

**Universidad Miguel Hernández**  
**Escuela Politécnica Superior de Orihuela**  
Departamento de Tecnología Agroalimentaria



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y  
PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y  
ANTIOXIDANTES DE ACEITES  
ESENCIALES DE ESPECIES DE  
*THYMUS* PROCEDENTES DE CULTIVO  
ECOLÓGICO Y SU APLICACIÓN A  
PELÍCULAS DE QUITOSANO**

Memoria realizada para optar al título de Doctor, presentada por

Carmen Ballester Costa

Orihuela 2016

**Universidad Miguel Hernández**  
**Escuela Politécnica Superior de Orihuela**  
Departamento de Tecnología Agroalimentaria



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y  
PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y  
ANTIOXIDANTES DE ACEITES  
ESENCIALES DE ESPECIES DE  
*THYMUS* PROCEDENTES DE CULTIVO  
ECOLÓGICO Y SU APLICACIÓN A  
PELÍCULAS DE QUITOSANO**

**TESIS DOCTORAL**

*Presentada por:*

***Carmen Ballester Costa***

*Directores:*

***Manuel Viuda Martos***

***Juana Fernández López***

***Esther Sendra Nadal***

**Universidad Miguel Hernández**  
**Escuela Politécnica Superior de Orihuela**  
Departamento de Tecnología Agroalimentaria



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y  
PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y  
ANTIOXIDANTES DE ACEITES  
ESENCIALES DE ESPECIES DE  
*THYMUS* PROCEDENTES DE CULTIVO  
ECOLÓGICO Y SU APLICACIÓN A  
PELÍCULAS DE QUITOSANO**

**Dr. Manuel Viuda Martos**

**Dra. Juana Fernández López**

**Dra. Esther Sendra Nadal**

**Carmen Ballester Costa**



**D. José Ramón Díaz Sánchez**, Dr. Ingeniero Agrónomo y Catedrático de Escuela Universitaria del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández,

**CERTIFICA:**

Que la Tesis Doctoral Titulada “**Composición química y propiedades antibacterianas y antioxidantes de Aceites Esenciales de especies de *Thymus* procedentes de cultivo ecológico y su aplicación a películas de quitosano**” de la que es autora la Licenciada en Ciencias Biológicas **Carmen Ballester Costa** ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Manuel Viuda Martos, la Dra. Juana Fernández López y la Dra. Esther Sendra Nadal, la cual considero conforme en cuanto a forma y contenido para que sea presentada para su correspondiente exposición publica.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Orihuela a veintiséis de febrero de dos mil dieciséis.

Fdo.: Dr. José Ramón Díaz Sánchez



**D. Manuel Viuda Martos**, Dr. por la Universidad Miguel Hernández y Profesor Ayudante Doctor del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández.

**Dña. Juana Fernández López**, Dra. Veterinaria y Profesor Titular de Universidad, del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández.

**Dña. Esther Sendra Nadal**, Dra. Veterinaria y Profesor Titular de Universidad, del Departamento de Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Miguel Hernández.

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral Titulada “**Composición química y propiedades antibacterianas y antioxidantes de Aceites Esenciales de especies de Thymus procedentes de cultivo ecológico y su aplicación a películas de quitosano**” llevada a cabo por la Licenciada en Ciencias Biológicas **Carmen Ballester Costa** ha sido realizada bajo nuestra dirección y autorizamos a que sea presentada para optar a la obtención del grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández.

Y para que conste a los efectos oportunos se firma el presente certificado en Orihuela a veintiséis de febrero de dos mil dieciséis.

Fdo.: Dr. Manuel Viuda Martos

Fdo.: Dra. Juana Fernández López

Fdo.: Dra. Esther Sendra Nadal

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a todas las personas que con sus aportaciones han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

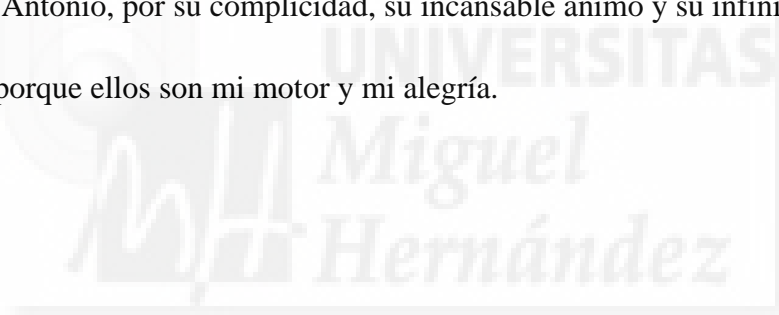
A mi Director Dr. Manuel Viuda Martos, porque de él nació la idea de realizar esta Tesis y con su ayuda e implicación ha contribuido de manera decisiva.

A mis Directoras Dra. Juana Fernández López y Dra. Esther Sendra Nadal, porque he tenido su colaboración incondicional y han estado siempre atentas a mis necesidades.

Al Dr. Jose Ángel Pérez Álvarez, director del grupo de investigación de Industrialización de Productos de Origen Animal (IPOA), por su apoyo e interés en que este proyecto saliese adelante.

A mi marido Antonio, por su complicidad, su incansable ánimo y su infinita paciencia.

A mis hijos, porque ellos son mi motor y mi alegría.





*A mis padres*

*Camilo y Carmen*



## Índice

---



<b>INDICE GENERAL</b>	<b>Página</b>
<b>1.-ESTRUCTURA DE LA TESIS</b>	1
<b>2.-INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>2.1.-Producción agroalimentaria ecológica</b>	3
<i>2.1.1.-Conservación de productos ecológicos</i>	4
<b>2.2.-Plantas Aromáticas</b>	5
<b>2.3.-Género <i>Thymus</i></b>	6
<i>2.3.1.-Taxonomía del Género <i>Thymus</i></i>	7
<b>2.4.-Aceites esenciales de plantas aromáticas</b>	9
<b>2.5.-Propiedades de los aceites esenciales</b>	11
<i>2.5.1.-Actividad antibacteriana de los aceites esenciales</i>	11
<i>2.5.2.-Actividad antioxidante de los aceites esenciales</i>	14
<i>2.5.3.-Otras propiedades de los aceites esenciales</i>	16
<i>2.5.3.1.-Capacidad antifúngica</i>	17
<i>2.5.3.2.-Capacidad preventiva contra el cáncer</i>	17
<i>2.5.3.3.-Eficacia antiviral</i>	18
<b>2.6.-Recubrimientos y películas comestibles</b>	18
<b>2.6.1.-Qitosano</b>	19
<i>2.6.1.1.-Aplicaciones del qitosano</i>	21
<b>2.6.2.-Películas de qitosano</b>	22
<b>2.6.3.-Películas de qitosano adicionadas con aceites             esenciales de plantas aromáticas</b>	25
<i>2.6.3.1-Propiedades antioxidantes y antimicrobianas             de las películas comestibles adicionadas con AEs.</i>	26
<b>3.- OBJETIVOS</b>	28
<b>3.1-Objetivos generales</b>	28
<b>3.2.-Objetivos particulares</b>	28
<b>4.-MATERIALES Y MÉTODOS</b>	29
<b>4.1.-Aceites esenciales de tomillo</b>	29
<b>4.2.-Composición química de los aceites esenciales</b>	30

<b>4.3.-Determinación de la actividad antibacteriana de los AEs</b>	30
4.3.1.- <i>Cepas bacterianas</i>	30
4.3.2.- <i>Método de difusión en disco</i>	31
4.3.3.- <i>Determinación del efecto del volumen de aceite esencial</i>	32
4.3.4.- <i>Método de microdilución</i>	32
<b>4.4.-Determinación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales</b>	33
4.4.1.- <i>Capacidad secuestrante del radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).</i>	33
4.4.2.- <i>Poder antioxidante por reducción del ion férrico (FRAP)</i>	33
4.4.3.- <i>Capacidad quelante del ion ferroso (FIC).</i>	33
4.4.4.- <i>Capacidad secuestrante del radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS•+)</i>	34
<b>4.5.-Determinación de la actividad antibacteriana en extractos cárnicos.</b>	34
4.5.1.- <i>Preparación del medio de cultivo</i>	34
4.5.2.- <i>Método de difusión en disco</i>	35
4.5.3.- <i>Efecto del volumen de aceite esencial</i>	35
<b>4.6.-Elaboración de las películas de quitosano</b>	35
<b>4.7.-Determinación de la actividad antibacteriana de las películas de quitosano</b>	37
<b>4.8.-Determinación de la actividad antioxidante de las películas de quitosano</b>	37
<b>4.9.-Metodología estadística</b>	37
<b>5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	39
<b>5.1.-Composición química de los Aceites Esenciales sometidos a estudio</b>	39
<b>5.2.-Actividad antibacteriana de los aceites esenciales sometidos a estudio</b>	41

---

5.2.1.-Método de difusión en disco	41
5.2.2.-Método de microdilución	45
5.3.-Actividad antibacteriana, de los aceites esenciales sometidos a estudio, frente a diversas cepas bacterianas empleando como medio de cultivo diferentes extractos cárnicos	49
5.3.1.-Determinación del efecto del volumen sobre la actividad antibacteriana empleando como medio de cultivo diferentes extractos cárnicos	56
5.4.-Actividad antioxidante de los aceites esenciales sometidos a estudio	62
5.5.-Actividad antibacteriana y antioxidante de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales sometidos a estudio.	66
5.5.1- Actividad antibacteriana de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales sometidos a estudio.	67
5.5.2-Actividad antioxidante de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales sometidos a estudio.	69
6.-CONCLUSIONES	73
7.-BIBLIOGRAFÍA	76
8.-PUBLICACIONES	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
<b>Figura 1</b>	A: Estructura química de la quitina; B: estructura química del quitosano. 20
<b>Figura 2</b>	Esquema de las diferentes formas de penetración de un compuesto cuando se adiciona directamente sobre el alimento o a través de una película comestible. 25
<b>Figura 3</b>	Plantas del género <i>Thymus</i> utilizadas para la extracción de los aceites esenciales. (A) <i>Thymus capitatus</i> ; (B) <i>Thymus mastichina</i> ; (C) <i>Thymus vulgaris</i> ; (D) <i>Thymus zygis</i> . 29
<b>Figura 4</b>	Películas de quitosano adicionadas con A: AE de <i>Thymus mastichina</i> ; B: AE de <i>Thymus vulgaris</i> ; C: AE de <i>Thymus capitatus</i> ; D: AE de <i>Thymus zygis</i> . 36
<b>Figura 5</b>	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de A: <i>T. capitatus</i> , B: <i>T. mastichina</i> , C: <i>T. vulgaris</i> , y D: <i>T. zygis</i> sobre la cepa <i>L. innocua</i> usando el método de difusión en disco. 45
<b>Figura 6</b>	Secuestro de los radicales DPPH (determinada como porcentaje de inhibición de dichos radicales) por la acción de los AE obtenidos de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , a diferentes concentraciones. 62
<b>Figura 7</b>	Secuestro de los radicales ABTS, determinada como porcentaje de inhibición de dichos radicales por la acción de los AE obtenidos de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , a diferentes concentraciones. 63
<b>Figura 8</b>	Capacidad quelante del ion ferroso, determinada como porcentaje de quelación de dichos iones por la acción de los AEs obtenidos de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , a diferentes concentraciones. 64
<b>Figura 9</b>	Capacidad de reducir el ion férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) de los AEs obtenidos de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , expresada como mg de Trolox equivalentes/mL de aceite esencial. 65
<b>Figura 10</b>	Contenido en fenoles totales (TPC) de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales de <i>T. zygis</i> (AETZ), <i>T. capitatus</i> (AETC), <i>T. vulgaris</i> (AETV) y <i>T. mastichina</i> (AETM), a diferentes concentraciones. 70

## ÍNDICE DE TABLAS

Tablas		Página
<b>Tabla 1</b>	Grupos los grupos funcionales de los compuestos terpenoides con las principales propiedades de cada uno de ellos.	10
<b>Tabla 2</b>	Tipo y concentración de aceite esencial incorporado a las diferentes películas de quitosano.	37
<b>Tabla 3</b>	Los principales constituyentes de los aceites esenciales <i>T. vulgaris</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. capitatus</i> y <i>T. zygis</i> y sus porcentajes relativos del área total del cromatograma e Índices Kovats.	40
<b>Tabla 4</b>	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>T. mastichina</i> , <i>T. capitatus</i> , <i>T. zygis</i> y <i>T. vulgaris</i> , de cultivo ecológico, usando el método de difusión en disco y empleando un volumen de AE de 30 $\mu$ L.	42
<b>Tabla 5</b>	Efecto del volumen de aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. capitatus</i> y <i>T. zygis</i> , en la determinación de la actividad antibacteriana, usando el método de difusión en disco	44
<b>Tabla 6</b>	Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) en $\mu$ L/mL obtenidos mediante el ensayo de microdilución de los aceites esenciales de <i>T. mastichina</i> , <i>T. zygis</i> , <i>T. capitatus</i> y <i>T. vulgaris</i> frente a las 10 cepas bacterianas.	46
<b>Tabla 7</b>	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico fresco y volumen de AE de 30 $\mu$ L.	50
<b>Tabla 8</b>	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico cocido y un volumen de AE de 30 $\mu$ L.	51
<b>Tabla 9</b>	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto crudo-curado y un volumen de AE de 30 $\mu$ L.	52
<b>Tabla 10</b>	Clasificación de los AEs de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , según su actividad sobre las distintas cepas bacterianas, en los diferentes medios de cultivo elaborados con un extracto cárnico fresco, cocido o crudo curado y un volumen de AE de 30 $\mu$ L.	54

---

<b>Tabla 11</b>	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto fresco y el método de difusión en disco.	57
<b>Tabla 12</b>	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cocido y el método de difusión en disco.	59
<b>Tabla 13</b>	Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>T. capitatus</i> , <i>T. mastichina</i> , <i>T. vulgaris</i> y <i>T. zygis</i> , sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto crudo-curado y el método de difusión en disco.	61
<b>Tabla 14</b>	Actividad antibacteriana de las películas comestibles de quitosano (CH) incorporadas con AEs de <i>T. zygis</i> (CH+AETZ), <i>T. capitatus</i> (CH+AETC), <i>T. vulgaris</i> (CH+AETV) y <i>T. mastichina</i> (CH+AETM) a diferentes concentraciones (0, 1, y 2%) frente a distintas bacterias.	68
<b>Tabla 15</b>	Actividad antioxidante de películas comestibles de quitosano incorporadas con AEs ecológicos de <i>T. zygis</i> (CH+AETZ) <i>T. capitatus</i> (CH+AETC), <i>T. vulgaris</i> (CH+AETV) y <i>T. mastichina</i> (CH+AETM) a diferentes concentraciones por medio de dos métodos antioxidantes diferentes: secuestro del radical DPPH y capacidad reductora del ion férrico (FRAP).	71



## **I. ESTRUCTURA**

---

## 1.- ESTRUCTURA DE LA TESIS

Para la realización de la presente Tesis Doctoral se ha seguido una metodología basada en la publicación de un compendio de artículos de investigación.

La estructura de esta Tesis Doctoral consta de una breve introducción (capítulo segundo) en la que se incluye una revisión bibliográfica sobre la producción ecológica y las propiedades de las plantas aromáticas y los aceites esenciales así como su aplicación en la industria de alimentos. También incluye una revisión sobre el quitosano y su potencial uso en la elaboración de películas para la aplicación en la conservación de alimentos.

En el capítulo tercero se describen los objetivos propuestos y en el capítulo cuarto, se presenta un resumen de los materiales y métodos utilizados para poder entender los distintos procesos de elaboración que se han llevado a cabo y las determinaciones analíticas practicadas.

En el capítulo quinto se recoge un resumen global de los resultados más relevantes obtenidos en los diferentes estudios realizados.

Seguidamente, en el capítulo sexto se presentan las conclusiones de todos los estudios que forman parte de la presente memoria de Tesis Doctoral, mientras que el capítulo séptimo corresponde a la bibliografía consultada.

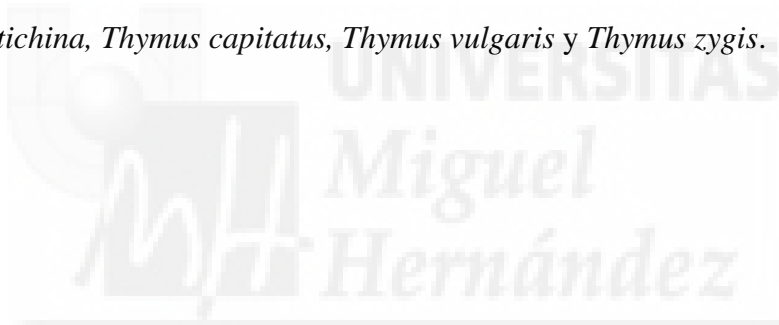
En el último capítulo (octavo) de la presente Tesis Doctoral se incluyen las publicaciones que componen la base de la misma. El primer trabajo, publicado en la revista *Industrial Crops and Products* se centra en la caracterización química y en la determinación de las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales objeto de estudio. En este trabajo se identifica la composición química, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC/MS), y las propiedades antibacterianas frente a diez cepas bacterianas relacionadas con el deterioro de alimentos en refrigeración y cepas bacterianas indicadoras de cepas patógenas como son: *Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Achromobacter denitrificans*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter gergoviae* y *Alcaligenes faecalis* de los cuatro aceites esenciales



pertenecientes al género *Thymus*: *Thymus mastichina*, *Thymus capitatus*, *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis*, objeto de estudio.

En la segunda publicación, que se encuentra bajo revisión en la revista *Food Control*, se determina la actividad antioxidante y la actividad antibacteriana frente a las mismas cepas analizadas en el trabajo publicado en el revista *Industrial Crops and Products* de los cuatro aceites esenciales sometidos a estudio, pero empleando distintos medios de cultivo elaborados con diferentes sistemas modelo a base de extractos cárnicos.

La tercera publicación, que está en proceso de revisión en la revista *Journal of Food Science and Technology*, se centra en determinar las propiedades antioxidantes y antibacterianas frente a cuatro cepas como son: *L. innocua*, *S. marcescens*, *A. faecalis* y *E. amnigenus* de las películas de quitosano adicionadas con aceites esenciales de *Thymus mastichina*, *Thymus capitatus*, *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis*.





## **II. INTRODUCCIÓN**

---

## **2.-INTRODUCCIÓN**

### **2.1. Producción agroalimentaria ecológica**

La producción agroalimentaria ecológica es un sector emergente, moderno, que ha surgido con fuerza como demanda social reglamentada (Reglamentos CE 834/2007, 889/2008 y 505/2012), para hacer frente a la problemática alimentaria, sanitaria y medioambiental de los sistemas intensivos de producción, caracterizada por su calidad diferenciada, rápido desarrollo, implantación y expansión en todos los continentes, así como por su amplia aceptación por parte de los consumidores. En los últimos diez años el mercado de los productos ecológicos se ha caracterizado por un dinámico desarrollo, impulsado por un acusado crecimiento de la demanda. El mercado mundial de los alimentos ecológicos se ha cuadruplicado desde 1999. De tal modo que la superficie dedicada a la producción ecológica en la Unión Europea (UE) se ha duplicado en los últimos años (EUR-Lex, 2016).

El consumo mundial de productos ecológicos superó en 2010 los 45.000 millones de euros. Hay que tener en cuenta, además, que la estructura del consumo de alimentos y bebidas ecológicos es bastante diferente a la correspondiente a la alimentación convencional. Así, en el caso de los productos ecológicos dicha estructura es la siguiente: hortalizas, frutas, legumbres y frutos secos representa el 40%; aceite 12%; vino 8%; carne y derivados cárnicos 7%; panadería y bollería 5% y resto de sectores el 28% (MAGRAMA, 2016).

La producción ecológica en España ha experimentado un importante auge desde sus inicios en la década de los 80, situándose en estos momentos como el primer estado miembro de la Unión Europea en superficie dedicada a este sector y situándose también dentro de los primeros puestos a nivel mundial. La superficie de la agricultura ecológica ha crecido a un ritmo del 5,5% anual en los últimos diez años, al pasar de los 6,4 millones de hectáreas de 2005 a los 11,5 millones de hectáreas de 2015 según datos de la Comisión Europea (FiBL y IFOAM, 2015). Sin embargo, la industria agroalimentaria española de productos ecológicos de origen animal, está mucho menos desarrollada que la de origen vegetal, 663 y 3.034 industrias, respectivamente, en 2011, con la

perspectiva de seguir creciendo, sobresaliendo en este ámbito las de productos hortofrutícolas frescos (16,94%), vinos (16,84%) y aceites (12,10%).

Como se ha mencionado, la industria alimentaria animal representa el 18% frente al 82% de la vegetal, y como consecuencia de ello existe una carencia evidente y desequilibrio entre producción primaria/elaboradores que conlleva a problemas de comercialización de los productos ecológicos en los mercados nacionales. De cualquier modo, en España, se prevé que en los próximos años se mantendrá una tendencia al alza, debido a las condiciones idóneas naturales de nuestro país y al apoyo de las medidas públicas que en esta materia se están desarrollando. La Unión Europea tiene un plan de promoción y fomento de las prácticas ecológicas y por tanto de la producción de alimentos y productos ecológicos.

### ***2.1.1.-Conservación de productos ecológicos.***

Muchas de las propiedades organolépticas y sensoriales de los alimentos disminuyen con el paso del tiempo debido a una gran cantidad de factores (temperatura, luz y aire). Sin embargo, los principales factores causantes de la degradación de los productos ecológicos, en general, son la oxidación lipídica y la degradación producida por los microorganismos. Para combatir estos problemas, la industria agroalimentaria cuenta con nuevas tecnologías, como las altas presiones hidrostáticas, ultrasonidos, pulsos eléctricos o la nanotecnología. Sin embargo, el empleo de estas nuevas tecnologías todavía no está muy instaurada debido en gran medida a las altas inversiones necesarias (Viuda-Martos et al., 2008).

En los últimos años son muchas las sustancias que han sido estudiadas como fuente de antioxidantes y antimicrobianos naturales para la conservación de alimentos en general y alimentos de origen ecológico en particular, ya que estos productos han de estar elaborados sin adición de compuestos artificiales como aditivos, colorantes, saborizantes y/o aromas. Entre ellas se encuentran distintos componentes derivados de las plantas aromáticas como son los aceites esenciales, los cuales ya han demostrado ser eficaces para combatir tanto la oxidación lipídica como la degradación microbiana.

## **2.2.-Plantas Aromáticas**

Se denominan plantas aromáticas a toda especie vegetal cuya importancia radica en poseer un aroma y/o sabor que la hacen útil, estando dicha propiedad dada por componentes o fracciones volátiles que químicamente se denominan esencias o aceites esenciales (Ringuelet, 2013).

A lo largo de la historia las plantas aromáticas y las especias han tenido gran protagonismo. El primer conocimiento de las plantas aromáticas data de la edad de fuego y el comienzo de su utilización para la alimentación se sitúa en la edad de hierro y bronce. Posteriormente distintos pueblos como el egipcio, chino, indio, romano y árabe fueron cultivando y desarrollando el uso de hierbas aromáticas hasta llegar a su uso como hierbas medicinales.

Actualmente se hace uso de los conocimientos que se han ido adquiriendo a lo largo de la historia de las plantas aromáticas para su aplicación en los distintos campos, tales como:

- ❖ Alimentario
- ❖ Farmacéutico
- ❖ Cosmético
- ❖ Agrícola

Las plantas utilizadas con estos fines pertenecen, en términos generales, a tres grandes familias botánicas:

- ❖ Aliáceas: ajo, cebolla, cebolleta, chalotas, etc.
- ❖ Apiáceas: eneldo, perifollo, hinojo, perejil, etc.
- ❖ Lamiáceas: mejorana, melisa, menta, orégano, salvia, tomillo, etc.

En el ámbito alimentario, las hierbas aromáticas han sido ampliamente utilizadas para dar sabor y aroma a los alimentos, utilizándolas como condimento en la cocina. Generalmente se utilizan las hojas de las mismas, ya sean frescas, secas, o deshidratadas y debido a sus características en cuanto a color, aroma y/o flavor son utilizadas en la preparación de alimentos y bebidas (Díaz-Maroto et al., 2002). En la medicina tradicional, son muchas las hierbas aromáticas y especias que han sido utilizadas para

tratar diferentes problemas de salud, como enfermedades infecciosas, inflamaciones o desórdenes digestivos, entre otras. La búsqueda de productos naturales por su potencial curativo es una idea que viene desde la antigüedad, pero ha sido tomada en consideración y desarrollada en los últimos años (Nabavi et al., 2014).

Son numerosas las publicaciones científicas que muestran que las plantas tienen alto potencial para sintetizar diferentes sustancias, denominadas compuestos bioactivos, con propiedades beneficiosas para la salud (Daglia, 2011). Era habitual que los extractos obtenidos de plantas fueran, de forma general, el primer tratamiento recomendado frente a diversas enfermedades, debido a sus múltiples acciones beneficiosas y a sus bajos efectos adversos (Simoes et al., 2009). Estos compuestos bioactivos, obtenidos a partir de las plantas y que son responsables de los efectos beneficiosos, incluyen ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, lecitinas, terpenoides y alcaloides, entre otros (Lai y Roy, 2004; Ciocan y Bara, 2007).

Como se ha mencionado, son muchas las familias de plantas que pueden ser empleadas en la industria cosmética, farmacéutica o alimentaria, pero de entre todas ellas destaca la familia *Lamiaceae* y dentro de esta familia el género *Thymus*.

### **2.3-Género *Thymus*.**

El género *Thymus* engloba 928 especies, nativas de Europa, tanto de la cuenca del Mediterráneo como del norte de Europa, así como de otras partes del mundo, como Asia, Sur América y Australia (Morales, 2002). Este género pertenece a la familia botánica de las labiadas (*Lamiaceae*), la cual comprende 150 géneros, con cerca de 2800 especies, distribuidas por todo el mundo. Según la etimología, *Thymus* es la latinización de la voz griega *thyo* (= yo perfume), según ciertos autores, o de *thymos* (= fuerza), según otros. Este nombre fue usado de manera general para referirse a un conjunto de plantas aromáticas que se han utilizado como estimulantes de las funciones vitales. El nombre más frecuente en lengua castellana es "tomillo", que deriva del latín y que igualmente expresa un concepto amplio y vago desde el punto de vista botánico (Morales, 1986).

El género *Thymus* tiene una importancia destacada dentro de la flora de la península ibérica. Vulgarmente estas plantas han sido denominadas "tomillos", y es

muy frecuente encontrar una o varias especies formando parte de los matorrales caméfitos, de escaso porte y cobertura, a lo largo de la vegetación típica mediterránea (Morales, 2010).

Los tomillos son arbustos con porte pequeño, de hoja perenne, que forma una mata leñosa muy tupida de hasta unos 15-30 cm de altura. Los tallos son ramificados, de tonalidad gris y aspecto leñoso, poblado densamente de pequeñas hojas de forma entre ovada y lanceolada. En las extremidades de los tallos se forman inflorescencias de 3 a 6 flores en espiga. Estas flores, con la corola del labio superior escotada y el inferior dividido en tres lóbulos, pueden adquirir color blanco o rosa, mientras que el cáliz es rojizo y aterciopelado (Rivas-Martínez, 2004). Es una especie que vive, preferentemente sobre suelos ricos en bases, sobre todo en calizas y margas, también en terrenos yesosos cuando la influencia de éste no es muy acusada, y raramente sobre suelos arenosos. Es frecuente encontrarlo en suelos pedregosos, grietas de rocas o sobre cantiles. Florece en primavera, de marzo a junio.

El género *Thymus* se caracteriza por contener una gran riqueza de aceites esenciales, y debido a las características de los mismos, se le atribuyen propiedades beneficiosas para la salud, además de propiedades antibacterianas (suficientemente contrastadas en la actualidad); por todo ello, se le engloba dentro de las llamadas plantas medicinales (Morales, 2010). Si bien estas propiedades pueden verse afectadas por las condiciones climáticas y edáficas, las características y composición química de un aceite esencial proveniente de estas plantas, está determinado genéticamente (Morales, 1986). Desde el punto de vista taxonómico, es patente la existencia de gran número de especies o taxones subespecíficos del género *Thymus*, lo que indica su gran diversificación.

### **2.3.1.-Taxonomía del Género *Thymus*.**

Al utilizar la taxonomía botánica, para la ordenación y clasificación del género *Thymus*, nos encontramos que para géneros o subgéneros complejos, éstos pueden dividirse en secciones; por lo que la sección se corresponde con una taxonomía intermedia entre el género, subgénero y especie. Las secciones por tanto engloban a grupos de especies que mantienen características comunes, pero no de suficiente entidad

para clasificarlos como géneros.

El género *Thymus* puede dividirse en siete secciones. Dentro de esta clasificación por secciones, se encuentran dos de ellas, que por ser objeto de estudio en este trabajo, se describen más detalladamente; son la sección *Mastichina* y la sección *Thymus*, que a su vez tienen la siguiente subdivisión (Morales, 1986):

1.-Sección *Mastichina* (Miller) Benth se subdivide en

- *T. mastichina* (L.) L.
  - Subsp. *mastichina*
  - Subsp. *donyanae* R. Morales
- *T. albicans* Hoffmanns y Link

2.-Sección *Thymus*

- Subsección *Thymastra* (Nyman ex Velen.) R. Morales
  - *T. capitellatus* Hoffmanns y Link.
  - *T. camphoratus* Hoffmanns y Link.
- Subsección *Thymus*
  - *T. carnosus* Boiss.
  - *T. vulgaris* L.
    - Subsp. *Vulgaris*
    - Subsp. *Aestivus* (Willk.) Bolós y Bolós.
  - *T. orospedanus* Huguet del Villar.
  - *T. hyemalis* Lange.
  - *T. zygis* Loefl.ex L.
    - Subsp. *zygis*.
    - Subsp. *gracilis* (Boiss.) R. Morales
    - Subsp. *sylvestris* (Hoffmanns y Link) Brot. Ex Coutinho.
  - *T. baeticus* Boiss. ex Lacaita.
  - *T. willdenowii* Boiss.
  - *T. loscosii* Willk.
  - *T. serpylloides* Bory.



## 2.4.-Aceites esenciales de plantas aromáticas.

Los aceites esenciales (AEs) son productos volátiles de naturaleza y composición química compleja, extraídos de ciertas plantas aromáticas y especias que poseen aromas característicos (Kuklinski, 2000; Bruneton, 2001). Son lípidos simples, sin ácidos grasos, a diferencia de los aceites fijos que contienen ácidos grasos como componentes estructurales fundamentales y que no son volátiles (Burt, 2004). Como se ha mencionado, no son grasos, y son muy poco densos. Son insolubles en agua, aunque sí son “arrastrables” por ella por hidrodestilación, solubles en alcohol, grasas y aceites vegetales. La exposición al aire provoca su oxidación. En la planta estas sustancias se almacenan en conductos de aceites, conductos de resinas y en los tricomas (Baser y Demirci, 2007).

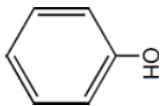
La obtención de los AEs de las distintas partes de las plantas se puede realizar mediante diferentes métodos de extracción, como son: la destilación por arrastre de vapor, la extracción por disolventes, la extracción por fluidos supercríticos y por medio del uso de microondas (Peredo-Luna, et al., 2009). A escala comercial, la destilación por arrastre de vapor es el método preferente para la extracción de AEs (Masango, 2005).

Los AEs resultantes de estos procesos son muy volátiles e intensamente aromáticos. Sus componentes se dividen en dos grandes grupos: compuestos no terpenoides, y compuestos terpenoides. En el grupo de los compuestos no terpenoides se encuentran sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. En cuanto a sus usos y aplicaciones no son tan importantes como los terpenoides. Los compuestos terpenoides son sustancias químicas presentes en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas y son los que les confieren las características de la actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica, entre otras. Principalmente, en los AEs encontramos los monoterpenos ( $C_{10}$ ), como limoneno, *p*-cimeno y  $\alpha$ -pineno, aunque también son comunes los sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) y los diterpenos ( $C_{20}$ ).

El rasgo característico de los monoterpenos de los aceites esenciales es su alta volatilidad y olores significativos (Haig, 2008).

En la Tabla 1 se presentan los grupos funcionales de los compuestos terpenoides con las principales propiedades de cada uno de ellos.

**Tabla 1.** Grupos los grupos funcionales de los compuestos terpenoides con las principales propiedades de cada uno de ellos

Compuesto	Grupo funcional	Ejemplo	Propiedades
<b>Alcohol</b>	$R-CH_2-OH$	Mentol, Geraniol	Antimicrobiano, Antiséptico, Tonificante, Espasmolítico
<b>Aldehído</b>	$R-CHO$	Citral, Citronelal	Espasmolítico, Sedante, Antiviral
<b>Cetona</b>	$R_1-CO-R_2$	Alcanfor, Tuyona	Mucolítico, Regenerador celular, Neurotóxico
<b>Éster</b>	$R_1-COO-R_2$	Metil Salicilato	Espasmolítico, Sedativo, Antifúngico
<b>Éteres</b>	$-C-O-C-$	Cineol, Ascaridol	Expectorante, Estimulante
<b>Éter fenólico</b>	Anillo - O - C	Safrol, Anetol, Miristicina	Diurético, Carminativo, Estomacal, Expectorante
<b>Fenol</b>		Timol, Eugenol, Carvacrol	Antimicrobiano, Irritante, Estimulante, Inmunológico
<b>Hidrocarburo</b>	Sólo contiene C y H	Pineno, Limoneno	Estimulante Descongestionante Antivírico, Antitumoral

En términos generales, los aceites esenciales están compuestos por más de setenta componentes, fundamentalmente mezclas de hidrocarburos (terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos) y compuestos oxigenados (alcoholes, cetonas, aldehídos, fenoles, ésteres, etc.). Éstos pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos (Russo et al., 1998; Carson et al., 2006).

La mayoría de las veces, la bioactividad de un AE está determinada por uno o dos de sus componentes principales (Bakkali et al., 2008). Pero en otras ocasiones, la actividad no se atribuye a ninguno de los constituyentes mayoritarios, y es la combinación de moléculas la que modifica la actividad para ejercer un efecto significativo (Isman et al., 2008).

Es muy importante el papel que juegan los compuestos minoritarios, ya que existen evidencias de que estos componentes contribuyen, de manera significativa, a las propiedades funcionales que el aceite esencial pueda presentar, debido al posible sinergismo entre distintos componentes (Burt, 2004).

Las composiciones de los aceites esenciales están muy influenciadas por factores intrínsecos y factores ecológicos. Dentro de los factores intrínsecos, se pueden enumerar: la especie, la variedad, el clon y el ecotipo. Y dentro de los factores ecológicos, pueden destacarse la procedencia geográfica, las condiciones climáticas, de suelo y bióticas. También influyen en la composición final de los AEs los factores tecnológicos, como las técnicas de cultivo, tipos de procesos de recolección, las condiciones de almacenamiento y tecnologías de procesamiento (Mancini et al., 2015).

Cuando coinciden en género y especie, la variación en cuanto a su composición química da lugar a lo que llamamos los diferentes quimiotipos del AE. Se denomina “quimiotipo” a un grupo de individuos de una especie, que se distingue en forma significativa del resto por su composición química. Cuando la concentración de un componente es muy superior a la del resto, se denomina quimiotipo simple. Los quimiotipos mixtos son aquellos que presentan concentración importante de más de un constituyente (Sotomayor, 1998).

Debido a los procesos de hibridación de las plantas del género *Thymus*, se genera un poliformismo que da lugar a las diferentes especies y subespecies existentes en este género. Esta alta variabilidad ecológica tiene su repercusión en las diferentes composiciones de los AEs de las distintas especies pertenecientes a éste género.

## **2.5.-Propiedades de los aceites esenciales.**

### ***2.5.1.-Actividad antibacteriana de los aceites esenciales.***

Los agentes antibacterianos se utilizan en los alimentos por dos razones principales: (i) control de procesos de deterioro natural (conservación de alimentos) y (ii) evitar el crecimiento de los microorganismos, incluyendo microorganismos patógenos (seguridad alimentaria). En la actualidad, el consumidor está muy concienciado con la relación existente entre la alimentación y la salud y existe una tendencia creciente a consumir alimentos naturales, seguros y de buena calidad, con la inclusión mínima de compuestos químicos, empleados como conservantes, y su sustitución por conservantes naturales, que son aquellos que han sido obtenidos de animales, plantas y fuentes microbianas.

Unos de estos compuestos, obtenidos de las plantas, y que han demostrado poseer una alta actividad antibacteriana son los aceites esenciales. Así, los AEs son muy valorados por su eficacia para usos de conservación y seguridad alimentaria (Gyawali e Ibrahim, 2014; Prakash et al., 2015). La actividad antibacteriana de los AEs depende principalmente de cuatro características: (i) su carácter hidrófilo o hidrófobo, (ii) su composición química y (iii) la cepa bacteriana y (iv) el número de colonias sobre la que actúan (Kalemba y Kunicka, 2003; López-Malo et al., 2005; Fisher y Philips, 2008; Solorzano-Santos y Miranda-Novales, 2011).

En este sentido, está ampliamente documentado, en la literatura científica, las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales de hierbas aromáticas y especias en general y los pertenecientes a las distintas especies del género *Thymus* en particular (Jamali et al., 2013; Donato et al., 2015; Pesavento et al., 2015; Carrillo-Hormaza et al., 2015; Zhang et al., 2016). Así, Rota et al. (2008), estudiaron la actividad antibacteriana de tres AEs pertenecientes al género *Thymus* como son: *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* subsp. *Gracilis* y *Thymus hyemalis* Lange frente a diversas cepas bacterianas (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* serotype O:8; *Shigella flexneri* serovar 2a y *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* serovar 4b, *L. monocytogenes* serovar 1/2c y *Staphylococcus aureus*). El AE que mostró mayor actividad fue el de *T. hyemalis* seguido del AE de *T. zygis* y por último el AE de *T. vulgaris*. Con respecto a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de estos AEs, los que presentaban mayor poder bactericida y propiedades bacteriostáticas fueron, en este orden *T. hyemalis*, *T. zygis* y *T. vulgaris*. De Martino et

al. (2009) analizaron la actividad antibacteriana de los aceites esenciales obtenidos de *Thymus longicaulis* y *Thymus pulegioides* recolectados en Italia, frente a una serie de bacterias (*S. aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*). Estos autores obtuvieron halos de inhibición comprendidos entre 9 y 18 mm para el AE de *T. longicaulis* y entre 11 y 20 mm para el AE de *T. pulegioides*. En otro estudio similar, Jamali et al. (2013) analizaron la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de una especie de tomillo (*Thymus maroccanus* Ball) endémico de Marruecos, en función del estado vegetativo y de la parte de la planta analizada, frente a una serie de bacterias tanto Gram (+): *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* y *L. monocytogenes*; como Gram (-) *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Estos autores obtuvieron halos de inhibición entre 21,3 y 43,7 mm para las bacterias Gram (+), y entre 9,7 y 23,7 mm, para las Gram (-). Por su parte El Bouzidi et al. (2013) estudiaron la actividad antibacteriana de los AEs de tres especies de tomillos endémicas de Marruecos como son, *Thymus broussonetii*, *Thymus maroccanus* y *Thymus satureioides*, frente a una serie de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas (*S. aureus*, *M. luteus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *E. coli 1*, *E. coli 2*, *Salmonella* spp. y *Enterobacter cloacae*). Para el AE de *T. broussonetii*, los halos de inhibición variaban entre 27,33 y 53,67 mm. En el caso del AE de *T. maroccanus* los halos de inhibición estaban comprendidos entre 29,33 y 56,17 mm, mientras que para *T. satureioides* salvaje los halos variaban desde 21 hasta 49,17 mm. Pesavento et al. (2015) analizaron la actividad antibacteriana de los AEs de *Origanum vulgare*, *T. vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, *Cinnamomum zeylanicum*, y *Salvia officinalis* frente a 5 cepas patógenas capaces de transmitir enfermedades a través de los alimentos como son: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* y *Clostridium jejuni*. Estos autores mencionan que todos los AEs analizados mostraron actividad antibacteriana frente a todas las bacterias analizadas, siendo los AEs más activos los obtenidos a partir de *T. vulgaris* y *O. vulgare* seguidos de *C. zeylanicum*, *R. officinalis* y *S. officinalis*. Mancini et al. (2015), estudiaron la CMI de cinco AEs de *T. vulgaris* obtenidos de cinco zonas distintas de la región de la campiña del sureste de Italia, frente a 10 cepas bacterianas patógenas (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. faecalis*, *E. coli*, *K.*

*pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* y *Salmonella typhi*). Los AEs mostraron diferente actividad inhibitoria frente a los patógenos, con unos valores de CMI comprendidos entre 6,25 y 100 µg/mL. Boskovic et al. (2015) analizaron la actividad antibacteriana de los AEs obtenidos de orégano y *Thymus* cultivados en Serbia frente a una serie de microorganismos tales como, *S. enteritidis*, *S. thyphimurium*, *S. aureus*; *S. aureus* resistente a la meticilina, *E. coli* y *B. cereus*. La CMI de los AEs de orégano varió entre 160-640 µg/mL y para tomillo entre 320-640 µg/mL.

El mecanismo de acción por el cual los AEs ejercen su actividad antibacteriana no se conoce con total exactitud. Teniendo en cuenta el gran número de componentes químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antimicrobiana no se deba a un único mecanismo específico, sino a la acción conjunta de diferentes mecanismos que actúan sobre distintos puntos diana de la célula (Skandamis et al., 2001; Carson et al., 2002). Una posible hipótesis para explicar el modo de acción de los AEs sería, que estos compuestos tienen una alta capacidad de penetrar y desestabilizar los componentes lipídicos de la pared celular, provocando roturas de las estructuras celulares (como las membranas celulares) provocando así la muerte del microorganismo (Burt, 2004; Holley y Patel, 2005; Fisher y Phillips, 2008). En la literatura científica existen otras muchas teorías que tratan de explicarlo, entre ellas están: la interrupción de los sistemas enzimáticos, la coagulación del citoplasma celular, ataques sobre el material genético o incluso daños sobre las proteínas de membrana que permiten el flujo de electrones al exterior (Oussalah et al., 2006; Xing et al., 2011).

#### **2.5.2.-Actividad antioxidante de los aceites esenciales.**

Los radicales libres, o especies reactivas de oxígeno, son los responsables de la oxidación, tanto en los sistemas alimentarios, como en los biológicos. La oxidación es una de las principales causas de deterioro químico en multitud de productos alimentarios, que provoca su enranciamiento y la alteración de las propiedades organolépticas, en cuanto a color, sabor, aroma y textura. Esto puede provocar una disminución en la calidad nutricional del alimento e incluso afectar a su seguridad alimentaria (Tepe et al., 2005a; Fernández-López et al., 2007). En los organismos biológicos, estos radicales libres provocan la oxidación de lípidos en las células,

disminuyendo la fluidez de la membrana, lo que desencadena mutaciones en el ADN celular y la posibilidad de padecer cáncer (Kumar et al., 2013; Cadet y Wagner, 2014).

Los antioxidantes son sustancias que cuando están en bajas concentraciones (en relación con otros compuestos oxidables), inhiben o retrasan los procesos oxidativos, produciendo su propia oxidación (Shebis et al., 2013). Los compuestos antioxidantes naturales o sintéticos se usan para reducir los daños oxidativos relacionados con la edad y distintas enfermedades, y también para impedir el deterioro de alimentos en la industria alimentaria (Viuda-Martos et al., 2010a). Entre los antioxidantes sintéticos que más se utilizan en alimentos se encuentran, el butil hidroxianisol (BHA), el butil hidroxitolueno (BHT) el galato de propilo (GP) y la terbutil hidroquinona (TBHQ). Estos compuestos tienen la desventaja de ser muy volátiles y, además, se sospecha que son perjudiciales para la salud (Damechki et al., 2001; Shahidi, 2008). Frente a la demanda por parte de los consumidores de fuentes de antioxidantes naturales, la industria ha respondido con un interés en el estudio de los extractos de las plantas aromáticas, debido a que presentan propiedades antioxidantes que son, en algunos casos, superiores a las mostradas por muchos antioxidantes sintéticos de los utilizados normalmente (Viuda-Martos et al., 2010a). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el uso de plantas aromáticas, especias y sus derivados, como los AEs, como antioxidantes naturales, podría estar limitado, debido a sus propiedades aromatizantes y saborizantes que podrían causar modificaciones, a nivel organoléptico, sobre el producto en el que se adicionan. Por tanto, se han de adicionar en la concentración adecuada para que ejerzan su efecto antioxidante, sin variar, de forma significativa, las propiedades organolépticas del producto.

