<sup>3</sup> Zabol University of Medical Sciences, Zabol, 61615-585, Iran

<sup>4</sup> Medical Ethics and Law Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Student Research Committee, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, 22439789 Tehran, Iran

<sup>6</sup> Phytochemistry Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>7</sup> Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Iran

<sup>8</sup> Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran

<sup>9</sup> Department of Chemistry, Richardson College for the Environmental Science Complex, The University of Winnipeg, Winnipeg, Canada

<sup>10</sup> Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale Agroalimentare, Università degli Studi di Bologna, Cesena, Italy

<sup>11</sup> Department of Medical Parasitology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol 61663-335, Iran

<sup>12</sup> Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan State University, 20133 Milan, Italy

Correspondence to: bahar.salehi007@gmail.com; a.ata@uwinnipeg.ca; mehdi\_sharifrad@yahoo.com; javad.sharifrad@gmail.com

Received November 17, 2017; Accepted February 26, 2018; Published June 25, 2018

Doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2018.64.8.11>

Copyright: © 2018 by the C.M.B. Association. All rights reserved.

**Abstract:** Doogh is a dairy drinkable fermented product, whose shelf-life and quality is mostly affected by bacteria such as *Staphylococcus* spp. This study investigated the antibacterial activity of essential oils (EOs) from *Thymus vulgaris* L., *Mentha peperita* L. and *Ziziphora tenuior* L., alone or in combination, against *Staphylococcus aureus* in industrial doogh. A three-level and three-variable face centered central composite design experiment was used. Results showed that EOs significantly inhibited *S. aureus* growth after 1 and 7 days of storage. According to the model, the maximum inhibition was obtained in the presence of 0.2% of EO, independently of the type, and no synergistic or additive effects were observed. Slightly lower *S. aureus* survivals were observed at the maximum concentration of *Z. tenuior* EO. In spite of the antimicrobial activity of these EOs, further research is needed to assess their performance in food matrix and, in particular, in dairy product.

**Key words:** Antimicrobial activity; *Thymus vulgaris* L.; Peppermint; *Ziziphora tenuior* L.; Response surface methodology; Face centered central composite design.

### **1. Titre de l'article :**

Activité antibactérienne de certaines espèces de Lamiacées contre *Staphylococcus aureus* dans les boissons à base de yaourt (Doogh).

### **2. Problématique et objectif :**

Doogh est un produit laitier fermenté buvable, dont la durée de conservation et la qualité sont principalement affectées par des bactéries telles que *Staphylococcus spp.*,

L'objectif de cette étude consiste à étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles (HE) de *Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita* L. et *Ziziphora tenuior* L., seules ou en combinaison, contre *Staphylococcus aureus* dans le doogh industriel.

### **3. Les activités réalisées dans ce travail :**

- **Préparation d'une suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus* :**

Les souches bactériennes de *S. aureus* (ATCC 33591, PTCC 1764) ont été fournies sous forme de flacons lyophilisés de la collection In-flectional and Industrial Fungi and Bacteria, centre de l'unité de biotechnologie de l'organisation de recherche iranienne pour la science et la technologie (Mashhad, Iran).

- **Préparation d'huiles essentielles :**

Les HE à qualité alimentaire préparées à partir de thym commun (*T. vulgaris* L.), de menthe poivrée (*M. piperita*) et de (*Z. tenuior* L.) ont été achetées à la société Barij Essence Kashan (Ispahan, Iran) sous forme liquide. Les HE ont été conservées dans une bouteille en verre foncé à 4°C jusqu'à l'utilisation.

- **Conception expérimentale:**

Un plan « face centered central composite »(CCF) avec 3 variables (*T. vulgaris* L., *M. piperita* L. et *Z. tenuior* L.) à 3 niveaux a été utilisé comme conception expérimentale. En statistique, « face centered central composite » est un plan expérimental, utile dans la méthodologie de surface de réponse, pour construire un modèle de second ordre (quadratique) pour une variable de réponse sans avoir besoin d'utiliser une expérience factorielle complète à trois niveaux.

- **Préparation d'échantillons doogh contenant des HE :**

Les échantillons de doogh fournis ont été achetés sur le marché local de la province de Zabol, Sistan et Baluchestan d'Iran. Les doogh ont été préparés et analysés par le laboratoire de contrôle de la qualité des aliments de l'Université Zabol de sciences médicales, Zabol, Iran.

- **Dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans les échantillons doogh :**

La survie de *S. aureus* dans des échantillons de doogh a été surveillée pendant un stockage réfrigéré de 24 h et 168 h (7 jours).

- **Analyses statistiques:**

L'optimisation des concentrations d'HE a été effectuée en utilisant

Le Polynomial model : Les données relatives aux dénombrements de *S. aureus* pour chaque série du CCF ont été ajustées avec une équation polynomiale de second ordre, afin d'évaluer les effets de la présence des trois HE sur la charge bactérienne de *S.aureus* dans le doogh. Dans le but de simplifier le modèle, ils ont utilisé le RSM, seulement les valeurs significatives supérieures à 95% ont été conservées dans le modèle final.

#### **4. Résultats et discussion :**

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles naturelles des plantes de la famille des Lamiacées sur des échantillons de Doogh a été mesuré. Les résultats obtenus vis-à-vis la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* ont montré une efficacité variable. Cette dernière est en fonction de la concentration des huiles essentielles des plantes *T. vulgaris L*, *M. piperita* et *Z.tenuior L*. Une meilleure inhibition a été enregistrée à des concentrations optimales de l'huile essentielle. Cependant une croissance de *S.aureus* a été observée à une concentration maximale de *Z. tenuio*.

Une étude réalisée par **Balentineet al. (2006)**, indique que la sensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer par la probabilité de la sensibilité des bactéries à Gram positif aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et aux extraits naturels due à leurs absence de la membrane externe.

D'autres expériences sont nécessaires pour évaluer la performance de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles dans la matrice alimentaire, en particulier, dans les produits laitiers, une expérience de conception centrale composite à trois niveaux et trois variables a été utilisée. Les résultats ont montré que les huiles essentielles ont présenté une activité antibactérienne significative contre *S. aureus* après 1 et 7 jours de stockage. Selon ce modèle, la meilleure inhibition a été obtenue en présence de 0,2% de l'huile essentielle, cependant aucun effet synergique n'a été enregistré.

Les huiles essentielles de *T. vulgaris L*, *M. piperita* et *Z.tenuior L*. ayant un pouvoir antibactérien. Sur la souche *Staphylococcus aureus* dans le doogh.



# **Conclusion générale**

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et est aussi devenue aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs, et d'autres parts, du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce et sans effet secondaire. *Thymus vulgaris* appartient à la famille des lamiaceae, une plante médicinale très utilisée en médecine traditionnelle pour leurs propriétés thérapeutiques.

En raison de la situation sanitaire liée au Covid-19, nous avons analysé trois articles sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris in vitro* et *in vivo* vis à vis des souches bactériennes.

Les résultats montrent que l'extrait de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a présenté une activité antibactérienne significative contre toutes les souches testées. *Escherichia coli* est la bactérie la plus sensible testée, avec la plus faible réduction de l'ordre  $10^4$  UFC/ml.

Une réduction de la croissance bactérienne dans la viande a été enregistrée avec l'utilisation d'huile essentielle encapsulée de la plante *Thymus vulgaris*.

Les résultats obtenus ont montré une efficacité importante vis-à-vis la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* dans les boissons à base de yaourt (Doogh). La meilleure inhibition a été obtenue en présence de 0,2% de l'huile essentielle après 1 et 7 jours de stockage.

L'ensemble des résultats obtenus sur la mise en évidence de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* vis-à-vis des souches testées ne constitue qu'une première ébauche dans la recherche des substances naturelles biologiquement actives de la plante. D'autres recherches sont donc nécessaires pour compléter les informations déjà acquises.

# **Références bibliographiques**

- Abdolshahi, A., Naybandi-Atashi, S., Heydari-Majd, M., Salehi, B., Kobarfard, F., Ayatollahi, SA, ... & Sharifi-Rad, J. (2018). *Activité antibactérienne de certaines espèces de Lamiacées contre Staphylococcus aureus dans la boisson à base de yaourt (Doogh). Biologie cellulaire et moléculaire* , 64 (8). Pp : 71-77.
- Alma, M., Mavi, A., Yildirim ,A., Digrak ,M., Hirata, T., (2003). *Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from Origanum syriacum L. growing in Turkey. Biol. Pharm. Bull.*26 :1725-1729.
- AL-Mamun, M., Chowdhury, T., Biswas, B., Absar,N. (2018).*Food Poisoning and Intoxication: A Global Leading Concern for Human Health,University of Science and Technology Chittagong (USTC), Chittagong, Bangladesh DOI: 10.1016/B978-0-12-814956-0.00011-1*
- Amarti, F., Satrani, B., Aafi, A., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., ... & Chaouch, A. (2008). *Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Thymus capitatus et de Thymus bleicherianus du Maroc. Phytothérapie*, 6(6). pp : 342.
- Anna Abdolshahi et al. (2018). *Antibacterial activity of some Lamiaceae species against Staphylococcus aureus in yoghurt-based drink (Doogh) ,Essential oil activity vs. Staphylococcus aureus. Cell Mol Biol (Noisy le Grand) 2018 | Volume 64 | Issue 8.*
- Anonyme, *Qu'est-ce qu'une huile essentielle ? de Danielle Festy et Isabelle Pacchioni. Éd. Leduc S. 2019, Disponible sur internet, Url : <https://www.pharmaciengiphar.com/medecines-naturelles/conseils-aromatherapie/qu-est-ce-qu-une-huile-essentielle> .*
- Anonyme. *Guide des plantes qui soignent, Vidal, 2010, Disponible sur internet : Url :<https://www.vidal.fr/parapharmacie/utilisation/bon-usage-phytotherapie-plantes/parties-plantes-medicinales.html> .*
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, M. F. (2016). *Antimicrobial and antibiotic potentiating activity of essential oils from tropical medicinal herbs and spices. Antibiotic Resistance*, pp : 271.

- Bakkali, F.,Averbeck,S.,Averbeck,D.,and Idaomar,M.(2008).Biological effects of essential oils – a review. *FoodChem.Toxicol.* 46, 446–475.doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106
- Bassolé, I.H.N., Juliani,H.R.(2012).Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989–4006.doi: 10.3390/molecules17043989
- Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. (1986). *Les plantes dans la thérapeutique moderne, 2ème édition révisée, Ed. Maloine éditeur.*
- Botsoglou, N.A.,Yannakopoulos, A.L., Fletouris, D.J.,Tserveni-Goussi, A.S., Fortomaris, P.D.(1997). Effect of Dietary Thyme on the Oxidative Stability of Egg Yolk. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3711–3716, doi:10.1021/jf9703009.
- Bouhdid S., Idaomar, M. ; Zhiri, A.; Bouhdid, D.; Skali, N. S. ; Abrini, J. (2006) *Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès International de biochimies, Agadir, Maroc. Pp : 324-327.*
- Boutoial, K., Garcia, V., Rovira, S., Ferrandini, E., Abdelkhalek, O., López, M.B. (2013).Effect of feeding goats with distilled and non-distilled thyme leaves (*Thymus zygis subp. gracilis*) on milk and cheese properties. *J. Dairy Res.* 2013, 80, 448–456, doi:10.1017/s0022029913000459.
- Brandl, MT. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu Rev Phytopathol.* 44:367–392.
- Bruneton, J. (1987). *Éléments de phytochimie et de pharmacognosie, Ed. Tec&Doc Lavoisier.*
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec et Doc. Paris. Pp : 101-120.*
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème Ed Tec et Doc. Paris. Pp : 101-120.*
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology, Vol.94, pp. 223-253.*
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. (2005). Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen

- microbial fermentation in a continuous culture system. Animal Feed Science and Technology.* 124 : 597–613.
- Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., Morales, P. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 377–399, doi:10.1111/1541-4337.12065. [cfm?CFRPart.173](#) (accessed: 10.12.14).
  - Chabrier, J. (2010). *Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie.* Sciences pharmaceutiques. hal-01739123
  - Christoper, B. (2003). *RHS AZ Encyclopedia of Garden Plants.* Dorling Kindersley, London.
  - CLSI – Manual Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. vol. 23. pp.1.* [http://www.anvisa.gov.br/servicos/aude/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/aude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf), Accessed date: 29 January 2019.
  - Cronquist, A. (1968). *The evolution and classification of flowering plants. The evolution and classification of flowering plants.*
  - Deans, S. G., Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *Int.J.FoodMicrobio.* 5, 165–180.
  - Debuigne, G. (1974). *Larousse des plantes qui guérissent, Ed. Larousse.*
  - Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander, and eucalyptus essential oils. *Int.J.FoodMicrobiol.* 74, 101–109. doi:10.1016/S0168-1605(01)00734-6
  - Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G. (2006). Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 2745–2749, doi:10.1021/jf052722l.
  - Diallo M. L. (2010). *Contribution à l'étude de qualité bactériologique des repas servis par Dakar Catering selon les critères du groupe SERVAIR* Thèse : Méd ; Vét. Dakar.

- Djilani, A I., Dicko, A 2. (2014). *The Therapeutic Benefits of Essential Oils*. doi : 10.1111/1750-3841.12492 vol.79,Nr.7,2014\_journal of food science R1231
- Dormans, H.J.D., Deans, S.G. (2000). *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308–316. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.
- Duarte, M.C.T., Leme, C., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., (2006). *Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec Escherichia coli*. *Rev. Bras. Plantas med.* 8, 139–143.
- Falcone, P.M., Mastromatteo, M., Del Nobile, M.A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., (2007). *Evaluating in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene indicating and pathogenic bacteria*. *J. Food Prot.* 70, 425–431. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.2.425>.
- Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A., Hewei, F.M., El-Baroty, G.S.A. (1989). *Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media*. *J. Americ. Oil Chem. Soc* 1989, 66, 792–799.
- Food and Drug Administration. (2002). *Secondary direct food additives permitted in food for human consumption*. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch>.
- Frazier, W.C., Westhoff, D.C. (1988). *Food Microbiology, fourth ed.* McGraw-Hill Inc., New York, NY.
- Gonçalves, N.D., Pena, F. de L., Sartoratto, A., Derlamelina, C., Duarte, M.C.T., Antunes, A.E.C., Prata, A.S., 2017. *Encapsulated thyme (Thymus vulgaris) essential oil used as a natural preservative in bakery product*. *Food Res. Int.* 96, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.006>.
- Gómez-Estaca, J., De Lacey, A.L., López-Caballero, M., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P. (2010). *Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation*. *Food Microbiol.* 2010, 27, 889–896, doi:10.1016/j.fm.2010.05.012.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Dunstan, J.A., Hale, J., Lehmann, H., Robinson, C.J., Prescott, S.L. & Riley, T.V. (2008). *Antimicrobial and anti-inflammatory*

- activity of five Taxandria fragrans oils in vitro. Microbiology and immunology, Vol.52, pp. 522-530.*
- Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A. (2003). *Effects of Herbal Essential Oils Used To Extend the Shelf Life of Freshwater-Reared Asian Sea Bass Fish (Lates calcarifer). J. Food Prot. 2003, 66, 410–417, doi:10.4315/0362-028x-66.3.410.*
  - Holley, R.A., Patel, D. (2005). *Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 2005, 22, 273–292, doi:10.1016/j.fm.2004.08.006.*
  - Horváth, G., Bencsik, T., Ács, K., & Kocsis, B. (2016). *Sensitivity of ESBL-producing gram-negative bacteria to essential oils, plant extracts, and their isolated compound. Academic Press, Amsterdam, Pp : 239-269.*
  - Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R (2015). *The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of Thymus vulgaris. International Journal of Clinical Medicine, 6(09). Pp : 635.*
  - Huang, Z., Liu, X., Jia, S., Zhang, L., Luo, Y. (2018). *The effect of essential oils on microbial composition and quality of grass carp ( Ctenopharyngodon idellus ) fillets during chilled storage. Int. J. Food Microbiol. 2018, 266, 52–59, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.003.*
  - Imen, B. S. C., & Lotfi, O. (2019). *Evaluation de l'activité antibactérienne d'extraits d'Origanum vulgare.*
  - Iseppi, R., Sabia, C., de Niederhäusern, S., Pellati, F., Benvenuti, S., Tardugno, R., ... & Messi, P. (2019). *Activité antibactérienne des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L. et Thymus vulgaris L. et de leur combinaison contre les agents pathogènes d'origine alimentaire et les bactéries d'altération dans les légumes prêts à manger. Recherche sur les produits naturels , 33 (24). Pp : 3568-3572.*
  - Iserin ,P., Vican ,P. (2001), *Encyclopédie des plantes médicinales/ Identification, préparations, soins. Larousse édition, Paris, 335p.*
  - Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Koocheki, A., Khazaei, N. (2014). *Effect of quince seed mucilageedible films incorporated with oregano or*



- thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. Int.J.FoodMicrobiol.2014, 174, 88–97,doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.001.*
- Kabouche, Z., Boutaghane, N., Laggoune, S., Kabouche, A., Ait-Kaki, Z., & Benlabed, K. (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *International Journal of Aromatherapy*, 15(3). Pp : 129-133.
  - Kalemba D., Kunicka S. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils, *Current Medicinal Chemistry* DOI: [10.2174/0929867033457719](https://doi.org/10.2174/0929867033457719)
  - Khadir, A., Sobeh, M., Gad, H. A., Benbelaid, F., Bendahou, M., Peixoto, H., ... & Wink, M. (2016). Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Thymus lanceolatus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71(5-6). Pp : 155-163.
  - Kraszewski, J., Strzetelski, J. A., Niwińska, B.(2004). Effects of dietary herb supplements for cows on milk yield and technological quality of milk. 55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Bled, Slovenia, 2004.
  - Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N. (2009).Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4°C. *Food Chem.* 2009, 115, 169–175.
  - Lagunez Rivera, L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffent par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat N 2360. Institut National polytechnique de Toulouse 64p.
  - Marculescu, A., Vlase, L., Hanganu, D., Dragulescu, C., Antonie, I. and Neli-Kinga, O. (2007) Polyphenols Analyses from *Thymus* Species. *Proceedings of the Romanian Academy. Series B*, 3. Pp : 117-121.
  - Martínez-Zamora, L., Jongberg, S., Ros, G., Skibsted, L.H., Nieto, G.(2020). Plant derived ingredients rich in nitrates or phenolics for protection of pork against protein oxidation. *Food Res. Int.*, 129, 108789, doi:10.1016/j.foodres.2019.108789.

- Medina, R., Miralles, S. (s.d). *Aceite esencial de tomillo mendocino (Acantholippia seriphiioides): efecto antioxidante en medallones de carne vacuna.*
- Moñino, M.I., Martínez, C., Sotomayor, J, A., Lafuente, A., Jordán, M .J. (2008). *Polyphenolic transmission to segureño lamb meat from ewes dietary supplemented with the distillate from rosemary (Rosmarinus officinalis) leaves. J. Agric. Food Chem. 2008, 56, 3363–3367.*
- Morales, R. (2002) *The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In : Thyme : the genus Thymus. Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43.*
- Moreau, B. (2003). *Maître de conférences de pharmacognosie à la faculté de Pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie.*
- Naghibi ,F., Esmaeili, S., Malekmohammadi ,M ., Hassanpour, A., Mosaddegh, M.(2014). *Ethnobotanical survey of medicinal plants used traditionally in two villages of Hamedan, Iran .Traditional Medicine and Materia Medica Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L., Coppola, R., Feo, V., 2013. *Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharma 6, 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.*
- Nieto, G. (2020). *A Review on Applications and Uses of Thymus in the Food Industry ,Department of Food Technology, Food Science and Nutrition, Faculty of Veterinary Sciences, Regional Campus of International Excellence “Campus Mare Nostrum”, Espinardo, 30071 Murcia, Spain 2020.*
- Oulkheir, S., Aghrouch, M., Mourabit, F.E., Dalha, F., Graich, H., Amouch, F., Ouzaid, K., Moukale, A., Chadli, S., 2017. *Antibacterial activity of essential oils extracts from cinnamon, thyme, clove and geranium against a gram negative and gram positive pathogenic bacteria. Journal of Diseases and Medicinal Plants 3, 1–5. <https://doi.org/10.11648/j.jdmp.s.2017030201.11>.*
- Ouattara, B., Sabato, S.F., Lacroix, M.(2001). *Combinated effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (Penaeus spp.). Int. J. Food Microbiol. 2001, 68, 1–9.*

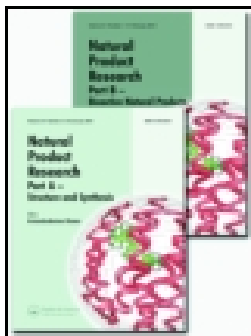
- Pacchioni, I. Festy, D. (2016) , Leduc.S Editions, Collection Poches , Nombre de pages 198.
- Pariente, L. (2001) *Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologiques*. 2 ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris.
- Phakawat T., Soottawat,B. (2014 ).*Institute of Food Technologists R \_*  
Doi : 10.1111/1750-3841.12492 vol.79, Nr.7, 2014\_ *journal of food science* R1231.
- Poletti A. (1988) *Fleurs et plantes médicinales*. 2ème Ed. Delachaux & Nistlé S. A. Suisse. Pp : 103 et 131.
- Radiünz, M., dos Santos Hackbart, HC, Camargo, TM, Nunes, CFP, de Barros, FAP, Dal Magro, J, ... & da Rosa Zavareze, E. (2020). *Potentiel antimicrobien de l'huile essentielle de thym (Thymus vulgaris) encapsulée par atomisation sur la conservation des produits carnés de type hamburger*. *Journal international de microbiologie alimentaire*, 330. Pp : 108696.
- Rojas, J., Ruiz, J., Almonacid, R., Ortiz, J., Palomino, M., Huaroto, L., Collahua, E., Chavez, R. and Anampa, A. (2016). *Antibacterial activities of essential oils from three medicinal plants in combination with EDTA against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *British Microbiology Research Journal*, 17(4), pp : 1-10.
- Román, S., Sanchez-Siles, L.M., Siegrist, M., Román, S., Sanchez-Siles, L.M.(2017). *The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review*. *Trends Food Sci. Technol.* 2017, 67, 44–57, doi:10.1016/j.tifs.2017.06.010.
- Saddi, M., A. Sanna, F., Cottiglia, L., Chisu, L., Casu, L., Bonsignore, A., De Logu, A. (2007). *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* Vol.6, pp. 1-10.
- Sakkas,H., Papadopoulou,C. (2017). *Microbiology Department, Faculty of Medicine, School of Health Sciences, University of Ioannina, 45110 Ioannina, Greece .review 2017 J. Microbiol. Biotechnol.* 27(3), 429–438 , <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>
- Sharma, R.,Gupta, M., Ogra, J. (1998).*Factors affecting yield and chemical quality of goat milk chhana*. *Small Rumin. Res.* 1998, 27, 257–262, doi:10.1016/s0921-448800054-0.

- Sindelar, J.J., Milkowski, A.L., (2011). *Sodium Nitrite in Processed Meat and Poultry Meats: A Review of Curcidity and Examining the Risk/Benefits of its Use*. American Meat Science Association, pp. 3.
- Skandamis, P.N., Tsigarida, E., Nychas, G.J.E. (2002). *The effect of oregano essential oil on survival/death of Salmonella typhimurium in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions*. *Food Microbiol.*, 2002, 19, 97–103.
- Sokmen, M., Serkedjieva, J., Daferera, D., Gulluce, M., Polissiou, M., Tepe, B., et al. (2004). *In vitro antioxidant, antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of Origanum acutidens*. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3309-3312
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N. (2008). *The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against Escherichia coli O157:H7 in minced beef during refrigerated storage*. *Meat Sci.* 2008, 80, 159–166, doi:10.1016/j.meatsci.2007.11.014.
- Speranza, B., Corbo, M.R. (2010). *“Essential oils for preserving perishable foods: possibilities and limitations,” in Application of Alternative Food Preservation Technologies to Enhance Food Safety and Stability*, eds A. Bevilacqua, M.R. Corbo, and M. Sinigaglia (Sharjah: Bentham Publisher), 35–57.
- Stahl-Biskup, E., & Sáez, F. (Eds.). (2002). *Thyme: the genus Thymus*. CRC Press.
- Swain, T., Hillis, W.E., (1959). *The phenolic constituents of Prunus domestica I. – The quantitative analysis of phenolic constituents*. *J Sci Food Agr* 10, 63–68.
- Tabassum, N., Vidyasagar, G.M. (2013). *Antifungal investigations on plant essential oils. A review*. *Int. J. Pharm. Pharmacol. Sci.* 5, 19–28.
- Tanabe, H., Yoshida, M., Tomita, N. (2002). *Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat*. *Anim. Sci. J.* 2002, 73, 389–393, doi:10.1046/j.1344-3941.2002.00054.x.
- Tao, F., Hill, L.E., Peng, Y., Gomes, C.L. 2014. *Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications*. *LWT - Food Sci Technol.* 59, 247–255. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.037.

- Tardugno, R., Pellati, F., Iseppi, R., Bondi, M., Bruzzesi, G., Benvenuti S. (2018). *Phytochemical composition and in vitro screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria*. *Nat Prod Res.* 32:544–551.
- Tefiani, C. (2015). *Les propriétés biologiques des huiles essentielles de Curcuma longa, Ammoides verticillata et Thymus ciliatus ssp. eu-ciliatus*. thèse, Sciences Agronomiques. L'Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- Teuscher E., Anton R., Lobstein A. (2005) *Plantes aromatiques Epices, aromates, condiments et huiles essentielles*. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. Pp : 521
- Verpoorte, R. (2000) *Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(3), pp : 253-262.
- Vinholes, J., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M.A., Rocha, S.M.(2014). *Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in in vitro Caco-2 cell models*. *Food Chem.* 156, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.106>.
- Vinholes, J., Grosso, C., Andrade, P.B., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., Pinho, P.G.D., Ferreres, F.(2011). *In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of Spergularia rubra*. *Food Chem.* 129, 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.098>.
- Wagner Jr, A. B. (1989). *Bacterial Food Poisoning*. Leaflet/Texas Agricultural Extension Service; no. 1540.
- Yano, Y., Satomi, M., Oikawa, H.(2006). *Antimicrobial effect of spices and herbs on Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 111, 6–11, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.031.
- Youdim, K.A., Deans, S.G. (1999). *Dietary supplementation of thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues*. *Mech. Ageing Dev.* 1999, 109, 163–175, doi:10.1016/s0047-637400033-0.

- Zengin, H., Baysal, A.H., (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of thyme and clove essential oils and application in minced beef. *J. Food Process. Preserv.* 39, 1261–1271. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12344>.

# **Annexes**



## Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters


ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


# Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables

Ramona Iseppi, Carla Sabia, Simona de Niederhäusern, Federica Pellati, Stefania Benvenuti, Roberta Tardugno, Moreno Bondi & Patrizia Messi


To cite this article: Ramona Iseppi, Carla Sabia, Simona de Niederhäusern, Federica Pellati, Stefania Benvenuti, Roberta Tardugno, Moreno Bondi & Patrizia Messi (2018): Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables, *Natural Product Research*, DOI: [10.1080/14786419.2018.1482894](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1482894)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1482894>

 View supplementary material 

 Published online: 06 Jun 2018.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 




 View Crossmark data 



SHORT COMMUNICATION



## Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables

Ramona Iseppi , Carla Sabia, Simona de Niederhäusern, Federica Pellati , Stefania Benvenuti , Roberta Tardugno, Moreno Bondi and Patrizia Messi

Department of Life Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

### ABSTRACT

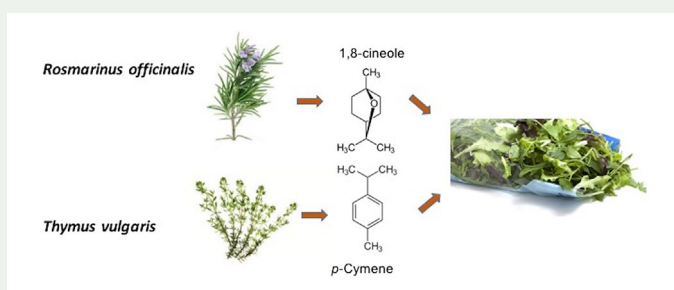
The antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils (EOs), and their combination against food-borne and spoilage bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas* spp.) was determined. The EOs inhibitory effect was evaluated both *in vitro* by using the disk diffusion assay and the minimum inhibitory concentration (MIC) determination, and *on food* by using an artificially contaminated ready-to-eat (RTE) vegetables. The results showed that the lowest MIC values were obtained with *R. officinalis* and *T. vulgaris* EOs against *E. coli* (4 and 8  $\mu\text{L/mL}$ , respectively). The incorporation of the EOs alone or their combination in RTE vegetables reduced the viable counts of all the tested strains. Lastly, in the *on food* study we simulated the worst hygienic conditions, obtaining results that can be considered a warranty of safety.

### ARTICLE HISTORY

Received 20 March 2018  
Accepted 28 May 2018

### KEYWORDS


Ready-to-eat products; EOs antibacterial activity; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella enteritidis*; *Yersinia enterocolitica*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas* spp



## 1. Introduction

Minimally processed vegetables or ready-to-eat (RTE) vegetables include mainly fresh vegetables, sold in sealed plastic containers, after washing, peeling, slicing, sanitization, rinsing, drying and packaging to extend their shelf life, without further manipulation by the

**CONTACT** Ramona Iseppi  ramona.iseppi@unimore.it

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1482894>.

consumer. However, RTE vegetables can be contaminated with spoilage bacteria and food-borne pathogens during all stages of the production process up to consumption. With regard to the ready-to-eat fresh-cut products, some recent foodborne outbreaks indicate their relevance as possible vehicles of foodborne pathogens (Brandl, 2006). Many foodborne pathogens that are relevant for RTE leafy vegetables, such as *Salmonella*, shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *Campylobacter* spp., pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes*, have been associated with leafy vegetables.

In order to preserve food, synthetic compounds have been used as additives. More recently, an increased focus on new preservation methods based on the use of natural substances has been observed. Essential oils (EOs), whose use in vegetable products has already been approved by the Food and Drug Administration (2002), fall in this concept (Burt 2004); indeed, they have shown to possess an antimicrobial activity against both food-borne pathogens and spoilage bacteria (Viuda-Martos et al. 2008; Samadi et al. 2011; Ruiz-Navajas et al. 2012; Mith et al. 2014; Marrelli et al. 2016).

In this ambit, the aim of the present investigation was to evaluate the antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L., both *in vitro* and directly *on food* in RTE vegetables, artificially contaminated with five bacteria (*L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*, *E. coli* and *Pseudomonas* spp.) of interest in human health and in food production, for a future use in the preservation field.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Essential oils

The chemical composition of the EOs from the same batches, as reported by Tardugno, Pellati et al. (2018), showed 1,8-cineole (45.27%), borneol (12.94%),  $\alpha$ -pinene (11.39%),  $\beta$ -pinene (6.55%), camphene (5.34%) and camphor (4.08%) as main constituents in *R. officinalis* EO, while, *p*-cymene (39.18%), followed by thymol (25.05%) and  $\gamma$ -terpinene (5.25%) were the major compounds in *T. vulgaris* EO.

