جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم والتقنيات فاس
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS

N° d'ordre :

Centre des Etudes Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales
Formation Doctorale : Sciences et Génie de la Matière, de la Terre et de la Vie
Discipline : Chimie
Spécialité* : Plante Aromatique et Médicinale/Chimiométrie
Laboratoire : Chimie Organique Appliqué (COA)

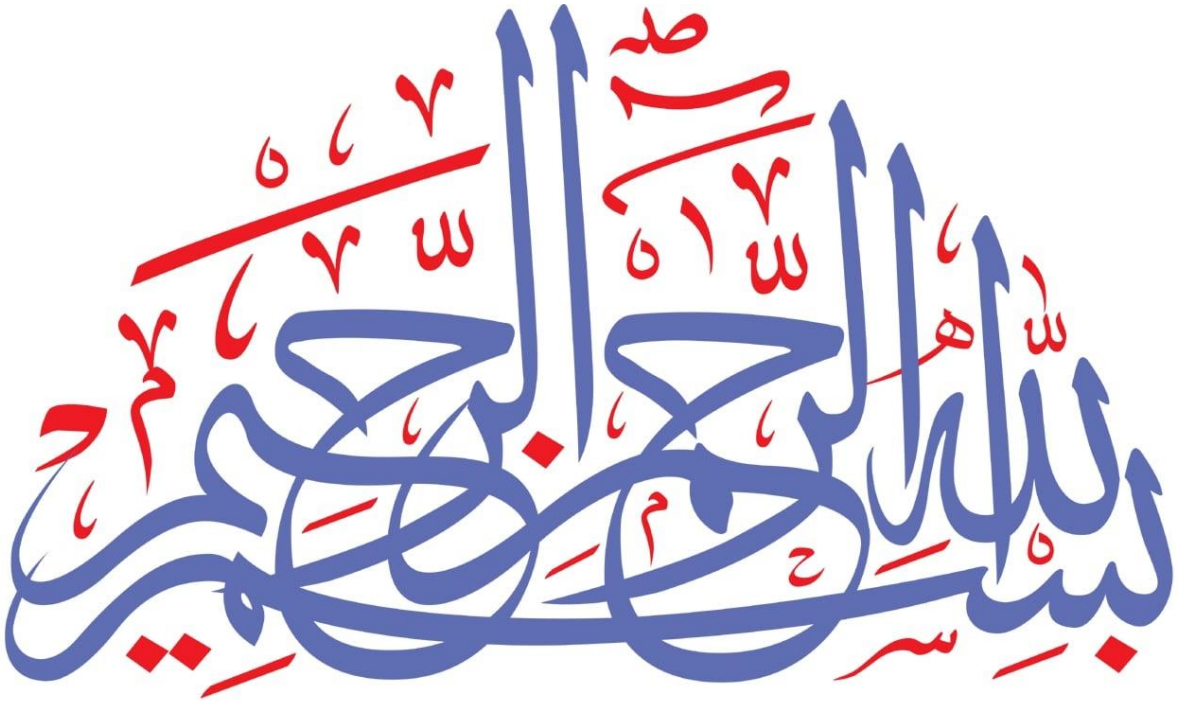
Thèse pour l'obtention de DOCTORAT

Apport des techniques chimiométriques à la gestion de la qualité et à la Valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales : *C. sativus*, *S. rosmarinus* et *C. atlantica*

Préparée par : Mlle Saoussan ANNEMER

Soutenue le 03 Juin 2023 devant le jury :

Nom et Prénom	Grade	Etablissement	Qualité
El Mestafa EL HADRAMI	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Président
Mohamed TABYAOUI	PES	Faculté des Sciences de Rabat	Rapporteur
Bouchaib IHSSANE	PES	Ecole Normale Supérieur de Rabat	Rapporteur
Taoufiq SAFFAJ	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Rapporteur
Hamid STAMBOULI	PES	Institut de Criminalistique de la Gendarmerie Royale de Rabat	Examinateur
Khadija BEKHTI	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Examinatrice
Yassine EZ-ZOUBI	PA	Faculté des Sciences et Techniques d'al'Hoceima	Invité
Abdellah Farah	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Directeur de thèse



Remerciements

Cette thèse n'aurait pas pu être ce qu'elle est, sans l'aide de **ALLAH** tout puissant qui m'a donné la force, la patience et le courage afin de l'accomplir.

J'adresse tout naturellement ma reconnaissance et ma gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur **Abdellah Farah**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, sans qui ce travail n'aurait probablement jamais vu le jour. Je vous remercie pour votre patience, votre grande rigueur scientifique et vos recommandations mesurées qui ont guidé ce travail jusqu'au bout. Je vous suis également reconnaissante pour le temps conséquent que vous m'avez accordé, vos qualités pédagogiques et scientifiques, votre sympathie, votre franchise et pour les nombreux encouragements que vous m'avez prodigués. J'ai beaucoup appris à vos côtés et je vous adresse ma gratitude pour tout cela. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude et mes vifs remerciements.

Je remercie Monsieur **El Mestafa El Hadrami**, Directeur du Centre des Etudes Doctorales et Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, d'avoir accepté de présider ma soutenance malgré ses préoccupations nombreuses, et de juger cette thèse dans sa globalité.

Je tiens à remercier Monsieur **Mohamed Tabyaoui**, Vice-Doyen chargé des Affaires Académiques et Pédagogiques et Professeur à la Faculté des Sciences de Rabat. Monsieur **Bouchaib Ihssane** Professeur à l'Ecole Normale Supérieur de Rabat, ainsi que Monsieur **Taoufik Seffaj**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse.

J'exprime ma gratitude à Monsieur **Hamid Stambouli**, Directeur de l'Institut de Criminalistique de la Gendarmerie Royale et à Madame **Khadija Bekhti**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, qui ont bien voulu être examinateurs.

Je souhaite également remercier Monsieur **Badr Satrani**, Docteur au Centre de Recherche Forestière de Rabat, de m'avoir accueillie chaleureusement au sien du laboratoire de Chimie des Plantes Aromatiques et Médicinales et de Microbiologie, de m'avoir mis dans le bain de la microbiologie et appris le métier. Ses compétences et sa disponibilité ont joué un rôle décisif dans la réalisation d'une grande partie de ce travail.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur **Yassine Ez-Zoubi**, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques d'al'Hoceima. Merci, Monsieur, de l'aide et les conseils que vous m'avez apportés

lors de ce travail. Les nombreuses remarques écrites dans les marges ont éveillé ma réflexion et continuent de la faire progresser. Pour cela, je ne peux que vous en être reconnaissante.

J'aimerais remercier très sincèrement l'ensemble du personnel de l'Institut de Criminalistique de la Gendarmerie Royale en particulier Monsieur **Taoufik Bouayoun** et Madame **Nezha Fettoukh** pour leurs gentillesses et leurs accueils chaleureux et pour tout ce qu'ils m'ont apporté.

Je remercie l'ensemble du personnel de la FST de Fès et plus particulièrement les doctorants du laboratoire de Chimie Organique Appliquée (COA) en particulier **Amine Assouguem**, **Amal Ramzi**, **Amine Ez-Zoubi**, **Wafae Moustaid et Abdellatif Alami**, qui ont toujours été disponibles et m'ont permis de travailler dans une ambiance conviviale.

Une pensée toute particulière est adressée à la famille **Laghmari** pour leur gentillesse et leur bienveillance. Merci à vous pour votre présence et vos encouragements et pour tous ces bons moments que nous partageons.

Un remerciement tout spécial à une amie et une sœur si merveilleuse Madame **Ikram Elayachi**. Merci à vous pour votre aide et votre soutien inestimable dans les moments difficiles, votre générosité à partager l'information et pour votre bonne humeur. Je suis vraiment heureuse de vous connaitre et je sais que notre amitié continuera au-delà de cette thèse.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse tous mes sentiments de reconnaissance à ma famille ; ma mère **Malika**, mon père **El Hassane**, ma sœur **Nouhaila** et mon frère **Mohammed Amine**, vous m'avez soutenue et comblée tout au long de mon parcours. Puise **ALLAH** vous procurer bonheur et prospérité. Une pensée toute spéciale pour mon oncle **Mohammed** qui n'a pas vécu pour assister à l'aboutissement de mon travail, mais je sais qu'il en aurait été très fier. Je ne saurais terminer sans adresser une pensée à mes amis qui m'ont été, chacun à sa manière, une source d'inspiration et d'énergie. Je m'abstiens de les nommer tellement la liste est longue. Je nommerai tout de même **Rajae Ait Lhaj**, **Oumayma Boukria**, **Soukayna El Amrani**, sans oublier ma chère amie **Sara Cherrad** et mes collègues **Farah Aabouch** et **Ismail Ettaleb** du Centre de Recherche Forestière de Rabat.

Valorisation des travaux

Publication dans des revues à comité de lecture

Annemer, S., Ez zoubi, Y., Ramzi, A., El Hadrami, E. M., El Ouali Lalami, A., Satrani, B., & Farah, A. (2022). Variations in saffron quality in Morocco (Taliouine and Taznakht) according to altitude and provenance: Chemometric investigation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(2), e16292.

Annemer, S., Farah, A., Stambouli, H., Assouguem, A., Almutairi, M. H., Sayed, A. A., ... & Ez Zoubi, Y. (2022). Chemometric investigation and antimicrobial activity of *Salvia rosmarinus* Spenn essential oils. *Molecules*, *27*(9), 2914.

Annemer, S., Farah, A., Stambouli, H., & Bouayoun, T. (2022). Principal Component and Hierarchical Cluster Analysis of major compounds variation of Moroccan *Rosmarinus officinalis* essential oil. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 336, p. 00069). EDP Sciences.

Ramzi, A., El Ouali Lalami, A., **Annemer, S.,** Ez zoubi, Y., Assouguem, A., Almutairi, M. H., ... & Farah, A. (2022). Synergistic Effect of Bioactive Monoterpenes against the Mosquito, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Molecules*, *27*(13), 4182.

Ramzi, A., Farah, A., Ez Zoubi, Y., **Annemer, S.,** & El Ouali Lalami, A. (2022). Aroma profile and fumigant toxicity of two Moroccan Lavandula species essential oils against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, *42*(3), 2663-2672.

Assouguem, A., Kara, M., Ramzi, A., **Annemer, S.,** Kowalczyk, A., Ali, E. A., ... & Farah, A. (2022). Evaluation of the effect of four bioactive compounds in combination with chemical product against two spider mites *Tetranychus urticae* and *Eutetranychus orientalis* (Acari: Tetranychidae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2022*.

Ez-zoubi, A., **Annemer, S.,** El Amrani, S., & Farah, A. (2023). Encapsulation of Origanum compactum Essential Oil in Beta-Cyclodextrin Metal Organic Frameworks: Characterization, Optimization, and Antioxidant Activity. *Journal of Food Processing and Preservation*, *2023*.

Communications à des congrès

Annemer, S., Farah, A., Stambouli, H., Bouayoun, T., El-Ouali Lalami, A., & Ez-Zoubi, Y. (2021) Effet de la période de récolte et de site de Coopérative sur la qualité chimique des huiles essentielles du Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.), Pharmacologie, Phytothérapie et Phytochimie des Plantes Aromatiques et Médicinales, July 27-28th 2021, Khenifra, Morocco. *Communication orale*

Annemer, S., Farah, A., Stambouli, H., Bouayoun, T., El-Ouali Lalami, A., & Ez-Zoubi, Y. (2021) Principal Component and Hierarchical Cluster Analysis of major compounds variation of Moroccan Rosmarinus officinalis essential oil, the International Conference on Energy and Green Computing. December 09-10th, 2021, Meknes, Morocco. *Communication orale*

Annemer, S., Ez-zoubi, Y., Ramzi A., El Hadrami, E. M., El Ouali Lalami, A., Satrani, B., & Farah, A. (2021) Variation de la qualité du safran Marocain (région de Taliouine et Taznakht) en fonction de l'altitude et de la provenance : Étude chimiométrique, Biodiversité, Biotechnologies, Durabilité & Innovation, December 20th-22nd, 2021, Agadir, Morocco. *Communication orale*

Annemer, S., Ez-zoubi, Y., Stambouli, H., Bouayoun, T., Satrani, B., & Farah, A. (2022) Combined-simultaneous hydrodistillation of *Salvia rosmarinus* Spenn and *Cedrus atlantica* Manetti: Optimization of biological activity by mixture design methodology, Valorisation des Ressources Naturelles Rôle de la Recherche Scientifique dans le Cadre du Nouveau Modèle de Développement, June 30th and July 02nd, 2022, Rabat, Morocco. *Communication orale*

Annemer, S., Ez-zoubi, Y., Stambouli, H., Bouayoun, T., Satrani, B., & Farah, A. (2022) Anti-Wood-Decay Fungal Activity of the Simultaneous hydrodistillation of *Salvia rosmarinus* Spenn and *Cedrus atlantica* Manetti, 1st International congress on biotech studies, November 9-11th, 2022, Ankara-Turkey. *Communication orale*

Annemer, S., Ez-zoubi, Y., Ramzi A., El Hadrami, E. M., El Ouali Lalami, A., Satrani, B., & Farah, A. (2022) Variation of the quality of Moroccan saffron (Taliouine and Taznakht region) according to altitude and provenance: Chemometric study1st International congress on biotech studies, November 9-11th, 2022, Ankara-Turkey. *Communication orale*

Ez-zoubi, A., **Annemer, S.,** El Amrani, S., Ez zoubi, Y., & Farah, A (2022) Encapsulation of *Origanum compactum* essential oil in betacyclodextrin metal organic frameworks: Characterization, optimization and antioxidant activity, 1st International congress on biotech studies, November 9-11th, 2022, Ankara-Turkey. *Communication orale*

Annemer, S., Ez-zoubi, Y., Stambouli, H., Bouayoun, T., Satrani, B., & Farah, A. Combined-simultaneous hydrodistillation of *Salvia rosmarinus* Spenn and *Cedrus atlantica* Manetti: Optimization of Anti-Wood-Decay Fungal activity by mixture design methodology, 4th International Conference on Advanced Engineering Technologies, September 28-30th, 2022, Ankara-Turkey. *Communication orale*

Ramzi, A., El Ouali Lalami, A., **Annemer, S.,** Ez zoubi, Y., Assouguem, A., & Farah, A. (2022) Synergistic effect of bioactive essential oils' compounds against the mosquito, Culex pipiens, 1st International congress on biotech studies, November 9-11th, 2022, Ankara-Turkey. *Communication orale*

Moustaid, W., Saffaj, T., **Annemer, S.,** Assouguem A., & Farah, A. (2022) Evaluation of the antibacterial activity of healthy and infected cedar wood, 1st International congress on biotech studies, November 9-11th, 2022, Ankara-Turkey. *Communication orale*

Annemer, S., Kachabi, M., El Hadrami, E. M., Sara El kharaf, Hicham Zaitan & Farah, A. (2018) Contribution de l'analyse statistique à l'étude comparative de la composition minéralogique du sol et des espèces *Thymus algeriensis* et *Origanum majorana*, 7th International Meeting on Chemometrics and Quality, October 24-25th 2018, Fez, Morocco. *Communication par affiche*

Annemer, S., Kachabi, M., El Hadrami, E. M., Sara El kharaf, Hicham Zaitan & Farah, A. (2018) Caractérisation du sol et communication sol/plante en éléments minéralogiques, 3ème journée du doctorant en Biologie de l'USMBA, June 27th, 2018, Fez, Morocco. *Communication par affiche*

Résumé

La demande en Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) et en Huiles Essentielles (HE) ne cesse d'augmenter. La méconnaissance, l'incompréhension, la complexité des données analytiques, la volatilité, la faible solubilité et stabilité des HE, limitent considérablement leurs applications à grande échelle. Pour cette étude, les trois espèces choisies sont *Crocus sativus, Salvia rosmarinus et Cedrus atlantica*. Le travail vise l'utilisation des techniques chimiométriques dans la gestion de la qualité et la valorisation des PAM.

Les facteurs (altitudes et provenances) qui affectent la qualité du *C. sativus* ont été évalués. Les outils d'analyse statistique ont permis de conclure que l'altitude est le seul paramètre qui affecte la qualité du safran. Ces résultats ont permis la modélisation par régression en moindres carrés partiels (PLS) du pouvoir colorant en fonction des absorbances de picrocrocine, safranal et crocine, par un modèle postulé et validé.

L'effet de la période de récolte et de provenances sur le rendement, la composition chimique et l'activité antimicrobienne des HE de *S. rosmarinus* de la province de Figuig, a été évalué. Il a été démontré et confirmé par techniques statistiques (ANOVA, ACP) que seule la période de récolte qui a affecté la quantité et la qualité des HE. L'ACP et l'ACH ont permis de diviser les échantillons en deux principaux groupes A (saison d'été) et B (saison d'hiver). L'activité antibactérienne testée a montré que *M. smegmatis* et *B. subtilis* sont les souches les plus sensibles (1/500 (v/v).

L'hydrodistillation simultanée et la formulation à partir de mélange binaire (*S. rosmarinus / C. atlantica*), ont été réalisées à partir de plan de mélange. La combinaison *S. rosmarinus* (60%) / *C. atlantica* (40%) présente la plus forte activité antifongique contre les champignons *C. puteana* (CE_{50} = 9,91±1,91 µg/mL) et *C. versicolor (*CE_{50} = 9,28±1,55 µg/mL*)*. La combinaison *S. rosmarinus (*55%*)/ C. atlantica* (45%) présente une activité optimale contre les champignons *G. trabeum* (CE_{50} = 11,48±3,73 µg/mL) et *P. placenta* (CE_{50} = 22,62±3,79 µg/mL). La nano-encapsulation a été réalisée sur la combinaison dévoilant une forte activité antifongique. L'optimisation de l'efficacité de l'encapsulation a été réalisée grâce à la méthode de surface de réponse. Les résultats ont indiqué que l'efficacité d'encapsulation pouvait atteindre une valeur de 87 % dans les conditions optimales : 10 % de MEO/éthanol et rapport 1:10 MEO/GA. Le test d'activité antifongique a révélé que la MEO-GA avait un effet inhibiteur contre les champignons de la pourriture brune du bois avec une valeur de CE_{50} de 5,15±0,88 et 12,63±0,65 µg/mL pour *G. trabeum* et *P. placenta*, respectivement. Les travaux menés au cours de cette thèse ont abouti à de nombreux résultats très intéressants, qui peuvent avoir une incidence économique positive dans la valorisation des PAM au Maroc. Ces résultats ouvrant la voie à plusieurs perspectives qui peuvent être envisageables pour le développement d'un produit naturel, efficace, moins coûteux et facile à utiliser pour la préservation du bois contre la pourriture par des champignons.

Les résultats prometteurs des différents axes de recherches susmentionnés, ont montré que les techniques d'analyse couplées aux outils chimiométriques permettent d'évaluer la qualité chimique des PAM et de développer des formulations pour l'amélioration des activités biologiques afin de garantir une meilleure valorisation de notre patrimoine végétal.

Mots clés : Huiles essentielles, altitude, provenance, période de récolte, hydrodistillation simultanée, nanoencapsulation, gomme arabique, optimisation.

Abstract

The medicinal and aromatic plants (MAP) and essential oils (EO) is currently experiencing an increase in demand. The misunderstanding, the unknown, the complexity of the analytical data, the volatility, and the low solubility and stability of the EOs, have severely restricted their widespread application. In this study, the three species chosen are *Crocus sativus*, *Salvia rosmarinus*, and *Cedrus atlantica*. The aim of this thesis is the application of chemometric techniques in the management of the quality and the valorization of MAP.

The factors (altitudes and provenances) that affect the quality of *C. sativus* were evaluated. The statistical analysis tools allowed to conclude that the quality of saffron was affected only by altitude. These results allowed the modeling coloring strength by partial least squares (PLS) regression in term of picrocrocin, safranal and crocin absorbances by a postulated and validated model.

The effect of harvest period and provenances on the yield, chemical composition and antimicrobial activity of *S. rosmarinus* EOs from Figuig province was evaluated. The statistical analysis showed and confirmed that only the harvest period was affected the quantity and quality of EOs. The PCA and the HCA results were divided into two groups: Group A for the summer season and group B for the winter season. The antibacterial activity tested showed that *M. smegmatis* and *B. subtilis* were the most susceptible strains (1/500 (v/v).

The simultaneous hydrodistillation and the formulation of the binary mixture (*S. rosmarinus* / *C. atlantica*) were carried out by designs of the mixture. The optimum antifungal activity was observed in a combination of 60% *S. rosmarinus* and 40% *C. atlantica* essential oils, providing an EC_{50} value of 9.91±1.91 and 9.28±1.55 µg/mL for *C. puteana* and *C. versicolor*, respectively. The highest antifungal activity for *G. trabeum* and *P. placenta* was found in the combination of 55% of *S. rosmarinus* and 45% of *C. atlantica* essential oils, with an EC_{50} value of 11.48±3.73 and 22.62±3.79 µg/mL, respectively. The nanoencapsulation was performed on the combination revealing strong antifungal activity. The optimization of the encapsulation efficiency was carried out using the surface response method. The results indicated that the encapsulation efficiency could reach a value of 87% under the optimal conditions: 10% MOE/ethanol and 1:10 MOE/GA ratio. The antifungal activity test revealed that MEO-GA had an inhibitory effect against wood brown rot fungi with an EC_{50} value of 5.15±0.88 and 12.63±0.65 µg/mL for *G. trabeum* and *P. placenta*, respectively.

The work carried out during this thesis has led to many interesting results, which can have a positive economic impact on the valorization of MAP in Morocco. These results opening the way to several perspectives that can be envisaged for the development of a natural product, effective, non-toxic, lower-cost and easy-to-use wood preservatives to protect wood from decay.

The promising results of the different axes of research mentioned previously have shown that analytical techniques coupled with chemometric tools allow us to evaluate the chemical quality of MAP and to develop formulations to improve the biological activities to guarantee a better valorization of our plant patrimony.

Keywords: Essential oils, altitude, provenance, harvest period, simultaneous hydrodistillation, nanoencapsulation, gum arabic, optimization.

Liste des tableaux

Synthèse bibliographique

Tableau 1: classification botanique de *C. sativus* 15
Tableau 2: Propriétés chimiques du safran selon la norme ISO/TS 3632 [64] 19
Tableau 3: Utilisation des extraits du safran dans les domaines de la médecine, de la parfumerie et de cosmétique, et d'agroalimentaire. (---) : non trouvé. 22
Tableau 4: Classification botanique de *cedrus atlantica* Manetti 25
Tableau 5: Classification botanique de *Salvia rosmarinus* Spenn 30
Tableau 6: La variation de la composition chimique et les activités biologiques des huiles essentielles de *S. rosmarinus* selon leur origine géographique. (---) : non trouvé. 32
Tableau 7: Utilisation des huiles essentielles du romarin dans les domaines de la médecine, de la parfumerie et des cosmétiques, de l'alimentation et de l'agriculture. (---): non-trouvé 36
Tableau 8: Quelques effets des combinaisons binaires et ternaires de certaines HEs. 47

Article I

Tableau 1 : Localisation, altitude et coordonnées des échantillons des zones d'étude 77
Tableau 2 : Spécifications chimiques du safran selon ISO/TS 3632 82
Tableau 3 : Valeurs d'absorbance de la pricocrocine, du safranal et de la crocine ainsi que la teneur en eau du safran provenant des différents sites de la région de Taliouine et de Taznakht 84
Tableau 4 : Valeurs d'absorbance de la pricocrocine, du safranal et de la crocine ainsi que la teneur en eau du safran des différentes provenances 92
Tableau 5 : Matrice de corrélation entre les variables de la qualité du safran. Forte corrélation (>0,7) ; corrélation moyenne (entre 0,5-0,6) ; pas de corrélation (<0,5) 95

Article II

Tableau 1 : Localisation et coordonnées géographiques des trois coopératives 113
Tableau 2 : Composés majoritaire des HEs de *S. rosmarinus* selon différentes coopérative et période de récolte 121
Tableau 3 : La qualité de la représentation des variables sur les 3 premières composantes, les valeurs propres des composantes, les pourcentages de variabilité expliquée, et les pourcentages cumulés 124
Tableau 4 : Concentration minimale inhibition des HE de *S. rosmarinus* 132

Article III

Tableau 1 : Matrice d'expérience de plan Simplex-lattice pour deux composants 149
Tableau 2 : Composition chimique d'HE des *S. rosmarinus*, *C. atlantica* et de leur combinaison binaire 154
Tableau 3 : Concentration efficaces (CE_{50}) des différents mélanges de *S. rosmarinus* et de *C. atlantica* contre les champignons de pourriture du bois 159
Tableau 4 : Différentes combinaisons générées par le plan de mélange choisi (simplex-lattice) et les réponses expérimentales, y compris trois répétitions des points centraux 160
Tableau 5 : Analyse de la variance, coefficients de détermination R^2, et coefficient de détermination ajusté R_{adj}^2 pour les modèles postulé des CP CE_{50}, CV CE_{50}, GT CE_{50} et PP CE_{50} 161

Tableau 6 : Coefficients de régression estimés pour les modèles postulés pour la CP CE_{50}, la CV CE_{50}, la GT CE_{50} et la PP CE_{50}. ……..164
Tableau 7 : Valeurs prédites et expérimentales de CE_{50} pour le point de test réalisé pour les mélanges optimaux……..170

Article VI

Tableau 1 : Matrice d'expérience de plan composite centré à deux paramètres……187
Tableau 2 : Paramètres et niveaux utilisés pour le plan composite centré……188
Tableau 3 : Composition chimique de l'HE de *S. rosmarinus* et de *C. atlantica* seule et en combinaison……190
Tableau 4 : Plan composite centré du processus d'encapsulation d'un mélange d'HE (55% de *S. rosmarinus* et de 45% de *C. atlantica*) dans la gomme arabique……194
Tableau 5 : Analyse de la variance pour le modèle postulé……195
Tableau 6 : Coefficients de régression estimés et leur signification dans les modèles de régression linéaire multiple de second ordre pour le modèle ajusté……196
Tableau 7 : Concentration efficace (CE_{50}) de GA, MEO-GA et MEO contre les champignons de la pourriture brune du bois……207

Liste des figures

Synthèse bibliographique

Figure 1: Evolution de nombre des coopératives des PAM au Maroc pendant 2008 à 2020. 10
Figure 2: l'espèce *Crocus sativus* L. Plante Crocus (a), fleur Crocus avec stigmate (b), récolte du safran de la fleur Crocus (c), safran fraîchement récolté (d), safran séché (e) 15
Figure 3 : Aire de répartition géographique du safran au Maroc. 17
Figure 4 : Structure chimique des trois principaux composés du safran. 18
Figure 5 : L'espèce de *Cedrus atlantica* Manetti. . L'arbre du cèdre (a), feuille avec fruit (b), feuille (c), ecorce (d) 24
Figure 6 : Aire de répartition géographique du cèdre d'Atlas au Maroc. 26
Figure 7 : La structure moléculaire des principaux composés déterminés dans l'HE de *C. atlantica*. 27
Figure 8 : l'espèce *Salvia rosmarinus* Spenn. Plante du romarin (a), feuille avec fleur du romain(b), récolte du romarin (c), romarin fraîchement récolté (d), romarin séché (e). 29
Figure 9 : Aire de répartition géographique du romarin au Maroc. 31
Figure 10 : La structure moléculaire des principaux composés dans l'HE de *S. rosmarinus*. 34
Figure 11 : représentation des mélanges à deux constituants. 44
Figure 12 : Diverses voies de dégradation possibles pour les huiles essentielles. 49
Figure 13 : structure de la gomme arabique. 51
Figure 14 : Procédé de nano-encapsulation d'huiles essentielles dans la gomme arabique par lyophilisation [218]. 52

Article I

Figures 1 : Carte de location de la zone de Taliouine et Taznakht dans la région sud du Maroc……77
Figures 2 : Schéma explicative de la méthode proposée pour la préparation des échantillons depuis la récolte du safran jusqu'à l'obtention du profil UV……81
Figures 3 : Valeurs d'absorbance de la pricocrocine, du safranal et de la crocin ainsi que la teneur en eau du safran à différentes altitudes dans la région de Taliouine et de Taznakhet. Haute altitude (>2 000 m), Moyenne altitude (1 800-1 700 m), Basse altitude (<1 600 m). Les lettres a, b, c, d, e, f, g, h, et i indiquent des différences significatives. Chaque baton avec des lettres différentes est significativement différente (*P < 0,05*) selon le test de Tukey……88
Figure 4 : Valeurs d'absorbance pour la picrocrocine, le safranal et la crocine de l'échantillon de safran avec 15,61% d'humidité (bleu) et de l'échantillon de safran avec 4,40% d'humidité (rouge)……91
Figure 5 : Valeurs d'absorbance de la pricocrocine, du safranal et de la crocine ainsi que la teneur en eau du safran à différentes provenances. Les lettres a, b, c, d, e, f, et g indiquent des différences significatives. Chaque baton avec des lettres différentes est significativement différente (*P < 0,05*) selon le test de Tukey……93
Figure 6 : Structure et morphologie des stigmates des différentes altitudes (haute altitude (>2 000 m), moyenne altitude (1 800-1 700 m), basse altitude (<1 600 m)) de l'échantillon Taroudante (Assais) et de l'échantillon Imouzzar Maroucha (Serghina) a été réalisée au microscope électronique à balayage (MEB)……94
Figure 7. Analyses en composantes principales de la qualité du safran en fonction du site de récolte. (a) : Projection des variables sur le plan factoriel, (b) : projection des individus sur les variables (les sites de récolte) dans le plan factoriel……97
Figure 8 : Projection des données spectrales UV sur le pouvoir colorant. H : haute altitude (>2000m), M : altitude moyenne (1800m-1700m), L : basse altitude (<1600m)……98

Figure 9 : Représentation graphique des scores U du Y par rapport aux scores T du X de 4 modèles PLS. (a-d) Modèle PLS avec 1 PCs, modèle PLS avec 2 PCs, modèle PLS avec 3 PCs, modèle PLS avec 4 PCs……99
Figure 10 : Tracé des valeurs mesurées en fonction des valeurs prédites obtenues à partir des modèles PLS……100
Figure 11 : Tracé des valeurs mesurées en fonction des valeurs prédites obtenues à partir du modèle de calibration et de prédiction. (a): Modèle de calibration ; (b) : Modèle de validation……101

Article II

Figures 1 : Carte de location de la zone d'étude, provinces de Figuig, Est du Maroc……114
Figures 2 : Rendement moyen selon les HEs des trois coopératives et pendant neuf périodes de récolte Chaque colonne présentée par des lettres différentes (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m et n) indique une différence significative ($p < 0,05$) selon le test de Tukey……118
Figures 3 : Projection des variables sur la première et la deuxième composante principale……125
Figures 4 : Projection du nuage d'individus (score plot) sur la première et la deuxième composante principale. Pn : période de récolte. Le groupe A correspond à la saison d'été. Le groupe B correspond à la saison d'hiver……126
Figures 5 : Projection des variables et des individus sur la première et la deuxième composante principale. Pn : période de récolte. Le groupe A correspond à la saison estivale. Le groupe B spécifie la saison d'hiver……127
Figures 6 : Classification hiérarchique des HEs de *S. rosmarinus* correspondant à chaque période de récolte selon leurs composés majoritaires Le groupe A correspond à la saison estivale. Le groupe B spécifie la saison d'hiver……128
Figures 7 : Diamètre des zones d'inhibition de trois souches bactériennes en fonction des HEs des trois coopératives. Chaque colonne représentée par des lettres différentes (a, b, c, d, e, f et g) montre une différence significative ($p < 0,05$) selon le test de Tukey……130

Article III

Figure 1 : Hydrodistillation simultanée de *S. rosmarinus* et *C. atlantica*……146
Figure 2 : Représentation des mélanges à deux constituants sur un segment de droite Segment du plan de mélange binaire de *S. rosmarinus* et *C. atlantica*……149
Figure 3 : Rendement moyen des HEs en fonction du ratio de la plante. Les différentes lettres (a, b, c, d et e) illustrent une différence significative ($p < 0,05$) selon le test de Tukey……151
Figure 4 : Activités antifongiques d'HE de *S. rosmarinus*, *C. atlantica* et leur combinaison binaire 50%-50% contre les champignons de de pourriture du bois de Coniophora puteana après incubation à 25±1 ◦C……160
Figure 5 : Courbe des valeurs observées en fonction des valeurs prédites pour le plan de mélange correspondant aux quatre champignons de pourriture du bois (CP CE_{50}, CV CE_{50}, GT CE_{50}, et PP CE_{50})……164
Figure 6 : Profil de mélange montrant la zone de minimisation de la réponse CE_{50} en fonction des deux constituants……167
Figure 7 : Diagramme de désirabilité montrant les proportions précises des deux plantes étudiées conduisant à la CE_{50} optimale……169

Article VI

Figures 1 : Illustration du processus d'encapsulation de la MEO dans l'AG……185
Figures 2 : Plan composite centré pour deux paramètres……188
Figures 3 : Courbe des observées en fonction des valeurs prédites pour l'efficacité de l'encapsulation……196
Figures 4 : Représentation en 2D (a) et 3D (b) des paramètres optimisés conduisant à l'efficacité d'encapsulation souhaitée……198
Figures 5 : Profil d'de prévision des conditions optimales pour l'efficacité de l'encapsulation……199
Figures 6 : Structure des différents échantillons (GA et MEO-GA) effectuée par MEB à ×500……200
Figures 7 : Distribution de taille des particules (µm) des nanoparticules MEO-GA……201
Figures 8 : Diagrammes XRD de GA et MEO-GA……202
Figures 9 : Spectres FTIR de MEO, GA et MEO-GA……203
Figures 10 : Courbes d'analyse thermique TG-ATD de MEO, GA et MEO-GA……205
Figures 11 : Pourcentages d'inhibition de GA, MEO et MEO-GA contre la croissance des champignons de pourriture du bois (a) *Poria placenta* et (b) *Gloeophyllum trabeum*……207
Figures 12 : Activité antifongique de GA, MEO et MEO-GA contre la croissance des champignons de pourriture du bois de (a) *Poria placenta* et (b) *Gloeophyllum trabeum*. Tous à la concentration de 62,5 µg/mL……207

Liste des abréviations

ai : regression coefficient
ANOVA : Analysis of variance
ANDEF : Agence Nationale des Eaux et Forêts
B. subtilis : *Bacillus subtilis*
C_n : Cooperative
C. atlantica : *Cedrus atlantica* Manetti
CCD : Central Composite Design
C. puteana : *Coniophora puteana*
C. sativus : *Crocus sativus* L.
C. versicolor : *Coriolus versicolor*
Df : Degrees of freedom
DLS : Dynamic Light Scattering
DoE : Design of experiment
EC_{50} : Effective Concentration for **50%**
EO : essential oil
E. coli : *Escherichia coli*
F : Test Fisher
FTIR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GA : Gum Arabic
GC/MS : Gaz Chromatography coupled with Mass Spectrometry
GC-FID : Flame Ionization Detector
G. trabeum : *Gloeophyllum trabeum*
HCA : Hierarchical Cluster Analysis
HE : Huiles essentielles
ISO : International Organization for Standardization
M. smegmatis : *Mycobacterium smegmatis*
MEO : Combined *Salvia rosmarinus* Speen and *Cedrus atlantica* Manetti essential oil
MIC : Minimum Inhibition Concentration
P. placenta : *Poria placenta*
PAM : Plante Aromatique et Médicinales
PC : principal component
PE : Plan d'expérience
PCA : Principal Component Analysis
Pn : Period of harvesting
PLS : Partial Least Squares
p-value : Probabilité de significativité
R^2 : Coefficients of determination
R_{ajd}^2 : Coefficient of determination-adjusted
RI : Retention Indice
RI Lit : Retention Indices from Literature
RMSE : Root-Mean-Square Errors
RSM : Response Surface Methodology
SEM : Scanning Electron Microscope
S. rosmarinus : *Salvia rosmarinus* Spenn
t: Test student
TGA : Thermo-Gravimetric Analysis
UV-Vis : Ultraviolet-Visible
XRD : X-Ray Diffractometry
Xi : Factor
Y : Response

TABLE DE MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 6

1. Les plantes aromatiques et médicinales au Maroc 7

1.1. Diversité des PAM au Maroc 8

1.1.1. La richesse et la biodiversité des PAM au Maroc 8

1.1.2. Aspects economique, social, societal et patrimonial de la filière des PAM au Maroc. **Erreur ! Signet non défini.**

1.1.3. Les rôles des coopératives dans la gestion et la promotion de la filière PAM au Maroc 9

1.1.3.1. Secteur du safran 11

1.1.3.2. Valorisation de la production du cèdre de l'Atlas 11

1.1.3.3. Promotion du secteur de production de Romarin dans la région de l'Orientale 12

1.2. Composition chimique et exploitation pharmacologique et industrielle des plantes de grande valeur ajoutée au Maroc 13