La actividad antioxidante de las hierbas aromáticas, de las especias, de los aceites esenciales y de sus componentes, ha sido objeto de múltiples estudios (Alves-Silva et al., 2013; Teixeira et al., 2013a; Khouya et al., 2015; Hounda et al., 2016; Majouli et al., 2016). De igual modo, en los últimos años ha existido un gran interés en el estudio de la capacidad antioxidante de las especies pertenecientes a la familia botánica de las labiadas y en especial en el estudio de las plantas del género *Thymus*, debido a que es una especie ampliamente extendida, con importantes propiedades antioxidantes. Así, Tepe et al. (2005a) compararon el potencial antioxidante, utilizando

el ensayo del secuestro del radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH), de los aceites esenciales obtenidos de dos especies de tomillos, *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* y *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. Estos aceites esenciales presentaron un valor de IC<sub>50</sub> (concentración de aceite esencial que inhibe el 50% del radical DPPH) de 0,22 y 2,67 mg/mL, respectivamente. En otro estudio similar, Jamali et al. (2013) analizaron la actividad antioxidante del aceite esencial de *Thymus maroccanus* Ball, una planta endémica de Marruecos, en función del estado vegetativo y de la parte de la planta analizada. Estos autores encontraron que, en la etapa de floración, el AE presentaba una mayor actividad antioxidante, analizada con los métodos DPPH, la capacidad de reducir el ion Fe<sup>+3</sup> (FRAP) y β-caroteno/ácido linoleico con valores de IC<sub>50</sub> comprendidos entre 61.48 y 182.86 µg/mL para hojas y de 63,81 a 129,93 µg/mL para flores. Ali et al. (2015) analizaron la actividad antioxidante del AE obtenido de *Thymus algeriensis*. Estos autores encontraron que la actividad antioxidante de este aceite esencial, medida mediante los métodos de DPPH (IC<sub>50</sub> = 4,31-9,23 mg/mL) y ABTS (11,69-28,23 µg Trolox Equivalentes/mg) fue moderada. Mancini et al. (2015) estudiaron la actividad antioxidante, empleando el método de secuestro de radicales DPPH, de los AEs de tres especies de *Thymus vulgaris*, recolectadas en distintas zonas de la región de la campiña del sureste de Italia. Los valores que obtuvieron de IC<sub>50</sub> estaban comprendidos entre 28,95 y 64,93 µg/mL frente a un valor de 3,10 µg/mL de IC<sub>50</sub> del ácido ascórbico, que se utilizó como referencia.

El mecanismo de acción que provoca esta actividad antioxidante no está todavía totalmente aclarado. Existen diversos mecanismos de acción para dicha capacidad antioxidante: el secuestro de radicales libres, la donación de hidrógenos, la quelación de iones metálicos o incluso el que pueden actuar como sustrato de radicales como el superóxido o el hidroxil (Al-Mamary et al. 2002). Como ocurría en el caso de la actividad antimicrobiana, la actividad antioxidante de los aceites esenciales está relacionada con la presencia y concentración de distintos componentes en dicho aceite esencial y fundamentalmente, de aquellos que presentan grupos fenólicos en su estructura.

### 2.5.3.- Otras propiedades de los aceites esenciales.

Además de las propiedades descritas anteriormente, los aceites esenciales



presentan otras características relacionadas con la salud. Entre dichas propiedades cabe destacar su actividad antifúngica, anticancerígena y antiviral, entre otras.

#### 2.5.3.1.-Capacidad antifúngica

Los hongos patógenos, al tratarse de organismos eucariotas, tienen muchas semejanzas a niveles celulares y moleculares con sus anfitriones, es decir a quienes infectan o donde se desarrollan, por lo que son muy difíciles de combatir (Routh et al., 2011). De ahí que para algunos de los patógenos fúngicos, como *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* y *Criptococcus sp.*, son conocidos los problemas existentes para combatirlos y las pocas opciones de medicamentos disponibles para un tratamiento antifúngico eficaz (Kathiravan et al., 2012). Así, Gonçalves et al. (2010) evaluaron la actividad antifúngica de cuatro tipos de aceites esenciales obtenidos de *T. zygis* subsp. *sylvestris* frente a diferentes cepas de *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger* y *A. flavus*) y obtuvieron valores de CMI entre 0,16 y 1,25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Alves-Silva et al. (2013) demostró la actividad antifúngica de los AEs de cilantro, albahaca y apio, frente a *Mucor racemosus* y *Penicillium chrysogenum*. En un estudio similar, Ruiz-Navajas et al. (2013a) comprobaron la actividad antifúngica de los AEs obtenidos de *T. piperella* y *T. moroderi* frente a *Alternaria alternata*, *P. chrysogenum* y *M. racemosus*.

#### 2.5.3.2.-Capacidad preventiva contra el cáncer

Uno de los retos más difíciles de la quimioterapia es encontrar un tratamiento que impida el crecimiento de células cancerígenas. Ciertas moléculas de origen vegetal han demostrado ser eficaces contra la proliferación de células cancerosas. Así, varios tipos de cánceres y tumores malignos como el glaucoma, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de hígado y de pulmón, cáncer de mama, y la leucemia, han sido reducidos después del tratamiento con aceites esenciales de plantas (Edris, 2007; Kaefer y Milner, 2008; Hamid et al., 2011). Por lo tanto, se supone que estas moléculas tienen actividad potencial contra el cáncer y pueden ser usadas en estrategias preventivas y terapéuticas contra tumores.

Los terpenoides que forman parte de los componentes polifenólicos de aceites esenciales de plantas, previenen la proliferación de células tumorales a través de necrosis o la inducción de la apoptosis (Dudai et al., 2005; Bakkali et al., 2008). Debido

a que los aceites esenciales tienen capacidad antioxidante, interfieren directamente en las funciones mitocondriales de células de mamíferos, en consecuencia, son capaces de disminuir procesos metabólicos, como por ejemplo el metabolismo del crecimiento celular, la sobreproducción mitocondrial y el estrés oxidativo permanente, características que son intrínsecas al desarrollo de los tumores cancerígenos (Czarnecka et al., 2006).

#### *2.5.3.3.-Eficacia antiviral.*

Los aceites esenciales poseen también, además de sus propiedades antimicrobianas, actividades antivirales. La capacidad de la inhibición de la replicación viral, se cree que es debido a los monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides de los aceites esenciales (Astani et al., 2011).

Se ha constatado la actividad inhibidora de los aceites esenciales procedentes de eucalipto y tomillo (*Thymus*) contra el virus del herpes simple (Reichling et al., 2005; Schnitzler et al., 2007). Koch et al. (2008) analizaron el efecto de los aceites esenciales de diversas hierbas aromáticas y especias frente al virus del herpes simple tipo 2 (HSV-2), indicando que todos los aceites esenciales analizados presentaban actividad antiviral, siendo su posible mecanismo de acción, la interacción con el desarrollo del virus. Otros estudios demostraron la eficacia del AE de *Thymus* spp. en la inhibición de la replicación del virus Epstein-Barr (EBV) (Hamid et al., 2011).

### **2.6.- Recubrimientos y películas comestibles.**

El uso de compuestos con características antimicrobianas y antioxidantes de origen natural, resulta de gran interés para la industria de los alimentos. Dentro de estos elementos tienen gran importancia los llamados recubrimientos y películas comestibles, cuya finalidad es la de mejorar la calidad de los alimentos, dándoles una mayor vida útil. En 1936 Rigby describió el método de preparación de películas con biomateriales (quitosano) (Rigby, 1936), pero debido al uso y desarrollo de la industria de los plásticos, no fue hasta la década de los años 70, cuando se retomaron las investigaciones y avances de los recubrimientos y películas para alimentos.

Una película o recubrimiento comestible se define como, una capa delgada y continua elaborada con polisacáridos, con componentes de naturaleza proteica o lipídica

o por una mezcla de todos ellos, que se dispone, bien alrededor de los alimentos, o entre ellos, para mejorar su calidad y su vida útil. Para elaborar las matrices formadoras del recubrimiento, uno o varios de los elementos deben aportar una estructura estable (Ramos-García et al., 2010; Fernández-Pan y Maté Caballero, 2011).

Las películas comestibles deben funcionar como barrera selectiva a la transferencia de humedad y gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), además de evitar la oxidación de lípidos y la pérdida de compuestos volátiles, responsables de aromas y sabores de ciertos alimentos (Espino-Díaz et al., 2010). Los polisacáridos y las proteínas son buenos materiales para la formación de películas y recubrimientos comestibles, ya que muestran excelentes propiedades mecánicas y estructurales, pero presentan una débil capacidad de barrera frente a la humedad. Este problema no se encuentra en los lípidos, dadas sus propiedades hidrofóbicas (Morillon et al., 2002).

Para superar la baja resistencia mecánica de los compuestos lipídicos, estos pueden ser usados en asociación con materiales hidrofílicos mediante la formación de una emulsión, o a través de la laminación de la película hidrocoloide con una capa lipídica. Hay que tener en cuenta, que la eficiencia de una película comestible frente a la humedad, no puede ser mejorada simplemente mediante la adición de materiales hidrofóbicos a la formulación, a menos que se logre una capa lipídica homogénea y continua dentro, o sobre la matriz hidrocoloide (Karbowski et al., 2007).

Entre los polisacáridos, no tóxicos y biodegradables, se encuentra el quitosano, que ha sido ampliamente utilizado en la preparación de películas y recubrimientos antimicrobianos, debido a su propiedad de inhibir o retrasar el crecimiento de hongos y de numerosas bacterias en la superficie del producto, extendiendo así su vida útil.

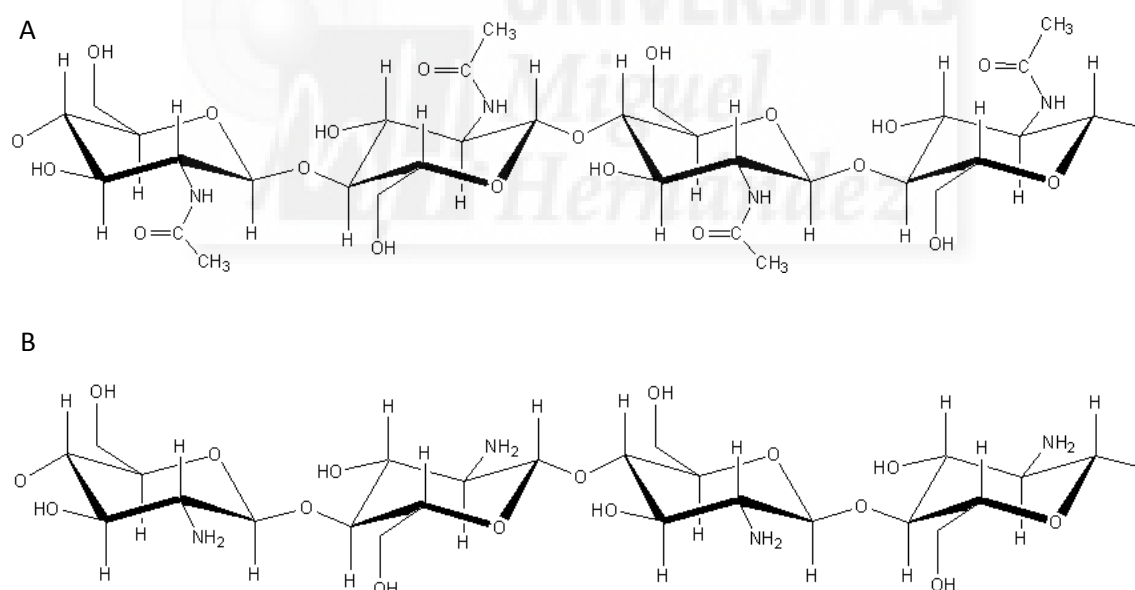
### **2.6.1.-Quitano.**

El quitano fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar la quitina con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtenía un producto soluble en ácidos orgánicos y la nombró “quitina modificada”. Más tarde, en 1894, Hoppe-Seyler fue quien la denominó “quitano” (Singla et al., 2001,).

El quitano es un polisacárido que está presente de manera natural en las paredes celulares de algunos hongos, en pequeñas concentraciones. Aunque la principal

forma de obtención es a partir de la desacetilización alcalina de la quitina (Chenite et al., 2000; Rinaudo, 2006). Este compuesto, el quitosano derivado N-desacetilado de la quitina, presenta un grado de desacetilación no menor al 65% (Majeti y Kumar, 2000). Es un biopolímero policatiónico de origen natural, que se obtiene a partir de los exoesqueletos de crustáceos y artrópodos (Tikhonov et al., 2006). La producción industrial de este biomaterial, prácticamente se basa en el tratamiento de las conchas de diversos tipos de crustáceos (gambas, langostas, cangrejos y langostinos), debido a la factibilidad de encontrar estos materiales como desecho de las plantas procesadoras de estas especies (Hernández et al., 2009).

La quitina y el quitosano son estructuras químicas similares (Figura 1), aunque presentan propiedades significativas diferentes. Ambos compuestos están formados por cadenas de monómeros de glucopiranosas unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4).



**Figura 1:** A: Estructura química de la quitina; B: estructura química del quitosano

La diferencia entre el quitosano y la quitina, radica en el carbono 2, en donde la quitina posee un grupo aceto-amida, mientras que en el quitosano, este grupo amino se obtiene mediante el proceso de desacetilización. La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como quitano; sin embargo, cuando la desacetilación del material de partida es incompleta, se crea una

mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades  $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y  $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa, cuya relación depende de las condiciones de reacción y que, obviamente, genera materiales con distintas propiedades denominados quitosanos. La diferencia en las propiedades de estos materiales puede llegar a ser notable (Rinaudo, 2006; Younes y Rinaudo, 2015).

El quitosano tiene un peso molecular que oscila entre  $1 \times 10^5$  y  $2,5 \times 10^6$  Dalton, tiene un carácter básico, y un pKa próximo a 6,3. Es insoluble en agua, en ácidos concentrados, bases y en los disolventes orgánicos más comunes, pero es soluble en ácidos minerales y orgánicos diluidos. La solubilización del quitosano se produce al añadir protones a los grupos aminos libres en medios ácidos, y permanece en disolución hasta pH 6,2 a partir del cual empieza a formar precipitados similares a geles hidratados (Chenite et al., 2000; Majeti y Kumar, 2000;).

#### *2.6.1.1.-Aplicaciones del quitosano*

Debido a las propiedades funcionales y fisicoquímicas del quitosano, se ha podido identificar una enorme cantidad de aplicaciones que abarcan áreas tan variadas como: alimentación (Lárez, 2006), medicina (Lim et al., 2010; Li et al., 2010), agricultura (Kulikov et al., 2006) cosmética (Morganti y Morganti, 2008) y farmacia (Hirano et al., 1987), entre otras. La funcionalidad y actividad del quitosano depende de sus características físicas, como son el tamaño de la cadena polimérica que afectan directamente a su peso molecular, el grado de desacetilación promedio, de los grupos aminos libres, de su viscosidad y de su solubilidad (Sobral et al., 2008).

En términos generales, la aplicación de quitosano ha mostrado efectos positivos en el crecimiento de las plantas, tanto en la estimulación de la germinación de semillas como en el crecimiento de partes de la planta (Bhaskara et al., 1999). En el sector textil actúa como fijador de colores, y sirve como componente de fibras para la mejora de lanas, y en la impermeabilización de algodones y linos (Castro, 2000). En el campo de la biomedicina, el quitosano es utilizado para la fabricación de cápsulas para medicamentos, formulación de vendajes dérmicos y en la formación de tejidos, cartílagos, pieles, tendones y ligamentos (Pastor e Higuera, 2004).

Las características del quitosano que hacen que sea atractivo para su uso en la

biomedicina son: sus particulares propiedades mecánicas que facilitan su manejo, el que son biodegradables y que tienen compatibilidad biológica. Todas estas propiedades se le atribuyen por tener una estructura química similar a las matrices extracelulares de los tejidos humanos, que hacen que tenga por ello actividades biológicas similares. Además, posee un carácter básico y una carga positiva a pH ácido, por lo que puede interactuar con las superficies celulares y las proteínas plasmáticas (Peniche et al., 2004).

El hecho de que la fuente de obtención del quitosano más abundante sea un coproducto procedente de industrias pesqueras, y que se le hayan atribuido propiedades emulgentes, gelificantes, antioxidantes y antimicrobianas, entre otras, ha potenciado sus aplicaciones, en los últimos años, tanto en la industria alimentaria, como en la biotecnológica (Tikhonov et al., 2006).

En el sector alimentario, se puede encontrar como agente gelificante o como integrante de la dieta alimenticia diaria (por sus cualidades de retención de grasas y agua, hasta 20 veces su peso). Como agente antioxidante, por su poder quelante frente a metales, que son los catalizadores de las reacciones de oxidación de grasas. Otra de sus aplicaciones consiste en utilizarlo como emulsionante y estabilizador de emulsiones, así como agente estabilizador del color, debido a su afinidad por determinados colorantes. Otros usos posibles es su utilización como agente conservador, debido a sus propiedades antimicrobianas frente a bacterias y hongos, por acción inhibitoria o por retraso en su crecimiento (Shahidi et al., 1999; Agulló et al., 2003). Además, el quitosano tiene la posibilidad de formar películas sobre una superficie cuando se deja evaporar la solución del polímero. Sin embargo hay que tener en cuenta, como mencionan Valenzuela y Arias, (2012) que el uso del quitosano como ingrediente para uso alimentario está autorizado en países como Japón, Corea o Estados Unidos pero todavía no ha sido aprobado por la Unión Europea.

### ***2.6.2-Películas de quitosano.***

Dentro de las excelentes características del quitosano ya ampliamente comentadas, está la de formar películas. Para la formulación de películas y cubiertas de quitosano comestibles se utilizan concentraciones variables entre el 1% y el 3% de

quitosano en disoluciones acuosas, acidificadas con ácido acético o ácido láctico, cuyas concentraciones para la acidificación varían entre el 1% y el 3% (Leceta, 2013). Esta propiedad, junto con su actividad antimicrobiana, se ha utilizado para la conservación y envasado de diversos productos alimentarios (Agulló et al., 2003).

En este contexto, el sector alimentario es el principal demandante de materiales de envase, puesto que estos, juegan un papel fundamental en el transporte y la conservación de los alimentos. No obstante, la creciente preocupación por el impacto ambiental que generan estas actividades, ha supuesto un punto de inflexión en la búsqueda de alternativas biodegradables (Reddy et al., 2003; Shah et al., 2008). La utilización de películas de quitosano, en sustitución del polietileno como envoltorio alimenticio, eleva y mejora, frente a éste último, el período de conservación, debido a la capacidad antimicrobiana del quitosano y a la reducción de etileno y dióxido de carbono; factores que están muy relacionados, por ejemplo, con el deterioro de frutas y vegetales (Jeon et al., 2002; Bhale et al., 2003).

Las películas obtenidas a partir de quitosano se caracterizan por ser transparentes, ligeramente amarillentas, de suave superficie, flexibles, cohesivas, de gran resistencia mecánica (comparable a las de muchos polímeros comerciales), hidrófilas, inocuas, biocompatibles, biodegradables (Shahidi et al., 1999; Tharanathan y Kittur, 2003) y adecuadas para distintos grupos de alimentos (No et al., 2007). Las películas y recubrimientos se pueden considerar como alimentos, ingredientes alimentarios, aditivos alimentarios, sustancias en contacto con alimentos o envases alimentarios (Debeaufort et al., 1998). Por lo tanto, estos productos deben estar regulados de acuerdo a la función/es que desempeñen y aprobados para su uso alimentario por la legislación de cada país (Silva-Weiss et al., 2013).

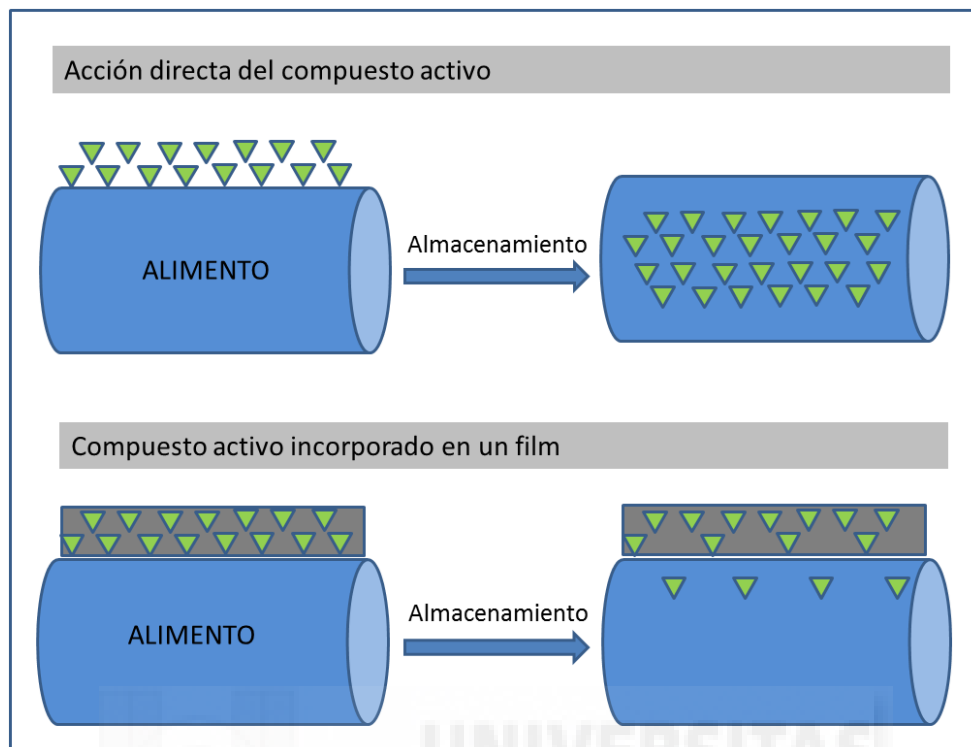
Las propiedades de las películas de quitosano varían en función de las características base del quitosano empleado para su elaboración, como son su grado de desacetilación, peso molecular y viscosidad, entre otras, así como de los plastificantes empleados. Dependiendo de estos factores las propiedades mecánicas, térmicas y de permeabilidad a los gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) variaran considerablemente. Arvanitoyannis et al. (1997) obtuvieron películas comestibles de gelatina-quitosano plastificadas con agua y polioles, y observaron un aumento en su permeabilidad, conforme se incrementaba el

contenido de plastificantes. Películas comestibles compuestas de almidón de maíz-quitosano y empleando como plastificante el glicerol, muestran que la mezcla de estos dos hidrocoloides mejora sus propiedades mecánicas, como la elongación a la rotura y la permeabilidad al vapor de agua, en contraste con membranas desarrolladas con uno solo de los componentes estructurales. Ello se atribuye a las interacciones entre los grupos hidroxilo del almidón y los grupos amino del quitosano (Liu et al., 2009).

Las películas comestibles de quitosano, además de actuar como barreras selectivas mejorando la permeabilidad al vapor de agua, y a los gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ ), podrían actuar como agentes vehiculizantes de un gran número de compuestos funcionales (Ojagh et al., 2010) que pueden ser añadidos, para mejorar sus propiedades funcionales como antioxidantes, fungicidas, antimicrobianos, colorantes y saborizantes, entre otras (Salmieri y Lacroix, 2006). Además, permiten la migración de sus componentes, desde el propio recubrimiento, hasta el alimento, consiguiendo que esta migración se realice lentamente y de forma controlada (Fernández-Pan et al., 2010). En la Figura 2 se muestran las diferentes formas de penetración de un compuesto activo cuando se adiciona directamente sobre el alimento o a través de una película comestible.

En este sentido, se han realizado investigaciones con películas comestibles de quitosano, a las que se le han añadido sustancias como ácido sórbico, ácido benzoico, benzoato de sodio, ácido cítrico (Quintavalla y Vicini, 2002), y sorbato de potasio (Ozdemir y Floros, 2008). Así mismo, se han añadido a películas comestibles, bacteriocinas, como nisina o pediocina (Sebti y Coma, 2002), con la finalidad de cuantificar los efectos de las sustancias añadidas, así como la velocidad con la que, desde las películas comestibles, se liberan sobre los alimentos. En un estudio realizado con natamicina (antimicótico) añadido a una película comestible de quitosano, se consiguió que la sustancia añadida se liberase de forma controlada, logrando un efecto sinérgico entre ambos componentes, sobre el crecimiento de los microorganismos contaminantes (Romanazzi et al., 2002, Fajardo et al., 2010).





**Figura 2.** Esquema de las diferentes formas de penetración de un compuesto cuando se adiciona directamente sobre el alimento o a través de una película comestible.

Otros componentes que pueden ser añadidos a las películas comestibles de quitosano para mejorar sus propiedades funcionales son los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas y/o especias.

### ***2.6.3.-Películas de quitosano adicionadas con aceites esenciales de plantas aromáticas.***

Las películas de quitosano adicionadas con aceites esenciales de plantas aromáticas o especias, además de exhibir determinadas propiedades de barrera (oxígeno, lípidos, aromas, humedad) presentan unas excelentes propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas, provocadas por la presencia de los AEs. Debido a todas estas propiedades, este tipo de películas se convierten en una seria alternativa para lograr el objetivo de aumentar la vida útil y mantener la calidad del producto en el cual son utilizados (Ruiz-Navajas, 2014). Pero debe existir un equilibrio entre las concentraciones de AEs, utilizados para conseguir mejores propiedades funcionales en el alimento, y la no alteración de forma significativa de las características

organolépticas de los productos que recubren dichas películas.

La incorporación de AEs como compuestos activos en películas comestibles, presenta el inconveniente de que durante el proceso de obtención (mediante extensión y secado de las mezclas que conforman las películas comestibles) se producen grandes pérdidas de los AEs (Fernández-Pan et al., 2010). Su incorporación mediante pulverización en una cara de la película y posterior termo-compresión de dos películas, obteniendo una película bicapa con los compuestos activos en la interfase, podría representar una adecuada estrategia para la optimización del proceso de obtención de películas biodegradables activas, donde la liberación del compuesto activo al espacio de cabeza del envase alimentario, ocurriría de forma progresiva. Esta metodología, evitaría la aplicación directa del compuesto activo sobre el alimento, la cual presenta serios inconvenientes en numerosas ocasiones (Ben Arfa et al., 2007).

#### *2.6.3.1-Propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las películas comestibles adicionadas con AEs.*

El principal motor para el crecimiento de la industria alimentaria es la mejora de la tecnología referente a la conservación y alargamiento de la vida útil de los alimentos. (Sadaka et al., 2013). Por tanto, la fabricación de envases activos que alarguen la conservación y la vida útil de los alimentos envasados, es un objetivo para investigadores y el sector de la industria de la alimentación. Los envases activos son aquellos que proporcionan unas condiciones de conservación óptimas y de calidad, alargando la vida de los alimentos envasados, mejorando las propiedades sensoriales y manteniendo la calidad de los mismos durante su periodo de vida útil (Vermeiren et al., 1999). Por otro lado, los consumidores desean alimentos más naturales, con menos conservantes químicos añadidos, y por ello ha aumentado la popularidad y uso de los agentes antimicrobianos de origen natural (Sadaka et al., 2013). En este escenario, la adición de aceites esenciales a películas elaboradas con biopolímeros naturales, con características antibacterianas y antioxidantes, podría ser una elección interesante. Los aceites esenciales tienen propiedades antimicrobianas y antioxidantes extensamente estudiadas y reconocidas (Gende et al., 2010; Danh et al., 2012b; Kacániová et al., 2012; Teixeira et al., 2013ab) y podrían constituir un excelente componente bioactivo para su adición a películas comestibles.

Así, Martucci et al. (2015) investigaron la eficacia de los AEs de orégano y lavanda adicionados sobre películas comestibles, en la inhibición del crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*. Valoraron los efectos de cada uno de los aceites empleados por separado y con una mezcla de ambos en igual proporción (50:50). Los resultados demostraron que ambos aceites inhibían el crecimiento microbiano, siendo más activos frente a bacterias Gram-positivas. El AE de orégano fue el más efectivo (presentó los valores más bajos de la concentración mínima inhibitoria). Los resultados de la mezcla de los dos aceites esenciales en iguales proporciones, mostraron un efecto antagonista entre ambos. Altiok et al. (2010) desarrollaron películas de quitosano adicionadas con distintas concentraciones de AE de *T. vulgaris*, analizando posteriormente su actividad antibacteriana frente a distintas bacterias, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Estos autores encontraron que todas las bacterias fueron sensibles a las películas desarrolladas, pero solo a la máxima concentración (1,2% (v/v)) obteniendo halos de inhibición comprendidos entre 16 y 19 mm. Gómez-Estaca et al. (2010) analizaron la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano al que se le adicionó AE obtenido de *Thymus vulgaris*. Estos autores encontraron que estas películas de quitosano/AE tenían una significativa actividad antibacteriana frente a *Photobacterium phosphoreum* and *Clostridium perfringens* y una actividad moderada frente a *S. aureus* y *B. cereus*. En otro estudio Ruiz-Navajas et al. (2013b) observaron que la adición de AEs obtenidos de *T. piperella* y *T. moroderi* a películas comestibles de quitosano, en general, inhibía el crecimiento de *Listeria innocua*, *Aeromonas hydrophila* y *Achromobacter denitrificans*.



### **III. OBJETIVOS**

---

### 3.- OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivos generales

El objetivo general del presente estudio es determinar el potencial conservante de distintos aceites esenciales obtenidos de 4 plantas, procedentes de cultivo ecológico, pertenecientes al género *Thymus* como son: *Thymus capitatus*, *Thymus zygis*, *Thymus mastichina* y *Thymus vulgaris* y su aplicación en películas de quitosano.

Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares.

#### 3.2.- Objetivos particulares

- Caracterizar químicamente los aceites esenciales obtenidos de plantas, procedentes de cultivo ecológico, pertenecientes al género *Thymus* como son: *Thymus capitatus*, *Thymus zygis*, *Thymus mastichina* y *Thymus vulgaris*.
- Determinar la actividad antibacteriana de dichos aceites esenciales frente a diversas cepas bacterianas relacionadas con la degradación de alimentos o indicadoras de la presencia de patógenos en los mismos.
- Conocer la capacidad antioxidante de dichos aceites esenciales mediante la utilización de diferentes técnicas analíticas.
- Evaluar la actividad antibacteriana, de dichos aceites esenciales frente a diversas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo diferentes extractos cárnicos.
- Incorporar los aceites esenciales sometidos a estudio en películas de quitosano.
- Determinar la capacidad antioxidante de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales sometidos a estudio.
- Determinar la actividad antibacteriana de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales sometidos a estudio.



## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

## 4.-MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se recoge la información completa del material vegetal empleado así como la metodología desarrollada en cada uno de los ensayos efectuados, ya que en los artículos publicados en revistas internacionales y que se adjuntan a esta memoria, solo se muestra un resumen de la metodología empleada, siguiendo instrucciones editoriales.

### 4.1.-Aceites esenciales de tomillo.

Los aceites esenciales (AEs) empleados en el presente trabajo, tanto para la determinación de la composición química como para la determinación de las propiedades antioxidantes, propiedades antibacterianas y su posterior aplicación a películas comestibles, pertenecían a cuatro especies distintas de tomillo: *Thymus zygis*, *Thymus mastichina*, *Thymus capitatus* y *Thymus vulgaris*. En la Figura 3 se muestran las plantas del género *Thymus* utilizadas para la extracción de los aceites esenciales.



**Figura 3:** Plantas del género *Thymus* utilizadas para la extracción de los aceites esenciales. (A) *Thymus capitatus*; (B) *Thymus mastichina*; (C) *Thymus vulgaris*; (D) *Thymus zygis*

Todos estos aceites analizados procedían de plantas de cultivo ecológico y se obtuvieron por destilación por arrastre de vapor de las hojas, el tallo y las flores. Estos aceites esenciales, sometidos a estudio, fueron suministrados por la empresa “Esencias Martínez Lozano” (Murcia, España), teniendo certificada la procedencia de cultivo ecológico por el “Institute for Marketecology” (IMO), de acuerdo con los procedimientos descritos en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y la certificación europea según R834/2007 por el Comité de Agricultura Ecológica de la Región de Murcia (CAERM). Se decidió el empleo de aceites esenciales comerciales para evitar posibles variaciones en la composición y que fuese un producto estandarizado por obtenerse de grandes volúmenes de material vegetal.

#### **4.2.-Composición química de los aceites esenciales**

La determinación de la composición química de los distintos aceites esenciales estudiados, se realizó mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/MS) en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón), acoplado a un detector selectivo de masas Shimadzu GCMS-QP5050A (Shimadzu Corporation) equipado con una columna TRACSIL Meta X5 (Teknokroma S. Coop. C. Ltd, Barcelona, España), 30 m x 0.25 mm i.d., y un espesor de relleno de 0,25  $\mu\text{m}$ . Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250 y 300  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo a 40  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 min incrementándose gradualmente hasta los 200  $^{\circ}\text{C}$  en un ratio de 3  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , manteniéndose a esta temperatura durante 1 min. Transcurrido este tiempo se volvió a aumentar la temperatura hasta los 280  $^{\circ}\text{C}$  en un ratio de 15  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , manteniéndose a 280  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Como gas portador se utilizó Helio con un flujo de 1 mL/min. La identificación de los compuestos se realizó mediante comparación, de los tiempos de retención y el espectro de masas, con los de los estándares previamente inyectados, así como, con la biblioteca Wiley 229 del sistema, los valores del índice de Kovats y valores presentes en la literatura científica (NIST, 2010).

#### **4.3.- Determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales**

##### **4.3.1.- Cepas bacterianas**

Para determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales se



seleccionaron cepas bacterianas relacionadas con el deterioro de alimentos en refrigeración y cepas bacterianas indicadoras de la presencia de cepas patógenas. Las cepas bacterianas seleccionadas fueron: *Listeria innocua* CECT 910, *Serratia marcescens* CECT 854, *Pseudomonas fragi* CECT 446, *Pseudomonas fluorescens* CECT 844, *Aeromonas hydrophila* CECT 5734, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346, *Achromobacter denitrificans* CECT 449, *Enterobacter amnigenus* CECT 4078, *Enterobacter gergoviae* CECT 587 y *Alcaligenes faecalis* CECT 145. Todas ellas fueron adquiridas en la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia (España).

#### **4.3.2.-Método de difusión en disco**

Para la determinación de la actividad antibacteriana de los AEs analizados se empleó el método de difusión en disco descrito por Tepe et al. (2005b), con algunas modificaciones. Para ello, una suspensión ( $0,1 \text{ mL } 10^6 \text{ UFC/mL}$ ) de cada una de las cepas microbianas objeto de estudio se sembró en placas Petri que contenían 20 mL de medio sólido *Nutrient Agar II* (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) para *P. fluorescens*, *P. fragi*, *S. putrefaciens*, *S. marcescens* y *A. hidrophila*; *Nutrient Agar I* (Oxoid) para *E. gergoviae*, *E. amnigenus*, *A. faecalis* y *A. denitrificans* y *Brain Heart Infusion Agar* (Sharlab, Barcelona, España) para *L. innocua*. Transcurridos 5 minutos, tiempo necesario para que el inóculo se secase, se procedió a colocar en el centro de cada una de las placas un disco estéril de 9 mm de diámetro el cual se impregnó con 30  $\mu\text{L}$  de los distintos AEs analizados, y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente, para permitir la correcta difusión del aceite esencial. Posteriormente, las placas se incubaron durante 24 h a 26 ó 37 °C dependiendo del tipo de cepa. Al final del período de incubación, se midió, con ayuda de un calibre, el diámetro de la zona clara de alrededor del disco y se expresó como actividad antibacteriana en milímetros del halo de inhibición (incluido el diámetro del disco). De acuerdo a la anchura de la zona libre, se clasificaron los aceites de la siguiente forma: no activo (-) diámetro entre 9,01 y 12,00 mm; moderadamente activo (+) diámetro entre 12,01 y 21,00 mm; activo (++) diámetro entre 21,01 y 30,0 mm, y extremadamente activo (+++) diámetro igual o superior a 30,01 mm (Djabou et al., 2013). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **4.3.3.- Determinación del efecto del volumen de aceite esencial**

Para determinar el efecto del volumen se procedió a la realización del método de difusión en disco, como bien se menciona en el apartado 4.3.2. Sin embargo, en este caso los volúmenes adicionados al disco fueron de 15, 7,5 y 3,75  $\mu\text{L}$ , siguiendo la metodología descrita por Viuda-Martos et al. (2005). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **4.3.4.- Método de microdilución**

La actividad antibacteriana de los AEs analizados también se determinó empleando el método de microdilución, propuesto por Abate et al. (1998), con algunas modificaciones. Las cepas bacterianas de *A. hydrophila*, *P. fragi*, *P. fluorescens*, *A. denitrificans*, *S. marcescens* y *S. putrefaciens* se incubaron 24 horas a 26 °C mientras que las cepas de *A. faecalis*, *E. amnigenus* y *E. gergoviae* se incubaron 24 h a 37 °C en *Nutrien Broth* N° 2 (Oxoid). Por último, *L. innocua* se incubó 24 h a 37 °C en *Brain Heart Infusion Broth*. Los cultivos bacterianos se ajustaron a una densidad final de  $10^6$  UFC/mL antes de ser empleados. Los AEs sometidos a estudio se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO) para alcanzar una concentración final de 30  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Se hicieron diluciones seriadas en un rango de 0,03 a 30  $\mu\text{L}/\text{mL}$  en tubos estériles que contenían Muller Hinton Broth (MHB). Las microplacas de 96 pocillos (Iwaki brand, Asahi Techno Glass, Japón) se prepararon vertiendo 95  $\mu\text{L}$  de MHB y 5  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano dentro de cada uno de los pocillos. Un alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de cada uno de los AEs preparados anteriormente se añadió al primer pocillo. Posteriormente se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de las diluciones seriadas y se añadieron a los 11 pocillos consecutivos restantes. El volumen final de cada pocillo fue de 200  $\mu\text{L}$ . La nisina (0,01-10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  MHB) se usó como control positivo, mientras el control negativo consistió en MHB con DMSO (5% v/v).

Las placas se agitaron a 150 rpm durante 2 min y se incubaron durante 24 h a 26 ó 37 °C, dependiendo del microorganismo inoculado. Tras la incubación se añadió a cada pocillo 25  $\mu\text{L}$  de 3-{4,5-dimetiltiazol-2-il} -2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma Life Science), disuelto en DMSO (0,8 mg/mL), y las placas se incubaron durante 1 h para que los microorganismos viables metabolizaran el tinte amarillo MTT en

formazano (cristales de color púrpura). La concentración mínima inhibitoria (MIC) se consideró como el valor de la primera concentración en la que no se produjo cambio de color (de amarillo a púrpura). Se confirmó mediante la siembra de 10  $\mu$ L de muestras de los pocillos claros en Mueller Hinton Agar. El proceso se repitió tres veces para cada microorganismo.

#### **4.4.- Determinación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales**

##### **4.4.1.- Capacidad secuestrante del radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH).**

La capacidad secuestrante de radicales se determinó usando el radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH), siguiendo el método descrito por Brand-Williams et al. (1995). Los resultados se expresaron como % de inhibición del radical DPPH. Dicho % de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$(i) \quad \% \text{ inhibición} = \left( \frac{A_c - A_s}{A_c} \right) \times 100$$

Siendo  $A_c$ , la absorbancia de la muestra control ( $t = 15$  min) y  $A_s$  la absorbancia de la muestra analizada en el final de la reacción ( $t = 15$  min). También se procedió al cálculo del valor de  $IC_{50}$  que corresponde a la cantidad de muestra necesaria para provocar una inhibición del radical DPPH del 50%. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

##### **4.4.2.- Poder antioxidante por reducción del ion férrico (FRAP)**

El poder antioxidante por reducción del ion férrico de las distintas muestras se realizó según el método descrito por Oyaizu (1986). Los resultados se expresaron como mg de Trolox equivalentes por mL de muestra (mg TE/mL muestra). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

##### **4.4.3.- Capacidad quelante del ion ferroso (FIC).**

La actividad quelante del ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ) se midió inhibiendo la formación del complejo ferrocina- $Fe^{2+}$  siguiendo el método de Carter (1971). Los resultados se expresaron como % de inhibición de la formación del complejo ferrozina- $Fe^{2+}$  y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$(ii) \quad \% \text{ Actividad quelante} = \left( \frac{A_c - A_s}{A_c} \right) \times 100$$

Siendo  $A_C$ , la absorbancia de la muestra control y  $A_S$  la absorbancia de la muestra analizada en el final de la reacción. También se procedió al cálculo del valor de  $IC_{50}$  que corresponde a la cantidad de muestra necesaria para provocar la quelación del 50% del ion ferroso. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **4.4.4.- Capacidad secuestrante del radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>)**

Para la determinación de la capacidad secuestrante del radical ABTS<sup>•+</sup> se siguió la metodología descrita por Leite et al. (2011), con algunas modificaciones. Este método se basa en la reducción de la coloración verde/azul producida por la reacción del radical ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>) con el antioxidante presente en la muestra. El radical se obtuvo tras la reacción del ABTS<sup>•+</sup> (7 mM) en buffer acetato de sodio 20 mM (pH 4,5) y persulfato de potasio (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (24±2 °C) y diluido en el mismo buffer, hasta obtener una absorbancia de 0,70 (± 0,02) a 734 nm.

Para el ensayo se colocaron 10 µL de las distintas muestras de aceite esencial y 990 µL de radical ABTS<sup>•+</sup>, midiendo la absorbancia a 734 nm, tras 6 min de incubación. Los resultados se expresaron como % de inhibición del radical ABTS<sup>•+</sup>. Dicho % de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$(iii) \quad \% \text{ inhibición} = \left( \frac{A_C - A_S}{A_C} \right) \times 100$$

Siendo  $A_C$ , la absorbancia de la muestra control y  $A_S$  la absorbancia de la muestra analizada en el final de la reacción. También se procedió al cálculo del valor de  $IC_{50}$  que corresponde a la cantidad de muestra necesaria para provocar una inhibición del radical ABTS<sup>•+</sup> del 50%. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **4.5.- Determinación de la actividad antibacteriana en extractos cárnicos.**

##### **4.5.1.- Preparación del medio de cultivo.**

Para la determinación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales utilizando, como medio de cultivo, distintos extractos cárnicos, se procedió de la siguiente manera. En primer lugar se prepararon los distintos medios de cultivo; para ello se pesaron 10 gramos de producto cárnico, ya sea un producto crudo-curado (fuet),

uno cocido (jamón cocido) o fresco (carne de vacuno picada), y se introdujeron en bolsas para Stomacher, a las cuales se les añadió 90 mL de agua de peptona (pH 7,2). Esta mezcla se homogeneizó en el Stomacher durante 180 segundos.

A continuación, se realizó una filtración a través de un papel de filtro Whatman nº 3 para eliminar los restos sólidos que hubiesen quedado. El extracto filtrado se introdujo en una botella junto con 15 g/L de agar bacteriológico y se llevó a ebullición. A continuación se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos. Para concluir este proceso, se procedió a verter el medio (20 mL) en placas Petri, dejándolo solidificar durante 30 minutos en una cabina de seguridad biológica con flujo laminar vertical.

#### **4.5.2.- Método de difusión en disco**

Para la determinación de la actividad antibacteriana de los AEs analizados se empleó el método de difusión en disco siguiendo la metodología descrita en el punto 4.3.2 de la presente memoria, a excepción de que los medios de cultivo utilizados fueron los obtenidos según la metodología descrita en el punto 4.5.1.