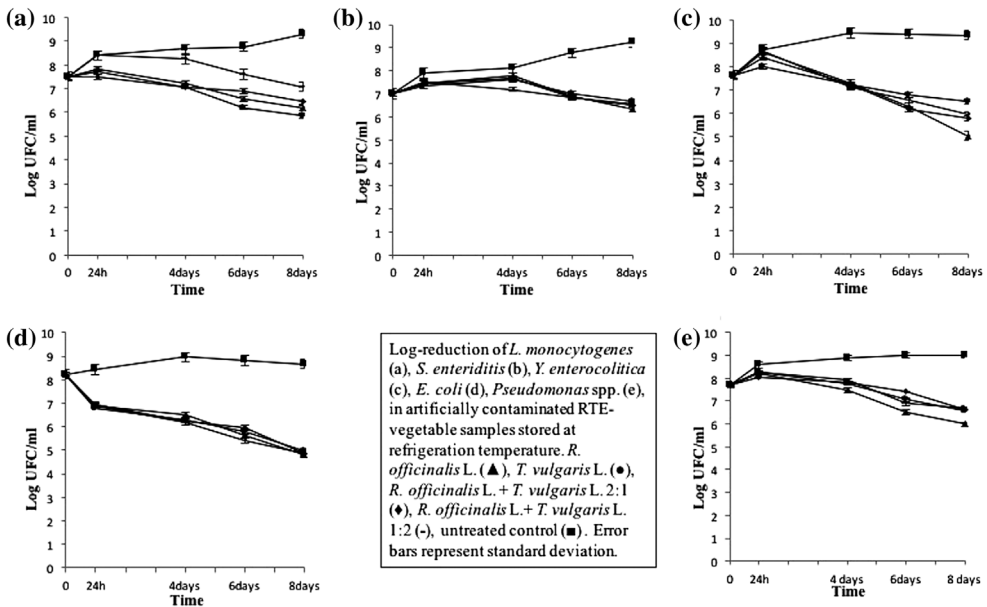
### 2.2. Antibacterial activity determination

#### 2.2.1. Agar disk diffusion assay

The inhibitory activity of the EOs against all food-borne pathogens and spoilage bacteria was quantified by a clear zone of inhibition (Table S1). *R. officinalis* L. and *T. vulgaris* L. EOs were effective at 100% (v/v) concentration. Furthermore, *R. officinalis* L. EO showed a good antagonistic activity at 0.5% (v/v) concentration against all strains, with the exception of *S. enteritidis*, which resulted insensitive, whereas the same concentration of *T. vulgaris* L. EO demonstrated again appreciable activity against *L. monocytogenes* NCTC 10888 and *E. coli*.

#### 2.3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration index (FICI) values

The MIC of the isolates for the tested EOs confirmed the results of the disk diffusion test (Table S2). None of the strains showed resistance to the EOs, even at lower concentrations. The only value higher than the others was observed for *T. vulgaris* EO, that showed a MIC of



**Figure 1.** Log-reduction of *L. monocytogenes* (a), *S. enteritidis* (b), *Y. enterocolitica* (c), *E. coli* (d), *Pseudomonas* spp. (e) in artificially contaminated RTE-vegetable samples stored at refrigeration temperature. *R. officinalis* L. (▲), *T. vulgaris* L. (●), *R. officinalis* L. + *T. vulgaris* L. 2:1 (◆), *R. officinalis* L. + *T. vulgaris* L. 1:2 (-), untreated control (■). Error bars represent standard deviation.

250  $\mu\text{L}/\text{mL}$  against *L. monocytogenes* NCTC 10,888. The FICI for the combined application of *R. officinalis* L. and *T. vulgaris* L. EOs against all tested bacteria was 2, which suggested lack of interaction between both oils.

#### 2.4. Evaluation of the antibacterial activity in RTE vegetable: on food studies

Figures 1a-e illustrate the log-reduction of indicators in artificially contaminated RTE vegetable samples, added with *R. officinalis* L. EO and *T. vulgaris* L. EO, alone or in combinations, and stored at refrigeration temperature. Both EOs exhibited a good antibacterial activity against *L. monocytogenes* NCTC 10888 (Figure 1a), with a gradual decrease from the 4th day of exposure and a final reduction of 3.5 log cfu  $\text{g}^{-1}$  and 3 log cfu  $\text{g}^{-1}$  for *T. vulgaris* L. EO and *R. officinalis* L. EO, respectively. The combination of these two EOs in different proportions did not lead to better results than the individually used ones. With regard to *S. enteritidis*, *T. vulgaris* L. EO and the association of the two EOs showed the same activity (2.5 log cfu  $\text{g}^{-1}$  reduction) at the end of the experiment, while *R. officinalis* L. EO showed a slight better activity (almost 3 log cfu  $\text{g}^{-1}$ ) than the above (Figure 1b). Against *Y. enterocolitica*, all the products tested caused a marked decrease, starting at 24 h with about 2 log cfu  $\text{g}^{-1}$  reduction within 4 days of treatment. *R. officinalis* L. EO, in particular, displayed the most effective activity, with a reduction of 4 log ( $p < 0.04$ ) at the end of the experiment, while *T. vulgaris* L. and the combination of the two EOs caused a decrease of *Y. enterocolitica* viable counts of almost 3 log cfu  $\text{g}^{-1}$  and 3.5 cfu  $\text{g}^{-1}$ , respectively (Figure 1c). The trend on *E. coli*, recovered from artificially contaminated RTE vegetables, is shown in Figure 1d; *E. coli* was the most

sensitive strain to all the active compounds used, with a marked and fast decline already evident within 24 h of exposition, with a reduction in viable counts of almost  $4 \log \text{cfu g}^{-1}$  ( $p < 0.03$ ) at the end of the experiment. Lastly, *R. officinalis* L. EO proved to be the most active one against *Pseudomonas* spp., with a  $3 \log \text{g}^{-1}$  reduction in viable counts; *T. vulgaris* L. EO alone and the combination of the two EOs exhibited the same trend against this microorganism, with a difference of about 2.5 logs compared to the control. For all products, the activity was gradual and already evident after 24 h of exposition (Figure 1e).

The microbial safety of RTE vegetables is a serious health concern, due to their extensive handling during the preparation process, that represents a potential risk for consumers. The trend toward the consumption of RTE fresh vegetables and fruit, with minimal processing and preservatives, has continuously increased in recent years, and such products are not without risk, as they can be a vehicle for the transmission of human pathogens. This pressure has led to an increased interest in the use of EOs as natural sanitizers for both fresh and RTE vegetables to promote a new safety approach for the extension of products shelf life (Ndoti-Nembe et al. 2015; de Medeiros Barbosa et al. 2016; Gonçalves Cattelan et al. 2018). For this reason we artificially contaminated the samples with a high bacterial load and, even in these unfavorable conditions, the incorporation of the EOs alone or in combination reduced the viable counts of all the tested strains from 24 h up to the end of the experiment. In particular, the best results were obtained on *E. coli*, as already described by other authors (Santomauro et al. 2017). *T. vulgaris* L. EO is characterized by phenolic compounds, such as thymol, and other aromatic compounds, such as *p*-cymene, well-known for their strong antibacterial activity, since they are capable of disintegrating bacterial outer membrane (Tardugno, Spagnoletti et al. 2018). The components identified in *R. officinalis* L. EO were monoterpenes and its antibacterial activity may be due to the presence of 1,8-cineole, belonging to the ether group, and also to alcoholic compounds, such as borneol, both lipophilic components which easily diffuse across bacterial cell membranes. However, very frequently the antibacterial activity of EOs cannot be due to a single constituent, because they are complex mixtures; therefore, their biological activity can be attributed to the phytocomplex in many cases (Tardugno, Spagnoletti et al. 2018).

By simulating the worst hygienic conditions in the *on food* study, we obtained results that can be really considered as a warranty of safety. In addition, we were able to minimize the taste impact in the treated vegetables, as the antibacterial activity was also observed at the lowest concentration tested (0.5%). The unpleasant smell of EOs, due to the high concentration required to exhibit effective bactericidal activity, is indeed one of the main limit for their use in fresh food. The encouraging results obtained in this study could be a stepping stone both for the growing market demand of 'natural food' and also for a better organoleptic impact of RTE fresh cut products.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## ORCID

Ramona Iseppi  <http://orcid.org/0000-0003-3071-3258>

Federica Pellati  <http://orcid.org/0000-0002-9822-6862>

Stefania Benvenuti  <http://orcid.org/0000-0003-4793-8795>

## References

- Brandl MT. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annu Rev Phytopathol.* 44:367–392.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int J Food Microbiol.* 94:223–253.
- Gonçalves Cattelan M, de Oliveira Nishiyama YP, Vinturim Gonçalves TM, Rodrigo Coelho A. 2018. Combined effects of oregano essential oil and salt on the growth of *Escherichia coli* in salad dressing. *Food Microbiol.* 73:305–310.
- Food and Drug Administration. 2002. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. Available at: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?CFRPart¼173> (accessed: 10.12.14).
- Marrelli M, Conforti F, Formisano C, Rigano D, Arnold NA, Menichini F, Senatore F. 2016. Composition, antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of essential oils from three *Origanum* species growing wild in Lebanon and Greece. *Nat Prod Res.* 30:735–739.
- de Medeiros Barbosa I, da Costa Medeiros JA, de Oliveira KAR, Gomes-Neto NJ, Tavares JF, Magnani M, de Souza EL. 2016. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables. *Food Control.* 59:468–477.
- Mith H, Duré R, Delcenserie V, Zhiri A, Daube G, Clinquart A. 2014. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci Nutr.* 2:403–416.
- Ndoti-Nembe A, Dang VK, Doucet N, Lacroix M. 2015. Antimicrobial Effects of Essential Oils, Nisin, and Irradiation Treatments against *Listeria monocytogenes* on Ready-to-Eat Carrots. *J Food Sci.* 80:M795–M799.
- Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Sendra E, Perez-Alvarez JA, Fernández-López J. 2012. Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain. *Food Control.* 27:294–299.
- Samadi N, Sharifan A, Emam-Djomeh Z, Salehi Sormaghi MH. 2011. Biopreservation of hamburgers by essential oil of *Zataria multiflora*. *Nat Prod Res.* 26:665–668.
- Santomauro F, Sacco C, Donato R, Bellumori M, Innocenti M, Mulinacci N. 2017. The antimicrobial effects of three phenolic extracts from *Rosmarinus officinalis* L., *Vitis vinifera* L. and *Polygonum cuspidatum* L. on food pathogens. *Nat Prod Res.* 4:1–7.
- Tardugno R, Pellati F, Iseppi R, Bondi M, Bruzzesi G, Benvenuti S. 2018. Phytochemical composition and *in vitro* screening of the antimicrobial activity of essential oils on oral pathogenic bacteria. *Nat Prod Res.* 32:544–551.
- Tardugno R, Spagnoletti A, Grandini A, Maresca I, Sacchetti G, Pellati F, Benvenuti S. 2018. Chemical profile and biological activities of *Cedrelopsis grevei* H. Baillon Bark Ess Oil Plant Biosyst. 152:120–129.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. 2008. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *Int J Food Sci Technol.* 43:526–531.



## Antimicrobial potential of spray drying encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil on the conservation of hamburger-like meat products

Marjana Radünz<sup>a,\*</sup>, Helen Cristina dos Santos Hackbart<sup>a</sup>, Taiane Mota Camargo<sup>a</sup>, Camila Francine Paes Nunes<sup>a</sup>, Felipe Antonio Primon de Barros<sup>b</sup>, Jacir Dal Magro<sup>b</sup>, Pedro José Sanches Filho<sup>c</sup>, Eliezer Avila Gandra<sup>d</sup>, André Luiz Radünz<sup>e</sup>, Elessandra da Rosa Zavareze<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Comunitária da Região de Chapecó, CEP 89809-900, Chapecó, SC, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-Riograndense – Campus Pelotas, CEP55740-000, Pelotas, RS, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Agronomia, Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Chapecó, CEP 89815-899, Chapecó, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Thymol  
Spray drying  
Morphology  
Antioxidant  
*Escherichia coli*  
Thermotolerant coliforms

### ABSTRACT

Synthetic preservatives can have harmful effects on the body, so plant essential oils appear to be an attractive natural alternative. However, the use of essential oils is limited due to the low stability and possible negative effects on the sensory properties of food. Oil encapsulation was suggested as a way to overcome these drawbacks. The objective of this study was to encapsulate thyme essential oil and to evaluate its antioxidant and antimicrobial potential in vitro and in situ in of hamburger-like meat products. The casein-maltodextrin capsules produced by spray-drying were assessed for encapsulation efficiency, thermal stability, chemical compounds and morphology. Antioxidant activity was evaluated by DPPH, hydroxyl and nitric oxide methods, while antimicrobial activity was evaluated in vitro against four bacteria and in situ in hamburger-like products. The capsule showed high encapsulation efficiency and thermal stability, and spherical and irregular morphology. The casein-maltodextrin encapsulated essential oil showed antioxidant and antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium tested in vitro and against thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* in situ, showing potential for application as a natural preservative in food.

### 1. Introduction

The replacement of synthetic preservatives with essential oils from the specialized metabolism of herbs has been the subject of intense study, because according to the International Cancer Research Agency, World Health Organization, synthetic preservatives used in meat products such as nitrite may have carcinogenic potential due to nitrosamine production (Sindelar and Milkowski, 2011; WHO, 2015).

Several essential oils have bioactive effects as an antimicrobial activity because they destabilize the bacterial lipid bilayer promoting the cell membrane degeneration that causes bacterial death. Among the essential oils that have antibacterial capacity is thyme oil. The significant compounds of thyme essential oil are thymol, p-cymene, carvacrol, and  $\gamma$ -terpinene (Jakiemiu et al., 2010; Negahban and Saeedfar, 2015; Shabnum and Wagay, 2011).

Despite the bactericidal potential of essential oils, they have poor stability at elevated temperatures, light, and oxygen, besides intense aroma and flavor, often interfering with sensory characteristics when added directly to food products, limiting their use as natural preservatives. In this scenario, encapsulation stands out as an effective technique for compound protection, in addition to masking unwanted sensory characteristics and allowing a more controlled release of the compound in the medium, but it is necessary to verify that the encapsulation process will not diminish the effects expected bioactive substances (Nedovic et al., 2011).

Spray drying is one of the oldest methods of compound encapsulation and is an economical and flexible process that promotes high encapsulation efficiency. Several wall materials can be used, including casein and maltodextrin, reported in the literature for their ease in encapsulating volatile compounds, oils, and fats (Gharsallaoui et al.,

\* Corresponding author.

E-mail address: [marjanaradunz@gmail.com](mailto:marjanaradunz@gmail.com) (M. Radünz).

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108696>

Received 29 January 2020; Received in revised form 17 May 2020; Accepted 27 May 2020

Available online 30 May 2020

0168-1605/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



2007; Ramakrishnan et al., 2013). The purpose of this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of encapsulated and unencapsulated thyme essential oil.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Thyme essential oil (White, Food Chemicals Codex, CAS: 8007-46-3), sodium casein (CAS: 9005-46-3), and maltodextrin (CAS 9050-36-6) were obtained commercially from Sigma-Aldrich.

### 2.2. Essential oil characterization

Thyme essential oil compounds were evaluated by gas chromatography. A 1  $\mu$ L sample of thyme essential oil was diluted with 1:20 (v:v) n-hexane and injected into a gas chromatography coupled with a mass spectrophotometer GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu <sup>TM</sup>, Kyoto, Japan) with automatic injector AOC20i (Shimadzu <sup>TM</sup>, Kyoto, Japan) and a capillary column OV-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m). The elution gradient was 60 °C for 1 min in isothermal mode with heating rate of 5 °C/min to 180 °C, remaining for 1 min in isothermal method, and new heating rate of 40 °C/min up to 280 °C, remaining for 1.5 min in isothermal mode, totaling a 30 min run. The injection temperature was 200 °C with a flow rate of 1 mL/min using split mode helium gas. The sweep range was 40 to 450 *m/z* with the solvent cut in 3 min. The interphase temperature was 270 °C, and the ion source temperature was 260 °C.

Qualitative analysis of the compounds was performed by integrating the peak and comparing retention times; homologous C8-C30 n-alkane series by determining the linear retention index (LRI) according to Van Den Dool and Kratz (1963); mass/charge ratio for each compound, molecular formula, molecular mass and similarity index according to the NIST11 library (Mass Spectra Library, USA).