1.2.1. Safran (*crocus Sativus* L.) 13

1.2.1.1. Présentation de *crocus Sativus* L. 13

1.2.1.2. Aire de répartition géographique du safran au Maroc ..... **Erreur ! Signet non défini.**

1.2.1.3. Profil chimique des extraits de safran 17

1.2.1.4. Variation qualitative de Safran selon la norme Internationale 19

1.2.1.5. Facteurs influençant sur la qualité du Safran 20

1.2.1.6. Utilisations du safran et de son extrait 20

1.2.2 Cédre d'Atlas (*cedrus Atlantica* Manetti) 24

1.2.2.1. Présentation de *cedrus Atlantica* Manetti 24

1.2.2.2 Aire de répartition géographique de cèdre d'Atlas au Maroc 25

1.2.2.3. Profile aromatique des huiles essentielles de cèdre d'Atlas Marocain 26

1.2.2.4. Utilisations du cèdre de l'Atlas et de son huile essentielle 27

1.2.3. *Salvia rosmarinus* Spenn 28

1.2.3.1. Présentation de *Salvia rosmarinus* Spenn 28

1.2.3.2. Aire de répartition géographique au Maroc 30

1.2.3.3. Variation des chémotypes de *Salvia rosmarinus* Spenn 31

1.2.3.4. Utilisations du romarin et de son huile essentielle 34

2. Techniques chimiométriques et leurs applications 38

2.1. Aperçue sur les techniques chimiométriques 38

2.2. Méthodes non supervisées 38

2.2.1. L'Analyse en Composantes Principales (ACP) 39
2.2.2. Analyse en classification hiérarchique 40
2.3. Méthodes supervisées 40
2.3.1. Méthodes de régression multivariée 40
2.3.1.1. Régression en moindre carré partielle 40
2.3.2. Plan d'expérience 41
2.3.2.1. Plan de surface de réponse 42
2.3.2.1.1. Plan composite centré 42
2.3.2.2. Plan de mélange 43
2.3.2.2.1. Plan à deux constituants 43
3. Application des techniques chimiométriques pour amélioration qualitative et quantitative des biomolécules et leurs applications dans des modèles biologiques 45
3.1. Utilisation de l'approche chimiométrique dans la détermination quantitative et qualitative des huiles essentielles 45
3.2. Application des plans de mélange sur des modèles biologiques 46
3.3. Limites d'application des technique chiomiométrique dans le secteur des PAM 48
4. Encapsulation des huiles essentielles 48
4.1. Techniques conventionnelles de l'encapsulation 50
4.2. Encapsulation des huiles essentielles par la gomme arabique 50
4.2.1. Gomme arabique 50
4.2.2. Nano-encapsulation avec la gomme arabique 51
4.2.2.1. Nano-encapsulation par lyophilisation: intérêts et limites 52
4.2.2.2. Facteurs affectant la nano-encapsulation des huiles essentielles/gomme arabique 53
4.3. Application de nano-encapsulation pour la lutte contre la pourriture du bois 53
Référence 55
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS 68
Article I : Variations de la qualité du safran au Maroc (Taliouine et Taznakht) en fonction de l'altitude et de la provenance : Etude chimiométrique 71
1. Introduction 75
2. Material and methods 76
2.1. Plant material 76
2.2. Moisture determination 79
2.3. Analysis by ultraviolet/visible spectrometry 80
2.4. Coloring strength of saffron 81
2.5. Grade of saffron 81
2.6. Determination of the morphological structure of the stigmas through scanning electron microscopy 82

2.7. Statistical analysis 82
3. Results and Discussion 82
3.1. Saffron quality results 82
3.1.1. The effect of site and altitude on moisture content 88
3.1.2. Effect of site and altitude on picrocrocin, safranal, and crocin 89
3.1.3. Influence of moisture content on picrocrocin, safranal and crocin 90
3.1.4. Effect of provenance on the quality of saffron 91
3.1.5. Morphological structure of stigmas 93
3.2. Principal component analysis: 94
3.3. Partial least square regression 97
4. Conclusion 101
References 103
Article II : Etude chimiométrique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Salvia rosmarinus* Spenn 107
1. Introduction 111
2. Materials and Methods 112
2.1. Plant Material 112
2.2. Essential Oils Extraction 114
2.3. Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis 114
2.4. Antimicrobial Activity 115
2.4.1. Bacterial Strains 115
2.4.2. Disc Diffusion Method 115
2.4.3. Minimal Inhibitory Concentration 116
2.5. Statistical Analysis 116
3. Results and Discussion 116
3.1. Variations of the Essential Oils Yield 116
3.2. Variations of the Essential Oil Compositions 118
3.3. Principal Component Analysis 123
3.4. Hierarchical Cluster Analysis 127
3.5. Antimicrobial Activity 129
4. Conclusions 133
References 134
Article III : Hydrodistillation simultanée de Cedrus atlantica Manetti et de *Salvia rosmarinus* Spenn : Optimisation de l'activité fongique contre la pourriture du bois en utilisant la méthodologie du plan de mélange 140
1. Introduction 144
2. Materials and Methods 145

2.1. Plant Material 145
2.2. Essential Oils Extraction 146
2.3. Chromatographic analysis 147
2.4. Anti-Wood-Decay Fungal Activity 147
2.5. Experimental Mixture design 148
2.6. Statistical Analysis 150
3. Results and discussion 150
3.1. Essential oils yield 150
3.2. Chemical composition of essential oil 151
3.3. Anti-Wood-Decay Fungal Activities of the tested binary combinations 158
3.4. Establishment of response prediction models 160
4. Conclusions 171
References 173
Article IV : Nanoencapsulation de l'huile essentielle combinée de Salvia rosmarinus Speen et Cedrus atlantica Manetti dans la gomme arabique : optimisation et application comme conservateur du bois 178
1. Introduction 182
2. Material and methods 183
2.1. Plant Material and Essential oils extraction 183
2.2. Chromatographic analysis 184
2.2.1. Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis 184
2.2.2. Gas chromatography (GC-FID) analysis 184
2.3. Encapsulation process of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* essential oil mixture in gum arabic 185
2.4. Encapsulation efficiency 185
2.5. Characterization of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* essential oil mixture in gum arabic 186
2.5.1. Morphology and particles size analysis 186
2.5.2. X-ray powder diffraction analysis 186
2.5.3. Fourier transform infrared spectroscopy analysis 186
2.5.4. Thermogravimetric analysis 186
2.6. Antifungal activity 186
2.7. Experimental design and data analysis 187
2.8. Statistical analysis 189
3. Results and discussion 189
3.1. Chemical composition 189
3.2. Optimization of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* essential oil mixture encapsulation condition in gum arabic 194
3.3. Characterization of nanocapsules 200

3.3.1. Morphology and particles size analysis 200
3.3.2. X-ray powder diffraction analysis 201
3.3.3. Fourier transform infrared spectroscopy analysis 202
3.3.4. Thermogravimetric analysis 204
3.4. Antifungal activity 205
4. Conclusion 208
Reference 209
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVE 215

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis l'Antiquité, la nature a représenté la source primordiale des besoins de l'homme : nourriture, médicaments, abris et également la matière première pour des produits de première nécessité. L'histoire indique que les aromates faisaient partie des premiers échanges commerciaux entre les peuples et que ces plantes occupent depuis toujours une place primordiale dans la fabrication des médicaments et des parfums ainsi que dans les préparations alimentaires [1].

De nos jours, les plantes aromatiques et médicinales ont un rôle primordial dans diverses industries non seulement pour leur usage comme aromate mais aussi pour leurs propriétés biologiques. L'utilisation de ces plantes dans différents produits commerciaux et domestiques remonte à l'antiquité, et ne cesse d'augmenter en raison de l'évolution de l'attitude des consommateurs vis-à-vis des produits naturels [2].

Les PAM et leurs produits dérivés font un élément de plus en plus important dans le marché mondial [3,4]. Jusqu'à présent, ils ont suscité l'intérêt du public mondial avec la tendance au "retour à la nature", et la demande croissante des industries par des plantes a conduit à une expansion significative de ses marchés de produits [5]. Cette situation offre une véritable opportunité de développement au Maroc, à travers l'adoption d'une politique appropriée, dans le domaine de la gestion, de l'exploitation et de la valorisation des PAM. En fait, celles-ci constituent des moyens à haute valeur ajoutée, capables de contribuer à améliorer les conditions de vie des populations démunies au Maroc en particulier dans les régions arides et semi-arides. Malgré ces avantages prometteurs, plusieurs contraintes nuisent au développement de ce domaine. Il s'agit principalement de la surexploitation des ressources naturelles, de problèmes liés à l'absence de techniques de récolte rationnelles et de techniques d'extraction appropriées des PAM, ainsi que l'absence de la valorisation au niveau local (le produit est vendu en vrac), et le manque de moyens modernes de transformation. Il est donc primordial de développer ce secteur notamment les coopératives et promouvoir la qualité des PAM.

En outre, la qualité des PAM dépend de plusieurs facteurs tels que l'espèce botanique, les parties de la plante (feuille, tige, racine, rhizome, fleur, graine, etc.), les méthodes de traitement (lavage, séchage, vapeur, etc.), les conditions de stockage (durée, température, humidité, etc.), les périodes de la récolte, ainsi que les conditions de cultures (terrain, sol, climat et ensoleillement) [4-8]. Ces facteurs ont provoqué des variations au niveau de la composition chimique des PAM d'un lot à l'autre, et ont entraîné une différence significative dans les activités biologiques [9].

Une évaluation et un contrôle rigoureux de la qualité de la composition chimique complexe des PAM sont d'une grande importance pour garantir son efficacité et sa sécurité. Cette évaluation était

généralement réalisée sur la base de la détermination quantitative de quelques composés majoritaires [10]. La détermination d'un seul composé majoritaire pour l'évaluation de la qualité des PAM a négligé l'importance de l'effet synergique des multicomposantes, et n'a pas représenté son efficacité globale [11,12]. Des techniques d'évaluation de la qualité globale reposant sur une approche non ciblée, ont été proposées afin d'établir une description chimique complète des PAM. Au cours des dernières décennies, le concept de traitement des données chimiques des PAM visant à obtenir une caractérisation complète des matrices chimiques complexes est devenu l'un des outils les plus convaincants pour l'évaluation de leur qualité.

Les analyses effectuées par différentes techniques analytiques ont fourni un nombre considérable des données, ce qui a offert une bonne occasion d'extraire des informations chimiques utiles de l'ensemble de données original riches en informations. Cependant, ces données signifient également qu'il est complexe (ne peuvent pas être évaluées facilement). Par conséquent, nous avons donc besoin des techniques de traitement de données pour exploiter les informations chimiques utiles [13]. Aujourd'hui, avec le développement de l'informatique, les analyses statistiques des données chimiques par des méthodes chimiométriques ont été de plus en plus appliquées à la recherche de la qualité des PAM, ainsi elles sont devenues des outils de premier plan par les communautés scientifiques pour obtenir rapidement des résultats d'analyse et réduire le temps de développement des produits. [14]. La chimiométrie implique l'utilisation d'approches statistiques pour analyser et modéliser les informations chimiques, elle peut simplifier ou réduire la dimensionnalité de données complexes, ce qui peut révéler ou expliquer des tendances sous-jacentes. Elle est largement utilisée pour résoudre divers problèmes dans différents domaines, tels que l'analyse de similitude, de classification et d'explorer la relation entre les variables indépendantes et dépendantes. L'application de la chimiométrie aux données chimiques permet d'extraire des connaissances couvertes des systèmes chimiques par modélisation mathématique, ce qui constitue une direction potentielle pour l'évaluation complète de la qualité des PAM. Les outils chimiométriques peuvent également être utilisés pour étudier les facteurs qui influencent ces analyses par le biais de la plan expérimentale, qui reste pour l'instant largement sous-utilisée dans le contexte des PAM. Ces approches peuvent conduire à l'élaboration de protocoles statistiquement validés pour la collecte, le stockage et l'analyse des preuves.

Dans ce contexte scientifique, nos travaux de thèse se sont orientés autour de quatre articles, dont deux sont publiés dans les journaux Journal of Food Processing and Preservation ([Q2] et [FI=

2.609]) et Molecules ([Q1] et [FI=4.927]), le troisième est soumis au journal ACS Omega ([Q1] et [FI= 4.132]), et le quatrième est soumis au journal Frontiers in Plant Science ([Q1] et [FI= 6.627]).

Après une introduction suivie d'une investigation bibliographique présentant un aperçu général sur les PAM. Cette étude inclut une monographie des trois plantes étudiées, le rôle des coopératives dans la gestion et la promotion des PAM au Maroc et les différents travaux proposés dans la littérature concernant les méthodes chimiométriques utilisées dans l'évaluation et la valorisation des PAM. Ainsi que des informations sur la nano-encapsulation des huiles essentielles, notamment dans la gomme Arabique, et sur les applications des complexes d'inclusion dans le domaine de préservation du bois. Les résultats de ces travaux sont ensuite présentés à travers quatre articles conduits conjointement, à savoir :

- Article I : Cet article comporte la gestion et l'investigation de l'effet des conditions de culture, particulièrement l'altitude et la provenance de la qualité du *Crocus sativus* L. dans la région de Taliouine et Taznakhet par des traitements multivariés notamment, l'analyse en composantes principales et la régression en moindres carrés partiels.
- Article II : Cet article inclut l'étude de l'effet de la période de récolte et des coopératives sur le rendement et la composition chimique du *Salvia rosmarinus* Spenn dans la région orientale, en particulier la province du Figuig par des traitements multivariés notamment, l'analyse en composantes principales et l'analyse en classification hiérarchique.
- Article III : Cet article est dédié à l'élaboration des formulations de deux huiles essentielles issues de *Salvia rosmarinus* Spenn et *Cedrus atlantica* Manetti, pour lutter contre les champignons responsables de la pourriture du bois à savoir : *Coniophora puteana*, *Coriolus versicolor*, *Gloeophyllum trabeum*, et *Poria placenta* par la méthodologie des plans d'expérience en particulier, le plan de mélange.
- Article IV : Cet article vise à l'optimisation des conditions de nano-encapsulation par la gomme Arabique de la formulation optimale des huiles essentielles par la conception de plan d'expérience de type surface de réponse.

Après une conclusion générale et les nouvelles perspectives qu'ouvrent ces résultats seront présentés.

Ce travail permettra la mise en évidence d'une nouvelle voies de valorisation des PAM par l'utilisation des techniques chimiométriques, à savoir l'analyse multivariée (l'analyse en composantes principales, l'analyse en classification hiérarchique et la régression en moindres carrés

partiels) et la conception de plan d'expérience (plan de mélange et plan de surface de réponse). Par ailleurs, il offrira la possibilité de proposer un traitement alternatif stable et efficace pour la préservation du bois contre le développement fongique.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les plantes aromatiques et médicinales au Maroc

Selon la Pharmacopée européenne, les plantes médicinales sont considérées comme des médicaments à base de plantes possédant au moins certaines propriétés médicinales. Il est rare que la plante soit utilisée dans sa totalité ; plus fréquemment, une ou plusieurs parties de la plante sont utilisées, pour des usages variés [15].

Les plantes aromatiques et médicinales ont toujours été utilisées par l'homme. Environ 35 000 espèces de plantes sont utilisées par la population mondiale à des fins médicinales [16]. Au cours du temps, il a acquis une expertise et des connaissances dans le domaine de la cosmétique et la pharmacopée traditionnelle. De plus en plus à travers le temps, la demande locale et internationale en matière de PAM a sans cesse augmenté et exerce par conséquet une forte pression sur les ressources naturelles [17,18].

Aujourd'hui, une grande diversité de la population mondiale, en particulier dans les pays en développement, utilise les PAM pour faire face aux besoins primaires d'assistance médicale. Environ 80% de la population dépend des produits des PAM pour l'automédication [19,20]. A l'instar des pays en développement, le Maroc entreprend constamment des recherches sur l'utilisation potentielle de PAM pour des applications thérapeutiques. Le Millieu rural qui est très proche de la terre fait plus confiance aux soins par les plantes naturelles, approche très convoitée par les herboristes [21-23]. Ces usages populaires, bien ancrés dans la culture de cette société, étaient liés à la diversité ethnique, à l'histoire ancienne, aux croyances et aux conditions socioculturelles. En plus des Berbères indigènes, ce pays a accueilli une grande diversité de population ethniques venant à la fois de l'Est (Phéniciens, Juifs et Arabo-musulmans), du Sud (Africains subsahariens) et du Nord de l'Afrique (Romains et Vandales) [24]. Toutes ces personnes venant de tous les horizons ont eu un impact sur l'histoire culturelle riche, vibrante et diverse de cette société. Cette histoire ancienne couplée à l'évolution contemporaine a permis le développement d'une culture spécifique qui incarne intrinsèquement une myriade de sous-cultures visiblement distinctes. Elle concerne diverses formes de cultures et de croyances allant du paganisme, du judaïsme, du christianisme à l'islam. Parmi tous ces domaines, la santé et la guérison traditionnelle par les PAM représentent une composante importante de cette diversité culturelle [25]. En matière des PAM, les capacités nationales sont très importantes et constituent un avantage, notamment pour le développement socio-économique rural [26].

1.1. Diversité des PAM au Maroc

1.1.1. La richesse et la biodiversité des PAM au Maroc

Le Maroc possède une grande diversité géographique (plaines, basse, moyenne et haute montagne, vallées, falaises etc.) accompagnée d'une variabilité climatique qui a conduit et conduit toujours à l'installation et au développement d'une flore riche et variée. En effet, le Maroc occupe une place prépondérante dans le secteur des plantes aromatiques et médicinales, en raison de sa diversité et de son importance pour l'économie nationale. Selon les dernières statistiques, Il possède une véritable réserve phytogéologique avec 41 écosystèmes et 7000 espèces végétales, dont 5211 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires, subdivisées en 155 familles et 981 genres [27]. Cependant, l'exploitation de ce potentiel naturel extraordinaire est faible. Parmi les 600 plantes qui ont une valeur médicinale et aromatique seulement 280 qui sont exploitées.

En plus de sa diversité biologique, le Royaume est classé ainsi au premier rang des pays du Sud de la Méditerranée pour sa richesse en plantes endémiques [28]. Il existe 800 espèces endémiques (près de 19% des fora marocains), cette richesse est due à des facteurs écologiques très variés. Parmi les genres les plus riches en espèces endémiques [29]:

- 23 sur 48 espèces du genre *Teucrium*
- 23 sur 68 espèces du genre *Siléne*
- 11 sur 50 espèces du genre *Centaurea*
- 9 sur 19 espèces du genre *Thymus*
- 9 sur 47 espèces du genre *Astragalus*
- 5 sur 43 espèces du genre *Linaria*
- 10 sur 48 espèces du genre *Ononis*
- 8 sur 25 espèces du genre *Bupleurum*
- 10 sur 17 espèces du genre *Leucantheum*
- 4 sur 26 espèces du genre *Genista*
- 8 sur 25 espèces du genre *Stachys*
- 6 sur 24 espèces du genre *Sedum*
- 7 sur 45 espèces du genre *Euphorbia*

Parmi les arbres endémiques : *Abies naroccana, Acacia gummifera, Argania spinosa, Cedrus atlantica, Pinus clusiana var mauretanica, Pinus pinaster var maghrebiana* [30].

En outre, la répartition géographique de la flore endémique du Maroc met en relief la grande originalité du Haut Atlas comme principal foyer d'endémisme. Les autres chaînes montagneuses du pays (Moyen Atlas, Rif, Anti-Atlas) montrent également un endémisme remarquable [31].

1.1.2. Aspects economique, social, societal et patrimonial de la filière PAM au Maroc

Les PAM constituent une ressource naturelle qui peut jouer un rôle essentiel dans le développement socio-économique de certaines régions marocaines. Le Maroc est un fournisseur traditionnel du marché mondial des PAM. Il est classé le 12ème exportateur mondial des PAM. En effet, il exporte en moyenne 52.000 tonnes par an, soit l'équivalent de 500 millions de dirhams en PAM sous diverses formes et près de 165 millions de dirhams en huiles essentielles, soit un total d'environ 465 millions de dirhams [32]. Cette activité permet de générer des revenus importants et la création de milliers de journées de travail (environ 500 000 journées de travail pour un salaire de 25 millions de dirhams), notamment pour les communautés rurales et la consolidation de leurs équilibres commerciaux [33].

L'importance de ce domaine pour les populations rurales est marginalisée a encouragé l'état à créer des coopératives et des associations qui opèrent dans ce secteur afin de garantir une utilisation appropriée des ressources, et d'attirer les investissements privés dans le domaine des PAM ainsi d'améliorer les conditions de vie des habitants des régions rurales en leur permettant de bénéficier de la valeur ajoutée générée par la valorisation et la transformation des PAM [34].

1.1.3. Les rôles des coopératives dans la gestion et la promotion de la filière PAM au Maroc

Au cours de ces dernières décennies, le domaine des plantes aromatiques et médicinales a connu une évolution remarquable. En effet, sur les 4200 plantes existantes, 800 sont répertoriées comme plantes aromatiques et médicinales et la majorité de ces plantes viennent des régions les plus défavorisées du pays alors leur commercialisation apporte un revenu important. De ce fait, l'Etat marocain a lancé le projet du Plan Maroc Vert (2008-2020) pour optimiser la production et la commercialisation afin d'assurer une meilleure exploitation et valorisation des plantes médicinales et aromatiques avec une amélioration des conditions de vie des populations de ces régions. Il a procédé à la subvention des organisations à caractère professionnel telles que les coopératives et les associations pour passer d'un secteur qui fournit des matières premières non transformées à un secteur industriel qui offre des gammes de produits de qualité pour les marchés nationaux et internationaux [35].

Ce projet vise à intégrer les coopératives qui rassemblent la population utilisatrice, dans la chaîne de valeur et le développement des secteurs associés au PAM.

Ces coopératives permettent non seulement une meilleure exploitation de la ressource, mais aussi la création et la popularisation de bonnes pratiques de collecte du PAM auprès de ces populations et l'institutionnalisation d'un partenariat entre l'administration forestière et les coopératives.

Aujourd'hui, les coopératives sont désormais perçues comme l'une des plus importantes composantes du développement économique social et solidaire. Ces coopératives renforcent également l'autonomie économique des femmes rurales, améliorent les conditions de vie des familles locales et de luttent contre la pauvreté [35,36].

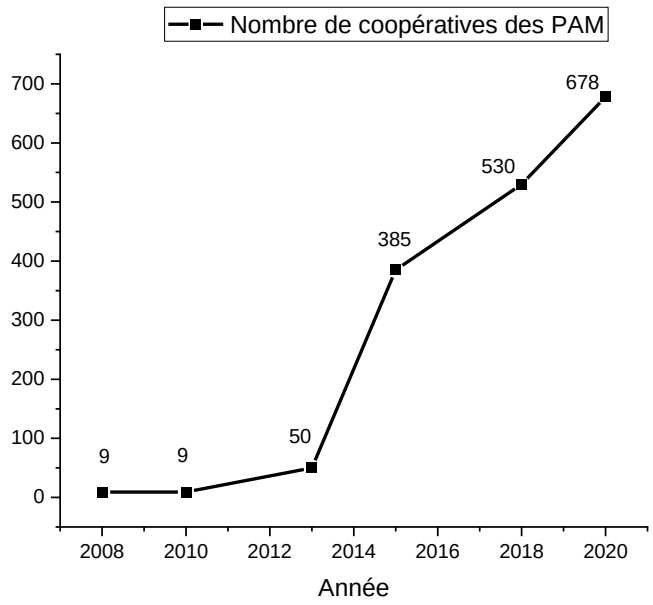


Figure 1: Evolution de nombre des coopératives des PAM au Maroc pendant 2008 à 2020.

Avec le plan du Maroc vert, le secteur coopératif des PAM marocain a connu ces derniers temps une attractivité importante et une véritable dynamique socio-économique. Selon les statistiques de l'Office du développement de la coopération (ODCO), le nombre des coopératives a évolué dans la période de 2008 à 2020 (Figure 2). Le nombre des coopératives des PAM a passé de 9 en 2008 à 50 en 2013. En 2015, en passant de 50 à 385 coopératives. De même, le nombre des coopératives a passé de 530 en 2018 à 678 en 2020 [37]. Parmi celles-ci figurent les coopératives du safran dans la région Souss-Massa et Drâa-Tafilalte, du cèdre de l'Atlas dans le Moyen Atlas et du romarin dans la région de l'Orientale.

1.1.3.1. Secteur du safran

La culture du Safran est une activité primordiale dans plusieurs Douars des communes de Taliouine et Taznakhte, elle génère un montant important de revenus pour les familles, estimé à plus de dix mille dirhams par ménage [38]. Il est essentiel de noter que la culture de Safran évolue, elle est passé d'une production pour l'autoconsommation à une production pour la commercialisation aux marchés. Cette évolution est attribuée aux efforts fournis pour la valorisation du safran de la région depuis 2007 dans le cadre de la nouvelle stratégie de développement des produits du territoire.

Le projet de coopérative a été initié en 2008, avec une douzaine associations dans les différentes communes. Ces coopératives ont participé à l'amélioration de la promotion territoriale. Cette contribution se décline en trois approches principales.

- ✓ **La contribution socioéconomique :** les coopératives de safran réalisent des chiffres d'affaires élevés et marqués par une évolution positive d'année en année. Selon l'Office régional de développement agricole, le chiffre d'affaires a été multiplié par 4,8, passant de 17 millions de DH en 2008 et 82 millions de DH en 2019 [39]. Ce revenu permet aux associés d'améliorer leurs conditions de vie et d'assurer également une véritable intégration des femmes rurales dans le tissu socioéconomique.

- ✓ **La contribution à la préservation de safran :** L'amélioration des situations socioéconomiques des adhérents est un facteur positif pour encourager les coopératives d'élargir les zones de culture de safran. Cette amélioration permet donc de renforcer la préservation de la culture du safran dans différentes communes rurales de la région Taliouine et Taznakht.

- ✓ **La contribution à l'amélioration de l'image territoriale :** Les coopératives safranières est un élément essentiel qui permet de contribuer à la constitution de l'identité économique régionale et au renforcement de l'attractivité du territoire en développant un modèle économique durable.

1.1.3.2. Valorisation de la production du cèdre de l'Atlas

Le cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Manetti) est une espèce endémique des montagnes de l'Afrique du Nord, du Maroc et de l'Algérie. Au Maroc, il couvre une surface d'environ 133 000 ha, il occupe 2,8% de la surface totale forestière. Cette superficie est répartie essentiellement sur quatre régions : le Rif (8 300 ha), le Moyenne Atlas (93 500 ha), et le Haut Atlas (31 200 ha). Au Moyenne Atlas central, le cèdre constitue l'ensemble le plus important au Maroc, seulement à Ifrane (province de

Moyen Atlas), le cèdre couvre plus de 40 000 ha [40]. L'importance du cèdre découle de l'intérêt bio-écologique et socio-économique ainsi que de ses qualités qui lui permettent d'occuper une place primordiale dans la forêt méditerranéenne [41].

Vu l'importance du patrimoine forestier, la province d'Ifrane a connu la naissance de dizaine de coopératives dont principalement les coopératives de madriers, et de charbonniers, elle produit une excellente qualité du bois d'œuvre, du bois de menuiserie, et de goudron végétal. Cependant, il existe très peu de coopératives de valorisation des produits du cèdre, et la première coopérative a été créée en 2016. Ces coopératives ont favorisé le développement territorial. Cet apport s'appuie sur trois orientations principales.

- ✓ **La contribution socioéconomique :** les coopératives de cédraie ont permis d'améliorer les conditions de vie des populations issues des zones montagneuses par la commercialisation des produits à base de cèdre.
- ✓ **La contribution à la préservation de cèdre :** afin de favoriser une protection de cèdre d'Atlas, L'Agence Nationale des Eaux et Forêts a adopté une stratégie, qui s'intéresse à l'implication des personnes usagères au cœur de la gestion des forêts. Cette gestion repose d'une part sur leur conservation, leur diversité et leur pérennité et d'une part sur l'exportation rationnelle d'autre part. De plus, les coopératives de production de l'huile essentielle de cèdre essaient également de valoriser à travers l'exploitation de la sciure du bois de cèdre recueilli auprès des menuiseries de la région pour protéger cette espèce endémique du Maroc.
- ✓ **La contribution à l'amélioration de l'image territoriale :** Les coopératives de cèdres contribuent à la dynamisation interne de l'économie locale, ce qui permet la création d'une valeur ajoutée territoriale.

1.1.3.3. Promotion du secteur de production de Romarin dans la région de l'Orientale

Au Maroc, le romarin pousse spontanément dans les régions aériennes, notamment dans les régions orientales du pays, où il couvre environ 500 000 ha dans les trois provinces de Taourirt, Jerada et Figuig. Cette superficie est répartie essentiellement sur les quatre provinces de Taourirt (148 062 ha), Jerada (63 686 ha), Figuig (280 000 ha) et Nador (1 000 ha) [42]. Rien qu'à Talsint (province de Figuig), l'arbuste du romarin couvre plus de 200 000 ha [43]. Dans les provinces de Taourirt, Jerada et Bouarfa, le romarin est le plus répandu et exploité. Les communes rurales les plus concernées par cette ressource sont Talsint et Boumerieme dans la province de Figuig [44,45].

Afin de favoriser un développement durable des nappes de romarin de la région de l'Oriental, et de faire bénéficier les communautés rurales des ressources offertes par ces milieux, l'Agence nationale des Eaux et Forêts, s'investit particulièrement dans l'organisation des exploitants, ce qui a conduit à la création des coopératives qui regroupent plusieurs exploitants.

Actuellement, plus d'une dizaine de coopératives du romarin dans la région de l'Oriental avec une présence de 6000 membres des coopératives et cueilleurs, dont 30% sont des femmes, réalisent **2000** DH (=20% du revenu actuel déclaré en moyenne) de revenus nets additionnels par an [46]. Ces coopératives ont contribué au développement du territoire. Cette contribution est fondée sur trois axes principaux.

- ✓ **Les contributions socioéconomiques :** les coopératives du romarin jouent un rôle important dans l'économie locale. Elle permet la réduction de la pauvreté rurale, la création de la richesse et d'emploi par la récolte de romarin ainsi le commerce de l'huile essentielle [47].
- ✓ **La contribution à la préservation des nappes de romarin :** L'Agence Nationale des Eaux et Forêts (ANDEF) a retenu, parmi les axes stratégiques de sa politique, la gestion et le développement durable du romarin en assurant la conservation et la reconstitution des nappes du romarin. Pour ce faire, l'ANDEF est amené à mettre des conditions d'exploitation dans les contrats avec les coopératives telles que :
    - Respecter la période de repos des parcelles pour la régénération,
    - Couper avec des sécateurs pour ne pas endommager les touffes,
    - Couper au maximum 50 % de la touffe
    - Éviter la récolte du Romarin à proximité des habitations et des douars [48].
- ✓ **La contribution à l'amélioration de l'image territoriale :** Les coopératives du romarin contribuent dans l'attractivité territoriale, ce qui favorise le développement de l'économie sociale et solidaire et territoire dans la région de l'Oriental [49].

1.2. Composition chimique et exploitation pharmacologique et industrielle des plantes de grande valeur ajoutée au Maroc

1.2.1. Safran (*crocus Sativus* L.)

1.2.1.1. Présentation de *crocus Sativus* L.

Le safran (*Crocus sativus* L.) est une géophyte herbacée vivace de la famille des Iridacées qui se propage végétativement au moyen d'un bulbe [50]. Il atteint 10 à 25 cm de hauteur en se développant à partir de ses bulbes. Ce dernier est de forme sub-ovoïde, sa taille et sa forme sont variables. Il a une structure massive, recouvert de nombreuses spathes concentriques. Chaque bulbe mère produit

à partir des bourgeons apicaux un à trois gros bulbes filles et plusieurs petits bulbes à partir des bourgeons latéraux [51]. Le safran possède deux types de racines : des racines fibreuses, fines à la base du bulbe mère, et des racines contractiles formées à la base des bourgeons latéraux [52]. Les feuilles varient de 5 à 11 par bourgeon. Elles sont très étroites et mesurent entre 1,5 et 2,5 mm de couleur vert foncé. Elles mesurent de 20 à 60 cm de long avec une bande blanchâtre dans la partie interne et une nervure à l'extérieur. Les fleurs de *Crocus sativus* commencent à apparaître au début de l'automne, vers la fin du mois de septembre, de couleur violette, composées de six tépales, trois sont internes, tandis que les trois autres sont externes, qui se rejoignent au niveau du long tube qui naît de la partie supérieure de l'ovaire (Figure 3). A leur apparition, les fleurs sont protégées par des bractées membraneuses blanchâtres. Le pistil est composé d'un ovaire inférieur d'où part un style fin de 9 à 10 cm de long [53].

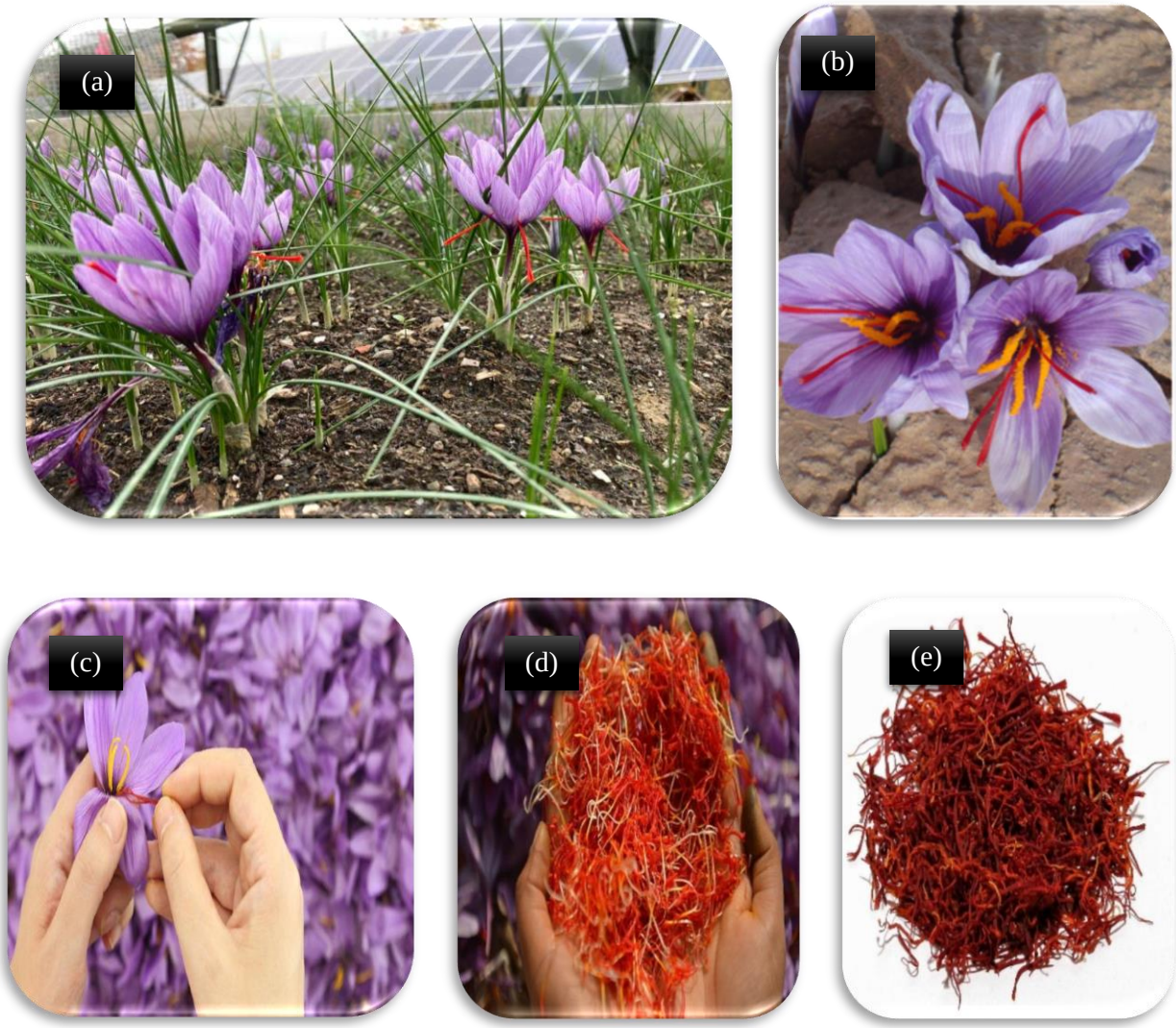


Figure 2: l'espèce *Crocus sativus* L. Plante Crocus (a), fleur Crocus avec stigmate (b), récolte du safran de la fleur Crocus (c), safran fraîchement récolté (d), safran séché (e).

La classification de *Crocus sativus* Linnaeus est indiquée dans le tableau 1.

Tableau 1: classification botanique de *C. sativus.*

Division	*Spermatophyte*
Sous-division	*Angiosperme*
Classe	*Monocotylédone*
Sous-classe	*Liliidae*
Ordre	*Liliales*
Famille	*Iridaceae*

Sous-famille	*Crocoideae*
Genre	*Crocus*
Espèce	*Crocus sativus Linnaeus*

1.2.1.1. Aire de répartition géographique du safran au Maroc

Crocus sativus L. est une espèce endémique du Maroc et l'une des plantes les plus chères parmi les plantes aromatiques et médicinales dans le monde. La principale région de production du safran ((> 95% des surfaces cultivées) est localisée dans la région du Souss-Massa et Drâa-Tafilalte (Sud-Ouest du Maroc). La produit du safran se répartie en deux provinces : province de Taroudant (zone de Taliouine) à l'Ouest du massif de Siroua et province de Ouarzazate (zone de Taznakht) au Sud Est du massif de Siroua (Figure 4) [54]. La région secondaire (< 5% des surfaces cultivées) se situe dans cinq nouvelles zones de production de safran marocain, liées soit à des initiatives privées (projet d'entreprise), soit publiques (projet d'appui au développement rural). Elles sont réparties sur différentes régions (Figure 4) : Zone de la vallée d'Ourika, zone de Chichaoua, zone de debdou, zone de Chefchaouen, et autres zones comme Zagora, Skoura et Boulmane [38].