En este caso de acuerdo a la anchura de la zona libre, la clasificación de los AEs se realizó de la siguiente forma: no activo (-) diámetro igual a 9,00 mm; ligeramente activo (+) diámetro entre 9,01 y 12,00 mm; moderadamente activo (++) diámetro entre 12,01 y 21,00 mm; activo (+++) diámetro entre 21,01 y 30,0 mm, y extremadamente activo (++++) diámetro igual o superior a 30,01 mm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

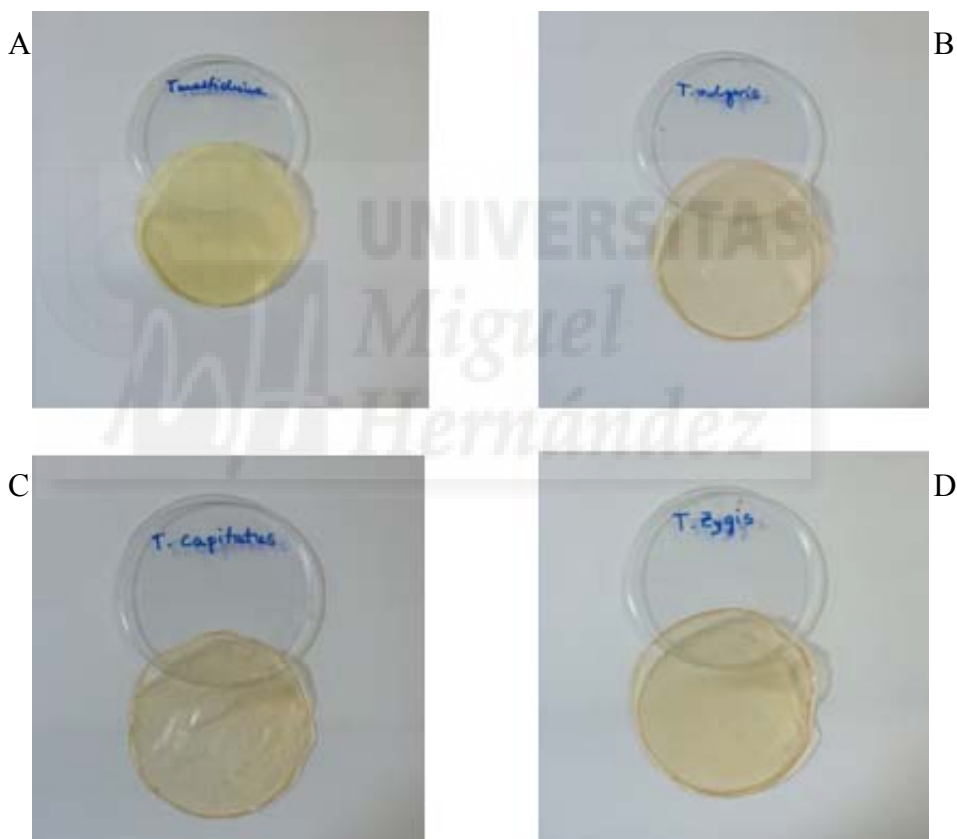
#### **4.5.3.-Efecto del volumen de aceite esencial**

Para la determinación del efecto del volumen sobre la actividad antibacteriana de los AEs analizados, se empleó la metodología descrita en el punto 4.3.3 de la presente memoria

#### **4.6.- Elaboración de las películas de quitosano.**

Para la elaboración de las películas de quitosano, adicionadas con los distintos aceites esenciales sometidos a estudio, se siguió la metodología descrita por Ojagh et al. (2010). Para ello se empleó quitosano de alto peso molecular con un grado de desacetilación de 75-85% (Sigma-Aldrich Chemical Co., Steinheim, Alemania) al 2%

en una disolución de ácido láctico al 1%, empleando Tween 80 como emulsionante al 0,2% y como plastificante glicerol (0,75 mL/g quitosano). Como moldes se utilizaron, placas de Petri estériles, de 9 cm de diámetro, a las cuales se dosificaron 20 g de las disoluciones preparadas y se llevaron a deshidratar a 37 °C durante 48 h en estufa de convección. Transcurrido ese tiempo se almacenaron a 25 °C en desecadores, con una humedad relativa del 53%, utilizando sales de nitrato de magnesio, hasta su uso. En la Figura 4 se muestran las películas de quitosano adicionadas con los cuatro aceites esenciales objeto de estudio.



**Figura 4:** Películas de quitosano adicionadas con A: AE de *Thymus mastichina*; B: AE de *Thymus vulgaris*; C: AE de *Thymus capitatus*; D: AE de *Thymus zygis*.

Los diferentes AEs sometidos a estudio se adicionaron a las películas de quitosano a diferentes concentraciones tal y como se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Tipo y concentración de aceite esencial incorporado a las diferentes películas de quitosano

Formulación	<i>T. zygis</i> (%)	<i>T. capitatus</i> (%)	<i>T. vulgaris</i> (%)	<i>T. mastichina</i> (%)
CH	0	0	0	0
CH+AETZ 1%	1	0	0	0
CH+AETZ 2%	2	0	0	0
CH+AETC 1%	0	1	0	0
CH+AETC 2%	0	2	0	0
CH+AETV 1%	0	0	1	0
CH+AETV 2%	0	0	2	0
CH+AETM 1%	0	0	0	1
CH+AETM 2%	0	0	0	2

CH: quitosano; CH+AETZ 1%: quitosano con 1% de AE de *T. zygis*; CH+AETZ 2%: quitosano con 2% de AE de *T. zygis*; CH+AETC 1%: quitosano con 1% de AE de *T. capitatus*; CH+AETC 2%: quitosano con 2% de AE de *T. capitatus*; CH+AETV 1%: quitosano con 1% de AE de *T. vulgaris*; CH+AETV 2%: quitosano con 2% de AE de *T. vulgaris*; CH+AETM 1%: quitosano con 1% de AE de *T. mastichina*; CH+AETM 2%: quitosano con 2% de AE de *T. mastichina*.

#### 4.7.- Determinación de la actividad antibacteriana de las películas de quitosano

Para la determinación de la actividad antibacteriana de las películas de quitosano adicionadas con los diferentes AEs, se siguió la metodología descrita en el apartado 4.3.2 de la presente memoria. En lugar de discos se utilizaron porciones de película de 1 cm<sup>2</sup>, tomadas en condiciones asépticas, que se depositaron en el centro de la placa. La cantidad de aceite por cm<sup>2</sup> en las películas con un 1% de aceite fue de 3 mg/cm<sup>2</sup> y en las películas con un 2% de aceite de 6 mg/cm<sup>2</sup>.

#### 4.8.- Determinación de la actividad antioxidante de las películas de quitosano

Para la determinación de la actividad antioxidante de las películas de quitosano adicionadas con los AEs sometidos a estudio se siguió la metodología descrita en los apartados 4.4.1 y 4.4.2 de la presente memoria, partiendo en este caso de películas adicionadas con el 1 y 2% de los distintos AEs sometidos a estudio.

#### 4.9. Metodología estadística

La metodología estadística se diseñó para cada uno de los estudios a analizar, y

viene especificada en los respectivos artículos. La totalidad de los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA) utilizando el programa Análisis of Variance. Para la determinación de las media y la desviación estándar se siguieron métodos estadísticos convencionales. El análisis estadístico empleado en cada ensayo fue la aplicación de un análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores, dependiendo del ensayo realizado. Para estudiar entre qué variables de los factores principales las diferencias fueron estadísticamente significativas, se realizaron contrastes entre las medias aplicando el test de Tukey, siguiendo las recomendaciones de Afifi y Azen (1979).







## **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---

## 5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se recogen los principales resultados y una breve discusión de los diferentes trabajos realizados. Las versiones completas de los mismos se encuentran en los correspondientes artículos publicados o en proceso de revisión en revistas internacionales incluidas en el *Journal Citations Reports* y se adjuntan al final de esta memoria (Capítulo VIII).

### 5.1.-Composición química de los aceites esenciales sometidos a estudio.

El objetivo de este trabajo, publicado en la revista “*Industrial Crops and Products*” (2013, 50, 304-311) fue la determinación de la composición química de los aceites esenciales (AEs) obtenidos de cuatro especies de tomillos como son *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. zygis* y *T. capitatus*, de cultivo ecológico, mediante el empleo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

En la Tabla 3 se muestran los principales componentes químicos, así como su porcentaje relativo con respecto al total del área del cromatograma y el índice de Kovats, de los distintos aceites esenciales objeto de estudio. En el AE de *T. mastichina* se identificaron 80 compuestos, los cuales representan el 98,51% del AE. El compuesto mayoritario fue 1,8-cineol (51,94%), seguido de linalol (19,90%) y  $\beta$ -pineno (3,39%). En un estudio similar Miguel et al. (2004) informó que el componente mayoritario del AE obtenido de *T. mastichina* cultivado en Portugal fue el 1,8-cineol (58%).

En el AE obtenido de *T. capitatus* se identificaron 44 compuestos que representaban el 99,03% del total de los constituyentes detectados. Este AE se caracterizó por una alta fracción de monoterpenos y especialmente por la presencia del fenol carvacrol (69,83%), y sus precursores *p*-cimeno (6,12%) y  $\gamma$ -terpineno (6,68%). Ibraliu et al. (2011) estudió la composición de los AE de *T. capitatus* cultivados en diferentes áreas climáticas de Albania. Estos autores mencionan que los componentes principales de dichos AEs fueron el carvacrol (54-78%), *p*-cimeno (5-8,4%) y  $\gamma$ -terpineno (2,6-4%), resultados que concuerdan con los obtenidos en este trabajo.

En el AE de *T. zygis* se identificaron 93 compuestos que representaban el 98,93% del total de los constituyentes detectados. El principal compuesto fue el timol (48,59%) seguido del *p*-cimeno (18,79%) y el  $\gamma$ -terpineno (8,31%). Estos resultados

están en concordancia con los expuestos por Rota et al. (2008) quien mencionó que los principales compuestos del AE de *T. zygis* cultivado en España fueron el timol (68,10%), el *p*-cimeno (11,0%) y el  $\gamma$ -terpineno (4,80%).

**Tabla 3.** Los principales constituyentes de los aceites esenciales *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus* y *T. zygis* y sus porcentajes relativos del área total del cromatograma e Índices Kovats.

Componente	Id. <sup>1</sup>	Índices Kovats		<i>T. vulgaris</i> (% área)	<i>T. mastichina</i> (% área)	<i>T. capitatus</i> (% área)	<i>T. zygis</i> (% área)
		KI	Lit <sup>2</sup>				
$\alpha$ -trujeno	KI.W	928	931	0,24	0,08	1,47	1,13
$\alpha$ -pineno	KI.W.St	936	934	2,65	2,57	0,79	1,06
Sabineno	KI.W	978	976	0,87	1,86	---	0,05
$\beta$ -pineno	KI.W	983	980	0,29	3,39	0,24	0,24
mirreno	KI.W	988	991	6,89	1,09	2,03	1,66
$\alpha$ -terpineno	KI.W	1021	1018	3,50	0,54	1,57	1,44
<i>p</i> -cimeno	KI.W.St	1025	1026	2,17	0,30	6,12	18,79
Limoneno	KI.W.St	1031	1031	2,22	2,45	0,29	0,29
<i>l</i> ,8-Cineol	KI.W.St	1036	1034	0,16	51,94	---	---
$\gamma$ -terpineno	KI.W	1066	1062	8,91	0,54	6,68	8,31
$\alpha$ -terpinoleno	KI.W	1100	1096	1,28	0,14	---	0,14
Linalol	KI.W.St	1100	1098	44,00	19,90	1,42	4,31
Borneol	KI.W	1168	1165	1,30	0,59	0,15	1,67
$\alpha$ -terpineol	KI.W	1187	1189	1,24	2,68	---	0,17
Terpinen-4-ol	KI.W	1194	1192	11,88	0,43	0,84	1,04
Timol	KI.W.St	1294	1290	1,18	0,14	0,02	48,59
Carvacrol	KI.W.St	1300	1298	0,09	---	69,83	1,83
$\beta$ -cariofileno	KI.W	1422	1418	0,74	1,03	3,62	1,15

<sup>1</sup>“KI.W” significa que la identificación estaba basada en los índices de Kovats y comparada con la librería Wiley. “KI.W.St” significa que la identificación estaba basada en los índices de Kovats y comparada con la librería Wiley y patrón.

<sup>2</sup>NIST base de datos.

En el AE de *T. vulgaris* se identificaron 80 compuestos, lo que representaba el 98,97% del total de los componentes presentes en el AE. El componente principal fue el linalol (44,00%) seguido por terpinen-4-ol (11,84%),  $\gamma$ -terpineno (8,91 %) y mirreno

(6,89%). En un estudio similar Viuda-Martos et al. (2010a) analizó el AE de *T. vulgaris* cultivado en Egipto y encontró que el constituyente mayoritario era timol (32,23%) seguido por el  $\gamma$ -terpineno (21,19%), y el *p*-cimeno (20,27%). Esta variabilidad en la composición química del AE de *T. vulgaris* podría ser debida a que hay diferentes genotipos intraespecíficos (De Lisi et al., 2011). El genotipo usado en este trabajo se caracterizaba por la alta cantidad de linalol.

Los resultados obtenidos muestran que la composición de los AEs analizados procedentes de cultivos ecológicos son muy similares a los que se pueden encontrar en la literatura científica para AEs procedentes de cultivos convencionales. Obviamente hay gran variabilidad en la composición química de los AEs obtenidos de las diferentes especies de *Thymus*. Dicha variabilidad depende de varios factores, incluyendo las condiciones medioambientales (temperatura, duración del día, sol, lluvia etc.), estación del año, localización geográfica, geología, nutrientes, parte de la planta y método usado para obtener los AEs (Viuda-Martos et al., 2008).

## **5.2.-Actividad antibacteriana de los aceites esenciales sometidos a estudio**

El objetivo de este estudio fue la determinación de la actividad antibacteriana, mediante el empleo de dos técnicas distintas (difusión en disco y microdilución) de los AEs obtenidos de *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus*, y *T. zygis*, de cultivo ecológico, frente a diversas bacterias relacionadas con el deterioro de alimentos o indicadoras de la presencia de patógenos. Los resultados están publicados en la revista “*Industrial Crops and Products*” (2013, 50, 304-311).

### **5.2.1.-Método de difusión en disco.**

En la Tabla 4 se recoge la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *T. mastichina*, *T. capitatus*, *T. zygis* y *T. vulgaris* usando el método de difusión en disco. Los AEs de *T. zygis* y *T. capitatus* mostraron efectos inhibitorios del crecimiento frente a las 10 bacterias ensayadas. Por otro lado los AEs de *T. mastichina* y *T. vulgaris* solo mostraron efectos de inhibición del crecimiento bacteriano frente a 8 y 7 cepas de las 10 estudiadas, respectivamente. Todos los AEs analizados mostraron alta actividad frente a *L. innocua* y *A. faecalis*. Para ambas bacterias, *T. zygis* presentó la mayor zona de inhibición ( $p < 0,05$ ) seguido por los AEs de *T. capitatus*, *T. vulgaris* y *T. mastichina*, en

este orden. Para *A. hydrophila* y *S. putrefaciens*, el AE de *T. capitatus* consiguió el mayor ( $p < 0,05$ ) halo de inhibición y fue activo frente a ambas cepas. El AE de *T. zygis* fue moderadamente activo mientras los AEs de *T. mastichina* y *T. vulgaris* no fueron activos contra estas cepas.

**Tabla 4.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *T. mastichina*, *T. capitatus*, *T. zygis* y *T. vulgaris*, de cultivo ecológico, usando el método de difusión en disco y empleando un volumen de AE de 30  $\mu$ L

Bacteria	Diámetro (media y desviación) del halo de inhibición (mm) incluyendo el diámetro del disco de 9 mm.			
	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>T. capitatus</i>	<i>T. zygis</i>
<i>L. innocua</i>	32,86±0,62 <sup>a‡</sup> (+++)	26,83±0,06 <sup>b</sup> (++)	36,77±0,11 <sup>c</sup> (+++)	39,52±0,22 <sup>d</sup> (+++)
<i>A. hydrophila</i>	10,76±0,20 <sup>a</sup> (-)	11,29±0,39 <sup>a</sup> (-)	23,50±0,00 <sup>b</sup> (++)	17,26±0,06 <sup>c</sup> (+)
<i>A. denitrificans</i>	12,64±0,21 <sup>a</sup> (+)	10,69±0,10 <sup>b</sup> (-)	14,34±0,00 <sup>c</sup> (+)	15,82±0,08 <sup>d</sup> (+)
<i>A. faecalis</i>	39,77±3,92 <sup>a</sup> (+++)	23,50±3,46 <sup>b</sup> (++)	47,48±0,54 <sup>c</sup> (+++)	51,35±0,21 <sup>d</sup> (+++)
<i>E. amnigenus</i>	12,34±0,19 <sup>a</sup> (+)	12,51±0,01 <sup>a</sup> (+)	12,04±0,05 <sup>b</sup> (+)	13,20±0,23 <sup>c</sup> (+)
<i>E. gergoviae</i>	13,17±0,04 <sup>a</sup> (+)	12,14±0,19 <sup>b</sup> (+)	11,45±0,31 <sup>c</sup> (-)	10,62±0,13 <sup>d</sup> (-)
<i>S. marcescens</i>	15,68±0,42 <sup>a</sup> (+)	12,36±0,04 <sup>b</sup> (+)	17,98±0,83 <sup>c</sup> (+)	16,43±0,00 <sup>d</sup> (+)
<i>S. putrefaciens</i>	9,00±0,00 <sup>c</sup> (-)	9,00±0,00 <sup>c</sup> (-)	23,71±0,08 <sup>a</sup> (++)	17,54±0,33 <sup>b</sup> (+)
<i>P. fragi</i>	9,00±0,00 <sup>d</sup> (-)	11,68±0,32 <sup>bc</sup> (-)	12,27±0,07 <sup>a</sup> (+)	12,04±0,33 <sup>ac</sup> (+)
<i>P. fluorescens</i>	9,00±0,00 <sup>c</sup> (-)	9,00±0,00 <sup>c</sup> (-)	14,92±0,21 <sup>a</sup> (+)	11,94±0,11 <sup>b</sup> (-)

<sup>‡</sup>Los valores seguidos por letras diferentes dentro de la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según el test de rango múltiple de Tukey. Los aceites esenciales son clasificados como (-) no activo, (+) moderadamente activo, (++) activo y (+++) extremadamente activo.

De igual modo, para *A. denitrificans*, el AE de *T. mastichina* no fue activo, mientras que los AEs de *T. vulgaris*, *T. zygis* y *T. capitatus* fueron moderadamente

activos para esta cepa; el AE de *T. zygis* mostró la mayor ( $p < 0,05$ ) zona de inhibición. En el caso de *E. amnigenus*, *L. innocua* y *A. faecalis* fue el AE de *T. zygis* el que mostró el mayor ( $p < 0,05$ ) halo de inhibición. Todos los AEs evaluados fueron moderadamente activos para *E. amnigenus* y *S. marcescens*. Para *E. gergoviae*, los AEs de *T. mastichina* y *T. vulgaris* fueron moderadamente activos, mientras los AEs de *T. zygis* y *T. capitatus* no fueron activos. En el caso de *P. fragi* y *P. fluorescens* los AEs de *T. capitatus* y *T. zygis* fueron moderadamente activos, mientras que los AEs de *T. mastichina* y *T. vulgaris* no fueron activos.

Respecto al efecto del volumen de AE usado (Tabla 5), en el caso del AE de *T. vulgaris* no se observó efecto antibacteriano a ningún volumen estudiado frente a *S. putrefaciens*, *P. fragi* y *P. fluorescens*. De la misma forma, no se encontró efecto inhibitorio en el disco impregnado con 3,75  $\mu\text{L}$  en el resto de cepas bacterianas analizadas, excepto para *L. innocua*. Esta cepa mostró sensibilidad frente a todos los volúmenes de AE ensayados de forma directamente proporcional al volumen.

El AE de *T. mastichina* (Tabla 5) no presentó actividad inhibitoria frente a *A. denitrificans*, *E. amnigenus*, *E. gergoviae*, *S. putrefaciens*, *P. fluorescens* y *P. fragi* a ninguno de los volúmenes analizados (15; 7,5 y 3,75  $\mu\text{L}$ ). Para *L. innocua* y *A. faecalis* no se observó efecto inhibitorio en el disco impregnado con 3,75  $\mu\text{L}$ . Para *A. hydrophila* y *S. marcescens* solo el disco impregnado con 15  $\mu\text{L}$  de este AE presentó inhibición (Tabla 5).

El AE de *T. capitatus* mostró (Tabla 5) efectos inhibitorios ( $p < 0,05$ ) sobre *L. innocua*, *A. hydrophila*, *S. marcescens*, *A. denitrificans* y *A. faecalis* a todos los volúmenes ensayados y lo hizo de forma volumen-dependiente.

El AE de *T. zygis* tuvo un efecto inhibitorio contra *P. fragi*, *P. fluorescens* y *E. gergoviae*, solo en el volumen ensayado más alto (30  $\mu\text{L}$ ), no así para el resto de volúmenes ensayados (Tabla 5). Por otro lado este aceite esencial mostró efectos inhibitorios ( $p < 0,05$ ) sobre *L. innocua*, *A. hydrophila*, *A. denitrificans*, *S. marcescens*, *E. amnigenus* y *A. faecalis* para todos los volúmenes ensayados y lo hizo de forma volumen-dependiente (Tabla 5).

**Tabla 5.** Efecto del volumen de aceite esencial de *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus* y *T. zygis*, en la determinación de la actividad antibacteriana, usando el método de difusión en disco.

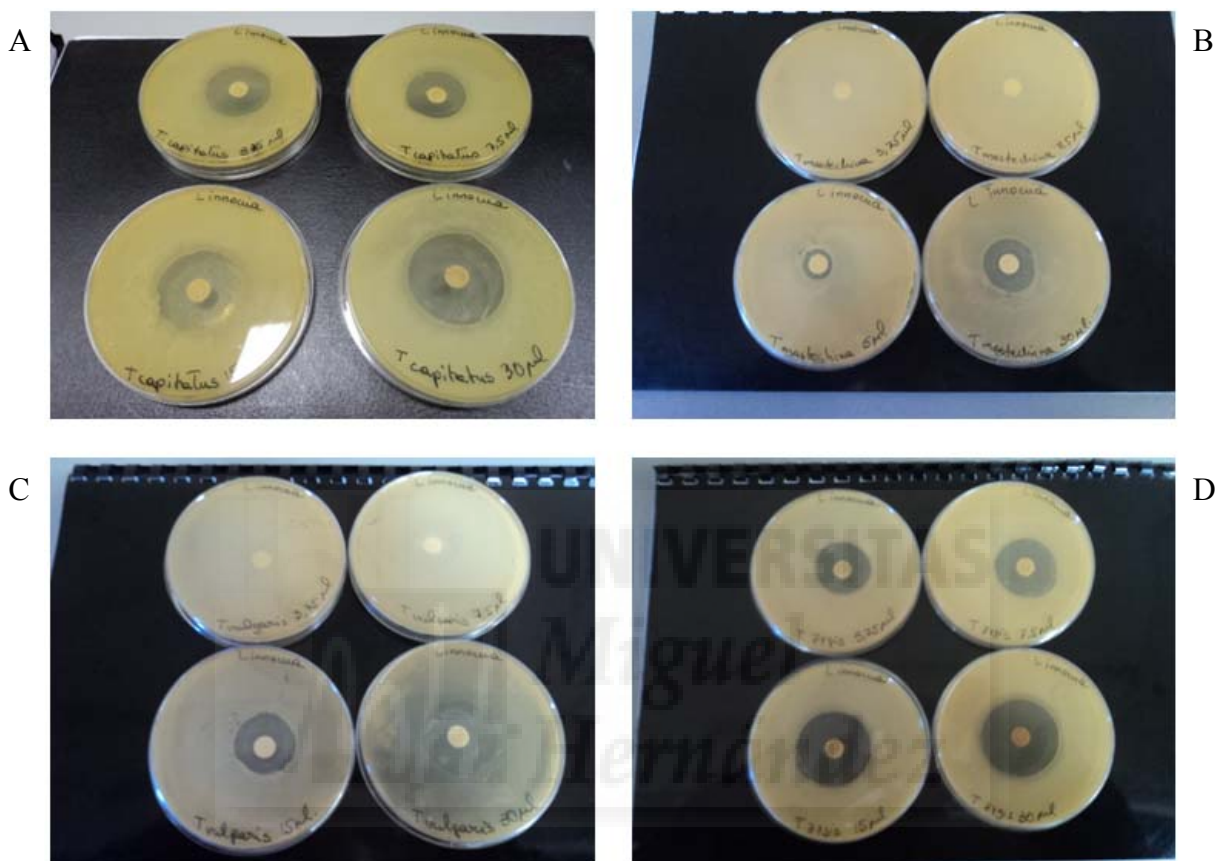
Bacteria	V ( $\mu\text{L}$ ) <sup>γ</sup>	Aceite esencial			
		<i>T. vulgaris</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>T. capitatus</i>	<i>T. zygis</i>
<i>L. innocua</i>	15	21,10±9,46 <sup>a</sup>	15,89±0,86 <sup>a</sup>	36,57±0,23 <sup>a</sup>	37,48±1,62 <sup>a</sup>
	7,5	11,97±1,17 <sup>b</sup>	12,75±0,04 <sup>b</sup>	35,71±0,30 <sup>b</sup>	35,69±0,57 <sup>b</sup>
	3,75	11,93±0,01 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>c</sup>	33,27±0,86 <sup>c</sup>	32,26±3,35 <sup>c</sup>
<i>A. hydrophila</i>	15	10,47±0,32 <sup>a</sup>	10,99±0,06 <sup>a</sup>	14,13±0,01 <sup>a</sup>	13,82±0,04 <sup>a</sup>
	7,5	10,40±0,01 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	12,39±0,07 <sup>b</sup>	12,98±0,25 <sup>b</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	11,44±0,44 <sup>c</sup>	12,82±0,02 <sup>b</sup>
<i>A. denitrificans</i>	15	10,99±0,04 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	12,37±0,00 <sup>a</sup>	15,28±0,23 <sup>a</sup>
	7,5	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	10,49±0,01 <sup>b</sup>	12,44±0,00 <sup>b</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	10,02±0,01 <sup>c</sup>	11,51±0,00 <sup>c</sup>
<i>A. faecalis</i>	15	31,94±1,65 <sup>a</sup>	15,75±0,60 <sup>a</sup>	44,40±0,40 <sup>a</sup>	48,30±1,92 <sup>a</sup>
	7,5	13,29±0,18 <sup>b</sup>	12,68±1,03 <sup>b</sup>	41,99±0,44 <sup>b</sup>	44,70±0,01 <sup>c</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>c</sup>	9,00±0,00 <sup>c</sup>	40,95±0,60 <sup>b</sup>	38,19±1,07 <sup>c</sup>
<i>E. amnigenus</i>	15	10,59±0,32 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	12,66±0,31 <sup>a</sup>
	7,5	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	11,34±0,33 <sup>b</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	10,54±0,06 <sup>c</sup>
<i>E. gergoviae</i>	15	11,33±0,33 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	11,22±0,15 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	7,5	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
<i>S. marcescens</i>	15	14,41±0,27 <sup>a</sup>	10,49±0,07 <sup>a</sup>	15,63±0,11 <sup>a</sup>	14,42±0,34 <sup>a</sup>
	7,5	13,50±0,07 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	13,49±0,09 <sup>b</sup>	12,18±0,00 <sup>b</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>c</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	13,16±0,06 <sup>c</sup>	11,21±0,05 <sup>c</sup>
<i>S. putrefaciens</i>	15	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	15,97±0,42 <sup>a</sup>	12,31±0,20 <sup>a</sup>
	7,5	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>
<i>P. fragi</i>	15	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	7,5	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
<i>P. fluorescens</i>	15	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	13,31±0,19 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	7,5	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>

<sup>γ</sup>Para una misma bacteria valores seguidos por letras diferentes dentro de la misma columna son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según el test de rangos múltiples de Tukey.

<sup>γ</sup> Volumen de aceite esencial añadido.

Valores expresados como: Diámetro del halo de inhibición (mm) incluyendo el diámetro del disco de 9 mm.

En la Figura 5 se muestra la actividad antibacteriana (manifestada mediante los halos de inhibición) de los aceites esenciales de *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus* y *T. zygis* sobre la cepa *L. innocua*, usando el método de difusión en disco.



**Figura 5:** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de A: *T. capitatus*, B: *T. mastichina*, C: *T. vulgaris*, y D: *T. zygis* sobre la cepa *L. innocua* usando el método de difusión en disco.

### 5.2.2.-Método de microdilución

La Tabla 6 muestra los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) obtenidos mediante el ensayo de microdilución de los AEs de *T. mastichina*, *T. zygis*, *T. capitatus* y *T. vulgaris* frente a las 10 cepas bacterianas.

Los AEs analizados fueron más efectivos en los ensayos de microdilución que en los ensayos de difusión en disco en agar. Tanto es así, que incluso los AEs que no mostraron efectos inhibidores del crecimiento de cepas como *S. putrefaciens*, *P. fragi* y *P. fluorescens* en ensayos de difusión en disco sobre agar, fueron efectivos en ensayos



por microdilución. Para el AE de *T. mastichina* los valores de MIC oscilaban entre 3,75 y 7,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , mientras que en el caso de *T. zygis*, *T. capitatus* y *T. vulgaris*, los valores de MIC variaban en unos rangos comprendidos entre 1,87 y 7,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Todas las bacterias analizadas en este trabajo tuvieron mayor resistencia a los AE que a la nisina (control).

**Tabla 6.** Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) en  $\mu\text{L}/\text{mL}$  obtenidos mediante el ensayo de microdilución de los aceites esenciales de *T. mastichina*, *T. zygis*, *T. capitatus* y *T. vulgaris* frente a las 10 cepas bacterianas.

Bacteria	Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )				Nisina
	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>T. capitatus</i>	<i>T. zygis</i>	
<i>L. innocua</i>	3,75	3,75	3,75	3,75	2,50
<i>A. hydrophila</i>	3,75	3,75	3,75	3,75	2,50
<i>A. denitrificans</i>	3,75	3,75	3,75	3,75	2,50
<i>A. faecalis</i>	3,75	3,75	3,75	3,75	2,50
<i>E. amnigenus</i>	7,5	7,5	7,5	7,5	1,25
<i>E. gergoviae</i>	7,5	7,5	7,5	7,5	1,25
<i>S. marcescens</i>	7,5	7,5	1,87	3,75	1,25
<i>S. putrefaciens</i>	1,87	3,75	1,87	1,87	0,62
<i>P. fragi</i>	3,75	3,75	3,75	3,75	1,25
<i>P. fluorescens</i>	3,75	3,75	1,87	3,75	1,25

En general, las cepas bacterianas ensayadas presentaron diferente comportamiento en los dos métodos usados: difusión en disco sobre agar y microdilución. En el caso de los AEs de *T. mastichina* o *T. vulgaris* la cepa bacteriana menos sensible en el método de difusión en disco mostró la mayor sensibilidad en el ensayo de microdilución. En cuanto a los AEs de *T. zygis* y *T. capitatus*, las cepas bacterianas que fueron más sensibles en los métodos de difusión en disco, mostraron la misma sensibilidad en los ensayos de microdilución. Como ocurre con los AEs de *T. mastichina* o *T. vulgaris*, las cepas bacterianas menos sensibles a la acción de los AEs de *T. zygis* y *T. capitatus* en el método de difusión de disco, mostraron mayor

sensibilidad en el ensayo de microdilución.

El ensayo de microdilución permite el contacto directo del aceite con los microorganismos y se aproxima mejor a las condiciones reales que se dan en un alimento al que se añaden AEs y permite determinar, cuantitativamente, la eficacia antibacteriana de los AEs. Las diferencias en efectividad para estos dos métodos evaluados radican en las diferencias en la capacidad de los AEs para acceder a los microorganismos, dependiendo de la interacción con la matriz donde los AEs son incorporados. Cuando los AEs son analizados por el método de microdilución el efecto inhibitorio es mayor que los AEs difundidos en un medio sólido (método de difusión en disco).

Este aspecto tiene que tenerse en cuenta para futuras aplicaciones de los AEs como compuestos antibacterianos naturales para la conservación de alimentos; con esta información es posible determinar la concentración de AE que se debe usar, dependiendo de donde se realice la aplicación, si el AE es añadido directamente sobre el alimento o dentro de este, o como una parte del envase.

En la literatura científica, más allá de nuestro conocimiento, no existen estudios donde se ponga de manifiesto la actividad antibacteriana de AEs pertenecientes al género *Thymus* y procedentes de cultivo ecológico. Sin embargo la actividad antibacteriana de diversas especies de tomillos, incluidas las analizadas en este trabajo, pero obtenidas de plantas cultivadas o silvestres no cultivadas han sido ampliamente estudiadas. Así, Rota et al. (2008) mostró que el AE de *T. zygis* tenía actividad antibacteriana frente a *Salmonella enteridis*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocitogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus aureus*. Bounatirou et al. (2007) informó que el AE de *T. capitatus* mostraba actividad antibacteriana frente a *Salmonella spp.*, *Bacillus cereus*, *L. innocua* y *S. aureus*. Viuda-Martos et al. (2008) analizó la actividad antibacteriana del AE de *T. vulgaris* cultivado en España. Este AE mostró actividad antibacteriana frente a *E. gergoviae*, *E. amnigenus*, *Staphylococcus xilosus* y *Staphylococcus carnosus*. Çetin et al. (2011) investigó la actividad antibacteriana del AE de *Thymus sipylens*, *sipylens variedad rosulans*. Este AE mostró el mayor efecto inhibitorio frente a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y *S. aureus*.

Está ampliamente demostrado que los AEs muestran actividad antibacteriana, sin embargo la razón de esta capacidad no está totalmente esclarecida y se han sugerido distintos mecanismos de acción. Los datos de la literatura disponible muestran que el primer lugar de la acción tóxica de los AEs es, generalmente, la membrana plasmática. Esto está directamente relacionado con la hidrofobicidad de los compuestos terpenoides de los AEs, lo cual les permite dividir la bicapa lipídica bacteriana, distorsionando su estructura e incrementando su permeabilidad a protones, iones y otros constituyentes celulares (Kalemba y Kunicka, 2003; Carson et al., 2006). Burt (2004) mencionó que los AEs podrían desintegrar la membrana exterior de la bacteria liberando lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad al ATP. En otro estudio, Burt et al. (2007) y Arques et al. (2008) propusieron que los AEs afectaban a células microbianas por varios mecanismos antibacterianos, como la interrupción de los sistemas enzimáticos, comprometiendo el material genético de la bacteria o actuando sobre la oxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana. De cualquier modo, la actividad antibacteriana que muestran los AEs, es muy difícil de asociar a un único compuesto presente en su composición, debido a la complejidad y variabilidad de esta. Así la actividad antibacteriana podría ser causada por la acción conjunta de la totalidad de los compuestos que conforman el AE, o bien por un efecto sinérgico entre los componentes mayoritarios y otros que estuviesen en menor cantidad tal y como menciona Carović-Stanko et al. (2010). Sin embargo, otros autores mencionan la existencia de una relación directa entre los componentes mayoritarios del AE y la actividad antibacteriana (Djenane et al., 2011). Además, cabe destacar que la actividad antibacteriana producida por los componentes que constituyen los AEs está influenciada por el carácter lipofílico de su estructura hidrocarbonada y el carácter hidrofílico de sus grupos funcionales (Nowak et al., 2012).

Por otro lado, también hay que tener en cuenta que el tipo de bacteria también tiene influencia en la efectividad de los AEs. Así, está demostrado que el efecto antibacteriano de los AEs es menor sobre las bacterias Gram (-) que sobre las bacterias Gram (+) (Gilles et al., 2010). La diferencia en la sensibilidad de la bacteria frente al AE, se piensa que es como resultado de las diferencias en la estructura de su membrana celular. La envoltura celular de las bacterias Gram (-) es más compleja que la de las

bacterias Gram (+). Las bacterias Gram (-) están compuestas de dos capas que protegen a la célula y le aportan rigidez mientras que las bacterias Gram (+) no presentan la capa más exterior de la membrana celular. Esta podría ser la razón por la que dichas bacterias fueran más sensibles a la acción de los compuestos presentes en los AEs (Angienda et al., 2010). En este trabajo, a altos volúmenes de AE, no se encontraron diferencias entre bacterias Gram (-) y Gram (+), así como tampoco en los ensayos de microdilución.

### **5.3.-Actividad antibacteriana, de los aceites esenciales sometidos a estudio, frente a diversas cepas bacterianas, empleando como medios de cultivo, diferentes extractos cárnicos.**

El objetivo de este trabajo fue la determinación de la actividad antibacteriana, mediante el empleo de dos técnicas distintas (difusión en disco y microdilución) de los AEs obtenidos de *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus*, y *T. zygis*, frente a diversas bacterias relacionadas con el deterioro de alimentos o indicadoras de la presencia de patógenos, en las que se emplearon como medio de cultivo, diferentes extractos cárnicos, obtenidos a partir de un producto cárnico fresco, un producto cárnico cocido y un producto cárnico crudo-curado. Este trabajo se encuentra bajo revisión en la revista *Food Control*.

En la Tabla 7 se observa la actividad antibacteriana de los AEs de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico fresco. Los cuatro AEs estudiados presentaron actividad inhibitoria del crecimiento frente a todas las cepas analizadas, siendo los mayores halos de inhibición los obtenidos frente a las cepas *A. faecalis* y *L. innocua*. En el caso de *A. faecalis*, fue el AE de *T. capitatus* el que mostró mayores halos de inhibición ( $p < 0,05$ ) seguido por el aceite esencial de *T. zygis*, *T. vulgaris* y *T. mastichina*. En el caso de *L. innocua*, fue el AE de *T. zygis* el que presentó un mayor halo de inhibición ( $p < 0,05$ ) seguido por los AEs de *T. mastichina*, *T. capitatus* y *T. vulgaris*, que no mostraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre ellos.

Para las cepas *E. amnigenus*, *E. gergoviae* y *P. fluorescens*, fueron los AEs de *T. capitatus* y *T. zygis* los que mostraron una mayor actividad inhibitoria de su crecimiento, no mostrando diferencias ( $p > 0,05$ ) estadísticamente significativas entre

ellos. Para estas cepas, fue el AE de *T. mastichina* el que presentó menor actividad ( $p < 0,05$ ). Para las cepas *A. denitrificans*, *A. hydrophila*, *P. fragi*, *S. marcescens* y *S. putrefaciens* fue el AE de *T. capitatus* el que mostró mayores halos de inhibición ( $p < 0,05$ ) seguido por los AEs de *T. zygis*, *T. vulgaris* y *T. mastichina*.

**Tabla 7.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico fresco y volumen de AE de 30  $\mu\text{L}$

Bacteria	Diámetro (media y desviación) del halo de inhibición (mm) incluyendo el diámetro del disco de 9 mm.			
	<i>T. capitatus</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. zygis</i>
<i>A. denitrificans</i>	28,37 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	11,29 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>	19,82 $\pm$ 0,97 <sup>c</sup>	23,92 $\pm$ 2,72 <sup>b</sup>
<i>A. faecalis</i>	35,12 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	16,91 $\pm$ 1,17 <sup>d</sup>	32,73 $\pm$ 0,33 <sup>c</sup>	33,85 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>
<i>A. hydrophila</i>	30,69 $\pm$ 1,88 <sup>a</sup>	14,70 $\pm$ 0,98 <sup>d</sup>	16,04 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	19,35 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>
<i>E. amnigenus</i>	16,80 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	10,97 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	12,43 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup>	17,98 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>
<i>E. gergoviae</i>	13,78 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	10,82 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	10,77 $\pm$ 1,42 <sup>b</sup>	13,92 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
<i>L. innocua</i>	34,07 $\pm$ 2,68 <sup>b</sup>	34,98 $\pm$ 1,67 <sup>b</sup>	33,77 $\pm$ 3,35 <sup>b</sup>	45,37 $\pm$ 5,98 <sup>a</sup>
<i>P. fluorescens</i>	29,36 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>	12,07 $\pm$ 1,10 <sup>c</sup>	19,91 $\pm$ 2,55 <sup>b</sup>	27,72 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>
<i>P. fragi</i>	29,80 $\pm$ 2,16 <sup>a</sup>	11,61 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	16,23 $\pm$ 2,29 <sup>c</sup>	26,61 $\pm$ 1,90 <sup>b</sup>
<i>S. marcescens</i>	29,06 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	11,84 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup>	16,84 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	16,96 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
<i>S. putrefaciens</i>	32,04 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	13,09 $\pm$ 0,40 <sup>d</sup>	15,34 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	20,85 $\pm$ 3,28 <sup>b</sup>

Valores seguidos de la misma letra dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) según el test de Rangos múltiples de Tukey.

En la Tabla 8 se observa la actividad antibacteriana de los AEs de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico cocido. Los cuatro aceites esenciales estudiados presentaron actividad inhibitoria del crecimiento frente a todas las cepas analizadas. Como en el caso anterior, las dos cepas más sensibles a la acción de los AEs analizados fueron *A. faecalis* y *L. innocua*. En el caso de *A. faecalis*, fue el AE de *T. capitatus* el que mostró mayores halos de inhibición ( $p < 0,05$ ), seguido por los AEs de *T. zygis* y *T. vulgaris*, no presentando diferencias ( $p > 0,05$ ) entre ambos. En el caso de *L.*

*innocua*, fue el AE de *T. zygis* el que presentó un mayor halo de inhibición, seguido por el AE de *T. vulgaris*, aunque no se apreciaron diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) entre ambos.

Para la cepa *E. gergoviae*, fueron los AEs de *T. capitatus* y *T. zygis*, los que mostraron una mayor actividad inhibitoria del crecimiento, no mostrando diferencias ( $p > 0,05$ ) estadísticamente significativas entre ellos. Para la cepa *S. marcescens*, fueron los AEs de *T. capitatus*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, los que mostraron una mayor actividad inhibitoria de su crecimiento, no existiendo diferencias ( $p > 0,05$ ) entre ellos.

**Tabla 8.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico cocido y un volumen de AE de 30  $\mu$ L

Bacteria	Diámetro (media y desviación) del halo de inhibición (mm) incluyendo el diámetro del disco de 9 mm.			
	<i>T. capitatus</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. zygis</i>
<i>A. denitrificans</i>	14,70 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	13,29 $\pm$ 0,61 <sup>bc</sup>	13,59 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	13,11 $\pm$ 0,13 <sup>c</sup>
<i>A. faecalis</i>	32,25 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	15,34 $\pm$ 0,70 <sup>c</sup>	24,55 $\pm$ 5,44 <sup>b</sup>	25,39 $\pm$ 1,96 <sup>b</sup>
<i>A. hydrophila</i>	14,49 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup>	12,13 $\pm$ 0,34 <sup>c</sup>	14,74 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	18,51 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>
<i>E. amnigenus</i>	16,29 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	10,69 $\pm$ 0,37 <sup>c</sup>	10,87 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	15,08 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>
<i>E. gergoviae</i>	16,51 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	13,81 $\pm$ 0,28 <sup>c</sup>	14,46 $\pm$ 0,20 <sup>b</sup>	17,32 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>
<i>L. innocua</i>	20,86 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup>	15,23 $\pm$ 1,22 <sup>c</sup>	22,35 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	23,01 $\pm$ 0,78 <sup>a</sup>
<i>P. fluorescens</i>	17,71 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>	12,86 $\pm$ 0,56 <sup>d</sup>	13,93 $\pm$ 0,45 <sup>c</sup>	15,48 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>
<i>P. fragi</i>	15,17 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	11,78 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	14,30 $\pm$ 0,64 <sup>c</sup>	16,68 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>
<i>S. marcescens</i>	16,59 $\pm$ 2,09 <sup>a</sup>	12,69 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	15,95 $\pm$ 1,80 <sup>a</sup>	15,15 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
<i>S. putrefaciens</i>	13,75 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	14,34 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	9,77 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>	12,98 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>

Valores seguidos de la misma letra dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) según el test de Rangos múltiples de Tukey.

Para las cepas *A. denitrificans*, *E. amnigenus* y *P. fluorescens* fue el AE de *T. capitatus* el que mostró una mayor actividad inhibitoria del crecimiento ( $p < 0,05$ ). Para las cepas *A. hydrophila* y *P. fragi* fue el AE de *T. zygis* el que mostró los mayores halos

de inhibición ( $p < 0,05$ ), seguido por el AE de *T. capitatus*. Cuando se analizó la actividad de los aceites frente a *S. putrefaciens*, fue el AE de *T. mastichina* el que manifestó la mayor actividad inhibitoria ( $p < 0,05$ ), seguido por los AEs de *T. capitatus*, *T. zygis* y *T. vulgaris*.

En la Tabla 9 se muestra la actividad antibacteriana de los AEs de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico crudo-curado. En este caso, no todos los AEs estudiados presentaron actividad inhibitoria del crecimiento frente a todas las cepas analizadas. Así, para *E. gergoviae*, solo el AE de *T. vulgaris* fue activo, mientras que para *E. amnigenus* y *A. faecalis*, solo los AEs de *T. mastichina* y *T. vulgaris* presentaron actividad, siendo el AE de *T. vulgaris* el que presentó mayor ( $p < 0,05$ ) inhibición.