### 2.3. Phenolic compounds

The content of phenolic compounds in the thyme essential oil was determined by the Folin-Ciocalteu method (Swain and Hillis, 1959) adapted for microplate readers. A 2 mg sample of thyme essential oil was homogenized with 2 mL methanol. In a 96-well plate, 15  $\mu$ L of the diluted sample, 200  $\mu$ L of ultrapure water and 15  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu were added, after the plate was incubated in the dark for 10 min. Then 30  $\mu$ L of sodium carbonate was added and incubated again for 2 h and read in a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400) at 725 nm. For the quantification of phenolic compounds, a standard curve prepared with gallic acid was used, and the results were expressed in mg of gallic acid (EAG) 100 g<sup>-1</sup> sample.

### 2.4. Essential oil encapsulation

Thyme essential oil was encapsulated by spray drying using casein and maltodextrin as wall materials according to the proposed methodology Tomazelli Júnior et al. (2018).

First, the sodium casein emulsifier was dissolved in ultrapure water (4.17 g in 100 mL) and homogenized with the aid of an Ultra-Turrax® (model T18, IKA, Staufen, Germany) at 300 rpm for 2 h. Afterward, 20 g of thyme essential oil was added to the solution and homogenized again in the Ultra-Turrax at 15000 rpm for 60 min. This mixture was then homogenized with maltodextrin at a ratio of 1:4 at 300 rpm for 2 h. The final solution was spray-dried (Mini Spray Dryer - B290, BÜCHI, Flawil, Switzerland) with a flow rate of 7.5 mL/min<sup>-1</sup>. Inlet and outlet temperatures were maintained at 110 °C and 70 °C, respectively. The dried powder was collected and stored in an opaque airtight container at 4 °C.

## 2.5. Characterization of encapsulated essential oil

### 2.5.1. Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency was determined by spectrophotometry for the content of phenolic compounds. For this purpose, 1 mg of thyme capsules and 2 mL of ultrapure water were homogenized in a vortex. Then the solution was centrifuged at 8232  $\times$  g for 5 min. An aliquot of the supernatant was analyzed in a microplate spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400) at 725 nm following the method of Swain and Hillis (1959), adapted to the microplate reader. The EE was expressed as a percentage and was calculated according to Eq. (1).

$$EE (\%) = \frac{\text{Phenolic compounds essential oil} - \text{Phenolic compounds capsule}}{\text{Phenolic compounds essential oil}} \times 100 \quad (1)$$

### 2.5.2. Thermal properties

Thermal properties of thyme essential oil, thyme essential oil capsule and control capsule were evaluated by differential scanning calorimeter (DSC 2010, TA Instruments, New Castle, USA). A 1 mg sample was weighed in non-airtight enclosed aluminum crucibles. The samples were heated at a rate of 0.5 °C/min, in the range of 30 to 250 °C under nitrogen flow (50 mL/min<sup>1</sup>).

### 2.5.3. Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis of thyme essential oil, thyme essential oil capsule and control capsule was performed with the aid of a thermogravimetric analyzer (TGA, TA-60WS, Shimadzu, Kyoto, Japão). A sample with 0.5 to 1 mg was weighed in a platinum capsule and heated to 600 °C using a heating rate of 50 °C/min and a nitrogen flow of 50 mL/min. For control, an empty platinum capsule was used.

### 2.5.4. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Thyme essential oil, thyme essential oil capsule and control capsule were analyzed on an FTIR spectrometer (IRAffinity-1, Shimadzu, Japan) coupled with zinc selenide crystal with a resolution of 400–4000 cm<sup>-1</sup>. A sufficient amount of sample was added to cover the equipment crystal, and 32 scans were performed.

### 2.5.5. Morphology

The morphology of the thyme essential oil capsule and control capsule without oil addition was evaluated under a scanning electron microscope (SEM) (JSM6610LV, Jeol). First, the samples were gold plated using a 20 mA current for 120 s, the acceleration voltage applied was 10 kV and 50.000  $\times$  magnification range. The average capsule diameter was determined from the calculated average of 50 capsules obtained from SEM images using the ImageJ computer program.

## 2.6. Antioxidant activity

The antioxidant activity of the encapsulated and unencapsulated thyme essential oil was determined using the following spectrophotometric methodologies: radical scavenging (DPPH 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) according to the method proposed by Brand-Williams et al. (1995), with some modifications (Vinholes et al., 2011; Vinholes et al., 2014). The capture capacity of the hydroxyl radical was performed, according to Vinholes et al. (2011). The capture capacity of the nitric oxide radical was achieved according to the proposed methodology by Vinholes et al. (2014). Antioxidant activity (AA) was expressed as percentage radical uptake/elimination according to Eq. (2):

$$AA\% = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] * 100 \quad (2)$$

where  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of the reaction control (all reagents

**Table 1**  
Compounds present in encapsulated (ESEO) and unencapsulated (TEO) thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil.

	Chemical name	IUPAC name	MF	MM	LRI NIST	TEO				ESEO			
						RT	RI exp	SI	A%	RT	RI exp	SI	A%
1	alpha-Thujene	2-methyl-5-propan-2-ylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene	C10H16	136	897	5.771	925	91	0.2	–	–	–	–
2	alpha-Pinene	2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	C10H16	136	948	6.037	936	96	3.6	5.994	933	95	0.7
3	alpha-Camphene	(1R,4S)-2,2-dimethyl-3-methylidenebicyclo[2.2.1]heptane	C10H16	136	943	6.393	951	95	1.2	–	–	–	–
4	beta-myrcene	7-methyl-3-methylideneocta-1,6-diene	C10H16	136	958	7.356	991	94	1.6	7.308	989	93	0.4
5	beta-pinene	6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptane	C10H16	136	980	7.746	1006	90	0.1	–	–	–	–
6	para-Cymene	1-methyl-4-propan-2-ylbenzene	C10H14	134	1042	8.365	1029	95	26.2	8.247	1031	95	16.2
7	Limonene	(4R)-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	C10H16	136	1018	8.447	1031	92	0.1	–	–	–	–
8	Eucalyptol	1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane	C10H18O	154	1059	8.516	1034	93	1.8	8.447	1031	91	1.8
9	gamma-Terpinene	1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene	C10H16	136	1061	9.275	1058	98	7.8	9.201	1058	97	2.3
10	Linalool oxide II	2-[(2S,5S)-5-ethenyl-5-methyloxolan-2-yl]propan-2-ol	C10H18O2	170	1164	9.631	x	91	0.1	9.589	x	84	0.3
11	Dihydrocarveol	2-methyl-5-prop-1-en-2-ylcyclohexan-1-ol	C10H18O	154	1196	10.084	x	85	0.2	–	–	–	–
12	Linalool	3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	C10H18O	154	1082	10.406	1101	94	8.3	10.334	1098	96	8.9
13	Plinol A	1,2-dimethyl-3-prop-1-en-2-ylcyclopentan-1-ol	C10H18O	154	1099	11.154	1127	90	0.1	–	–	–	–
14	Camphor	1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one	C10H16O	152	1121	11.776	1148	96	2.4	11.711	1146	98	2.7
15	Isoborneol	1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	C10H18O	154	1138	12.135	1161	90	0.2	12.094	1159	89	0.3
16	Borneol	(1S,2R,4R)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol	C10H18O	154	1138	12.397	1170	95	1.6	12.355	1180	95	1.6
17	Terpinen-4-ol	4-methyl-1-propan-2-ylcyclohex-3-en-1-ol	C10H18O	154	1177	12.724	1181	93	1.3	12.677	1179	96	1.4
18	beta-Terpineol	1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexan-1-ol	C10H18O	154	1158	15.049	x	83	0.1	–	–	–	–
19	Thymol	5-methyl-2-propan-2-ylphenol	C10H14O	150	1262	16.066	1297	95	36.0	15.972	1293	95	58.5
20	Carvacrol	2-methyl-5-propan-2-ylphenol	C10H14O	150	1298	16.263	1304	91	3.3	16.238	1302	94	3.5
21	Germacrene B	(1E,5E)-1,5-dimethyl-8-propan-2-ylidencyclodeca-1,5-diene	C15H24	204	1515	18.471	x	87	0.1	–	–	–	–
22	Aromadendrene	1,1,7-trimethyl-4-methylidene-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-octahydro-1aH-cyclopropa[e]azulene	C15H24	204	1386	19.696	x	92	0.6	–	–	–	–
23	Humulene	(1E,4E,8E)-2,6,9-tetramethylcycloundeca-1,4,8-triene	C15H24	204	1454	20.596	1463	92	0.1	–	–	–	–
24	beta-Guaiene	1,4-dimethyl-7-propan-2-ylidene-2,3,4,5,6,8-hexahydro-1H-azulene	C15H24	204	1067	22.330	x	85	0.1	–	–	–	–
25	Caryophyllene oxide	(1R,4R,6R,10S)-4,12,12-trimethyl-9-methylidene-5-oxatricyclo[8.2.0.0 <sup>4,6</sup> ]dodecane	C15H24O	220	1578	23.933	1595	89	2.7	23.867	1592	94	1.4
26	beta-Bisabolene	(4S)-1-methyl-4-(6-methylhepta-1,5-dien-2-yl)cyclohexene	C15H24	204	1518	24.297	x	85	0.1	–	–	–	–
27	Patchoulane	4,10,11,11-tetramethyltricyclo[5.3.1.0 <sup>1,5</sup> ]undecane	C15H26	206	1393	24.558	x	86	0.2	–	–	–	–
28	beta-Farnesene	(6E)-7,11-dimethyl-3-methylidenedodeca-1,6,10-triene	C15H24	204	1440	28.883	x	88	0.1	–	–	–	–

TEO – thyme essential oil, ESEO – encapsulated thyme essential oil, IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry, MF – molecular formula, MM – molecular mass, LRI NIST - bookstore linear retention index National Institute of Standards and Technology, RT – retention time, RI exp. – experimental linear retention index, SI – similarity index by bookstore, A% - area percentage.

except the sample), and  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the reaction with the sample tested.

## 2.7. In vitro antimicrobial activity

To determine the in vitro antimicrobial activity of the encapsulated and unencapsulated thyme essential oil, standard strains bacteria species were used of the *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311), *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC 43895), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 10832). The concentration of the bacteria used was standardized to  $1.5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### 2.7.1. Disk diffusion

Disk diffusion analysis was performed according to the protocol proposed by the Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (CLSI, 2015). For this, 10 µL of thyme essential oil was added under sterile paper discs in Petri dishes containing Muller-Hinton agar. The plates were then incubated at 37 °C for 24 h, after which time the halos formed were measured with a caliper. Deionized water was used as a control. The result was expressed in centimeters.

### 2.7.2. Minimum inhibitory concentration

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was performed according to the method described by Cabral et al. (2009) with minor modifications. Encapsulated and unencapsulated thyme essential oil was tested at 5 concentrations: 100, 50, 10, 1 and 0.1 mg/mL. The MIC was evaluated by optical density (OD) analysis in a spectrophotometer (Biochrom EZ Read 400) at 620 nm. Subsequently, the incubation was performed for 24 h at 37 °C and then read again in a spectrophotometer.

The MIC was considered as the lowest concentration in which there was no bacterial growth in the culture medium.

### 2.7.3. Minimal bactericidal concentration

Minimum Bactericidal Concentration (CBM) was performed according to the method described by Cabral et al. (2009) with minor modifications. The volume of 0.1 mL was transferred to PCA (Plate Count Agar) agar plates from wells that had an inhibitory effect on the MIC assay (1 and 0.1 mg/mL). The minimum bactericidal concentration was considered to be the places where there was no bacterial growth after 48 h of incubation at 37 °C.

## 2.8. In situ antimicrobial activity

The in situ antimicrobial activity of encapsulated and unencapsulated thyme essential oil was evaluated using hamburger-like meat products as a test food following the recommendations of Terra (2005), with some modifications. The standard formulation used for developing the treatments was 57% lean beef, 10% swine fat, 15% ice, 15% ice water and 3% textured soy protein. Four treatments were developed: a standard meat product, a sodium nitrite-added meat product (commercial preservative), a meat product with the addition of 0.1 g/100 g of unencapsulated thyme essential oil and a meat product with the addition of 1 g/100 g of encapsulated thyme essential oil. The hamburger-like meat products were modeled in Petri dishes with plastic wrap and refrigerated at 4 °C for 14 days. Enumerations of thermotolerant coliforms and *E. coli* were performed at 0, 7 and 14 days of refrigerated storage following the methodology proposed by Downes and Ito (2001).



## 2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) using Student's *t*-test with 5% significance in the Statistica 7.0 program (Statsoft, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Essential oil characterization

The compounds present in the thyme essential oil are shown in Table 1. The compounds found in the encapsulated and unencapsulated thyme oil are arranged in order of elution. The unencapsulated thyme essential oil had twenty-eight compounds, the main ones being thymol (36.0%), para-cymene (26.2%), linalool (8.3%), gamma-terpinene (7.8%), alpha-pinene (3.6%) and carvacrol (3.3%). The encapsulated thyme essential oil had fourteen compounds, the main ones being thymol (58.5%), para-cymene (16.2%), linalool (8.9%), carvacrol (3.5%), camphor (2.7%) and gamma-terpinene (2.3%).

These compounds were identified by different studies that evaluated the composition of thyme essential oil. Tomazelli Júnior et al. (2018) encapsulated thyme oil by the spray drying technique and identified 21 compounds in pure oil and eighteen compounds after the encapsulation process. In both studies, thymol and carvacrol were the significant compounds increasing their concentration after the encapsulation process. The study by Marzec et al. (2010) evaluated the essential oil content, chemical composition and price comparison of commercially available thyme in Poland, where 87 compounds were identified, thymol being the majority. Viuda-Martos et al. (2007) evaluated the composition of different spices, among them the thyme essential oil for which thirty compounds were identified, among them terpinen-4-ol as the majority. Tohidi et al. (2017) evaluated the composition of the essential oil of ten thyme species, 38 compounds were identified among them thymol, where it was the majority in most assessed species. These differences between concentrations and the number of compounds present in the essential oil are mainly due to edaphoclimatic factors (Radünz et al., 2019).

Thymol was the major constituent component of the encapsulated and unencapsulated thyme essential oil, and encapsulation had a positive effect on thymol concentration, increasing its level from 36.0% to 58.5%, which also occurred with other oxygenated compounds such as linalool, carvacrol, camphor, and terpinen-4-ol. Probably this is due to the formation of hydrogen bonds between hydroxyl groups with active sites of protein molecules, thus improving the retention of volatiles during encapsulation. However, unoxygenated compounds such as para-cymene and gamma-terpinene had their concentration decreased in encapsulation (Baranauskienė et al., 2006; Tomazelli Júnior et al., 2018). Thymol and carvacrol have antimicrobial activity capable of affecting the outer membrane of gram-negative bacteria (Nazzaro et al., 2013; Tomazelli Júnior et al., 2018).

### 3.2. Phenolic compounds

The content of phenolic compounds present in the thyme essential oil was 5.92 mg GAE/g. Possibly the differences between the concentrations of phenolic compounds in the essential oil are dependent on the extraction method of the essential oil and sample characteristics. Roby et al. (2013), evaluated the content of phenolic compounds with different extraction solvents, finding the highest concentration of these compounds in methanol extraction (8.10 mg GAE/g), similar to that found in this study. Mancini et al. (2015) evaluated different samples of thyme essential oil from plants from different regions of Campania (Italy) finding concentrations ranging from 77.6 to 165.1 mg GAE/g, higher than those found in this study.

The concentration of phenolic compounds is greatly affected by environmental conditions, such as soil composition and nitrogen

content, which can modify plant constituents, changing the level of these compounds and the yield of essential oils. Another critical factor is the solvent used in the extraction since its solubility and higher polarity affect the extraction of phenolic compounds from the sample. The content of phenolic compounds is an essential factor to be studied, as it directly affects antioxidant activity, responsible for the defense mechanisms against various inflammatory diseases caused by reactive oxygen species, which are formed in the oxidative stress process (Aliakbarlu and Shamel, 2013; Mancini et al., 2015; Radünz et al., 2019; Roby et al., 2013).