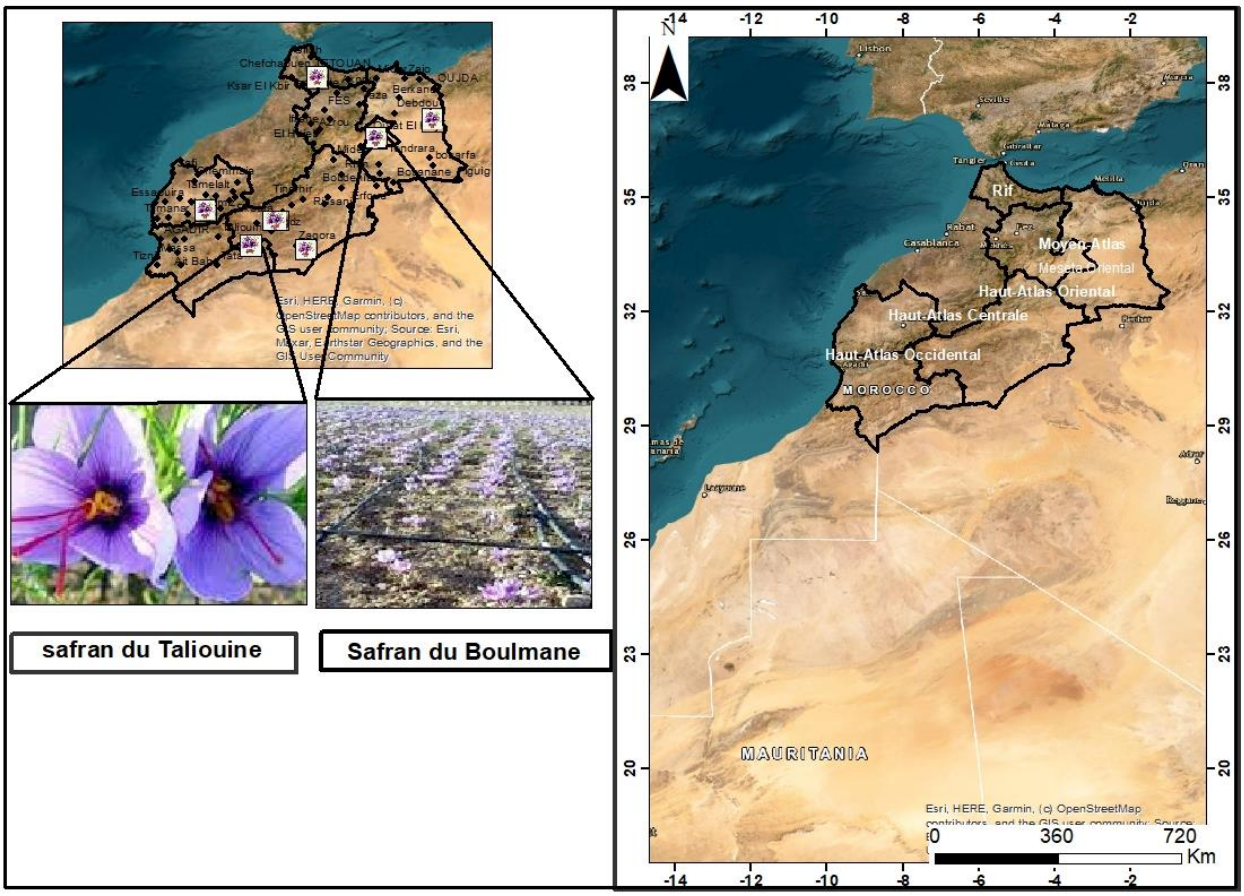


Figure 3 : Aire de répartition géographique du safran au Maroc.

1.2.1.2. Profil chimique des extraits de safran

L'analyse chimique des stigmates de *C. sativus* a montré la présence d'environ 150 composés volatils et non volatils. Cependant, moins de 50 constituants ont été identifiés jusqu'à présent [55]. Les trois principaux composés biologiquement actifs sont : crocine, picrocrocine, et safranal (Figure 5).

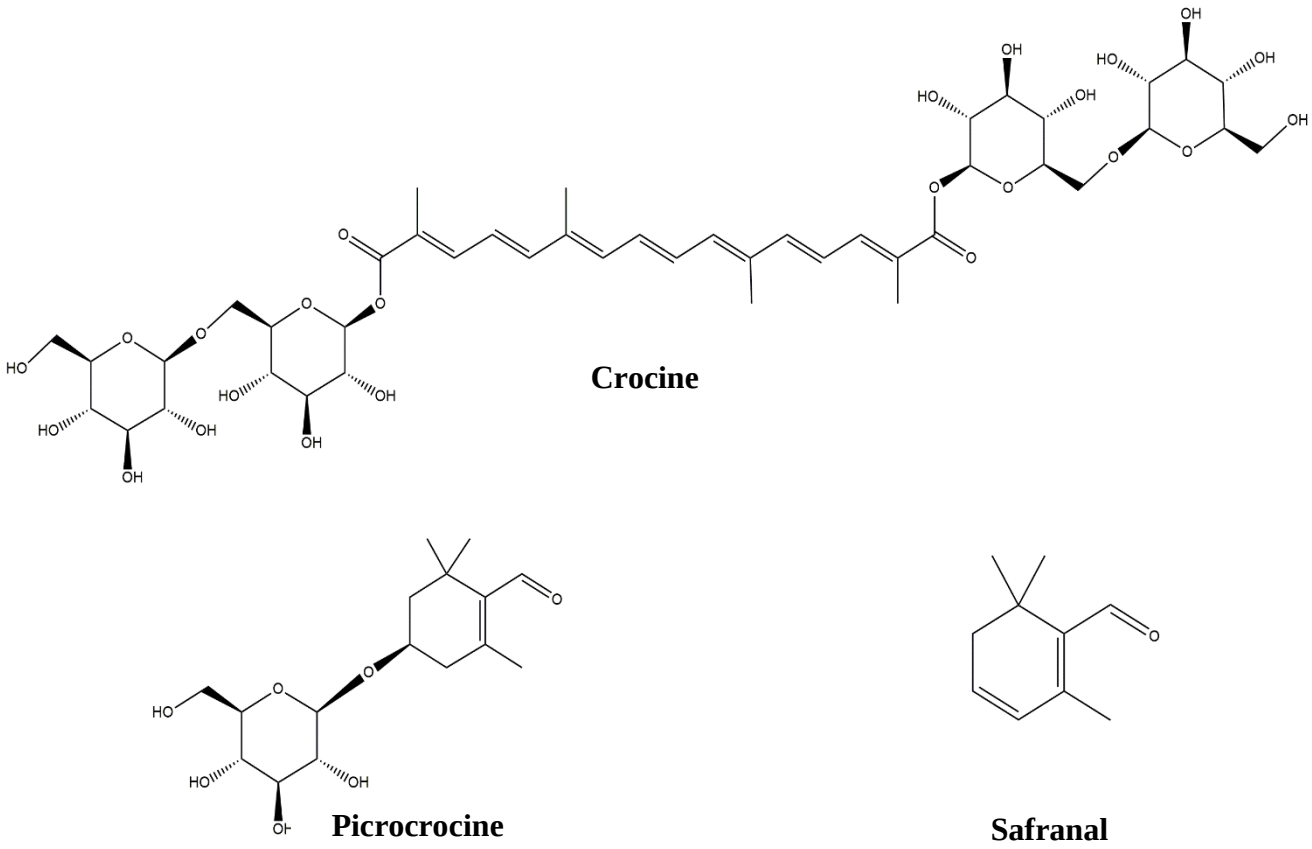


Figure 4 : Structure chimique des trois principaux composés du safran.

Le crocine, responsable de la couleur jaune-orange, est un caroténoïde rare dans la nature, facilement soluble dans l'eau. Par rapport aux autres caroténoïdes, le crocine à une application plus large en tant que colorant dans les aliments et les médicaments, principalement en raison de sa grande solubilité. Le picrocrocine est le principal facteur influençant le goût amer du safran, qui peut être cristallisé par hydrolyse [56]. Le safranal, responsable de l'arôme (il représente 70% de la fraction volatile), est peu ou pas présent dans les stigmates frais, sa concentration dépend des conditions de séchage et de conservation du safran [57].

Outre le crocine et le picrocrocine, les principaux composés du safran sont les anthocyanes, les flavonoïdes mais il est également riche en vitamines, acides aminés, protéines, amidon, matières minérales et gommes [55]. Elle possède également de nombreux composants actifs non volatils, dont beaucoup sont des caroténoïdes, notamment la zéaxanthine, le lycopène et divers α- et β-carotènes. Les molécules volatiles, qui ont une odeur très forte, sont constituées de plus de 34 composants, qui sont principalement des terpènes, des alcools terpéniques et des esters [58].

La qualité du safran dépend de la concentration de ces trois principaux métabolites qui confèrent aux stigmates leur couleur et leur saveur uniques. Leur teneur dépend de l'environnement et des pratiques culturelles [59]. La composition chimique des échantillons du safran provenant de nombreux pays indique, que les valeurs rapportées dépendent fortement des méthodes utilisées pour le séchage, l'extraction et l'analyse des stigmates [60,61]. De nombreuses méthodes d'analyse des composants de cette plante ont été décrites [62]. La qualité de cette plante est réglementée par les normes ISO 3632, qui visent à normaliser la classification du safran dans le monde entier ; ces normes sont mises à jour tous les trois ans par l'organisation internationale de normalisation.

1.2.1.3. Variation qualitative de Safran selon la norme Internationale

La détermination de la qualité du safran n'est pas évidente, la pureté et les propriétés colorantes du safran, ainsi que son goût et sa saveur définissent sa qualité. Depuis 2011, des lignes directrices pour l'analyse des principaux composés bioactifs du safran ont été définies par l'Organisation internationale de normalisation (ISO 3632). Selon l'ISO 3632, le crocine, le picrocrocine et le safranal sont respectivement responsables de la couleur, de la saveur et de l'arôme du safran [63]. Lorsque le safran est conforme aux exigences de la norme ISO 3632 et aucune matière n'a été ajoutée au produit naturel, on dit qu'il est pur [64]. Les deux parties qui constituent cette norme, ISO 3632-1:2011 et ISO 3632-2:2010, fournissent des méthodes d'essai pour les différentes formes sous lesquelles se présente le safran séché en filaments entiers, coupés et en poudre.

La norme ISO/TS 3632 permet de classer le safran en quatre catégories ; de la plus faible catégorie IV à la meilleure catégorie I, selon son taux d'humidité qui doit être varié entre 10% et 12% et sa teneur en Crocine, Picrocrocine et Safranal. Le tableau 2 ci-dessous représente les caractéristiques chimiques de safran selon la norme ISO/TS 3632 :

Tableau 2: Propriétés chimiques du safran selon la norme ISO/TS 3632 [64]

Composés du safran	Catégorie I	Catégorie II	Catégorie III	Catégorie IV
Saveur amère, Picrocrocine $E^{1\%}_{1cm}$ 257nm, sur matière sèche, min.	70	55	40	30
Safranal, $E^{1\%}_{1cm}$ 330nm, sur matière sèche : min / max.	20/50	20/50	20/50	20/50
Pouvoir colorant, Crocine $E^{1\%}_{1cm}$ 440nm, sur matière sèche : min.	190	150	110	80
Humidité %, max	12	12	12	12

1.2.1.5. Facteurs influençant sur la qualité du Safran

Plusieurs études ont porté leur attention sur les facteurs qui affectent la qualité et donc la valeur économique du produit final. La qualité n'est pas influencée par la taille du bulbe [65] mais dépend surtout des conditions climatiques (température, précipitations), de l'origine géographique du bulbe [66-68], du degré d'ouverture de la fleur [69], des traitements post-récolte [69], de séchage (température, durée) et des conditions de stockage [70-73] ont montré que l'altitude affectait positivement l'anatomie et la concentration de crocine.

1.2.1.6. Utilisations du safran et de son extrait

De l'Antiquité à nos jours, et dans le monde entier, le safran est toujours utilisé en cuisine. Il est utilisé en Inde, en Iran, en Espagne et dans d'autres pays comme assaisonnement pour le riz [74]. Au Maroc, le safran est utilisé dans le thé à la place de la menthe, mais aussi comme épice dans la préparation de divers plats traditionnels, dont la Mrouzia, la Rfissa, le Kadid et le couscous. Le safran est également un ingrédient central dans le mélange des épices qui parfume de nombreux plats marocains [75].

Pour les huiles essentielles du romarin, elles sont actuellement utilisées dans l'industrie alimentaire, la parfumerie, le cosmétique, la savonnerie ainsi que dans l'industrie pharmaceutique.

Dans le côté pharmacologique, le safran est principalement utilisé pour ses propriétés médicinales à des fins diverses : comme un anti-cancéreux, aphrodisiaque, antispasmodique, pour le traitement des maux d'estomac, pour soulager la tension. Dans la médecine traditionnelle persane, il est utilisé pour la dépression. Il est également utilisé pour traiter l'insomnie et entre dans le traitement de la rougeole, la dysenterie, la jaunisse etc. Il est appliqué sous la forme de pâte pour traiter les maladies

de la peau comme l'acné. Le safran est considéré comme tonique pour le cœur et le système nerveux [76].

Le safran est utilisé dans l'industrie de la parfumerie et des cosmétiques, mais l'utilisation actuelle la plus importante de cette plante est dans l'industrie alimentaire [62].

- En l'industrie alimentaire, Le safran est utilisé comme additif alimentaire pour ses propriétés colorant et exhausteur de goût, il réveille les saveurs de nombreux aliments tout en libérant son délicieux parfum. Il est aussi utilisé pour la préservation des produits alimentaires grâce à son activité antioxydante [63].
- En industrie pharmacologique, le safran est utilisé dans les préparations pour les cas de problèmes d'éjaculation précoce [64]. Il existe également des préparations à base de safran utilisées pour soulager le syndrome prémenstruel et pour le traitement de plusieurs maladies de la peau.

En industrie cosmétique, le safran est le secret d'une beauté épicée. Il est employé pour ses propriétés éclaircissantes et son pouvoir antioxydant qui permet de neutraliser les radicaux libres pour agir comme un « anti-âge » [65,66].

Les utilisations et les propriétés bénéfiques du safran en médecine, dans les parfums et les cosmétiques ainsi que dans les industries alimentaires ont été documentées par plusieurs auteurs (Tableau 3).

Tableau 3: Utilisation des extraits du safran dans les domaines de la médecine, de la parfumerie et de cosmétique, et d'agroalimentaire. (---) : non trouvé.

Origine	Molécules testées	Partie utilisée	Type d'utilisation	Type d'administration	Dose	Effet	Référence
Iran	Crocine et crocétine	stigmate	Médecine	administration par voie orale	Extraits aqueux (0,32, 0,56 et 0,8 g/kg, i.p.) et éthanoliques (0,8, 1,4 et 2 g/kg, i.p.)	Anti-inflammatoire	[77,78]
Iran	Crocine et crocétine	stigmate	Médecine	administration par voie orale	40 mg/kg/jour	Hépatoprotecteur	[79]
Iran	Crocins, crocetin and safranal	stigmate	Médecine	administration par voie orale	30 mg/jour	Antihypertenseur et hypolipidémique	[80]
Iran	Crocine	stigmate	Médecine	administration par voie orale	50 mg/jour	Cardiovasculaire	[81]
Iran	Safranal et crocine	stigmate	Médecine	administration par voie orale	30 mg/jour	Antidépresseur et anxiolytique	[82]
Iran	Crocine	stigmate	Médecine	administration par voie orale	30 mg/jour	Alzheimer	[83]
Iran	crocetine	stigmate	Médecine	administration par voie orale	25, 50 et 75 µg/kg de poids corporel	Parkinson	[84]

Espagne	Safranal et crocine	Stigmate	Agroalimentaire	---	---	Antibactérien (*Salmonella enterica*)	[85]
Iran	Crocine, safranal, acide gallique	stigmate	Agroalimentaire	---	2 g/ 1L d'eau	Anti-lipide oxydant dans la viande de poitrine de poulet pendant le stockage	[86]
Italie	Crocine	stigmate	Agroalimentaire	---	1% (w/v) extrait de safran/yaourt ou pâtes	Antioxydant, sensoriel et digestibilité	[87]
Iran	Crocine et crocétine	stigmate	Cosmétique	administration par voie cutanée	lotion à 3%	Anti-âge et maladies de la peau	[88]
Iran	Crocine, kaempherol, quercétine, composants phénoliques tels que les acides tannique, gallique, caféique, cinnamique, chlorogénique, férulique et vanillique	Pollen	Cosmétique	administration par voie cutanée	2−4-8% lotions	Antisolaire et hydratant	[89]

1.2.2 Cédre d'Atlas (*cedrus Atlantica* Manetti)

1.2.2.1. Présentation de *cedrus Atlantica* Manetti

Le cèdre (*Cedrus atlantica* Manetti) est un arbre endémique d'Afrique du Nord et du Maroc dont la longévité est de plusieurs siècles. Il représente une richesse écologique, économique, sociale et culturelle. C'est un grand arbre, atteignant une hauteur moyenne de 40 mètres. Il a un port pyramidal lorsqu'il est jeune, puis devient tabulaire lorsqu'il est vieux, avec des branches généralement longues et dressées, portant des feuilles isolées de 10 à 20 mm de long, dont la couleur peut aller du vert clair foncé ou glauque au bleu et sous forme de nombreuses rosettes. Ses fruits, sous forme de cônes ellipsoïdes de couleur brune avec des écailles fines et très serrées, sont d'une taille moyenne de 5 à 8 cm (Figure 6) [30].



Figure 5 : L'espèce de *Cedrus atlantica* Manetti. . L'arbre du cèdre (a), feuille avec fruit (b), feuille (c), ecorce (d).

La classification du *Cedrus atlantica* Manetti est mentionnée dans le tableau 4.

Tableau 4: Classification botanique de *cedrus atlantica* Manetti.

Règne	*Plantae*
Sous règne	*Viridaeplantae*
Embranchement	*Spermaphytes*
Sous embranchement	*Gymnospermes*
Classe	*Vectrices*
Sous classe	*Pinidae*
Ordre	*Coniferales*
Famille	*Pinacées*
Sous-famille	*Abiétées*
Genre	*Cedrus*
Espèce	*Cedrus atlantica Manetti*

1.2.2.2 Aire de répartition géographique de cèdre d'Atlas au Maroc

Cedrus atlantica Manetti est une espèce endémique des montagnes d'Afrique du Nord. [8]. Il couvre une surface d'environ 131 000 ha au Maroc environ de 2,8% de la surface totale forestière. Il s'étend essentiellement entre le Rif (16000 ha), le Moyen Atlas central et oriental (100 000 ha) et le Haut Atlas oriental (15 000 ha), sur une surface estimée à 133 000 ha (Figure 7) [90]. Dans la chaîne rifaine, le cèdre se développe dans son aire optimale de 1500 à 1900 m sur calcaire et sur substrat quartzeux-schisteux (à Ketama), et sur substrats gréseux (à Tizirène) ainsi que dans des zones restreintes et isolées (Jbel Kelti, Talassemtane, Jbel Tiziren, Oursane, Tidighine) [41]. Au Moyen Atlas central, le cèdre constitue l'ensemble le plus important au Maroc et se développe sur le substrat calcaire ou dolomitique de Timahdit, Azrou, Ain Leuh, M'rirt, Khénifra, Itzer et Tounfite. Au moyen Atlas oriental, la cédraie est répartie en petits îlots entre les massifs de Bou Iblan, de Taffert et de Tamtroucht au nord et dans les massifs de Bou Naceur au sud sur substrat dolomitique ou marno-calcaire. Dans le Haut Atlas oriental, le cèdre se développe sur les versants de Jbel Ayachi et Jbel Masker sur des marno-schistes calcaires. Ces massifs représentent des analogies climatiques et édaphiques avec la cédraie de Bou-Iblane au Moyen Atlas Oriental [40].

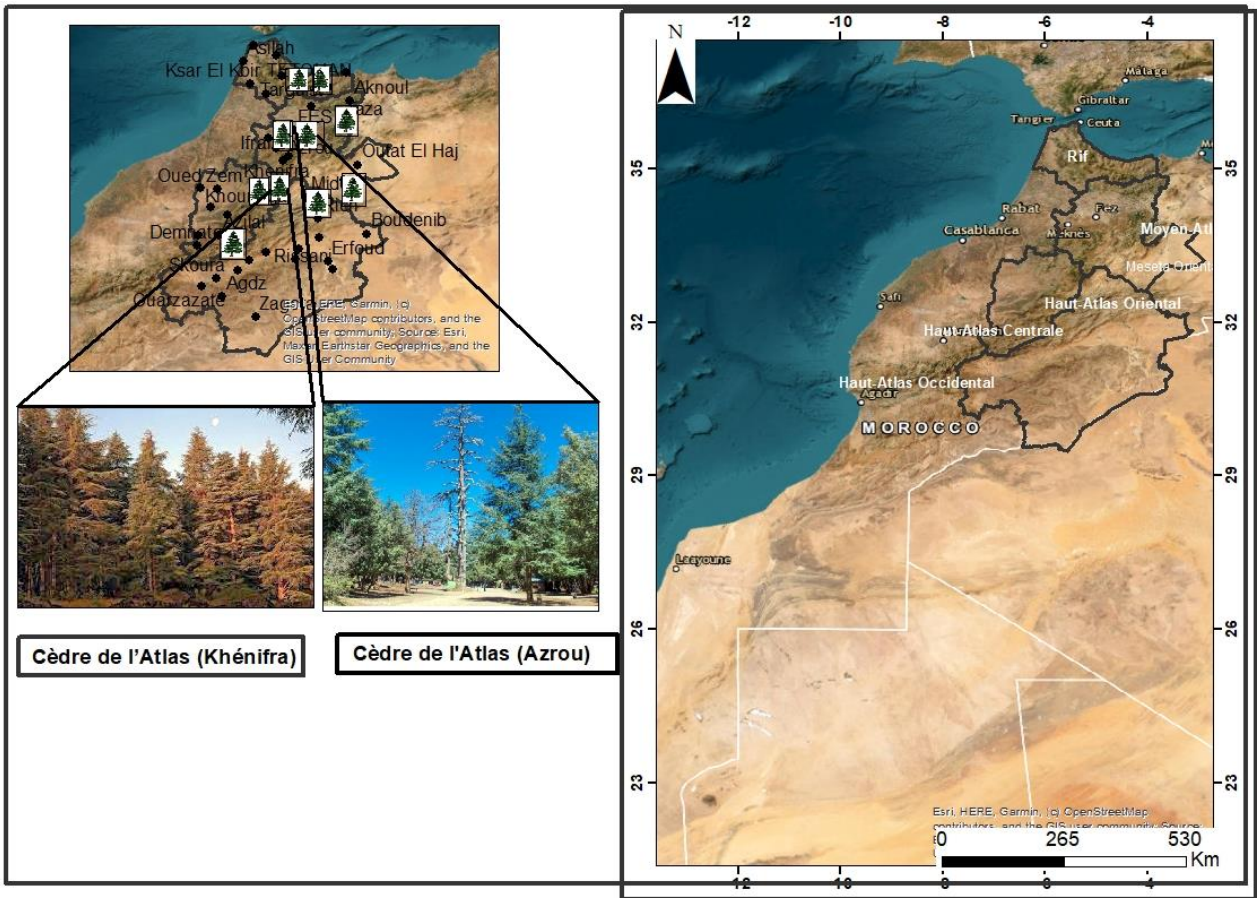


Figure 6 : Aire de répartition géographique du cèdre d'Atlas au Maroc.

1.2.2.3. Profile aromatique des huiles essentielles de cèdre d'Atlas Marocain

Le Maroc est le principal fournisseur du marché international pour l'huile essentielle de cèdre. L'huile essentielle extraite de la sciure de *Cedrus atlantica* du Maroc est riche en himachalène sous forme de trois isomères : α, β, et γ, qui constituent la majorité de l'huile essentielle. Il existe d'autres composés qui sont également présents dans cette essence à savoir, E et Z atlantone, mais avec des quantités variables (Figure 8) [91,92].

Selon une étude effectuée par Bennouna et al, [93], la cedranone (19. 35%), l'isocedranol (13,78 %), l'oxyde de caryophyllène (8,73%), le γ-calamenene (7,77 %), le δ-cadinene (7,34 %), et le β-himachalane (7,23 %) sont les principaux composés du *C. atlantica* situé dans la région du Moyen Atlas marocain et exactement dans la ville d'Azrou.

En revanche, Fidah et al, et Salhi et al, [94,95] ont identifié l'E-γ-Atlantone (19,73%), l'E-α-Atlantone (16,86%), et l'isocedranol (11,68%) comme principaux composants de l'huile du bois du cèdre de la région du Khemisset. Une étude réalisée par Zrira et al, [96] indique que la composition

chimique de l'huile essentielle de sciure de *C. atlantica* est riche en l'α-(E)-atlantone (19,3 %), le β-himachalène (15,1 %), et le 8-Cedren-13-ol, (13,1 %).

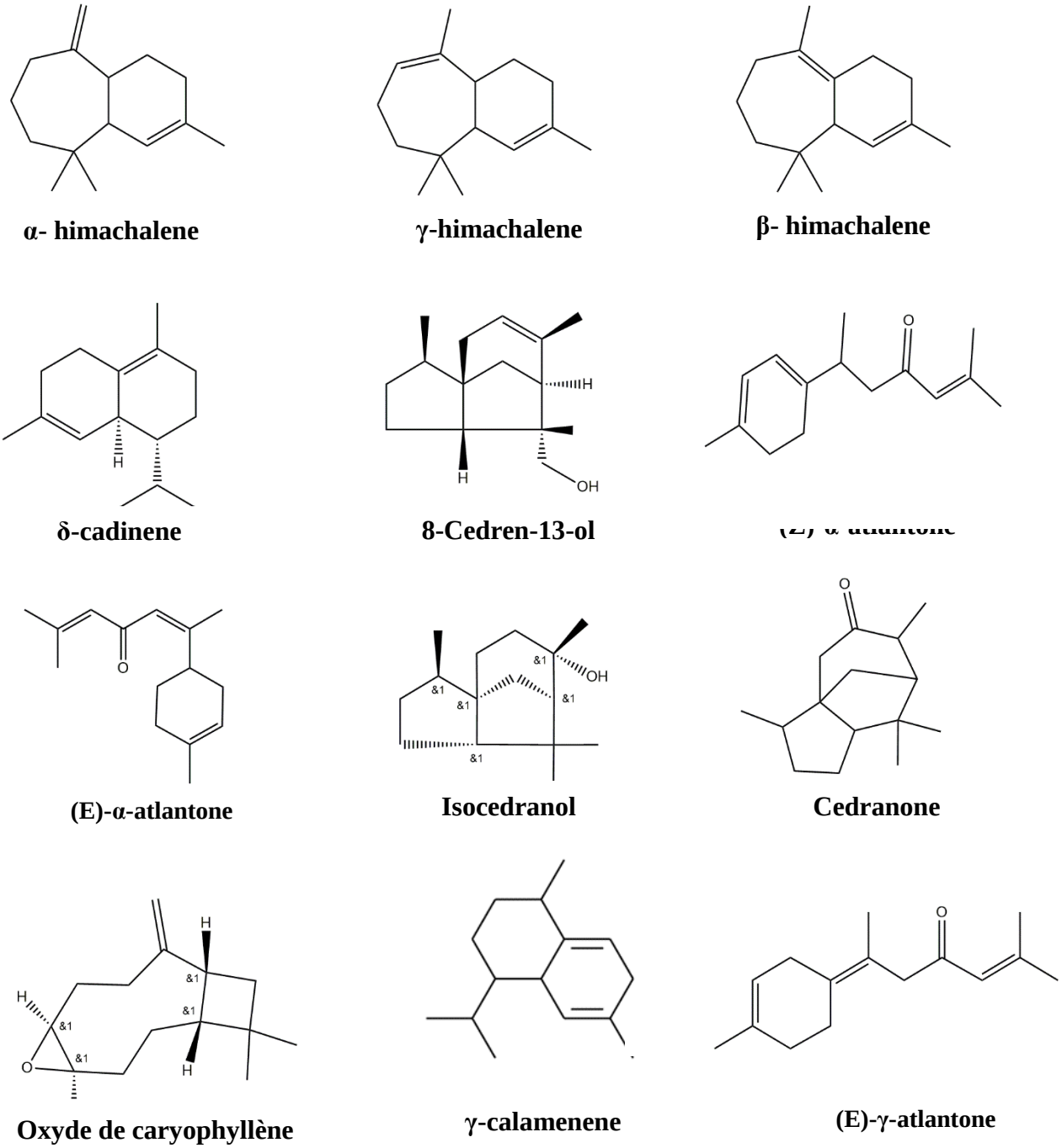


Figure 7 : La structure moléculaire des principaux composés déterminés dans l'HE de *C. atlantica*.

1.2.2.4. Utilisations du cèdre de l'Atlas et de son huile essentielle

Le cèdre rend de multiples services et fournit des produits utiles : bois d'œuvre, bois de chauffage et sciure de bois comme énergie, goudron et huiles essentielles (bois, feuilles et branches). Il fournit

un bois assez cassant, ce qui limite son utilisation pour la charpente. En raison de son imputrescibilité, il est populaire dans la construction navale. Les perches de cèdre ont une bonne élasticité, empêchent et résistent avant de se briser suffisamment pour être utilisées comme bois de mine. Traditionnellement destiné à des utilisations structurelles, le bois de cèdre a été utilisé dans le travail du bois, la menuiserie fine et la course à l'intérieur et à l'extérieur [30].

Les huiles essentielles du cèdre de l'Atlas sont utilisées en parfumerie pour leur rôle de fixateur et leur odeur unique qui se marie bien avec les produits à base de labdanum (ciste) et les matières parfumantes de type boisées-florales. Elles sont utilisées dans la fabrication de savons parfumés, de déodorants et autres arômes [97]. L'huile essentielle du cèdre de l'Atlas a des propriétés antifongiques, antiseptiques, cicatrisantes, astringentes et décongestionnantes pour le système respiratoire. On lui attribue également des effets relaxants, drainants, lymphotoniques, diurétiques et lipolytiques (combustion des graisses). Elle améliore la qualité du réseau artériel et du cuir chevelu (pellicules comme l'huile de cade). Elle repousse les moustiques et les mites. Chez les anciens Égyptiens, l'huile et la résine de cèdre étaient ajoutées aux préparations utilisées pour embaumer les momies. Aujourd'hui encore, cet attribut naturel est exploité dans les cintres et les boules de cèdre suspendus dans les armoires. Les substances aromatiques libérées par l'huile ont d'excellentes propriétés répulsives contre les acariens [30].

1.2.3. *Salvia rosmarinus* Spenn

1.2.3.1. Présentation de *Salvia rosmarinus* Spenn

Rosmarinus officinalis L. est populairement connu sous le nom de romarin et, récemment connu par *Salvia rosmarinus* Spenn [98]. Le romarin est un arbuste très aromatique, de 0,50 à plus de 1 m, à feuillage persistant, très ramifié, très feuillu. Les fleurs sont bleu pâle ou blanchâtres, à pédoncule très petit, visibles de janvier à mai. Elles sont groupées à l'extrémité des rameaux, à la base des feuilles. Ces feuilles opposées décussées insérées sur une tige à section carrée, coriaces, sessiles, linéaires, enroulées par les bords, vertes et agrestes au-dessus, blanches-tomentose en dessous (Figure 9). Le fruit, ovide, est entouré par un calice persistant, sec est constitué de quatre akénes (tetrakéne) [98].



Figure 8 : l'espèce *Salvia rosmarinus* Spenn. Plante du romarin (a), feuille avec fleur du romain(b), récolte du romarin (c), romarin fraîchement récolté (d), romarin séché (e).

La classification *Rosmarinus officinalis* L. est illustrée dans le tableau 5.

Tableau 5: Classification botanique de *Salvia rosmarinus* Spenn.

Règne	*Plantae*
Sous règne	*Tracheobionta*
Embranchement	*Spermaphytes*
Sous embranchement	*Angiospermes*
Classe	*Magnoliopsida*
Sous classe	*Astéridés*
Ordre	*Lamiales*
Famille	*Lamiacées*
Genre	*Rosmarinus*
Espèce	*Rosmarinus officinalis*

1.2.3.2. Aire de répartition géographique au Maroc

Le romarin (*Salvia rosmarinus* Spenn) est très répandu dans toute la Méditerranée, de l'Espagne aux Balkans et à l'Afrique du Nord [99]. Au Maroc, il est répandu dans la partie méditerranéenne et surtout dans l'Est : l'Oriental, le Haut Atlas Oriental, le Moyen Atlas oriental, et le Rif central et centro-occidental (Figure 10). Il se situe au niveau des forêts, des broussailles et des matorrals, sur des substrats calcaires bien drainés. Dans l'Oriental, il est répandu dans la partie de la crête calcaire, et dans les steppes boisées de Figuig, Debdou, El Atef Gurcif, Jerada, Bouarfa et Tafoughalt [100]. Dans le Haut Atlas, il est particulièrement abondant à Jebl Ayachi, Titahouna, Tizi n'teleghmet et Ait Ben Akki [101]. Dans le Moyen Atlas, il est très abondant à Jbel Lahmer, au col de Fegouss et dans le massif de Bou Iblane, Midelt, Taferdouste, Talzemt [102,103]. Dans le Rif, il se localise dans Talassemtane, alors qu'il est rarement observé dans la partie occidentale [104,105].

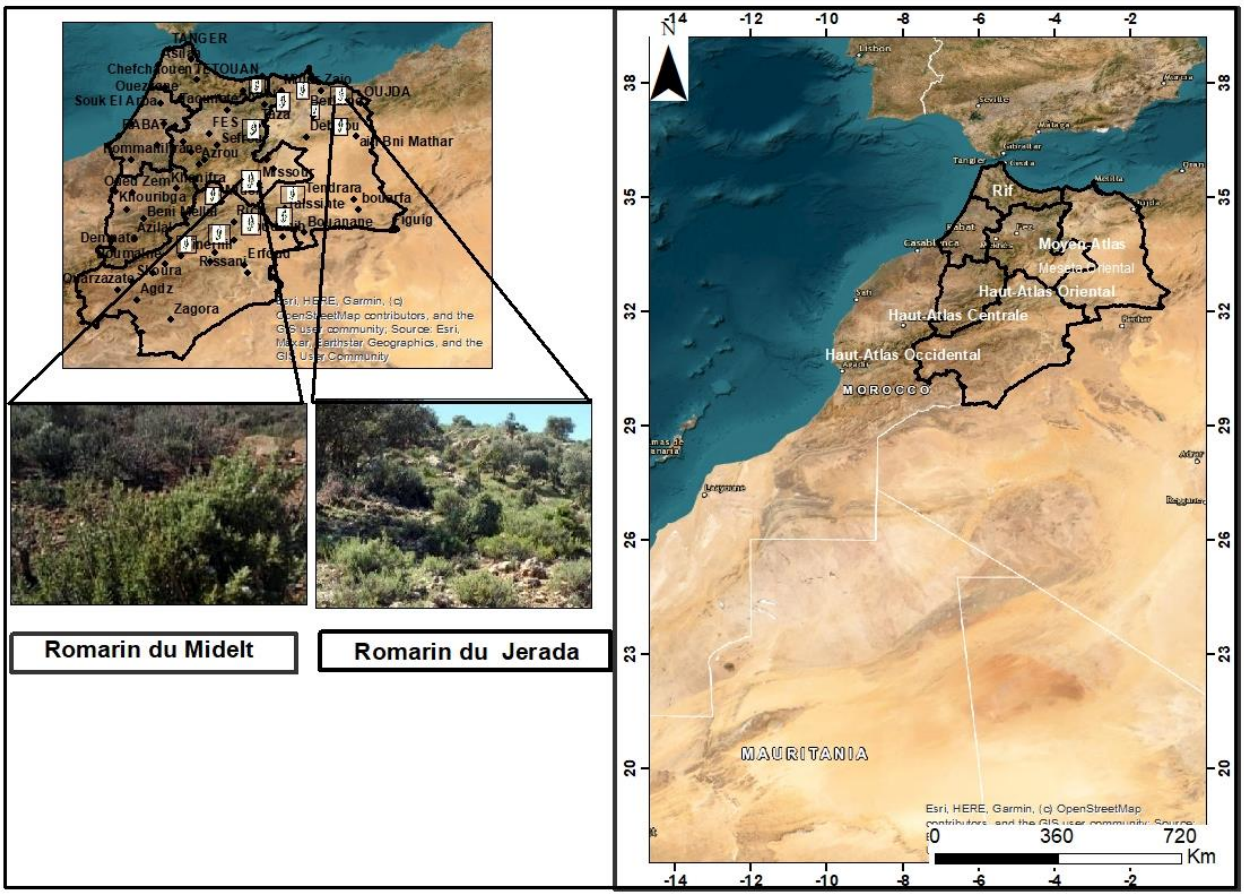


Figure 9 : Aire de répartition géographique du romarin au Maroc.