**Tabla 9.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto crudo-curado y un volumen de AE de 30  $\mu$ L

Bacteria	Diámetro (media y desviación) del halo de inhibición (mm) incluyendo el diámetro del disco de 9 mm.			
	<i>T. capitatus</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. zygis</i>
<i>A. denitrificans</i>	20,75 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup>	15,87 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	15,99 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	20,63 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>
<i>A. faecalis</i>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	16,03 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	21,38 $\pm$ 2,08 <sup>a</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>
<i>A. hydrophila</i>	38,18 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	24,94 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	29,91 $\pm$ 5,12 <sup>b</sup>	40,72 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>
<i>E. amnigenus</i>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	17,31 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	19,19 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
<i>E. gergoviae</i>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	12,85 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
<i>L. innocua</i>	38,59 $\pm$ 1,37 <sup>b</sup>	19,45 $\pm$ 2,03 <sup>d</sup>	22,82 $\pm$ 0,45 <sup>c</sup>	50,97 $\pm$ 5,17 <sup>a</sup>
<i>P. fluorescens</i>	19,28 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	16,70 $\pm$ 0,33 <sup>c</sup>	11,49 $\pm$ 0,19 <sup>d</sup>	18,99 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>
<i>P. fragi</i>	30,11 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	14,19 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>	13,26 $\pm$ 0,66 <sup>d</sup>	18,49 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>
<i>S. marcescens</i>	16,60 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	11,49 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	14,82 $\pm$ 0,76 <sup>b</sup>	16,64 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
<i>S. putrefaciens</i>	18,96 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	15,82 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	13,45 $\pm$ 1,66 <sup>c</sup>	18,87 $\pm$ 1,51 <sup>a</sup>

Valores seguidos de la misma letra dentro de la misma fila no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) según el test de Rangos múltiples de Tukey.

En el caso de las *Pseudomonas* (*P. fragi* y *P. fluorescens*) fue el AE de *T. capitatus* el que mostró los mayores halos de inhibición ( $p < 0,05$ ) seguido por el AE de *T. zygis*, *T. mastichina* y *T. vulgaris*. Para las cepas *A. denitrificans*, *S. marcescens*, *S. putrefaciens* y *A. hydrophila*, fueron los AEs de *T. capitatus* y *T. zygis*, los que mostraron una mayor actividad inhibitoria de su crecimiento, no mostrando diferencias ( $p > 0,05$ ) significativas entre ambos. Para la cepa *E. amnigenus*, fueron los AEs de *T. vulgaris* y *T. mastichina* los que mostraron una mayor actividad inhibitoria de su crecimiento ( $p > 0,05$ ). Para *P. fluorescens* y *P. fragi*, fue el AE de *T. capitatus* el que mostró mayor actividad inhibitoria del crecimiento ( $p < 0,05$ ); mientras que para *A. faecalis* y *E. gergoviae*, fue el AE de *T. vulgaris* el que mostró mayor ( $p < 0,05$ ) actividad inhibitoria.

En la Tabla 10 se puede encontrar la clasificación de los aceites esenciales de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, según su actividad sobre las distintas cepas bacterianas, en los distintos medios de cultivo empleados (extracto cárnico fresco, cocido o crudo curado).

En el caso de *A. denitrificans*, los aceites esenciales de *T. capitatus* y *T. zygis* fueron más activos cuando se empleó como medio de cultivo el extracto fresco, sin embargo para estos mismos AEs no hubo diferencias entre los medios en los que se empleó un producto cárnico cocido o crudo-curado. Para *A. faecalis* el medio de cultivo elaborado con un extracto crudo-curado influyó significativamente en el caso de los AEs de *T. capitatus* y *T. zygis*, ya que pasaron de tener una actividad extremadamente activa o moderadamente activa en los medios con extractos fresco o cocido, a no presentar actividad en el medio crudo-curado. La actividad inhibitoria del aceite esencial de *T. mastichina* no se vio afectada por el medio de cultivo. Para *A. hydrophila* el medio de cultivo con extracto de producto crudo-curado permitió un mayor efecto inhibitorio de los AEs que los medios con producto fresco y cocido frente a los cuatro aceites esenciales (*T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*).

En cuanto a las cepas *E. amnigenus* y *E. gergoviae*, el medio de cultivo con producto crudo-curado anuló su sensibilidad frente a los aceites esenciales de *T. capitatus* y *T. zygis*, que en cambio tuvieron actividades inhibitorias moderadamente activa o activas en los productos fresco y cocido respectivamente. Cuando se analizan



los resultados para *L. innocua* se observa que para todos los AEs, es en el medio de cultivo preparado con un extracto cárnico fresco en el que se obtiene una actividad inhibitoria extrema. Sin embargo en el medio de cultivo elaborado con un extracto cocido, para los AEs de *T. capitatus* y *T. mastichina* la actividad se puede clasificar como moderadamente activa.

**Tabla 10.** Clasificación de los AEs de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, según su actividad sobre las distintas cepas bacterianas, en los diferentes medios de cultivo elaborados con un extracto cárnico fresco, cocido o crudo curado y un volumen de AE de 30 µL

Bacteria	Aceite esencial			
	<i>T. capitatus</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. zygis</i>
<i>A. denitrificans</i>	+++; ++; ++	+; +; ++	++; ++; ++	+++; ++; ++
<i>A. faecalis</i>	++++; ++++; -	++; ++; ++	++++; +++; +++	++++; +++; -
<i>A. hydrophila</i>	+++; ++; ++++	++; ++; +++	++; ++; +++	++; ++; ++++
<i>E. amnigenus</i>	++; ++; -	+; +; ++	++; +; ++	++; ++; -
<i>E. gergoviae</i>	++; ++; -	+; ++; -	+; ++; ++	++; ++; -
<i>L. innocua</i>	++++; ++; ++++	++++; ++; ++	++++; +++; +++	++++; +++; ++++
<i>P. fluorescens</i>	+++; ++; ++	++; ++; ++	++; ++; +	+++; ++; ++
<i>P. fragi</i>	+++; ++; ++++	+; +; ++	++; ++; ++	+++; ++; ++
<i>S. marcescens</i>	+++; ++; ++	+; ++; +	++; ++; ++	++; ++; ++
<i>S. putrefaciens</i>	++++; ++; ++	++; ++; ++	++; +; ++	++; ++; ++

Negro → Producto cárnico fresco; Azul → Producto cárnico cocido; Verde → Producto cárnico curado

Clasificación de los aceites esenciales: (-) no activo; (+) ligeramente activo; (++) moderadamente activo; (+++) activo; (++++) extremadamente activo.

Para *P. fluorescens*, los AEs de *T. capitatus* y *T. zygis* fueron más activos cuando se empleó como medio de cultivo un extracto cárnico fresco, sin embargo para estos mismos AEs no hubo diferencias entre los medios en los que se empleó un extracto cárnico cocido o crudo-curado. Finalmente, en el caso *S. marcescens* la actividad inhibitoria de los AEs de *T. vulgaris* y *T. zygis* no se vio afectada por el medio de cultivo.

Generalmente, la composición, la estructura, así como los grupos funcionales de

los componentes que integran el aceite esencial desempeñan un papel muy importante a la hora de determinar su actividad antibacteriana. De igual modo, otro factor que afecta a la aplicación de aceites esenciales en alimentos como agentes antibacterianos es que se supone que los altos niveles de grasa y/o de proteína en los alimentos protegen de cierta manera a las bacterias contra la acción de los aceites esenciales (Burt, 2004). Así, si el aceite esencial se disuelve en la fase lipídica del alimento, estará menos disponible para actuar sobre las bacterias presentes en la fase acuosa.

También es importante destacar que en función de cómo se encuentre la fracción grasa del alimento, ya sea emulsionada, degradada por acción del proceso fermentativo y de curado, o no alterada, los aceites esenciales ejercerán más o menos actividad frente al crecimiento microbiano, tal y como se comprueba en el presente trabajo. Por el contrario, los carbohidratos del alimento no parecen proteger a las bacterias contra la acción de los aceites esenciales tanto como las grasas y las proteínas. Una alta concentración de agua y/o de sal en el producto facilita la acción de los aceites esenciales (Burt et al., 2007). Es un hecho comprobado que la concentración de aceite esencial a aplicar a un alimento es mucho mayor, del orden del 1-3%, (Ruiz-Navajas et al., 2015) que la cantidad adicionada cuando se realiza en ensayo in vitro, para obtener los mismos resultados de actividad antibacteriana. Ésta es una de las razones por la que su uso en el sector alimentario está limitado, ya que el empleo de altas concentraciones provoca cambios organolépticos en el alimento y disminuye la aceptabilidad del mismo por parte del consumidor (Lis-Balchin y Deans, 1997).

La interacción entre los grupos fenólicos de los aceites esenciales y las proteínas, lípidos y aldehídos de los alimentos puede explicar, por lo menos parcialmente, la reducción en los efectos antibacterianos. Se ha propuesto que los extractos derivados de las especias sean utilizados como agentes antibacterianos formando parte de un sistema de tecnología de barreras que implique la preservación del alimento por la acción múltiple y simultánea de una serie de compuestos y/o acciones (Nychas y Skandamis, 2003). El desarrollo de los sistemas antibacterianos multi-componentes para los alimentos requiere una comprensión muy exacta de los mecanismos de acción de los agentes específicos, para poder centrar así la atención en combinaciones potencialmente eficaces (Holley y Gill, 2004).

El uso conjunto de AEs con otros factores pueden facilitar su utilización como agentes antibacterianos, sin afectar a las características organolépticas del producto, así, la utilización de pH bajos, bajas temperaturas o bajos niveles de oxígeno, permiten reducir las concentraciones de aceites esenciales a utilizar (Skandamis y Nychas 2000).

### **5.3.1.- Determinación del efecto del volumen sobre la actividad antibacteriana empleando como medios de cultivo diferentes extractos cárnicos.**

En la Tabla 11 se observa la actividad antibacteriana de los AEs de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, en función de distintos volúmenes adicionados, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico fresco. En este caso no todos los AEs estudiados presentaron actividad inhibitoria del crecimiento frente a las cepas analizadas. Siendo la cepa *L. innocua* la más sensible a la acción de estos AEs, ya que mostraba los mayores halos ( $p < 0,05$ ) de inhibición para cada uno de los volúmenes adicionados.

En el caso de *A. denitrificans*, *E. amnigenus* y *P. fragi*, se comportaron de una forma similar; a medida que disminuía el volumen de AE empleado, menores eran los halos de inhibición, es decir, la actividad antibacteriana ocurría de una forma concentración-dependiente. Así, para los AEs de *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, se presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación con los volúmenes empleados. Para *S. marcescens*, los AEs de *T. capitatus*, *T. vulgaris* y *T. zygis* no mostraron diferencias ( $p > 0,05$ ) significativas entre los volúmenes de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$ . Sin embargo, sí se encontraron ( $p < 0,05$ ) para el AE de *T. mastichina*.

En cuanto a la cepa *A. faecalis*, para los aceites esenciales de *T. capitatus*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, se presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación con los volúmenes empleados. Mientras que para el AE de *T. mastichina*, no se presentaron diferencias entre los volúmenes de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$  ( $p > 0,05$ ). En el caso de la cepa *E. gergoviae*, se apreciaron diferencias, para todos los volúmenes empleados, para los AEs de *T. capitatus* y *T. mastichina*. En el caso de *T. zygis*, los volúmenes de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$ , no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos. Sin embargo, para *T. vulgaris* no hubo actividad inhibitoria en ninguno de los tres volúmenes empleados (15, 7,5, 3,75  $\mu\text{L}$ ).

**Tabla 11.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto fresco y el método de difusión en disco.

Bacteria	$\gamma$ V ( $\mu$ L)	Aceite esencial			
		<i>T. vulgaris</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>T. capitatus</i>	<i>T. zygis</i>
<i>L. innocua</i>	15	26,42 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	24,40 $\pm$ 0,85 <sup>a</sup>	30,11 $\pm$ 1,80 <sup>a</sup>	40,26 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>
	7,5	18,87 $\pm$ 2,86 <sup>b</sup>	21,93 $\pm$ 2,51 <sup>b</sup>	27,92 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	38,62 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
	3,75	12,18 $\pm$ 0,88 <sup>c</sup>	13,29 $\pm$ 0,67 <sup>c</sup>	27,01 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	37,17 $\pm$ 0,30 <sup>c</sup>
<i>A. hydrophila</i>	15	14,38 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	12,56 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	28,95 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	19,35 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
	7,5	12,67 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	10,60 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	24,97 $\pm$ 1,45 <sup>b</sup>	17,27 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>
	3,75	10,43 $\pm$ 0,53 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	15,09 $\pm$ 0,42 <sup>c</sup>
<i>A. denitrificans</i>	15	13,93 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	11,23 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	27,79 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	18,60 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>
	7,5	12,65 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	10,09 $\pm$ 0,80 <sup>b</sup>	26,40 $\pm$ 1,55 <sup>a</sup>	16,13 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>
	3,75	11,13 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	09,33 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	23,63 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup>	13,88 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>
<i>A. faecalis</i>	15	30,40 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	14,54 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup>	27,03 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>	29,69 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>
	7,5	26,21 $\pm$ 2,14 <sup>b</sup>	13,60 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	24,26 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	26,33 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>
	3,75	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	12,75 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	16,60 $\pm$ 0,33 <sup>c</sup>
<i>E. amnigenus</i>	15	10,97 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	10,21 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	14,90 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	14,43 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>
	7,5	9,68 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	9,08 $\pm$ 0,07 <sup>b</sup>	14,04 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	13,88 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup>
	3,75	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	12,55 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	10,45 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>
<i>E. gergoviae</i>	15	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	10,79 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	11,66 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	12,46 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
	7,5	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	9,27 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	10,04 $\pm$ 0,34 <sup>b</sup>	12,02 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
	3,75	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	10,61 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>
<i>S. marcescens</i>	15	14,87 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	10,61 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	26,84 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	15,98 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
	7,5	13,54 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>	9,47 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	23,28 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup>	15,97 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
	3,75	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	9,32 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	19,84 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	12,72 $\pm$ 0,88 <sup>b</sup>
<i>S. putrefaciens</i>	15	15,14 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>	11,93 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	31,13 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	16,63 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>
	7,5	12,61 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	11,43 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	27,02 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	15,90 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
	3,75	9,65 $\pm$ 0,34 <sup>c</sup>	10,96 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>	24,33 $\pm$ 1,99 <sup>c</sup>	14,33 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
<i>P. fragi</i>	15	14,56 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	10,94 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	27,15 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	24,25 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
	7,5	11,93 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	10,17 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	26,46 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	15,07 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>
	3,75	9,66 $\pm$ 0,62 <sup>c</sup>	9,41 $\pm$ 0,29 <sup>c</sup>	25,92 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	13,87 $\pm$ 1,54 <sup>c</sup>
<i>P. fluorescens</i>	15	17,85 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	11,18 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	26,72 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	20,46 $\pm$ 4,89 <sup>a</sup>
	7,5	12,34 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	9,79 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	25,55 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	14,92 $\pm$ 2,49 <sup>b</sup>
	3,75	10,15 $\pm$ 0,75 <sup>c</sup>	9,62 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	22,49 $\pm$ 1,16 <sup>c</sup>	12,29 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>

Valores expresados como: Diámetro del halo de inhibición (mm) incluyendo el diámetro del disco de 9 mm. Para una misma bacteria. Valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) según el test de Rangos múltiples de Tukey.

Por último, para la cepa *S. putrefaciens*, los AEs de *T. capitatus*, *T. mastichina* y *T. vulgaris* mostraron diferencias ( $p < 0,05$ ) significativas en relación con los volúmenes empleados. Mientras que para *T. zygis*, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los volúmenes de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$ .

En la Tabla 12 se observa la actividad antibacteriana de los AEs de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, en función de diferentes volúmenes empleados (15, 7,5 y 3,75  $\mu\text{L}$ ) sobre las distintas cepas bacterianas analizadas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico cocido. Como ocurría con el medio de cultivo que se empleó un extracto fresco, no todos los AEs mostraron actividad frente a todas las cepas y a todos los volúmenes analizados. En este caso fue la cepa *A. faecalis*, la que se mostró más sensible a la acción de los AEs analizados mostrando los mayores ( $p < 0,05$ ) halos de inhibición

Para las cepas *A. denitrificans*, *L. innocua* y *S. marcescens*, ocurría lo mismo que en *A. faecalis*, es decir, en función del volumen de aceite esencial empleado, se mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ellos. La actividad inhibitoria ocurría de forma volumen dependiente. Cabe destacar que el aceite esencial de *T. mastichina* no fue activo al volumen menor (3,75  $\mu\text{L}$ ) frente a estas cepas, a excepción de *A. denitrificans*

Para *E. gergoviae* y *P. fluorescens*, en el caso de los AEs de *T. capitatus*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación con los volúmenes empleados. Mientras que para el AE de *T. mastichina*, los volúmenes de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$ , no mostraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre ellos. Para *A. hydrophila*, los AEs de *T. capitatus*, *T. mastichina* y *T. vulgaris* mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación con los volúmenes de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$ . Mientras que para *T. zygis*, no se apreciaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre estos volúmenes.

En cuanto a *P. fragi*, para el AE de *T. capitatus* no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los volúmenes de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$ . Sin embargo, en el caso de los AEs de *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sí se presentaron diferencias ( $p < 0,05$ ) en relación con los volúmenes empleados.

**Tabla 12.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cocido y el método de difusión en disco.

Bacteria	$\gamma$ V ( $\mu$ L)	Aceite esencial			
		<i>T.</i> <i>vulgaris</i>	<i>T.</i> <i>mastichina</i>	<i>T.</i> <i>capitatus</i>	<i>T.</i> <i>zygis</i>
<i>L. innocua</i>	15	17,33 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	10,71 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	27,11 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	19,44 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>
	7,5	9,33 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	26,65 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	16,79 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>
	3,75	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	23,89 $\pm$ 2,02 <sup>c</sup>	16,04 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>
<i>A. hydrophila</i>	15	14,33 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	11,41 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	14,11 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	16,63 $\pm$ 1,94 <sup>a</sup>
	7,5	12,34 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	9,26 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	13,89 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	14,38 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>
	3,75	9,20 $\pm$ 0,48 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	13,52 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	12,83 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>
<i>A. denitrificans</i>	15	13,59 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	10,14 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	14,18 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	12,83 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>
	7,5	12,11 $\pm$ 0,45 <sup>b</sup>	9,54 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	12,72 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	12,63 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
	3,75	9,84 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	9,32 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	12,31 $\pm$ 0,71 <sup>b</sup>	11,11 $\pm$ 0,06 <sup>c</sup>
<i>A. faecalis</i>	15	18,06 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	11,34 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	25,20 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	21,52 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
	7,5	17,02 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>	10,11 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	23,30 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	20,68 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
	3,75	09,79 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	20,53 $\pm$ 3,23 <sup>c</sup>	18,47 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
<i>E. amnigenus</i>	15	10,03 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	14,43 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup>	14,21 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
	7,5	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	13,29 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	13,25 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup>
	3,75	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	11,29 $\pm$ 1,43 <sup>b</sup>	10,92 $\pm$ 0,43 <sup>c</sup>
<i>E. gergoviae</i>	15	12,73 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	11,35 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	14,33 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>	14,62 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>
	7,5	12,20 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	11,30 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	12,94 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>	13,71 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
	3,75	10,57 $\pm$ 0,25 <sup>c</sup>	9,32 $\pm$ 0,50 <sup>b</sup>	11,64 $\pm$ 0,38 <sup>c</sup>	12,33 $\pm$ 0,38 <sup>c</sup>
<i>S. marcescens</i>	15	12,72 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	11,70 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	15,06 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	14,57 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
	7,5	11,30 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	9,70 $\pm$ 0,48 <sup>b</sup>	14,25 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	13,52 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>
	3,75	9,38 $\pm$ 0,39 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	11,93 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	12,41 $\pm$ 1,19 <sup>b</sup>
<i>S. putrefaciens</i>	15	11,11 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	13,66 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	12,34 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>
	7,5	10,93 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	13,08 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	11,72 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>
	3,75	9,12 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	12,77 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	11,33 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>
<i>P. fragi</i>	15	13,16 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	11,53 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	14,45 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	16,00 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
	7,5	12,11 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	9,90 $\pm$ 1,22 <sup>b</sup>	13,99 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	15,38 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>
	3,75	10,15 $\pm$ 0,75 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup>	13,15 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	14,58 $\pm$ 0,59 <sup>c</sup>
<i>P. fluorescens</i>	15	12,72 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	10,36 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	16,85 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	15,21 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>
	7,5	11,01 $\pm$ 1,20 <sup>b</sup>	10,11 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	14,31 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	14,42 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>
	3,75	9,48 $\pm$ 0,40 <sup>c</sup>	9,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>	12,26 $\pm$ 0,97 <sup>c</sup>	13,30 $\pm$ 0,23 <sup>c</sup>

Valores expresados como: Diámetro del halo de inhibición (mm) incluyendo el diámetro del disco de 9 mm. Para una misma bacteria. Valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) según el test de Rangos múltiples de Tukey.

Finalmente, las cepas *E. amnigenus* y *S. putrefaciens* se comportaron de igual manera para los AEs de *T. capitatus* y *T. mastichina*, no mostrando diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los volúmenes de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$  del AE de *T. capitatus*. En cuanto al AE de *T. mastichina*, no hubo actividad inhibitoria, frente a estas cepas, en ninguno de los volúmenes empleados.

En la Tabla 13 se observa la actividad antibacteriana de los AEs de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, en función de distintos volúmenes, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto cárnico crudo-curado. Como en los casos anteriores, no todos los AEs estudiados presentaron actividad inhibitoria del crecimiento frente a las cepas analizadas. En este caso, cabe destacar, que todos los AEs analizados mostraron los mayores halos de inhibición frente a la cepa *A. hydrophila*. Para los AEs de *T. capitatus*, *T. vulgaris* y *T. zygis* se apreciaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en función del volumen empleado.

La cepa *S. marcescens* tuvo el mismo comportamiento que *A. hydrophila* para los AEs de *T. vulgaris* y *T. zygis*, mientras que para los AEs de *T. capitatus* y *T. mastichina*, no se presentaron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los volúmenes de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$ . Las cepas *L. innocua*, *S. putrefaciens* y las Pseudomonas (*P. fragi* y *P. fluorescens*) mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación con los volúmenes empleados.

Para *A. faecalis* y *E. amnigenus* se comportaron de una forma similar, los aceites esenciales de *T. capitatus* y *T. zygis* que no mostraron actividad inhibitoria en ninguno de los tres volúmenes empleados (15, 7,5, 3,75  $\mu\text{L}$ ). Mientras que para los AEs de *T. mastichina* y *T. vulgaris* se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en relación con los volúmenes empleados.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos para la cepa *A. denitrificans* en el caso de los AEs de *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación con los volúmenes empleados de 15 y 7,5  $\mu\text{L}$ . Sin embargo el AE de *T. capitatus* no mostró diferencias ( $p > 0,05$ ) entre dichos volúmenes.

Para finalizar, la cepa *E. gergoviae* no presentó actividad inhibitoria frente a ninguno de los cuatro aceites esenciales analizados y en ninguno de los tres volúmenes empleados.

**Tabla 13.** Actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, sobre las distintas cepas bacterianas, empleando como medio de cultivo un extracto crudo-curado y el método de difusión en disco.

Bacteria	γ V (μL)	Aceite esencial			
		<i>T. vulgaris</i>	<i>T. mastichina</i>	<i>T. capitatus</i>	<i>T. zygis</i>
<i>L. innocua</i>	15	19,71±2,00 <sup>a</sup>	14,36±2,66 <sup>a</sup>	38,59±1,37 <sup>a</sup>	41,17±0,68 <sup>a</sup>
	7,5	12,78±0,48 <sup>b</sup>	11,42±0,99 <sup>b</sup>	33,31±0,76 <sup>b</sup>	36,54±0,39 <sup>b</sup>
	3,75	11,42±0,92 <sup>c</sup>	9,94±0,91 <sup>b</sup>	31,55±1,56 <sup>c</sup>	32,84±0,60 <sup>c</sup>
<i>A. hydrophila</i>	15	28,90±1,29 <sup>a</sup>	23,98±0,31 <sup>a</sup>	37,61±0,95 <sup>a</sup>	38,77±0,59 <sup>a</sup>
	7,5	25,68±0,12 <sup>b</sup>	23,69±0,01 <sup>a</sup>	26,42±0,23 <sup>b</sup>	36,73±0,30 <sup>b</sup>
	3,75	21,32±5,09 <sup>c</sup>	17,48±1,21 <sup>b</sup>	16,35±0,26 <sup>c</sup>	23,11±0,99 <sup>c</sup>
<i>A. denitrificans</i>	15	14,52±0,03 <sup>a</sup>	14,28±0,52 <sup>a</sup>	18,76±0,16 <sup>a</sup>	19,69±0,33 <sup>a</sup>
	7,5	12,55±0,06 <sup>b</sup>	11,07±0,02 <sup>b</sup>	17,76±1,10 <sup>a</sup>	18,62±0,80 <sup>b</sup>
	3,75	11,00±0,48 <sup>c</sup>	10,79±1,00 <sup>b</sup>	16,32±0,37 <sup>b</sup>	17,16±0,67 <sup>b</sup>
<i>A. faecalis</i>	15	14,06±2,39 <sup>a</sup>	12,89±0,75 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	7,5	10,88±0,53 <sup>b</sup>	10,14±0,37 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	3,75	09,50±0,01 <sup>c</sup>	9,50±0,00 <sup>c</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
<i>E. amnigenus</i>	15	15,81±0,59 <sup>a</sup>	11,75±0,35 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	7,5	11,82±1,32 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>c</sup>	9,00±0,00 <sup>b</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
<i>E. gergoviae</i>	15	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	7,5	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
	3,75	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>	9,00±0,00 <sup>a</sup>
<i>S. marcescens</i>	15	13,89±0,37 <sup>a</sup>	11,58±0,47 <sup>a</sup>	16,15±0,05 <sup>a</sup>	16,41±0,21 <sup>a</sup>
	7,5	13,36±0,03 <sup>b</sup>	11,22±0,03 <sup>a</sup>	16,09±0,02 <sup>a</sup>	15,92±0,40 <sup>b</sup>
	3,75	12,78±0,14 <sup>c</sup>	10,77±0,02 <sup>b</sup>	15,78±0,01 <sup>b</sup>	15,05±0,00 <sup>c</sup>
<i>S. putrefaciens</i>	15	11,85±0,06 <sup>a</sup>	13,45±0,96 <sup>a</sup>	15,03±0,07 <sup>a</sup>	15,16±0,30 <sup>a</sup>
	7,5	11,07±0,00 <sup>b</sup>	12,67±0,05 <sup>b</sup>	13,71±0,55 <sup>b</sup>	13,60±0,37 <sup>b</sup>
	3,75	10,18±0,16 <sup>c</sup>	11,40±0,12 <sup>c</sup>	12,66±0,16 <sup>c</sup>	13,50±0,50 <sup>b</sup>
<i>P. fragi</i>	15	12,92±0,01 <sup>a</sup>	12,11±0,40 <sup>a</sup>	17,01±0,04 <sup>a</sup>	16,26±0,43 <sup>a</sup>
	7,5	12,54±0,16 <sup>b</sup>	11,03±0,46 <sup>b</sup>	15,27±0,01 <sup>b</sup>	15,73±0,08 <sup>b</sup>
	3,75	10,72±0,18 <sup>c</sup>	9,71±0,64 <sup>c</sup>	13,43±0,07 <sup>c</sup>	14,72±0,47 <sup>c</sup>
<i>P. fluorescens</i>	15	11,21±0,12 <sup>a</sup>	14,46±0,32 <sup>a</sup>	18,32±0,10 <sup>a</sup>	16,09±0,75 <sup>a</sup>
	7,5	10,67±0,24 <sup>b</sup>	12,81±0,65 <sup>b</sup>	15,63±0,47 <sup>b</sup>	15,17±0,14 <sup>b</sup>
	3,75	10,48±0,04 <sup>b</sup>	10,18±0,84 <sup>c</sup>	13,75±0,94 <sup>c</sup>	12,90±0,57 <sup>c</sup>

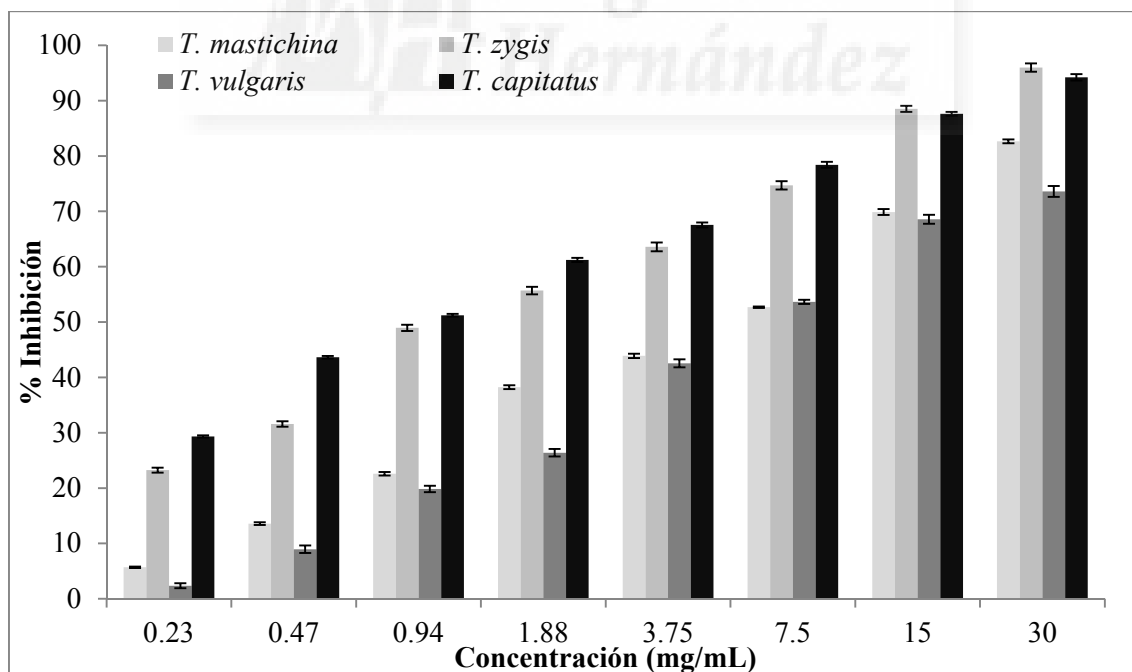
Valores expresados como: Diámetro del halo de inhibición (mm) incluyendo el diámetro del disco de 9 mm. Para una misma bacteria. Valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) según el test de Rangos múltiples de Tukey.



#### 5.4.- Actividad antioxidante de los aceites esenciales sometidos a estudio

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la actividad antioxidante de los AEs obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, procedentes de cultivo ecológico. La determinación de la actividad antioxidante *in vitro* se realizó siguiendo cuatro diferentes métodos analíticos, como son: el método del secuestro del radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH), el poder antioxidante de la reducción de hierro (FRAP), la capacidad secuestrante del radical 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) y la capacidad quelante del ion ferroso (FIC). Este trabajo se encuentra bajo revisión en la revista *Food Control*.

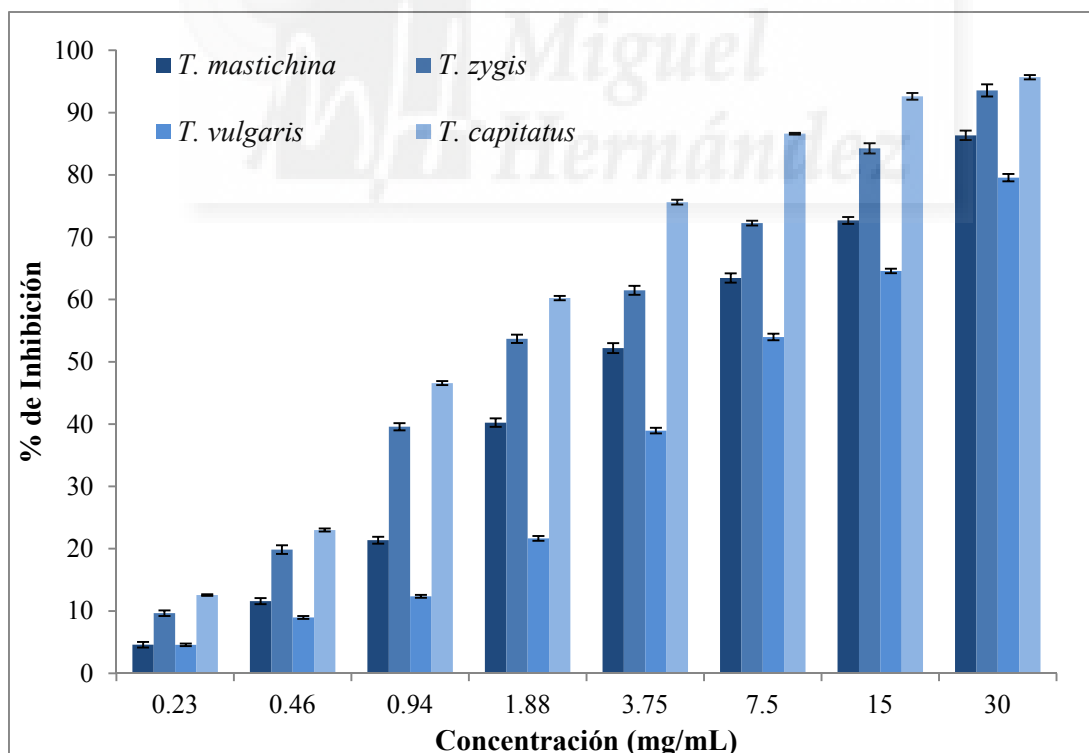
La Figura 6 muestra la actividad del secuestro de los radicales DPPH (determinada como porcentaje de inhibición de dichos radicales) por la acción de los AEs obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*. Como se observa en dicha Figura, el secuestro de los radicales DPPH se produce de forma concentración dependiente para todos los AEs analizados.



**Figura 6:** Secuestro de los radicales DPPH (determinada como porcentaje de inhibición de dichos radicales) por la acción de los AE obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, a diferentes concentraciones.

A las concentraciones más elevadas (30 y 15 mg/mL) fue el AE de *T. zygis* el que mostró una mayor actividad ( $p < 0,05$ ) secuestrante de radicales DPPH, mientras que a concentraciones inferiores a esos 15 mg/mL es el AE de *T. capitatus* el que mostró una mayor efectividad ( $p < 0,05$ ) en el secuestro de radicales. A todas las concentraciones analizadas, fue el AE de *T. vulgaris* el que mostró una menor capacidad ( $p < 0,05$ ) secuestrante. Los valores de  $IC_{50}$  (concentración de AE que inhibe el 50% del radical DPPH) de los diferentes AEs siguieron el orden siguiente: *T. capitatus* (0,60 mg/mL) < *T. zygis* (0,90 mg/mL) < *T. mastichina* (3,11 mg/mL) < *T. vulgaris* (4,05 mg/mL).

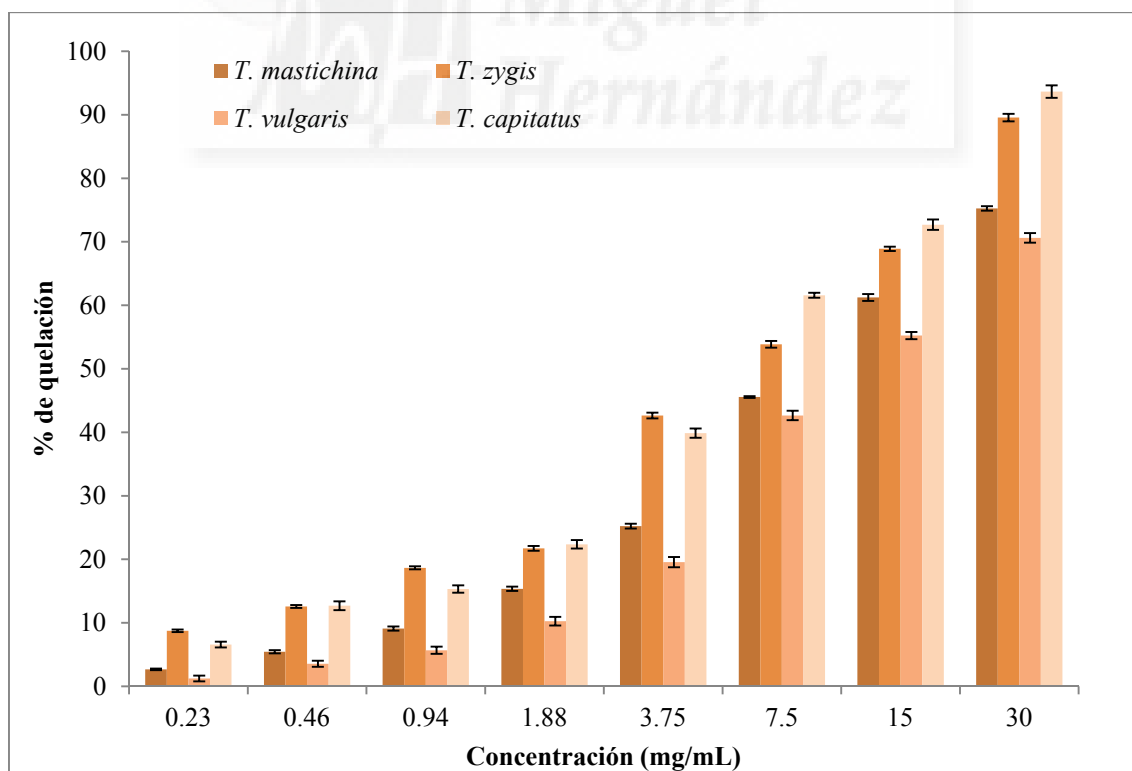
La Figura 7 muestra la actividad del secuestro de los radicales ABTS, también determinada como porcentaje de inhibición de dichos radicales, por la acción de los AE obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*. Como, ocurría en el caso del secuestro de radicales DPPH, para todos los AEs analizados el secuestro de radicales ABTS también sucede de forma dependiente de la concentración.



**Figura 7:** Secuestro de los radicales ABTS, determinada como porcentaje de inhibición de dichos radicales por la acción de los AE obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, a diferentes concentraciones.

En este caso, a todas las concentraciones analizadas, es el AE de *T. capitatus* el que mostró una mayor ( $p < 0,05$ ) efectividad del secuestro de radicales ABTS, seguido por el AE de *T. zygis*. Nuevamente, es el AE de *T. vulgaris* el que presentó una menor capacidad ( $p < 0,05$ ) secuestrante. Los valores de  $IC_{50}$  (concentración de AE que inhibe el 50% del radical ABTS) de los diferentes AEs siguieron el orden siguiente: *T. capitatus* (1,41 mg/mL) < *T. zygis* (2,07 mg/mL) < *T. mastichina* (3,73 mg/mL) < *T. vulgaris* (6,46 mg/mL).

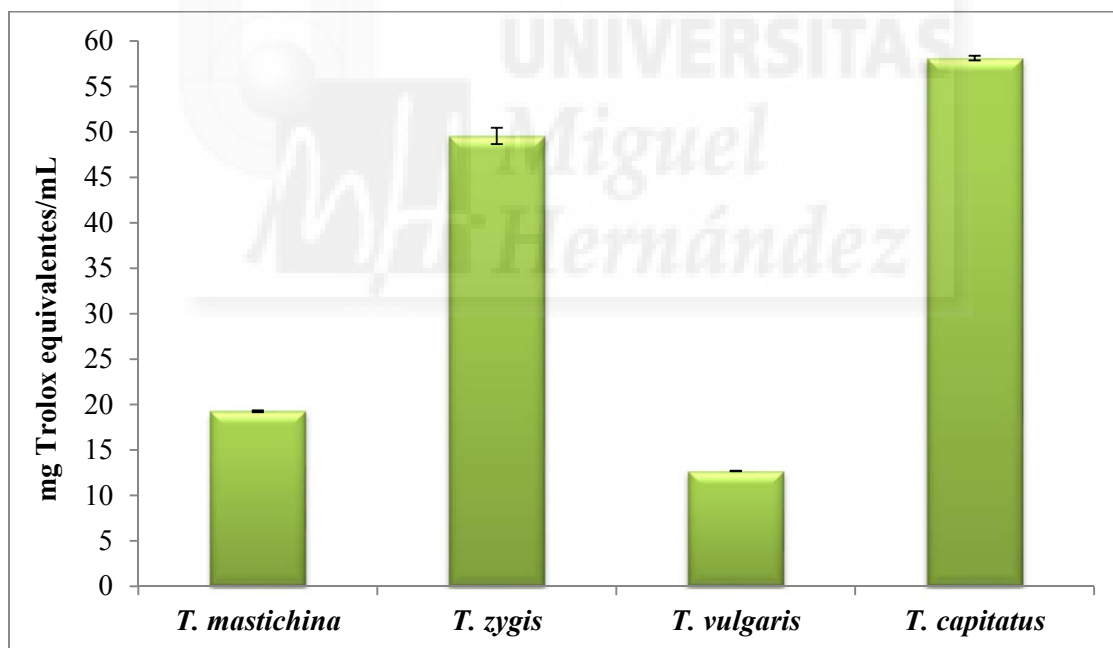
La capacidad quelante del ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ) por la acción de los AE obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis* se muestra en la Figura 8. El análisis de esta capacidad mostró que todos los AEs analizados fueron capaces de quelar el ion ferroso, y además, dicha acción se produjo de forma dependiente de la concentración. En las concentraciones más elevadas (30, 15 y 7,5 mg/mL) es el AE de *T. capitatus* el que mostró una mayor ( $p < 0,05$ ) capacidad quelante seguido por el AE de *T. zygis*, el cual presentó una mayor actividad ( $p < 0,05$ ) quelante a las concentraciones más bajas (< 7,5 mg/mL) ensayadas.



**Figura 8:** Capacidad quelante del ion ferroso, determinada como porcentaje de quelación de dichos iones por la acción de los AEs obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, a diferentes concentraciones.

Otra vez fue el AE de *T. vulgaris* el que mostró una menor capacidad ( $p < 0,05$ ) quelante del ion ferroso. Los valores de  $IC_{50}$  (concentración de AE que es capaz de quelar el 50% del ion ferroso) de los diferentes AEs siguieron el orden siguiente: *T. capitatus* (4,45 mg/mL) < *T. zygis* (4,95 mg/mL) < *T. mastichina* (9,61 mg/mL) < *T. vulgaris* (13,29 mg/mL).

La Figura 9 muestra la capacidad de reducción del ion férrico ( $Fe^{+3}$ ), en términos de concentración equivalente al Trolox, de los AEs obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*. Al igual que ocurría con los métodos anteriores, es el AE de *T. capitatus* el que mostró los valores más elevados ( $p < 0,05$ ) en la capacidad de reducir el ion férrico, seguido por el AE de *T. zygis*. Nuevamente el AE de *T. vulgaris* mostró los valores más bajos ( $p < 0,05$ ) en la capacidad de reducir el ion férrico, si se compara con los otros AE estudiados.



**Figura 9:** Capacidad de reducir el ion férrico ( $Fe^{+3}$ ) de los AEs obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, expresada como mg de Trolox equivalentes/mL de aceite esencial.

La determinación de la capacidad antioxidante que las hierbas aromáticas y las especias, así como sus derivados (fundamentalmente los aceites esenciales), ejercen en los alimentos, es un tema que actualmente está teniendo un importante auge, tanto por

parte de los investigadores como por parte de la industria agroalimentaria. No hay que olvidar que la oxidación lipídica constituye una de las principales causas de deterioro de los alimentos y se produce, tanto durante el almacenamiento de materias primas, como durante su procesado, o incluso durante el almacenamiento de los productos finales (Tepe et al., 2005c). Así, el empleo de AEs procedentes de plantas pertenecientes al género *Thymus* está ampliamente determinado. En un estudio realizado por Ruiz-Navajas, et al., (2013a) se informa que los valores de IC<sub>50</sub> para los AEs de *Thymus piperella*, medidos con los métodos DPPH y FIC fueron de 9,30 y 425 mg/mL, respectivamente mientras que para el AE de *Thymus moroderi* los valores de IC<sub>50</sub> medidos con estos mismos métodos fueron de 90 y 6 mg/mL, respectivamente. En un estudio similar Nikolic et al., (2014) mencionan que el AE de *Thymus serpyllum* muestra una alta capacidad secuestrante de radical DPPH con valores de IC<sub>50</sub> de 0.96 µg/mL, al igual que los AEs obtenidos de *T. algeriensis* (IC<sub>50</sub>: 1,64 µg/mL) y *T. vulgaris* (IC<sub>50</sub>: 4,80 µg/mL).