### 3.3. Encapsulated essential oil characterization

#### 3.3.1. Encapsulation efficiency

Several factors can affect the encapsulation efficiency of compounds, such as the encapsulation method and wall materials. In the present study, the encapsulation efficiency of the thyme essential oil by spray drying using casein and maltodextrin as wall materials was 88.9%. This result is higher than that found in other studies that aimed to encapsulate immersion thyme essential oil, using chitosan (44.8 to 67.2%), by complex coacervation using gelatin and Arabic gum (85%), by ionic gelation using sodium alginate (85%), by inclusion complex using  $\beta$ -cyclodextrin (71.3 to 82.6%) and by liposome dispersion method (35.4%) (Gonçalves et al., 2017; Lin et al., 2018; Tao et al., 2014; Trifković et al., 2014). Possibly greater encapsulation efficiency occurs due to the spray drying technique minimizing mechanical damage compared to other methods, as well as a higher affinity of oil components with wall materials.

#### 3.3.2. Thermal and thermogravimetric analysis

The differential scanning calorimetry analysis (Table 2A) shows that thyme essential oil has three degradation peaks at temperatures above 190 °C, while the non-oiled capsule has four peaks at temperatures above 125 °C. The thyme essential oil capsule exhibits three exothermic events from 168 °C; these events possibly being characteristic of sample water losses.

In a thermogravimetric analysis (Table 2B), the thyme essential oil presented mass losses at temperatures close to 200 °C, while the encapsulated oil has shown a mass loss at temperatures above 300 °C, indicating that the encapsulation promoted an increase in the thermal stability of the thyme essential oil. According to some authors, the thyme essential oil has exothermic peaks in the temperature range near 268 °C; this event can be attributed to hydrolysis or oxidation of the terpenoid constituents of the essential oil. The absence of this thermal event in the encapsulated essential oil proves its encapsulation, which is protected within the capsule (Tao et al., 2014).

#### 3.3.3. Fourier transform infrared spectroscopy

Thyme essential oil is composed mainly of thymol, para-cymene, linalool, gamma-terpinene, alpha-pinene, carvacrol, among others, thus, in the infrared spectroscopy analysis, characteristic bands of these significant compounds are observed (Table 3).

The spectrum of thyme essential oil where bands were observed in 2960, 2926 and 2869  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{s}}\text{C-H}$ ;  $\nu_{\text{a}}\text{C-H}$ ) sp<sup>3</sup> and sp<sup>2</sup> hybridizations present in the structures of the primary compounds. Band in 1514  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C}=\text{C}$ ) referring to the aromatic rings present in thymol, p-cymene and carvacrol and bands in 1457  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-C}$ ) e 1418  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-O}$ ) referring to the phenyl group present in thymol. It is still possible to observe the band in 811  $\text{cm}^{-1}$  ( $\gamma\text{C-H}$ ) characteristic of isoprenoid compounds.

The control capsule had bands at 3331  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{O-H}$ ) corresponding to intermolecular hydroxyls, 1149  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{as}}\text{C-O-C}$ ) for cyclic ether, 1080  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C-O-H}$ ) of the cyclic chain and ( $\nu\text{C-O}$ ) between chains.

The encapsulated thyme essential oil showed characteristic bands of the control capsule, so it is suggested that there was a complete encapsulation of the amount of essential oil tested in this study, it is still observed that the *fingerprint* region (1500–600  $\text{cm}^{-1}$ ) between the

**Table 2**  
Thermal (A) and thermogravimetric (B) properties of encapsulated (ESEO) and unencapsulated (TEO) thyme essential oil (*Thymus vulgaris*).

Thermal properties (A)			Thermogravimetric properties (B)					
Sample	$\Delta T$ (°C)	Temp (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$\Delta m$ (mg)	Temp (°C)	$\Delta T$ (°C)	WL (%)	Res (%)
TEO	69.3	190.0	48.0	1.2	193.5	139.4	739	88.5
	32.1	204.5	1.9	0.6	213.7	38.5	3.6	
	9.8	207.0	16.6					
CC	16.9	125.6	14.9	4.8	240.2	126.4	96.2	3.8
	8.6	237.8	8.9					
	2.8	239.9	0.1					
	2.1	247.5	1.8					
ESEO	37.2	168.5	46.8	0.2	344.7	64.5	12.6	87.4
	18.7	204.3	20.6					
	46.3	260.1	0.3					

TEO – thyme essential oil; CC - Control capsule without oil addition; ESEO – encapsulated thyme essential oil. Thermal properties:  $\Delta T$  - temperature range for degradation; Temp (°C) - peak degradation temperature;  $\Delta H$  - the energy required for degradation. Thermogravimetric properties:  $\Delta m$  – mass loss in mg; Temp (°C) – average temperature where mass loss occurred;  $\Delta T$  – temperature range where mass loss occurred; WL(%) – weight loss; Res(%) – residue; Results correspond to the mean of a duplicate.

**Table 3**  
Infrared Spectrum of encapsulated and unencapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil.

Vibration (cm <sup>-1</sup> )	TEO	CC	ESEO
$\nu$ (OH)	–	3331	3331
$\nu$ (CH) <sup>a</sup>	2960, 2926, 2869	–	–
$\nu$ (C=C) <sup>b</sup>	1514	–	–
$\nu$ (C–C) <sup>c</sup>	1457	–	–
$\nu$ (CO) <sup>c</sup>	1418	–	–
$\nu_{as}$ (COC) <sup>d</sup>	–	1149	1149
$\nu$ (COH)	–	1080	1080
$\nu$ (CO) <sup>e</sup>	–	1008	1008
$\gamma$ (CH)	811	–	–

TEO - thyme essential oil; CC - Control capsule without oil addition; ESEO - encapsulated thyme essential oil;  $\nu$  - stretching;  $\delta$  - deformation in the plane;  $\gamma$  - deformation out of the plane; <sup>a</sup> - sp<sup>3</sup> and sp<sup>2</sup> hybridizations; <sup>b</sup> - aromatic; <sup>c</sup> - phenyl group; <sup>d</sup> - cyclic ether; <sup>e</sup> - link between the chains; Mean based on triplicates.

control capsule and the encapsulated thyme essential oil was similar, reinforcing the encapsulation efficiency.

### 3.3.4. Morphology

The maltodextrin and casein encapsulated thyme essential oil by spray drying showed spherical and irregular morphology and mean diameter of 0.87  $\mu$ m (Fig. 1), possibly due to the temperature employed in the encapsulation method, while the control without the addition of oil did not promote the formation of spheres, observing only disordered structures. This result is similar to that found in  $\beta$ -cyclodextrin-encapsulated thyme essential oil capsules (Tao et al., 2014) and higher than 0.18  $\mu$ m found for liposome-encapsulated thyme essential oil and that 0.53  $\mu$ m of essential oil capsules produced by coacervation using chitosan and sodium alginate as wall materials (Lin et al., 2018; Shen et al., 2016). The differences in capsule morphology and diameter rely on the characteristics of the encapsulation processes and the characteristics of the wall materials.

### 3.4. Antioxidant activity

The results for the analysis of antioxidant activity by the free radical capture methods 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl (OH) and nitric oxide (ON) are described in Table 4. The percentage inhibition of DPPH radical for thyme oil, and thyme capsule was 83.1% and 5.1%, respectively. The intense activity of unencapsulated oil is similar to that reported in the literature (62.9 to 93.4%), and possibly due to the synergistic effect between oil compounds. The low activity of the

encapsulated oil may be due to the interaction of the compounds with the wall material, not allowing their complete release (Dandlen et al., 2009; Viuda-Martos et al., 2010).

Thyme essential oil has an antioxidant activity of 27.4% for the hydroxyl radical, with no activity detected against this extreme in the capsule. The antioxidant activity observed against the nitric oxide radical for the unencapsulated and encapsulated thyme essential oil was 14.8% and 13.8%, respectively.

Studies that evaluate the radicals and hydroxyl and nitric oxide in encapsulated and unencapsulated thyme essential oil are scarce in the literature, but their evaluation is of great importance for the detection of pathologies in our body. The hydroxyl radical is the dominant reactive oxygen species that induce lipid peroxidation and other biological damage in the body (Hazra et al., 2010). Nitric oxide radical is frequently detected in places where inflammatory processes occur, influencing several functions, including neurotransmission, vasodilation, synaptic plasticity, and memory in the central nervous system. However, under pathological conditions, there is an overproduction of the radical, which can mediate toxic effects such as DNA fragmentation, cell damage, and neuronal cell death. It also has neurotoxicity and acts as a pathological mediator in pathophysiological processes such as cerebral ischemia, epilepsy, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases (Sumanont et al., 2004).

### 3.5. In vitro antimicrobial activity

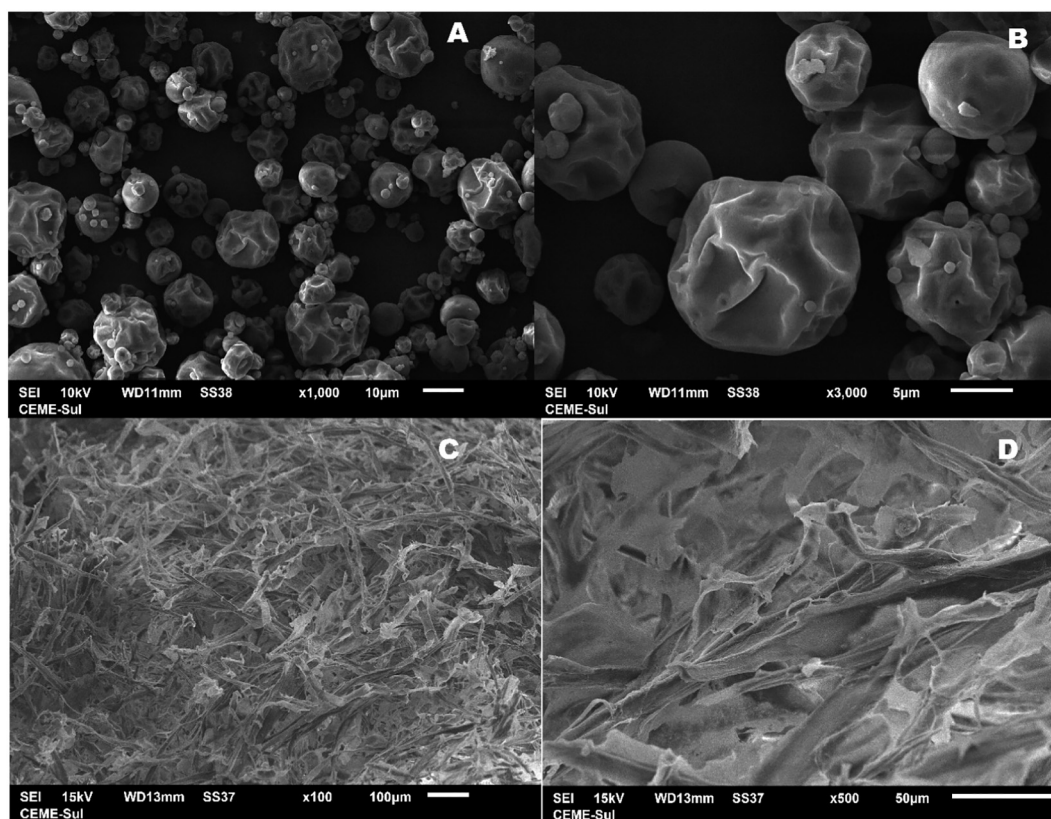
#### 3.5.1. Disk diffusion

The presence and size of the disk diffusion inhibition halos indicate the susceptibility of the bacteria to the essential oil, when the halos are smaller than 0.7 cm they are considered non-active against the bacteria, and when they have a diameter greater than 1.2 cm are considered of satisfactory inhibitory effect (Arora and Kaur, 1999). Thus, the thyme essential oil had a pleasing inhibitory effect against all bacteria evaluated, where the halo formed for *S. Typhimurium* was 1.55 cm, 2.56 cm for *L. monocytogenes*, 1.44 cm for *S. aureus* and 2.43 cm for *E. coli*. These results are similar to those reported in the literature, where thyme essential oil always has inhibition halos greater than 1 cm (Oulkheir et al., 2017).

#### 3.5.2. Minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration

The encapsulated and unencapsulated thyme essential oil had an inhibitory and bactericidal effect against all bacteria evaluated (Table 5).

According to the classification proposed by Duarte et al. (2006), an essential oil with MIC value up to 0.5 mg/mL is considered a robust



**Fig. 1.** Morphology of encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil by spray drying magnified 1000 times (A) and 3000 times (B) and Control capsule without oil addition (CC) magnified 100 times (C) and 500 times (D).

**Table 4**

Antioxidant activity of encapsulated and unencapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil by methods of inhibiting DPPH, hydroxyl, and nitric oxide radicals.

Radicals	Antioxidant activity (%)		
	TEO	ETEO	CC
DPPH	83.1 <sup>a</sup>	5.1 <sup>b</sup>	ND
Hydroxyl	27.4 <sup>a</sup>	ND	ND
Nitric oxide	14.8 <sup>a</sup>	13.8 <sup>a</sup>	ND

TEO – thyme essential oil; ETEO – encapsulated thyme essential oil; CC – Control capsule without oil addition; ND – not detected; Mean based on triplicates; Different lowercase letters on the same line differ statistically from each other by the Tukey test with 5% significance.

**Table 5**

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (CBM) of encapsulated and unencapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil.

Bacterias	Concentration (mg mL)					
	MIC			MBC		
	TEO	ETEO	CC	TEO	ETEO	CC
<i>Salmonella typhimurium</i>	0.1	0.1	ND	0.1	0.1	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.1	0.1	ND	0.1	0.1	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.1	0.1	ND	0.1	0.1	ND
<i>Escherichia coli</i>	0.1	0.1	ND	0.1	0.1	ND

MIC – Minimum Inhibitory Concentration, MBC – Minimum Bactericidal Concentration, TEO – thyme essential oil; ETEO – encapsulated thyme essential oil; CC – control capsule without oil addition; ND – not detected; mean based on triplicates.

antimicrobial agent; values between 0.6 and 1.5 mg/mL had a moderate effect and above 1.6 mg/mL showed reduced activity. The MIC values of the encapsulated and unencapsulated thyme essential oil for all bacteria tested were 0.1 mg/mL. Therefore they may be considered potent antimicrobial agents. For unencapsulated oil these values were lower than those found in other studies ranging from 0.125 mg/mL for *S. aureus*, 0.20 to 0.64 mg/mL for *E. coli* and 0.25 to 1.83 mg/mL for *S. Typhimurium*; whereas for encapsulated oil the values were lower than those reported in the literature, ranging from *S. aureus* 0.23 mg/mL, *E. coli* 0.38–0.85 mg/mL and *Salmonella* 0.41 mg/mL (Gonçalves et al., 2017; Hoffman-Pennesi and Wu, 2010; Tao et al., 2014). The best results found in the present study, when compared to literature data, are possibly due to the edaphoclimatic factors of thyme cultivation, as well as the extraction and encapsulation methods of the essential oil.

Thyme essential oil had a bactericidal effect at lower concentrations than reported in the literature, where values range from 5 to 10 mg/mL (Oulkheir et al., 2017). Thyme capsules of the present study showed the bactericidal effect at concentrations lower than inclusion complex encapsulated thyme (1.91 mg/mL) for *E. coli* (Tao et al., 2014). The bactericidal capacity of the thyme essential oil is possibly related to the interaction between the compounds present with the bacterial cell membrane proteins, causing the contents to leak, increasing the permeability, which consequently leads to death (Falcone et al., 2007).

### 3.6. In situ antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the encapsulated and unencapsulated thyme essential oil in hamburgers can be seen in Table 6. At time zero, all treatments had the same MPN/g for thermotolerant coliforms and *E. coli*. At 7 days of storage, there was an increase in the number of thermotolerant coliforms in control, control capsule without oil addition and encapsulated essential oil treatments, while there was a



**Table 6**

Antimicrobial activity in situ for nitrite and essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) encapsulated and unencapsulated, made in burger meat against thermotolerant coliforms and *Escherichia coli* in three different times.