1.2.3.3. Variation des chémotypes de *Salvia rosmarinus* Spenn

La composition chimique des HEs du romarin est relativement constante. Par contre, les proportions des constituants peuvent varier selon l'origine géographique, les conditions environnementales [106], l'espèce [107], l'âge des feuilles, le mode de distillation [108], le cycle végétatif [109] et la période de récolte [110]. Par ailleurs, les variétés chimiques (ou chémotypes) différenciées produisent des huiles essentielles de compositions chimiques différentes [111].

Au Maroc, trois chémotypes de romarin ont été identifiés (Figure 11) :

- Chémotype 1,8 cinéole ;
- Chémotype camphre ;
- chémotype α-pinène [112].

Les huiles essentielles du romarin de l'oriental, de Moyen Atlas et du nord du Maroc sont caractérisées par le chémotype 1,8-cinéole. Alors que l'HE du romarin de Loukkos est caractérisée par le chémotype camphre [113,114].

Une étude réalisée en Algérie a permis d'identifier le camphre (35,3-37,6 %) comme le composé majoritaire de l'huile essentielle de romarin [33]. Une étude effectuée en Tunisie sur huit échantillons des huiles essentielles du romarin prélevés dans des régions différentes a montré que la teneur en 1,8 cinéole varie de 47,6 à 55,1% [115]. L'huile essentielle de *S. rosmarinus* d'Espagne a été caractérisée par la présence de chemotype camphre (17.2-34.7 %) [48]. De plus, le chemotype 1,8-cinéole (21,89-16,98 %) a été identifié comme le composé majoritaire de l'huile essentielle de romarin en Italie. L'huile essentielle de *S. rosmarinus* de Grèce a été caractérisée par le chemotype 1,8-cinéole qui varie de 48,3 à 58,7 % [50]. Tandis que, le ρ-cymène (44,02 %) était le composé le plus courant dans l'huile essentielle de romarin de Turquie [51]. Ceci indique que l'origine géographique est un facteur de variation de la composition chimique. Une autre étude sur le suivi mensuel de la composition chimique des huiles essentielles du romarin a révélé que les composés majoritaires varient selon la période de récolte [116].

Plusieurs études scientifiques ont rapporté la variation de la composition chimique des huiles essentielles de *S. rosmarinus*. Le tableau 6 fournit plus d'informations sur la variabilité chimiques des huiles essentielle de *S. rosmarinus*.

Tableau 6: La variation de la composition chimique et les activités biologiques des huiles essentielles de *S. rosmarinus* selon leur origine géographique. (---) : non trouvé.

Origine	Région	Partie extraite	Composés majoritaires	Activité biologique étudiée	Référence
Morocco	Nord-Est	Partie aérienne	1,8- cinéole, camphre, α-pinène, β-pinène, camphène, et β-caryophyllène	Antioxydant	[117]
Morocco	Nord-Ouest	Partie aérienne	1,8-cinéole, camphre, bornéol et α-pinène	Antioxydant, antibactérienne, antiseptique	[114]
Morocco	---	Feuilles et fleurs	camphre, β-caryophyllène, 2,4-hexadiène, 3,4-diméthyl-, (Z, Z), α-fenchène, cis-verbénone, et acétate de bornyle	Insecticide	[91]
Morocco	Orientale	Feuille	1,8-cinéole, camphre, α-pinène et bornéol	Antioxydant	[44]

Morocco	---	Feuille	α- pinène, myrcène, 1,8-cinéole, camphre, camphène, α-terpinéol, bornéol et bcaryophyllène	Antibactérienne, antioxydant, antifongique, insecticide, antidiabétique, antivieillissement, anti-inflammatoire et anticancéreuse	[118]
Algérie	---	Partie aérienne	α-pinène, camphène, limonène, camphre, 1,8-cinéole et bornéol	Antimicrobienne et antioxydant	[119]
Tunisia	---	Partie aérienne	1,8- cinéole, camphre et α-pinène	Antioxydant, antidépressive, antiallergique, antifongique, antibactérienne et anti-inflammatoire ; activité antimutagène et antiallergique	[120]
Tunisia	Nord	Fleur	1,8- cinéole, α- pinène β-pinène, camphre et camphène	Antioxydant, antibactérienne, antifongique, et contrôle du brunissement enzymatique.	[121]
Tunisia	Nord-Est	Feuille	1,8- cinéole, *cis*-verbénol, camphre α- pinène, et tepinen-4-ol	Antibactérienne, efficacité de l'enzyme, et prétraitement enzymatique	[122]
Espagne	Sud-Est	Partie aérienne	1,8- cinéole, camphor, α-pinene	Antibactérienne	[123]
Espagne	---	---	camphre, α-pinène, 1,8-cinéole, β-pinène myrcène et camphène	---	[124]

Italie	---	---	oxyde de pipérénone et γ-terpinène	Antifongiques, antioxydant, cytotoxicité, et anticancéreuse (cancer du poumon (A549))	[125]
Italie	Orientale	---	1,8-cinéole, α-pinène, camphre et camphène	Antiparasitaire, antioxydant, antimicrobienne	[126]
Italie	Nord	Partie aérienne	1,8-cinéole, α-pinène, camphre, et trans-caryophyllène	Antioxydant, les effets neuroprotecteurs	[127]
Grèce	Nord	Feuille	1,8-cinéole, camphre et α-pinène	Génotoxicité, antimicrobiennes, antivirales et antioxydantes	[128]
Turquie	---	Feuilles et fleurs	1,8 cinéole, isobornéol, α-pinène, α-terpinéol Camphène, limonène, p-cymène et bornyl acétate	---	[129]

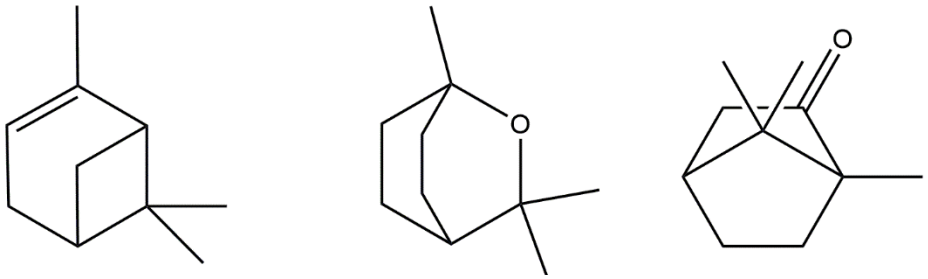


Figure 10 : La structure moléculaire des principaux composés dans l'HE de *S. rosmarinus*.

1.2.3.4. Utilisations du romarin et de son huile essentielle

Le romarin possède une aptitude à conserver les produits alimentaires contre la dégradation par les micro-organismes et surtout contre l'oxydation des matières grasses animales et végétales. Ses propriétés antiseptiques sont largement utilisées dans certaines techniques traditionnelles de conservation des produits alimentaires. Un exemple typique : la conservation du beurre sous forme

de "smen". Par ailleurs, le romarin présente un pouvoir antioxydant très marqué dû aux substances flavonoïdes, aux polyphénols et aux acides phénoliques qu'il contient en quantités importantes [130].

Le romarin est reconnu par ses propriétés pharmacologiques en raison de ses effets antioxydants [131], antimicrobiens [132,133] et chimiopréventifs [134]. Il est utilisé contre Alzheimer en raison de son potentiel hépato-protecteur et de son effet antiangiogénique [130]. Il est utilisé pour soigner les maladies liées à l'inflammation pour ses propriétés anti-inflammatoires [120].

Les huiles essentielles du romarin sont actuellement utilisées dans l'industrie alimentaire, de parfumerie, de cosmétique, de savonnerie ainsi que dans l'industrie pharmaceutique.

- En agroalimentaire, elles sont appliquées comme aromatisants alimentaires et comme un agent de conservation des aliments et des huiles lipidiques [135].
- En parfumerie, elles entrent dans la composition de la plupart des eaux de Cologne ; Combinées à d'autres huiles essentielles surtout du basilic et de patchouli ;
- En savonnerie, grâce à son odeur fraîche et agréable, cette huile essentielle est employée à l'état déterpéné dans la préparation des savons, des shampooings et des déodorants ;
- En industrie pharmaceutique et thérapeutique, les huiles essentielles de romarin à cinéole sont utilisées comme matière première de préparations des médicaments [136]. Les huiles essentielles de romarin à cinéole et à pinène sont exploitées à des fins médicinales. En effet, grâce à ses propriétés anesthésiques, antiseptiques et stimulantes de l'expectoration, le cinéole pur est couramment utilisé dans les traitements des inflammations du nez et de la gorge ainsi que dans les bronchites chroniques. Elles sont utilisées comme stimulant du cuir chevelu et comme antiparasitaires [137].

Les propriétés bénéfiques et les utilisations du romarin en médecine, dans les parfums et les cosmétiques ainsi que dans les industries alimentaires ont été rapportées par plusieurs auteurs (Tableau 7).

Tableau 7: Utilisation des huiles essentielles du romarin dans les domaines de la médecine, de la parfumerie et des cosmétiques, de l'alimentation et de l'agriculture. (---): non-trouvé.

Origine	Molécules téstées	Partie utilisée	Type d'utilisation	Type d'administration	Dose	Effet	Référence
Mexique	---	partie aériennes	Médecine	administration par voie orale	10–300 mg/kg	Anti nociceptive	[138]
Mexique	---	partie aériennes	Médecine	administration par voie orale	10 mg/kg, i.p.	Anti nociceptive	[139]
Iran	α-pinène	Feuille	Médecine	administration par voie orale	---	Antispasmodique	[140]
Turquie	---	---	Médecine	administration par voie cutanée (massage)	---	Maux de tête	[141]
Taiwan	---	Feuille	Médecine	administration par voie orale	3,13- 25µg/ml	Anti-inflammation et anti-tumorale	[142]
Algérie	camphre, 1,8-cinéole et bornéol	partie aériennes	Agroalimentaire	---	120.4-326.1 µL/mL	Antioxydant et antibactérienne (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*)	[143]

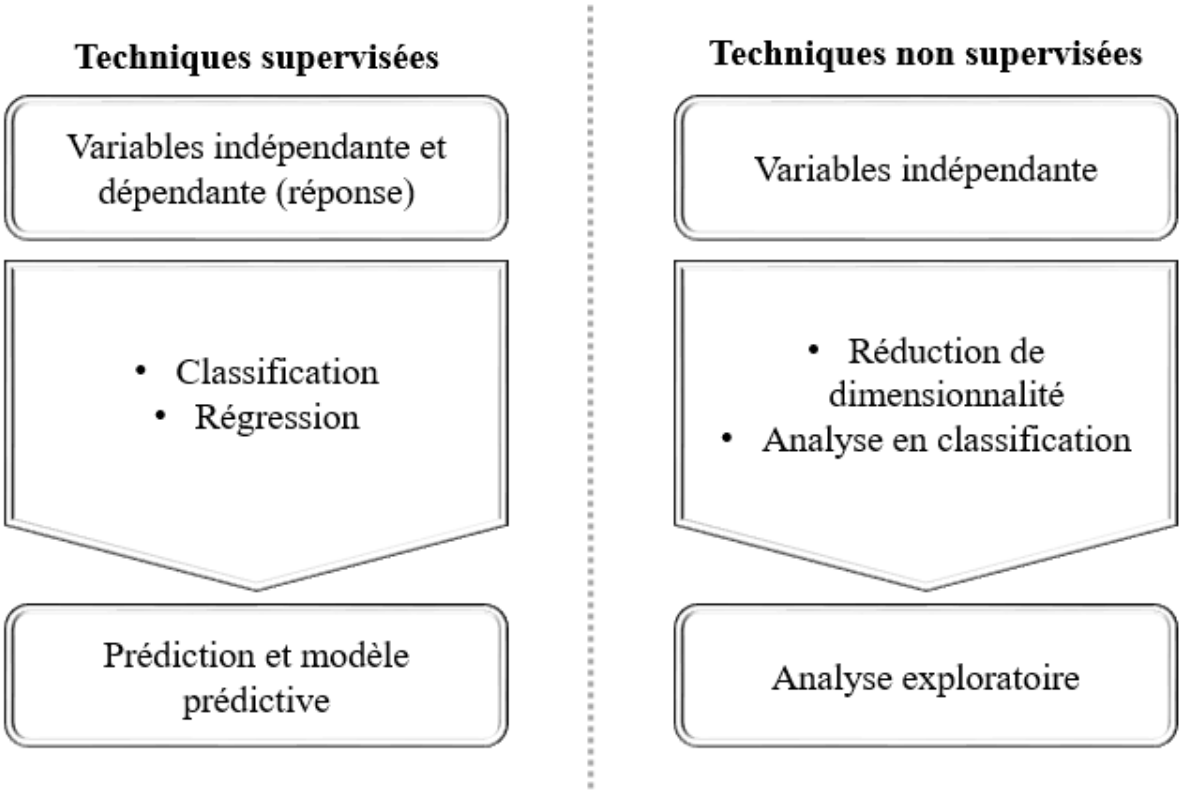
Turque	1,8-cinéole, α-pinène, camphre	Feuille	Agroalimentaire	---	Concentration de 2% (w/v) la viande/l'huile essentielle de romarin	Antibactérienne (*Salmonella Typhimurium* et *Listeria monocytogenes*)	[144]
Argentine	α-terpinéol et cis-sabinène	---	Agroalimentaire	---	0.1 g/100 g l'huile essentielle de romarin /L'huile de tournesol	Antioxydant (la stabilité oxydative de l'huile de tournesol)	[145]
Portugal	1,8-cinéole, camphre, α-pinène et bornéol.	Feuille	cosmétique	administration par voie cutanée	Lotion de 0,5- 3%	Ingrédients parfumés et agents de conditionnement de la peau	[146]
---	carvacrol	---	cosmétique	administration par voie cutanée	Lotion de 3% w/w	la nutrition des cheveux, renforce les cheveux, et aide à l'élimination des molécules indésirables qui bloquent les pores	[147]

2. Techniques chimiométriques et leurs applications

2.1. Aperçue sur les techniques chimiométriques

Selon Chemometrics and intelligent laboratory systems journal, [148] la chimiométrie est la discipline chimique qui utilise des méthodes mathématiques et statistiques pour concevoir ou sélectionner des procédures et des expériences optimales, et pour fournir un maximum d'informations chimiques en analysant les données chimiques. À partir de cette définition o nous pouvons dire que la chimiométrie est l'application mathématique et statistique dans le domaine de l'analyse chimique.

Les techniques chimiométriques peuvent être classées en deux catégories :



2.2. Méthodes non supervisées

Les techniques non supervisées sont des techniques qui ne nécessitent pas de superviseur (réponse). Bien que ces méthodes ne puissent pas être appliquées directement aux problèmes de classification ou de régression, elles sont idéales pour explorer la structure sous-jacente des données. En outre, certaines méthodes non supervisées permettent de projeter de nouveaux échantillons sur un ensemble de données préexistant. Cette méthode est utile pour découvrir les informations et les relations entre les variables indépendantes. Elle traite principalement des données qui ne sont pas

étiquetées « la valeur cible n'est pas requise ». L'approche chimiométrique non supervisée la plus utilisée dans chimie analytique est l'Analyse en Composantes Principales (ACP) et l'Analyse en Classification Hiérarchique (ACH).

2.2.1. L'Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une méthode d'analyse multivariée exploratoire des données, basée sur la décomposition mathématique et constitue l'un des principaux outils chimiométriques. Elle permet une meilleure visualisation de la variation présente dans un énorme ensemble de données comportant de nombreuses variables [149].

L'ACP est une technique permet d'étudier les relations existant entre des variables quantitatives, sans tenir compte a priori d'une quelconque structure. Elle consiste à résumer, synthétiser l'information contenue dans une matrice en remplaçant les variables initiales par un nombre plus petit de variables (les composantes), non corrélées entre elles [150].

L'ACP décompose une matrice de données originale X en vecteurs de scores T (n,p), vecteurs de loading P(m.p) et une matrice de résidus E(n,m) où p est le variables latentes sélectionnées en utilisant l'équation :

$$X=TP^{t}+E$$

Les vecteurs associés à l'espace des lignes X sont connus sous le nom de "Coordonnées Factorielles" (Scores), tandis que ceux associés à l'espace des colonnes X sont désignés sous le nom de "Contributions Factorielles" (Loadings). Chaque composante principale se distingue par trois ensembles de caractéristiques supplémentaires : la variance à laquelle elle est associée, les contributions factorielles (ou "loadings") désignant les contributions des variables initiales à cette composante, et les coordonnées factorielles (ou "scores") désignant la position ou les coordonnées des échantillons sur cette composante principale [151,152].

L'analyse en composantes principales a plusieurs usages, notamment :

L'analyse et la visualisation des corrélations entre les variables afin de réduire le nombre de variables à mesurer ultérieurement.

Détermination des facteurs non corrélés qui sont des combinaisons linéaires des variables de départ pour pouvoir employer ces facteurs dans des méthodes de modélisation.

représentation des observations dans un espace a-dimensionnel pour déterminer des groupes d'observations homogènes ou, au contraire, des observations atypiques [153].

2.2.2. Analyse en classification hiérarchique

L'Analyse en Clusters Hiérarchique (ACH) est une approche courante dans laquelle les objets sont connectés pour former des clusters basés sur la distance de séparation. Ce processus est le plus souvent agglomératif ; il commence par des objets simples et les regroupe progressivement en clusters plus grands [154].

L'approche hiérarchique en classification consiste à procéder de manière séquentielle à un regroupement des objets étudiés en classes emboîtées. Les techniques hiérarchiques produisent une séquence complète de partitions : au premier pas, on a N clusters (un pour chaque objet) et au dernier pas, un cluster unique regroupe tous les objets à classer [155].
Cette hiérarchie de partitions est le plus souvent représentée sous la forme d'un arbre, appelé aussi dendrogramme [156]. La classification ascendante hiérarchique (ou ACH), comme son nom l'indique, est une méthode ascendante : à chaque pas de l'algorithme de classification regroupe les individus appartenant à deux classes sur la base de leurs similarités [150]. Parmi les applications essentielles de l'ACH :

- une mesure de similarité (ou de dissimilaire) entre les individus.
- construire des partitions emboîtées, à l'image des classifications biologiques ou taxonomiques[154].

2.3. Méthodes supervisées

Les techniques supervisées, contrairement aux techniques non supervisées, nécessitent une "réponse". Les techniques supervisées permettent de prédire une variable dépendante quantitative ou qualitative à partir des variables indépendantes à travers un modèle mathématique ; les propriétés prédictives de ce modèle sont préalablement validées et testées en utilisant un ensemble d'échantillons indépendants (données de test) avant d'être exploité.

2.3.1. Méthodes de régression multivariée

Les méthodes de régression multi-variée sont utilisées pour établir des relations quantitatives entre plusieurs variables indépendantes et une réponse dépendante. Le modèle résultant peut alors prédire la réponse d'un échantillon inconnu sur la base des données prédictives mesurées.

2.3.1.1. Régression en moindre carré partielle

La régression en moindre carré partielle (Partial Least Squares regression) PLSR est une technique de calibration la plus utilisée pour l'analyse chimique en raison de ses avantages [157,158] . Elle

permet de relier un ensemble de variables dépendantes Y, à un ensemble de variables indépendantes X. De plus, cette méthode permet de calculer le coefficient de régression même si le nombre de variables est supérieur au nombre d'échantillons.

La PLSR est donc basée sur la modélisation simultanée de la variabilité dans les matrices prédictive, X, et dépendante, Y, en calculant des Variables Latentes (LVs) qui maximisent la variance extraite des 2 matrices en même temps que leur corrélation. PLSR est une méthode de régression linéaire puissante, capable de traiter des variables colinéaires, et d'accepter un grand nombre de variables [159].

Plusieurs applications de La régression PLSR existent, notamment :

- Examiner des problèmes plus complexes en traitant des variables X et des variables de réponse Y nombreuses et colinéaires et d'analyser les données de manière plus rationnelle.
- Permettre de prédire une propriété de l'échantillon à partir des variables indépendantes originales [160].

2.3.2. Plan d'expérience

La méthodologie du plan d'expérience est une collection d'outils statistiques et mathématiques qui peuvent être utilisés pour développer, améliorer et optimiser les processus. Elle a aussi des utilisations importantes dans la conception, le développement et la formulation de nouveaux produits, et dans l'amélioration des produits déjà existants.

Les applications les plus étendues de plan d'expérience se trouvent dans le monde industriel, en particulier dans les situations où plusieurs variables d'entrée influencent potentiellement les mesures de performance ou les caractéristiques de qualité du produit ou du processus. Ces mesures de performance ou caractéristiques de qualité sont appelées la réponse. Elles sont généralement mesurées sur une échelle continue, mais les réponses d'attributs, des classements et des réponses sensorielles ne sont pas inhabituelles. Les variables d'entrée sont les variables indépendantes et sont soumises au contrôle de l'ingénieur ou du scientifique, du moins dans le cadre d'un test ou d'une expérience. La démarche méthodologique d'un plan d'expérience (PE) comprend cinq étapes principales [161]:

- ✓ Détermination statistique des expériences ;
- ✓ Estimation des coefficients d'un modèle mathématique ;
- ✓ Validation du modèle ;

- ✓ Optimisation de la réponse ;
- ✓ Vérification de l'adéquation du modèle.

L'analyse de variance (ANOVA) de chaque terme de cette équation permettra de déterminer si les interactions entre les facteurs peuvent être négligées.

La représentation graphique du modèle est un moyen approprié pour trouver le réglage optimal. Deux types de graphiques peuvent être utiles :

- ✓ la surface de réponse dans l'espace tridimensionnel ;
- ✓ le graphique des contours, qui est la projection de la surface sur un plan, représentée par des lignes de réponse constante.

Dans ces graphiques, la réponse est représentée comme une fonction de deux facteurs. Selon le critère d'optimisation établi, la valeur optimale recherchée peut correspondre à un maximum, un minimum ou une valeur spécifique. Les tracés de la surface de réponse et de contours construits permettent d'identifier la zone de compromis à rechercher visuellement la réponse désirée.

La fonction de désirabilité est très utile quand il faut trouver le meilleur compromis entre plusieurs réponses. Elle est très facile à utiliser et rend de grands services, notamment quand on a besoin d'optimiser des conditions opératoires d'une méthode ou d'un procédé. La fonction de désirabilité varie de 0 à 1. La grande valeur (1) correspond à une satisfaction maximale, la valeur (0), à un refus complet [162]. En effet, cette fonction reste à la valeur (0) tant que la valeur de la réponse ne convient pas et passe à (1) dès que la valeur de la réponse est satisfaisante. Cette combinaison de PE avec la fonction de désirabilité est appelée optimisation méthodologie de désirabilité [162].

2.3.2.1. Plan de surface de réponse

La Méthodologie de Surface de Réponse (MSR) est une technique statistique qui permet d'optimiser efficacement des processus complexes en utilisant une approche de nombreux facteurs et réponses [163]. La première étape de la MSR consiste à déterminer les facteurs qui seront employés dans l'étude. Cette étape peut être réalisée par le biais d'un plan fractionné ou le plan de Plackett-Burman ou à partir d'une recherche bibliographique, ce qui permet d'évaluer les facteurs qui sont statistiquement significatifs pour les réponses en utilisant un plus petit nombre d'essais.

2.3.2.1.1. Plan composite centré

Le plan composite central (CCD) est le plus souvent utilisé pour obtenir la surface de réponse. Le plan est constitué de points factoriels (-1, +1) et axiaux (-α, + α) et de répétitions au point central,

ce qui confère des propriétés telles que l'orthogonalité et la rotativité à l'ajustement des polynômes quadratique [164]s. Les points axiaux (2k) permettent d'évaluer la courbure et d'estimer de nouveaux extrêmes pour tous les facteurs d'étude dans des configurations hautes et basses. Ce plan est utile car il permet une connaissance complète des réponses avec le plus petit nombre d'expériences [165]. Le nombre d'expériences pour ce plan peut être obtenu à partir de l'équation (2).

$$N = K^2 + 2K + C_p$$

où k représente le nombre de facteurs, et Cp représente le nombre de répliques du point central [166].

2.3.2.2. Plan de mélange

La conception des plans de mélange est une catégorie des expériences de la surface de réponse, dans laquelle les variables indépendantes sont les proportions des composants à étudier et la variable dépendante (réponse) dépend uniquement des proportions des composants du mélange [167]. La somme des proportions de tous les composants d'un mélange doit toujours être égale à 100%. Ainsi, pour tout mélange de q composants, il peut avoir l'équation suivante :

$$\sum_{i=1}^{q} x_i = 100\% = 1$$

Avec xi représentant la proportion du ième composant. Notons que les niveaux des variables qui composent ce type de plan sont dépendants et que pour déterminer la composition des mélanges de q composants, il suffit de préciser la composition de q - 1 composant [168-170].

La proportion du dernier composant correspond à ce qui manque pour compléter les 100%. Cette équation enlève un degré de liberté aux proportions, ce qui se traduit par la perte d'une dimension par rapport aux espaces expérimentaux utilisés dans le traitement des variables de procédé puisque plusieurs compositions sont impossibles à obtenir (à titre d'exemples, 0%, et 300%) [168].

2.3.2.2.1. Plan à deux constituants

Les domaines expérimentaux pour les plans de mélange à deux composants sont présentés dans la Figure 12. Pour deux composants, les points expérimentaux qui peuvent être adoptés dans ce type de plan sont représentés par une ligne droite [168]. Le plan à deux constituants est rarement utilisé à cause de sa difficulté de valider son modèle, donc le plan à trois constituants est le plus utilisée.

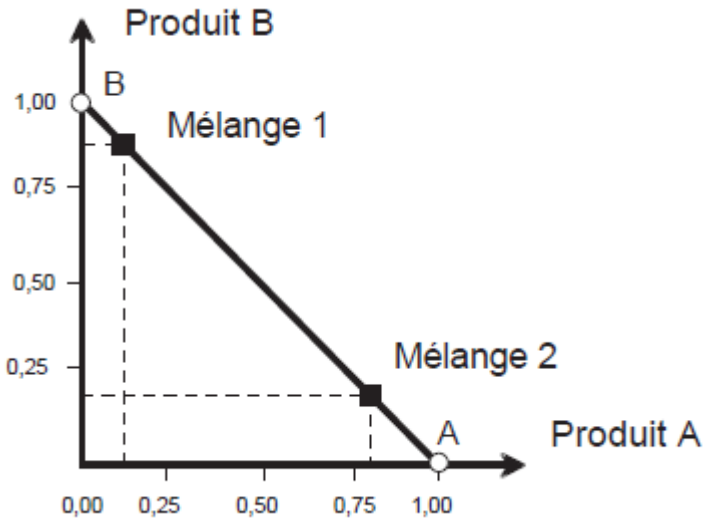


Figure 11 : représentation des mélanges à deux constituants.

Le choix du plan de mélange approprié doit tenir compte de certaines questions, telles que le nombre de variables et d'interactions à étudier, l'efficacité de la modélisation des données, la faisabilité et les coûts liés à son exécution. Les deux types de plans de mélange les plus couramment utilisés sont les plans en réseaux (Simplex lattice design) et les plans centrés augmentés (Augmented Simplex-centroid design) [167].

Le plan en réseaux peut être considéré comme l'équivalent d'un plan factoriel pour les variables de processus dans le sens où les points expérimentaux sont pris aux extrémités du domaine expérimental, ils sont espacés de manière égale avec les coordonnées représentant les variables. Ce plan de mélange consiste en un réseau de type (q, m) pour q composantes pour l'ajustement d'un polynôme de degré m, où m-1 points expérimentaux peuvent être pris à intervalles réguliers entre les niveaux 0 et 1 selon l'équation (2) [171]:

$$x_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \frac{m-1}{m}, 1 \; for \; i = 1, 2, \dots, q$$

Donc, pour l'ajustement d'une fonction du premier degré, seuls les niveaux 0 et 1 sont nécessaires. Pour un modèle du second degré (m = 2), les niveaux 0, 1/2, et 1 sont utilisés, et pour un modèle cubique (m = 3), les niveaux 0, 1/3, 2/3, et 1 sont adoptés [161].

3. Application des techniques chimiométriques pour amélioration qualitative et quantitative des biomolécules et leurs applications dans des modèles biologiques

Les techniques chimiométriques sont l'un des principaux outils utilisés pour résoudre les problèmes analytiques, car elle permet d'éviter les erreurs d'interprétation des données complexes et volumineuses [172]. Les techniques chimiométriques font appel à une grande variété de méthodes supervisées et non supervisées. La tendance croissante à l'application de la chimiométrie dans les études des plantes aromatiques et médicinales au cours des deux dernières décennies, s'explique par la recherche intensive qui vise à valider et à tester la puissance des techniques de traitement des données dans les domaines des plantes aromatiques et médicinales et par la disponibilité de logiciels applicables [156]. Les études actuelles montrent que la technique chimiométrique devient une approche importante dans les domaines des plantes aromatiques et médicinales pour révéler et justifier la corrélation de diverses variables, explorer les données, sélectionner la variable pertinente, développer un modèle prédictif et optimiser un processus [173,174].

3.1. Utilisation de l'approche chimiométrique dans la détermination quantitative et qualitative des huiles essentielles

Plusieurs constituants déterminent l'efficacité des plantes aromatiques et médicinales, parmi lesquelles les huiles essentielles. Il est important de construire divers systèmes d'évaluation puissants pour le contrôle de la qualité de ces huiles essentielles. Pour ce faire, l'ACP et l'ACH ont été utilisés pour le contrôle de la qualité de ce type de produits à base de plantes. Ces deux méthodes ont joué un rôle important et ont montré leur grand potentiel en combinaison avec de multiples approches analytiques pour discriminer les herbes de différentes origines géographiques, les processus de production, et d'autres facteurs qui peuvent affecter la quantité ou la qualité de l'huile essentielle. De plus, la HCA et la ACP pourraient être utilisés pour s'approuver mutuellement afin de garantir l'évaluation de la qualité des plantes aromatiques et médicinales. Cependant, les hypothèses formulées par ces deux techniques chimiométriques ne sont pas toujours suffisantes. Dans ce cas, le recours à d'autres techniques s'avère necéssaire, telles que les méthodes de reconnaissance de formes supervisées [175,176], qui peuvent être introduites pour mettre en œuvre l'établissement complet des données chimiques des PAM pour l'évaluation de la qualité.

Une étude a été menée au Maroc, qui s'est concentrée sur la prédiction des rendements en huiles essentielles de *Myrtus communis* L. en utilisant les techniques ACP, ACH et RLM [177]. L'ACP a été utilisé pour montrer les corrélations entre les variables morphologiques et le rendement en huile

essentielle et aussi identifier la similarité entre les échantillons. L'ACH a été utilisé pour confirmer la similarité trouvée par l'ACP. La RLM a été utilisée pour mettre en œuvre l'intégration de la modélisation axée sur les données dans la prédiction de rendements en huile essentielle à partir des données morphologiques de la plante. Le modèle s'est avéré être un outil utile dans la modélisation de rendement de *Myrtus communis* L. car il a montré une meilleure capacité de prédiction.

Une autre étude menée au Maroc portait sur la modélisation spatiale de rendements en huile essentielle à l'aide de techniques chimiométriques, notamment les plans d'expériences [178]. Les principaux objectifs de l'étude étaient d'identifier les facteurs les plus importants qui ont influencé le rendement en huile essentielle au cours de processus d'extraction. Les résultats des plans d'expérience ont indiqué qu'une meilleure approche pourrait être proposée pour optimiser les facteurs d'extraction afin d'obtenir un rendement maximal.

Une étude récente montre que l'application de la technique chimiométrique, en particulier l'ACH et PLSR, a été significative pour déterminer les similitudes entre les différents échantillons, et le modèle de PLSR a été appliqué pour déterminer la relation entre les attributs sensoriels et ces composés odorants [179].

Donc à partir de ces études, l'application de la chimiométrie a offert de nombreux grands impacts, elle permet une estimation fiable non seulement avec des informations limitées, mais aussi avec une base de données vaste et complexe, avec une gestion de qualité des plantes aromatiques et médicinales meilleure et efficace.

3.2. Application des plans de mélange sur des modèles biologiques

La combinaison des huiles essentielles peut aboutir à des résultats différents, synergiques, additifs ou antagonistes. La synergie se produit lorsque deux composés ont une activité biologique plus grande que les composants individuels. Un effet additif est obtenu lorsque l'effet antifongique total de la combinaison de deux huiles essentielles combinée égal la somme des huiles essentielles individuelles [180].

L'intérêt de ces combinaisons est de réduire la quantité totale d'additifs synthétiques, dans les produits transformés, améliorant ainsi leur qualité et leur sécurité et leur acceptation par les consommateurs, devenus de plus en plus critiques à l'égard de l'utilisation de conservateurs chimiques dans les produits [181].

En plus, la conception des plans de mélange permet de développer des formulations innovantes qui apportent des réponses optimales [182]. Cette méthode de conception de mélanges a été appliquée récemment par de nombreux chercheurs pour obtenir le mélange actif optimal de divers composés. Grâce à cette méthodologie du plan d'expérience, plusieurs études ont examiné les applications du plan d'expérience en tant que propriétés antimicrobiennes [183-186] et antifongique [187] (Tableau 8). Ayari et al. [188] ont utilisé le plan de mélange pour optimiser les proportions de mélange des HEs d'origan/thym contre *P. amylolyticus* et *B. cereus*. Moussi et al. [189] ont montré que les combinaisons Armoise/lavande sont efficaces contre *Staphylococcus aureus, Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa* [183]. Ils ont trouvé aussi que la combinaison binaire des huiles essentielles de Thym/Myrte montre une efficacité élevée contre *Salmonella typhimurium*. Cependant, Nikkhah et al. [187] ont adopté cette méthodologie pour atteindre l'effet antifongique optimal des HEs de Thym/cannelle contre *Botrytis cinerea Penicillium expansum*. Néanmoins, aucune étude n'a été publiée sur l'application de modèles de plans de mélange contre les champignons de pourriture du bois.

Tableau 8: Quelques effets des combinaisons binaires et ternaires de certaines HEs.

Mélange des huiles essentielles	Types d'activité	Microorganismes étudiés	Références
Thymus vulgaris L., *Rosmarinus officinalis* L. et *Myrtus communis* L.	Activité antibactérienne	*Salmonella typhimurium*	[183]
Mentha pulegium L., *Ormenis mixta* L., et *Mentha piperita* L.	Activité antibactérienne	*Staphylococcus aureus, Escherichia coli* et *Candida tropicalis*	[132]
Syzygium aromaticum L., *Cinnamomum zeylanicum* Blume, et *Lavandula stoechas* subsp. stoechas	Activité antibactérienne	*Escherichia coli*	[185]
Eucalyptus camaldulensis, Mentha pulegium, et *Rosmarinus officinalis* L.	Activité antibactérienne	*Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae,* et *Staphylococcus aureus*	[186]
Origanum compactum Bentham et *Thymus vulgaris* L.	Activité antibactérienne	*Pontibacter amylolyticus* et *Bacillus cereus*	[188]

Artemisia herba-alba Asso, *Lavandula angustifolia* Mill., et *Rosmarinus officinalis* L.	Activité antibactérienne	*Staphylococcus aureus, Escherichia coli,* et *Pseudomonas aeruginosa*	[189]
Thymus vulgaris L. et *Cinnamomum zeylanicum* Blume	Activité antifongique	*Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*	[187]

3.3. Limites d'application des technique chiomiométrique dans le secteur des PAM

La chimiométrie est largement utilisée en chimie analytique depuis 30 ans, la première publication dans ce domaine de recherche datant des années 1980 [190-192]. Par la suite, les techniques chimiométriques ont été progressivement appliquées dans d'autres disciplines, y compris les sciences des plantes aromatiques et médicinales par des scientifiques et des ingénieurs [193-195].

L'application de la chimiométrie au Maroc pour l'amélioration qualitative et quantitative des biomolécules n'a connu aucun développement significatif qu'au début des années 2014, en particulier, l'évaluation de la qualité des substances bioactive, suivie par l'optimisation des processus d'extraction et les activités biologiques [177,178,183]. Il y a peu d'études environnementales sur l'application des techniques chimiométriques au Maroc qui ont été publiées. La principale raison de cette limitation est que la chimiométrie est relativement nouvelle dans le domaine des PAM au Maroc.

4. Encapsulation des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des composés volatils, naturels, complexes caractérisés par une forte odeur, obtenus à partir du métabolisme des plantes comme sous-produits [196]. Elles sont notamment synthétisées par les plantes aromatiques et stockées dans des glandes sécrétrices où elles se présentent sous forme de gouttelettes liquides [197]. Elles peuvent être obtenues à partir de différentes parties de la plante, telles que les racines, les tiges, les feuilles, les fleurs et extraites par hydrodistillation, distillation à la vapeur, distillation sèche ou pressage mécanique [198].

Bien que les HEs soient des mélanges complexes d'environ 20 à 60 composés de faible poids moléculaire (alcaloïdes, phénols et terpènes), leur bioactivité dépend principalement de quelques molécules à des concentrations plus élevées [198]. Cependant, les composés à de faibles pourcentages sont utiles pour améliorer leurs efficacités [199,200]. Par conséquent, les HEs

présentent une activité synergique mutuelle exploitant les multiples mécanismes d'action complémentaires de la plupart de leurs composants.