El mecanismo de acción que provoca esta actividad antioxidante no está todavía esclarecido. Existen diversos mecanismos de acción para dicha capacidad antioxidante: el secuestro de radicales libres, la donación de hidrógenos, la quelación de iones metálicos o incluso pueden actuar como sustrato de radicales como el superóxido o el hidroxil (Al-Mamary et al., 2002). Como ocurría en el caso de la actividad antimicrobiana, la actividad antioxidante de los aceites esenciales está relacionada con la presencia y concentración de distintos componentes en dicho aceite esencial y fundamentalmente aquellos que presentan grupos fenólicos en su estructura.

#### **5.5.- Actividad antibacteriana y antioxidante de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales sometidos a estudio.**

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la actividad antioxidante y la actividad antibacteriana de películas comestibles de quitosano adicionadas con los AEs obtenidos de *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* y *T. zygis*, de cultivo ecológico. La determinación de la actividad antioxidante *in vitro* se realizó siguiendo dos metodologías distintas, como son: el método del secuestro del radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazil (DPPH) y el poder antioxidante de la reducción de hierro (FRAP). La actividad antibacteriana se determinó frente a cuatro cepas relacionadas con el deterioro

de alimentos o indicadores del mismo, como son: *L. innocua*, *S. marcescens*, *A. faecalis* y *E. amnigenus*. Este trabajo se encuentra bajo revisión en la revista *Journal of Food Science and Technology*.

#### **5.5.1- Actividad antibacteriana de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales sometidos a estudio.**

En la Tabla 14 se recoge la actividad antibacteriana de las películas de quitosano adicionadas con distintas concentraciones (0, 1 y 2 %) de los AEs de *T. zygis* (CH+AETZ), *T. capitatus* (CH+AETC), *T. vulgaris* (CH+AETV) y *T. mastichina* (CH+AETM).

Las películas que contenían solo quitosano no fueron efectivas frente a ninguna de las cuatro cepas bacterianas analizadas. Estos resultados están en concordancia con los expuestos por Ruiz-Navajas et al. (2013b) y Wang et al. (2011), los cuales indicaron que no se apreciaban zonas de inhibición significativas para películas de quitosano puro frente a distintas cepas, como *L. innocua*, *S. marcescens*, *E. coli* y *S. aureus*.

*E. amnigenus* fue la cepa más resistente a la acción de las películas de quitosano adicionadas con los AEs procedentes de plantas del género *Thymus*, ya que a ninguna de las concentraciones ensayadas se obtuvo inhibición del crecimiento de dicha cepa.

En el caso de *S. marcescens*, la actividad antibacteriana se produjo de forma concentración dependiente. Los halos de inhibición mayores ( $p < 0,05$ ) se obtuvieron para la película formada por CH+AETM 2%, seguido por la película formada por CH+AETV 2%. Por el contrario, la película formada por CH+AETZ 1% no presentó actividad frente a esta cepa, mientras que al 2% mostró los halos de inhibición más pequeños ( $p < 0,05$ ), de todas las películas analizadas para dicha cepa.

Por lo que respecta a *L. innocua*, la actividad antibacteriana también se produjo de una manera dependiente de la concentración. Sin embargo, en este caso, fue la película formada por CH+AETC 2%, la que produjo los mayores ( $p < 0,05$ ) halos de inhibición, seguido por la película formada por CH+AETM 2%. Una vez más, la película formada por CH+AETZ 1% no presentó actividad frente a esta cepa, mientras que al 2% mostró los menores ( $p < 0,05$ ) halos de inhibición.

**Tabla 14.** Actividad antibacteriana de las películas comestibles de quitosano (CH) incorporadas con AEs de *T. zygis* (CH+AETZ), *T. capitatus* (CH+AETC), *T. vulgaris* (CH+AETV) y *T. mastichina* (CH+AETM) a diferentes concentraciones (0, 1, y 2%) frente a distintas bacterias.

Películas	Diámetro de zona de inhibición (mm) incluyendo la película (10 mm)			
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>
Control	10,00±0,00 <sup>aH</sup>	10,00±0,00 <sup>aF</sup>	10,00±0,00 <sup>aF</sup>	10,00±0,00 <sup>aA</sup>
CH+AETZ 1%	10,00±0,00 <sup>bH</sup>	10,00±0,00 <sup>bF</sup>	28,41±0,03 <sup>aC</sup>	10,00±0,00 <sup>bA</sup>
CH+AETZ 2%	12,50±0,37 <sup>cG</sup>	16,35±0,70 <sup>bE</sup>	32,12±0,83 <sup>aB</sup>	10,00±0,00 <sup>dA</sup>
CH+AETC 1%	13,19±0,24 <sup>cF</sup>	18,28±0,18 <sup>bC</sup>	31,66±0,29 <sup>aB</sup>	10,00±0,00 <sup>dA</sup>
CH+AETC 2%	19,90±0,14 <sup>cD</sup>	27,36±0,78 <sup>bA</sup>	35,08±1,20 <sup>aA</sup>	10,00±0,00 <sup>dA</sup>
CH+AETV 1%	18,49±0,05 <sup>aE</sup>	12,19±0,06 <sup>cF</sup>	14,35±0,11 <sup>bF</sup>	10,00±0,00 <sup>dA</sup>
CH+AETV 2%	26,49±0,08 <sup>aB</sup>	16,49±0,06 <sup>cE</sup>	21,23±0,18 <sup>bD</sup>	10,00±0,00 <sup>dA</sup>
CH+AETM 1%	21,15±0,04 <sup>aC</sup>	17,92±0,08 <sup>cD</sup>	18,42±0,12 <sup>bE</sup>	10,00±0,00 <sup>dA</sup>
CH+AETM 2%	32,36±0,05 <sup>aA</sup>	25,51±0,04 <sup>cB</sup>	28,29±0,04 <sup>bC</sup>	10,00±0,00 <sup>dA</sup>

Para un mismo aceite esencial, los valores seguidos por la misma letra minúscula no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), según el test de rangos múltiples de Tukey.

Para una misma bacteria, los valores seguidos por la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), según el test de rangos múltiples de Tukey.

Con referencia a *A. faecalis*, todos las películas de quitosano adicionadas con los AEs objeto de estudio, a todas las concentraciones, fueron capaces de producir efectos inhibitorios del crecimiento; siendo estos efectos, como en los casos anteriores, dependientes de la concentración. De nuevo, la película formada por CH+AETC 2%, provocó los mayores halos ( $p < 0,05$ ) de inhibición, seguidos en este caso por la película formada por CH+AETZ 2%. La película formada por CH+AETV 2% mostró los halos de inhibición más bajos ( $p < 0,05$ ) para esta bacteria.

En la literatura científica no hay estudios previos que nos permitan comparar los resultados de la actividad antibacteriana de las películas comestibles de quitosano incorporadas con AEs procedentes de cultivos ecológicos. Sin embargo, la actividad antibacteriana de las películas de quitosano añadidas con AEs de distintas especies del

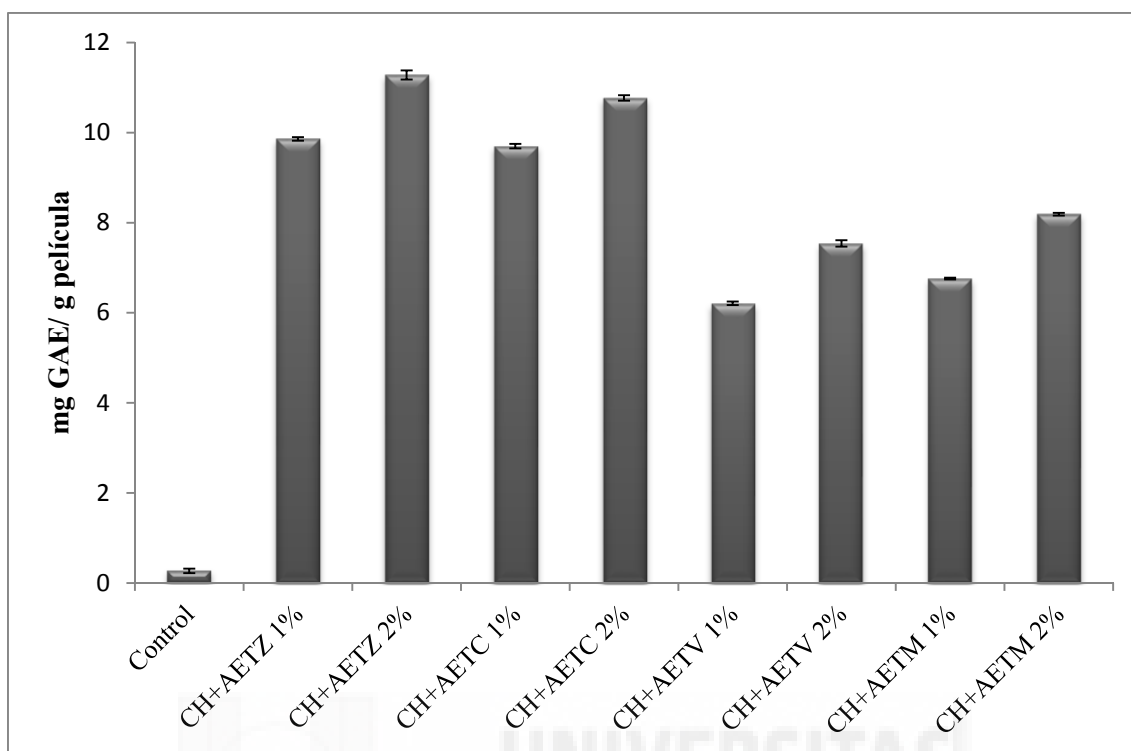
género *Thymus*, procedentes de cultivos convencionales, sí que han sido analizadas. Así, Hosseini et al. (2008), analizaron los efectos antibacterianos de AEs de *Thymus* incorporados en películas comestibles de quitosano en concentraciones de 0,5; 1 y 1,5 %. Estos investigadores informaron que las películas de quitosano a las que se les incorporaban los AEs de tomillo, producían una gran zona de inhibición frente a *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis* y *P. aeruginosa*. En otro estudio, Gómez-Estaca et al. (2010), analizaron películas de quitosano preparadas con AEs de *T. vulgaris*. Estos autores concluyeron que las películas que contienen quitosano y AE muestran una actividad antibacteriana significativa frente a *Photobacterium phosphoreum* y *Clostridium perfringens*, y una actividad moderada frente a *S. aureus* y *B. cereus*.

#### **5.5.2- Actividad antioxidante de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales sometidos a estudio.**

El contenido en fenoles totales (TPC) de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales de *T. zygis* (AETZ), *T. capitatus* (AETC), *T. vulgaris* (AETV) y *T. mastichina* (AETM), a diferentes concentraciones, se muestran en la Figura 10. La película elaborada solo con quitosano (muestra control) mostró un TPC de 0,27 mg GAE/g película. Este resultado es concordante con los expuestos por Ruiz-Navajas et al. (2013b) y Moradi et al. (2012) y puede ser explicado por la formación de cromógenos, debido a la reacción del reactivo Folin y Ciocalteu con componentes de naturaleza no fenólica, pero con capacidad reductora.

Los resultados obtenidos mostraron que el contenido en TPC en las películas de quitosano aumentaba significativamente ( $p < 0,05$ ) a medida que aumentaba la concentración de AE adicionado. De este modo, a la concentración más alta ensayada (2%), fue la película formada por CH+ AETZ la que mostró un mayor TPC, seguido por la película formada por CH+AETC. Sin embargo, a la concentración más baja (1%), no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las películas formadas por CH+AETZ y CH+AETC.





**Figura 10:** Contenido en fenoles totales (TPC) de las películas de quitosano adicionadas con los aceites esenciales de *T. zygis* (AETZ), *T. capitatus* (AETC), *T. vulgaris* (AETV) y *T. mastichina* (AETM), a diferentes concentraciones.

Para determinar la actividad antioxidante, *in vitro*, de las películas de quitosano adicionadas, a distintas concentraciones, con AEs de *T. zygis* (AETZ), *T. capitatus* (AETC), *T. vulgaris* (AETV) y *T. mastichina* (AETM) se emplearon dos metodologías distintas, como son, la capacidad secuestrante del radical DPPH y la capacidad reductora del ion férrico (FRAP). La adición de AE a las películas de quitosano mejoraba de forma considerable las propiedades antioxidantes de dichas películas, comparadas con la muestra elaborada solo con quitosano. Además, esta mejora se producía en función del AE empleado. Cuando se determinó la actividad antioxidante empleando el método DPPH (Tabla 15), los resultados mostraron que, la capacidad secuestrante de radicales producida por las películas de quitosano adicionadas con los AEs sometidos a estudio, se producía de forma concentración dependiente. Las películas formadas con CH+AETZ 2% mostraron la mayor ( $p < 0,05$ ) actividad secuestrante, seguido por las películas formadas con CH+AETC 2%. Mientras que las películas formadas con CH+AETV mostraron los valores más bajos ( $p < 0,05$ ). A bajas concentraciones de AE adicionado (1%) no se encontraron diferencias significativas

( $p > 0,05$ ) entre las películas formadas con CH+AETZ y las películas formadas con CH+AETC, ni entre las películas formadas con CH+AETC y las películas formadas con CH+AETM. Nuevamente, las películas formadas con CH+AETV mostraron los valores más bajos ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 15 se muestra la capacidad de reducción del ion férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) de las películas de quitosano adicionadas con los AEs sometidos a estudio. En este caso, nuevamente la actividad antioxidante se produjo de forma concentración dependiente. Como ocurría en el caso del análisis con el método DPPH, la muestra control mostró una leve capacidad para reducir el hierro férrico a ferroso (0,08 mg TE/g película). Como se observa en la Tabla 15, a altas concentraciones (2%), las películas formadas por CH+AETC mostraron la mayor capacidad para reducir el hierro férrico a ferroso, seguido de las películas formadas por CH+AETM; mientras que las películas formadas por CH+AETV mostraron la capacidad más baja ( $p < 0,05$ ) de reducir el ion férrico.

**Tabla 15.** Actividad antioxidante de películas comestibles de quitosano incorporadas con AEs ecológicos de *T. zygis* (CH+AETZ) *T. capitatus* (CH+AETC), *T. vulgaris* (CH+AETV) y *T. mastichina* (CH+AETM) a diferentes concentraciones por medio de dos métodos antioxidantes diferentes: secuestro del radical DPPH y capacidad reductora del ion férrico (FRAP)

	DPPH (mg TE/g)	FRAP (mg TE/g)
Control	0,01±0,00 <sup>H</sup>	0,08±0,01 <sup>H</sup>
CH+AETZ 1%	0,35±0,02 <sup>bE</sup>	2,13±0,10 <sup>bEF</sup>
CH+AETZ 2%	0,55±0,01 <sup>aA</sup>	3,20±0,05 <sup>aC</sup>
CH+AETC 1%	0,31±0,01 <sup>bEF</sup>	2,06±0,07 <sup>bF</sup>
CH+AETC 2%	0,48±0,01 <sup>aB</sup>	4,70±0,10 <sup>aA</sup>
CH+AETV 1%	0,26±0,01 <sup>bG</sup>	1,98±0,03 <sup>bG</sup>
CH+AETV 2%	0,39±0,01 <sup>aD</sup>	2,95±0,02 <sup>aD</sup>
CH+AETM 1%	0,29±0,01 <sup>bF</sup>	2,21±0,01 <sup>bE</sup>
CH+AETM 2%	0,44±0,01 <sup>aC</sup>	3,99±0,01 <sup>aB</sup>

Valores expresados como mg de equivalente de Trolox (TE)/ g película.

Para un mismo aceite esencial, los valores seguidos por la misma letra minúscula no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), según el test de rango múltiple de Tukey.

Para un mismo ensayo antioxidante, los valores seguidos por la misma letra mayúscula no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), según el test de rango múltiple de Tukey.

Sin embargo, a bajas concentraciones (1%), no se apreciaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las películas formadas por CH+AETC y las películas formadas por CH+AETZ, ni entre las películas formadas por CH+AETZ y las películas formadas por CH+AETM.

Esta actividad antioxidante mostrada por las películas de quitosano adicionadas con los AEs sometidos a estudio podría estar relacionada con la presencia, en dichas películas, de componentes bioactivos, tales como ácidos fenólicos y terpenoides, provenientes de los AEs (Ruiz-Navajas et al., 2013b). Así, estos compuestos, presentes en la composición química de los AEs, están fuertemente asociados con su función antioxidante, principalmente debida a las propiedades reductoras ejercidas siguiendo distintos mecanismos de acción, como son: el secuestro de radicales libres, la capacidad de donar hidrógenos, la capacidad quelante de metales de transición, entre otros (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2006). De igual modo, la actividad antioxidante podría estar correlacionada con el contenido en fenoles totales. Varios estudios establecieron las relaciones entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante, siendo muchos los autores que reportaron una alta correlación entre el contenido total de fenoles y las propiedades antioxidantes (Viuda-Martos et al., 2010b; Wang et al., 2016). En este trabajo se obtuvo una correlación significativa entre TPC y capacidad antioxidante de las películas comestibles de quitosano a los que se le incorporaron los AEs sometidos a estudio. Así los niveles de correlación entre TPC-DPPH y TPC-FRAP fueron  $r = 0,945$  y  $r = 0,832$ , respectivamente.



## **VI. CONCLUSIONES**

---

## 6.- CONCLUSIONES

1. Los aceites esenciales obtenidos de plantas pertenecientes al género *Thymus* (*Thymus capitatus*, *Thymus zygis*, *Thymus mastichina* y *Thymus vulgaris*), procedentes de cultivo ecológico, presentan una gran variabilidad en la composición química, no existiendo diferencias de composición con los aceites esenciales procedentes de plantas cultivadas de forma convencional o los aceites esenciales obtenidos de plantas silvestres descritos en la literatura científica.
2. Los aceites esenciales analizados muestran una considerable actividad antibacteriana con el método de difusión en disco. Al máximo volumen ensayado (30 µL) los aceites esenciales de *Thymus capitatus* y *Thymus zygis* son efectivos sobre las diez cepas analizadas (*Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Achromobacter denitrificans*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter gergoviae* y *Alcaligenes faecalis*), mientras que los aceites esenciales de *Thymus mastichina* y *Thymus vulgaris* mostraron efectos de inhibición del crecimiento bacteriano frente a ocho (*Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fragi*, *Aeromonas hydrophila*, *Achromobacter denitrificans*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter gergoviae* y *Alcaligenes faecalis*) y siete (*Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Achromobacter denitrificans*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter gergoviae* y *Alcaligenes faecalis*) cepas de las diez analizadas, respectivamente. Son los aceites de *Thymus capitatus* y *Thymus zygis* los que presentan una mayor actividad antibacteriana (mayores halos de inhibición).
3. Cuando se analiza el efecto del volumen de aceite esencial utilizado, los aceites esenciales de *Thymus capitatus* y *Thymus zygis* son efectivos, a todas las concentraciones, sobre cinco (*Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Achromobacter denitrificans* y *Alcaligenes faecalis*) y seis cepas (*Listeria innocua*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Achromobacter denitrificans*, *Enterobacter amnigenus*, y *Alcaligenes faecalis*) de las diez analizadas, respectivamente.

4. La determinación de la actividad antibacteriana empleando el método de microdilución revela que los aceites esenciales de *Thymus capitatus*, *Thymus zygis*, *Thymus mastichina* y *Thymus vulgaris* son capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias ensayadas a concentraciones comprendidas entre 1,87 y 7,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .
5. Los aceites esenciales analizados muestran una considerable actividad antibacteriana cuando se ensayan en medios de cultivo con diferentes extractos cárnicos. Al máximo volumen ensayado (30  $\mu\text{L}$ ) todos los aceites esenciales analizados son efectivos frente a todas las cepas, en los medios de cultivo en los que se emplea un extracto cárnico fresco o cocido. Son los aceites de *Thymus capitatus* y *Thymus zygis* los que muestran los mayores halos de inhibición en todos los medios de cultivo en los que se emplean extractos cárnicos.
6. Cuando se analiza el efecto del volumen de aceite esencial, sobre su actividad antibacteriana cuando se utilizan, como medios de cultivo, diferentes extractos cárnicos, son los aceites esenciales de *Thymus capitatus* y *Thymus zygis*, los que muestran efecto inhibitor del crecimiento bacteriano, sobre las cepas sensibles a la máxima concentración, a todas las concentraciones ensayadas y en todos los medios de cultivo elaborados con distintos extractos cárnicos.
7. Los aceites esenciales de *Thymus capitatus*, *Thymus zygis*, *Thymus mastichina* y *Thymus vulgaris* presentan una importante actividad antioxidante con cualquiera de los cuatro métodos utilizados. Es el aceite esencial de *Thymus capitatus* el que muestra una mayor capacidad de secuestrar radicales, una mayor capacidad de reducir el ion férrico y una mayor capacidad de quelar metales de transición.
8. La aplicación de los aceites esenciales de *Thymus capitatus*, *Thymus zygis*, *Thymus mastichina* y *Thymus vulgaris* a películas de quitosano incrementa su actividad antioxidante de las películas, la cual se produce de forma concentración-dependiente. Son las películas adicionadas con los aceites esenciales de *Thymus capitatus* y *Thymus zygis* las que muestran mayor actividad antioxidante, con cualquiera de los dos métodos antioxidantes ensayados.
9. La aplicación de los aceites esenciales de *Thymus capitatus*, *Thymus zygis*, *Thymus*

*mastichina* y *Thymus vulgaris* a películas de quitosano, incrementa su actividad antibacteriana. Nuevamente son las películas adicionadas con los aceites esenciales de *Thymus capitatus* y *Thymus zygis* las que muestran la mayor actividad.

10. Los aceites esenciales de las 4 especies de *Thymus* estudiadas, procedentes de cultivo ecológico, podrían usarse como conservantes en la elaboración de alimentos ecológicos por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Teniendo en cuenta ambas propiedades, los aceites esenciales de *Thymus zygis* y *Thymus capitatus* son los más efectivos (presentan una mayor actividad antioxidante y antibacteriana). Dichas propiedades las manifiestan, no solo cuando se utilizan de forma aislada, sino incluso cuando se incorporan como compuestos activos a películas de quitosano.





## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---



## 7.-BIBLIOGRAFÍA

- Abate, G., Mshana, R.N., Miörner, H. (1998). Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rimampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2, 1011–1016.
- Afifi, A. A., Azen, S. P. (1979). Statistical analysis. A computer assisted approach (2nded.). London: Academic Press Inc.
- Agulló, E., Rodríguez, M.S., Ramos, V., Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience*, 3, 521-530.
- Ali, I.B.E., Chaouachi, M., Bahri, R., Chaieb, I., Boussaïd, M., Harzallah-Skhiri, F. (2015). Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. Et Reut. *Industrial Crops and Products*, 77, 631-639.
- Al-Mamary, M., Al-Meerri, A., Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22, 1041-1047.
- Altioik, D., Altioik, E. Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 2227-2236.
- Alves-Silva, J.M., Dias dos Santos, S.M., Pintado, M.E., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, 32, 371-378.
- Angienda, P.O., Onyango, D.M., Hill, D.J. (2010). Potential application of plant essential oils at sub-lethal concentrations under extrinsic conditions that enhance their antimicrobial effectiveness against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 4, 1678-1684.
- Arques, J.L., Rodriguez, E., Nuñez, M., Medina, M. (2008). Inactivation of gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology*, 227, 77-82.
- Arvanitoyannis, I., Kolokuris, I., Nakayama, A., Yamamoto, N., Aiba, S.I. (1997). Physico-chemical studies of chitosan-poly (vinyl alcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose. *Carbohydrate Polymers*, 34, 9-19.
- Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evid. Based Compl. Altern. Med.*, <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep187>.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- Baser, K.H.C., Demirci, F. (2007). Chemistry of essential oils. In: Berger, R.G. (Ed.), *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer, Berlin, Germany, pp. 43-86.
- Ben Arfa, A., Preziosi-Belloy, L., Chalier, P., Gontard, N. (2007). Antimicrobial paper based on a soy protein isolate or modified starch coating including carvacrol and cinnamaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2155-2162.

- Bhale, S., No, H.K., Prinyawiwatkul, W., Farr, A.J., Nadarajah, K., Meyers, S.P. (2003). Chitosan coating improves shelf life of eggs. *Journal of Food Science*, 68 (7), 2378-2383.
- Bhaskara, M.V., J. Arul, P. Angers and L. Couture. (1999). Chitosan Treatment of Wheat Seeds Induces Resistance to *Fusarium graminearum* and Improves Seed Quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47: 208-1216.
- Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M., Baltic, M.Z. (2015). Antimicrobial activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. *Procedia Food Science*, 5, 18-21.
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro, L., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa, M.M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry* 105, 146-155.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Segunda Edición. Acribia. Zaragoza.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Burt, S.A., Der Zee, R.V., Koets, A.P., De Graaff, A.M., Van Knapen, F., Gaastra, W., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E. (2007). Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4484-4490.
- Cadet, J., Wagner, J.R. (2014). Oxidatively generated base damage to cellular DNA by hydroxyl radical and one-electron oxidants: Similarities and differences. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 557, 47-54.
- Carović-Stanko, K., Orlic, S., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M., Satovic, Z. (2010). Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chemistry* 119, 196-201.
- Carrillo-Hormaza, L., Mora, C., Alvarez, R., Alzate, F., Osorio, E. (2015). Chemical composition and antibacterial activity against *Enterobacter cloacae* of essential oils from *Asteraceae* species growing in the Páramos of Colombia. *Industrial Crops and Products*, 77, 108-115.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 50-62.
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analges of Biochemistry*, 40, 450-458.
- Castro, P. (2000). Propiedades de la quitina y el quitosano. Periodismo de Ciencia y Tecnología. México.
- Çetin, B., C, akmak, i, S., C, akmak, i, R. (2011). The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35, 145-154.

- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M.D., Hoemann, C.D., Leroux, J.C., Atkinson, B.L., Binette, F., Selmani, A. (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gel in situ. *Biomaterials*, 21, 2155-2161.
- Ciocan, I.D., Bara, I. (2007). Plant products as antimicrobial agents. Universitatii Ale S, tiint, ifice Analele Alexandru Ioan Cuza. Tom VIII
- Czarnecka, A.M., Golik, P., Bartnik, E. (2006). Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. *Journal Applied Genetics*, 47, 67-78.
- Daglia, M. (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 174-181.
- Damechki M., Sotiropoulou S., Tsimidou M. (2001). Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils. *Grasas y Aceites*, 52: 207-213
- Danh, L.T., Triet, N.D.A., Han, L.T.N., Zhao, J., Mammucari, R., Foster, N. (2012). Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, 70, 27-34.
- De Lisi, A., Tedone, L., Montesano, V., Sarli, G., Negro, D. (2011). Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. *Food Chemistry* 125, 1284-1286.
- De Martino, L., Bruno, M., Formisano, C., De Feo, V., Napolitano, F., Rosselli, S., et al. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Thymus* growing wild in southern Italy. *Molecules*, 14, 4614-4624.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J., Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science*. 38(4), 299-313.
- Díaz-Maroto, M.C., Pérez Coello, M.S., González-Viñas, M.A., Cabezudo, M.D. (2002). Flavour components of Mediterranean spices. *Research Advances in Food Science*, 31, 101-120.
- Djabou, N., Lorenzi, V., Guinoiseau, E., Andreani, S., Giuliani, M.C., Desjobert, J.M., Bolla, J.M., Costa, J., Berti, L., Luciani, A., Muselli, A. (2013). Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxin-producing pathogens. *Food Control* 30, 354-363.
- Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., Roncalés, P. (2011). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* 22, 1046-1053.
- Donato, R., Santomauro, F., Bilia, A.R., Flamini, G., Sacco, C. (2015). Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some food borne pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1251-1254.
- Dudai, N., Weinstein, Y., Krup, M., Rabinski, T., Ofir, R. (2005). Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Medica*, 71, 484-488.
- Edris, A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21, 308-323.
- El Bouzidi, L., Jamali, C.A., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Industrial Crops and Products*, 43, 450-456.

- Espino-Díaz, M., Ornelas-Paz, J., Martínez-Téllez, M.A, Santillán, C., Barbosa-Cánovas, G.V., Zamudio-Flores, P.B., Olivas, G.I. (2010). Development and characterization of edible films based on mucilage of *opuntiaficus-indica* (L.). *Journal of Food Science*, 75(6), 347-352
- EUR-Lex, (2016). [http://ec.europa.eu/agriculture/organic/eu-policy/european-action-plan/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/organic/eu-policy/european-action-plan/index_en.htm) Fecha de acceso 16-02-2016.
- Fajardo, P., Martins, J.T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101, 349-356.
- Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., Pérez-Alvarez, J.A. (2007). Orange fibre as potential functional ingredient for dry-cured sausages. *European Food Research and Technology*, 226(1-2), 1-6.
- Fernández-Pan, I., Armendariz, A., Mate, J.I. (2010). Aumento de la vida útil de pechuga de pollo mediante el empleo de recubrimientos comestibles activos. Actas del VI Congreso español de ingeniería de alimentos. ISBN: 978-84-7359-654-1.
- Fernández-Pan, I., Maté-Caballero, J.G. (2011). Recubrimientos comestibles antimicrobianos para el aumento de la seguridad y vida comercial de productos cárnicos. *Eurocarne*, 197, 46-55.
- FiBL and IFOAM, (2015). Organics International. Research Institute of Organic Agriculture
- Fisher, K., Phillips C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Food Science and Technology*, 19 (3): 156-164.
- Gende, L.B., Maggi, M., van Baren, C., di Leo Lira, A., Bandoni, A., Fritz, R., Eguaras, M. (2010). Antimicrobial and miticide activities of Eucalyptus globulus essential oils obtained from different Argentine regions. Spanish. *Journal of Agricultural Research*, 8, 642-650.
- Gilles, M., Zhao, J., An, M., Agboola, S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry* 119, 731-737.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*, 27, 889-896.
- Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Cavaleiro, C., Lopes, M.C., Salgueiro, L. (2010). Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *Sylvestris*. *Industrial Crops and Products*, 32, 70-75.
- Gyawali, R., Ibrahim, S.A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.
- Haig, T. (2008). Allelochemicals in plants. En *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer New York, pp. 63-104.
- Hamid, A.A., Aiyelaagbe, O.O., Usman, L.A. (2011). Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. *International Journal of Current Research*, 33, 86-98.
- Hernández, H., Águila, E., Flores, O., Viveros, E.L., Ramos, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío*, 22(3), 57-60.

- Hirano, S. (1987). Chitin and chitosan for use as novel biomedical materials, in *Advances in Biomedical Polymers*, L.G. Gebelein, Editor., (Plenum: New York).
- Holley, R., Gill, A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 5750-5755.
- Holley, R., Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22 (4): 273-292.
- Hosseini, M.H., Razavi, S.H., Mousavi, S.M.A., Yasaghi, S.A.S.Y., Hasansaraei, A. G. (2008). Improving Antibacterial Activity of Edible Films Based on Chitosan by Incorporating Thyme and Clove Essential Oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences*, 8, 2895-2900.
- Hounda, J.B.F., Jazet, P.M.D., Lazar, G., Răducanu, D., Caraman, I., Bassene, E., Boyom, F.F., Lazar, I.M. (2016). Spectral and chemometric analyses reveal antioxidant properties of essential oils from four Cameroonian Ocimum. *Industrial Crops and Products*, 80, 101-108.
- Ibraliu, A., Mi, X., Risti, M., Dajic Stefanovic, Z., Shehu, J. (2011). Analysis of essential oils of three wild medicinal plants in Albania. *Journal of Medicinal Plants Research* 51, 58-62.
- Isman, M.B., Wilson, J.A., Bradbury, R. (2008). Insecticidal activities of commercial rosemary oils (*Rosmarinus officinalis*) against larvae of *Pseudaletia unipuncta* and *Trichoplusia ni*. in relation to their chemical compositions. *Pharmaceutical Biology*, 46, 82-87.
- Jamali, C.A., Kasrati, A., Bekkouche, K., Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D., Abbad, A. (2013). Phenological changes to the chemical composition and biological activity of the essential oil from Moroccan endemic thyme (*Thymus maroccanus* Ball). *Industrial Crops and Products*, 49, 366-372.
- Jeon, Y.J., Kamil, J.Y.V.A., Shahidi, F. (2002). Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5167-5178.
- Kacaniova, M., Vukovic, N., Hleba, L., Bobkova, A., Pavelkova, A., Rovna, K., Arpasova, H. (2012). Antimicrobial and antiradicals activity of *Origanum vulgare* L. and *Thymus vulgaris* essential oils. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2 (1), 263-271.
- Kaefer, C.M., Milner, J.A., (2008). The role of herbs and spices in cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 347-361.
- Kalemba, D., Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10 (10): 813-829.
- Karbowiak, T., Debeaufort, F., Voilley, A. (2007). Influence of thermal process on structure and functional properties of emulsion-based edible films. *Food Hydrocolloids*, 21, 879-888.
- Kathiravan, M.K., Salake, A.B., Chothe, A.S., Dudhe, P.B., Watode, R.P., Mukta, M.S., Gadhwe, S., (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20, 5678-5698.
- Khouya, T., Ramchoun, M., Hmidani, A., Amrani, S., Harnafi, H., Benlyas, M., Younes Filali Zegzouti, Y.F., Alem, C. (2015). Anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant effects of aqueous extracts from Moroccan thyme varieties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(8), 636-644

- Koch, C., Reichling, J., Schneele, J., Schnitzler, P. (2008). Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine*, 15(1-2), 71-78.
- Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. *Omega*. Barcelona
- Kulikov, S., Chirkov, S., Lopatin, S., Varlamov, V. (2006). Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 200-203.
- Kumar, G.P., Navya, K., Ramya, E.M., Venkataramana, M., Anand, T., Anilakumar, K.R. (2013). DNA damage protecting and free radical scavenging properties of Terminalia arjuna bark in PC-12 cells and plasmid DNA. *Free Radicals and Antioxidants*, 3, 35-39.
- Lai, P., Roy, J. (2004). Antimicrobial and chemo preventive properties of herbs and spices. *Current Medicinal Chemistry*, 11(11), 1451-1460
- Lárez Velásquez, C. (2006). *Avances en Química*, 1, 15.
- Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., de la Caba, K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, 116, 889-899.
- Leite, A. V., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., Marostica, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2277-2283
- Li, Z., Yubao, L., Yi, Z., Lan, W., Jansen, J. (2010). *In vitro* and *in vivo* evaluation on the bioactivity of ZnO containing nano-hydroxyapatite/chitosan cement. *Journal of Biomedical Material Research A*, 93, 269-279.
- Lim, C., Yaacob, N., Ismail, Z., Halim, A. (2010). *In vitro* biocompatibility of chitosan porous skin regenerating templates (PSRTs) using primary human skin keratinocytes. *Toxicology in Vitro*, 24, 721-727.
- Lis-Balchin, M., Deans, S.G. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 759-762.
- Liu, F., Qin, B., He, L., Song, R. (2009). Novel starch/chitosan blending membrane: antibacterial, permeable and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 78, 146-150.
- Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2006). Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 86, 477-485.
- López-Malo, A., Palou, E., Alzamora, S.M. (2005a). Naturally occurring compounds plant sources. In P.M. Davidson, J.N. Sofos, A.L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (3rd ed., pp. 429-446). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- López-Malo, A., Palou, E., León-Cruz, R., Alzamora, S. (2005b). Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. *Advances in Food Mycology*, 571 (4): 261- 286.
- MAGRAMA, (2016), <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/la-agricultura-ecologica/documentos-de-interes/default.aspx> Fecha de Acceso 12-02-2016.
- Majeti N.V Ravi Kumar (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.

- Majouli, K., Hlila, M.B., Hamdi, A., Flamini, G., Jannet, H.B., Kenani, A. (2016). Antioxidant activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertiacheirifolia* (L.). *Industrial Crops and Products*, 82, 23-28.
- Mancini, E., Senatore, F., Del Monte, D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., Mejdí Snoussi, M., Vincenzo De Feo, V. (2015). Article Studies on Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules*, 20, 12016-12028.
- Martucci, J.F., Gende, L.B., Neira, L.M., Ruseckaite, R.A. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products* 71, 205-213.
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13, 833-839.
- Miguel, G., Simões, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Carvalho, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry* 86, 183-188.
- Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S.M.R., Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., Hadian, M. (2012). Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT-Food Science and Technology*, 46, 477-84.
- Morales, R. (1986). Taxonomía de los géneros *Thymus* (excluida la sección Serpyllum) y *Thymbra* en la Península Ibérica. *Ruizia* 3: 1-324. Real Jardín Botánico, CSIC. Madrid.
- Morales, R. (2002). The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. *Thyme: The genus Thymus*. New York: Taylor and Francis Inc. (pp. 1-43).
- Morales, R. (2010). *Thymus* L. In: Castroviejo, S. et al. (eds.), *Flora ibérica* 12: 349-409. Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC.
- Morganti, P., Morganti, G. (2008). Chitin nanofibrils for advanced cosmeceuticals. *Clinical and Dermatology*, 26, 334-340.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Bond, G., Capelle, M., Volley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 67-89.
- Nabavi, S.F., Daglia, M., Moghaddam, A.H., Habtemariam, S., Nabavi, S.M. (2014). Curcumin and liver disease: From chemistry to medicine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(1), 62-77.
- National Institute of Standards and Technology (Nist). 2010: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>. Accessed 10. 2011.
- Nikolić, M., J. Glamočlija, I. C. F. R., Ferreira, R. C. Calhelha, Â., Fernandes, T., Marković, D., Marković, A., Giweli, M., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52, 183-190.

- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of Food Science* 72, R87-R100.
- Nowak, A., Kalembe, D., Krala, C., Piotrowska, M., Czyzowska, A. (2012). The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. *Food Microbiology* 32, 212-216.
- Nychas, G.J.E., Skandamis, P.N. (2003). Antimicrobials from herb and spices. In: Natural antimicrobials for the minima processing of foods. pp. 176-200. Roller, S. ed. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge. United Kingdom.
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., Hosseini, S.M.H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122, 161-166.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73, 236-244.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Ozdemir, M., Floros, J.D. (2008). Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*, 84, 116-123.
- Pastor, A.A., e Higuera, I. (2004). Generalidades. En: Quitina y quitosano: obtención características y aplicaciones. 1ª ed. Ed. Fondo editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. Pp. 312.
- Peniche, C., Aguilar, M.R., Aranaz, I., Mayoraga, A., Paños, I., Román, J.S., Tapia, C. (2004). Aplicaciones en ciencias de la vida. En: Quitina y quitosano: obtención características y aplicaciones. 1ª ed. Ed. Fondo editorial Pontificia Universidad Católica de Perú. Lima, Perú. Pp. 312.
- Peredo-Luna, H.A., Palou-García, E., López-Malo, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3-1, 24-32.
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A.R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M.C., Lo Nostro, A. (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 188-199.
- Prakash, B., Media, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities e potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381-391.
- Quintavalla, S., Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62, 373-380.
- Ramos-García, M. L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28 (1), 44 -57.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R., Rashmi and Kalai, V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87, (2), 137-146.



- Reichling, J., Koch, C., Stahl-Biskup, E., Sojka, C., Schnitzler, P. (2005). Virucidal activity of abeta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. *Planta Medica*, 71, 1123-1127.
- Rigby, G.W. (1936). Process for the preparation of films and filaments and products thereof. *United States Patent Office*.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.
- Ringuelet, J.A. (2013). Productos naturales vegetales. Universidad Nacional de La Plata, Primera edición, La Plata, Buenos Aires, Argentina
- Rivas-Martínez, S. (2004). Global Bioclimatics (Clasificación Bioclimática de la Tierra) (Versión 27-08-04). Phytosociological Research Center, J.M. Usandizaga, 46. E-28409 Los Negrales, Madrid. Departamento de Biología Vegetal II (Botánica). Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. E- 28040 Madrid.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D., Salerno, M. (2002). Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, 67(5), 1862-1866.
- Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordan, M.J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19, 681-687.
- Routh, M.M., Raut, J.S., Karuppaiyl, S.M., (2011). Dual properties of anticancer agents: an exploratory study on the *in vitro* anti-Candida properties of thirty drugs. *Chemotherapy*, 57, 372-380.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J. (2013a). *In vitro* antioxidant and antifungal properties of essential oils obtained from aromatic herbs endemic to the southeast of Spain. *Food Protection*, 76, 1218-1225.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., Fernández-López, J. (2013b). *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*, 30, 386-392.
- Ruiz-Navajas, Y. (2014). Caracterización de aceites esenciales de plantas aromáticas mediterráneas y su aplicación a films de quitosano para la conservación de productos cárnicos. Doctoral Thesis. Universidad Miguel Hernández de Elche. Departamento de Tecnología Agroalimentaria E.P.S.O, Orihuela (Alicante), Spain.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Barber, X., Sendra, E., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-López, J. (2015). Effect of chitosan edible films added with *Thymus moroderi* and *Thymus piperella* essential oil on shelf-life of cooked cured ham. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6493-6501.
- Russo, M., Galletti, G.C., Bocchini, P., Carnacini, A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3741-3746.

- Sadaka, F., Ngumjeu, C., Brachais, C.-H., Vroman, I., Tighzert, L., Couvercelle, J.-P., (2013). Review on antimicrobial packaging containing essential oils and their active biomolecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 350-355.
- Salmieri, S., Lacroix, M. (2006). Physicochemical properties of alginate polycaprolactone-based films containing essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 10205-10214.
- Schnitzler, P., Koch, C., Reichling, J. (2007). Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 51, 1859-1862.
- Sebti, I., Coma, V. (2002). Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. *Carbohydrate Polymers*, 49, 139-144.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), 246-265.
- Shahidi, F. (2008). Antioxidants: extraction, identification, application and efficacy measurement. *Electron Journal of Environment Agricultural and Food Chemistry*, 7, 3255-3261.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science Technology*, 10, 37-51.
- Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., Yehoshua, Y. (2013). Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 643-649.
- Silva-Weiss A., Ihl M., Sobral P.J.A., Gómez-Guillén M.C., Bifani V. (2013). Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Engineering Reviews*, 5(4), 200-216.
- Simoes, M., Bennett, R. N., Rosa, E. A. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*, 26(6), 746-757.
- Singla, A.K., Chawla, M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1047-1067.
- Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.J.E. (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science*, 13(1), 65-75.
- Skandamis, P.N., Nychas, G.J.E. (2000). Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 91, 1011-1022.
- Sobral, P., Alvarado, J., Zaritzky, N.E, Laurindo, J.B., Gómez-Guillén, C., Añón, M.C., Montero, P., Denavi, G., Molina, Ortiz, S., Mauri, A., Pinotti, A., García, M., Martino, M.N. y Carvalho, R. (2008). Films base on biopolymer from conventional and non-conventional sources, Food engineering integrated approaches. Springer Science, New York. N.Y. USA.
- Solórzano-Santos, F., Miranda-Navales, MG. (2011). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23 (0):1- 6.

- Sotomayor, J.A. (1998). Estudio sobre plantas aromáticas de los géneros *Salvia* y *Thymus*, espontáneas en el Sureste Ibérico, para su establecimiento como cultivo. Doctoral Thesis. University of Murcia. Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Murcia, Spain.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. (2013a). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products*, 43, 587-595.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. (2013b). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (11), 2707-2714.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Sokmen, A. (2005a). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp *sipelyus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp *sipelyus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering* 66, 447-454.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M. (2005b). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333-340.
- Tepe, B., Sokmen, M., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M. (2005c). Antimicrobial and antioxidative activity of essential oil and various extracts of *Cyclotrichium origanifolium* (Labill.) Manden. and Scheng. *Journal of Food Engineering* 69, 335-342.
- Tharanathan, R.N., Kittur, F.S. (2003). Chitin - The undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 61-87.
- Tikhonov, V.E., Stepanova, E.A., Babak, V.G., Yamskov, I.A., Palma-Guerrero, J., Jansson, H.B., et al. (2006). Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 64(1), 66-72.
- Valenzuela, C., Arias, J. I. (2012). Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: Una revisión. *Avances En Ciencias Veterinarias*, 27(1), 33-47.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Beest, M., De Kruijf, N., Debevere, J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science Technology*, 10 (3), 77-86.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., (2005). Método de concentración mínima de inhibición. Technical Report. *Project Recovery and Compost Management, Rehobot, Israel*, 19-21 February.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Perez-Álvarez, J.A. (2008) Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 526-531
- Viuda-Martos, M., El-Gendy, G.S.A., Sendra, E., Fernández-López, J., Razik, K.A.A., Omer, E.A., Pérez-Álvarez, J.A. (2010a). Chemical composition and antioxidant and anti-listeria activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9063-9070.

- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Sánchez-Zapata, E., Fernández-López, J., Pérez Álvarez, J. A. (2010b). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 13-19.
- Wang, L., Chen, C., Su, A., Zhang, Y., Yuan, J., Ju, X. (2016). Structural characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction from defatted adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) seed meal. *Food Chemistry*, 196, 509-517.
- Wang, L., Liu, F., Jiang, Y., Chai, Z., Li, P., Cheng, Y., Jing, H., Leng, X. (2011). Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12411-12419.
- Xing, Y.G., Xu, Q.L., Che, Z.M., Li, X.H., Li, W.T. (2011). Effects of chitosan-oil coating on blue mold disease and quality attributes of jujube fruits. *Food and Function* 2, 466-474
- Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174.
- Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., Quek, S.Y. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, 282-289.





## **VIII. PUBLICACIONES**

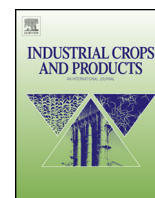
---

**Título:** Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth.

**Autores:** Carmen Ballester-Costa, Esther Sendra, Juana Fernández-López, Jose A. Pérez-Álvarez, M. Viuda-Martos

**Revista:** *Industrial Crops and Products*

**Año:** 2013



# Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth



Carmen Ballester-Costa, Esther Sendra, Juana Fernández-López, Jose A. Pérez-Álvarez, Manuel Viuda-Martos\*

IPOA Research Group (UMH-1 and REVIV-Generalitat Valenciana), AgroFood Technology Department, Escuela Politécnica Superior de Orihuela, Miguel Hernández University, Crta. Beniel km 3.2, E-03312 Orihuela, Alicante, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 5 April 2013

Received in revised form 24 July 2013

Accepted 25 July 2013

### Keywords:

Essential oil

Organic

*Thymus*

Antibacterial

Chemical composition

## ABSTRACT

In organic food industry no chemical additives can be used to prevent microbial spoilage. As a consequence, the essential oils (EOs) obtained from aromatic herbs and spices are gaining interest for their potential as preservatives. The EOs of *Thymus zygis*, *Thymus mastichina*, *Thymus capitatus* and *Thymus vulgaris* obtained from organic growth, were chemically analyzed and identified by GC and GC–MS, while the agar disk diffusion and microdilution assays were used to determine their antibacterial activity. In *T. mastichina* EO the major compound was 1,8-cineole (51.94%) whilst in *T. zygis* EO the main constituent was thymol (48.59%). *T. capitatus* EO was characterized by high content in carvacrol (69.83%). Finally, *T. vulgaris* EO had a high content of linalool (44.00%).

The agar disk diffusion assay, *T. zygis* and *T. capitatus* EOs showed inhibitory effects against the ten tested bacteria, while *T. matichina* and *T. vulgaris* had inhibitory effects against eight and seven tested bacteria, respectively. *T. zygis* and *T. capitatus* EOs had higher inhibition halos against all tested bacteria, at higher concentration (40  $\mu$ L), than *T. matichina* and *T. vulgaris* EOs. The microdilution assay, *T. mastichina* EO had a MIC values ranging between 3.75 and 7.5  $\mu$ L/mL. Whilst in the case of *T. zygis*, *T. capitatus* and *T. vulgaris* EOs the MIC values ranged between 1.87 and 7.5  $\mu$ L/mL.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Organic food is one of the fastest growing sectors of the food and agriculture industry worldwide. Retail consumer sales of organic food, including meat and poultry products, have been growing annually. Industry sources expect the trend to continue; predicting increases, in sales for meat and meat products. However, in organic food industry in general, and in meat industry in particular, no chemical additives can be used to prevent microbial spoilage. In this context, one possible solution to avoid this problem is the use of aromatic herbs or spices and especially, their derivatives such as essential oils (EOs). The EOs are gaining interest for their potential as antioxidant and antimicrobial properties provide the basis for many applications in raw and processed food preservation or pharmaceutical product (Bozin et al., 2006). Additionally, these substances have been generally recognized as safe (GRAS) and are widely accepted by consumers (Burt, 2004). In any case, organic EOs and herbs, to be sustainable for the processing of organic foods, must be obtained from certificated organic growth

production. Furthermore, the EOs could be included in the concept of the hurdle-technology (*i.e.* the application of different strategies to reduce spoilage microorganisms or pathogens *e.g.* through reduced aw or pH value) to be more effective.

EOs are complex mixtures of volatile compounds with strong odor that are synthesized in several plant organs. These substances are a group of terpenoids, sesquiterpenes and possibly diterpenes with different groups of aliphatic hydrocarbons, acids, alcohols, aldehydes, acyclic esters or lactones (Fisher and Phillips, 2006). The antibacterial activity of EOs are widely demonstrated, many *in vitro* studies reports a high efficacy of EOs against food-borne pathogens and spoilage bacteria (Viuda-Martos et al., 2011; Ruiz-Navajas et al., 2012a,b; Alves-Silva et al., 2013).

The genus *Thymus* comprising around 350 species of perennial, aromatic herbs and shrubs predominantly found in the Mediterranean region, Asia, Southern Europe and North Africa (Maksimovic et al., 2008). There are several ecotypes of thyme, which differ in their morphological characteristics and in the composition of their EOs although all are characterized by a moderate odor and sometimes a very pronounced balsamic and spicy flavor (Tedone et al., 2001). The demand for EOs from *Thymus* species is increasing for perfumery, cosmetic and medicinal uses (Hazzit et al., 2009). Additionally, thyme EO is among the world's top 10 EOs also used as

\* Corresponding author. Tel.: +34 966749737; fax: +34 966749677.

E-mail address: [mviuda@umh.es](mailto:mviuda@umh.es) (M. Viuda-Martos).

a preservative for food purposes (Ehivet et al., 2011). Four species found in the *Thymus* genus are *Thymus zygis*, *Thymus mastichina*, *Thymus capitatus* and *Thymus vulgaris* chemotype linalool. These four *Thymus* species are common in Spain and they are widely used in the food industry, mainly in meat industry. Additionally, they are widely used as culinary flavoring agents and their flavor and aroma are familiarized and widely accepted by consumers. *T. zygis*, also known as red thyme, is one of the most commercial Spanish thymes because of the economic importance that the presence of thymol has for thyme EO quality. *T. capitatus* is commonly used as a culinary spice and was reported to possess some biological effects such as antibacterial and antioxidant activities (Bounatirou et al., 2007). *T. vulgaris*, also known as Spanish common thyme, has significant antioxidant and antibacterial activities (Viuda-Martos et al., 2008). In the same way, the Iberian Peninsula endemic *T. mastichina*, showed both antimicrobial and antioxidant activities (Miguel et al., 2003).

Thus, the aims of this study were to ascertain the chemical composition and the antibacterial properties of organic essential oils of different *Thymus* species such as *T. zygis*, *T. mastichina*, *T. capitatus* and *T. vulgaris* to determine their suitability for use as certified organic food preservatives.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Essential oils

The essential oils of *T. zygis*, ref. 11961, *T. mastichina* ref. 90001-1284, *T. capitatus* ref. 95001-1150 and *T. vulgaris* ref. 80001-3577 were obtained by steam distillation from leaves, stem and flowers. All EOs analyzed were supplied by Esencias Martinez Lozano (Murcia, Spain). The EOs were organic certified by the Institute for Marketecology (IMO) according to the procedures as outlined in the USDA.

### 2.2. Essential oils analysis

#### 2.2.1. Gas chromatography analysis (GC)

The EOs were analyzed using a Shimadzu GC-17A equipped with FID detector and a TRACSIL Meta X5 column (Teknokroma S. Coop. C. Ltd, Barcelona, Spain, 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness). Injector and detector temperatures were set at 250 and 300 °C, respectively. The oven temperature was kept at 40 °C for 5 min; raised to 200 °C at 3.0 °C/min and held for 1 min; raised to 280 °C at 15 °C/min and held for 10 min. Helium was used as carrier gas, at a flow rate of 1 mL/min. Diluted samples (1/10 cyclopentane, v/v) of 0.2 μL were injected automatically in the split mode (split ratio 1/44). Quantitative data were obtained electronically from FID area data without using correction factors. All the tests were performed in triplicate.

#### 2.2.2. Gas chromatography/mass spectrometry analysis (GC-MS)

The volatile compounds were isolated, identified and quantified on a Shimadzu GC-17A gas chromatograph (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), coupled to a Shimadzu mass spectrometer detector (GC-MS QP-5050A). The GC-MS system was equipped with the same column used in the GC analysis and with the same temperature program. Analyses were carried out using helium as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min, at a split ratio of 1:10. Diluted samples (1/10 cyclopentane, v/v) of 0.2 μL of the extracts were injected. Mass spectra were obtained by electron ionization (EI) at 70 eV, using a spectral range of 45–450 m/z. Most of the compounds were identified by using 3 different analytical methods: (i) retention indices (KI), Kovats indexes in reference to n-alkanes (C<sub>8</sub>–C<sub>32</sub>), (ii) GC-MS retention times (authentic chemicals), and (iii) mass spectra (authentic chemicals and NIST05 spectral library collection) (NIST,

2010). Identification was considered tentative when it was based on only mass spectral data.

### 2.3. Microbial strains

The EOs were individually tested against several bacteria: *Listeria innocua* CECT 910, *Serratia marcescens* CECT 854, *Pseudomonas fragi* CECT 446, *Pseudomonas fluorescens* CECT 844, *Aeromonas hydrophila* CECT 5734, *Shewanella putrefaciens* CECT 5346, *Achromobacter denitrificans* CECT 449, *Enterobacter amnigenus* CECT 4078, *Enterobacter gergoviae* CECT 587, and *Alcaligenes faecalis* CECT 145. These microorganisms were chosen as they are commonly associated with refrigerated foods: as indicator of pathogenic microorganism or as spoilage microorganism. All species were supplied by the Spanish Type Culture Collection (CECT) of the University of Valencia (Spain).

### 2.4. Antimicrobial screening

#### 2.4.1. Disk-diffusion method

The antibacterial activity of EOs studied was determined by the disk diffusion method as previously described by Tepe et al. (2005) with some modifications. Petri plates were prepared by pouring 20 mL of Nutrient Agar II (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) in the case of *P. fluorescens*, *P. fragi*, *S. putrefaciens*, *S. marcescens* and *A. hydrophila*; Nutrient Agar I (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) in the case of *E. gergoviae*, *E. amnigenus*, *A. faecalis* and *A. denitrificans*; and Brain Heart Infusion agar (Sharlab, Barcelona, Spain) for *L. innocua* and allowed to solidify. Plates were dried for 30 min in a biological safety cabinet with vertical laminar flow. A suspension (0.1 mL of 10<sup>6</sup> CFU/mL) of standardized inocula was spread on the solid medium plates. The inocula were allowed to dry for 5 min. Then, sterile filter paper disks (9 mm in diameter Schindler & Schuell, Dassel, Germany) were impregnated with 30 μL of EO. The plates were left 15 min at room temperature to allow the diffusion of the EO, and then they were incubated at appropriated temperature (26–37 °C) for each bacteria during 24 h. At the end of the period, the diameter of the clear zone around the disk was measured with a caliper (Wiha dialMax<sup>®</sup> ESD-Uhrmessschieber, CH) and expressed in millimeters (disk diameter included) as its antibacterial activity. According to the width of the clear zone (diameter expressed in mm), the essential oils were appreciated as follows: not active (–) for diameter equal to or below 12.0 mm, moderately active (+) for diameter between 12.0 and 21.0 mm, active (++) for diameter between 21.0 and 30.0 mm and extremely active (+++) for diameter equal to or longer than 30.0 mm (Djabou et al., 2013). All tests were performed in triplicate.

#### 2.4.2. Determination of volume effect

The concentration effect (CE) was studied to ascertain which volume of EO had an inhibitory effect on bacterial growth in the disk diffusion assay. The culture techniques used were those described in the previous paragraph (agar disk diffusion method), but adding 30, 15, 7.5, and 3.75 μL of EO (Viuda-Martos et al., 2005). All tests were performed in triplicate.

#### 2.4.3. Microdilution assay

Antimicrobial activity was determined based on a colorimetric broth microdilution method proposed by Abate et al. (1998), with some modifications. Bacterial strains *A. hydrophila*, *P. fragi*, *A. denitrificans*, *S. marcescens* and *S. putrefaciens* were cultured 24 h at 26 °C, *A. faecalis*, *E. amnigenus* and *E. gergoviae* were cultured 24 h at 37 °C in the Nutrient Broth No. 2 (NB No. 2) (Oxoid Ltd, England) and *L. innocua* was cultured 24 h at 37 °C on Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Scharlau S.L., Spain) and adjusted to



**Table 1**  
The main constituents of *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus*, and *T. zygis* essential oils and their relative percentages of total chromatogram area and Kovats indexes.

Compound	Id. <sup>a</sup>	Kovats indexes		<i>T. vulgaris</i> (% area)	<i>T. mastichina</i> (% area)	<i>T. capitatus</i> (% area)	<i>T. zygis</i> (% area)
		KI	Lit <sup>b</sup>				
α-Thujene	KI.W	928	931	0.24	0.08	1.47	1.13
α-Pinene	KI.W.St	936	934	2.65	2.57	0.79	1.06
Sabinene	KI.W	978	976	0.87	1.86	–	0.05
β-Pinene	KI.W	983	980	0.29	3.39	0.24	0.24
Myrcene	KI.W	988	991	6.89	1.09	2.03	1.66
α-Terpinene	KI.W	1021	1018	3.50	0.54	1.57	1.44
p-Cymene	KI.W.St	1025	1026	2.17	0.30	6.12	18.79
Limonene	KI.W.St	1031	1031	2.22	2.45	0.29	0.29
1,8-Cineole	KI.W.St	1036	1034	0.16	51.94	–	–
γ-Terpinene	KI.W	1066	1062	8.91	0.54	6.68	8.31
α-Terpinolene	KI.W	1100	1096	1.28	0.14	–	0.14
Linalool	KI.W.St	1100	1098	44.00	19.90	1.42	4.31
Borneol	KI.W	1168	1165	1.30	0.59	0.15	1.67
α-Terpineol	KI.W	1187	1189	1.24	2.68	–	0.17
Terpineol-4	KI.W	1194	1192	11.88	0.43	0.84	1.04
Thymol	KI.W.St	1294	1290	1.18	0.14	0.02	48.59
Carvacrol	KI.W.St	1300	1298	0.09	–	69.83	1.83
β-Caryophyllene	KI.W	1422	1418	0.74	1.03	3.62	1.15

<sup>a</sup>“KI.W” means that identification was based on Kovats indexes and comparison with Wiley library. “KI.W.St” means that identification was based on Kovats indexes and comparison with Wiley library and standard.

<sup>b</sup>NIST database.

a final density of  $10^6$  CFU/mL and used as inocula. EOs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to reach a final concentration of 30  $\mu$ L/mL. Serial twofold dilutions were made in a concentration ranging from 0.03 to 30  $\mu$ L/mL in sterile test tubes containing Muller Hinton broth (MHB). The 96-well microplates (Iwaki brand, Asahi Techno Glass, Japan) were prepared by dispensing 95  $\mu$ L of Muller Hinton broth and 5  $\mu$ L of the bacterial inocula into each well. A 100  $\mu$ L aliquot from each EOs initially prepared was added into the first wells. Then, 100  $\mu$ L from their serial dilutions were transferred into eleven consecutive wells. The final volume in each well was 200  $\mu$ L. Nisin at the concentration range 0.01–10  $\mu$ L/mL was prepared in MHB and used as positive control whilst the negative control consisting of MHB with DMSO (5%, v/v). Contents of each well were mixed on a plate shaker at 150 rpm for 2 min prior to incubation for 24 h at the optimal temperature depending on the microbial inocula. After incubation, 25  $\mu$ L of 3-{4,5-dimethylthiazol-2-yl}-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Life Science), dissolved in DMSO (0.8 mg/mL) was added to each of the wells and incubated for 1 h in order to allow the viable microorganisms to metabolize the yellow MTT dye into formazan (purple crystals). The minimum inhibitory concentration (MIC) value was considered as the concentration of the first well that did not undergo color change (from yellow to purple) and was confirmed by plating 10  $\mu$ L samples from clear wells on Muller Hinton agar medium. The procedure was repeated three times for each microorganism.

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis and comparisons among means were carried out using the statistical package Statgraphics 5.1 for Windows. The data collected, for antibacterial properties using disk diffusion assay, were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) to test the effects of one fixed factor: essential oil, with four levels: *T. mastichina*, *T. zygis*, *T. capitatus*, and *T. vulgaris* for each bacteria. The data collected to ascertain the volume effects were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) to test the effects of one fixed factor: volume, with four levels: 30, 15, 7.5, and 3.75  $\mu$ L for each EO. The Tukey's *post hoc* test was applied for comparisons of means, differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemical composition of the essential oils

Table 1 summarizes the main constituents, their relative percentage of the total chromatogram area and Kovats index of *T. mastichina*, *T. zygis*, *T. capitatus*, and *T. vulgaris* EOs. In *T. mastichina* EO there were identified 80 compounds, which represents 98.51% of the total EO. The major compounds were 1,8-cineole (51.94%), linalool (19.90%) and  $\beta$ -pinene (3.39%). These results are in agreement with Pina-Vaz et al. (2004) who reported that 1,8-cineole (67.40%), linalool (4.3%) and  $\beta$ -pinene (4.0%) were the main components of *T. mastichina* EO collected in Portugal. In a similar study Miguel et al. (2004) reported that 1,8-cineole (58%) was the main component of *T. mastichina* EOs from Portugal. Based on GC and GC-MS analysis of the *T. capitatus* EO 44 components were identified, which represented 99.03% of the total detected constituents. This EO was characterized by the high monoterpene fraction, and especially by the presence of the phenolic carvacrol (69.83%), and their precursors *p*-cymene (6.12%) and  $\gamma$ -terpinene (6.68%). Bounatirou et al. (2007) analyzed the chemical composition of EOs isolated from the aerial parts of Tunisian *T. capitatus* during the different phases of the plant development. The main components of the EOs were carvacrol (62–83%), *p*-cymene (5–17%) and  $\gamma$ -terpinene (2–14%) results that were in concordance with this study. Ibraliu et al. (2011) studied the EO composition of *T. capitatus* collected from different agro-climatically diverse sites in Albania. They reported that the main components were carvacrol (54–78%), *p*-cymene (5–8.4%) and  $\gamma$ -terpinene (2.6–4%). When the EO of *T. vulgaris* was analyzed, 80 compounds were identified, representing 98.97% of the total EO. The main component was linalool (44.00%) followed by terpineol-4 (11.84%),  $\gamma$ -terpinene (8.91%) and myrcene (6.89%). The chemical composition obtained in this study is very different that reported by Imelouane et al. (2009) who studied the chemical composition of *T. vulgaris* EO from Morocco. The main compounds identified were camphor (38.54%), camphene (17.19%) and  $\alpha$ -pinene (9.35%). In a similar study Viuda-Martos et al. (2010) analyzed *T. vulgaris* EO from Egypt and found as its major constituents were thymol (32.23%),  $\gamma$ -terpinene (21.19%), and *p*-cymene (20.27%). This great variability in the chemical composition of *T. vulgaris* EOs could be due to there are different

intra-specific chemotypes (De Lisi et al., 2011). The chemotype used in this work was the characterized by a high amount of linalool. In *T. zygis* EO there were identified 93 compounds which represented 98.93% of the total oil. The main components were thymol (48.59%), *p*-cymene (18.79%) and  $\gamma$ -terpinene (8.31%). In concordance with this study, Rota et al. (2008) described that the main components of *T. zygis* EO cultivated in Spain were thymol (68.10%), *p*-cymene (11.0%) and  $\gamma$ -terpinene (4.80%) while Gonçalves et al. (2010) described that the chemical profile of *T. zygis* EO from Portugal was thymol (43.0%), *p*-cymene (16.0%) and  $\gamma$ -terpinene (8.40%).

As can be observed, the results obtained for these organic EOs were very similar to those present in the scientific literature. It may be assumed by, EOs are typically extracted from wild plants growing without the addition of any type of chemical. Obviously, there was a great variability in the chemical composition of EOs obtained from different *Thymus* species. Such variability depends on several factors including local climatic and environmental conditions (temperature, day length, sun, rain, etc.), season, geographical location, geology, nutrients, part of the plant and the method used to obtain the EO (Viuda-Martos et al., 2008).

### 3.2. Antibacterial activity

#### 3.2.1. Disk-diffusion method

The *in vitro* antibacterial activities of *T. matchina*, *T. zygis*, *T. capitatus* and *T. vulgaris* EOs against several bacteria strains were qualitatively and quantitatively assessed by the presence or absence of inhibition zones using the agar disk diffusion method as shown in Table 2. *T. zygis* and *T. capitatus* EOs showed inhibitory effects against the ten tested bacteria. On the other hand, *T. matchina* and *T. vulgaris* showed inhibitory effects against eight and seven tested bacteria, respectively. All EOs analyzed showed the highest activity against *L. innocua* and *A. faecalis*. For both bacteria, *T. zygis* EO had the highest ( $p < 0.05$ ) inhibition zone following by *T. capitatus*, *T. vulgaris* and *T. matchina* EOs in this order. For *A. hydrophila* and *S. putrefaciens*, *T. capitatus* EO had the highest ( $p < 0.05$ ) inhibition zone and it was active, against both strains. *T. zygis* EO was moderately active whilst *T. matchina* and *T. vulgaris* EOs were not active against both strains. Similarly, for *A. denitrificans*, *T. matchina* and *T. vulgaris* EOs were not active whereas *T. zygis* and *T. capitatus* EOs were moderately active. For this strain, *T. zygis* EO showed the highest ( $p < 0.05$ ) inhibition zone. In the case of *E. amnigenus*, as occurs with *L. innocua* and *A. faecalis*, *T. zygis* EO showed the highest ( $p < 0.05$ ) inhibition zone. All tested EOs were moderately active on *E. amnigenus* and *S. marcescens*. For *E. gergoviae*, *T. matchina* and *T. vulgaris* EOs were moderately active, while *T. zygis* and *T. capitatus* EOs were not active. In the case of *P. fragi* and *P. fluorescens*, *T. capitatus* EO was moderately active while *T. zygis*, *T. matchina* and *T. vulgaris* EOs were not active.

As regards the effect of the EO volume used (Table 3), in the case of *T. vulgaris* EO, no antibacterial effect was observed, at any volume, against *S. putrefaciens*, *P. fragi* and *P. fluorescens*. In the same way, no inhibitory effect was found in the disk impregnated with 3.75  $\mu$ L on the rest of bacterial strains analyzed except for *L. innocua*. This strain (*L. innocua*) showed inhibition effects at all volumes assayed and it did in a volume-dependent manner.

*T. mastichina* EO had inhibitory effect against *A. denitrificans*, *E. amnigenus*, *E. gergoviae* and *P. fragi* only at the highest volume assayed (30  $\mu$ L), whilst no antibacterial effect was found, at any volume assayed, on *S. putrefaciens* and *P. fluorescens*. For *L. innocua* and *A. faecalis* no inhibitory effect was observed in the disk impregnated with 3.75  $\mu$ L.

*T. capitatus* EO showed inhibitory effects ( $p < 0.05$ ) on *L. innocua*, *A. hydrophila*, *S. marcescens*, *A. denitrificans* and *A. faecalis* at all

**Table 2**  
Antimicrobial activity of *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus*, and *T. zygis* essential oils using disk diffusion method.

Essential oil	Diameter (mean and SD) of inhibition zone (mm) including disk diameter of 9 mm									
	<i>L. innocua</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. denitrificans</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>E. amnigenus</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. putrefaciens</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>T. vulgaris</i>	32.86 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup> (+++)	10.76 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup> (-)	12.64 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup> (-)	39.77 $\pm$ 3.92 <sup>a</sup> (+++)	12.34 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup> (+)	13.17 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup> (+)	15.68 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup> (+)	9.00 $\pm$ 0.00 (-)	9.00 $\pm$ 0.00 (-)	9.00 $\pm$ 0.00 (-)
<i>T. mastichina</i>	26.83 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup> (++)	11.29 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup> (-)	10.69 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup> (-)	23.50 $\pm$ 3.46 <sup>b</sup> (++)	12.51 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup> (+)	12.14 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup> (+)	12.36 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup> (+)	9.00 $\pm$ 0.00 (-)	11.68 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup> (-)	9.00 $\pm$ 0.00 (-)
<i>T. capitatus</i>	36.77 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup> (+++)	23.50 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup> (++)	14.34 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup> (+)	47.48 $\pm$ 0.54 <sup>c</sup> (+++)	12.04 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup> (+)	11.45 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup> (-)	17.98 $\pm$ 0.83 <sup>c</sup> (+)	23.71 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup> (++)	12.27 $\pm$ 0.07 <sup>bc</sup> (+)	14.92 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup> (+)
<i>T. zygis</i>	39.52 $\pm$ 0.22 <sup>d</sup> (+++)	17.26 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup> (+)	15.82 $\pm$ 0.08 <sup>d</sup> (+)	51.35 $\pm$ 0.21 <sup>d</sup> (+++)	13.20 $\pm$ 0.23 <sup>c</sup> (+)	10.62 $\pm$ 0.13 <sup>d</sup> (-)	16.43 $\pm$ 0.00 <sup>d</sup> (+)	17.54 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup> (+)	12.04 $\pm$ 0.33 <sup>ac</sup> (-)	11.94 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup> (-)

Values followed by different letters within the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's multiple range test. N.A., non-active. Essential oils are classified as (-) not active, (+) moderately active, (++) active and (+++) extremely active.

**Table 3**  
Volume effect of *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus* and *T. zygis* essential oils using disk diffusion method.

Essential oil	V <sup>a</sup> (μL)	Diameter (mean and SD) of inhibition zone (mm) including disk diameter of 9 mm									
		<i>L. innocua</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. demitriticans</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>E. amnigenus</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. putrefaciens</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>T. vulgaris</i>	30	32.86 ± 0.62 <sup>aW</sup>	10.76 ± 0.20 <sup>a</sup>	12.64 ± 0.21 <sup>a</sup>	39.77 ± 3.92 <sup>a</sup>	12.34 ± 0.19 <sup>a</sup>	13.17 ± 0.04 <sup>a</sup>	15.68 ± 0.42 <sup>a</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
	15	21.10 ± 9.46 <sup>b</sup>	10.47 ± 0.32 <sup>a</sup>	10.99 ± 0.04 <sup>b</sup>	31.94 ± 1.65 <sup>b</sup>	10.59 ± 0.32 <sup>b</sup>	11.33 ± 0.33 <sup>b</sup>	14.41 ± 0.27 <sup>b</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
	7.5	11.97 ± 1.17 <sup>c</sup>	10.40 ± 0.01 <sup>a</sup>	N.A.	13.29 ± 0.18 <sup>c</sup>	N.A.	N.A.	13.50 ± 0.07 <sup>c</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
<i>T. mastichina</i>	3.75	11.93 ± 0.01 <sup>c</sup>	N.A. <sup>b</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	30	26.83 ± 0.06 <sup>a</sup>	11.29 ± 0.12 <sup>a</sup>	10.69 ± 0.10 <sup>a</sup>	23.50 ± 3.46 <sup>a</sup>	12.51 ± 0.01 <sup>a</sup>	12.14 ± 0.19 <sup>a</sup>	12.36 ± 0.04 <sup>a</sup>	N.A.	11.68 ± 0.07 <sup>a</sup>	N.A.
	15	15.89 ± 0.86 <sup>b</sup>	10.99 ± 0.06 <sup>b</sup>	N.A.	15.75 ± 0.60 <sup>b</sup>	N.A.	N.A.	10.49 ± 0.07 <sup>b</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
<i>T. capitatus</i>	7.5	12.75 ± 0.04 <sup>c</sup>	N.A.	N.A.	12.68 ± 1.03 <sup>c</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	3.75	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	30	36.77 ± 0.11 <sup>a</sup>	23.50 ± 0.00 <sup>a</sup>	14.34 ± 0.00 <sup>a</sup>	47.48 ± 0.54 <sup>a</sup>	12.04 ± 0.05 <sup>a</sup>	11.45 ± 0.31 <sup>a</sup>	17.98 ± 0.83 <sup>a</sup>	23.71 ± 0.08 <sup>a</sup>	12.27 ± 0.32 <sup>a</sup>	14.92 ± 0.21 <sup>a</sup>
<i>T. zygis</i>	15	36.57 ± 0.23 <sup>a</sup>	14.13 ± 0.01 <sup>b</sup>	12.37 ± 0.00 <sup>b</sup>	44.40 ± 0.40 <sup>b</sup>	N.A.	11.22 ± 0.15 <sup>b</sup>	15.63 ± 0.11 <sup>b</sup>	15.97 ± 0.42 <sup>b</sup>	N.A.	13.31 ± 0.19 <sup>b</sup>
	7.5	35.71 ± 0.30 <sup>b</sup>	12.39 ± 0.07 <sup>c</sup>	10.49 ± 0.01 <sup>c</sup>	41.99 ± 0.44 <sup>c</sup>	N.A.	N.A.	13.49 ± 0.09 <sup>c</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
	3.75	33.27 ± 0.86 <sup>c</sup>	11.44 ± 0.44 <sup>d</sup>	10.02 ± 0.01 <sup>d</sup>	40.95 ± 0.60 <sup>c</sup>	N.A.	N.A.	13.16 ± 0.06 <sup>d</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
<i>T. zygis</i>	30	39.52 ± 0.22 <sup>a</sup>	17.26 ± 0.06 <sup>a</sup>	15.82 ± 0.08 <sup>a</sup>	51.35 ± 0.21 <sup>a</sup>	13.20 ± 0.12 <sup>a</sup>	10.62 ± 0.13 <sup>a</sup>	16.43 ± 0.00 <sup>a</sup>	17.54 ± 0.33 <sup>a</sup>	12.04 ± 0.33 <sup>a</sup>	11.94 ± 0.11 <sup>a</sup>
	15	37.48 ± 1.62 <sup>b</sup>	13.82 ± 0.04 <sup>b</sup>	15.28 ± 0.23 <sup>b</sup>	48.30 ± 1.92 <sup>b</sup>	12.66 ± 0.31 <sup>b</sup>	N.A.	14.42 ± 0.34 <sup>b</sup>	12.31 ± 0.20 <sup>b</sup>	N.A.	N.A.
	7.5	35.69 ± 0.57 <sup>c</sup>	12.98 ± 0.25 <sup>c</sup>	12.44 ± 0.00 <sup>c</sup>	44.70 ± 0.01 <sup>c</sup>	11.34 ± 0.33 <sup>c</sup>	N.A.	12.18 ± 0.00 <sup>c</sup>	N.A.	N.A.	N.A.
3.75	32.26 ± 3.35 <sup>d</sup>	12.82 ± 0.02 <sup>c</sup>	11.51 ± 0.00 <sup>d</sup>	38.19 ± 1.07 <sup>d</sup>	10.54 ± 0.06 <sup>d</sup>	N.A.	11.21 ± 0.05 <sup>d</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	

For the same essential oil, values followed by different letters within the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ) according to Tukey's multiple range test.

<sup>a</sup> Volume of essential oil added.

<sup>b</sup> Non-active.

volumes assayed and it did in a volume-dependent manner. *T. zygis* EO had inhibitory effect against *P. fragi*, *P. fluorescens* and *E. gergoviae* only at the highest volume assayed (30 μL) and against *S. putrefaciens* at 7.5 and 3.75 μL. On the other hand, this EO showed inhibitory effects ( $p < 0.05$ ) on *L. innocua*, *A. hydrophila*, *A. denitrificans*, *S. marcescens*, *E. amnigenus* and *A. faecalis* at all volumes assayed and it did in a volumen-dependent manner.

### 3.2.2. Microdilution assay

Table 4 shows the minimum inhibitory concentration (MIC) of *T. mastichina*, *T. zygis*, *T. capitatus* and *T. vulgaris* EOs against the ten bacteria strains determined by microdilution assay. The tested EOs proved to be more effective in microdilution assay than in agar disk diffusion assay. Even EOs that showed no inhibitory effect against *S. putrefaciens*, *P. fragi* and *P. fluorescens* by agar disk diffusion assay were effective by microdilution assay. For *T. mastichina* EO the MIC values varied between 3.75 and 7.5 μL/mL while in the case of *T. zygis*, *T. capitatus* and *T. vulgaris* the MIC values ranged between 1.87 and 7.5 μL/mL. All the bacteria tested in this work had higher resistance to the EOs assayed than they had for nisin.

In general, the assayed bacteria strains presented different behavior in the two methods used agar disk diffusion and microdilution. In the case of *T. mastichina* or *T. vulgaris* EO, the less sensitive bacteria strains in the agar disk diffusion method showed higher susceptibility in the microdilution assay. As regards of *T. zygis* and *T. capitatus* EO, the bacteria strains that were more sensitive in the agar disk diffusion method, showed the same susceptibility in the microdilution assay. As occurs with *T. mastichina* or *T. vulgaris* EO, the less sensitive bacteria strains to the action of *T. zygis* and *T. capitatus* EO in the agar disk diffusion method did show higher sensibility in by microdilution assay.

Microdilution assay is generally more sensitive and allows quantitative determination of essential oils antibacterial efficiency. The differences in effectiveness as assessed by these two methods point to possible differences in the EO capacity to access to the microorganism depend on the matrix interaction where the EO is incorporated. When the EO is tested by microdilution method, the inhibitory effect is higher than the EO diffuses in a solid medium (disk diffusion method). This phenomenon needs to be taken into account to design further application of EOs as natural antibacterial compounds for food preservation. With this information, it is possible to determine the concentration of EO that must be used, depending on its application: if the EO will be added directly over or into the food or as a part of the package.

There are no studies on the antibacterial activity of organic *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus* and *T. zygis* EOs. However, the antibacterial activity of several thyme varieties, included the analyzed in this study, obtained from wild or cultivated plants has been widely studied. Thus, Rota et al. (2008) informed that *T. zygis* EO possesses antibacterial activity, against *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*; *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus*. Bounatirou et al. (2007) reported that *T. capitatus* EO showed antibacterial activity against *Salmonella* spp. *Bacillus cereus*, *L. innocua* and *S. aureus*. Viuda-Martos et al. (2008) analyzed the antimicrobial activity of *T. vulgaris* EO cultivated in Spain. This EO showed antibacterial activity on *E. gergoviae*, *E. amnigenus*, *Staphylococcus xilosus* and *Staphylococcus carnosus*. Çetin et al. (2011) investigated the antibacterial activity of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans* EO. This EO showed the highest inhibitory effects on *Pseudomonas pseudoalkaligenes* and *S. aureus*.

Although the EOs showed antimicrobial activity, the reason behind this capacity are not well documented. Different modes of action have been suggested. The available literature data show that the primary site of the toxic action of EOs is generally the plasmic membrane. This is directly related to the hydrophobicity of the

**Table 4**  
Minimum inhibitory concentration (MIC) values of *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. capitatus* and *T. zygis* essential oils against several bacterial strains.

Sample	Minimum inhibitory concentration (MIC) ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )									
	<i>L. innocua</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. denitrificans</i>	<i>A. faecalis</i>	<i>E. amnigenus</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. putrefaciens</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>T. vulgaris</i>	3.75	3.75	3.75	3.75	7.5	7.5	7.5	1.87	3.75	3.75
<i>T. mastichina</i>	3.75	3.75	3.75	3.75	7.5	7.5	7.5	3.75	3.75	3.75
<i>T. capitatus</i>	3.75	3.75	3.75	3.75	7.5	7.5	1.87	1.87	3.75	1.87
<i>T. zygis</i>	3.75	3.75	3.75	3.75	7.5	7.5	3.75	1.87	3.75	3.75
Nisin	2.50	2.50	2.50	2.50	1.25	1.25	1.25	0.62	1.25	1.25

terpenoid compounds of EOs, which enables them to partition into the bacterial lipid bilayer, disturbing its structure and increasing its permeability to protons, ions and other cell constituents (Kalemba and Kunicka, 2003; Carson et al., 2006). Burt et al. (2007) and Arques et al. (2008) proposed that the EOs affect microbial cells by various antimicrobial mechanisms, including disrupting enzyme systems, compromising the genetic material of bacteria and forming fatty acid hydroperoxidase caused by oxygenation of unsaturated fatty acids.

The antimicrobial activities of the EOs are difficult to associate to a specific compound due to their complexity and variability. Thus, the antimicrobial activity could be caused by the major compounds of the EOs or due to a synergistic effect between the major compounds and the minor ones (Carović-Stanko et al., 2010). Nevertheless, some researchers reported that there is a relationship between the chemical composition of the most abundant components in the EO and the antimicrobial activity (Djenane et al., 2011). Additionally, in the antimicrobial action of EO components, the lipophilic character of their hydrocarbon skeleton and the hydrophilic character of their functional groups are of the main importance (Nowak et al., 2012). The activity rank of essential oil components is as follows: phenols > aldehydes > ketones > alcohols > ethers > hydrocarbons (Kalemba and Kunicka, 2003). The main component of investigated *T. zygis* EO was thymol while in *T. capitatus* EO was carvacrol, two monoterpenes with phenolic ring. In the case of *T. mastichina* EO, the main component was 1,8-cineole belonging to ethers group, whilst in *T. vulgaris* EO the principal component was linalool belonging to alcohols group. Based on composition of investigated EOS we expected that the antimicrobial activity of *T. zygis* and *T. capitatus* EOs will be higher than those of *T. vulgaris* and *T. mastichina* EOs. It was confirmed during study.

Carvacrol and thymol, the main components of *T. capitatus* and *T. zygis* respectively, have been found to exhibit antimicrobial activity against a variety of bacteria, including foodborne pathogens (Rattanachaiakunsopon and Phumkhachorn, 2010; Guarda et al., 2011; Ramos et al., 2012). It is recognized that their mode of action results in the release of the lipopolysaccharides from Gram negative bacteria with the consequent cell membrane permeability increase and ATP loss (Caillet et al., 2005). Additionally, carvacrol or thymol can cause cell death because it can damage the cytoplasmic membrane, which leads to the collapse of the proton motive force and depletion of the ATP pool (Ultee et al., 2002). In the same way, 1,8-cineol, the main component of *T. mastichina*, is known to possess antimicrobial properties several bacteria strains such as: *S. aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, *B. cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella catarrhalis* and *E. coli* (Hendry et al., 2009; van Vuuren and Viljoen, 2007). As regards linalool antibacterial activity, Bagamboula et al. (2004) informed that linalool had a weak inhibitory action against *Shigella flexeri*, *Shigella sonnei* and *E. coli*.

The type of bacteria also has an influence on the effectiveness of the EOs. Gram-negative bacteria, were generally less susceptible than Gram-positive (Gilles et al., 2010). The difference in susceptibility of the bacteria to an EO is thought to arise as a result of the differences in their cell membrane structure. The cell envelopes of Gram-negative bacteria are more complex than the cell wall of Gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria are composed of two layers that protect the cell and provide rigidity. Gram-positive bacteria lack the outer membrane thus that maybe the reason why they would be more susceptible to action of phenolic components of EOs (Angienda et al., 2010). In this work, at higher concentration no differences were found between Gram-negative and Gram-positive bacteria as well as in microdilution assay.

#### 4. Conclusion

The findings suggest that organic *T. matichina*, *T. zygis*, *T. capitatus*, and *T. vulgaris* EOs could be used as antibacterial agents in food preservation. In addition, these EOs may be acceptable to consumers and to regulatory agencies as natural preservatives in organic foods. However, it should be borne in mind that the levels of essential oils and their compounds necessary to inhibit microbial growth in food products are higher than in culture media. This is due to interactions between essential oil compounds and the food matrix and should be considered for commercial applications. Due to this issue, in-depth studies are required due to high concentrations of EOs may adversely affect the organoleptic properties of food.

#### References

- Abate, G., Mshana, R.N., Mörner, H., 1998. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2, 1011–1016.
- Alves-Silva, J.M., Dias dos Santos, S.M., Pintado, M.E., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Viuda-Martos, M., 2013. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control* 32, 371–378.
- Angienda, P.O., Onyango, D.M., Hill, D.J., 2010. Potential application of plant essential oils at sub-lethal concentrations under extrinsic conditions that enhance their antimicrobial effectiveness against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 4, 1678–1684.
- Arques, J.L., Rodríguez, E., Nuñez, M., Medina, M., 2008. Inactivation of gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system. *European Food Research and Technology* 227, 77–82.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M., Debever, J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* 21, 33–42.
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro, L., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa, M.M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry* 105, 146–155.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., Anackov, G., 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 1822–1828.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223–253.
- Burt, S.A., Der Zee, R.V., Koets, A.P., De Graaff, A.M., Van Knapen, F., Gastra, W., Haagsman, H.P., Veldhuizen, E., 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4484–4490.
- Caillet, S., Shareck, F., Lacroix, M., 2005. Effect of gamma radiation and oregano essential oil on murein and ATP concentration of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 68, 2571–2579.
- Carović-Stanko, K., Orlić, S., Politeo, O., Strikić, F., Kolak, I., Milos, M., Satovic, Z., 2010. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. *Food Chemistry* 119, 196–201.
- Carson, C.F., Hammer, K.A., Riley, T.V., 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 50–62.
- Çetin, B., Çakmakçı, S., Çakmakçı, R., 2011. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35, 145–154.
- De Lisi, A., Tedone, L., Montesano, V., Sarli, G., Negro, D., 2011. Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. *Food Chemistry* 125, 1284–1286.
- Djabou, N., Lorenzi, V., Guinoiseau, E., Andreani, S., Giuliani, M.C., Desjobert, J.M., Bolla, J.M., Costa, J., Berti, L., Luciani, A., Muselli, A., 2013. Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxic-infectious pathogens. *Food Control* 30, 354–363.
- Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., Roncalés, P., 2011. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* 22, 1046–1053.
- Ehivet, F.E., Min, B., Park, M.K., Oh, J.H., 2011. Characterization and antimicrobial activity of sweet potato starch-based edible film containing origanum (*Thymus capitatus*) oil. *Journal of Food Science* 76, 178–184.
- Fisher, C., Phillips, C., 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1232–1240.
- Gilles, M., Zhao, J., An, M., Agboola, S., 2010. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry* 119, 731–737.
- Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Cavaleiro, C., Lopes, M.C., Salgueiro, L., 2010. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. *Industrial Crops and Products* 32, 70–75.
- Guarda, A., Rubilar, J.F., Miltz, F., Galotto, M.J., 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology* 146, 144–150.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Verissimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry* 116, 714–721.
- Hendry, E.R., Worthington, T., Conway, B.R., Lambert, P.A., 2009. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64, 1219–1225.
- Ibraliu, A., Mi, X., Risti, M., Dajic Stefanovic, Z., Shehu, J., 2011. Analysis of essential oils of three wild medicinal plants in Albania. *Journal of Medicinal Plants Research* 51, 58–62.
- Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathélet, J.P., Ankit, M., Khedid, K., El-Bachiri, A., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology* 11, 205–208.
- Kalemba, D., Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10, 813–829.
- Maksimovic, Z., Stojanovic, D., Sostaric, I., Djajic, Z., Ristic, M., 2008. Composition and radical-scavenging activity of *Thymus glabrescens* Willd. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 2036–2041.
- Miguel, M.G., Figueiredo, A.C., Costa, M.M., Martins, D., Duarte, J., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2003. Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albcans*, *Th. mastichina*, *Th. carnosus* and *Thymra capitata* in sunflower oil. *Nahrung/Food* 47, 397–401.
- Miguel, G., Simões, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Carvalho, L., 2004. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitosus*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry* 86, 183–188.
- National Institute of Standards and Technology (NIST), 2010. <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html> (accessed December, 2012).
- Nowak, A., Kalemba, D., Krala, C., Piotrowska, M., Czyżowska, A., 2012. The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. *Food Microbiology* 32, 212–216.
- Pina-Vaz, C., Gonçalves-Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J., Martínez-de-Oliveira, J., 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 18, 73–78.
- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., Garrigós, M.C., 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. *Journal of Food Engineering* 109, 513–519.
- Rattanachaiunsopon, P., Phumkhachorn, P., 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110, 614–619.
- Rota, M.C., Herrera, A., Martínez, R.M., Sotomayor, J.A., Jordán, J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control* 19, 681–687.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J., 2012a. 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.
- Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J., 2012b. Chemical characterization and antibacterial activity of two aromatic herbs (*Santolina chamaecyparissus* and *Sideritis angustifolia*) widely used in the folk medicine. *Journal of Food Safety* 32, 426–434.
- Tedone, L., D'andrea, L., Marzi, V., 2001. Caratterizzazione biomorfologica e valutazione agronomica di specie e popolazioni di timo (*Thymus* spp.) nell'area mediterranea. In: Atti del VI Convegno delle Biodiversità, Valenzano, 6 settembre, pp. 1134–1142.
- Tepe, B., Sokmen, M., Sokmen, A., Daferera, D., Polissiou, M., 2005. Antimicrobial and antioxidative activity of essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. *Journal of Food Engineering* 69, 335–342.
- Ultee, A., Bennis, M.H.J., Moezelar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1561–1568.
- van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 540–544.
- Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2005. Método de concentración mínima de inhibición. Technical Report. Project Recovery and Compost Management, Rehobot, Israel, 19–21 February.

- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2008. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. *International Journal of Food Science & Technology* 43, 526–531.
- Viuda-Martos, M., El Gendy, A.E., Sendra, E., Fernández-López, J., El Razik, K.A.A., Omer, E.A., Pérez-Alvarez, J.A., 2010. Chemical composition and antioxidant and anti-*Listeria* activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (16), 9063–9070.
- Viuda-Martos, M., Mohamady, M.A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K.A., Omer, E.A., Pérez-Alvarez, J.A., Sendra, E., 2011. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control* 22, 1715–1722.



**Título:** Assessment of In vitro antioxidant and antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species obtained from organic growth on meat homogenates.

**Autores:** Carmen Ballester-Costa, Esther Sendra, Juana Fernández-López, Jose A. Pérez-Álvarez, M. Viuda-Martos

**Revista:** Food Control

**Año:** 2016

Control

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Assessment of In vitro antioxidant and antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species obtained from organic growth on meat homogenates

Article Type: Research Paper

Keywords: Essential oil; *Thymus*; Antibacterial; Antioxidant; Meat homogenates

Corresponding Author: Dr. Manuel Viuda-Martos, PhD

Corresponding Author's Institution: Miguel Hernandez University

First Author: Carmen Ballester-Costa, PhD student

Order of Authors: Carmen Ballester-Costa, PhD student; Esther Sendra, PhD; Juana Fernandez-Lopez, PhD; Jose A Pérez-Alvarez, PhD; Manuel Viuda-Martos, PhD

Abstract: The aims of this study were to determine (i) the antibacterial activity using, as culture medium, extracts from meat homogenates (minced beef, cooked Ham or dry-cured sausage) and (ii) the antioxidant properties of organic essential oils (EOs) obtained from four *Thymus* species such as *Thymus zygis*, *Thymus mastichina*, *Thymus capitatus* and *Thymus vulgaris* which are common in Spain. The antibacterial activity using different meat extracts as culture medium was determined with agar disc diffusion assay while the antioxidant activity was determined using four different methods such as DPPH, ABTS, FRAP and FIC.

All EOs analyzed, at all concentrations and with all methods, had antioxidant activity. *T. capitatus* and *T. zygis* EOs were the most active. The IC<sub>50</sub> values, for DPPH, ABTS and FIC assays were 0.60, 1.41 and 4.44 mg/mL, respectively, in the case of *T. capitatus* whilst for *T. zygis* were 0.90, 2.07 and 4.95 mg/mL, respectively. On the other hand, *T. vulgaris* EO showed the lowest IC<sub>50</sub> values in all methods assayed.

As regards to antibacterial activity, *T. zygis* and *T. capitatus* EOs, in all culture medium made with extracts from meat products, had higher inhibition halos against all tested bacteria than *T. mastichina* and *T. vulgaris* EOs. In general terms, the antibacterial activity of all EOs assayed in this work was higher in the culture medium made with minced beef than with the culture medium elaborated with cooked ham or dry-cured sausage.

*T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. zygis* and *T. capitatus* EOs may be used, by the food industry, as potential natural additives to replace or reduce the use of chemical ones.

Suggested Reviewers: Victor Kuri PhD

Lecture in Food Quality, Faculty of Science and Technology, Plymouth University

v.kuri@plymouth.ac.uk



Annalisa Serio PhD  
Assistant Professor, Food Science, University of Teramo  
aserio@unite.it

Alejandra Cardelle PhD  
Assistant Professor, Food Science, Santiago de Compostela University  
alejandra.cardelle@usc.es



## Highlights

- The antioxidant and antibacterial activity of essential oils (EOs) of four *Thymus* species was analyzed.
- Meat homogenates were used as culture medium for antibacterial activity determination
- *Thymus zygis* and *Thymus capitatus* EOs showed the highest antioxidant activity
- *T. zygis* and *T. capitatus* EOs, in all culture medium assayed had the highest inhibition halos against all tested bacteria.
- The assayed EOs showed different behavior in the different culture medium analyzed.



1 **Assessment of *In vitro* antioxidant and antibacterial properties of essential oils of four**  
2 ***Thymus* species obtained from organic growth on meat homogenates**

3

4

5

6

7 Carmen Ballester-Costa, Esther Sendra, Juana Fernández-López, Jose A. Pérez-Álvarez,  
8 Manuel Viuda-Martos

9

10

11 IPOA Research Group (UMH-1 and REVIV-Generalitat Valenciana). AgroFood Technology  
12 Department. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Miguel Hernández University. Ctra.  
13 Beniel km. 3,2. E-03312 Orihuela, Alicante (Spain).

14

15

16

17 Corresponding author: Dr. Manuel Viuda-Martos. e-mail: [mviuda@umh.es](mailto:mviuda@umh.es) Tel.: +34  
18 966749737; Fax: +34 966749677. AgroFood Technology Department. Orihuela 03312  
19 (Spain)

20

21

22

23

24

25

26 **Abstract**

27           The aims of this study were to determine (i) the antibacterial activity using, as culture  
28 medium, extracts from meat homogenates (minced beef, cooked Ham or dry-cured sausage)  
29 and (ii) the antioxidant properties of organic essential oils (EOs) obtained from four *Thymus*  
30 species such as *Thymus zygis*, *Thymus mastichina*, *Thymus capitatus* and *Thymus vulgaris*  
31 which are common in Spain. The antibacterial activity using different meat extracts as culture  
32 medium was determined with agar disc diffusion assay while the antioxidant activity was  
33 determined using four different methods such as DPPH, ABTS, FRAP and FIC.

34           All EOs analyzed, at all concentrations and with all methods, had antioxidant activity.  
35 *T. capitatus* and *T. zygis* EOs were the most active. The IC<sub>50</sub> values, for DPPH, ABTS and  
36 FIC assays were 0.60, 1.41 and 4.44 mg/mL, respectively, in the case of *T. capitatus* whilst  
37 for *T. zygis* were 0.90, 2.07 and 4.95 mg/mL, respectively. On the other hand, *T. vulgaris* EO  
38 showed the lowest IC<sub>50</sub> values in all methods assayed.

39           As regards to antibacterial activity, *T. zygis* and *T. capitatus* EOs, in all culture  
40 medium made with extracts from meat products, had higher inhibition halos against all tested  
41 bacteria than *T. mastichina* and *T. vulgaris* EOs. In general terms, the antibacterial activity of  
42 all EOs assayed in this work was higher in the culture medium made with minced beef than  
43 with the culture medium elaborated with cooked ham or dry-cured sausage.

44           *T. vulgaris*, *T. mastichina*, *T. zygis* and *T. capitatus* EOs may be used, by the food  
45 industry, as potential natural additives to replace or reduce the use of chemical ones.

46

47

48 **Keywords:** Essential oil, organic, *Thymus*, antibacterial, chemical composition

49

50

## 51 **1. Introduction**

52 The greater understanding of the relationship between diet, specific food ingredients and  
53 health is leading to new insights into the effect of food components on physiological function  
54 and health. This awareness has moved consumers to become more health-conscious, driving a  
55 trend towards “green”, healthy and nutritious foods with additional health promoting  
56 functions. This new approach to improving health status is especially interesting for the meat  
57 industry. The study by [Grunert \(2006\)](#) on trends in meat consumption identifies the processed  
58 meat sector as having the most promising future due, among other reasons, to consumers'  
59 demand for products that are easy and quick to prepare. However, to maintain the safety and  
60 prolong the shelf-life of meat and meat products the meat industry uses synthetic  
61 preservatives which have been widely used to control the lipid oxidation and to eliminate  
62 bacteria or moulds.

63 The use of these synthetic preservatives enters into controversy with the idea of a healthy  
64 and "green" product due to these compounds could cause health problems for consumers in a  
65 long term period. Thus, aiming to the reduction of the use of chemical additives in food  
66 industry, growing interest has risen recently on the use of natural food additives with  
67 antimicrobial and antioxidant properties that do not have any negative effects on the human  
68 health ([Alves-Silva, Dias dos Santos, Pintado, Pérez-Álvarez, Fernández-López, & Viuda-](#)  
69 [Martos, 2013](#)). In this way, natural antioxidants extracted from plants can be used as  
70 alternatives to the synthetic preservatives due to their equivalent or greater effect on the  
71 inhibition of lipid oxidation and bacterial growth ([Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Fernandez-](#)  
72 [Lopez, & Perez-Alvarez, 2011](#)).

73 Essential oils (EOs) obtained from aromatic herbs and spices are aromatic oily liquids  
74 formed by aromatic plants as secondary metabolites which are constituted by a complex mix  
75 of compounds, including monoterpenes and sesquiterpene hydrocarbons, as well as their

76 corresponding oxidized products (e.g. alcohols, aldehydes, ethers and ketones), several  
77 phenylpropene derivatives, phenols and miscellaneous volatile organic compounds (e.g.  
78 octanal, dodecanal, 2-undecanone) (Viuda-Martos et al., 2010a; Carson and Hammer 2011).  
79 Although antioxidant and antimicrobial properties of EOs were acknowledged long time ago  
80 there are still several investigations which showed that these compounds exhibit strong  
81 antimicrobial and antioxidant properties (Ruiz-Navajas, Viuda-Martos, Sendra, Perez-Alvarez  
82 and Fernández-López 2013; Adrar, Oukil, & Bedjou, 2015; Majouli, Besbes Hlila, Hamdi,  
83 Flamini, Ben Jannet, & Kenani, 2016) which makes them interesting ingredients in meat  
84 industry. Additionally, the main advantage of EOs is that they can be used in any food and are  
85 generally recognized as safe (GRAS), as long as their maximum effects are attained with  
86 minimal change in the organoleptic properties of the food (Viuda-Martos, Ruiz-Navajas,  
87 Fernandez-Lopez, & Perez-Alvarez, 2008). Although antimicrobial properties of EOs reaches  
88 *in vitro* bioactive concentrations at 5% or less, the application of plant EOs for control of  
89 food-borne pathogens and food spoilage bacteria requires the evaluation of its efficacy within  
90 food products or in model systems that closely simulate food composition (Gutierrez, Barry-  
91 Ryan, & Bourke, 2009).

92 Therefore, the aims of this study were to determine (i) the antibacterial activity using, as  
93 culture medium, extracts from meat homogenates (minced beef, cooked Ham or dry-cured  
94 sausage) and (ii) the antioxidant properties of organic essential oils obtained from four  
95 *Thymus* species such as *Thymus zygis*, *Thymus mastichina*, *Thymus capitatus* and *Thymus*  
96 *vulgaris* chemotype linalool which are common in Spain and they are widely used in the meat  
97 industry. Additionally, they are widely used as culinary flavoring agents and their flavor and  
98 aroma are familiarized and widely accepted by consumers (Ballester-Costa, Sendra,  
99 Fernández-López, Pérez-Alvarez and Viuda-Martos 2013).

100

## 101 2. Material and Methods

### 102 2.1. Essential oils

103 The essential oils (EOs) of *Thymus zygis* ref. 11961, *Thymus mastichina* ref. 90001-1284,  
104 *Thymus capitatus* ref. 95001-1150, and *Thymus vulgaris* ref. 80001-3577 were used in this  
105 work. These EOs were analyzed by [Ballester-Costa, et al., \(2013\)](#). These authors reported that  
106 in *T. mastichina* EO the major compounds were 1,8-cineole (51.94%), linalool (19.90%) and  
107  $\beta$ -pinene (3.39%). *T. capitatus* EO was characterized by the high monoterpene fraction, and  
108 especially by the presence of carvacrol (69.83%), and their precursors *p*-cymene (6.12%) and  
109  $\gamma$ -terpinene (6.68%). As regards to *T. vulgaris* EO, the main component was linalool (44.00%)  
110 followed by terpineol-4 (11.84%),  $\gamma$ -terpinene (8.91%) and myrcene (6.89%). Finally, in *T.*  
111 *zygis* EO the major components were thymol (48.59%), *p*-cymene (18.79%),  $\gamma$ -terpinene  
112 (8.31%) and linalool (4.31%). All EOs analyzed were supplied by Esencias Martinez Lozano  
113 (Murcia, Spain). The EOs were organic certified by the Institute for Marketecology (IMO)  
114 according to the procedures as outlined in the USDA, AMS 7 CFR Part 205 National Organic  
115 Program, Final Rule.

### 116 2.2. Antioxidant activity

117 2.2.1. *Determination of antioxidant activity using 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)*  
118 *radical scavenging method.*

119 The antioxidant activity of different concentrations (0.23-30 mg/mL) of *Thymus* EOs was  
120 measured in terms of hydrogen donating or radical scavenging ability, using the stable radical  
121 DPPH ([Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995](#)). The results were expressed as IC<sub>50</sub> value:  
122 concentration (mg/mL) for a 50% of chelating effect. All analyses were carried out in  
123 triplicated.

124 2.2.2. *ABTS radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) scavenging activity assay*

125 The ABTS<sup>•+</sup> scavenging activity assay was determined as described by [Leite et al., \(2011\)](#)  
126 with some modifications. The ABTS<sup>•+</sup> solution was produced by reacting aqueous ABTS  
127 solution (7 mM) with potassium persulfate (2.45 mM). Diluted ABTS<sup>•+</sup> solution with an  
128 absorbance of  $0.70 \pm 0.02$  at 734 nm was employed in the analysis. The reactions were  
129 performed by adding 990  $\mu$ L of ABTS<sup>•+</sup> solution to 10  $\mu$ L of each EOs solution (0.23-30  
130 mg/mL). After 6 min of incubation at room temperature, absorbance values were measured on  
131 a spectrophotometer at 734 nm. The results were expressed as IC<sub>50</sub> value: concentration  
132 (mg/mL) for a 50% of chelating effect. All analyses were carried out in triplicated.

### 133 2.2.3. Ferric reducing antioxidant power

134 The ferric reducing antioxidant power (FRAP) of different concentrations (0.23-30  
135 mg/mL) of Thymus EOs samples was determined by using the potassium ferricyanide-ferric  
136 chloride method ([Oyaizu, 1986](#)). The FRAP of the samples was estimated in terms of mg  
137 Trolox equivalent (TE) mL of sample as mean of three replicates.

### 138 2.2.4. Ferrous ion-chelating ability assay

139 Ferrous ions (Fe<sup>2+</sup>) chelating activity of different concentrations (0.15-20 mg/mL) of EOs  
140 samples was measured by inhibiting the formation of Fe<sup>2+</sup>-ferrozine complex after treatment  
141 of test material with Fe<sup>2+</sup>, following the method of [Carter \(1971\)](#). The results were expressed  
142 as IC<sub>50</sub> value: concentration (mg/mL) for a 50% of chelating effect. All analyses were  
143 performed in triplicated.

## 144 2.3. Microbial strains

145 The EOs were individually tested against several bacteria strains: *Listeria innocua* CECT  
146 910, *Serratia marcescens* CECT 854, *Pseudomonas fragi* CECT 446, *Pseudomonas*  
147 *fluorescens* CECT 844, *Aeromonas hydrophila* CECT 5734, *Shewanella putrefaciens* CECT  
148 5346, *Achromobacter denitrificans* CECT 449, *Enterobacter amnigenus* CECT 4078,  
149 *Enterobacter gergoviae* CECT 587, *Alcaligenes faecalis* CECT 145. These microorganisms



150 were chosen as they are commonly associated with refrigerated foods: as indicator of  
151 pathogenic microorganism or as spoilage microorganism. All species were supplied by the  
152 Spanish Type Culture Collection (CECT) of the University of Valencia (Spain).

## 153 **2.4. Antimicrobial screening**

### 154 *2.4.1. Preparation of meat model medium*

155 Ten grams of minced beef (MB), cooked ham (CH), or dry-cured sausage (DCS) were  
156 added to 90 mL of one-quarter-strength buffered peptone water (pH 7.2) in blender bags and  
157 homogenized in a Stomacher until smooth. After that, the samples were filtered through a  
158 paper disc Whatman n° 2 to remove solid particles and obtained a clarified extract. Meat  
159 model medium were made mixing the extracts obtained from MB, CH or DCS with agar  
160 solution (Sharlab, Barcelona, Spain) in order to obtain a final solid medium solution with  
161 1.5% agar. Finally, all prepared meat solutions were autoclaved, separately, at 121 °C for 15  
162 min prior to use to eliminate contamination from organisms that may already be present in the  
163 food.

### 164 *2.4.2. Disc-diffusion method*

165 Screening of EOs for antibacterial activity was determined by the agar diffusion method  
166 following the recommendations of [Tepe, Sokmen, Sokmen, Daferera and Polissiou, \(2005\)](#)  
167 which is normally used as a preliminary check efficient EOs. Petri plates were prepared by  
168 pouring 20 mL of previously prepared meat model medium (MB, CH or DCS) and allowed to  
169 solidify. Plates were dried for 30 min in a biological safety cabinet with vertical laminar flow.  
170 A suspension (0.1 mL of  $10^6$  CFU/mL) of standardized inoculum suspension was spread on  
171 the solid medium plates. The inoculums were allowed to dry for 5 min. Then, sterile filter  
172 paper disk (9 mm in diameter Schlinder & Schuell, Dassel, Germany) was impregnated with  
173 30 µL EO. The plates were left 15 min at room temperature to allow the diffusion of the EO,  
174 and then they were incubated at appropriated temperature for each bacteria during 24 h. At the

175 end of the period, the diameter of the clear zone around the disc was measured with a caliper  
176 (Wiha dialMax<sup>®</sup> ESD-Uhrmessschieber) and expressed in millimeters (disk diameter  
177 included) as its antimicrobial activity. According to the width of the inhibition zone diameter  
178 expressed in mm, results were appreciated as follows: not active (-) for diameter equal to or  
179 below 12.0 mm; moderately active (+) for diameter between 12.0 and 21.0 mm; active (++)  
180 for diameter between 21.0 and 30.0 mm and extremely active (+++) for diameter equal to or  
181 longer than 30.0 mm (Djabou et al., 2013). All tests were performed in triplicate.

## 182 **2.5. Statistical analysis**

183 Conventional statistical methods were used to calculate means and standard deviations of  
184 three simultaneous assays carried out with the different methods. Data collected for  
185 antioxidant properties were analyzed by one-way analysis of variance to test the effects of  
186 essential oils (levels: *T. zygis*, *T. mastichina*, *T. capitatus* and *T. vulgaris*). Data collected for  
187 antibacterial properties were analyzed by two-way analysis of variance to test the effects of  
188 two fixed factors: essential oil (levels: *T. zygis*, *T. mastichina*, *T. capitatus* and *T. vulgaris*)  
189 and bacterial strains (levels: *L. innocua*, *A. hydrophila*, *S. marcescens*, *A. faecalis*, *A.*  
190 *denitrificans*, *P. fragi*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens*, *E. amnigenus* and *E. gergoviae*). The  
191 Tukey's post hoc test was applied for comparisons of means, differences were considered  
192 significant at  $p < 0.05$ . Statistical analysis and comparisons among means were carried out  
193 using the statistical package Statgraphics 5.1 for Windows.

194

## 195 **3. Results and discussion**

### 196 **3.1. Antioxidant activity**

197 The antioxidant activity of EOS obtained from *T. zygis*, *T. mastichina*, *T. capitatus* and *T.*  
198 *vulgaris* was determined using four different methodologies, DPPH free radical scavenging,  
199 ABTS<sup>++</sup> scavenging activity, reducing power and chelating activity due to a single method

200 will provide basic information about antioxidant properties, but a combination of methods  
201 describes the antioxidant properties of the sample in more detail (Číž, Čížová, Denev,  
202 Kratchanova, Slavov & Lojek, 2010). The results are summarized in Table 1. With regard to  
203 DPPH assay, the EOs analyzed exhibited varying degrees of scavenging ability. *T. capitatus*  
204 EO showed the strongest ( $p < 0.05$ ) radical scavenging effect with a  $IC_{50}$  value of 0.60 mg/mL  
205 followed by *T. zygis* EO which had a  $IC_{50}$  value of 0.60 mg/mL. *T. mastichina* and *T. vulgaris*  
206 EOs, in this order, showed the lowest scavenging activity ( $p < 0.05$ ). In the case of ABTS<sup>+</sup>  
207 scavenging activity (Table 1), all EOs analyzed showed this ability. Again *T. capitatus* EO  
208 showed the lowest ( $p < 0.05$ )  $IC_{50}$  value and therefore it had the greatest antioxidant activity.  
209 On the other hand, *T. vulgaris* EO had the lowest ( $p < 0.05$ )  $IC_{50}$  value. This strong radical  
210 scavenging potential capacity, measure with DPPH and ABTS assays, of the EOs analyzed  
211 could explain by the occurrence of hydroxylated compounds such as terpenoids in their  
212 composition as mentioned Kadri, Zarai, Chobba, Gharsallah, Damak and Békir (2013).

213 Table 1 shows the ferric reducing antioxidant power obtained using the FRAP assay. *T.*  
214 *capitatus* EO had the highest ( $p < 0.05$ ) ferric reducing capacity in terms of Trolox  
215 concentrations. It was followed by *T. zygis* EO. *T. mastichina* and *T. vulgaris* EOs had lower  
216 ( $p < 0.05$ ) ferric reducing capacity compared with the other EOs. Ferrous ion, normally present  
217 in foods, is recognised as an effective pro-oxidant agent. EOs showed the property to chelate  
218 pro-oxidant metal ions, such as iron and copper and consequently avoiding free radical  
219 formation from these pro-oxidants. Thus, the  $Fe^{+2}$  chelating capacity of different *Thymus* EOs  
220 was shown in Table 1. *T. capitatus* and *T. zygis* EOs, showed the highest values ( $p < 0.05$ ) for  
221 chelating  $Fe^{+2}$  with  $IC_{50}$  values of 4.44 and 4.95 mg/mL, respectively. Once more, *T.*  
222 *mastichina* and *T. vulgaris* EOs, respectively, had the lowest capacity ( $p < 0.05$ ) to act as  
223 chelating agents.

224 The antioxidant activities of essential oils obtained from several thyme varieties have been  
225 reported by several studies (Zouari et al., 2011; Ozen, Demirtas, & Aksit, 2011; Ali,  
226 Chaouachi, Bahri, Chaieb, Boussaïd, & Harzallah-Skhiri, 2015). Therefore, Zouari et al.,  
227 (2011) investigated the antioxidant activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut EO, which  
228 grows wild in Tunisia. They reported that *T. algeriensis* EO was able to reduce the stable free  
229 radical DPPH with an IC<sub>50</sub> of 0.8 mg/mL. Viuda-Martos et al., (2010a) analysed the  
230 antioxidant activity of *Thymus vulgaris* EO cultivated in Egypt. These authors reported that  
231 this EO showed in a DPPH assay an IC<sub>50</sub> of 4.50 mg/mL while in the FIC assay the EC<sub>50</sub> was  
232 0.27 mg/mL. Ruiz-Navajas, et al., (2013) reported IC<sub>50</sub> values for *Thymus piperella* EO, in  
233 DPPH and FIC assays of 9.30 and 425 mg/mL, respectively while for *Thymus moroderi* EO  
234 the IC<sub>50</sub> values were 90 and 6 mg/mL respectively. In a similar study, Ali et al., (2015)  
235 analysed the antioxidant activity of EO obtained from *Thymus algeriensis*. These authors  
236 reported that the level of antioxidant activity estimated by DPPH (IC<sub>50</sub> = 4.31-9.23 mg/mL)  
237 and ABTS (11.69-28.23 µg Trolox Equivalent/mg) test was moderate. Nikolic et al., (2014)  
238 reported that *Thymus serpyllum* essential oil showed the highest DPPH radical scavenging  
239 activity (IC<sub>50</sub>: 0.96 µg/mL), followed by oils of *T. algeriensis* (IC<sub>50</sub>: 1.64 µg/mL) and *T.*  
240 *vulgaris* (IC<sub>50</sub>: 4.80 µg/mL).

241 The difference, in the antioxidant capacity measure with four different tests, between the  
242 four *Thymus* species analysed in this work could be explained by different mechanisms  
243 involved in each corresponding assays. Thus, each EOs had different compounds in their  
244 composition with specific capacities to participate in those mechanisms. However, it should  
245 be borne in mind that, as mentioned Viuda-Martos, Ruiz-Navajas, Sanchez-Zapata,  
246 Fernández-López and Pérez-Alvarez (2010b) it is very difficult to attribute the antioxidant  
247 effect of an EO to one or a few main constituents, due to an EO always contains a mixture of  
248 different chemical compounds and probably their biological profiles are the result of a

249 synergism of all molecules present in the EO. Even, it is possible that the activity of the main  
250 components is modulated by other minor molecules as mentioned [Bakkali, Averbek,](#)  
251 [Averbek and Idaomar \(2008\)](#). However, it should be borne in mind that the activities of EOs  
252 such as antioxidants depend not only on their structural features but also on many other  
253 factors, such as concentration, temperature, light, type of substrate, and physical state of the  
254 system, as well as on microcomponents acting as pro-oxidants or synergists ([Yanishlieva,](#)  
255 [2001](#)). Anyway, the use of EOs and their isolated components are new approaches to increase  
256 their efficacy, taking advantage of their synergistic and additive effects ([Bassolé and Rodolfo-](#)  
257 [Juliani, 2012](#)).

### 258 **3.2. Antibacterial activity**

259 The antibacterial activity of EOS obtained from *T. zygis*, *T. mastichina*, *T. capitatus* and *T.*  
260 *vulgaris* was determined by the application of disk diffusion against a panel of ten bacteria  
261 commonly associated with refrigerated foods: as indicator of pathogenic microorganism or as  
262 spoilage microorganism using as culture medium extracts obtained from meat homogenates.  
263 Table 2 shows the antibacterial activity of *Thymus* EOs using as culture medium a minced  
264 beef extract. All EOs studied showed growth inhibitory activity against all strains tested. In  
265 this way, all EOs tested showed the largest halos of inhibition against *A. faecalis* and *L.*  
266 *innocua* strains. For both bacteria all EOs were extremely active. In the case of *A. faecalis*  
267 was *T. capitatus* EO which showed greater inhibition halos ( $p < 0.05$ ) followed by *T. zygis*, *T.*  
268 *vulgaris* and *T. mastechina* EOs while for *L. innocua* the EO obtained from *T. zygis* had a  
269 greater inhibition halos ( $p < 0.05$ ) followed by *T. mastechina*, *T. vulgaris* and *T. capitatus* EOs  
270 which not showed differences ( $p > 0.05$ ) between them. For *E. amnigenus*, *E. gergoviae* and *P.*  
271 *fluorescens* were *T. zygis* and *T. capitatus* EOS which showed higher inhibitory activity of  
272 these strains with no statistically differences ( $p > 0.05$ ) between them. These EOs were  
273 moderately active against *Enterobacter* spp. and active on *P. fluorescens*. For *A. denitrificans*,

274 *A. hydrophila*, *P. fragi*, *S. marcescens* and *S. putrefaciens* was *T. capitatus* EO which showed  
275 the highest inhibition halos ( $p < 0.05$ ) and their activity, against these strains, could be  
276 classified as active or extremely active. For these bacteria, the next more effective was *T.*  
277 *zygis* EO their activity, could be classified as moderately active or active.

278 As regard the antibacterial activity of *Thymus* EOs using as culture medium a cooked ham  
279 extract (Table 3). Again all EOs analyzed had antibacterial activity on all bacteria strains  
280 tested. Except for *S. putrefaciens*, *T. mastichina* EO showed the lowest inhibition zones  
281 ( $p < 0.05$ ) of all EOs analyzed and it could be classified as not active or active depending of  
282 bacteria strain. On the other hand, *T. capitatus* EO showed the greater ( $p < 0.05$ ) inhibition  
283 halos against *A. denitrificans*, *A. faecalis*, *E. amnigenus* and *P. fluorescens* while *T. zygis* EO  
284 had the higher inhibition halos ( $p < 0.05$ ) against *L. innocua*, *A. hydrophila* and *P. fragi*. These  
285 EOs, against these strains, could be classified as moderately active or active. For *E.*  
286 *gergoviae* and *S. marcescens* no statistical differences ( $p > 0.05$ ) were found between *T.*  
287 *capitatus* and *T. zygis* EOs.

288 Table 4 showed the antibacterial activity of *T. capitatus*, *T. mastechina*, *T. vulgaris* and *T.*  
289 *zygis* EOs against several bacteria strains using as culture medium a dry-cured sausage  
290 extract. In this case not all EOs studied showed growth inhibitory activity against all strains  
291 tested. Thus, for *E. gergoviae* only *T. vulgaris* EO produce inhibition halos while for *A.*  
292 *faecalis* and *E. amnigenus* only *T. mastechina* and *T. vulgaris* EOS had antibacterial activity  
293 being *T. vulgaris* EO which presented higher ( $p < 0.05$ ) inhibition halos. For *A. hydrophila*, *A.*  
294 *denitrificans*, *S. marcescens* and *S. putrefaciens* strains the EOs obtained from *T. capitatus*  
295 and *T. zygis* showed a greater inhibition halos with no statistically differences ( $p > 0.05$ )  
296 between them. These EOs could be classified as moderately active against these bacteria  
297 except on *A. hydrophila*. In this case their activity is extremely active. In the case of

298 *Pseudomonas* (*P. fragi* and *P. fluorescens*) was *T. capitatus* EO which showed the greatest  
299 inhibition halos ( $p < 0.05$ ) followed by *T. zygis*, *T. mastechina* and *T. vulgaris* EOs.

300 As far our knowledge, there are no studies where the antibacterial activity of *Thymus* EOs  
301 were determined using as culture medium extracts from meat homogenates. However, the  
302 antibacterial activity of EOs obtained from *Thymus* species is widely determined. Therefore,  
303 Ruiz-Navajas, Viuda-Martos, Sendra, Perez-Alvarez and Fernández-López (2012) informed  
304 that the EOs obtained from two *Thymus* species endemic of eastern of Spain such as *Thymus*  
305 *moroderi* and *Thymus piperella* are a source of important bioactive compounds with  
306 antibacterial capacities against several Gram-positive and Gram-negative bacteria. The  
307 inhibition zones of microbial strains were in the range of 16.0-45.00 mm. Likewise, Fatma,  
308 Mouna, Mondher and Ahmed (2014) investigated the antibacterial activity of *Thymus hirtus*  
309 sp. *Algeriensis* EO cultivated in Tunisia against six bacterial strains namely *Escherichia coli*,  
310 *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteridis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and  
311 *Listeria monocytogenes*. These authors found that *T. hirtus* sp. *Algeriensis* EO was capable to  
312 inhibit the growth of bacteria organisms tested with inhibition zones comprised between 9 and  
313 65 mm. Similarly, Tepe, Sarikurkcu, Berk, Alim and Akpulat (2011) analyzed the  
314 antibacterial potential of *Thymus hyemalis* EO against several bacterial strains and they found  
315 that in the presence of this EO, no activity was observed against *Enterobacter aerogenes*,  
316 *Klebsiella pneumonia*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*. The most  
317 sensitive microorganisms were determined as *Bacillus cereus* and *B. subtilis* with a MIC  
318 value of 31.25 mg/mL, while *Enterococcus faecalis* and *S. aureus* had MIC values of 62.50  
319 mg/mL. De Martino, Bruno, Formisano, De Feo, Napolitano and Rosselli (2009) investigated  
320 the antibacterial properties of EOS obtained from *Thymus longicaulis* and *Thymus*  
321 *pulegioides*. These EOs showed important antibacterial activity against *Staphylococcus*

322 *aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*,  
323 *Enterobacter coli*, *Salmonella typhi* Ty2 and *Pseudomonas aeruginosa*.

324 The antibacterial data obtained in this work showed that certain compounds in the oils  
325 were successfully antibacterial; augmenting oils significance in inhibiting microbial  
326 pathogens (Bassolé and Rodolfo-Juliani, 2012). Terpenes have been widely demonstrated as  
327 potent antimicrobial compounds, and their considerable contribution to the *Thymus* EOs  
328 composition could be responsible for the antibacterial activities achieved in the present study.  
329 Thus, some researchers reported that there is a relationship between the chemical composition  
330 of the most abundant components in the EO and the antimicrobial activity (Djenane,  
331 Yangüela, Montañés, Djerbal, & Roncalés, 2011). For instance, the main components of  
332 *Thymus* EOs analyzed in this work, thymol, carvacrol, linalool and 1,8-cineol have been  
333 found in previous studies to exhibit a strong antibacterial (Rimá de Oliveira, et al., 2015;  
334 Moon & Rhee, 2016; Duarte, Luís, Oleastro, & Domingues, 2016). Nonetheless, as occurs  
335 with the antioxidant activity the antibacterial properties showed by *Thymus* EOs analyzed in  
336 the present study could result from a synergistic effect of more than one component.

337 Additionally, it should be borne in mind, that when the EOs are used as antimicrobial  
338 agents in food systems higher concentrations of EOs are needed to have comparable  
339 antimicrobial effects as those obtained *in vitro*. Factors present in complex food matrices such  
340 as fat content, proteins, water activity, pH, and enzymes can potentially diminish the efficacy  
341 of EOs (Burt, 2004). Thus, high levels of fat and protein in food protect, in a certain sense, the  
342 bacteria strains from the action of EOs. Therefore, if the EOs are dissolved in the lipid phase  
343 of the food, it will be less available to act on the bacteria strains which are present in the  
344 aqueous phase. It is also important to highlight that depending on how the fat fraction of food  
345 is found, either emulsified, degraded by action of the fermentation and curing process or  
346 unaltered, the EOs exert more or less activity against microbial growth, as it is shown in this



347 paper. Conversely, food carbohydrates not appear to protect the bacteria against the action of  
348 EOS as well as fats and proteins.

349 Although the EOs showed antibacterial properties, the reason behind this ability are not  
350 well documented. In this way, different mechanisms of action have been suggested. Thus, the  
351 available literature data show that the primary site of the toxic action of EOs is generally the  
352 plasmic membrane. Thus, [Horvathova et al., \(2014\)](#) mentioned that the effectiveness of EOs  
353 against several microorganisms is related to their hydrophobicity, which enables them to  
354 integrate into the lipids of the cell membrane and mitochondria, rendering them permeable  
355 and leading to leakage of cell contents. [Gao, Tian, Lu, Xu, Luo and Guo, \(2011\)](#) reported that  
356 membrane function could be disturbed by inhibition of proton motive force and electron  
357 transfer, or disruption of synthesis of critical macromolecules such as nucleic acid and  
358 protein. [Arques, Rodriguez, Nuñez and Medina \(2008\)](#) proposed that the EOs affect microbial  
359 cells by various antimicrobial mechanisms, including disrupting enzyme systems,  
360 compromising the genetic material of bacteria and forming fatty acid hydroperoxidase caused  
361 by oxygenation of unsaturated fatty acids. The essential oils might also inhibit the activity of  
362 protective enzymes and sequentially inhibit one or more biochemical pathways as mentioned  
363 [Xing, Xu, Li, Che and Yun \(2012\)](#).

364

#### 365 **4. Conclusion**

366 The essential oils obtained from *Thymus vulgaris*, *Thymus mastichina* and mainly from  
367 *Thymus zygis* and *Thymus capitatus* may be used, by the food industry in general and the meat  
368 industry in particular, as potential natural or “green” additives to replace or reduce the use of  
369 chemical ones since showing significant antioxidant and antibacterial properties. In addition,  
370 their efficacy, as antibacterial agents has been demonstrated in model systems that closely  
371 simulate food composition. However, the use of these essential oils could be restricted by

372 changes to the organoleptic properties of foods which are added. So, the most suitable  
373 essential oil must be chosen, at the right concentration, for each type of food.

374

## 375 **5. References**

376 Adrar, N., Oukil, N., & Bedjou, F. (2015). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus*  
377 *numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops*  
378 *and Products*, In Press. doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.007.

379 Ali, I. B. E., Chaouachi, M., Bahri, R., Chaieb, I., Boussaïd, M., & Harzallah-Skhiri, F.  
380 (2015). Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal  
381 activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Industrial Crops and*  
382 *Products*, 77, 631-639.

383 Alves-Silva, J. M., Dias dos Santos, S. M., Pintado, M. E., Pérez-Álvarez, J. A., Fernández-  
384 López, J., & Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antimicrobial,  
385 antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely  
386 used in Portugal. *Food Control*, 32, 371-378.

387 Arques, J. L., Rodriguez, E., Nuñez, M., & Medina, M. (2008). Inactivation of gram-negative  
388 pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase  
389 system. *European Food Research and Technology*, 227, 77-82.

390 Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential  
391 oils-A review. *Food Chemistry and Toxicology*, 46, 446-475.

392 Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez J. A., & Viuda-Martos,  
393 M. (2013). Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of  
394 four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, 50, 304-311.

395 Bassolé, I. H., & Rodolfo-Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their  
396 antimicrobial properties. *Molecules*, 17, 3989-4006.

397 Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to  
398 evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.

399 Carson, C. F. and Hammer, K. A. (2011). Chemistry and bioactivity of EOs. In H. Thormar  
400 (Eds), *Lipids and EOs as antimicrobial agents* (pp. 307-335.) West Sussex, UK: John  
401 Wiley & Sons, Ltd.

402 Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level  
403 with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, 40, 450-458.

404 Číž, M., Čížová, H., Denev, P., Kratchanova, M., Slavov, A., & Lojek, A. (2010). Different  
405 methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food*  
406 *Control*, 21(4), 518-523.

407 De Martino, L., Bruno, M., Formisano, C., De Feo, V., Napolitano, F., & Rosselli, S. (2009).  
408 Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of  
409 *Thymus* growing wild in southern Italy. *Molecules*, 14, 4614-4624.

410 Djabou, N., Lorenzi, V., Guinoiseau, E., Andreani, S., Giuliani, M. C., Desjobert, J. M.,  
411 Bolla, J. M., Costa, J., Berti, L., Luciani, A., & Muselli, A. (2013). Phytochemical com-  
412 position of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or  
413 toxi-infectious pathogens. *Food Control*, 30, 354-363.

414 Djenane, D., Yangüela, J., Montañés, L., Djerbal, M., & Roncalés, P. (2011). Antimicrobial  
415 activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria*  
416 *monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: efficacy and synergistic potential in  
417 minced beef. *Food Control*, 22, 1046-1053.

418 Duarte, A., Luís, A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016). Antioxidant properties of  
419 coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter* spp. *Food*  
420 *Control*, 61, 115-122.

421 Fatma, G., Mouna, B. F., Mondher, M., & Ahmed, L. (2014). In vitro assessment of  
422 antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Thymus*  
423 *hirtus* sp. *Algeriensis*. *Lipids in Health and Disease*, 13, 114-126.

424 Gao, C., Tian, C., Lu, Y., Xu, J., Luo, J., & Guo, X. (2011). Essential oil composition and  
425 antimicrobial activity of *Sphallerocarpus gracilis* seeds against selected food-related  
426 bacteria. *Food Control*, 22, 517-522.

427 Grunert, K. G. (2006). Future trends and consumer lifestyles with regard to meat  
428 consumption. *Meat Science*, 74, 149-160.

429 Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential  
430 oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food  
431 components. *Food Microbiology*, 26, 142-150.

432 Horvathova, E., J. Navarova, J., Galova, E., Sevcovicova, A., Chodakova, L., Snahnicanova,  
433 Z., Melusova, M., Kozics, K., & Slamenova, D. (2014). Assessment of antioxidative,  
434 chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol,  
435 carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil.  
436 *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 663-6639.

437 Kadri, A., Zarai, Z., Chobba, I. B., Gharsallah, N., Damak, M., & Békir, A. (2013). Chemical  
438 composition and in vitro antioxidant activities of *Thymelaea hirsuta* L: essential oil from  
439 Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10, 2930-2935.

440 Leite, A., Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Marostica Junior, M.  
441 R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba  
442 peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59,  
443 2277-2283.

444 Majouli, K., Besbes Hlila, M., Hamdi, A., Flamini, G., Ben Jannet, H., & Kenani, A. (2016).  
445 Antioxidant activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertia cheirifolia*  
446 (L.). *Industrial Crops and Products*, 82, 23-28.

447 Moon, H., & Rhee, M. S. (2016). Synergism between carvacrol or thymol increases the  
448 antimicrobial efficacy of soy sauce with no sensory impact. *International Journal of Food*  
449 *Microbiology*, 217, 35-41.

450 Nikolić, M., J. Glamočlija, I. C. F. R., Ferreira, R. C. Calhelha, Â., Fernandes, T., Marković,  
451 D., Marković, A., Giweli, M., & Soković, M. (2014). Chemical composition,  
452 antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus*  
453 *algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and*  
454 *Products*, 52, 183-190.

455 Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of  
456 products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japan Journal of Nutrition*, 44,  
457 307-315.

458 Ozen, T., Demirtas, I., & Aksit, H. (2011). Determination of antioxidant activities of various  
459 extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*.  
460 *Food Chemistry*, 124, 58-64.

461 Rimá de Oliveira, K. A., Pereira de Sousa, J., da Costa Medeiros, J. A., Queiroz de  
462 Figueiredo, R. C., Magnani, M., Pinto de Siqueira Júnior, J., & Leite de Souza, E. (2015).  
463 Synergistic inhibition of bacteria associated with minimally processed vegetables in mixed  
464 culture by carvacrol and 1,8-cineole. *Food Control*, 47, 334-339.

465 Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J.  
466 (2013). In vitro antioxidant and antifungal properties of essential oils obtained from  
467 aromatic herbs endemic to the southeast of Spain. *Food Protection*, 76, 1218-1225

468 Ruiz-Navajas, Y., Viuda-Martos, M., Sendra, E., Perez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J.  
469 (2012). Chemical characterization and antibacterial activity of *Thymus moroderi* and  
470 *Thymus piperella* essential oils, two *Thymus* endemic species from southeast of Spain.  
471 *Food Control*, 27, 294-299.

472 Tepe, B., Sarikurcu, C., Berk, S., Alim, A., & Akpulat, H. A. (2011). Chemical composition,  
473 radical scavenging and antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus boveii* and  
474 *Thymus hyemalis*. *Records of Natural Products*, 5, 208-220.

475 Tepe, B., Sokmen, M., Sokmen, A., Daferera, D., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and  
476 antioxidative activity of essential oil and various extracts of *Cyclotrichium origanifolium*  
477 (Labill.) Manden. & Scheng. *Journal of Food Engineering*, 69, 335-342.

478 Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., & Perez-Alvarez, J. A. (2008).  
479 Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit  
480 (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19, 1130-  
481 1138.

482 Viuda-Martos, M., El-Gendy, G. S. A., Sendra, E., Fernández-López, J., Razik, K. A. A.,  
483 Omer, E. A., & Pérez-Alvarez, J. A. (2010a). Chemical composition and antioxidant and  
484 anti-listeria activities of essential oils obtained from some Egyptian plants. *Journal of*  
485 *Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9063-9070.

486 Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Sanchez-Zapata, E., Fernández-López, J., & Pérez-  
487 Alvarez, J. A. (2010b). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely  
488 used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 13-19.

489 Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. A. (2011).  
490 Spices as Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 13-28.

491 Xing, Y., Xu, Q., Li, X., Che, Z., & Yun, J. (2012). Antifungal activities of clove against  
492 *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* *in vitro* and in wounded  
493 fruit test. *Journal of Food Safety*, 32, 84-93.

494 Yanishlieva, N. V. (2001). Inhibiting oxidation, In J. Pokorny, N. Yanishlieva, & M. Gordon  
495 (Eds.), *Antioxidants in food: practical applications* (pp. 22-69). Cambridge, UK:  
496 Woodhead Publishing Ltd.