Treatment	MPN/g					
	0 day		7 days		14 days	
	TC	EC	TC	EC	TC	EC
Control	23cA	23aA	43bA	3.6cA	460aA	9.2bA
Nitrite	23aA	23aA	0.0bC	0.0bB	0.0bD	0.0bB
CC	23cA	23aA	43bA	3.6cA	460aA	9.2bA
TEO	23aA	23aA	11bB	3.6cA	9.2cC	9.2bA
EEO	23bA	23aA	43aA	0.0bB	15.0cB	0.0bB

MPN – Most Probable Number; Control – Untreated sample; TC- thermotolerant coliforms; EC- *Escherichia coli*; TEO – thyme essential oil; EEO – encapsulated thyme essential oil; CC - Control capsule without oil addition; Mean based on triplicates; Different lower case letters for the same microorganism on the same line (same treatment) differ statistically from each other by the tukey test with 5% significance; Different capital letters in the same column (between treatments) differ statistically from each other by the tukey test with 5% significance.

reduction in unencapsulated essential oil and a total reduction in nitrite addition treatment. Finally, at 14 days of storage, the concentrations in the control and control capsule treatments increased exponentially, and the level in the nitrite group followed zero. Treatment with the addition of unencapsulated essential oil decreased slightly, and treatment with encapsulated essential oil considerably reduced the concentration of thermotolerant coliforms.

The reduction in microbiological growth when compared with the control group and with control capsule without oil addition may indicate that the encapsulated thyme essential oil may be valid for the control of these microorganisms over periods of up to 14 days. For the counting of *E. coli* it is observed that in 14 days the TEO and the control were similar, this result can be explained due to the volatility of the compounds present in the oil, where the TEO promoted a control of the growth of *Escherichia coli* in up to 7 days, after this period the content of *E. coli* was equal to the control because possibly all compounds with antimicrobial activity like thymol have volatilized, this indicates that TEO is efficient for the control of *E. coli* in meats in up to 7 days of refrigerated storage, not being effective after this period.

The antimicrobial effect of the encapsulated essential oil only in 14 days is possibly due to the slow release of volatile compounds that are protected by the wall material, being more useful for longer refrigerated storage times. The reduction in bacterial growth in meat with the use of thyme essential oil as compared to the control group was also proven in the study by Zengin and Baysal (2014).

#### 4. Conclusion

The encapsulated thyme essential oil had in vitro antioxidant effect and in vitro and *situ* antimicrobial effects. Oil encapsulation by spray drying with casein and maltodextrin as wall materials was effective in producing capsules with high encapsulation efficiency, excellent thermal stability and regular morphology with high antioxidant and antimicrobial activity, having the potential to act as a preservative in hamburgers.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ), the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the Secretariat for Economic Development, Science and Technology through the Program for the Support of Technological Poles for financial support to search.

To the Center of Electron Microscopy of the Southern Zone of the Federal University of Rio Grande (CEME-SUL) and the Analytical Center of the Federal University of Pelotas for the availability to perform the microscopy and thermal analyzes respectively.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108696>.

#### References

- Aliakbarlu, J., Shamel, F., 2013. In vitro antioxidant and antibacterial properties and total phenolic contents of essential oils from *Thymus vulgaris*, *T. kotschyanus*, *Ziziphora tenuior* and *Z. clinopodioides*. Turkish J Biochem 38, 425–431.43. <https://doi.org/10.5505/tjb.2013.58070>.
- Arora, D.S., Kaur, J., 1999. Antimicrobial activity of spices. Int J Antimicrob 12, 257–262.
- Baranauskienė, R., Venskutonis, P.R., Dewettinck, K., Verhė, R., 2006. Properties of orogano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and majoran (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based marices. Food Res. Int. 39, 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.09.005>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- CLSI – Manual Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada. vol. 23. pp. 1. [http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf), Accessed date: 29 January 2019.
- Dandlen, S.A., Lima, A.S., Mendes, M.D., Miguel, M.G., Faleiro, M.L., Sousa, M.J., Pedro, L.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., 2009. Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. Flavour Fragr J 25, 150–155. <https://doi.org/10.1002/ffj.1972>.
- Downes, F.P., Ito, H., 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington.
- Duarte, M.C.T., Leme, C., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., 2006. Effects of essential oils from medicinal plants used in Brazil against epec and etec *Escherichia coli*. Rev. Bras. Plantas med. 8, 139–143.
- Falcone, P.M., Mastromatteo, M., Del Nobile, M.A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., 2007. Evaluating in vitro antimicrobial activity of thymol toward hygiene indicating and pathogenic bacteria. J. Food Prot. 70, 425–431. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.2.425>.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. Food Res. Int. 40 (9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.
- Gonçalves, N.D., Pena, F. de L., Sartoratto, A., Derlamelina, C., Duarte, M.C.T., Antunes, A.E.C., Prata, A.S., 2017. Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. Food Res. Int. 96, 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.006>.
- Hazra, B., Sarkar, R., Biswas, S., Mandal, N., 2010. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica* and *Embellica officinalis*. BMC Complement. Altern. Med. 10, 10–20. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-20>.
- Hoffman-Pennesi, D., Wu, C., 2010. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal *Salmonella* population in broilers. J. Appl. Poult. Res. 19, 432–443. <https://doi.org/10.3382/japr.2009-00141>.
- Jakiemi, E.A.R., Scheer, A.P., Oliveira, J.S., Cocco, L.C., Yamamoto, C.I., Deschamps, C., 2010. Study of composition and yield of *Thymus vulgaris* L. oil essential. Semina: Ciēnc. Agrár. 31, 683–688. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n3p683>.
- Lin, L., Zhu, Y., Thangaraj, B., Abdel-Samie, M.A.S., Cui, H., 2018. Improving the stability of thyme essential oil solid liposome by using -cyclodextrin as a cryoprotectant. Carbohydr Polym 188, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.010>.
- Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., Snoussi, M., De Feo, V., 2015. Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. Molecules 20, 12016–12028. <https://doi.org/10.3390/molecules200712016>.
- Marzec, M., Polakowski, C., Chilczuk, R., Kolodziej, B., 2010. Evaluation of essential oil content, its chemical composition and price of thyme (*Thymus vulgaris* L.) raw material available in Poland. Kerva Polonica 56, 37–52.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino, L., Coppola, R., Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharma 6, 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B., 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. Procedia Food Sci 1, 1806–1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>.
- Negahban, M., Saeedfar, S., 2015. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. Russ. J. Biol. Res. 3, 35–38. <https://doi.org/10.13187/ejbr.2015.3.35>.
- Oulkheir, S., Aghrouh, M., Mourabit, F.E., Dalha, F., Graich, H., Amouch, F., Ouzaid, K., Moukale, A., Chadli, S., 2017. Antibacterial activity of essential oils extracts from cinnamon, thyme, clove and geranium against a gram negative and gram positive pathogenic bacteria. Journal of Diseases and Medicinal Plants 3, 1–5. <https://doi.org/10.11648/j.djdp.s.2017030201.11>.
- Radünz, M., Trindade, M.L.M., Camargo, T.M., Radünz, A.L., Borges, C.D., Gandra, E.A.,

- Helbig, E., 2019. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chem.* 276, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.173>.
- Ramakrishnan, S., Ferrando, M., Aceña-Muñoz, L., Lamo-Castellví, S., Güell, C., 2013. Fish oil microcapsules from O/W emulsions produced by Premix Membrane Emulsification. *Food Bioprocess Technol.* 6, 3088–3101. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0950-2>.
- Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.-H., Khalel, K.I., 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crop. Prod.* 43, 827–831. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>.
- Shabnum, S., Wagay, M.G., 2011. Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *Journal of Research & Development* 11, 83–94.
- Shen, L., Chen, J., Bai, Y., Ma, Z., Huang, J., Feng, W., 2016. Physical properties and stabilization of microcapsules containing thyme oil by complex coacervation. *J. Food Sci.* 81, N2258–N2262. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13397>.
- Sindelar, J.J., Milkowski, A.L., 2011. Sodium Nitrite in Processed Meat and Poultry Meats: A Review of Curity and Examining the Risk/Benefits of its Use. *American Meat Science Association*, pp. 3.
- Sumanont, Y., Murakami, Y., Tohda, M., Vajragupta, O., Matsumoto, K., Watanabe, H., 2004. Evaluation of the nitric oxide radical scavenging activity of manganese complexes of curcumin and its derivative. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 170–173. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.170>.
- Swain, T., Hillis, W.E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L. - The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agr.* 10, 63–68.
- Tao, F., Hill, L.E., Peng, Y., Gomes, C.L., 2014. Synthesis and characterization of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *LWT - Food Sci Technol.* 59, 247–255. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.037>.<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.037>.
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., Arzani, A., 2017. Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chem.* 220, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.203>.
- Tomazelli Júnior, O., Kuhn, F., Padilha, P.J.M., Vicente, L.R.M., Costa, S.W., Boligon, A.A., Scapinello, J., Nesi, C.N., Dal Magro, J., Lamo Castellví, S., 2018. Microencapsulation of essential thyme oil by spray drying and its antimicrobial evaluation against *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Braz. J. Biol.* 78, 311–317. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.08716>.
- Trifković, K.T., Milašinović, N.Z., Djordjević, V.B., Krušić, M.T.K., Knežević-Jugović, Z.D., Nedović, V.A., Bugarski, B.M., 2014. Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols. *Carbohydr. Polym.* 111, 901–907. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.053>.
- Van Den Dool, H., Dec Kratz, P., 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 11, 463–471. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x).
- Vinholes, J., Grosso, C., Andrade, P.B., Gil-Izquierdo, A., Valentão, P., Pinho, P.G.D., Ferreres, F., 2011. In vitro studies to assess the antidiabetic, anti-cholinesterase and antioxidant potential of *Spergularia rubra*. *Food Chem.* 129, 454–462. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.098>.
- Vinholes, J., Gonçalves, P., Martel, F., Coimbra, M.A., Rocha, S.M., 2014. Assessment of the antioxidant and antiproliferative effects of sesquiterpenic compounds in vitro Caco-2 cell models. *Food Chem.* 156, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.106>.
- Viuda-Martos, M., Ruíz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2007. Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. *Acta Chim. Slov.* 54, 921–926.
- Viuda-Martos, M., Navajas, Y.R., Zapata, E.S., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A.P., 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragr. J.* 25, 13–19. <https://doi.org/10.1002/ffj.1951>.
- World Health Organization – WHO, 2015. Q&A on the Carcinogenicity of the Consumption of Red Meat and Processed Meat. <https://www.who.int/features/qa/cancer-red-meat/en/>, Accessed date: 26 May 2019.
- Zengin, H., Baysal, A.H., 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of thyme and clove essential oils and application in minced beef. *J. Food Process. Preserv.* 39, 1261–1271. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12344>.

## Antibacterial activity of some Lamiaceae species against *Staphylococcus aureus* in yoghurt-based drink (Doogh)

Anna Abdolshahi<sup>1</sup>, Sahar Naybandi-Atashi<sup>2</sup>, Mojtaba Heydari-Majd<sup>3</sup>, Bahare Salehi<sup>4,5\*</sup>, Farzad Kobarfard<sup>6,7</sup>, Seyed Abdulmajid Ayatollahi<sup>6,8,9</sup>, Athar Ata<sup>9\*</sup>, Giulia Tabanelli<sup>10</sup>, Mehdi Sharifi-Rad<sup>11\*</sup>, Chiara Montanari<sup>10</sup>, Marcello Iriti<sup>12</sup>, Javad Sharifi-Rad<sup>6,9\*</sup>

<sup>1</sup> Food Safety Research Center (salt), Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

<sup>2</sup> Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, P.O. Box: 91775-1163, Mashhad, Iran

<sup>3</sup> Zabol University of Medical Sciences, Zabol, 61615-585, Iran

<sup>4</sup> Medical Ethics and Law Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Student Research Committee, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, 22439789 Tehran, Iran

<sup>6</sup> Phytochemistry Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>7</sup> Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Iran

<sup>8</sup> Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran

<sup>9</sup> Department of Chemistry, Richardson College for the Environmental Science Complex, The University of Winnipeg, Winnipeg, Canada

<sup>10</sup> Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale Agroalimentare, Università degli Studi di Bologna, Cesena, Italy

<sup>11</sup> Department of Medical Parasitology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol 61663-335, Iran

<sup>12</sup> Department of Agricultural and Environmental Sciences, Milan State University, 20133 Milan, Italy

**Correspondence to:** bahar.salehi007@gmail.com; a.ata@uwinnipeg.ca; mehdi\_sharifirad@yahoo.com; javad.sharifirad@gmail.com

**Received** November 17, 2017; **Accepted** February 26, 2018; **Published** June 25, 2018

**Doi:** <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2018.64.8.11>

**Copyright:** © 2018 by the C.M.B. Association. All rights reserved.

**Abstract:** Doogh is a dairy drinkable fermented product, whose shelf-life and quality is mostly affected by bacteria such as *Staphylococcus* spp.. This study investigated the antibacterial activity of essential oils (EOs) from *Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita* L. and *Ziziphora tenuior* L., alone or in combination, against *Staphylococcus aureus* in industrial doogh. A three-level and three-variable face centered central composite design experiment was used. Results showed that EOs significantly inhibited *S. aureus* growth after 1 and 7 days of storage. According to the model, the maximum inhibition was obtained in the presence of 0.2% of EO, independently of the type, and no synergistic or additive effects were observed. Slightly lower *S. aureus* survivals were observed at the maximum concentration of *Z. tenuior* EO. In spite of the antimicrobial activity of these EOs, further research is needed to assess their performance in food matrix and, in particular, in dairy product.

**Key words:** Antimicrobial activity; *Thymus vulgaris* L.; Peppermint; *Ziziphora tenuior* L.; Response surface methodology; Face centered central composite design.

### Introduction

Doogh is a dairy drink produced from yogurt, adding water, salt and other ingredients (*i.e.* natural plant essential oils). Indian has produced it for the first time, under the name of Lassi. Nowadays, this beverage is used in some countries like Iran and Turkey. It is a healthy dairy drink with pleasant organoleptic notes, which can appropriately substitute for soft drink in all Iranian's food baskets. Its annual production reached 3000000 tons in 2010 in Iran for domestic consumption (1). Milk and dairy products, including doogh, are frequently associated with the presence of *Staphylococcus aureus*, which is considered a dangerous threat to the safety of fermented milk and fresh or low-ripened cheeses (2-4).

Staphylococci are bacteria ubiquitously distributed in nature and commonly isolated from many food products and environmental samples (5). Staphylococci grow over a wide range of temperatures (between 7 and 48 °C) and pH values (between 4 and 10) and are particularly resistant to NaCl (10-15%) and to several

antibiotics (3). Moreover, coagulase positive staphylococci show pathogenic traits. In particular, *S. aureus* can cause food poisonings, producing a wide variety of enterotoxins responsible for staphylococcal food poisoning syndrome in humans (nausea, vomiting and abdominal cramps) (3, 6-10).

Plants and their parts are greatly used in traditional healing systems; only in some cases, their therapeutic potential in human has been substantiated (11-21). The need of herb-based medicines, food supplements, cosmetics, pharmaceuticals and health products is gradually increasing throughout the world (12, 22-34). The Lamiaceae family includes 212 genera and 5600 species and comprises various herbaceous, ornamental and edible plants, some of which are considered as source of essential oils (EOs) with strong antibacterial and antioxidant properties. This family has been used in traditional medicine since earlier times and usually used as a remedy for gastrointestinal tract infection (11). EOs are substances naturally synthesized in different plant organs and can be extracted to be used as complementary

medicine, natural therapeutic and food preservatives for their antimicrobial and antioxidant properties (23, 35-37). Some species belonging to Lamiaceae family, such as *Thymus vulgaris* L., *Ziziphora tenuior* L. and *Mentha piperita*, are well-known as aromatic and medicinal herbs. Moreover, the antimicrobial effects of Lamiaceae EOs and their main components (such as carvacrol and thymol) have been reported against a huge variety of Gram-positive (among which food-borne pathogens such as *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative bacteria, yeasts and moulds (38-46). The antimicrobial activity of these EOs is promising also in dairy products (47-51).