Les HE ont montré un grand nombre d'activités biologiques, mais leur utilisation pratique est souvent limitée par plusieurs inconvénients qui peuvent survenir pendant la manipulation ou le stockage. Elles sont sensibles aux réactions de conversion chimique ou de dégradation, telles que l'oxydation, l'isomérisation, la polymérisation et le réarrangement, qui dépendent principalement de paramètres environnementaux tels que la température, la lumière, l'oxygène atmosphérique, l'humidité, les métaux, et les impuretés (Figure 13) [196]. Ces problèmes d'instabilité peuvent entraîner une réduction ou une perte d'efficacité [201]. De plus, les HEs ont des propriétés physico-chimiques médiocres, telles que l'insolubilité dans l'eau (les HEs étant des composés lipophiles), une volatilité élevée et une demi-vie rapide qui les rendent difficiles à manipuler et à utiliser [202].

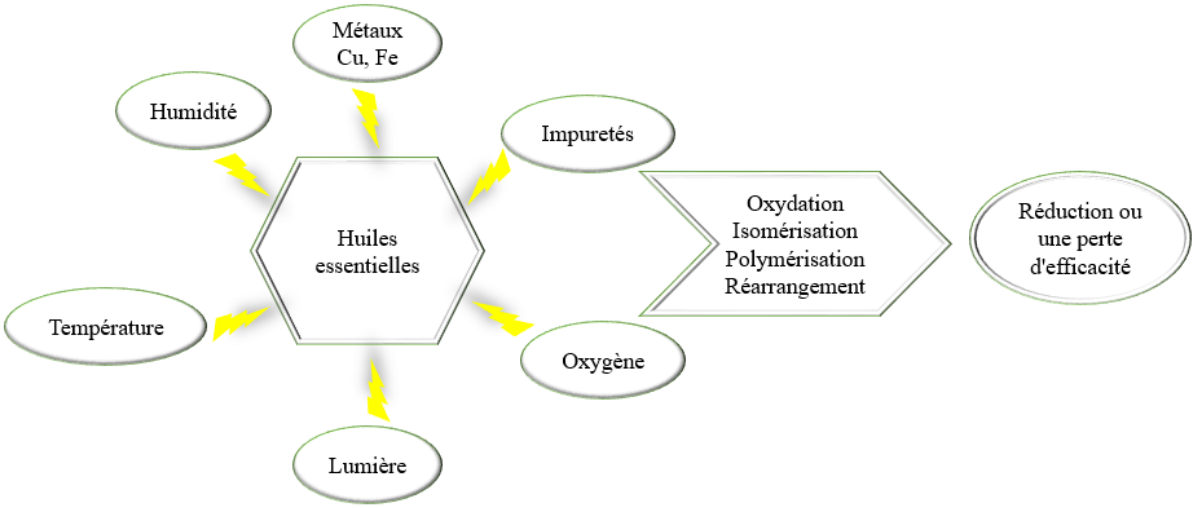


Figure 12 : Diverses voies de dégradation possibles pour les huiles essentielles.

Dans ce sens, la technologie de l'encapsulation représente l'un des plus grands défis, mais aussi l'une des plus grandes promesses, pour la véhiculation des HEs, grâce à leur taille subcellulaire, les carriers sont capables d'améliorer la bioactivité des HEs puisqu'ils permettent une pénétration tissulaire plus profonde et une absorption cellulaire plus facile. De plus, ils permettent de contrôler et de moduler la libération des principes actifs sur le site cible [203]. Enfin, l'approche de l'encapsulation pourrait améliorer les propriétés physico-chimiques et la stabilité des HEs, en permettant leurs dispersion dans l'eau, en réduisant leurs volatilité et en les protégeant de l'interaction avec l'environnement ainsi qu'elle permet parfois d'améliorer les activités biologiques. Plusieurs matériaux, tels que les enrobages comestibles, ont été utilisés comme agents d'assistance

pour l'encapsulation des huiles essentielles. La plupart des enrobages comestibles sont des polysaccharides, notamment des biopolymères tels que le chitosane, liposomes, startch, maltodextrine, la méthylcellulose, l'alginate de sodium et la gomme xanthane [204-207].

4.1. Techniques conventionnelles de l'encapsulation

L'encapsulation consiste à piéger une substance dans une autre, produisant ainsi des particules de faible diamètre. La substance encapsulée, dans ce cas l'HE, est l'agent actif, et la substance encapsulante est le matériau central. La nature des agents encapsulants et le procédé utilisé pour produire la capsule influencent la protection de l'HE. En fonction de sa granulométrie, les encapsulés peuvent être des nano-capsules (nm) ou des microcapsules (µm). Pour les obtenir, il existe des méthodes physiques, physico-chimiques et chimiques, et selon la méthode choisie, l'encapsulé aura des propriétés différentes. Ainsi, Il est donc essentiel de sélectionner la meilleure méthode pour les ingrédients concernés [208].

- **Méthodes physiques** : séchage par pulvérisation, enrobage sur lit fluidisé, extrusion-sphéronisation, extrusion centrifuge, enrobage à la poêle, séchage au tambour, lyophilisation, et procédés utilisant des fluides supercritiques.
- **Méthodes physico-chimiques** : refroidissement par pulvérisation, enrobage à chaud, gélification ionique, extraction par évaporation de solvant et coacervation simple ou complexe.
- **Méthodes chimiques** : polycondensation interfaciale, polymérisation in situ, polymérisation interfaciale et réticulation interfaciale.

4.2. Encapsulation des huiles essentielles par la gomme arabique

4.2.1. Gomme arabique

En outre, La gomme arabique (GA), l'un des biopolymères largement utilisés comme enrobage comestible, est un exsudat séché dérivé des tiges et des branches des acacias qui agit comme un émulsifiant et contient un complexe polysaccharide-protéine chargé négativement (Figure 14) [209].

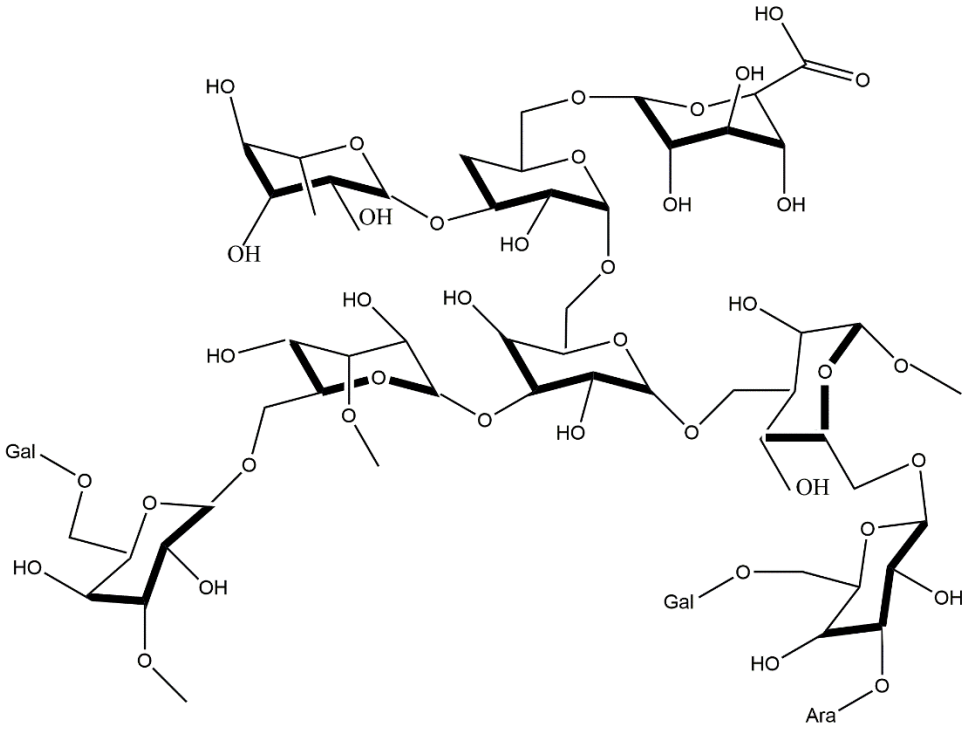


Figure 13 : structure de la gomme arabique.

La gomme arabique est inodore, incolore, insipide et n'affecte pas l'odeur, la couleur et le goût du système auquel elle est ajoutée. Elle est très soluble dans l'eau et se dissout aussi bien dans l'eau froide que dans l'eau chaude. Elle a la capacité de créer un film protecteur solide autour des gouttelettes d'huile, grâce à sa structure protéique arabinogalactane hautement ramifiée, qui contient des fragments de protéines et de polysaccharides. Elle forme un film fin et impénétrable autour de la particule d'arôme, la protégeant de l'oxydation et de l'évaporation et l'empêchant d'absorber l'humidité de l'air [210].

De plus, elles sont non toxiques, elle a été reconnue comme un composant sûr pour les additifs alimentaires [211-213]. Cela encourage son utilisation répandue pour la stabilité et le transport des composants bioactifs dans certaines huiles essentielles.

4.2.2. Nano-encapsulation avec la gomme arabique

La nano-encapsulation avec la gomme arabique peut être réalisée par coacervation ou par une technique de séchage à froid (lyophilisation). La coacervation peut se faire soit en phase aqueuse (c'est-à-dire l'encapsulation de matériaux de base insolubles dans l'eau/hydrophobes), soit en phase organique (c'est-à-dire l'encapsulation de composés hydrosolubles). D'autre part, les techniques de

séchage peuvent être réalisés par enrobage en lit fluidisé, séchage par pulvérisation, séchage en lit fluidisé ou lyophilisation [214,215].

Cependant, la méthode la plus utilisée dans la nano-encapsulation par la gomme arabique est la lyophilisation [216], dans laquelle la molécule invitée (HE) dissoute dans un solvant (par exemple l'éthanol) est ajoutée dans la solution de gomme arabique (GA), puis agitée doucement dans l'obscurité pour accomplir la complexation. Ensuite, la solution mélangée est lyophilisée à -80°C pendant 48 heures pour obtenir le complexe formé (Figure 15). Cette technique la plus appropriée pour la déshydratation de presque toutes les substances sensibles à la chaleur [217].

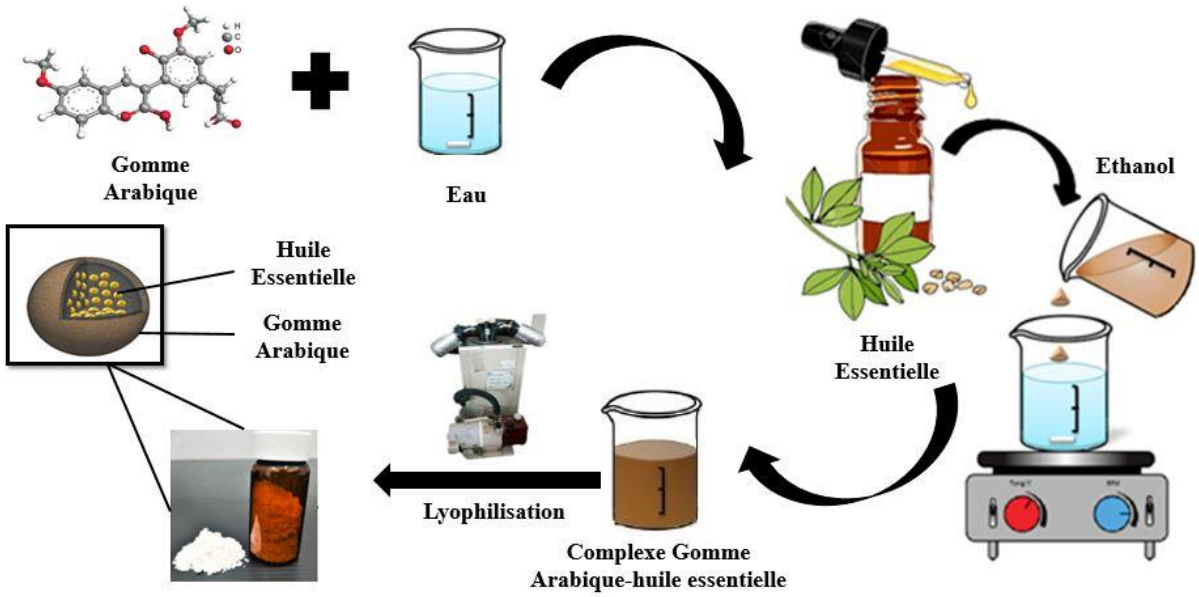


Figure 14 : Procédé de nano-encapsulation d'huiles essentielles dans la gomme arabique par lyophilisation [218].

Plusieurs recherches ont montré que la nano-encapsulation des HEs avec de la gomme arabique par émulsification suivie d'une lyophilisation donne une efficacité et une la stabilité thermo-oxydative de l'encapsulé élevés par rapport aux HE non encapsulée [219,220].

4.2.2.1. Nano-encapsulation par lyophilisation: intérêts et limites

La nano-encapsulation par la gomme arabique en utilisant la technique de lyophilisation présente certains inconvénients, tels que la durée du processus (24-48 heures), les coûts d'investissement et d'exploitation élevés par rapport aux autres techniques (une procédure à forte consommation d'énergie). La structure poreuse des poudres lyophilisées, due à la sublimation de la glace au cours du processus, est également l'une des principales limitations, car elles doivent être broyées ou

transformées en poudres fines après le séchage, et des problèmes liés au manque de contrôle de la taille des particules peuvent être constatés [217,221].

4.2.2.2. Facteurs affectant la nano-encapsulation des huiles essentielles/gomme arabique

La nano-encapsulation des HEs dans un système polymère peut être influencée par plusieurs facteurs (bio-polymère, quantité de solvant, le pH de solution, la technique de nano-encapsulation, et la vitesse et la durée de l'homogénéisation). Il convient donc d'accorder une attention accrue à ces paramètres spécifiques afin de parvenir à une meilleure nano-encapsulation. Parmi ces facteurs les plus importants sont :

- **Bio-polymère :** le type et la concentration de l'émulsifiant sont des éléments très importants ayant une signification considérable pendant le processus de nano-encapsulation. L'ajout d'un émulsifiant dans la solution réduit la tension superficielle de la suspension/émulsion, améliorant ainsi sa stabilité sans modifier le comportement rhéologique et empêchant l'agrégation des particules au début de la nano-encapsulation [222].
- **Co-solvant :** le type et la concentration de co-solvant sont les principaux facteurs qui influencent le résultat de la synthèse d'une nanoformulation à base de bi-polymère. Par exemple, dans le cas de la synthèse de nanoparticules, la concentration de co-solvant dans la solution est un facteur crucial en raison de leur forte influence sur l'efficacité de l'encapsulation [223-225] indiquaient que l'efficacité de l'encapsulation diminuait avec l'augmentation des ratios de co-solvants de l'éthanol.

4.3. Application de nano-encapsulation pour la lutte contre la pourriture du bois

L'activité antifongiques de ces complexes gomme Arabique-huile essentielle a été largement étudiée et prouvée pour l'application de ces complexes dans l'industrie alimentaire [226]. Néanmoins, peu d'études ont été menées sur l'application d'huiles essentielles encapsulées comme un agent de protection du bois contre les champignons de pourriture de bois [211]. Auparavant, aucune étude n'a porté sur la nanoencapsulation d'un mélange d'huiles essentielles pour une application dans la protection du bois.

De plus, plusieurs études indiquent que la gomme arabique améliore la compatibilité des huiles essentielles, en tant que composés actifs, avec l'eau, un solvant bon marché, sans danger pour l'environnement et biologiquement pertinent. Ainsi, les complexes résultants peuvent avoir un potentiel en tant que conservateurs à base d'eau, qui sont préférés sur les marchés [227].

Contrairement aux conservateurs conventionnels à base d'eau, tels que benzimidazoles, chromate acide de cuivre, arséniate de chromate de cuivre et arséniate de cuivre et de zinc qui sont nocifs pour les êtres humains et l'environnement en raison de leur toxicité, les systèmes de conservation proposés sont entièrement biosourcés et biodégradables, représentant ainsi une alternative durable intéressante aux systèmes traditionnels de conservation de bois.

Une étude a évalué l'effet de l'encapsulation des huiles essentielles sur la qualité des bois pendant le stockage. Cette étude a démontré une méthode facile d'utilisation des complexes méthyl-β-cyclodextrine-huiles essentielles (MβCD-EOs) comme conservateurs potentiels biosourcés pour la protection du bois. Les complexes MβCD-EOs ont présenté une résistance contre les champignons de la pourriture du bois significativement améliorée. Cette étude fournit une nouvelle perspective sur l'utilisation de composés naturels, d'huiles essentielles, d'extraits de plantes et de plantes médicinales, pour prolonger la durée de vie des produits en bois [228].

Référence

[1] M. Inoue, S. Hayashi, L.E. Craker, Role of medicinal and aromatic plants: Past, present, and future, IntechOpen London, UK, 2019.

[2] B. Beyene, B. Beyene, H. Deribe, Review on Application and Management of Medicinal Plants for the Livelihood of the Local Community, J. Resour. Dev. Manag. 22 (2016) 33–39. https://iiste.org/Journals/index.php/JRDM/article/view/31747.

[3] W.H. Organization, WHO General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine, Geneva. Online, (2000).

[4] J. Sendker, H. Sheridan, Composition and quality control of herbal medicines, in: Toxicol. Herb. Prod., Springer, 2017: pp. 29–65.

[5] T.T. He, C.O.L. Ung, H. Hu, Y.T. Wang, Good manufacturing practice (GMP) regulation of herbal medicine in comparative research: China GMP, cGMP, WHO-GMP, PIC/S and EU-GMP, Eur. J. Integr. Med. 7 (2015) 55–66. https://doi.org/10.1016/j.eujim.2014.11.007.

[6] A. Szakiel, C. Pączkowski, M. Henry, Influence of environmental biotic factors on the content of saponins in plants, Phytochem. Rev. 10 (2011) 493–502. https://doi.org/10.1007/s11101-010-9164-2.

[7] Z. Ning, C. Lu, Y. Zhang, S. Zhao, B. Liu, X. Xu, Y. Liu, Application of plant metabonomics in quality assessment for large-scale production of traditional Chinese medicine, Planta Med. 79 (2013) 897–908. https://doi.org/10.1055/s-0032-1328656.

[8] C. Liu, Y. Cheng, D. Guo, T. Zhang, Y. Li, W. Hou, L. Huang, H. Xu, A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines, Chinese Herb. Med. 9 (2017) 3–13.

[9] M. Goodarzi, P.J. Russell, Y. Vander Heyden, Similarity analyses of chromatographic herbal fingerprints: A review, Anal. Chim. Acta. 804 (2013) 16–28. https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.09.017.

[10] C. Tistaert, B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review, Anal. Chim. Acta. 690 (2011) 148–161. https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.023.

[11] P. Li, L.W. Qi, E.H. Liu, J.L. Zhou, X.D. Wen, Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models, TrAC - Trends Anal. Chem. 27 (2008) 66–77. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.11.005.

[12] D. Guo, Quality marker concept inspires the quality research of traditional Chinese medicines, Chin. Herb. Med. 1 (2017) 1–2.

[13] A.M. Gómez-Caravaca, R.M. Maggio, L. Cerretani, Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review, Anal. Chim. Acta. 913 (2016) 1–21. https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.025.

[14] Y. Huang, Z. Wu, R. Su, G. Ruan, F. Du, G. Li, Current application of chemometrics in traditional Chinese herbal medicine research, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1026 (2016) 27–35. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.050.

[15] R.P. Rocha, E.C. Melo, L.L. Radünz, Influence of drying process on the quality of medicinal plants : A review, 5 (2011) 7076–7084. https://doi.org/10.5897/JMPRx11.001.

[16] V.H. Heywood, Ethnopharmacology , food production , nutrition and biodiversity conservation : Towards a sustainable future for indigenous peoples &, J. Ethnopharmacol. 137 (2011) 1–15. https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.027.

[17] HCEFLCD, Morocco forest. 2nd edition, HCEFLCD. (2016).

[18] A.N. Shikov, O.N. Pozharitskaya, V.G. Makarov, H. Wagner, R. Verpoorte, M. Heinrich, Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia ; their history and applications, J. Ethnopharmacol. 154 (2014)

481–536. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.007.
[19] O. Akerele, Nature's medicinal bounty: don't throw it away, in: World Heal. Forum 1993; 14 390-395, 1993.
[20] O. mondiale de la Santé, Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023, Organisation mondiale de la Santé, 2013.
[21] F.Z. Redouan, G. Benítez, R.M. Picone, A. Crisafulli, C. Yebouk, M. Bouhbal, A. Ben Driss, M. Kadiri, J. Molero-Mesa, A. Merzouki, Traditional medicinal knowledge of apiaceae at talassemtane national park (northern Morocco), South African J. Bot. 131 (2020) 118–130.
[22] M. Elachouri, Ethnobotany/ethnopharmacology, and bioprospecting: Issues on knowledge and uses of medicinal plants by Moroccan people, in: Nat. Prod. Drug Discov., Elsevier, 2018: pp. 105–118.
[23] M. Abouri, A. El Mousadik, F. Msanda, H. Boubaker, B. Saadi, K. Cherifi, An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Tata Province, Morocco, Int J Med Plants Res. 1 (2012) 99–123.
[24] J. Bellakhdar, La médecine traditionnelle au Maghreb: une archéologie de la science méditerranéenne antique, Horizons Maghrébins-Le Droit à La Mémoire. 39 (1999) 73–87.
[25] J. Fakchich, M. Elachouri, An overview on ethnobotanico-pharmacological studies carried out in Morocco , from 1991 to 2015 : Systematic review (part 1), J. Ethnopharmacol. 267 (2021) 113200. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113200.
[26] F. Msanda, Floristic biodiversity , biogeographical significance , and importance of Morocco ' s Arganeraie Biosphere Reserve, (2021) 64156–64165.
[27] H. Rankou, A. Culham, S.L. Jury, M.J.M. Christenhusz, The endemic flora of Morocco, Phytotaxa. 78 (2013) 1–69.
[28] E. Idm'Hand, F. Msanda, K. Cherifi, Ethnobotanical study and biodiversity of medicinal plants used in the Tarfaya Province, Morocco, Acta Ecol. Sin. 40 (2020) 134–144. https://doi.org/10.1016/J.CHNAES.2020.01.002.
[29] J. El Oualidi, H. Khamar, M. Fennane, M. Ibn Tattou, S. Chauvet, M.S. Taleb, Checklist des endémiques et spécimens types de la flore vasculaire de l'Afrique du Nord, Doc. L'Institut Sci. 25 (2012) 1–189.
[30] S. Zrira, Some Important Aromatic and Medicinal Plants of Morocco, Med. Aromat. Plants World - Africa. 3 (2017) 91–125. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1120-1_5.
[31] P. aromatiques et médicinales du Maroc, Aromatic and medicinal plants of Morocco: Richness, diversity and threats, Bull. l'Institut Sci. Rabat. (2016) 27–42.
[32] F.Z. El Hassani, Characterization, activities, and ethnobotanical uses of Mentha species in Morocco, Heliyon. 6 (2020) e05480. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05480.
[33] M. Elachouri, Ethnobotany/Ethnopharmacology, and Bioprospecting: Issues on Knowledge and Uses of Medicinal Plants by Moroccan People, Elsevier, 2018. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102081-4.00005-8.
[34] M. Sghir Taleb, Aromatic and Medicinal Plants in Morocco: Diversity and Socio-Economic Role, Int. J. Agric. Biosyst. Eng. 11 (2017) 5.
[35] M. Fadil, A. Farah, T. Haloui, S. Rachiq, Diagnosis of the aromatic and medicinal plant sector in Morocco: Case of the cooperatives and associations of the Meknès-Tafilalt area, Lazaroa. 35 (2014). https://doi.org/10.5209/rev_laza.2014.v35.42697.
[36] B. Montanari, S.I. Bergh, Why women's traditional knowledge matters in the production processes of natural product development: The case of the Green Morocco Plan, Womens. Stud. Int. Forum. 77 (2019). https://doi.org/10.1016/j.wsif.2019.102275.
[37] K. Didi, H. Attouch, D. Coopérative, Dynamique Coopérative au Maroc et Nouveau Modèle de Développement To cite this version : HAL Id : hal-03745669 Dynamique Coopérative au Maroc et Nouveau Modèle de Développement Cooperative Dynamics in Morocco and New Development Model, (2022).

[38] A. Aboudrare, T. Lybbert, Importance socio-économique du Safran pour les ménages des zones de montagne de la région de Taliouine-Taznakht au Maroc, 2 (2014) 5–14.
[39] D. Aitelhaj, A. Bounar, La contribution des coopératives dans la promotion territoriale au Maroc : Cas des coopératives safranières de la zone de Taznakhte To cite this version : HAL Id : halshs-02076187, (2019).
[40] M. Naggar, La régénération du cèdre dans le moyen Atlas central au Maroc Quelle issue pour la durabilité de l ' écosystème de la cédraie ?, (2022).
[41] R. Cheddadi, A. Henrot, L. François, F. Boyer, F. Ficetola, A. Hambuckers, K. Huang, A. Lézine, Microrefugia , Climate Change , and Conservation of Cedrus atlantica in the Rif Mountains , Morocco, 5 (2017) 1–15. https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00114.
[42] HCEFLCD, ZIR Oriental project: Support for improving the competitiveness of the rosemary value chain in the Oriental, HCEFLCD. (2019).
[43] M. Naggar, K. Iharchine, Pour une valorisation durable des produits forestiers non ligneux: cas des facies à romarin de l'Oriental (Maroc), 14th World For. Congr. (2015) 7–11.
[44] M. Sabbahi, A. El Hassouni, A. Tahani, A. El Bachiri, Moroccan Journal of Chemistry Altitude effect on the chemical composition and antioxidant activity of rosemary in the region of Talsint (Morocco), J. Chem. 8 (2020) 866–875. http://revues.imist.ma/?journal=morjchem&page=login.
[45] M. Chetouani, I. Mzabri, A. Aamar, A. Boukroute, N. Kouddane, A. Berrichi, Morphological-physiological and biochemical responses of Rosemary (Rosmarinus officinalis) to salt stress, Mater. Today Proc. 13 (2019) 752–761. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.04.037.
[46] ambassade de suisse au Maroc, Développement de la Chaine de valeur Azir dans l'Oriental (Azir-O), 2016.
[47] M. Assioui, M. Mehdaoui, B. Bougi, Y. Balet, Social and solidarity economy between exploitation and sustainability of natural resources : Case of " Rosemary " from the aromatic and medicinal plants sector in the Oriental region (Morocco) ةيعيبطلا دراوملا ةمادتساو للاغتسا نيب ينماضتلاو يعامتجلا دا, Int. Uni-Scientific Res. J. (2021).
[48] HCEFLCD, MANUAL OF GOOD COLLECTION PRACTICES FOR ROSEMARY "Rosmarinus officinalis," HCEFLCD. (2014).
[49] M. BERNARD TYCHON, SUIVI DU ROMARIN DANS LA PROVINCE DE JERADA AU MAROC : CARTOGRAPHIE À PARTIR DE DONNÉES SECONDAIRES ET EXPLORATION DE LA COUVERTURE VÉGÉTALE POUR L'ESTIMATION DE LA PHYTOMASSE, 2018.
[50] F. Gresta, M. Lombardo, L. Siracusa, G. Ruberto, Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review, Agron. Sustain. Dev. 28 (2008) 95–112. https://doi.org/10.1051/agro:2007030.
[51] A.A. Zubor, G. Surányi, Z. Gyori, G. Borbély, J. Prokisch, Molecular biological approach of the systematics of Crocus sativus L. and its allies, Acta Hortic. 650 (2004) 85–93. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.650.8.
[52] M. Khalesi, B.S. Behboodi, H. Ebrahimzadeh, Development and contraction of contractile roots in Crocus sativus, Acta Hortic. 650 (2004) 55–58. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.650.4.
[53] R. V Molina, A. García-Luis, M. Valero, Y. Navarro, J.L. Guardiola, Extending the harvest period of saffron, in: I Int. Symp. Saffron Biol. Biotechnol. 650, 2003: pp. 219–225.
[54] É. De, Le safran marocain entre tradition et marché, (2007).
[55] P. Winterhalter, M. Straubinger, Saffron—renewed interest in an ancient spice, Food Rev. Int. 16 (2000) 39–59.
[56] M.S. Moghaddasi, Saffron chemicals and medicine usage, J Med Plants Res. 4 (2010) 427–430.
[57] A. Ait Oubahou, Bonnespratiquesagronomiques de la conduite technique du safrandans la region de Taliouin-Taznakht, FAO/TCP/MOR/320, 2009.
[58] M.L. Kyriakides, D.A. Kyriakides, Crocus sativus-Biological active Constituents, Stud Nat Prod Chem. 26 (2002) 293–312.

[59] F. Gresta, G. Avola, G.M. Lombardo, L. Siracusa, G. Ruberto, Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (Crocus sativus L.) as affected by environmental conditions, Sci. Hortic. (Amsterdam). 119 (2009) 320–324.

[60] C.D. Kanakis, D.J. Daferera, P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, Qualitative determination of volatile compounds and quantitative evaluation of safranal and 4-hydroxy-2, 6, 6-trimethyl-1-cyclohexene-1-carboxaldehyde (HTCC) in Greek saffron, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 4515–4521.

[61] A. V Zareena, P.S. Variyar, A.S. Gholap, D.R. Bongirwar, Chemical investigation of gamma-irradiated saffron (Crocus sativus L.), J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 687–691.

[62] P.A. Tarantilis, G. Tsoupras, M. Polissiou, Determination of saffron (Crocus sativus L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 699 (1995) 107–118.

[63] M.V. García-rodríguez, H. López-córcoles, G.L. Alonso, C.S. Pappas, M.G. Polissiou, P.A. Tarantilis, Comparative evaluation of an ISO 3632 method and an HPLC-DAD method for safranal quantity determination in saffron, 221 (2017) 838–843. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.089.

[64] R. Rocchi, M. Mascini, A. Faberi, M. Sergi, D. Compagnone, V. Di Martino, S. Carradori, P. Pittia, Comparison of IRMS, GC-MS and E-Nose data for the discrimination of saffron samples with different origin, process and age, Food Control. 106 (2019). https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106736.

[65] F. Gresta, G. Avola, G.M. Lombardo, L. Siracusa, G. Ruberto, Analysis of flowering, stigmas yield and qualitative traits of saffron (Crocus sativus L.) as affected by environmental conditions, Sci. Hortic. (Amsterdam). 119 (2009) 320–324. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.008.

[66] M. Lage, C.L. Cantrell, Quantification of saffron (Crocus sativus L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions, Sci. Hortic. (Amsterdam). 121 (2009) 366–373. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.02.017.

[67] L. Cardone, D. Castronuovo, M. Perniola, N. Cicco, V. Candido, Evaluation of corm origin and climatic conditions on saffron (Crocus sativus L.) yield and quality, J. Sci. Food Agric. 99 (2019) 5858–5869. https://doi.org/10.1002/jsfa.9860.

[68] M. Macchia, L. Ceccarini, I. Molfetta, P.L. Cioni, G. Flamini, Studies on saffron (Crocus sativus L.) from Tuscan Maremma (Italy): Effects of geographical origin, cultivation environment and drying method on volatile emission, Int. J. Food Sci. Technol. 48 (2013) 2370–2375. https://doi.org/10.1111/ijfs.12227.

[69] K. Erden, A. Ozel, A. Özel, INFLUENCE OF DELAYED HARVEST ON YIELD AND SOME QUALITY PARAMETERS OF SAFFRON (Crocus sativus L.) ARPN Journal of Agricultural and Biological Science INFLUENCE OF DELAYED HARVEST ON YIELD AND SOME QUALITY PARAMETERS OF SAFFRON (Crocus sativus L.), 11 (2016) 313–316. www.arpnjournals.com.

[70] C.P. del Campo, M. Carmona, L. Maggi, C.D. Kanakis, E.G. Anastasaki, P.A. Tarantilis, M.G. Polissiou, G.L. Alonso, Effects of mild temperature conditions during dehydration procedures on saffron quality parameters, J. Sci. Food Agric. 90 (2010) 719–725. https://doi.org/10.1002/jsfa.3877.

[71] S. Chaouqi, N. Moratalla-López, M. Lage, C. Lorenzo, G.L. Alonso, T. Guedira, Effect of drying and storage process on Moroccan saffron quality, Food Biosci. 22 (2018) 146–153. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.02.003.

[72] D. Chen, B. Xing, H. Yi, Y. Li, B. Zheng, Y. Wang, Q. Shao, Effects of different drying methods on appearance, microstructure, bioactive compounds and aroma compounds of saffron (Crocus sativus L.), Lwt. 120 (2020) 108913. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108913.

[73] Z. Aghaei, S.M. Jafari, D. Dehnad, Effect of Different Drying Methods on the Physicochemical Properties and Bioactive Components of Saffron Powder, Plant Foods Hum. Nutr. 74 (2019) 171–

178. https://doi.org/10.1007/s11130-019-00729-7.
[74] I. Mzabri, M. Chetouani, K. Charif, M. Addi, J. Nkengurutse, J. Mimouni, N. Kouddane, A. Berrichi, ScienceDirect The Agro-morphological behavior of saffron under the environmental conditions of four areas in Eastern Morocco, 2019. www.sciencedirect.com.
[75] M.-H. Modaghegh, M. Shahabian, H.-A. Esmaeili, O. Rajbai, H. Hosseinzadeh, Safety evaluation of saffron (Crocus sativus) tablets in healthy volunteers, Phytomedicine. 15 (2008) 1032–1037.
[76] A. Mokhtari-Zaer, S. Saadat, V. Ghorani, A. Memarzia, M.H. Boskabady, The Effects of Saffron (Crocus sativus) and its Constituents on Immune System, Saffron. 5 (2020) 193–217. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818462-2.00016-4.
[77] H. Ashktorab, A. Soleimani, G. Singh, A. Amin, S. Tabtabaei, G. Latella, U. Stein, S. Akhondzadeh, N. Solanki, M.C. Gondré-Lewis, Saffron: the golden spice with therapeutic properties on digestive diseases, Nutrients. 11 (2019) 943.
[78] H. Hosseinzadeh, H.M. Younesi, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Crocus sativus L. stigma and petal extracts in mice, BMC Pharmacol. 2 (2002) 1–8.
[79] M. Rahbani, D. Mohajeri, A. Rezaie, M. Nazeri, Protective effect of ethanolic extract of saffron (dried stigmas of Crocus sativus L.) on hepatic tissue injury in streptozotocin-induced diabetic rats, J. Anim. Vet. Adv. (2012).
[80] S. Ghaffari, N. Roshanravan, Saffron; An updated review on biological properties with special focus on cardiovascular effects, Biomed. Pharmacother. 109 (2018) 21–27. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.031.
[81] M. Kamalipour, S. Akhondzadeh, Cardiovascular effects of saffron: an evidence-based review, J. Tehran Heart Cent. 6 (2011) 59.
[82] A. Ghajar, S.M. Neishabouri, N. Velayati, L. Jahangard, N. Matinnia, M. Haghighi, A. Ghaleiha, M. Afarideh, S. Salimi, A. Meysamie, Crocus sativus L. versus citalopram in the treatment of major depressive disorder with anxious distress: a double-blind, controlled clinical trial, Pharmacopsychiatry. 50 (2017) 152–160.
[83] S. Akhondzadeh, M.S. Sabet, M.H. Harirchian, M. Togha, H. Cheraghmakani, S. Razeghi, S.S. Hejazi, M.H. Yousefi, R. Alimardani, A. Jamshidi, Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a 16-week, randomized and placebo-controlled trial, J. Clin. Pharm. Ther. 35 (2010) 581–588.
[84] A.S. Ahmad, M.A. Ansari, M. Ahmad, S. Saleem, S. Yousuf, M.N. Hoda, F. Islam, Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model, Pharmacol. Biochem. Behav. 81 (2005) 805–813.
[85] C. Pintado, A. de Miguel, O. Acevedo, L. Nozal, J.L. Novella, R. Rotger, Bactericidal effect of saffron (Crocus sativus L.) on Salmonella enterica during storage, Food Control. 22 (2011) 638–642.
[86] B. Masoumi, A. Abbasi, S.M. Mazloomi, The effect of saffron on microbial, physicochemical and texture profile of chicken (breast) meat stored in refrigerator, Int. J. Nutr. Sci. 3 (2018) 164–170.
[87] R. Gaglio, C. Gentile, A. Bonanno, L. Vintaloro, A. Perrone, F. Mazza, P. Barbaccia, L. Settanni, A. Di Grigoli, Effect of saffron addition on the microbiological, physicochemical, antioxidant and sensory characteristics of yoghurt, Int. J. Dairy Technol. 72 (2019) 208–217.
[88] I. Mzabri, M. Addi, A. Berrichi, Traditional and modern uses of saffron, Crocus Sativus. (n.d.).
[89] S. Golmohammadzadeh, M.R. Jaafari, H. Hosseinzadeh, Does saffron have antisolar and moisturizing effects?, Iran. J. Pharm. Res. IJPR. 9 (2010) 133.
[90] J.C. Linares, L. Taïqui, J.J. Camarero, Increasing Drought Sensitivity and Decline of Atlas Cedar (Cedrus atlantica) in the Moroccan Middle Atlas Forests, (2011) 777–796. https://doi.org/10.3390/f2030777.
[91] A. Ainane, Khammour, S. Charaf, M. Elabboubi, M. Elkouali, M. Talbi, R. Benhima, S. Cherroud, T. Ainane, Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: Cedrus atlantica, Citrus limonum, Rosmarinus officinalis, Syzygium aromaticum and Eucalyptus globules, Mater.