497 Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouarid, S., Bougatef, A. Karraya, A., Neffati, M., & Ayadie M. A.  
498 (2011). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant  
499 and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut.  
500 (*Lamiaceae*). *Food and Bioproducts Processing*, 89, 257-265.



**Table 1.** Antioxidant activity of essential oils obtained from *T. capitatus*, *T. mastichina*, *T. vulgaris* and *T. zygis* determined using four different methods such as DPPH, ABTS, FRAP and FIC.

	DPPH Assay IC <sub>50</sub> (mg/mL)	ABTS assay IC <sub>50</sub> (mg/mL)	FIC assay IC <sub>50</sub> (mg/mL)	FRAP assay (mg TE/mL)
<i>T. mastichina</i>	3.11±0.11 <sup>b</sup>	3.73±0.14 <sup>b</sup>	9.61±0.19 <sup>b</sup>	19.26±0.10 <sup>c</sup>
<i>T. zygis</i>	0.90±0.03 <sup>c</sup>	2.07±0.06 <sup>c</sup>	4.95±0.14 <sup>c</sup>	49.56±0.09 <sup>b</sup>
<i>T. vulgaris</i>	4.05±0.09 <sup>a</sup>	6.46±0.11 <sup>a</sup>	13.29±0.18 <sup>a</sup>	12.69±0.03 <sup>d</sup>
<i>T. capitatus</i>	0.60±0.02 <sup>d</sup>	1.41±0.05 <sup>d</sup>	4.44±0.16 <sup>d</sup>	58.12±0.25 <sup>a</sup>

Values followed by the same lower case letter within the same column are not significantly different ( $p > 0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.





**Table 2.** Antibacterial activity of *T. capitatus*, *T. mastechina*, *T. vulgaris* and *T. zygis* EOs against several bacterial strains using as culture medium minced beef extract.

	Diameter of inhibition zone (mm) including disc (9 mm)			
	<i>T. capitatus</i>	<i>T. mastechina</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. zygis</i>
<i>A. denitrificans</i>	28.37±0.11 <sup>aD</sup> (++)	11.29±0.00 <sup>dE</sup> (-)	19.82±0.97 <sup>cB</sup> (+)	23.92±2.72 <sup>bD</sup> (++)
<i>A. faecalis</i>	35.12±0.30 <sup>aA</sup> (+++)	16.91±1.17 <sup>dB</sup> (+)	32.73±0.33 <sup>cA</sup> (+++)	33.85±0.36 <sup>bB</sup> (+++)
<i>A. hydrophila</i>	30.69±1.88 <sup>aC</sup> (+++)	14.70±0.98 <sup>dC</sup> (+)	16.04±0.11 <sup>cC</sup> (+)	19.35±0.07 <sup>bE</sup> (+)
<i>E. amnigenus</i>	16.80±0.28 <sup>aE</sup> (+)	10.97±0.01 <sup>cF</sup> (-)	12.43±0.18 <sup>b</sup> (+)	17.98±1.67 <sup>aE</sup> (+)
<i>E. gergoviae</i>	13.78±0.63 <sup>aF</sup> (+)	10.82±0.06 <sup>bF</sup> (-)	10.77±1.42 <sup>bE</sup> (-)	13.92±0.08 <sup>aF</sup> (+)
<i>L. innocua</i>	34.07±1.68 <sup>bA</sup> (+++)	34.98±1.67 <sup>bA</sup> (+++)	33.77±3.35 <sup>bA</sup> (+++)	45.37±5.98 <sup>aA</sup> (+++)
<i>P. fluorescens</i>	29.36±2.11 <sup>aCD</sup> (++)	12.07±1.10 <sup>cDE</sup> (+)	19.91±2.55 <sup>bB</sup> (+)	27.72±0.68 <sup>aC</sup> (++)
<i>P. fragi</i>	29.80±2.16 <sup>aCD</sup> (++)	11.61±0.01 <sup>dE</sup> (-)	16.23±2.29 <sup>cCD</sup> (+)	26.61±1.90 <sup>bC</sup> (++)
<i>S. marcescens</i>	29.06±1.10 <sup>aCD</sup> (++)	11.84±0.49 <sup>cE</sup> (-)	16.84±1.10 <sup>bCD</sup> (+)	16.96±0.05 <sup>bE</sup> (+)
<i>S. putrefaciens</i>	32.04±0.01 <sup>aB</sup> (+++)	13.09±0.40 <sup>dD</sup> (+)	15.34±0.00 <sup>cD</sup> (+)	20.85±3.28 <sup>bDE</sup> (+)

For the same bacteria, values followed by the same lower case letter within the same row are not significantly different ( $p > 0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.

For the same essential oil values followed by the same upper case letter within the same column are not significantly different ( $p > 0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.

Essential oils are classified as (-) not active, (+) moderately active, (++) active and (+++) extremely active.

**Table 3.** Antibacterial activity of *T. capitatus*, *T. mastechina*, *T. vulgaris* and *T. zygis* EOs against several bacterial strains using as culture medium cooked ham extract.

	Diameter of inhibition zone (mm) including disc (9 mm)			
	<i>T. capitatus</i>	<i>T. mastechina</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. zygis</i>
<i>A. denitrificans</i>	14.70±0.14 <sup>aE</sup> (+)	13.29±0.61 <sup>bcB</sup> (+)	13.59±0.00 <sup>bE</sup> (+)	13.11±0.13 <sup>cE</sup> (+)
<i>A. faecalis</i>	32.25±0.01 <sup>aA</sup> (+++)	15.34±0.70 <sup>cA</sup> (+)	24.55±1.44 <sup>bA</sup> (++)	25.39±1.96 <sup>bA</sup> (++)
<i>A. hydrophila</i>	14.49±0.39 <sup>bE</sup> (+)	12.13±0.34 <sup>cC</sup> (+)	14.74±0.08 <sup>bD</sup> (+)	18.51±0.24 <sup>aB</sup> (+)
<i>E. amnigenus</i>	16.29±0.50 <sup>aC</sup> (+)	10.69±0.37 <sup>cE</sup> (-)	10.87±0.10 <sup>cF</sup> (-)	15.08±0.90 <sup>bD</sup> (+)
<i>E. gergoviae</i>	16.51±1.73 <sup>aC</sup> (+)	13.81±0.28 <sup>cB</sup> (+)	14.46±0.20 <sup>bDE</sup> (+)	17.32±0.97 <sup>aC</sup> (+)
<i>L. innocua</i>	20.86±0.59 <sup>bB</sup> (++)	15.23±1.22 <sup>cA</sup> (+)	22.35±0.40 <sup>aB</sup> (++)	23.01±0.78 <sup>aA</sup> (++)
<i>P. fluorescens</i>	17.71±0.85 <sup>aC</sup> (+)	12.86±0.56 <sup>dC</sup> (+)	13.93±0.45 <sup>cE</sup> (+)	15.48±0.25 <sup>bD</sup> (+)
<i>P. fragi</i>	15.17±0.15 <sup>bD</sup> (+)	11.78±0.06 <sup>dD</sup> (-)	14.30±0.64 <sup>cDE</sup> (+)	16.68±0.37 <sup>aC</sup> (+)
<i>S. marcescens</i>	16.59±1.09 <sup>aC</sup> (+)	12.69±0.01 <sup>bC</sup> (+)	15.95±0.80 <sup>aC</sup> (+)	15.15±0.00 <sup>aD</sup> (+)
<i>S. putrefaciens</i>	13.75±0.00 <sup>bF</sup> (+)	14.34±0.23 <sup>aA</sup> (+)	9.77±0.04 <sup>dG</sup> (-)	12.98±0.11 <sup>cE</sup> (+)

For the same bacteria, values followed by the same lower case letter within the same row are not significantly different ( $p > 0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.

For the same essential oil values followed by the same upper case letter within the same column are not significantly different ( $p > 0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.

Essential oils are classified as (-) not active, (+) moderately active, (++) active and (+++) extremely active.

**Table 4.** Antibacterial activity of *T. capitatus*, *T. mastechina*, *T. vulgaris* and *T. zygis* EOs against several bacterial strains using as culture medium a dry-cured sausage extract.

	Diameter of inhibition zone (mm) including disc (9 mm)			
	<i>T. capitatus</i>	<i>T. mastechina</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>T. zygis</i>
<i>A. denitrificans</i>	20.75±1.57 <sup>aC</sup> (+)	15.87±1.10 <sup>bE</sup> (+)	15.99±1.03 <sup>b</sup> (+)	20.63±0.28 <sup>aC</sup> (+)
<i>A. faecalis</i>	9.00±0.00 <sup>cE</sup> (-)	16.03±0.30 <sup>bE</sup> (+)	21.38±2.08 <sup>a</sup> (++)	9.00±0.00 <sup>cF</sup> (-)
<i>A. hydrophila</i>	38.18±1.48 <sup>aA</sup> (+++)	24.94±0.11 <sup>cA</sup> (++)	29.91±5.12 <sup>b</sup> (++)	40.72±0.85 <sup>aB</sup> (+++)
<i>E. amnigenus</i>	9.00±0.00 <sup>cE</sup> (-)	17.31±0.29 <sup>bC</sup> (+)	19.19±1.08 <sup>a</sup> (+)	9.00±0.00 <sup>cF</sup> (-)
<i>E. gergoviae</i>	9.00±0.00 <sup>bE</sup> (-)	9.00±0.00 <sup>bH</sup> (-)	12.85±0.44 <sup>a</sup> (+)	9.00±0.00 <sup>bF</sup> (-)
<i>L. innocua</i>	38.59±1.37 <sup>bA</sup> (+++)	19.45±1.03 <sup>dB</sup> (+)	22.82±0.45 <sup>c</sup> (++)	50.97±5.17 <sup>aA</sup> (+++)
<i>P. fluorescens</i>	19.28±0.15 <sup>aC</sup> (+)	16.70±0.33 <sup>cD</sup> (+)	11.49±0.19 <sup>d</sup> (-)	18.99±0.90 <sup>bD</sup> (+)
<i>P. fragi</i>	30.11±0.02 <sup>aB</sup> (+++)	14.19±0.06 <sup>cF</sup> (+)	13.26±0.66 <sup>d</sup> (+)	18.49±0.28 <sup>bD</sup> (+)
<i>S. marcescens</i>	16.60±0.33 <sup>aD</sup> (+)	11.49±0.02 <sup>cG</sup> (-)	14.82±0.76 <sup>b</sup> (+)	16.64±0.10 <sup>aE</sup> (+)
<i>S. putrefaciens</i>	18.96±0.88 <sup>aC</sup> (+)	15.82±0.08 <sup>bE</sup> (+)	13.45±1.66 <sup>c</sup> (+)	18.87±0.51 <sup>aD</sup> (+)

For the same bacteria, values followed by the same lower case letter within the same row are not significantly different ( $p > 0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.

For the same essential oil values followed by the same upper case letter within the same column are not significantly different ( $p > 0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.

Essential oils are classified as (-) not active, (+) moderately active, (++) active and (+++) extremely active.

**Título:** Antibacterial and antioxidant activities of chitosan edible films incorporated with organic essential oils obtained from four *Thymus* species.

**Autores:** Carmen Ballester-Costa, Esther Sendra, Juana Fernández-López, M. Viuda-Martos

**Revista:** Journal of Food Science and Technology

**Año:** 2016

# Journal of Food Science and Technology

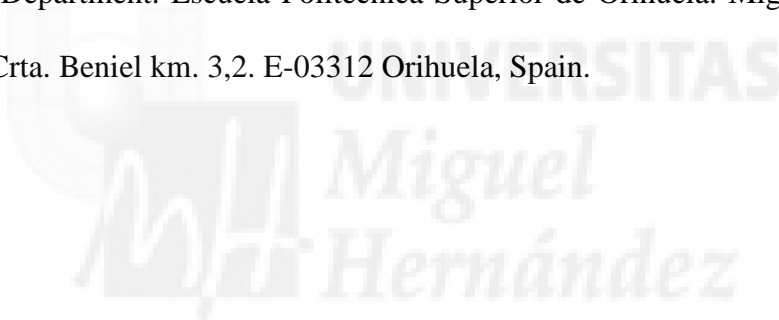
## Evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of chitosan edible films incorporated with organic essential oils obtained from four *Thymus* species --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	JFST-D-16-00514
<b>Full Title:</b>	Evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of chitosan edible films incorporated with organic essential oils obtained from four <i>Thymus</i> species
<b>Article Type:</b>	Short Communication
<b>Corresponding Author:</b>	Manuel Viuda-Martos, Ph.D Universidad Miguel Hernandez de Elche Orihuela, Alicante SPAIN
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidad Miguel Hernandez de Elche
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Carmen Ballester-Costa, Ph.D student
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Carmen Ballester-Costa, Ph.D student Esther Sendra, Ph.D Juana Fernández-López, Ph.D Manuel Viuda-Martos, Ph.D
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p>The aims of this study were to evaluate, (i) the antibacterial properties, (ii) the total phenol content (TPC) and (iii) the antioxidant activity, of chitosan edible films incorporated with certified organic essential oils (EOs) of <i>Thymus zygis</i>, <i>Thymus mastichina</i>, <i>Thymus capitatus</i> and <i>Thymus vulgaris</i>. The agar disc diffusion method was used to determine the antibacterial activities of chitosan edible films while for the antioxidant activity, two different analytical assays were used (DPPH and FRAP). As regard antibacterial activity, films containing only chitosan were not effective against any of tested bacteria. Chitosan films containing <i>T. capitatus</i> EO (CH+TCEO) was more effective against <i>Listeria innocua</i> and <i>Alcaligenes faecalis</i> whilst chitosan films containing <i>T. mastichina</i> EO (CH+TMEO) had the highest inhibition halos against <i>Serratia marcescens</i>. For and <i>Enterobacter amnigenus</i> no antibacterial activity was achieved. As regards the antioxidant activity, all chitosan films added with <i>Thymus</i> essential oils showed antioxidant activity, at all concentrations and with all methods assayed. In DPPH assay CH+TCEO had highest antioxidant activity. However in FRAP assay CH+TCEO showed best antioxidant effect.</p> <p>The results showed that chitosan edible films incorporated with organic <i>Thymus</i> EOs could be used as active films in food industry due to its antibacterial and antioxidant activities.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	<p>Annalisa Serio, PhD Assistant Professor, Univeristy of Teramo aserio@unite.it</p> <p>Victor Kuri, PhD Lecture in Food Quality, University of Plymouth V.Kuri@plymouth.ac.uk</p> <p>Freni K Tavaría, PhD Assistant Professor, Catholic University of Porto</p>

**Evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of chitosan edible films incorporated with organic essential oils obtained from four *Thymus* species**

Carmen Ballester-Costa, Esther Sendra, Juana Fernández-López, Manuel Viuda-Martos

IPOA Research Group (UMH-1 and REVIV-Generalitat Valenciana). AgroFood Technology Department. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Miguel Hernández University. Crta. Beniel km. 3,2. E-03312 Orihuela, Spain.



**Corresponding author:** Dr. Manuel Viuda-Martos. AgroFood Technology Department. Miguel Hernández University. E-mail: [mviuda@umh.es](mailto:mviuda@umh.es) Tel.: +34 966749661.

## 1 **Research highlights**

- 1  
2 ✓ Chitosan films (CH) were added with four organic *Thymus* essential oils (EOs)  
3  
4  
5 3 ✓ CH added with *Thymus* EOs showed moderated antibacterial activity.  
6  
7 4 ✓ CH added with *Thymus* EOs exhibited a high antioxidant activity.  
8  
9  
10 5 ✓ CH added with *Thymus* EOs could be use as preservative in food industry.  
11  
12 6  
13  
14 7  
15  
16  
17 8  
18  
19 9  
20  
21  
22 10  
23  
24 11  
25  
26 12  
27  
28 13  
29  
30 14  
31  
32 15  
33  
34 16  
35  
36 17  
37  
38 18  
39  
40 19  
41  
42 20  
43  
44 21  
45  
46 22  
47  
48 23  
49  
50 24  
51  
52 25  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



26 **Abstract**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

27 The aims of this study were to evaluate, (i) the antibacterial properties, (ii) the total  
28 phenol content (TPC) and (iii) the antioxidant activity, of chitosan edible films  
29 incorporated with certified organic essential oils (EOs) of *Thymus zygis*, *Thymus*  
30 *mastichina*, *Thymus capitatus* and *Thymus vulgaris*. The agar disc diffusion method was  
31 used to determine the antibacterial activities of chitosan edible films while for the  
32 antioxidant activity, two different analytical assays were used (DPPH and FRAP).

33 As regard antibacterial activity, films containing only chitosan were not effective  
34 against any of tested bacteria. Chitosan films containing *T. capitatus* EO (CH+TCEO)  
35 was more effective against *Listeria innocua* and *Alcaligenes faecalis* whilst chitosan  
36 films containing *T. mastichina* EO (CH+TMEO) had the highest inhibition halos against  
37 *Serratia marcescens*. For and *Enterobacter amnigenus* no antibacterial activity was  
38 achieved. As regards the antioxidant activity, all chitosan films added with *Thymus*  
39 essential oils showed antioxidant activity, at all concentrations and with all methods  
40 assayed. In DPPH assay CH+TZEO had highest antioxidant activity. However in FRAP  
41 assay CH+TCEO showed best antioxidant effect.

42 The results showed that chitosan edible films incorporated with organic *Thymus* EOs  
43 could be used as active films in food industry due to its antibacterial and antioxidant  
44 activities.

46 **Keywords:** Essential oils, chitosan films, *Thymus*, antibacterial, antioxidant



## 51 Introduction

52 Presently, the amount of research involving the production and characterization of  
53 biodegradable films has increased substantially, mainly due to interest in minimizing the  
54 ecological impact caused by the use of synthetic packaging materials. Furthermore,  
55 biodegradable films are excellent vehicles for incorporating a wide variety of additives,  
56 such as antioxidants, antifungal agents, antimicrobials, colours, and other nutrients (Rhim  
57 and Ng 2007). Chitosan, poly- $\beta$ -(1/4) N-acetyl-D-glucosamine, has a great potential to be  
58 used as alternative resources for active food packaging or food applications due to its  
59 biodegradability, biocompatibility, non-toxicity and film-forming capacity (Tharanathan  
60 and Kittur 2003). In addition, it has intrinsic antioxidant and antimicrobial properties,  
61 which are affected by its molecular weight and concentration. Therefore, chitosan has  
62 been used as antimicrobial films and coatings due to its effectiveness of inhibiting the  
63 growth of not only Gram-positive and Gram-negative bacteria but also yeasts and moulds  
64 (Siripatrawan and Harte 2010). Additionally, functional substances, such as flavonoids or  
65 essential oils have been incorporated into chitosan to enhance its antibacterial and  
66 antioxidant activity (Ruiz-Navajas et al. 2013; Sánchez-González et al. 2010). Essential  
67 oils (EOs) are gaining interest for their potential as preservatives and as decontamination  
68 agents since such substances have been generally recognized as safe (GRAS) and are  
69 widely accepted by consumers (Burt 2004). Nevertheless, direct application to foods, as a  
70 preservative, may be limited, since (i) it can be lost during storage due to its high  
71 volatility (ii) it can react with various food components and (iii) it can have detrimental  
72 effects on the organoleptic properties. Nonetheless, the EOs can be added to edible films  
73 and maintain all its properties. Thus, the aims of this study were to evaluate, (i) the  
74 antibacterial properties, (ii) the total phenol content (TPC) and (iii) the antioxidant  
75 activity, of chitosan edible films incorporated with certified organic EOs of *Thymus zygis*,

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

76 *Thymus mastichina*, *Thymus capitatus* and *Thymus vulgaris* to define, if the chitosan  
77 edible films incorporated with these EOs could be used as natural active films for food  
78 use.

## 79 **Materials and Methods**

### 80 **Essential oils**

81 The essential oils (EOs) of *Thymus zygis* ref. 11961 (TZEO), *Thymus mastichina* ref.  
82 90001-1284 (TMEO), *Thymus capitatus* ref. 95001-1150 (TCEO), and *Thymus vulgaris*  
83 ref. 80001-3577 (TVEO) were used in this work. These EOs were analysed by Ballester-  
84 Costa et al. (2013). These authors reported that in TMEO the major compounds were 1,8-  
85 cineole (51.94%), and linalool (19.90%). TCEO was characterized by the presence of  
86 carvacrol (69.83%), and their precursors *p*-cymene (6.12%) and  $\gamma$ -terpinene (6.68%). As  
87 regards to TVEO, the main component was linalool (44.00%) followed by terpineol-4  
88 (11.84%). Finally, in TZEO the major components were thymol (48.59%) and *p*-cymene  
89 (18.79%). All EOs analysed were supplied by Esencias Martinez Lozano (Murcia, Spain).  
90 The EOs were organic certified by the Institute for Marketecology (IMO) according to  
91 the procedures as outlined in the USDA, AMS 7 CFR Part 205 National Organic  
92 Program, Final Rule.

### 93 **Preparation of edible films**

94 Chitosan-based film was prepared by dissolving chitosan of high molecular weight  
95 and 75-85% deacetylated (Sigma-Aldrich Chemical Co., Steinheim, Germany) in a lactic  
96 acid aqueous solution (1% v/v) at a concentration of 2% (w/v) following the  
97 recommendations of Ojagh et al. (2010). The nine samples obtained were: Chitosan film  
98 (CH), chitosan added with TZEO at 1% and 2% (CH+TZEO 1% and CH+TZEO 2%),  
99 chitosan added with TMEO at 1% and 2% (CH+TMEO 1% and CH+TMEO 2%),

100 chitosan added with TVEO at 1% and 2% (CH+TVEO 1% and CH+TVEO 2%) and  
101 chitosan added with TCEO at 1% and 2% (CH+TCEO 1% and CH+TCEO 2%).

## 102 Antibacterial activity

### 103 *Microbial strains*

104 The chitosan films incorporate with different *Thymus* EOs were individually tested  
105 against *Listeria innocua* CECT 910, *Serratia marcescens* CECT 854, *Enterobacter*  
106 *amnigenus* CECT 4078 and *Alcaligenes faecalis* CECT 145. These bacteria were chosen  
107 based on they are commonly isolated from refrigerated foods (mainly meat and meat  
108 products) or as indicators or models of food pathogenic bacteria. All strains were  
109 supplied by the Spanish Type Culture Collection (CECT) of the University of Valencia  
110 (Spain).

### 111 *Antibacterial assay*

112 The agar disc diffusion method described by Tepe et al. (2005) with some  
113 modifications was used to determine the antibacterial capacity of chitosan edible films  
114 incorporated with TZEO, TMEO, TVEO or TCEO. Briefly, a suspension (0.1 mL of 10<sup>6</sup>  
115 cfu/mL) of each microorganism was spread on the solid medium plates, nutrient Agar II  
116 in the case of *S. marcescens*, *E. amnigenus* and *A. faecalis*; and Brain Heart Infusion agar  
117 for *L. innocua*. CH, CH+TZEO, CH+TMEO, CH+TVEO or CH+TCEO edible films  
118 discs, 10 mm in diameter, were aseptically obtained and placed on the inoculated plates;  
119 these plates were incubated at 37 °C for 24 h in the case of *A. faecalis*, *E. amnigenus* and  
120 *L. innocua* and at 26 °C for 24 h for *S. marcescens*. The diameters of the inhibition zones  
121 were measured in millimetres. All tests were performed in triplicate.

### 122 Total phenol content

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

123 The total phenol content (TPC) was determined using the Folin-Ciocalteu reagent  
124 (Singleton and Rossi 1965). The results were expressed in mg gallic acid equivalents  
125 (GAE)/g films, as mean of three replicates.

126 Antioxidant activity

127 *DPPH radical scavenging assay.*

128 The efficacy of the films to scavenge 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals  
129 was determined using the methodology described by Siripatrawan and Harte (2010).  
130 Results were expressed as µg Trolox equivalent/g film as mean of three replicates.

131 *Ferric reducing antioxidant power*

132 The ferric reducing antioxidant power (FRAP) of the different films samples was  
133 determined by using the potassium ferricyanide-ferric chloride method (Oyaizu 1986).  
134 Results were expressed as mg Trolox equivalent/g film as mean of three replicates.

135 Statistical analysis

136 Data collected for antioxidant and antibacterial properties were analysed by two-way  
137 analysis of variance to test the effects of two fixed factors: concentration (levels: 1 and  
138 2%) and EO (levels: *T. zygis*, *T. capitatus*, *T. mastichina* and *T. vulgaris*). The Tukey post  
139 hoc test was applied for comparisons of means, differences were considered significant at  
140  $p > 0.05$ . Statistical analysis and comparisons among means were carried out using the  
141 statistical package Statgraphics 5.1 for Windows.

142

## 143 **Results and Discussion**

144 Antibacterial activity

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

145 Inhibition zone diameters yielded by chitosan edible film disks with various  
146 concentrations (0, 1 and 2%) of *T. zygis*, *T. capitatus*, *T. mastichina* and *T. vulgaris* EOs  
147 against test organisms are shown in Table 1. Films containing only chitosan were not  
148 effective against any of the four tested bacteria. These results are in concordance with  
149 Ruiz-Navajas et al. (2013) and Wang et al. (2011) who reported that no significant  
150 inhibition zone was observed for the pure chitosan film against *L. innocua*, *S.*  
151 *marcescens*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

152 In the case of *S. marcescens*, the antibacterial activity occurs in a concentration  
153 dependent manner. The highest inhibition halos ( $p < 0.05$ ) were obtained for CH+TMEO  
154 2% followed by CH+TVEO 2%. CH+TZEO at 1% was not active against this strain  
155 while at 2% showed the lowest ( $p < 0.05$ ) inhibition halos. As regards *L. innocua*, again  
156 the antibacterial activity occurs in a concentration dependent manner. However, in this  
157 case, was CH+TCEO 2% which produced the highest ( $p < 0.05$ ) inhibition halos followed  
158 by CH+TMEO 2%. Again, CH+TZEO 1% was not active against this strain while at 2%  
159 showed the lowest ( $p < 0.05$ ) inhibition halos. With reference to *A. faecalis* all chitosan  
160 films added with *Thymus* EOs at all concentration were capable to produced inhibitory  
161 effects and this inhibitory effect was concentration-dependent. Another time, CH+TCEO  
162 2% produce the highest ( $p < 0.05$ ) inhibition halos followed, in this case, by CH+TZEO  
163 2%. CH+TVEO showed the lowest ( $p < 0.05$ ) inhibition halos for this bacteria. *E.*  
164 *amnigenus* was the most resistant strain since any film added with *Thymus* EOs, at all  
165 concentrations assayed, was able to produce inhibition.

166 In the scientific literature there are not studies where the antibacterial activity of  
167 chitosan edible films incorporated with EOs obtained from organic growth are  
168 determined. However, the antibacterial activity of chitosan films added with EOs from  
169 conventional *Thymus* species has been studied. Thus, Hosseini et al. (2008) analysed the

170 antibacterial effects of thymes EO incorporated into chitosan-based edible films at 0.5, 1  
171 and 1.5%. These authors reported that chitosan-based films incorporated with thyme  
172 essential oil produced a larger inhibition zone against *Listeria monocytogenes*,  
173 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Gómez-  
174 Estaca et al. (2010) analysed the antimicrobial chitosan films prepared with *Thymus*  
175 *vulgaris* EO. These authors concluded that chitosan-essential oil composite films, showed  
176 a significant antimicrobial activity against *Photobacterium phosphoreum* and *Clostridium*  
177 *perfringens* and a moderate activity on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. In  
178 other study, Ruiz-Navajas et al. (2013) reported that the addition of *Thymus piperella* and  
179 *Thymus moroderi* EOs to chitosan films, in general, inhibited the growth of *L. innocua*,  
180 *Aeromonas hydrophila* and *Achromobacter denitrificans*.

181 The antibacterial activity of chitosan films added with different *Thymus* EOs could be  
182 attributed to the action of only one component presents in EOs, such as carvacrol or  
183 thymol. Thus, several *in vitro* studies demonstrated that these compounds exhibit  
184 antimicrobial activity against a broad spectrum of both Gram-negative and Gram-positive  
185 bacteria (Burt and Reinders 2003; Gaysinsky et al. 2005). However, it is a more widely  
186 held point of view that the action is due to a synergistic effect between various  
187 components, whether major or minor ones. The mechanisms behind the antimicrobial  
188 activity are not known. Nevertheless, Viuda-Martos et al. (2011) reported that the reasons  
189 behind this capacity may be an attack on the cell membrane's phospholipid bilayer, the  
190 disruption of the enzymatic systems, the compromising of the genetic material of the  
191 bacteria/yeast, the formation of fatty acid hydroperoxidase by the oxygenation of  
192 unsaturated fatty acids, the coagulation of the cytoplasm, the damage of lipids and  
193 proteins, the distortion of the proton motive force (PMF), the electron flow and/or the  
194 active transport. Burt (2004) mentioned that EOs could disintegrate the outer membrane

195 of bacteria, releasing lipopolysaccharides and increasing the permeability of the  
196 cytoplasmic membrane to adenosine tri-phosphate.

#### 197 Total phenolic content and Antioxidant activity

198 Total phenolic content (TPC) of chitosan edible films incorporated with TZEO  
199 TCEO, TVEO and TMEO, at different concentrations, was shown in Figure 1. Chitosan  
200 films (control sample) showed a TPC of 0.27 mg GAE/g film. This result was in  
201 agreement with the results reported by Moradi et al. (2012) and Ruiz-Navajas et al.  
202 (2013) where a low TPC for chitosan film was obtained. This finding could be explained  
203 to the formation of chromogens, due to the reaction of Folin and Ciocalteu reagent with  
204 non-phenolic reducing as mentioned agents Moradi et al. (2012). The results showed that  
205 the TPC in the chitosan edible films significantly increased ( $p < 0.05$ ) when increased the  
206 essential oil concentration. At high concentration (2%); CH+TZEO showed the highest  
207 ( $p < 0.05$ ) TPC of all samples analysed followed by CH+TCEO. However, at the lowest  
208 concentration (1%), no statistical differences were found ( $p > 0.05$ ) between CH+TZEO  
209 and CH+TCEO. CH+TVEO had the lowest ( $p < 0.05$ ) TPC.

210 The TPC of CH+TZEO ( $p < 0.05$ ), expressed as gallic acid equivalent (GAE), were  
211 9.86 and 11.28 mg/g of film for the concentration of 1 and 2%, respectively. In  
212 CH+TCEO the values for TPC were 9.70 and 10.77 mg GAE/g of film with statistical  
213 differences ( $p < 0.05$ ) between them.

214 As regard to the antioxidant activity, DPPH radical scavenging activity and reducing  
215 power property were used to indicate the antioxidant activity of the films. The addition of  
216 essential oil onto chitosan films enhanced their antioxidant properties compared to the  
217 control films and this enhancement was dependent on the type of essential oil used. In the  
218 DPPH assay (Table 2), the results showed that the radical scavenging activity of the

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

219 chitosan films was significantly increased ( $p<0.05$ ) with the EO concentration. The  
220 chitosan films without EO (control sample) showed a slight scavenging activity on  
221 DPPH. At high concentration assayed (2%) the CH+TZEO films showed the highest  
222 ( $p<0.05$ ) values (0.55 mg TE/g) followed by CH+TCEO whilst CH+TVEO showed the  
223 lowest ( $p<0.05$ ) values. At low concentration (1%), no statistical differences were found  
224 ( $p>0.05$ ) between CH+TZEO and CH+TCEO and between CH+TCEO and CH+TMEO.  
225 Again CH+TVEO showed the lowest ( $p<0.05$ ) values.

226 In the FRAP assay (Table 2), the antioxidant capacity occur in a concentration  
227 dependent manner. As occur in the case of DPPH assay, control sample showed a slight  
228 ability to reduce ferric to ferrous iron (0.08 mg TE/g film). In this assay, at high  
229 concentration (2%), CH+TCEO films showed the highest ( $p<0.05$ ) ability to reduce ferric  
230 to ferrous ion, followed by CH+TMEO films while CH+TVEO showed the lowest  
231 ( $p<0.05$ ) ability. However, at low concentration (1%), no statistical differences were  
232 found ( $p>0.05$ ) between CH+TCEO and CH+TZEO films as well as between CH+TZEO  
233 and CH+TMEO films. Another time, CH+TVEO showed the lowest ( $p<0.05$ ) ability to  
234 reduce ferric to ferrous ion.

235 This antioxidant activity showed by chitosan films added with *Thymus* EOs could be  
236 related with the presence, in the edible films, of bioactive compounds such as phenolics  
237 acids or terpenoids coming from the essential oils (Ruiz-Navajas et al. 2013). Thus, these  
238 compounds present in the chemical composition of EOs are closely associated with their  
239 antioxidant function mainly due to their redox properties exerted by various possible  
240 mechanisms: free-radical scavenging activity, hydrogen donors, transition-metal-  
241 chelating activity, and/or singlet-oxygen-quenching capacity (Liyana-Pathirana and  
242 Shahidi 2006). In addition, when the added ingredients exhibit antioxidant properties, the  
243 action of such films involves two different mechanisms: the oxygen-barrier effect-



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

244 reducing the oxygen availability in the product-and the specific activity of the  
245 incorporated antioxidant agents (Bonilla et al. 2012).

246 The antioxidant activity could be correlated with the TPC. Several studies stated the  
247 relationships between phenolic content and antioxidant activity; several authors found a  
248 high correlation between the TPC and the antioxidant properties (Viuda-Martos et al.  
249 2010; Wang et al. 2016). In this work significant correlation between TPC and  
250 antioxidant capacity of chitosan edible films incorporated with *Thymus* EOs (FRAP and  
251 DPPH values) was obtained. Thus, the levels of correlations TPC-DPPH and TPC-FRAP  
252 were  $r = 0.945$  and  $r = 0.832$  respectively.

253

## 254 **Conclusions**

255 As conclusions, the results showed that chitosan edible films incorporated with  
256 organic *Thymus zygis*, *Thymus mastichina*, *Thymus vulgaris* and *Thymus capitatus*  
257 essential oils may have additional applications in food packaging to delay microbial  
258 growth and to improve the oxidative stability of foodstuffs due to its excellent  
259 antibacterial and antioxidant activities.

260

## 261 **References**

262 Ballester-Costa C, Sendra E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M  
263 (2013) Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of  
264 four *Thymus* species from organic growth. *Ind Crops Prod* 50:304-311.  
265 Bonilla J, Atarés L, Vargas M, Chiralt A (2012) Edible films and coatings to prevent the  
266 detrimental effect of oxygen on food quality: possibilities and limitations. *J Food Eng*  
267 110:208-213.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 268 Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in  
269 foods - a review. *Int J Food Microbiol* 94:223-253.
- 270 Burt SA, Reinders RD (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against  
271 *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 36:162-167.
- 272 Gaysinsky S, Davidson PM, Bruce BD, Weiss J (2005) Growth inhibition of *Escherichia*  
273 *coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by carvacrol and eugenol encapsulated in  
274 surfactant micelles. *J Food Prot* 68:2559-2566.
- 275 Gómez-Estaca J, López de Lacey A, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC, Montero  
276 P (2010) Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as  
277 antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol* 27:889-896.
- 278 Hosseini MH, Razavi SH, Mousavi SMA, Yasaghi SASY, Hasansaraei AG (2008)  
279 Improving antibacterial activity of edible films based on chitosan by incorporating  
280 thyme and clove essential oils and EDTA. *J App Sci* 8:2895-2900.
- 281 Liyana-Pathirana CM, Shahidi F (2006) Antioxidant properties of commercial soft and  
282 hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *J Sci Food Agric*  
283 86:477-485.
- 284 Moradi M, Tajik H, Rohani SM, Oromiehie AR, Malekinejad H, Aliakbarlu J, Hadian M  
285 (2012) Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria*  
286 *multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT-Food Sci Technol* 46:477-  
287 84.
- 288 Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SMH (2010) Development and evaluation of  
289 a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low  
290 affinity toward water. *Food Chem* 122:161-166.
- 291 Oyaizu M (1986) Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of  
292 products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jap J Nutr* 44:307-315.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

293 Rhim J, Ng P (2007) Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging  
294 applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47:411-33.

295 Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Sendra E, Perez-Alvarez JA, Fernández-López J  
296 (2013) *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films  
297 incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*  
298 30:386-392.

299 Sánchez-González L, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M (2010) Physical and  
300 antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films. *J Food Eng*  
301 98:443-52.

302 Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic  
303 phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vit* 16:144-158.

304 Siripatrawan U, Harte BR (2010) Physical properties and antioxidant activity of an active  
305 film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydro* 24:770-775.

306 Tepe B, Sokmen M, Sokmen A, Daferera D, Polissiou, M (2005) Antimicrobial and  
307 antioxidative activity of essential oil and various extracts of *Cyclotrichium*  
308 *origanifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. *J Food Eng* 69:335-342.

309 Tharanathan RN, Kittur, F (2003) Chitin-The undisputed biomolecule of great potential.  
310 *Crit Rev Food Sci Nutr* 43:61-87.

311 Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Sánchez-Zapata E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez  
312 JA (2010) Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a  
313 Mediterranean diet. *Flav Fra J* 25:13-19.

314 Viuda-Martos M, Mohamady MA, Fernández-López J, Abd ElRazik KA, Omer EA,  
315 Pérez-Álvarez JA, Sendra E (2011) *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of  
316 essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control* 22:1715-1722.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

317 Wang L, Liu F, Jiang Y., Chai Z, Li P, Cheng Y, Jing H, Leng X (2011) Synergistic  
318 antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. J Agric Food Chem  
319 59:12411-12419.

320 Wang L, Chen C, Su A, Zhang Y, Yuan J, Ju X (2016) Structural characterization of  
321 phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction from  
322 defatted adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) seed meal. Food Chem  
323 196:509-517.



324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Figure 1.** Total phenolic content of chitosan edible films incorporated with *Thymus zygis* (TZEO), *Thymus capitatus* (TCEO), *Thymus vulgaris* (TVEO) and *Thymus mastichina* (TMEO) essential oils.



390 **Table 1.** Antibacterial effect of chitosan edible films incorporated with organic *Thymus*  
 391 *zygis* (CH+TZEO), *Thymus capitatus* (CH+TCEO), *Thymus vulgaris* (CH+TVEO) and  
 392 *Thymus mastichina* (CH+TMEO) EOs at different concentrations against Gram-positive  
 393 or Gram-negative bacteria, by disc diffusion method.

Films	Diameter of inhibition zone (mm) including film (10 mm)			
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>
Control	‡N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
CH+TZEO1%	N.A.	N.A.	28.41±0.03 <sup>C</sup>	N.A.
CH+TZEO2%	12.50±0.37 <sup>cG</sup>	16.35±0.70 <sup>bE</sup>	32.12±0.83 <sup>aB</sup>	N.A.
CH+TCEO1%	13.19±0.24 <sup>cF</sup>	18.28±0.18 <sup>bC</sup>	31.66±0.29 <sup>aB</sup>	N.A.
CH+TCEO2%	19.90±0.14 <sup>cD</sup>	27.36±0.78 <sup>bA</sup>	35.08±1.20 <sup>aA</sup>	N.A.
CH+TVEO 1%	18.49±0.05 <sup>aE</sup>	12.19±0.06 <sup>cF</sup>	14.35±0.11 <sup>bF</sup>	N.A.
CH+TVEO 2%	26.49±0.08 <sup>aB</sup>	16.49±0.06 <sup>cE</sup>	21.23±0.18 <sup>bD</sup>	N.A.
CH+TMEO 1%	21.15±0.04 <sup>aC</sup>	17.92±0.08 <sup>cD</sup>	18.42±0.12 <sup>bE</sup>	N.A.
CH+TMEO 2%	32.36±0.05 <sup>aA</sup>	25.51±0.04 <sup>cB</sup>	28.29±0.04 <sup>bC</sup>	N.A.

394 ‡N. A.: Non active.

395 For a same essential oil, values followed by the same lower case letter are not significantly different  
 396 ( $p>0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.

397 For a same bacteria, values followed by the same upper case letter are not significantly different ( $p>0.05$ )  
 398 according to Tukey's Multiple Range Test.

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411 **Table 2.** Antioxidant effect of chitosan edible films incorporated with organic *Thymus*  
 412 *zygis* (CH+TZEO) *Thymus capitatus* (CH+TCEO), *Thymus vulgaris* (CH+TVEO) and  
 413 *Thymus mastichina* (CH+TMEO) EOs, at different concentrations by means of two  
 414 different (DPPH and FRAP) antioxidant test.

	DPPH	FRAC
	(mg TE/g)	(mg TE/g)
Control	0.01±0.00 <sup>H</sup>	0.08±0.01 <sup>H</sup>
CH+TZEO1%	0.35±0.02 <sup>bE</sup>	2.13±0.10 <sup>bEF</sup>
CH+TZEO2%	0.55±0.01 <sup>aA</sup>	3.20±0.05 <sup>aC</sup>
CH+TCEO1%	0.31±0.01 <sup>bEF</sup>	2.06±0.07 <sup>bF</sup>
CH+TCEO2%	0.48±0.01 <sup>aB</sup>	4.70±0.10 <sup>aA</sup>
CH+TVEO 1%	0.26±0.01 <sup>bG</sup>	1.98±0.03 <sup>bG</sup>
CH+TVEO 2%	0.39±0.01 <sup>aD</sup>	2.95±0.02 <sup>aD</sup>
CH+TMEO 1%	0.29±0.01 <sup>bF</sup>	2.21±0.01 <sup>bE</sup>
CH+TMEO 2%	0.44±0.01 <sup>aC</sup>	3.99±0.01 <sup>aB</sup>

415 Values expressed as mg Trolox Equivalent (TE)/g film.

416 For a same essential oil, values followed by the same lower case letter are not significantly different  
 417 ( $p>0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.

418 For a same antioxidant assay, values followed by the same upper case letter are not significantly different  
 419 ( $p>0.05$ ) according to Tukey's Multiple Range Test.

421

422

423

424

425

426

427

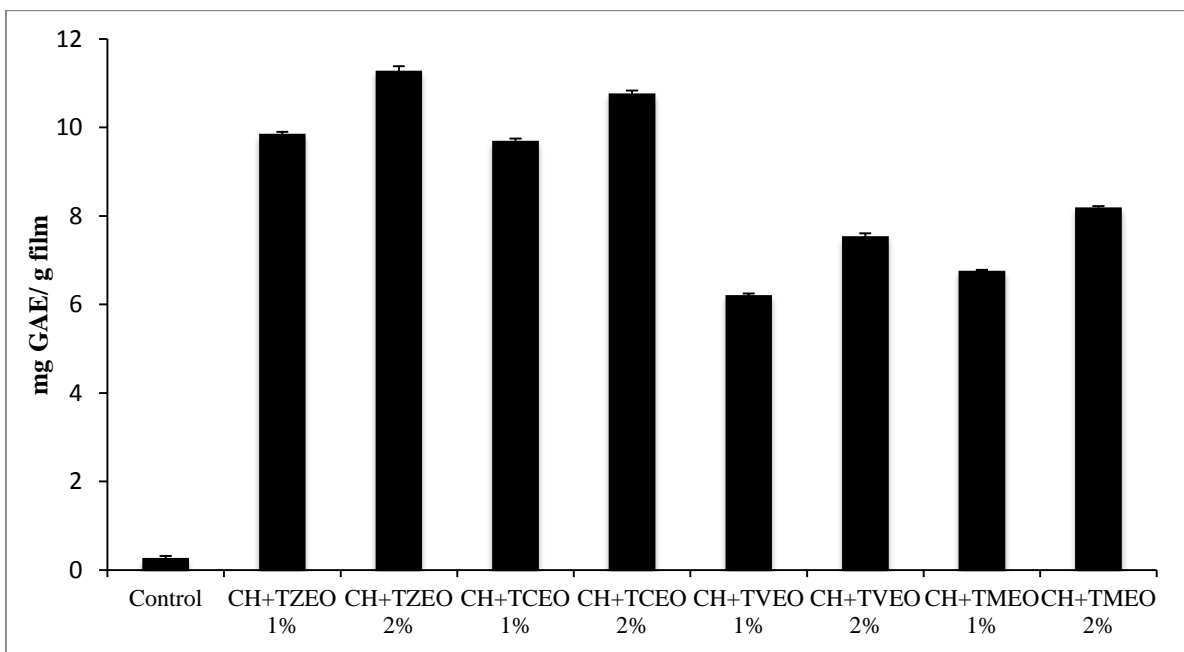
428

429

430

431

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



432  
433

Figure 1.