However, despite the demonstrated potential of EOs and their constituents *in vitro*, their efficacy in food systems may be influenced by several important variables (*i.e.* concentration and solubility, method of extraction, interaction with food matrix, pH, temperature, contamination level, etc.). Therefore, their use has been limited because of the high concentration needed to achieve sufficient antimicrobial activity (52). Although limited studies have been conducted on the antimicrobial interaction between more than two EOs, some synergistic effects of these substances are known and can be useful to reduce the amounts added to food, limiting their organoleptic impact on the products (53). In this perspective, response surface methodology (RSM) method can be used for the evaluation of the effects of multiple variables and their interaction on a response variable (*i.e.* bacterial growth), limiting the number of experiments (54, 55).

In this study, the antibacterial activities of *T. vulgaris* L., *M. piperita* and *Z. tenuior* L. EOs against *S. aureus* in dough were evaluated. In particular, the survival of two *S. aureus* strains, deliberately inoculated into the dough samples, was studied after 24 hour and 7 days of refrigerate storage and the results were evaluated with RSM.

## Materials and Methods

### *Staphylococcus aureus* suspension preparation

Microbial strains of *S. aureus* (ATCC 33591; PTCC 1764) were provided as lyophilized vials from the Infectious and Industrial Fungi and Bacteria collection Center in Biotechnology unit of Iranian Research Organization for Science and Technology (Mashhad, Iran). Before the experiments, the strains were cultured twice in nutrient broth (Merck, Germany) at 37 °C for 24 h and plated onto mannitol salt agar medium (Merck, Germany), incubated at the same conditions. The colonies were used to obtain a 0.5 standard microbial suspension using McFarland procedure (56). For this procedure, the 0.5 standard suspension was produced by mixing slowly 99.5 ml of 1% sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and 0.5 ml of 1.175% barium chloride dihydrate (BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O). The intensity of cell suspension density was measured at 625 nm by spectrophotometer (SIGMA-3-30K) in order to have a cell concentration of about 8 log CFU/ml.

### Essential oil preparation

The prepared food grade EOs of common thyme (*T. vulgaris* L.), peppermint (*M. piperita*) and *Z. tenuior* L. were purchased from company of Barij Essence Kashan

**Table 1.** Independent variables and their coded values used in the face centered composite design.

Independent variable	Symbol	Coded level		
		-1	0	+1
Concentrations of <i>T. vulgaris</i> EO (%v/v)	A	0	0.1	0.2
Concentrations of <i>M. piperita</i> EO (%v/v)	B	0	0.1	0.2
Concentrations of <i>Z. tenuior</i> EO (%v/v)	C	0	0.1	0.2

(Isfahan, Iran) in liquid form. The EOs have been stored in dark glass bottle at 4°C to prevent the negative effect of environmental conditions such as direct sunlight until analyses.

### Experimental design

A face centered central composite design (CCF) with 3 variables (*T. vulgaris* L., *M. piperita* L. and *Z. tenuior* L. concentration) at 3 levels was used as experimental design. The variables and levels used in the twenty experimental runs (including six replicates at the center point) are reported in Table 1 and Table 2.

### Preparation of dough samples containing EOs

The provided dough samples were purchased from local market in Zabol, Sistan and Baluchestan province of Iran. The dough were prepared and analyzed by the Food Quality Control laboratory of Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran. In particular, the dough was sterilized in autoclave and poured in 20 tubes of

**Table 2.** Experimental design adopted for the evaluation of the survival of *S. aureus* in dough samples and observed response values (log CFU/ml) for each run in relation to EO concentrations.

Run	<i>T. vulgaris</i> (A, %v/v)	<i>M. piperita</i> (B, %v/v)	<i>Z. tenuior</i> (C, %v/v)	Dependent variable (log CFU/ml)	
				<i>S. aureus</i> counts at 24h	<i>S. aureus</i> counts at 7 days
				1	0.00
2	0.20	0.00	0.00	3.00	1.90
3	0.00	0.20	0.00	2.94	1.85
4	0.20	0.20	0.00	2.99	1.87
5	0.00	0.00	0.20	2.56	1.45
6	0.20	0.00	0.20	2.94	1.82
7	0.00	0.20	0.20	2.38	1.27
8	0.20	0.20	0.20	2.85	1.75
9	0.00	0.10	0.10	2.87	2.12
10	0.20	0.10	0.10	3.04	2.27
11	0.10	0.00	0.10	3.14	2.06
12	0.10	0.20	0.10	3.10	1.97
13	0.10	0.10	0.00	3.48	2.54
14	0.10	0.10	0.20	3.08	2.22
15	0.10	0.10	0.10	3.15	2.18
16	0.10	0.10	0.10	3.04	2.08
17	0.10	0.10	0.10	3.12	2.13
18	0.10	0.10	0.10	2.99	2.02
19	0.10	0.10	0.10	2.95	2.06
20	0.10	0.10	0.10	3.15	2.21



**Table 3.** Parameters estimated for the final polynomial equation model.

Time	Intercept	A	B	C	AB	AC	BC
24 h	5.30	-10.35	-10.55	-12.61	38.50	46.50	34.00
		R <sup>2</sup> = 0.801	F-test <sub>(6,13)</sub> = 8.725 (p=0.000604)				
168 h	4.36	-10.71	-10.90	-12.95	39.13	48.13	35.63
		R <sup>2</sup> = 0.803	F-test <sub>(6,13)</sub> = 8.887 (p=0.000561)				

All the variables with significance  $P > 0.05$  were removed through a backward stepwise procedure. In the table also the diagnostics of regression are reported, and namely R<sup>2</sup> and F-test with the corresponding significance (A: *T. vulgaris*; B: *M. piperita*; C: *Z. tenuior*).

500 ml. In each tube, different concentrations of EOs (0, 0.1 and 0.2 % v/v) were added, according to the CCF chosen. The EOs was emulsified (30% of the total weight) with water and Tween 80 (Sigma–Aldrich, USA) by using a Homogenizer mixer (IKA-T25-digital ultra turrax) for 1 minute at 15000 rpm. Each sterilized doogh tube (containing different EO concentrations, according to CCF described) was inoculated with standardized concentration solution in order to obtain an initial *S. aureus* cell concentration of  $1 \times 10^5$  CFU/ml. A control tube (not added with any antimicrobial substances) was analyzed as *S. aureus* growth control (positive control).

### *Staphylococcus aureus* counts in doogh samples

*S. aureus* survival in doogh samples was monitored during a refrigerate storage of 24 h and 168 h (7 days). Specifically, 1 mL of doogh was aseptically transferred to 9 ml of 0.9% (w/v) NaCl sterile solution and the resulting suspension was serially diluted in the same diluent and plated onto mannitol salt agar medium (Merck, Germany) incubated at 37 °C for 48 h. Three different tubes for every condition were analyzed for each sampling time.

### Statistical analysis

Optimization of EO concentrations was done using RSM (57). The dependent variable (response) was *S. aureus* concentration (log CFU/ml, assessed by plate

count as described before) at 24h and 168 h of doogh refrigerate storage. Independent variables were the EO concentrations, in particular *T. vulgaris* L. EO (A, [v/v%]), *M. piperita* EO (B, [v/v%]) and *Z. tenuior* L. EO (C, [v/v%]). The experimental data were fitted with a second order polynomial model applying the least squares regression to estimate the regression coefficients in the equation. The generalized second-order polynomial model used in the response surface analysis was as follows:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

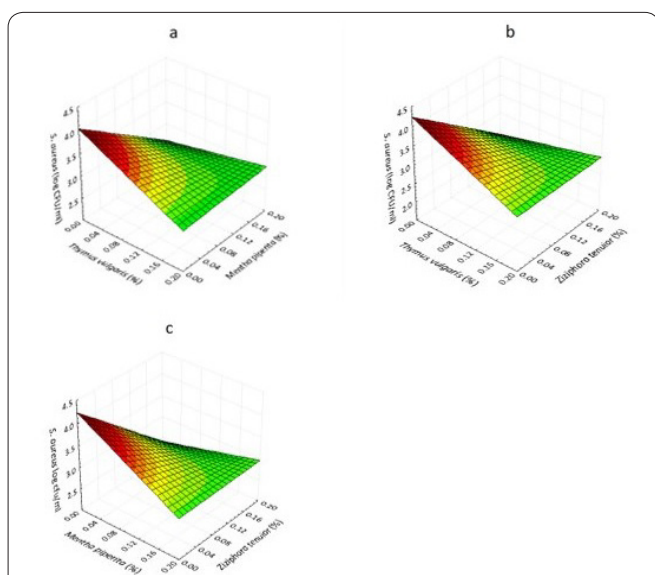
Where  $\beta_0$  is an estimated constant,  $\beta_i$  are the fitted regression coefficients related to the linear term of the covariate  $x_i$  (independent variables),  $\beta_{ii}$  are the fitted regression coefficients related to the quadratic term of the covariate  $x_i$  and  $\beta_{ij}$  are the fitted regression coefficients related to the interaction terms of the covariates  $x_i$ ,  $x_j$ . The regression analysis was performed using Statistica 8.1 (StatSoft Italy s.r.l., Vigonza, Italy) and the final model was obtained through a stepwise procedure and including only parameters with  $P \leq 0.05$ .

## Results and Discussion

### Polynomial model

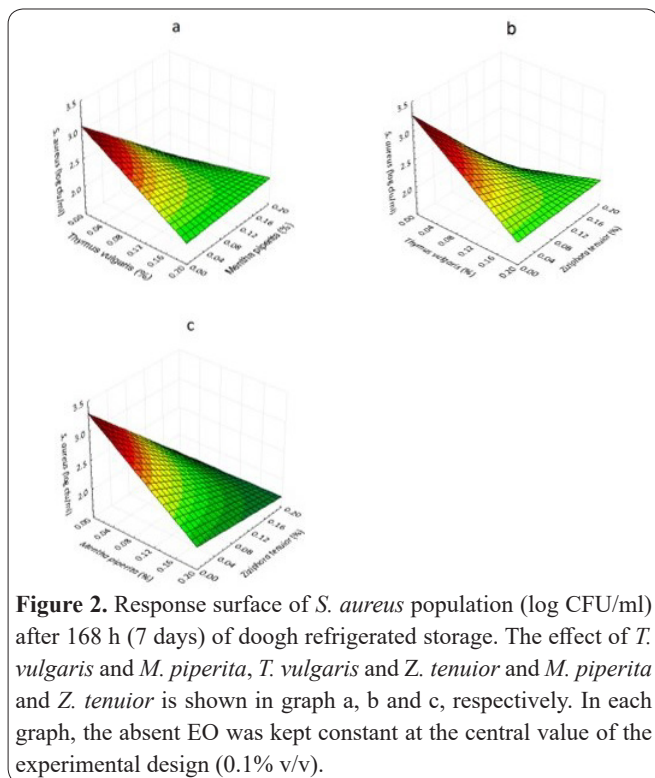
The data relative to *S. aureus* counts for each run of the CCF showed in Table 2 were fitted with a second order polynomial equation, in order to evaluate the effects of the presence of the three EOs on the *S. aureus* cell load in doogh. With the aim to simplify the model, a backward stepwise procedure was applied and only the terms characterized by significance higher than 95% were kept in the final model. The data of the linear regression are reported in Table 3. As it is possible to observe, after 24 h and 7 days (168 h) of storage, no quadratic term was significant and only linear and interactive terms were kept in the final model. In particular, a negative sign characterized all the linear terms, while the interactive coefficients were all positive. This final model resulted highly significant, as demonstrated by the Fisher (F) test, which is aimed to evaluate the level of significance (p-values) associated with ANOVA and by the values of the regression coefficients. The presence of the same terms in the final model and the similar coefficients indicated an analogous behavior for *S. aureus* counts at 24 and 168 h of refrigerate storage.

With the aim to visualize this behavior, the response surfaces obtained at 24 and 168 h are reported in Figure 1 and 2. In each graph, the EO not present in the run was kept constant at the central value of the experimental design (0.1% v/v). According to Fig. 1, after 24 h,



**Figure 1.** Response surface of *S. aureus* population (log CFU/ml) after 24 h of doogh refrigerated storage. The effect of *T. vulgaris* and *M. piperita*, *T. vulgaris* and *Z. tenuior* and *M. piperita* and *Z. tenuior* is shown in graph a, b and c, respectively. In each graph, the absent EO was kept constant at the central value of the experimental design (0.1% v/v).





**Figure 2.** Response surface of *S. aureus* population (log CFU/ml) after 168 h (7 days) of dough refrigerated storage. The effect of *T. vulgaris* and *M. piperita*, *T. vulgaris* and *Z. tenuior* and *M. piperita* and *Z. tenuior* is shown in graph a, b and c, respectively. In each graph, the absent EO was kept constant at the central value of the experimental design (0.1% v/v).

it is possible to observe a relevant effect of the single EOs on the survival of *S. aureus*. The increase of the concentration of one EOs when the other was not present determined an almost linear decrease of the survival of the pathogen. However, no interactive effect was evidenced at the higher EO concentrations. The samples after 168 h (Figure 2) confirmed this behavior, although the number of survivors was lower. However, also after 7 days no particular interactive or synergistic effect was observed.

The behavior described by these graphs indicated that the increase of each EOs from 0 to 0.2% (v/v) is responsible for *S. aureus* cell reduction. However, if we consider the maximum concentration of one of the EO, no adjunctive inhibition effect was determined by the increase of another EO even to its maximum concentration. Therefore, in these conditions, it is possible to state that we cannot observe any synergistic or additive effects of the three EOs considered in this dairy product. In order to better evidence this fact, Figure 3 represents *S. aureus* cell load (log CFU/ml) after 24 h of storage in relation to *T. vulgaris* and *M. piperita* when *Z. tenuior* was not added (Fig. 3a) or was added at its maximum concentration (Fig. 3b). While in Figure 3a, a relevant decrease of cell load was observed with the progressive increase of each EO concentration, confirming what stated before, Figure 3b, showed that if we consider the model at the maximum concentration of *Z. tenuior*, the effects of concentration variations of *T. vulgaris* and *M. piperita* add scarce or irrelevant effects. The experimental design suggested that the presence of 0.2% (v/v) of EO, independently of the type, reached the maximum inhibition level.

It is well known that active components of the EOs can interact with the food components, *i.e.* solubilizing in lipids and interacting with proteins (53). Dough is fermented milk with a high protein and fat content (1) and the EO fractions interacting with these compounds

are no more able to reach the cellular target and to exert any antimicrobial action.

The negative public perception of industrially synthesized food antimicrobials has increased the interest in more natural, non-synthesized, antimicrobials as potential alternatives to conventional preservatives to extend shelf life and prevent foodborne pathogens (52). The antibacterial effect of EOs is often related to the antimicrobial effects of specific terpenes. Even if the composition of the EOs from the same plant can be very different, the main components of *Z. tenuior* EO are pulegone, isomenthone, *p*-menth-3-en-8-ol and 8-hydrohymenthone (58). For *M. piperita*, menthol, menthon, menthofuran,  $\beta$ -caryophyllene and eucalyptol have been found to be the main components (59), while for *T. vulgaris* they are thymol, carvacrol, *p*-cymene and  $\gamma$ -terpinene (60).

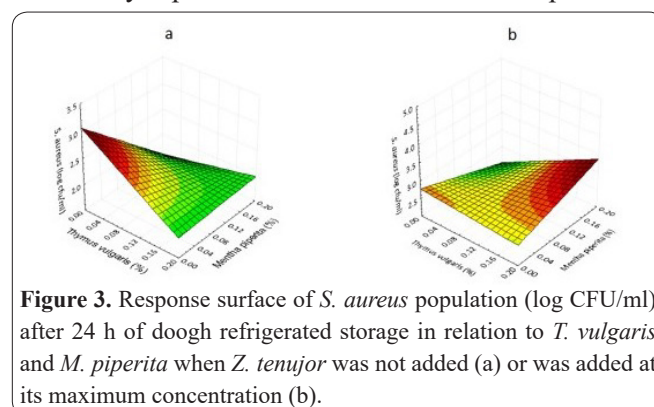
The antimicrobial activity of the bioactive compounds has its main target in the cell membrane, disturbing their fluidity and permeability; this perturbation determines several consequences such as membrane potential depletion, loss of cytoplasmic substances and ions up to cell disruption (53).