Today Proc. 13 (2018) 474–485. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.04.004.
[92] M. Aberchane, M. Fechtal, Analysis of Moroccan Atlas Cedarwood Oil (Cedrus atlantica Manetti), 16 (2004) 542–547.
[93] F. Bennouna, M. Lachkar, S. El Abed, I. Saad, Cedrus atlantica essential oil: Antimicrobial activity and effect on the physicochemical properties of cedar wood surface., Moroccan J. Biol. 16 (2020) 35–45. https://www.researchgate.net/publication/342643382.
[94] A. Fidah, N. Salhi, M. Rahouti, B. Kabouchi, M. Ziani, M. Aberchane, A. Famiri, Natural durability of cedrus Atlantica wood related to the bioactivity of its essential oil against wood decaying fungi, Maderas Cienc. y Tecnol. 18 (2016) 567–576. https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000049.
[95] N. Salhi, A. Fidah, M. Rahouti, M.R. Ismaili, B. Kabouchi, A. Famiri, Preservative effect of tetraclinis articulata and cedrus Atlantica wood extractives against fungal decay, Madera y Bosques. 26 (2020) 1. https://doi.org/10.21829/myb.2020.2632093.
[96] S. Zrira, M. Ghanmi, Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential of Cedrus atlantica (Cedarwood oil), J. Essent. Oil-Bearing Plants. 19 (2016) 1267–1272. https://doi.org/10.1080/0972060X.2015.1137499.
[97] A. Uehara, B. Tommis, E. Belhassen, B. Satrani, M. Ghanmi, N. Baldovini, Phytochemistry Odor-active constituents of Cedrus atlantica wood essential oil, Phytochemistry. 144 (2017) 208–215. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.09.017.
[98] L.M. de Macedo, É.M. Dos Santos, L. Militão, L.L. Tundisi, J.A. Ataide, E.B. Souto, P.G. Mazzola, Rosemary (Rosmarinus officinalis L., syn salvia rosmarinus spenn.) and its topical applications: A review, Plants. 9 (2020). https://doi.org/10.3390/plants9050651.
[99] B. Sasikumar, Rosemary, Handb. Herbs Spices Second Ed. 1 (2012) 452–468. https://doi.org/10.1533/9780857095671.452.
[100] A. Oussaid, M. Azzouzi, A. Ibn Mansour, M. Azouagh, M. Koudad, A. Oussaid, Moroccan Journal of Chemistry Assessment of the chemical/biological activities of extracts and essential oil of Rosmarinus Officinalis L. from the Oriental region of Morocco, Mor. J. Chem. 8 (2020) 732–744. http://revues.imist.ma/?journal=morjchem&page=login.
[101] O. Amed Idris, O. Abosede Wintola, A. Jide Afolayan, Helminthiases; prevalence, transmission, host-parasite interactions, resistance to common synthetic drugs and treatment, Heliyon. (2019) e01161. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.
[102] A. Youbi, I. Ouahidi, L. Mansouri, A. Daoudi, D. Bousta, Ethnopharmacological Survey of Plants Used for Immunological Diseases in Four Regions of Morocco, European J. Med. Plants. 13 (2016) 1–24. https://doi.org/10.9734/ejmp/2016/12946.
[103] M. Eddouks, M. Ajebli, M. Hebi, Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in Daraa-Tafilalet region (Province of Errachidia), Morocco, J. Ethnopharmacol. 198 (2017) 516–530. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.017.
[104] M. Bachar, H. Elyacoubi, L. Zidane, A. Rochdi, Ethnomedicinal and traditional phytotherapeutic plants used in Bouhachem Natural Regional Park (Rif of Morocco): Case of Bni-Leit and Al-Oued districts, © 2021 J. Pharm. Pharmacogn. Res. 9 (2020) 284–312. http://jppres.com/jppresOriginalArticle.
[105] A. El-Gharbaoui, G. Benítez, M.R. González-Tejero, J. Molero-Mesa, A. Merzouki, Comparison of Lamiaceae medicinal uses in eastern Morocco and eastern Andalusia and in Ibn al-Baytar's Compendium of Simple Medicaments (13th century CE), J. Ethnopharmacol. 202 (2017) 208–224. https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.014.
[106] Y. Li, D. Kong, Y. Fu, M.R. Sussman, H. Wu, The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants, Plant Physiol. Biochem. 148 (2020) 80–89. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
[107] C. Formisano, S. Delfine, F. Oliviero, G.C. Tenore, D. Rigano, F. Senatore, Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and

extracts of chamomile (Matricaria chamomilla L.) collected in Molise (South-central Italy), Ind. Crops Prod. 63 (2014) 256–263. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.042.

[108] D. Sadeh, N. Nitzan, D. Chaimovitsh, A. Shachter, M. Ghanim, N. Dudai, Interactive effects of genotype, seasonality and extraction method on chemical compositions and yield of essential oil from rosemary (Rosmarinus officinalis L.), Ind. Crops Prod. 138 (2019). https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.068.

[109] R.S. Verma, R.C. Padalia, A. Chauhan, R.K. Upadhyay, V.R. Singh, Productivity and essential oil composition of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) harvested at different growth stages under the subtropical region of north India, J. Essent. Oil Res. 32 (2019) 144–149. https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1684391.

[110] J.M. Andrade, C. Faustino, C. Garcia, D. Ladeiras, C.P. Reis, P. Rijo, Rosmarinus officinalis L.: An update review of its phytochemistry and biological activity, Futur. Sci. OA. 4 (2018). https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0124.

[111] N. Sadgrove, G. Jones, A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture, Agric. 5 (2015) 48–102. https://doi.org/10.3390/agriculture5010048.

[112] A. Elamrani, S. Zrira, B. Benjilali, M. Berrada, A study of moroccan rosemary oils, J. Essent. Oil Res. 12 (2000) 487–495. https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699572.

[113] K. Hannour, A. Boughdad, A. Maataoui, A. Bouchelta, Chemical composition of Rosmarinus officinalis (Lamiaceae) essential oils and evaluation of their toxicity against Bruchus rufimanus (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in Morocco, Int. J. Trop. Insect Sci. 38 (2018) 192–204. https://doi.org/10.1017/S1742758418000012.

[114] A. Bouyahya, A. Et-Touys, Y. Bakri, A. Talbaui, H. Fellah, J. Abrini, N. Dakka, Chemical composition of Mentha pulegium and Rosmarinus officinalis essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities, Microb. Pathog. 111 (2017) 41–49. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.015.

[115] A. Farhat, H. Benmoussa, R. Bachoual, Z. Nasfi, W. Elfalleh, M. Romdhane, J. Bouajila, Efficiency of the optimized microwave assisted extractions on the yield, chemical composition and biological activities of Tunisian Rosmarinus officinalis L. essential oil, Food Bioprod. Process. 105 (2017) 224–233. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.011.

[116] M.K. Stefanakis, C. Papaioannou, V. Lianopoulou, E. Philotheou-panou, A.E. Giannakoula, D.M. Lazari, Cultivation Conditions, (2022).

[117] L. Kharchoufa, I.A. Merrouni, A. Yamani, M. Elachouri, Profile on medicinal plants used by the people of North Eastern Morocco: Toxicity concerns, Toxicon. 154 (2018) 90–113. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.09.003.

[118] K. Diass, F. Brahmi, O. Mokhtari, S. Abdellaoui, B. Hammouti, Biological and pharmaceutical properties of essential oils of Rosmarinus officinalis L. And Lavandula officinalis L, in: Mater. Today Proc., Elsevier Ltd, 2021: pp. 7768–7773. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.495.

[119] N. Hendel, E. Napoli, M. Sarri, A. Saija, M. Cristani, A. Nostro, G. Ginestra, G. Ruberto, Essential Oil from Aerial Parts of Wild Algerian Rosemary: Screening of Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities, J. Essent. Oil-Bearing Plants. 22 (2019) 1–17. https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1590246.

[120] R.S. Borges, B.L.S. Ortiz, A.C.M. Pereira, H. Keita, J.C.T. Carvalho, Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved, J. Ethnopharmacol. 229 (2018) 29–45. https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038.

[121] I. Hamdeni, S. Slim, A. Sanaa, M. Louhaichi, A. Boulila, T. Bettaieb, Rosemary essential oil enhances culture establishment and inhibits contamination and enzymatic browning: Applications for in vitro propagation of Aloe vera L., South African J. Bot. (2021). https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.009.

[122] K. Hosni, I. Hassen, H. Chaâbane, M. Jemli, S. Dallali, H. Sebei, H. Casabianca, Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (Thymus capitatus L.) and rosemary (Rosmarinus officinalis L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity, Ind. Crops Prod. 47 (2013) 291–299. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.023.

[123] M.J. Jordán, V. Lax, M.C. Rota, S. Lorán, J.A. Sotomayor, Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of Rosmarinus officinalis L., Food Control. 30 (2013) 463–468.

[124] E. Melero-Bravo, G. Ortiz de Elguea-Culebras, R. Sánchez-Vioque, M. Fernández-Sestelo, D. Herraiz-Peñalver, R. Sánchez-Vioque, Variability of essential oil in cultivated populations of Rosmarinus officinalis L. in Spain, Euphytica. 218 (2022) 65.

[125] A. Spagnoletti, A. Guerrini, M. Tacchini, V. Vinciguerra, C. Leone, I. Maresca, G. Simonetti, G. Sacchetti, L. Angiolella, Chemical composition and bio-efficacy of essential oils from italian aromatic plants: Mentha suaveolens, Coridothymus capitatus, Origanum hirtum and Rosmarinus officinalis, Nat. Prod. Commun. 11 (2016) 1934578X1601101023.

[126] I. Oualdi, F. Brahmi, O. Mokhtari, S. Abdellaoui, A. Tahani, A. Oussaid, Rosmarinus officinalis from Morocco, Italy and France: Insight into chemical compositions and biological properties, Mater. Today Proc. 45 (2021) 7706–7710.

[127] M. Leporini, M. Bonesi, M.R. Loizzo, N.G. Passalacqua, R. Tundis, The essential oil of Salvia rosmarinus Spenn. from Italy as a source of health-promoting compounds: Chemical profile and antioxidant and cholinesterase inhibitory activity, Plants. 9 (2020) 798.

[128] S.D. Christopoulou, C. Androutsopoulou, P. Hahalis, C. Kotsalou, A. Vantarakis, F.N. Lamari, Rosemary extract and essential oil as drink ingredients: An evaluation of their chemical composition, genotoxicity, antimicrobial, antiviral, and antioxidant properties, Foods. 10 (2021) 3143.

[129] E.D. Yıldırım, The effect of seasonal variation on Rosmarinus officinalis (L.) essential oil composition, Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilim. Derg. 4 (2018) 33–38.

[130] G. Nieto, G. Ros, J. Castillo, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (Rosmarinus officinalis, L.): A Review, Medicines. 5 (2018) 98. https://doi.org/10.3390/medicines5030098.

[131] S. Sivakanthan, S. Rajendran, A. Gamage, T. Madhujith, S. Mani, Antioxidant and antimicrobial applications of biopolymers: A review, Food Res. Int. 136 (2020). https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109327.

[132] I. Messaoudi Moussii, K. Nayme, M. Timinouni, J. Jamaleddine, H. Filali, F. Hakkou, Synergistic antibacterial effects of Moroccan Artemisia herba alba, Lavandula angustifolia and Rosmarinus officinalis essential oils, Synergy. 10 (2020). https://doi.org/10.1016/j.synres.2019.100057.

[133] S.M. Vahdat, M. Khavarpour, S. Kazemi, Chemical Composition, Antimicrobial and Analgesic Properties of Rosmarinus officinalis L. from North of Iran, J. Med. Plants By-Products. 1 (2019) 107–114.

[134] M.D. Hernández, J.A. Sotomayor, Á. Hernández, M.J. Jordán, Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) oils, in: Essent. Oils Food Preserv. Flavor Saf., Elsevier Inc., 2016: pp. 677–688. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00077-8.

[135] I. Borrás-Linares, Z. Stojanović, R. Quirantes-Piné, D. Arráez-Román, J. Švarc-Gajić, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds, Int. J. Mol. Sci. 15 (2014) 20585–20606. https://doi.org/10.3390/ijms151120585.

[136] Z.J. Ni, X. Wang, Y. Shen, K. Thakur, J. Han, J.G. Zhang, F. Hu, Z.J. Wei, Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils, Trends Food Sci. Technol. 110 (2021) 78–89. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.070.

[137] A. Begum, S. Sandhya, S.S. Ali, K.R. Vinod, S. Reddy, D. Banji, An in-depth review on the medicinal flora Rosmarinus officinalis (lamiaceae), Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 12 (2013) 61–

73.
[138] M.E. González-Trujano, E.I. Peña, A.L. Martínez, J. Moreno, P. Guevara-Fefer, M. Deciga-Campos, F.J. López-Muñoz, Evaluation of the antinociceptive effect of Rosmarinus officinalis L. using three different experimental models in rodents, J. Ethnopharmacol. 111 (2007) 476–482.
[139] A.L. Martínez, M.E. González-Trujano, M. Chávez, F. Pellicer, Antinociceptive effectiveness of triterpenes from rosemary in visceral nociception, J. Ethnopharmacol. 142 (2012) 28–34.
[140] M. Moghtader, H. Salari, A. Farahmand, Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of Aspergillus flavus, J. Ecol. Nat. Environ. 3 (2011) 210–214.
[141] B.K. Göksel, Ö. Coşkun, S. Ucler, M. Karatas, A. Ozge, S. Ozkan, Use of complementary and alternative medicine by a sample of Turkish primary headache patients, Agri Derg. 26 (2014) 1–7.
[142] C.-H. Peng, J.-D. Su, C.-C. Chyau, T.-Y. Sung, S.-S. Ho, C.-C. Peng, R.Y. Peng, Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects, Biosci. Biotechnol. Biochem. 71 (2007) 2223–2232.
[143] N. Hendel, E. Napoli, M. Sarri, A. Saija, M. Cristani, A. Nostro, G. Ginestra, G. Ruberto, Essential oil from aerial parts of wild Algerian rosemary: Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities, J. Essent. Oil Bear. Plants. 22 (2019) 1–17.
[144] T. Kahraman, G. Issa, E.B. Bingol, B.B. Kahraman, E. Dumen, Effect of rosemary essential oil and modified-atmosphere packaging (MAP) on meat quality and survival of pathogens in poultry fillets, Brazilian J. Microbiol. 46 (2015) 591–599.
[145] G.N. Mezza, A. V Borgarello, N.R. Grosso, H. Fernandez, M.C. Pramparo, M.F. Gayol, Antioxidant activity of rosemary essential oil fractions obtained by molecular distillation and their effect on oxidative stability of sunflower oil, Food Chem. 242 (2018) 9–15.
[146] M.M. Fiume, W.F. Bergfeld, D. V Belsito, R.A. Hill, C.D. Klaassen, D.C. Liebler, J.G. Marks Jr, R.C. Shank, T.J. Slaga, P.W. Snyder, Safety assessment of Rosmarinus officinalis (rosemary)-derived ingredients as used in cosmetics, Int. J. Toxicol. 37 (2018) 12S-50S.
[147] E. Guzmán, A. Lucia, Essential oils and their individual components in cosmetic products, Cosmetics. 8 (2021) 114.
[148] chemometrics and intelligent laboratory systems - journal - elsevier, No Title, Https://Www.Sciencedirect.Com/Journal/Chemometrics-and-Intelligent-Laboratory-Systems. (2020).
[149] I.T. Jolliffe, J. Cadima, Principal component analysis: a review and recent developments, Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci. 374 (2016) 20150202.
[150] M. Otto, Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry, John Wiley & Sons, 2016.
[151] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, Principal component analysis, Chemom. Intell. Lab. Syst. 2 (1987) 37–52.
[152] G.H. Dunteman, Uses of principal components in regression analysis, Princ. Components Anal. (1989) 65–74.
[153] I.T. Jolliffe, Principal component analysis for special types of data, Springer, 2002.
[154] J. Miller, J.C. Miller, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, Pearson education, 2018.
[155] M. Maric, W. Van Bronswijk, S.W. Lewis, K. Pitts, Rapid characterisation and classification of automotive clear coats by attenuated total reflectance infrared spectroscopy, Anal. Methods. 4 (2012) 2687–2693.
[156] G. Sauzier, W. Van Bronswijk, S.W. Lewis, Chemometrics in forensic science: Approaches and applications, Analyst. 146 (2021) 2415–2448. https://doi.org/10.1039/d1an00082a.
[157] J.M. Soriano-Disla, L.J. Janik, R.A. Viscarra Rossel, L.M. Macdonald, M.J. McLaughlin, The performance of visible, near-, and mid-infrared reflectance spectroscopy for prediction of soil physical, chemical, and biological properties, Appl. Spectrosc. Rev. 49 (2014) 139–186.

[158] R.A.V. Rossel, T. Behrens, Using data mining to model and interpret soil diffuse reflectance spectra, Geoderma. 158 (2010) 46–54.
[159] I. Reinholds, V. Bartkevics, I.C.J. Silvis, S.M. van Ruth, S. Esslinger, Analytical techniques combined with chemometrics for authentication and determination of contaminants in condiments: A review, J. Food Compos. Anal. 44 (2015) 56–72.
[160] J. Trygg, E. Holmes, T. Lundstedt, Chemometrics in metabonomics, J. Proteome Res. 6 (2007) 469–479.
[161] J. Groupy, L. Creighton, Introduction aux plans d'expérience, 2006. https://doi.org/10.4236/am.2014.519298.
[162] R. Prado, Introduction to Design of Experiments, 2008. https://doi.org/10.1198/tas.2008.s273.
[163] M. Yolmeh, S.M. Jafari, Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes, Food Bioprocess Technol. 10 (2017) 413–433. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2.
[164] R. Leardi, Experimental design in chemistry: A tutorial, Anal. Chim. Acta. 652 (2009) 161–172. https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.015.
[165] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, Talanta. 76 (2008) 965–977. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019.
[166] R.H. Myers, D.C. Montgomery, C.M. Anderson-Cook, Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments, John Wiley & Sons, 2016.
[167] J. Goupy, L. Creighton, Mixture Designs, Introd. to Des. Exp. Cary, NC Sas Inst. Inc. (2007) 287–306.
[168] R.E. Bruns, I.S. Scarminio, B. de Barros Neto, Statistical design-chemometrics, Elsevier, 2006.
[169] D.L. Massart, B.G. Vandeginste, L.M. Buydens, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, S. De Jong, Handbook of chemometrics and qualimetrics, Elsevier Science Inc., 1998.
[170] J.A. Cornell, A primer on experiments with mixtures, John Wiley & Sons, 2011.
[171] M.A. Bezerra, V.A. Lemos, C.G. Novaes, R.M. de Jesus, H.R. Souza Filho, S.A. Araújo, J.P.S. Alves, Application of mixture design in analytical chemistry, Microchem. J. 152 (2020) 104336.
[172] V. Simeonov, L. Wolska, A. Kuczyńska, J. Gurwin, S. Tsakovski, J. Namieśnik, Chemometric estimation of natural water samples using toxicity tests and physicochemical parameters, Crit. Rev. Anal. Chem. 37 (2007) 81–90.
[173] A. Bansal, V. Chhabra, R.K. Rawal, S. Sharma, Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization, J. Pharm. Anal. 4 (2014) 223–233. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.12.001.
[174] A. Rebiai, B. Ben Seghir, H. Hemmami, S. Zeghoud, I. Ben Amor, I. Kouadri, M. Messaoudi, A. Pasdaran, G. Caruso, S. Sharma, M. Atanassova, P. Pohl, Quality Assessment of Medicinal Plants via Chemometric Exploration of Quantitative NMR Data: A Review, Compounds. 2 (2022) 163–181. https://doi.org/10.3390/compounds2020012.
[175] X.-J. Liu, J. Hu, Z.-Y. Li, X.-M. Qin, L.-Z. Zhang, X.-Q. Guo, Species classification and quality assessment of Chaihu (Radix Bupleuri) based on high-performance liquid chromatographic fingerprint and combined chemometrics methods, Arch. Pharm. Res. 34 (2011) 961–969.
[176] G.-H. Ruan, G.-K. Li, The study on the chromatographic fingerprint of Fructus xanthii by microwave assisted extraction coupled with GC–MS, J. Chromatogr. B. 850 (2007) 241–248.
[177] M. Fadil, A. Farah, B. Ihssane, T. Haloui, S. Lebrazi, B. Zghari, S. Rachiq, Chemometric investigation of light-shade effects on essential oil yield and morphology of Moroccan Myrtus communis L., Springerplus. 5 (2016). https://doi.org/10.1186/s40064-016-2749-5.
[178] M. Fadil, A. Farah, T. Haloui, S. Rachiq, Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de Rosmarinus officinalis L. par la méthodologie de surface de réponse Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of Rosmarinus officinalis L. by response surface methodology, J. Mater. Environ. Sci. 6 (2015) 2346–2357.

[179] Z. Xiao, H. Chen, H. Wang, Characterization of aroma compositions in different Chinese congou black teas using GC – MS and GC – O combined with partial least squares regression, (2017) 1–12. https://doi.org/10.1002/ffj.3378.
[180] I. Henri, N. Bassolé, H.R. Juliani, Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties, (2012) 3989–4006. https://doi.org/10.3390/molecules17043989.
[181] J. Gutiérrez-Fernández, M.R. García-Armesto, R. Álvarez-Alonso, P. Del Valle, D. de Arriaga, J. Rúa, Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against Enterococcus faecalis, J. Dairy Sci. 96 (2013) 4912–4920.
[182] E. Cristina, R. Maia, D. Borsato, I. Moreira, K. Roberta, P. Rogério, P. Rodrigues, A. Lazarin, Study of the biodiesel B100 oxidative stability in mixture with antioxidants, Fuel Process. Technol. 92 (2011) 1750–1755. https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2011.04.028.
[183] M. Fadil, K. Fikri-Benbrahim, S. Rachiq, B. Ihssane, S. Lebrazi, M. Chraibi, T. Haloui, A. Farah, Combined treatment of Thymus vulgaris L., Rosmarinus officinalis L. and Myrtus communis L. essential oils against Salmonella typhimurium: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology, Eur. J. Pharm. Biopharm. 126 (2018) 211–220. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.002.
[184] M. Chraibi, M. Fadil, A. Farah, S. Lebrazi, K. Fikri-Benbrahim, Antimicrobial combined action of Mentha pulegium, Ormenis mixta and Mentha piperita essential oils against S. aureus, E. coli and C. tropicalis: Application of mixture design methodology, LWT. 145 (2021). https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111352.
[185] H. Falleh, M. Ben Jemaa, K. Djebali, S. Abid, M. Saada, R. Ksouri, Application of the mixture design for optimum antimicrobial activity: Combined treatment of Syzygium aromaticum, Cinnamomum zeylanicum, Myrtus communis, and Lavandula stoechas essential oils against Escherichia coli, J. Food Process. Preserv. 43 (2019). https://doi.org/10.1111/jfpp.14257.
[186] R. Kachkoul, G. Benjelloun Touimi, B. Bennani, R. El Habbani, G. El Mouhri, M. Mohim, T. Sqalli Houssaini, M. Chebaibi, A. Koulou, A. Lahrichi, The Synergistic Effect of Three Essential Oils against Bacteria Responsible for the Development of Lithiasis Infection: An Optimization by the Mixture Design, Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2021 (2021).
[187] M. Nikkhah, M. Hashemi, M.B.H. Najafi, R. Farhoosh, Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit, Int. J. Food Microbiol. 257 (2017) 285–294.
[188] S. Ayari, S. Shankar, P. Follett, F. Hossain, M. Lacroix, Potential synergistic antimicrobial efficiency of binary combinations of essential oils against Bacillus cereus and Paenibacillus amylolyticus-Part A, Microb. Pathog. 141 (2020) 104008.
[189] I.M. Moussii, K. Nayme, M. Timinouni, J. Jamaleddine, H. Filali, F. Hakkou, Synergistic antibacterial effects of Moroccan Artemisia herba alba, Lavandula angustifolia and Rosmarinus officinalis essential oils, Synergy. 10 (2020) 100057.
[190] E.R. Malinowski, D.G. Howery, Factor analysis in chemistry, Wiley New York, 1980.
[191] S. Mas, A. de Juan, R. Tauler, A.C. Olivieri, G.M. Escandar, Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: a review, Talanta. 80 (2010) 1052–1067.
[192] S.N. Deming, Chemometrics: an overview., Clin. Chem. 32 (1986) 1702–1706.
[193] H. Schulz, R. Quilitzsch, H. Krüger, Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy, J. Mol. Struct. 661 (2003) 299–306.
[194] A.-C. Bansleben, I. Schellenberg, J.W. Einax, K. Schaefer, D. Ulrich, D. Bansleben, Chemometric tools for identification of volatile aroma-active compounds in oregano, Anal. Bioanal. Chem. 395 (2009) 1503–1512.
[195] N.F. Farag, S.H. El-Ahmady, E.H. Abdelrahman, A. Naumann, H. Schulz, S.M. Azzam, E.-S.A. El-Kashoury, Characterization of essential oils from Myrtaceae species using ATR-IR vibrational spectroscopy coupled to chemometrics, Ind. Crops Prod. 124 (2018) 870–877.

[196] C. Turek, F.C. Stintzing, Stability of essential oils: a review, Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 12 (2013) 40–53.
[197] A. Fahn, Structure and function of secretory cells, (2000).
[198] R. Pavela, Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review, Ind. Crops Prod. 76 (2015) 174–187.
[199] R. Pavela, Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against Culex quinquefasciatus Say larvae, Parasitol. Res. 114 (2015) 3835–3853.
[200] G. Benelli, R. Pavela, A. Canale, K. Cianfaglione, G. Ciaschetti, F. Conti, M. Nicoletti, S. Senthil-Nathan, H. Mehlhorn, F. Maggi, Acute larvicidal toxicity of five essential oils (Pinus nigra, Hyssopus officinalis, Satureja montana, Aloysia citrodora and Pelargonium graveolens) against the filariasis vector Culex quinquefasciatus: Synergistic and antagonistic effects, Parasitol. Int. 66 (2017) 166–171.
[201] M.B. Isman, Plant essential oils for pest and disease management, Crop Prot. 19 (2000) 603–608.
[202] L. Pavoni, G. Benelli, F. Maggi, G. Bonacucina, Green nanoemulsion interventions for biopesticide formulations, in: Nano-Biopesticides Today Futur. Perspect., Elsevier, 2019: pp. 133–160.
[203] A.R. Bilia, C. Guccione, B. Isacchi, C. Righeschi, F. Firenzuoli, M.C. Bergonzi, Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach, Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2014 (2014).
[204] H. Cui, H. Zhou, L. Lin, The specific antibacterial effect of the Salvia oil nanoliposomes against Staphylococcus aureus biofilms on milk container, Food Control. 61 (2016) 92–98.
[205] H. Rajabi, S.M. Jafari, G. Rajabzadeh, M. Sarfarazi, S. Sedaghati, Chitosan-gum Arabic complex nanocarriers for encapsulation of saffron bioactive components, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 578 (2019) 123644.
[206] M.L. Zambrano-Zaragoza, R. González-Reza, N. Mendoza-Muñoz, V. Miranda-Linares, T.F. Bernal-Couoh, S. Mendoza-Elvira, D. Quintanar-Guerrero, Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation, Int. J. Mol. Sci. 19 (2018) 705.
[207] A. Tiefenbacher, T. Sandén, H.-P. Haslmayr, J. Miloczki, W. Wenzel, H. Spiegel, Optimizing carbon sequestration in croplands: a synthesis, Agronomy. 11 (2021) 882.
[208] Q. Ye, N. Georges, C. Selomulya, Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products, Trends Food Sci. Technol. 78 (2018) 167–179.
[209] R.S. Matche, O.O. Adeogun, Physicochemical characterisations of nanoencapsulated Eucalyptus globulus oil with gum Arabic and gum Arabic nanocapsule and their biocontrol effect on anthracnose disease of Syzygium malaccense Fruits, Sci. African. 18 (2022) e01421.
[210] K. Poornima, R. Sinthya, Application of Various Encapsulation Techniques in Food Industries, Int. J. Latest Eng. Res. Appl. (2017) 37–41. www.ijlera.com.
[211] M. Maqbool, A. Ali, S. Ramachandran, D.R. Smith, P.G. Alderson, Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating, Crop Prot. 29 (2010) 1136–1141. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.06.005.
[212] A. Ali, N. Zahid, S. Manickam, Y. Siddiqui, P.G. Alderson, Double layer coatings: a new technique for maintaining physico-chemical characteristics and antioxidant properties of dragon fruit during storage, Food Bioprocess Technol. 7 (2014) 2366–2374.
[213] V. Kaushik, Y.H. Roos, Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic–sucrose–gelatin systems, LWT-Food Sci. Technol. 40 (2007) 1381–1391.
[214] I. Buljeta, A. Pichler, J. Šimunović, M. Kopjar, Polysaccharides as Carriers of Polyphenols: Comparison of Freeze-Drying and Spray-Drying as Encapsulation Techniques, Molecules. 27 (2022). https://doi.org/10.3390/molecules27165069.
[215] T. Laokuldilok, N. Kanha, Effects of processing conditions on powder properties of black glutinous rice (Oryza sativa L.) bran anthocyanins produced by spray drying and freeze drying, LWT-Food

Sci. Technol. 64 (2015) 405–411.
[216] C. Anandharamakrishnan, Drying techniques for nanoencapsulation, Tech. Nanoencapsulation Food Ingredients. (2014) 51–60.
[217] G. Ozkan, P. Franco, I. De Marco, J. Xiao, E. Capanoglu, A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications, Food Chem. 272 (2019) 494–506. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205.
[218] N. Lammari, O. Louaer, A.H. Meniai, A. Elaissari, Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects, Pharmaceutics. 12 (2020) 1–21. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050431.
[219] A.A. Mahdi, J.K. Mohammed, W. Al-Ansi, Q.A. Al-Maqtari, A. Al-Adeeb, H. Cui, L. Lin, Stabilization of the oil-in-water emulsions of Citrus reticulata essential oil by different combinations of gum arabic/maltodextrin/whey protein, J. Food Process. Preserv. (2022).
[220] K. Chen, M. Zhang, A.S. Mujumdar, M. Wang, Encapsulation of different spice essential oils in quinoa protein isolate-gum Arabic coacervates for improved stability, Carbohydr. Polym. 300 (2023) 120250.
[221] M. del C. Razola-Díaz, E.J. Guerra-Hernández, B. García-Villanova, V. Verardo, Recent developments in extraction and encapsulation techniques of orange essential oil, Food Chem. 354 (2021). https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129575.
[222] D.J. McClements, C.E. Gumus, Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance, Adv. Colloid Interface Sci. 234 (2016) 3–26. https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002.
[223] S. El Kharraf, A. Farah, E.M. El Hadrami, S. El-Guendouz, J.P. Lourenço, A.M. Rosa Costa, M.G. Miguel, Encapsulation of Rosmarinus officinalis essential oil in β-cyclodextrins, J. Food Process. Preserv. 45 (2021) 1–13. https://doi.org/10.1111/jfpp.15806.
[224] C.S. Mangolim, C. Moriwaki, A.C. Nogueira, F. Sato, M.L. Baesso, A.M. Neto, G. Matioli, Curcumin-β-cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application, Food Chem. 153 (2014) 361–370. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.067.
[225] E.I. Paramera, S.J. Konteles, V.T. Karathanos, Stability and release properties of curcumin encapsulated in Saccharomyces cerevisiae, β-cyclodextrin and modified starch, Food Chem. 125 (2011) 913–922. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.071.
[226] D.M. Miss-Zacarías, M. Iñiguez-Moreno, M. Calderón-Santoyo, J.A. Ragazzo-Sánchez, Optimization of ultrasound-assisted microemulsions of citral using biopolymers: characterization and antifungal activity, J. Dispers. Sci. Technol. 43 (2022) 1373–1382. https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1857264.
[227] B.K. Singh, S. Tiwari, N.K. Dubey, Essential oils and their nanoformulations as green preservatives to boost food safety against mycotoxin contamination of food commodities: a review, J. Sci. Food Agric. 101 (2021) 4879–4890.
[228] L. Cai, H. Lim, D.D. Nicholas, Y. Kim, Bio-based Preservative using Methyl-β-cyclodextrin-Essential Oil Complexes for Wood Protection, Int. J. Biol. Macromol. 147 (2020) 420–427. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.056.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

De nombreuses études, basées sur l'identification et le contrôle de la qualité des PAM sont effectués par l'analyse qualitative et quantitative de quelques composés marqueurs. Or, la variation des molécules majoritaires dans la même espèce et le nombre élevés des composés terpéniques, phénoliques, alcooliques et autres rend les tests de bioguidages très complexes. Pour remédier à ce problème, de nombreux outils chimiométriques ont été utilisés. Ces techniques sont puissantes et instructives pour les échantillons et les mélanges complexes. Elles permettent de comparer les données complexes en recherchant des similitudes, en opérant une discrimination et en procédant à une classification. Ainsi que, l'optimiser des réponses souhaitables à partir des modèles mathématiques postulés et valider.

En raison de l'intérêt que présentent ces techniques chimiométriques, cette partie de la thèse vise à évaluer la qualité de trois espèces de plantes marocaines de grande valeur ajoutée, sur le plan chimique en fonction des différents facteurs extrinsèques tel que, l'altitude, l'origine géographique, et la période de récolte, ainsi que l'optimisation de l'activité antifongique des formulations de deux huiles essentielles issues de *Salvia rosmarinus* Spenn et *Cedrus atlantica* Manetti. Enfin, les conditions optimales de nanoencapsulation de la formulation des deux HEs dans la gomme arabique ainsi que leur effet antifongique seront évalué. Les résultats obtenus dans ces études ont fait l'objet de quatre publications à savoir :

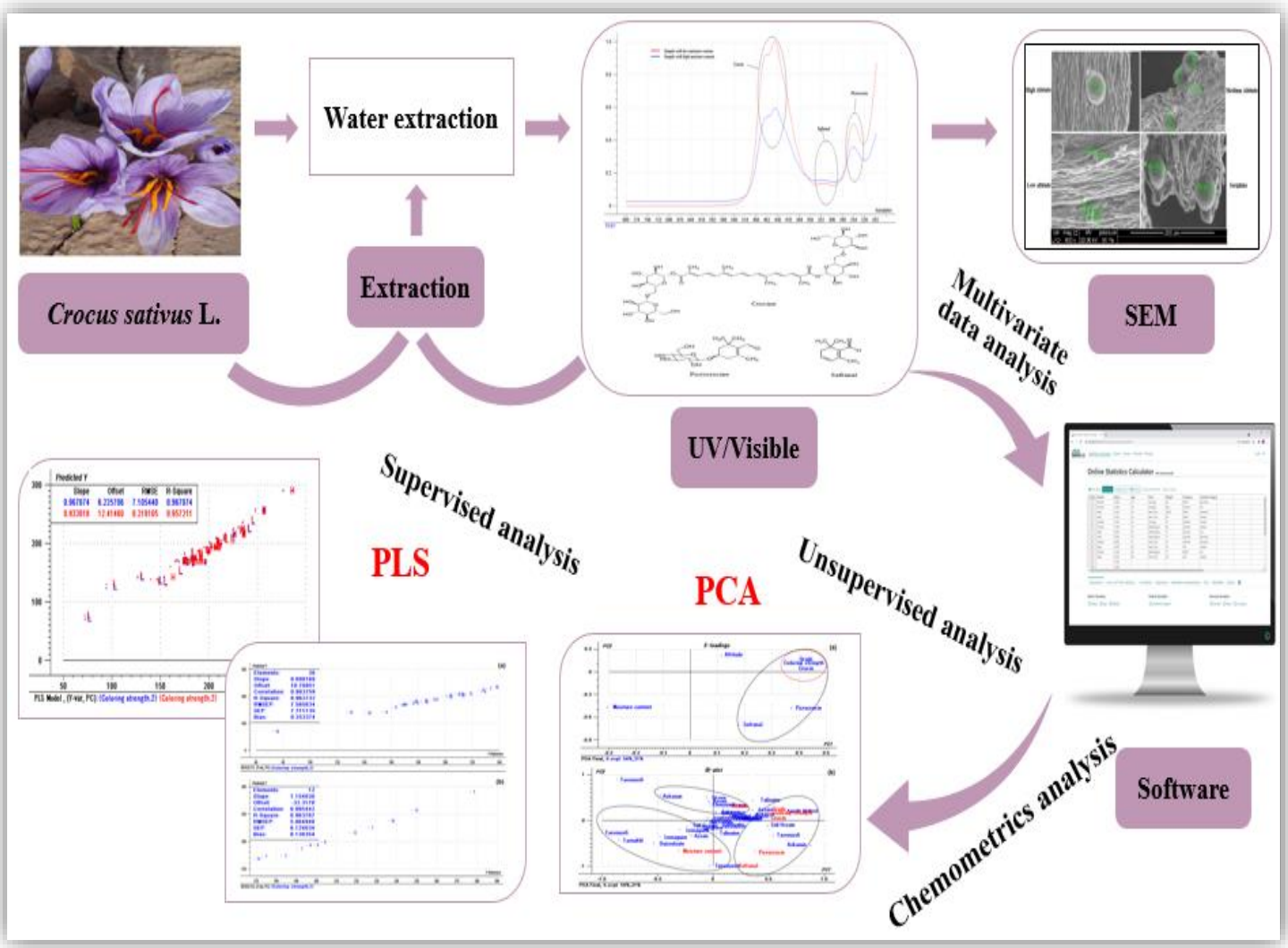
- Les travaux menés dans la première publication se sont concentré sur la gestion de la qualité du C. *sativus* de Taliouine et Taznakhet ainsi que la comparaison des différents profils des échantillons selon les différentes altitudes et provenances par des techniques chimiométriques tels que l'ACP et la PLS. Les résultats de ont révélé que l'altitude est le seul paramètre qui affecte la qualité du safran, par contre, aucune influence de la provenance n'a été remarquée. Par ailleurs, ces résultats nous ont permis d'orienter vers la modélisation par régression en moindres carrés partiels (PLS) du pouvoir colorant en fonction des absorbances de picrocrocine, safranal et crocine par un modèle postulé et validé.
- Les travaux de la deuxième publication se sont portés sur l'étude de l'effet de la période de récolte et des coopératives sur le rendement et la composition chimique de *S. rosmarinus* de la région orientale (province de Figuig). L'utilisation des techniques statistiques à savoir, l'ANOVA, l'ACP ont permis de constater que la période de récolte est le seul facteur qui affecte directement la quantité et la qualité des HE. Par contre, les coopératives n'ont aucun effet sur ces paramètres. En outre, l'ACP et l'ACH ont divisés les échantillons en deux groupes principaux : Le groupe A représente la saison d'été et le groupe B représente la

saison d'hiver. Les échantillons prélevés pendant l'été se caractérisent par une forte teneur en 1,8-cinéole et un rendement élevé en huile essentielle, tandis que les échantillons prélevés pendant l'hiver se caractérisent par une forte teneur en α-pinène et un faible rendement en huile essentielle. En outre, l'activité antibactérienne de l'huile essentielle qui présente la plus grande proportion de composé 1,8-cienole a été testé contre trois souches bactériennes. Les résultats ont montré que *M. smegmatis* et *B. subtilis* sont les souches les plus sensibles, leur croissance s'arrêtant à 1/500 (v/v). Par contre, la souche la moins sensible est *Escherichia coli*, avec une valeur CMI correspondant à 1/250 (v/v).

- Les travaux de la troisième publication se sont concentré sur l'élaboration des formulations de deux huiles essentielles issues de *S. rosmarinus* et *C. atlantica* en utilisant le plan de mélange. Les résultats ont attesté que l'obtention de l'activité souhaitée nécessite deux formulations : la combinaison *S. rosmarinus* (60%) / *C. atlantica* (40%) contre les champignons *C. puteana* (CE_{50} = 9,91±1,91 µg/mL) et *C. versicolor (*CE_{50} = 9,28±1,55 µg/mL) et la combinaison d *S. rosmarinus (*55%*)/ C. atlantica* (45%) contre les champignons *G. trabeum* (CE_{50} = 11,48±3,73 µg/mL) et *P. placenta* (CE_{50} = 22,62±3,79 µg/mL).
- Les travaux de la quatrième publication se sont consacrés à l'optimisation des conditions de nanoencapsulation de la formulation des deux huiles essentielles qui a démontré une activité antifongique optimale contre les champignons de pourriture du bois. L'optimisation de l'efficacité de l'encapsulation a été réalisée à l'aide de la méthode de surface de réponse basée sur deux paramètres, solide-liquide (rapport MEO/GA) et liquide-liquide (MEO/éthanol). Les résultats ont indiqué que l'efficacité d'encapsulation pouvait atteindre une valeur de 87 % dans les conditions optimales : 10 % de MEO/éthanol et rapport 1:10 MEO/GA. Le test d'activité antifongique a révélé que la MEO-GA avait un effet inhibiteur contre les champignons de la pourriture brune du bois avec une valeur de CE_{50} de 5,15±0,88 et 12,63±0,65 µg/mL pour les champignons *G. trabeum* et *P. placenta*, respectivement.

Article I.

Variations de la qualité du safran au Maroc (Taliouine et Taznakht) en fonction de l'altitude et de la provenance : Etude chimiométrique



ARTICLE I

Variations de la qualité du safran au Maroc (Taliouine et Taznakht) en fonction de l'altitude et de la provenance: Etude chimiométrique

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Food Processing and Preservation :* [Q2] et [FI= 2.609]

ANNEMER, Saoussan, EZ ZOUBI, Yassine, RAMZI, Amal, et al. Variations in saffron quality in Morocco (Taliouine and Taznakht) according to altitude and provenance: Chemometric investigation. Journal of Food Processing and Preservation, 2022, vol. 46, no 2, p. e16292.

Résumé

Safran, (*Crocus Sativus* Linnaeus) a suscité l'intérêt humain, depuis les anciennes cultures, pour ses propriétés culinaires, médicinales et cosmétiques. Au Maroc, le safran est cultivé depuis des siècles dans la zone de Taliouine (province de Taroudant), et plus récemment dans la zone de Taznakht (province d'Ouarzazate). Sa bonne qualité d'arôme et de saveur, la rend un produit hautement réputé au niveau national et international. La détermination de la qualité de safran n'est pas évidente, elle est déterminée par sa pureté et ses propriétés colorantes mais aussi aromatiques et gustatives. Le safran est dite pur lorsqu'il répond aux exigences de la norme ISO 3632 et qu'aucune matière n'a été ajoutée au produit naturel. La norme ISO/TS 3632 classe le safran en quatre catégories ; de la catégorie IV la plus faible à la catégorie I la meilleure, selon son taux d'humidité qui doit être varié entre 10% et 12% et sa teneur en Crocine, Picrocrocine et Safranal. De nombreux facteurs influencent le taux de ces principaux actifs : le territoire, le climat, le mode de culture, de récolte, de préparation, le séchage et de stockage. Cette étude vise à identifier les facteurs qui affectent la qualité du safran afin d'améliorer la qualité et la production du safran. Les échantillons de safran ont été collectés sur 38 sites de récolte à différentes altitudes (haute, moyenne et basse) à Taliouine et Taznakht. L'analyse de la teneur en safranal, crocine et picrocrocine a été réalisée par spectrophotométrie dans l'ultraviolet-visible (UV-Vis) selon la norme ISO 3632-1:2011. Le safran des sites de haute altitude s'est avéré avoir la teneur moyenne la plus élevée en picrocrocine (90,92±5,98), safranal (28,57±2,52) et crocine (208,37±21,27), suivi par celui des sites de moyenne altitude (87,59±8,22, 27,09±3,69 et 200,05±19,86, respectivement). Le test d'analyse de la variance a montré que la qualité du safran était influencée par l'altitude et non par la provenance de l'espèce. L'analyse en composantes principales (ACP) a indiqué que le safran contenant la plus grande quantité de crocine avait le plus grand pouvoir colorant et appartenait par conséquent à la première

catégorie. La régression par moindres carrés partiels (PLS) a permis de trouver un modèle préliminaire approprié pour prédire le pouvoir colorant à partir des absorbances. Globalement, ces résultats peuvent être utilisés pour améliorer la qualité et la quantité de safran en développant les conditions de culture du safran, en particulier en haute altitude.

Variations in saffron quality in Morocco (Taliouine and Taznakht) according to altitude and provenance: Chemometric investigation

Saoussan Annemer [1], Yassine Ez zoubi [2], Amal Ramzi [1], El Mestafa El Hadrami [1], Abdelhakim El Ouali Lalami [3], Badr Satrani [4], Abdellah Farah [1]

[1]Laboratory of Applied Organic Chemistry, Faculty of Sciences and Techniques, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fez B P 2202, Morocco.

[2]Biotechnology, Environmental Technology and Valorization of Bio-Resources Team, Department of Biology, Faculty of Sciences and Techniques Al-Hoceima, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco.

[3]Higher Institute of Nursing Professions and Health Techniques of Fez, Regional Health Directorate Fez Meknes, El Ghassani Hospital, 30000 Fez, Morocco.

[4]Forestry Research Center - Rabat, Avenue Omar Ibn Al Khattab, BP 763, - Rabat-Agdal, Morocco, 10050.

Correspondence: Abdellah Farah, Faculty of Sciences and Techniques, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Morocco

Email: farah.abdellah1@gmail.com

Abstract: This study aims to identify factors that affect saffron quality in order to enhance the quality and production of saffron. Saffron samples were collected from 38 harvest sites at various altitudes (high, medium, and low) in Taliouine and Taznakht. Analysis of the content of safranal, crocin, and picrocrocin was carried out through spectrophotometry in the ultraviolet-visible (UV-Vis) according to the ISO 3632-1:2011 standard. Saffron from high-altitude sites was found to have the highest average content of picrocrocin (90.92±5.98), safranal (28.57±2.52), and crocin (208.37±21.27), followed by that from medium-altitude sites (87.59±8.22, 27.09±3.69, and 200.05±19.86, respectively). Analysis of variance test showed that the quality of the saffron was influenced by the altitude and not by the species provenance. Principal component analysis (PCA) indicated that saffron containing the highest quantity of crocin was found to have the greatest coloring strength and consequently belonged to the first grade. Partial least squares (PLS) regression allowed finding a suitable preliminary model to predict the coloring strength from the absorbances. Overall, these findings can be used to improve the quality and quantity of saffron by developing the conditions of saffron cultivation, especially at high altitude.

Novelty impact statement: The investigation of Moroccan saffron showed that his quality is affected by the altitude and not by the provenance, and that the high altitude containing the first grade of saffron. The moisture content showed an effect on saffron quality. PCA identified a strong

correlation between crocin, coloring strength and saffron grade. Thus, the saffron with the highest amount of crocin had the highest coloring strength and therefore belonged to the first grade. PLS regression was successfully created as a preliminary model to predict coloring strength based on their absorbance data in these study areas.

Key words: Saffron, Altitude, picrocrocin, safranal, crocin, ISO3632 standard, PCA analysis, PLS regression.

1. Introduction

Morocco is characterized by its geographical location, cultural diversity, and great wealth of biodiversity that have made it rich in local products. These features are today presented as precious resources that contribute to the sustainable development of Moroccan regions. The region of Souss Massa witnesses local production of high-quality edibles such as argan oil, almond, and saffron [1]. These products are closely linked to the traditions of the Berber populations and are an integral part of their culture.

Saffron has been cultivated for centuries in Taliouine (province of Taroudant) and, more recently, Taznakht (province of Ouarzazate) [2]. Its cultivation represents an important source of employment and income for the local population. Saffron's rich aroma and flavor make it a highly renowned product nationally and internationally [3]. The quality of this species is determined by its organoleptic characteristics (color, texture, flavor, and smell) and through identification techniques. This quality is regulated by the ISO 3632 standard, which aims to standardize the classification of saffron worldwide. This standard classifies the quality of saffron in grades based on data gathered through spectrophotometric analysis (ISO 3632-2:2010 and ISO 3632-1:2011) [4].

Saffron (*Crocus sativus L.*) is a perennial herbaceous geophyte plant belonging to the *Iridaceae* family. The genus Crocus comprises more than 80 species [5] mainly distributed across the Mediterranean region and Southeast Asia [6]. Saffron is a plant that propagates vegetatively by means of a corm [7]. In its cultivation process, flower harvesting and separation of stigmas are still done by hand in most areas. Producing 1 kg of saffron requires between 150,000 and 200,000 flowers and around 400 hours of work [8].The intensive manual work involved in its production is the reason it is widely known as the most expensive species in the world [9].

Saffron is cultivated in many countries: Iran, India, Afghanistan, Greece, Morocco, Spain and Italy. Its global production is estimated at 418 t [9]. In Morocco, saffron is mainly cultivated in the southern region, with the main production regions being Taliouine and Taznakht. The total area

under saffron cultivation in these regions is estimated at 1630 ha [2]. In 2016, about 5.5 t of saffron were produced in Taliouine and Taznakht [10].

Saffron is used in food preparation mainly for its color, flavor, and aroma [11]. In addition, various medicinal properties are attributed to the species. Several scientific studies have reported that saffron has pharmacological properties, such as antioxidant and antifungal [12], anticancer [13-15], antiparasitic and antihypertensive [16,17], antimicrobial [18], anti-Alzheimer [19,20], anti-diabetic and anti-apoptotic [5], anti-ulcer [21], antidepressant [22], and antiproliferative effects [23,24]. The species are commonly used to treat skin problems such as dark pigments and acne [25].

The main chemical components of saffron are the secondary metabolites crocin, picrocrocin, and safranal [26]. Crocin gives saffron its color, safranal provides the spicy aroma, and picrocrocin is responsible for the bitter taste [27].

The aim of this study was to determine the quality of saffron cultivated in the southern regions of Morocco (Taliouine and Taznakht) by comparing samples of the species collected from different harvest sites based on altitude (high, medium, and low) and provenance (southern and northeastern regions) to find the correlation between them through principal component analysis (PCA). Partial least squares (PLS) regression was used to establish a predictive model of the spectral data on coloring strength using the following variables: moisture, picrocrocin, crocin, safranal, coloring strength, altitude, and spectral data.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Saffron is cultivated mainly in the south of morocco: Taliouine in Sous-Massa and Taznakht in Drâa-Tafilalet (Figure1). For this study, sampling was carried out at 38 plots located in different rural communes at high (>2,000 m), medium (1,800–1,700 m), and low altitudes (<1,600 m), as presented in Table 1. All samples were collected between 15 October and 15 November in 2019. This species were identified by Dr. Aafi Abderrahman (ex-researcher at the Forestry Research Center – Rabat, Morocco).

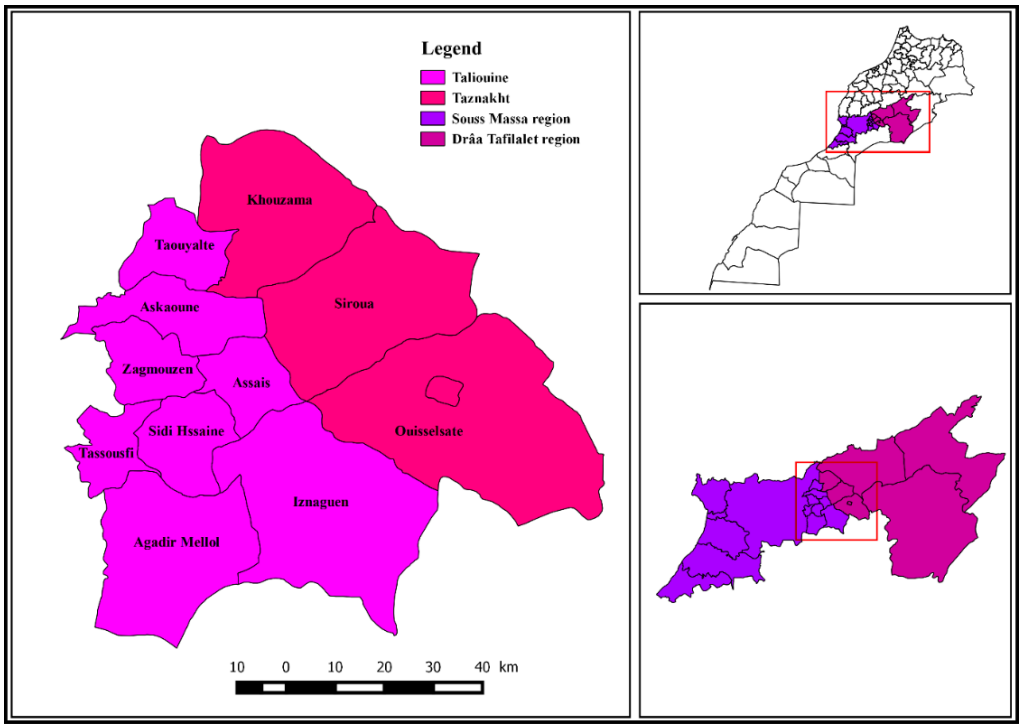


Figure 1: Geographic localization of Taliouine and Taznakht area in the Southern zone of Morocco. Made by the QGIS software [28].

Table 1: The localization, the altitude, and the coordinates of the samples from the study areas.

Samples Site	Rural Communities	Province	Region	Altitude (m)	Latitude N	Longitude W
P1	Zagmouzen	Taroudant	Souss-Massa	2056	30° 48' 31.7"	7° 34' 59.8"
P2	Assais	Taroudant	Souss-Massa	1092	29° 47' 53.8"	8° 32' 31.6"
P3	Siroua	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	2044	30° 38' 25.6"	7° 28' 47.3"
P4	Ouisslsate	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	1507	30° 31' 13.2"	7° 20' 0.9"
P5	Askaoune	Taroudant	Souss-Massa	2080	30° 43' 47.9"	7° 45' 15.6"
P6	Askaoune	Taroudant	Souss-Massa	2050	30° 44' 30.1"	7° 46' 52.8"
P7	Assais	Taroudant	Souss-Massa	1823	30° 37' 37.6"	7° 39' 24.7"

P8	Siroua	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	2032	30° 42' 10.7"	7° 30' 29.8"
P9	Khouzama	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	1801	30° 34' 7.7"	7° 51' 20"
P10	Tassousfi	Taroudant	Souss-Massa	1661	30°29'21.3"	7°52'20.5"
P11	Agadir Melloul	Taroudant	Souss-Massa	1766	30° 13' 37.1"	8° 35' 59.4"
P12	Askaoun	Taroudant	Souss-Massa	2061	30° 48' 25.8"	7° 47' 21.3"
P13	Sidi Hssaine	Taroudant	Souss-Massa	1622	30° 28' 7.1"	7° 46' 30.8"
P14	Taliouine	Taroudant	Souss-Massa	1033	30° 32' 7.2"	7° 55' 9.6"
P15	Sidi Hssaine	Taroudant	Souss-Massa	1549	30° 24' 36"	7° 51' 36"
P16	Siroua	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	2084	30° 38' 46.9"	7° 26' 58.1"
P17	Assais	Taroudant	Souss-Massa	1708	30° 34' 25.2"	7° 34'26.1"
P18	Taliouine	Taroudant	Souss-Massa	1114	30° 32' 7.2"	7° 55' 9.6"
P19	Izenagen	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	1470	30° 24' 6.7"	7° 15' 5.3"
P20	Taliouine	Taroudant	Souss-Massa	1450	30° 44' 20.1"	7° 46' 38.3"
P21	Askaoune	Taroudant	Souss-Massa	3000	30°44'27.0"	7°46'33.7"
P22	Siroua	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	2032	30° 42' 10.7"	7° 30' 29.8"
P23	sidi Hssaîne	Taroudant	Souss-Massa	1652	30° 28' 22.8"	7° 43' 4"
P24	Khouzama	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	1817	30° 51' 8.9"	7° 32' 21.7"

P25	Ouisselssat	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	1535	30° 36' 14.1"	7° 21' 38.8"
P26	Askaoune	Taroudant	Souss-Massa	2804	30° 46' 52.9"	7° 47' 31.8"
P27	Tassosfi	Taroudant	Souss-Massa	1456	30° 29' 16.1"	7° 52' 21.2"
P28	Tassousfi	Taroudant	Souss-Massa	1554	30° 25' 23.2"	7° 51' 42.8"
P29	Tassousfi	Taroudant	Souss-Massa	1461	30° 28' 28.2"	7° 52' 46.9"
P30	Tassousfi	Taroudant	Souss-Massa	1354	31° 22' 55.2"	9° 32' 41.7"
P31	Tassousfi	Taroudant	Souss-Massa	1451	30° 30' 5"	7° 51' 51.5"
P32	Izenagen	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	1595	30° 22' 37."	7° 24' 37.1"
P33	Sidi Hssaine	Taroudant	Souss-Massa	1586	30° 26' 34.3"	7° 50' 10.8"
P34	Siroua	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	2298	30°45'22"	7°17'55"
P35	Taouyalte	Taroudant	Souss-Massa	2007	30° 10' 18.4"	7° 51' 35"
P36	Khouzama	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	1914	30° 48' 9.8"	7° 31' 33.4"
P37	Taznakhet	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	1412	30° 31' 43.4"	7° 15' 44.6"
P38	Assais	Taroudant	Souss-Massa	1873	30°49'40.3"	7°32'36.7"

Pn: site.

2.2. Moisture determination

According to the procedures established by ISO/TS 3632-2:2011, moisture is determined by drying at 103 ± 2 °C for 16 h. For each test, 500 mg powder was treated. All assays were realized in triplicates. Moisture percentage and volatile components were determined using the following formula:

$$wMV = (m0 - m1)x\frac{100}{m0}\ \% \qquad (1)$$

m0: is the mass of the test sample, expressed in grams.

m1: is the mass of the dry residue, expressed in grams.

2.3. Analysis by ultraviolet/visible spectrometry

In the ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrometry method, the three criteria of color, taste, and flavor were measured and analyzed to determine the properties of saffron. Figure 2 illustrates the steps of sample preparation in determining the UV-visible profile. Each experiment was evaluated in triplicates. According to the technical specifications of ISO/TS 3632-2:2011, the absorbance of the various components of saffron was measured according to the following wavelengths:

- ✓ At 257 nm, corresponds to the maximum absorbance of picrocrocin.
- ✓ At 330 nm, refers to the maximum absorbance of safranal.
- ✓ At 440 nm, relates to the maximum absorbance of crocin.

The results are obtained by direct reading of the absorbance D, at three wavelengths, as follows:

$E_{1cm}^{1\%}$257 nm: absorbance at about 257 nm (maximum absorbance of picrocrocin).

$E_{1cm}^{1\%}$330 nm: absorbance at about 330 nm (maximum absorbance of safranal).

$E_{1cm}^{1\%}$440 nm: absorbance at about 440 nm (maximum absorbance of crocin).

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{D * 10000}{m(100 - H)} \qquad (2)$$

D: is the specific absorbance.

m: is the mass of the sample, expressed in grams.

H: is the moisture and volatile matter content of the sample, expressed as a mass fraction.

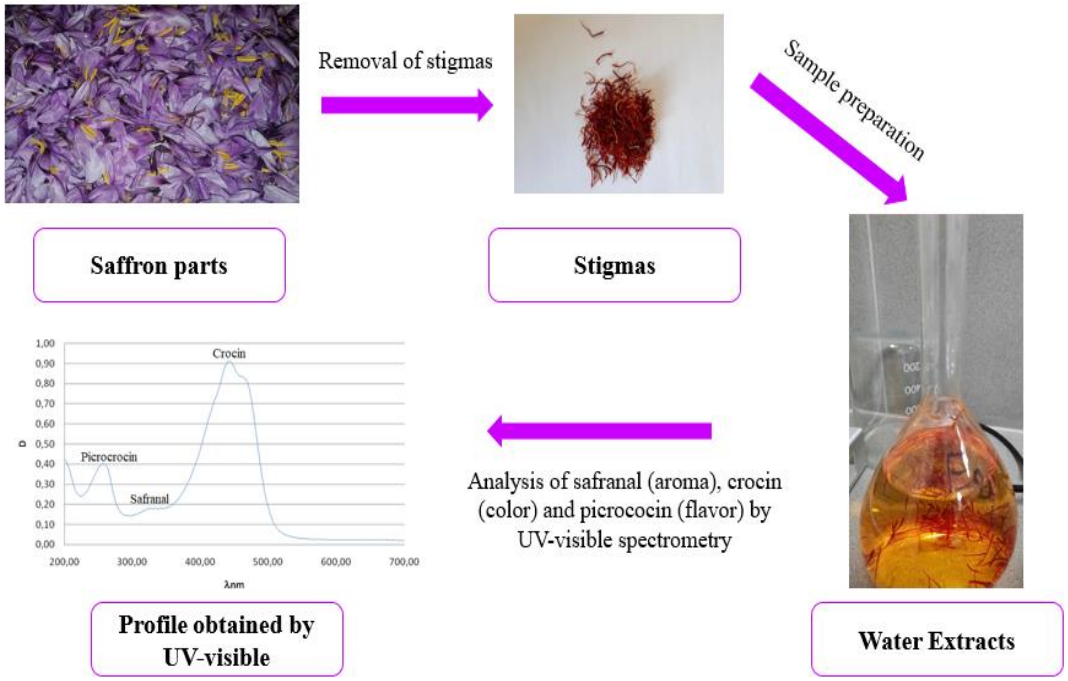


Figure 2 : Illustration of the proposed method for sample preparation from saffron harvest until obtaining the UV-visible profile.

2.4. Coloring strength of saffron

Measuring the absorbance of crocin at 440 nm allowed calculating the coloring strength of saffron by multiplying the absorption value with the factor 250, according to the SOIVRE method [29]. The value of the coloring strength was obtained through the following expression:

$$Coloring\ Staining = Absorbance440 \times 250 \quad (3)$$

2.5. Grade of saffron

The ISO/TS 3632 standard classifies saffron into four grades, from the lowest (grade 4) to the highest (grade 1), according to its moisture content, which must not exceed 12%, and crocin, picrocrocin, and safranal content (Table 2).

Table2: Chemical specifications of saffron according to ISO/TS 3632.

Saffron compound	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Flavour/ Picrocrocin $E^{1\%}_{1cm}$ 257nm	Min 70	Min 55	Min 40	Min 30
Aroma/ Safranal, $E^{1\%}_{1cm}$ 330nm	20-50	20-50	20-50	20-50
Colouring/ Crocin $E^{1\%}_{1cm}$ 440nm	Min 190	Min 150	Min 110	Min 80
Moisture content	Max 12%	Max 12%	Max 12%	Max 12%

2.6. Determination of the morphological structure of the stigmas through scanning electron microscopy

The morphological structure of the stigmas were determined through scanning electron microscopy (SEM) at the Innovation and Technology Transfer Center, Fez, Morocco. The samples were put in a Peltier panel at a temperature of 25 ºC and pressure of 90 Pa. FEI's instrument Quanta 200, equipped with an EDAX probe for surface microanalysis, was used to observe the stigmas at a voltage of 0.5 at 30 KV, Det LFD, 3.5 nm, from 250x to 400x, between 15.00 and 20.00 KV.

2.7. Statistical analysis

The collected data were analyzed using OriginPro 2021 software (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA). To apply one-way and two-way analysis of variance (ANOVA), a probability of $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. PCA and PLS regression were performed using the software Unscrambler version 9.7 (CAMO ASA, Oslo, Norway). The principal components' (PCs) significance was determined through cross-validation.

3. Results and Discussion

3.1. Saffron quality results

According to the limits established by the standard ISO 3632 1,2:2010-2011, the results of the picrocrocin (flavor), safranal (aroma), and crocin (color) content, moisture content (expressed in

percentage) and coloring power, as well as the quality grade of each sample, are presented in Table 3.

Table 3: The absorbance values of pricocrocin, safranal and crocin as well as moisture content of saffron from different site of Taliouine and Taznakht area.

Samples Site	Altitude	Means ± SD					Grade
		Flavour/Picrocrocin $E_{1cm}^{1\%}$257 nm	Aroma/Safranal $E_{1cm}^{1\%}$330 nm	Coloring/Crocin $E_{1cm}^{1\%}$440 nm	Coloring strength	Moisture	
P1	H	90.17±2.72	26.14±1.46	196.89±5.89	226.00±5.91	6.62±0.81	1
P2	M	73.27±1.96	24.64±1.30	156.62±2.80	182.31±3.11	8.17±1.07	2
P3	H	87.12±1.89	26.41±1.31	166.36±3.13	189.38±3.09	7.29±0.92	2
P4	L	83.02±3.02	40.17±2.48	138.61±3.71	163.43±3.56	11.83±1.96	3
P5	H	124.51±3.86	36.67±2.23	243.09±7.22	282.93±6.64	4.40±0.61	1
P6	H	91.58±2.49	29.38±1.25	186.16±4.06	214.08±4.54	6.89±0.86	2
P7	M	96.44±2.70	30.28±1.90	169.45±2.56	182.69±3.43	8.23±1.10	2
P8	H	92.29±2.63	32.19±1.33	192.96±3.63	230.59±2.37	6.59±0.92	1
P9	M	97.58±3.34	29.21±1.36	179.58±3.76	209.62±1.74	8.00±1.08	2

P10	L	88.15±1.61	35.13±2.45	166.92±3.32	192.96±5.48	7.68±1.15	2
P11	M	99.99±2.57	22.29±1.36	210.48±5.88	243.89±6.42	4.21±0.69	1
P12	H	83.43±1.78	19.09±1.24	163.64±2.70	190.75±3.75	6.75±0.95	2
P13	L	84.87±2.56	30.14±1.43	160.69±2.78	182.98±4.80	8.89±1.17	2
P14	L	72.24±1.96	25.86±1.33	169.92±2.56	203.46±4.70	8.93±1.04	2
P15	L	102.93±2.65	27.41±1.32	207.33±6.78	239.25±8.98	5.82±0.98	1
P16	H	78.71±1.70	27.54±1.28	175.63±3.76	185.26±3.95	6.94±0.86	2
P17	M	89.26±1.64	25.90±1.53	194.15±3.49	225.86±5.61	6.66±0.73	1
P18	L	81.96±1.58	33.66±1.25	138.31±2.86	163.11±2.07	10.71±1.73	3
P19	L	80.29±1.48	30.78±1.37	157.36±2.88	179.77±3.10	8.61±1.21	2
P20	L	92.21±2.54	27.15±1.34	180.33±4.84	196.68±3.06	6.22±0.82	2
P21	H	90.52±2.35	28.69±1.21	170.41±2.81	195.48±3.01	7.06±0.97	2
P22	H	99.94±3.59	28.79±1.39	153.35±2.96	167.97±2.20	8.11±1.18	2
P23	L	86.49±1.74	29.57±1.43	192.35±3.60	223.09±6.75	6.49±0.72	1

P24	M	87.14±1.84	28.69±1.26	153.20±2.99	178.75±2.24	8.17±1.29	2
P25	L	100.07±3.44	32.49±1.36	202.08±4.58	227.13±5.72	5.67±0.91	1
P26	H	90.03±2.50	30.50±1.35	177.73±3.68	205.98±3.85	7.52±1.21	2
P27	L	88.75±1.63	27.47±1.37	169.89±2.68	200.02±4.85	7.00±0.86	2
P28	L	87.19±2.46	5.12±0.57	127.71±2.66	147.99±2.82	12.37±1.87	3
P29	L	90.67±3.28	27.66±1.32	148.41±2.91	170.46±3.14	10.08±1.10	3
P30	L	80.29±2.41	30.78±1.49	157.36±3.95	175.64±3.19	7.28±0.93	2
P31	L	84.27±2.50	24.47±1.35	65.47±1.81	76.05±1.01	15.62±1.90	4
P32	L	51.01±1.42	28.68±1.28	112.93±2.66	124.46±3.82	12.75±1.83	3
P33	L	86.79±3.34	47.22±3.53	152.44±2.90	178.17±1.12	8.51±1.14	2
P34	H	91.38±3.37	30.67±1.42	184.89±4.63	215.88±6.79	6.88±0.43	1
P35	H	85.04±1.57	34.88±1.58	162.54±2.85	185.88±2.07	7.29±0.92	2
P36	M	79.99±1.50	27.24±1.55	174.48±3.87	200.29±3.09	6.14±0.79	2
P37	L	77.10±1.67	34.89±1.34	83.77±2.65	96.96±1.81	13.75±1.71	4

P38	M	70.00±1.59	18.95±1.53	151.00±3.58	177.01±3.73	7.41±1.20	2

H: high altitude (>2,000 m); M: medium altitude (1,800-1,700 m); L: low altitude (<1,600 m); Pn: site; SD: standard deviation.

3.1.1. The effect of site and altitude on moisture content

The moisture content of the saffron samples, calculated according to formula (1), varied from 15.62% to 4.40%. All samples from high, medium, and low altitudes had a moisture content that complied with the standard (moisture ≤12%), except for four samples from low-altitude sites: Nº31 from Tassousfi (15.62%), Nº37 from Taznakhet (13.75%), Nº32 from Izenagen (12.75%), and N°28 from Tassousfi (12.37%). Figure 3 clearly shows that no significant difference ($p > 0.05$) was noticed in the moisture content between high- and medium-altitude samples. However, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between high- and low-altitude samples, as well as medium- and low-altitude ones. Saffron from the low-altitude areas was found to have the highest moisture content, while that from the high-altitude regions had a significantly low moisture content. The two-way ANOVA results show that sample site and altitude have a highly significant effect on moisture content. The excess moisture in saffron from low-altitude areas can be explained either by wrong drying methods or by a rainy harvest period that made the stigmas moist and thus difficult to dry. Chaouqi et al. [30] have shown that the storage and drying method, as well as the drying time, have a significant effect on the quality of saffron.

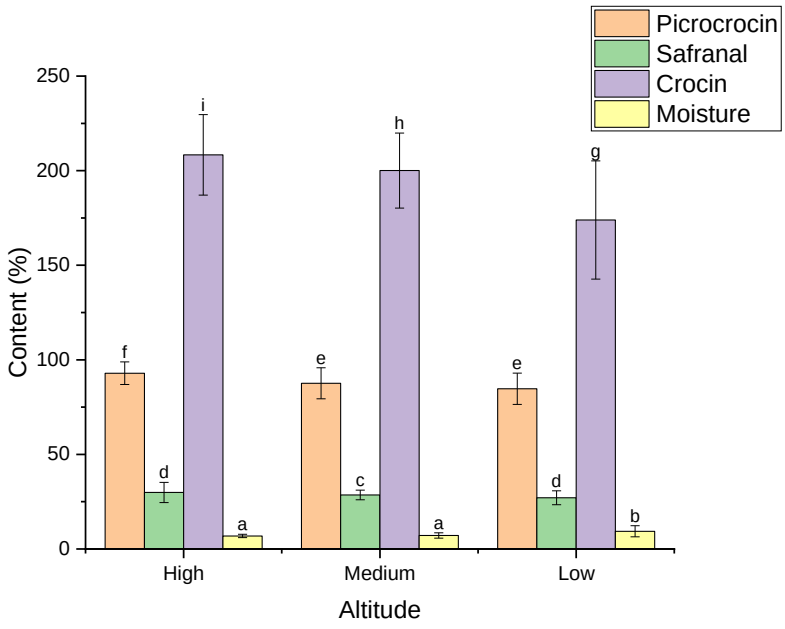


Figure 3: The absorbance values of pricocrocin, safranal and crocin as well as moisture content of saffron at different altitude from Taliouine and Taznakhet area. High altitude (>2,000 m); Medium altitude (1,800 -1,700 m); Low altitude (<1,600 m). Letters a, b, c, d, e, f, g, h, and i

indicated significant differences. Each column with different letters are significantly different (p <0.05) according to Tukey test

3.1.2. Effect of site and altitude on picrocrocin, safranal, and crocin

The content of picrocrocin (responsible for the bitter taste), safranal (providing the characteristic of species) and crocin (responsible for the color) in the saffron were determined according to formula (2), and the results are shown in Table 3. According to ISO/TS 3632, for saffron to be considered of high quality and satisfactory taste, its picrocrocin content must be higher than 70, safranal content must be between 20 and 50, and crocin content must be higher than 190. All samples from the high, medium, and low altitudes conformed to this standard, except for sample N°28 from Tassoussfi (low altitude) with a picrocrocin content of 51. Figure 3 indicates the significance differences in the amounts of the compounds among the different altitudes. No significant difference ($p > 0.05$) was observed between medium- and low-altitude areas, while a significant difference ($p < 0.05$) was observed between high- and medium-altitude areas and between high- and low-altitude areas in terms of picrocrocin content. The average picrocrocin levels of the samples were 90.92±5.98 at high altitudes, 87.59±8.22 at medium altitudes, and 84.69±8.27 at low altitudes. However, significant differences were noted among all altitude groups in terms of average safranal content, which was higher at low altitudes (29.89±5.33) than at high (28.57±2.52) and medium (27.09±3.69) altitudes. Regarding crocin content, again, significant differences were found among the three altitude levels. On average, the saffron from high- and medium-altitude regions had a crocin content of 208.37±21.27 and 200.05±19.86, respectively, stronger than the low-altitude average of 173.97±31.26. The highest crocin content (243.09±7.22) was found in sample N°5 (Askaoune). Among the 11 high-altitude saffron samples, three were in Grade 1 and the other eight in Grade 2. Among the eight samples from middle-altitude sites, two were in Grade 1 and the remaining six in Grade 2. Among the low-altitude samples, three were in Grade 1, eight in Grade 2, five in Grade 3, and two in Grade 4. Overall, saffron of the first and second grades had been predominantly cultivated at high and medium altitudes. Using the two-way ANOVA, the probability of the Fisher test was determined to be less than 0.05, showing the highly significant effect of harvest site and altitude on picrocrocin, safranal, and crocin content. The content of picrocrocin, safranal, and crocin in this study were higher than those reported by Ghanbari et al. [31] who found that picrocrocin, safranal, and crocin amounts of 72.00–86.60, 38.50–45.30, and 217–220, respectively, in their samples Similar to this study, Atyane et al. [33], found that

picrocrocin, safranal, and crocin content differed between saffron samples from different altitudes. Lage and Cantrell [34] determined altitude to be the only factor significantly affecting crocin content. On the other hand, Cardone et al. [35] indicated that the qualitative characteristics of the species, such as coloration, bitterness, and strength of aroma, were affected by the cultivation site ($p < 0.05$). In addition, significant differences in the contents of picrocrocin, crocin, and safranal were detected by) Vahedi et al. [36] between samples cultivated in different villages of the same city. Overall, variability in the content of saffron compounds is related to several factors such as altitude, drying method, climatic conditions, growing conditions, temperature, and geographical origin [37,40], as well as moisture content [41], since wet saffron witnesses degradation of picrocrocin to safranal through hydrolysis and reduction of crocin content.