Several researchers explored the effect of different EOs in many various dairy products. Ghalem and Zouaoui (47) studied the effects of *Lavandula* and *Chamaemelum* species EOs on physicochemical, microbial and organoleptic qualities of yoghurt. They found that these EOs showed remarkable antibacterial activity against bacteria, yeasts and moulds. In another study, the same Authors (48) studied the effect of *Rosmarinus officinalis* EO on microbiological and physico-chemical quality of yoghurt. They demonstrated that yoghurt containing *R. officinalis* EO had a satisfactory hygienic quality due to the absence of any pathogen. Moreover, sensory analysis indicated that the samples added with 0.14g/L of EO improved flavour, taste and texture with respect to the other samples.

Bonyadian and Moshtaghi (61) investigated the effectiveness of five EOs (thyme, tarragon, caraway seed, penny royal and peppermint) on survival of *S. aureus* in Feta cheese and found that thyme and tarragon EOs were the most effective.

Abd-El Fattah et al. (62) investigated lemongrass extract antimicrobial effects on yoghurt and found that 0.1% and 0.3% of lemongrass water extract were effective for inactivating both mould growth and mycotoxin production.

Fazeli et al. (63) studied the antibacterial effect of *Rhus coriaria* and *T. vulgaris* on some foodborne bacteria. They reported that the former Persian spices was



**Figure 3.** Response surface of *S. aureus* population (log CFU/ml) after 24 h of dough refrigerated storage in relation to *T. vulgaris* and *M. piperita* when *Z. tenuior* was not added (a) or was added at its maximum concentration (b).

effective against pathogenic bacteria and could be used as natural food additives. Mohamed *et al.* (49) studied the effects of antimicrobial properties of dill, caraway, coriander, basil and lemon balm EOs on dairy product quality. They observed that caraway and dill EOs had the highest antibacterial effect against the five tested pathogenic bacteria, *i.e.* *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*.

Bagamboula *et al.* (64) investigated the effectiveness of some EOs (thyme and basil) and some of their components (carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cimene) against *Shigella sonnei* and *S. flexneri* and demonstrated their effectiveness in reducing their cell numbers below the detection limit at concentration of 1%.

The antimicrobial activity of these EOs has been tested in dairy products, but few data are available on antibacterial influence of *T. vulgaris*, *Z. tenuior* and *M. piperita* EOs in dairy product such as doogh (47, 48, 50, 60). It has been shown that the combination of terpenic compounds either in single EO or their mixtures affects different biochemical processes of the target bacteria, and produces various interactive antibacterial effects (35). For instance, synergism has been observed between the EOs of *Origanum vulgare* and that of *Rosmarinus officinalis* against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* (65).

The effects of natural EOs derived from the *Lamiaceae* plants family on Doogh samples were measured and demonstrated to have an effect on *Staphylococcus aureus*. The results showed that the concentration conditions including *T. vulgaris* L., *M. piperita* and *Z. tenuior* L. EOs influenced the survival of *S. aureus*, which decreased during refrigerate storage. In general, the optimum concentration conditions were obtained at the maximum concentration of one EO, independently from the concentrations of the others. However, slightly lower *S. aureus* survivals were observed at the maximum concentration of *Z. tenuior* EO. In spite of the antimicrobial activity of the tested EOs, further experiments are needed to assess their performance in food matrix and, in particular, in dairy product.

### Acknowledgments

The authors are very grateful to Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran for financial support.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

### Author's contribution

A. Abdolshahi, S. Naybandi-Atashi, M. Heydari-Majd, B. Salehi, M. Sharifi-Rad and J. Sharifi-Rad designed the study and carried out the experiments and analyzed the results. B. Salehi, M. Sharifi-Rad, J. Sharifi-Rad, F. Kobarfard, S. A. Ayatollahi, G. Tabanelli, C. Montanari and M. Iriti contributed to write the manuscript. G. Tabanelli contributed to performed second order polynomial model and C. Montanari contributed to performed statistical analysis. M. Iriti, A. Ata, and J. Sharifi-Rad supervised the final version of the manuscript.

### References

- Najafi P, Asadollahi M. Examination of the production content of milk and dairy products in Iran. *Agri-Jahad Report* 2011; 22-23.
- Kamal RM, Bayoumi MA, El Aal SFA. MRSA detection in raw milk, some dairy products and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. *Food Control* 2013; 33(1): 49-53.
- Danielsson-Tham M-L. Staphylococcal food poisoning. *Food Associated Pathogens* 2013; 250-256.
- Zastempowska E, Grajewski J, Twarużek M. Food-borne pathogens and contaminants in raw milk—a review. *Annals of Animal Science* 2016; 16(3): 623-639.
- Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 126(3): 302-310.
- Hennekinne J-A, De Buyser M-L, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews* 2012; 36(4): 815-836.
- Sharifi-Rad J, Hoseini-Alfatemi S, Sharifi-Rad M, Miri A. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Prosopis farcta* different parts extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Minerva Biotechnologica* 2014; 4(26): 287-293.
- Sharifi-Rad M, Iriti, M., Sharifi-Rad, M., Gibbons, S. & Sharifi-Rad, J. Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of Rubiaceae, Fabaceae and Poaceae plants: A search for new sources of useful alternative antibacterials against MRSA infections. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)* 2016; 62: 39-45.
- Salehi B, Mortaz E, Tabarsi P. Comparison of antibacterial activities of cadmium oxide nanoparticles against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus* bacteria. *Advanced Biomedical Research* 2015; 4.
- Salehi B, Mehrabian S, Ahmadi M. Investigation of antibacterial effect of Cadmium Oxide nanoparticles on *Staphylococcus Aureus* bacteria. *Journal of Nanobiotechnology* 2014; 12(1): 26.
- Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 2005; 22(4): 273-292.
- Sharifi-Rad J, Mnayer D, Tabanelli G *et al.* Plants of the genus *Allium* as antibacterial agents: From tradition to pharmacy. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)* 2016; 62(9): 57-68.
- Sharifi-Rad M, Varoni EM, Salehi B *et al.* Plants of the Genus *Zingiber* as a Source of Bioactive Phytochemicals: From Tradition to Pharmacy. *Molecules* 2017; 22(12): 2145.
- Sharifi-Rad J, Salehi B, Varoni EM *et al.* Plants of the *Melaleuca* genus as antimicrobial agents: from farm to pharmacy. *Phytotherapy Research* 2017; 31(10): 1475-1494.
- Sharifi-Rad J, Salehi B, Stojanović-Radić ZZ *et al.* Medicinal plants used in the treatment of tuberculosis—Ethnobotanical and ethnopharmacological approaches. *Biotechnology Advances* 2017; doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.07.001.
- Salehi B, Zucca P, Sharifi-Rad M *et al.* Phytotherapeutics in cancer invasion and metastasis. *Phytotherapy Research* 2018; doi:10.1002/ptr.6087.
- Sharifi-Rad J, Fallah F, Setzer W, Entezari RH, Sharifi-Rad M. *Tordylium persicum* Boiss. & Hausskn extract: A possible alternative for treatment of pediatric infectious diseases. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)* 2016; 62(9): 20-26.
- Sharifi-Rad J, Hoseini-Alfatemi S, Sharifi-Rad M, Miri A. Phytochemical screening and antibacterial activity of different parts of the *Prosopis farcta* extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Minerva Biotechnologica* 2014; 26(4): 287-293.

19. Sharifi-Rad J, Mnayer D, Roointan A et al. Antibacterial activities of essential oils from Iranian medicinal plants on extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France) 2016; 62(9): 75-82.
20. Sahraie-Rad M, Izadyari A, Rakizadeh S, Sharifi-Rad J. Preparation of strong antidandruff shampoo using medicinal plant extracts: a clinical trial and chronic dandruff treatment. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2015; 10(4): e21517.
21. Sharifi-Rad M, Mnayer D, Flaviana Bezerra Morais-Braga M et al. *Echinacea* plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications. *Phytotherapy Research* 2018; doi: 10.1002/ptr.6101.
22. Raeisi S, Ojagh SM, Sharifi-Rad M, Sharifi-Rad J, Quek SY. Evaluation of *Allium paradoxum* (MB) G. Don. and *Eryngium caucasicum* traue. Extracts on the shelf-life and quality of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during refrigerated storage. *Journal of Food Safety* 2017; 37(3): e12321.
23. Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules* 2017; 22(1): 70.
24. Salehi B, Ayatollahi SA, Segura-Carretero A KF et al. Bioactive chemical compounds in *Eremurus persicus* (Joub. & Spach) Boiss. essential oil and their health implications. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France) 2017; 63(9): 1-7.
25. Sharifi-Rad J, Salehi B, Schnitzler P et al. Susceptibility of herpes simplex virus type 1 to monoterpenes thymol, carvacrol, p-cymene and essential oils of *Sinapis arvensis* L., *Lallemantia royleana* Benth. and *Pulicaria vulgaris* Gaertn. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France) 2017; 63(8): 42-47.
26. Raeisi S, Sharifi-Rad M, Quek SY, Shabanpour B, Sharifi-Rad J. Evaluation of antioxidant and antimicrobial effects of shallot (*Allium ascalonicum* L.) fruit and ajwain (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) seed extracts in semi-fried coated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets for shelf-life extension. *LWT-Food Science and Technology* 2016; 65: 112-121.
27. Sharifi-Rad J, Soufi L, Ayatollahi S et al. Anti-bacterial effect of essential oil from *Xanthium strumarium* against shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France) 2016; 62(9): 69-74.
28. Sharifi-Rad M, Tayeboon G, Miri A et al. Mutagenic, antimutagenic, antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities of *Scandix pecten-veneris* L. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France) 2016; 62(6): 8-16.
29. Stojanović-Radić Z, Pejčić M, Stojanović N, Sharifi-Rad J, Stanković N. Potential of *Ocimum basilicum* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against biofilms of *P. aeruginosa* clinical isolates. *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France) 2016; 62(9): 27-32.
30. Snow Setzer M, Sharifi-Rad J, Setzer WN. The search for herbal antibiotics: An in-silico investigation of antibacterial phytochemicals. *Antibiotics* 2016; 5(3): 30.
31. Bagheri G, Mirzaei M, Mehrabi R, Sharifi-Rad J. Cytotoxic and Antioxidant Activities of *Alstonia scholaris*, *Alstonia venenata* and *Moringa oleifera* Plants From India. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 2016; 11(3): e31129.
32. Salehi B, Mishra AP, Shukla I et al. Thymol, thyme and other plant sources: health and potential uses. *Phytotherapy Research* 2018 ; doi: 10.1002/ptr.6109.
33. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M et al. Carvacrol and Human Health: A Comprehensive Review. *Phytotherapy Research* 2018; doi: 10.1002/ptr.6103.
34. Salehi B, Kumar NVA, Şener B, Sharifi-Rad M, Kılıç M, Mahady GB, Vlaisavljevic S et al. Medicinal Plants Used in the Treatment of Human Immunodeficiency Virus. *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(5): 1459.
35. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 20014; 94(3): 223-253.
36. El Asbahani A, Miladi K, Badri W et al. Essential oils: from extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 2015; 483(1): 220-243.
37. Patrignani F, Siroli L, Serrazanetti DI, Gardini F, Lanciotti R. Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology* 2015; 46(2): 311-319.
38. Seow YX, Yeo CR, Chung HL, Yuk H-G. Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2014; 54(5): 625-644.
39. Montanari C, Serrazanetti DI, Felis G et al. New insights in thermal resistance of staphylococcal strains belonging to the species *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control* 2015; 50: 605-612.
40. Sharifi-Rad J, Hoseini-Alfatemi SM, Sharifi-Rad M, Setzer WN. Chemical composition, antifungal and antibacterial activities of essential oil from *Lallemantia royleana* (Benth. In Wall.) Benth. *Journal of Food Safety* 2015; 35(1): 19-25.
41. Gottardi D, Bukvicki D, Prasad S, Tyagi AK. Beneficial Effects of Spices in Food Preservation and Safety. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7.
42. Shahbazi Y. *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin as potential antimicrobial agents against *Escherichia coli* O157: H7 in doogh (Iranian yoghurt drink). *Journal of Pathogens* 2015; 176024: 7.
43. Karim G, Meshgi MA, Ababil RK, Bokaie S. Antimicrobial Effect of *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* Essential Oils in Two Storage Temperatures on the Survival of *Debaryomyces hansenii* in Iranian Doogh. *Applied Food Biotechnology* 2016; 3(2): 99-104.
44. Shahbazi Y. The antibacterial effect of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in doogh, a yoghurt-based Iranian drink. *Veterinary Research Forum* 2016; 7(3):213-219.
45. Marino M, Bersani C, Comi G. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection* 1999; 62(9): 1017-1023.
46. Boruğă O, Jianu C, Mişcă C, Golet I, Gruia A, Horhat F. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life* 2014; 7(Spec Iss 3): 56.
47. Ghalem BR, Zouaoui B. Evaluation of the quality of steamed yogurt treated by *Lavandula* and *Chamaemelum* species essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research* 2013; 7(42): 3121-3126.
48. Ghalem BR, Zouaoui B. Microbiological, physico-chemical and sensory quality aspects of yoghurt enriched with *Rosmarinus officinalis* oil. *African Journal of Biotechnology* 2013; 12(2).
49. Mohamed SH, Zaky WM, Kassem JM, Abbas HM, Salem M, Said-Al Ahl H. Impact of antimicrobial properties of some essential oils on cheese yoghurt quality. *World Applied Sciences Journal* 2013; 27(4): 497-507.
50. Asensio CM, Grosso NR, Juliani HR. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. *LWT-Food Science and Technology* 2015; 60(2): 664-671.
51. de Carvalho RJ, de Souza GT, Honório VG et al. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. *Food Microbiology* 2015; 52: 59-65.
52. Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control* 2015; 54:



111-119.

53. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 2012; 3.

54. Bashi DS, Mortazavi SA, Rezaei K, Rajaei A, Karimkhani MM. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from yarrow (*Achillea beibrestinii*) by response surface methodology. *Food Science and Biotechnology* 2012; 21(4): 1005-1011.

55. Majd MH, Rajaei A, Bashi DS, Mortazavi SA, Bolourian S. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomidosema parviflorum*) leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 2014; 57: 195-202.

56. McFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* 1907; 49(14): 1176-1178.

57. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*: John Wiley & Sons; 2016.

58. Abu-Darwish MS, Al-Ramamneh E, Kyslychenko VS, Karpiuk UV. The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region-South of Jordan. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 25(1): 239-246.

59. Guerra ICD, de Oliveira PDL, de Souza Pontes AL et al. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × vil-*

*losa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology* 2015; 214: 168-178.

60. Marchese A, Orhan IE, Daglia M et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chemistry* 2016; 210: 402-414.

61. Bonyadian M, Moshtaghi H. The Effects of Some Herb's Essential Oils on *S. aureus* in Feta Cheese. *Journal of Medicinal Plants* 2007; 1(21): 19-25.

62. Abd-El Fattah S, Yahia Hassan A, Bayoum H, Eissa H. The use of lemongrass extracts as antimicrobial and food additive potential in yoghurt. *Journal of American Science* 2010; 6: 582-594.

63. Fazeli MR, Amin G, Attari MMA, Ashtiani H, Jamalifar H, Samadi N. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control* 2007; 18(6): 646-649.

64. Bagamboula C, Uyttendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 2004; 21(1): 33-42.

65. De Azeredo GA, Stamford TLM, Nunes PC, Neto NJG, De Oliveira MEG, De Souza EL. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International* 2011; 44(5): 1541-1548.