3.1.3. Influence of moisture content on picrocrocin, safranal and crocin

The absorption plot of the saffron samples (Figure 4) indicates that moisture influences the picrocrocin, safranal, and crocin content. With increasing moisture, the amounts of picrocrocin and crocin decrease considerably, while the safranal content increases slightly. High moisture content leads to the degradation of crocin and picrocrocin. This result is in agreement with Koocheki and Sayyedi [42], who proved that crocin and picrocrocin amounts increase with decreasing irrigation levels. Lambert and Karra [41] also demonstrated that there is a significant correlation between water and picorcrocin, safranal, and crocin content. In addition, Aghaei et al. [43] have shown that the drying method, temperature, and their interaction have a significant effect on the crocin, picrocrocin, and safranal content. Fancello et al. [44] have also shown that safranal content is strongly influenced by the drying method. Moreover, the significant influence of the drying method on the picrocrocin content in saffron has been noted by Moratalla-López et al. [45]. According to Mzabri et al. [46] drying is an important step to obtain good-quality saffron, and poor conservation of the species can significantly alter the crocin, picrocrocin, and safranal content.

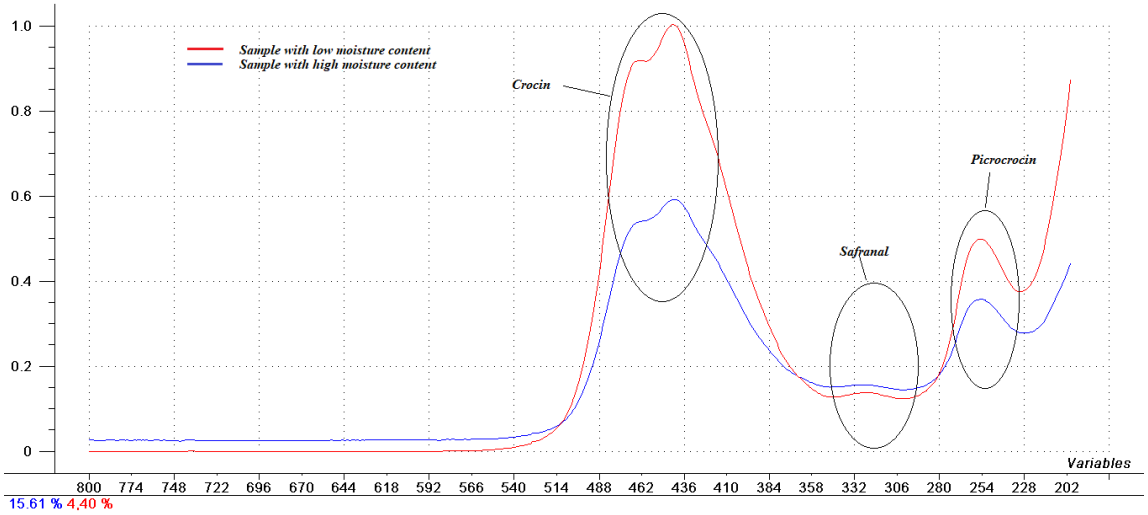


Figure 4: The absorbance value for picrocrocin, safranal, and crocin of saffron sample with 15.61% moisture (blue) and saffron sample with 4.40% moisture (red).

3.1.4. Effect of provenance on the quality of saffron

The quality of saffron from medium-altitude sites in southern Morocco (Taliouine and Taznakht) was compared with that of saffron cultivated in the country's northeastern regions (Table 4). The factors of altitude and moisture content were fixed in order to examine the influence of provenance on the quality of saffron. Figure 5 shows the significant differences in the level of saffron compounds in the samples from three provenances: Khouzama, Serghina, and Assais. No significant difference ($p > 0.05$) was observed between the three provenances in terms of safranal content. Regarding picrocrocin content, a significant difference ($p < 0.05$) was found between Serghina and Assais samples, as well as between Serghina and Khouzama samples, whereas no significant difference was identified between Assais and Khouzama samples. The amounts of picrocrocin and safranal in the samples were similar across the three provenances. However, a significant difference in the crocin content was noted. There was only a slight difference in picrocrocin, safranal, and crocin content between the southern and northeastern regions. Further, the two-way ANOVA demonstrated that provenance does not have a significant effect on saffron quality. This finding can encourage future exploitation of the northeastern regions of Morocco for saffron cultivation. Contrarily, Mzabri et al. [46] found a significant difference in picrocrocin, safranal, and crocin content between the different areas studied (Oujda, Figuig, Lgusirat, Ain Chouater). In addition, Lage and Cantrell [34] et Ghanbari et al. [32] too reported that the amounts of picrocrocin, crocin, and safranal differed significantly across samples from different provenances.

Table 4: The absorbance values of pricocrocin, safranal and crocin as well as moisture content of saffron from different provenance.

Rural Communities	Province	Region	Altitude (m)	Means ± SD			
				Moisture (%)	Picrocrocin $E_{1cm}^{1\%}$257 nm	Safranal $E_{1cm}^{1\%}$330 nm	Crocin $E_{1cm}^{1\%}$440 nm
Serghina	Imouzzer Marmoucha	Fez-Meknes	1989	7.21±1.16	90.47±2.56	35.25±1.92	140.58±2.97
Assais	Taroudant	Souss-Massa	1823	8.23±1.10	96.44±1.70	30.28±1.90	169.45±2.56
Khouzama	Ouarzazate	Drâa-Tafilalet	1801	8.00±1.08	97.58±3.34	29.21±1.36	179.58±3.76

SD: standard deviation.

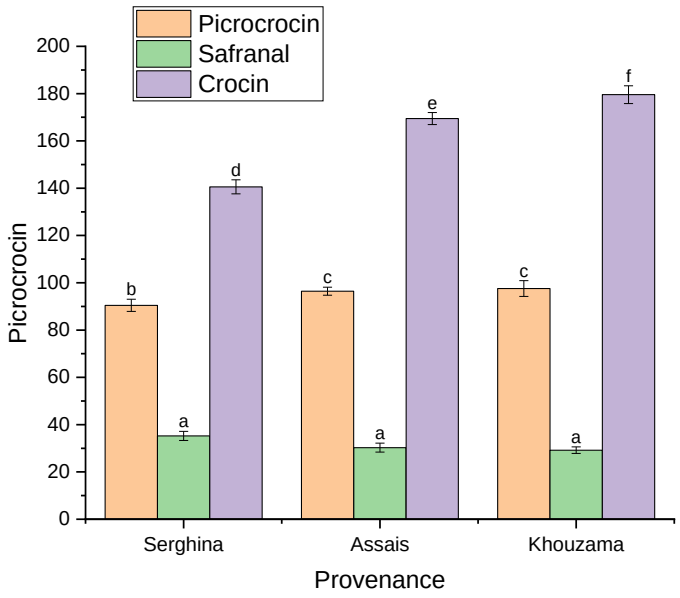


Figure 5: The absorbance values of pricocrocin, safranal and crocin as well as moisture content of saffron at three different provenances. Letters a, b, c, d, e, and f indicated significant differences. Each column with different letters are significantly different (*p <0.05*) according to Tukey test.

3.1.5. Morphological structure of stigmas

A scanning electron microscope was used to explain the effect of provenance and altitude on the morphology of the stigmas in different samples. The morphological structure of saffron stigmas from Taroudante provenance cultivated at different altitudes, as well as that from Imouzzar Marmoucha provenance (Serghina) were determined at a magnification of 200 µm (Figure 6). The structure of the high-altitude stigmas showed the existence of one gland with a diameter of 87.37 µm. In the medium-altitude samples, four glands with an average diameter of 64.9 µm were present. The low-altitude stigmas were composed of three glands with an average diameter of 17.85 µm, while the Serghina stigmas comprised two glands with an average diameter of 76.28 µm – close to the average diameter of the medium-altitude stigmas, thus confirming the ANOVA results.

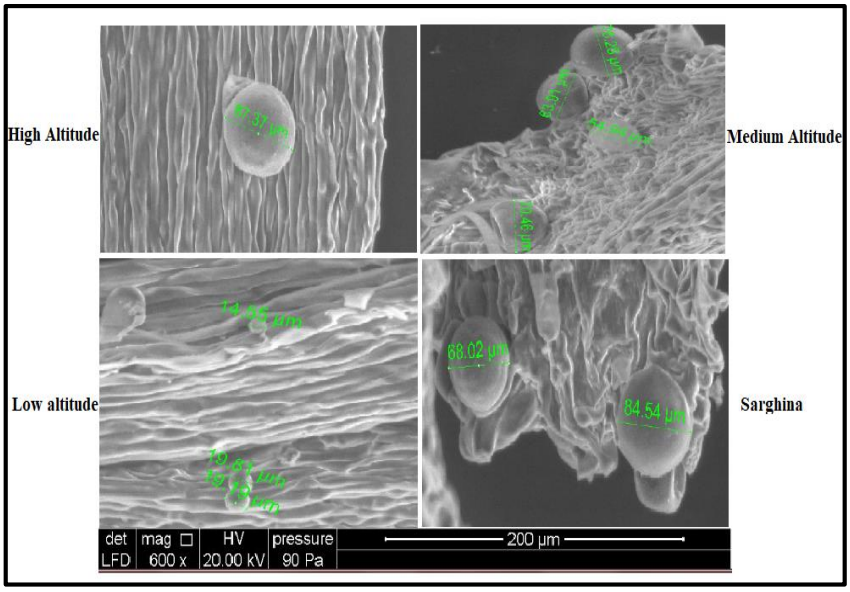


Figure 6: The stigmas morphology structure of the different altitude (high altitude (>2,000 m), medium altitude (1,800-1,700 m), low altitude (<1,600 m) of Taroudante (Assais) sample and Imouzzar Maroucha (Serghina) sample were carried out by Scanning Electron Microscope (SEM).

The difference in the diameters of the glands among samples from different altitudes justifies the variations in the picrocrocin, safranal, and crocin content, confirming the results of the statistical study previously used. This study's results are compatible with those of Ta et al. [47], who illustrated that there are differences between saffron from high altitudes (1400 m) and that from low altitudes (700 m) in terms of chemical composition, size, and number of glands. The differences in the size and number of glands can be explained either by the climatic and environmental conditions, especially the precipitation rate and temperature, or by the drying methods used. Chen et al. [48]revealed that the methods used to dry saffron have a significant effect on the morphological structure of the stigmas. According to the current study's results, altitude is the most important factor influencing the accumulation of active principles in the glands. The higher the altitude, the richer the stigmas are in active principles.

3.2. Principal component analysis:

The PCA analysis was enabled highlighting the differences in the profiles of the samples according to altitude (high, medium, and low), as well as determining the relation between the studied parameters (moisture content, picrocrocin, Safranal, and crocin content, coloring strength, and grade) and the location of saffron cultivation. The correlations of the different parameters studied is shown in a correlation matrix (Table 5). While a positive correlation was found between the picrocrocin, safranal, and crocin content, coloring strength, and grade

(meaning that all variables varied, on average, in the same direction), a negative correlation was found between the moisture content and the amount of crocin, coloring strength, and grade. Some correlations were strong (0.92), such as that been crocin content and grade, and others correlations were moderate (0.66; 0.52). The strong correlation between grade, crocin content, and coloring strength confirmed that the quality of saffron depends on the crocin content. There was a moderate correlation between (a) picrocrocin and crocin content, (b) coloring strength and picrocrocin content, and (c) safranal and picrocrocin content. When the quantity of crocin was high, the picrocrocin quantity was elevated, and when the quantity of safranal content increased with increased picrocrocin content. The negative correlation noted between moisture content, crocin, and coloring strength confirms the influence of moisture content on the secondary metabolites (picrocrocin, crocin, and safranal) reported previously. Thus, the positive correlation between picrocrocin and safranal is probably due to the analysis that was carried out directly after the harvest of the plant without storage (the factor of storage time was not studied) where the amounts of safranal and picrocrocin are high, moreover the decrease of picrocrocin was detected during a long storage time.

Table 5: Correlation matrix between variables of saffron quality.

	Moisture	Picrocrocin	Safranal	Crocine	Coloring strength	Altitude	Grade
Moisture	1.00	-0.13	0.13	-0.51	-0.59	-0.20	-0.51
Picrocrocin	-0.13	1.00	0.66	0.63	0.59	0.12	0.52
Safranal	0.13	0.66	1.00	0.23	0.19	-0.03	0.16
Crocine	-0.51	0.63	0.23	1.00	0.99	0.18	0.92
Coloring strength	-0.59	0.59	0.19	0.99	1.00	0.16	0.91
Altitude	-0.20	0.12	-0.03	0.18	0.16	1.00	0.09
Grade	0.51	0.52	0.16	0.92	0.91	0.09	1.00

Strong correlation (>0.7); Medium correlation (between 0.5-0.6); no correlation (<0.5).

PCA also allowed identifying the existence of correlations (positive and negative) among the three principal compounds of saffron (crocin, picrocrocin, and safranal) characterizing the

quality of saffron at each altitude. The first component (PC1) and the second component (PC2) axes (Figure 7) explained 75% of the variability. The loading graph shows that crocin, coloring strength, and grade had a strong influence on PC1. The moisture content, safranal, and picrocrocin were negatively influenced by PC2, while the altitude was influenced positively by PC2. PC1 explained the high coloring strength and high crocin content in samples cultivated at high altitudes, while the high moisture content in samples from low-altitude regions (Tassoussfi, Taznakht, Ouisslfate, Iznaguen) and the low safranal content in Tassoussfi's saffron were explained by PC2.

Crocin, picrocrocin, safranal, and coloring strength varied in the same direction. However, the moisture content, crocin content, coloring strength, and grade varied in the opposite direction. The biplot graph (Figure 7) shows that saffron cultivated in low-altitude areas (Tassoussfi, Taznakht, Ouisslfate, Iznaguen) was characterized by high moisture content, low quantities of crocin, picrocrocin, and safranal, low coloring strength, and a low grade. In contrast, the saffron produced at high altitudes (Askaoun, Siroua, Taouyalte), followed by that grown at medium altitudes (Khezama, Assais, Agadir Melloul, Zagmouzen), were characterized by low moisture content, large quantities of crocin, picrocrocin, and safranal, higher coloring strength, and a higher grade. The sample of Serghina is close to that of Zagmouzen in the biplot (Figure 7). Therefore, these two samples share with the medium altitude samples the same characteristics. The results of this study are similar to those obtained from the quality tests on saffron samples collected from southern Morocco carried out by Lage and Cantrell [34], who succeeded in proving the presence of a positive correlation between altitude and crocin content. In addition, Mzabri et al. [46] also confirmed the existence of a strong correlation (0.79) between altitude and crocin content, showing altitude to be the strongest factor affecting crocin content. These results are in line with those of the study conducted by Cardone et al. [35], who found a negative correlation between crocin content and rainfall. A positive correlation between crocin and safranal quantity was determined by Fallahi et al. [49], who found that when the safranal content increased in the stigmas, the crocin content increased too. It is well established in the literature that picrocrocin is the precursor of safranal. Degradation of picrocrocin to safranal was observed during a long term storage saffron stigmas [50], or with a high-drying temperature [51], or with the drying methods used [44]. Aghaei et al. [43] also were reported that drying Methods and their interaction affected picrocrocin, safranal, and crocin content significantly. Carmona et al. [52] were shown that the level of safranal precursors increases with thermal

treatment, while picrocrocin disappears rather than increases with similar treatments. From the previous results obtained, it can also be concluded that the quality of saffron is affected by the altitude and not by the provenance: High-altitude regions produce saffron of the best quality, followed by medium-altitude areas and then low-altitude regions, where the lowest quality of saffron is cultivated.

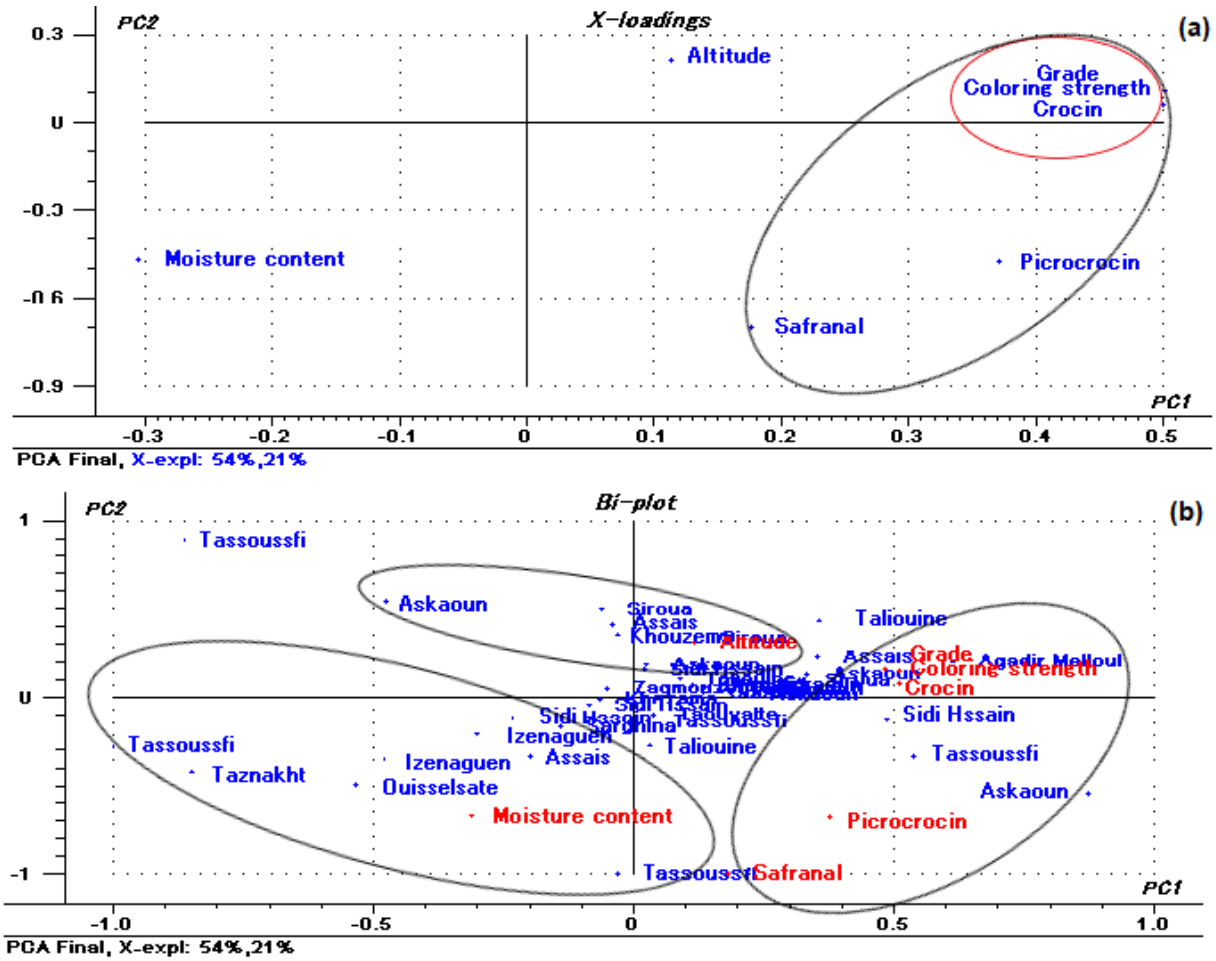


Figure 7: Principal component analyses of saffron quality in regards to the harvesting site. (a): Loading plot of the projection of the variables in the factorial design; (b): Biplot of the projection of the variables on the individuals (the harvesting sites) in the factorial design.

3.3. Partial least square regression

PLS regression consists of regressing the variable Y to be predicted on predictive X variables; the Y variable in our study was the coloring strength, the X variables being the UV-visible spectral data. This method was used in this study to develop a preliminary model to predict the coloring strength of saffron samples based on their absorbances. Projection of the absorbances of picrocrocin, safranal, and crocin on the coloring strength (Figure 8) indicated that a coloring strength exceeding 235 was only found at high and medium altitudes. Samples with a coloring

strength between 113 and 200 were found across high-, medium-, and low-altitude sites, while those with a coloring strength under 100 were produced solely in low-altitude regions.

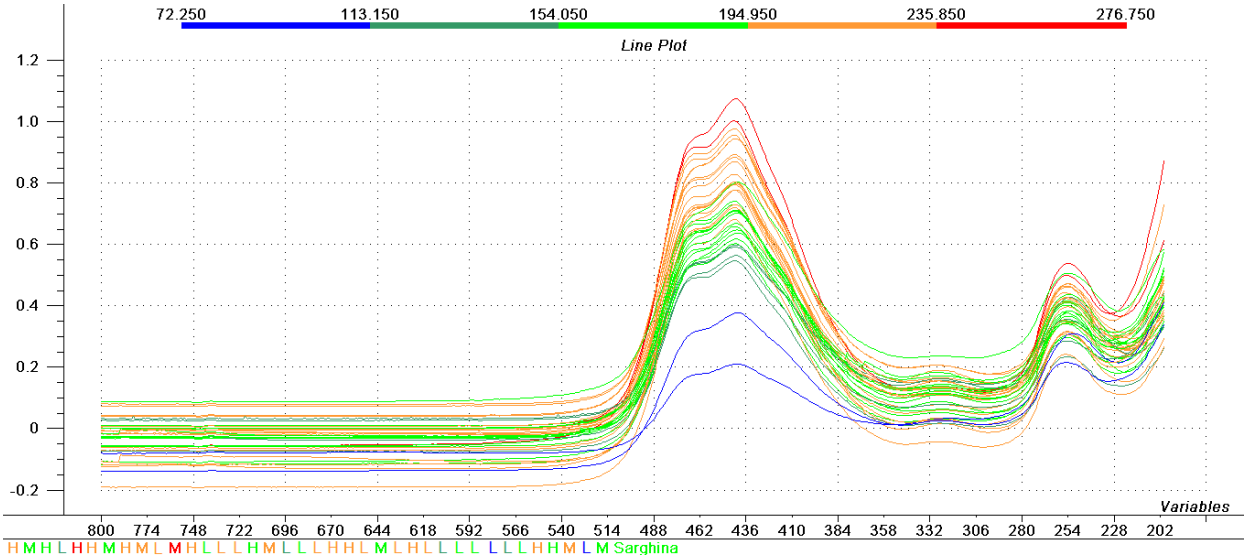


Figure 8: Projection of UV-visible spectral data on coloring strength. H: high altitude (>2,000 m); M: medium altitude (1,800-1,700 m); L: low altitude (<1,600 m).

Figure 9 illustrates the plotting of U scores of Y (coloring strength) against the T scores of X (UV-visible spectral data) in order to maximize the correlation between them. According to the calculation of the PCs of X and Y, the correlation between U and T scores improved in two PCs. The first component explained 72% of the Xs and 41% of the Ys (Figure 9 [a]), the second component explained 22% of the Xs and 55% of the Ys (Figure 9 [b]), the third component explained 4% of the Xs and only 1% of the Ys (Figure 9 [c]), and the fourth component explained 1% of the Xs and 0% of the Ys (Figure 9 [d]). The best preliminary model for prediction was the one with two components (PC1 and PC2) where 94% of the Xs explained 96% of the Ys (Figure 9 [b]). The results thus show that two components can explain the data set.

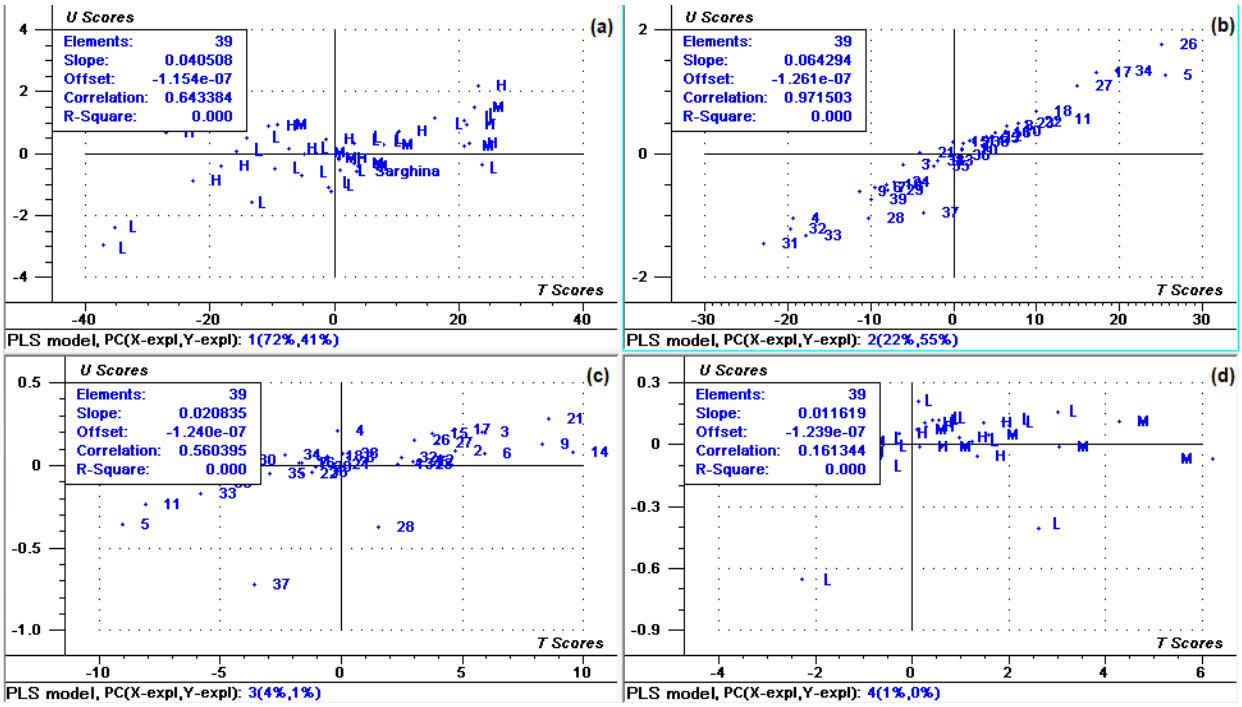


Figure 9: The graphical representation of scores U of the Y versus scores T of the X of 4 PLS preliminary models. (a-d) PLS preliminary model with 1 PCs; PLS preliminary model with 2 PCs; PLS preliminary model with 3 PCs; PLS preliminary model with 4 PCs.

To characterize the quality of the preliminary models, their coefficients of determination (R^2) and root-mean-square errors (*RMSE*s) were calculated. *RMSE* characterizes the amount of errors present in a preliminary model; a valid model must have a small RMSE value and an R2 value greater than 80%. Figure 10 shows the measured versus predicted values of the PLS preliminary models; the predicted values were found to display linearity. The proposed preliminary model (bleu model) is therefore satisfactory with regard to the selected response, with R^2 = 96.71% and *RMSE* = 7.11 for two components (PCs), and thus suitable to predict the coloring strength from the absorbances calculated using PLS.

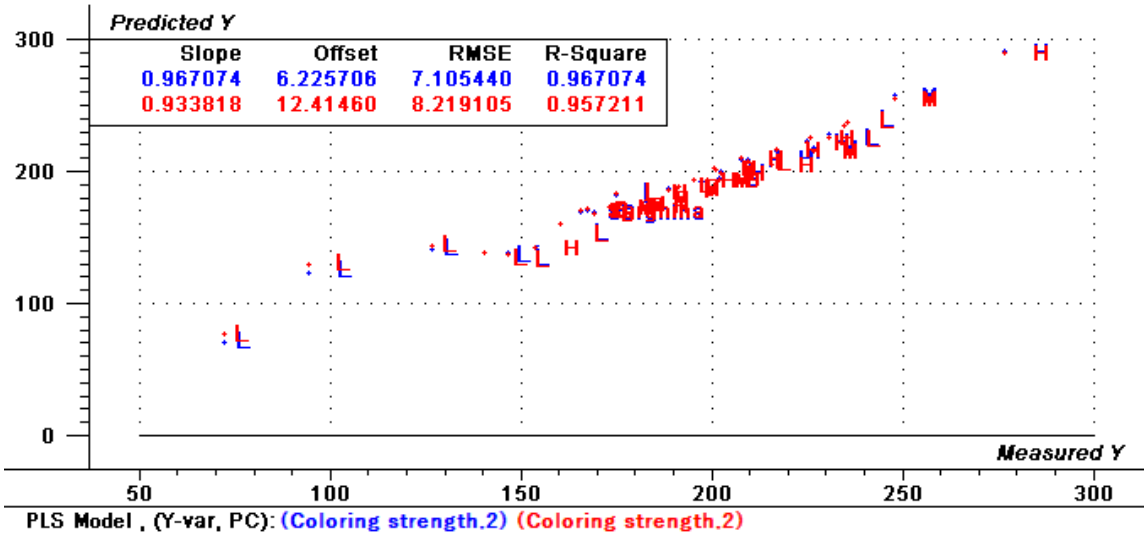


Figure 10: Plot of measured values according to the predicted values obtained from PLS preliminary models.

A cross-validation tool was used to examine the predictive capacity of the proposed preliminary model. The calibration preliminary model was calculated using two-thirds of the data set. In addition, one-third of the data set was utilized to construct the validation preliminary model. After the PLS regression preliminary model was developed, it was verified in the test set (validation). The calibration and validation preliminary models for the spectral data are illustrated in Figure 11. The PLS preliminary model presented a satisfactory predictive capacity, with R^2 = 96.38%, a small prediction error value (*RMSE* = 5.86), good correlation (0.99), and a bias of 0.14. Thus, it can be concluded that the preliminary model developed for evaluating the coloring strength was able to make accurate predictions.

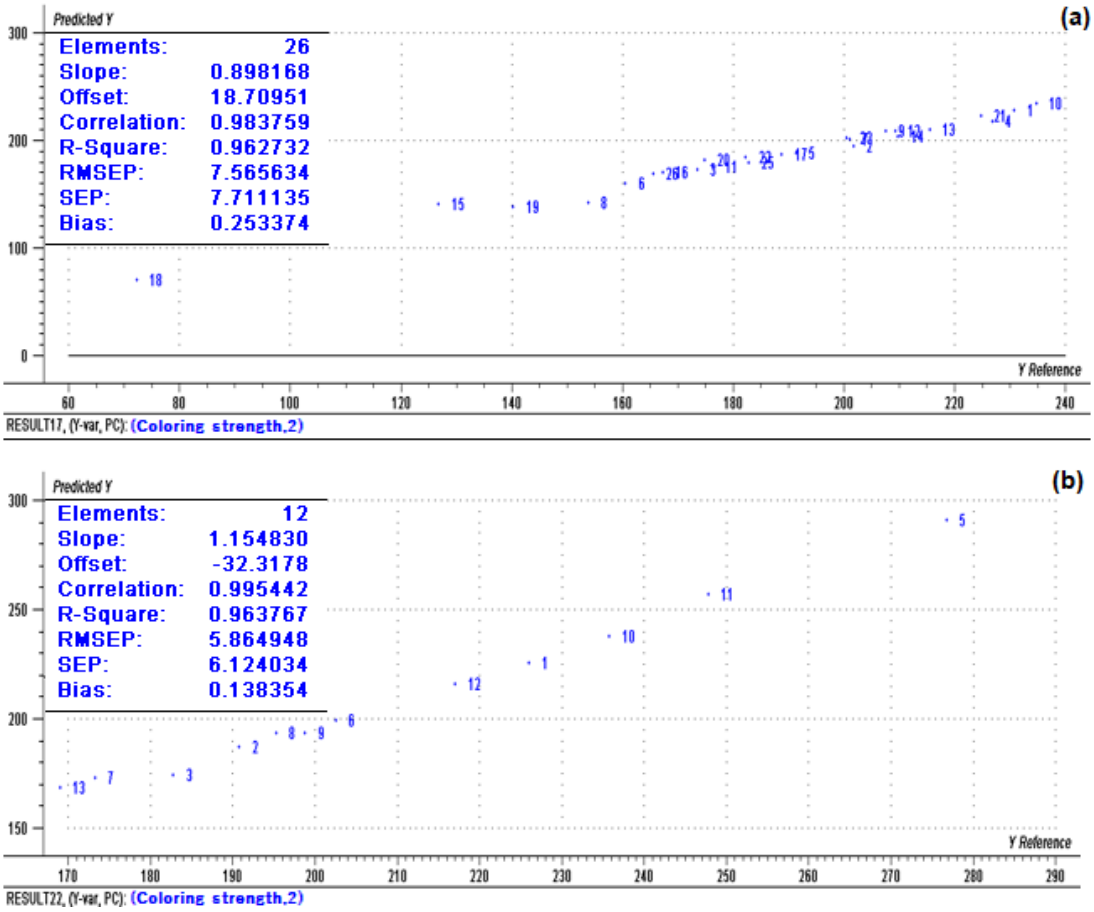


Figure 11: Plot of measured values according to the predicted values obtained from Calibration and Validation preliminary model. (a): Calibration preliminary model; (b): Validation preliminary model.

PLS regression allowed developing a mathematical preliminary model to predict the coloring strength based on the absorbances of picrocrocin, safranal, and crocin. This preliminary model has been validated and is ready for making predictions on other saffron samples in these studied areas. Therefore, the results obtained was very encouraging for a future construction of a strong and a representative PLS prediction model through using different samples in other regions of Morocco such as, the Eastern (Taza-Oujda), Fez-Meknes, and Beni Mellal-khenifra regions which are characterised by a climate similar to that of the regions of Souss Massa and Draa Tafilalte.

4. Conclusion

In this work, we investigated the quality of saffron cultivated in southern regions of Morocco (Taliouine and Tazenakhet area). The highest amount of moisture content appeared in saffron samples gathered from low-altitude sites, while the greatest amounts of safranal, crocin, and picrocrocin were seen in samples obtained from high-altitude regions, followed by those from

medium-altitude sites. Comparison between two saffron samples (with 15.61% and 4.40% moisture content) showed that moisture content affects the quantity of safranal, crocin, and picrocrocin. Further, the statistical analysis showed that there was no significant influence of provenance on the quality of saffron. The study of the morphological structure of saffron stigmas from different altitudes showed that those from high-altitude areas had more glands than those from regions at the other two altitude levels. The results of the PCA and two-way ANOVA confirmed the strong link between altitude and saffron quality. PCA enabled identifying a strong positive correlation between grade, crocin content and coloring strength confirmed that the quality of saffron depends on the crocin content. A slight negative correlation was noted among (a) moisture content, and coloring strength as well as (b) moisture content and crocin indicated the influence of moisture content on the quality of saffron. The PLS regression enabled to create a preliminary model to predict the coloring strength of saffron samples based on their absorbances in these studied areas. The results of the study can be used to develop optimal conditions for saffron cultivation in order to improve the production and quality of this precious species.

References

[1] M. Behnassi, S. A.Shahid, and N. Mintz-habib, *Science, Policy and Politics of Modern Agricultural System*. Springer Netherlands, 2014.

[2] H. Benjlil *et al.*, "Plant-parasitic nematodes parasitizing saffron in Morocco: Structuring drivers and biological risk identification," *Appl. Soil Ecol.*, vol. 147, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.apsoil.2019.103362.

[3] M. Rimani, I. Mzabri, Z. Chafik, and A. Berrichi, "ScienceDirect Weeds flora associated with Saffron (Crocus sativus L.) in Morocco," 2019. [Online]. Available: www.sciencedirect.com.

[4] R. Rocchi *et al.*, "Comparison of IRMS, GC-MS and E-Nose data for the discrimination of saffron samples with different origin, process and age," *Food Control*, vol. 106, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106736.

[5] S. I. Bukhari, M. Manzoor, and M. K. Dhar, "A comprehensive review of the pharmacological potential of Crocus sativus and its bioactive apocarotenoids," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 98. Elsevier Masson SAS, pp. 733–745, Feb. 01, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.090.

[6] S. Ehsan Falahat, H. Hadi, S. Siavash Moghaddam, and A. Aryanfar, "Exploring cultivation site of saffron (Crocus sativus L.) by utilizing GIS linked to AHP," *Spat. Inf. Res.*, vol. 27, no. 3, pp. 285–293, Jun. 2019, doi: 10.1007/s41324-018-00234-0.

[7] F. Gresta, M. Lombardo, L. Siracusa, and G. Ruberto, "Saffron, an alternative crop for sustainable agricultural systems. A review," *Agron. Sustain. Dev.*, vol. 28, no. 1, pp. 95–112, 2008, doi: 10.1051/agro:2007030.

[8] M. D. L. de Castro and R. Quiles-Zafra, "Appropriate use of analytical terminology – examples drawn from research on saffron," *Talanta Open*, vol. 2, p. 100005, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.talo.2020.100005.

[9] L. Cardone, D. Castronuovo, M. Perniola, N. Cicco, and V. Candido, "Saffron (Crocus sativus L.), the king of spices: An overview," *Scientia Horticulturae*, vol. 272. Elsevier B.V., Oct. 15, 2020, doi: 10.1016/j.scienta.2020.109560.

[10] S. Chaouqi, N. Moratalla-López, M. Lage, C. Lorenzo, G. L. Alonso, and T. Guedira, "Effect of drying and storage process on Moroccan saffron quality," *Food Biosci.*, vol. 22, pp. 146–153, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.fbio.2018.02.003.

[11] A. Bahrami, S.-S. Mirmohammadsadegh, S.-F. Zare-Hoseini, R. Mousavi-Tabari, and S. Saket, "Saffron in the ancient history of Iran," in *Saffron*, Elsevier, 2020, pp. 23–34.

[12] A. Khoulati *et al.*, "Saffron extract stimulates growth, improves the antioxidant components of Solanum lycopersicum L., and has an antifungal effect," *Ann. Agric. Sci.*, vol. 64, no. 2, pp. 138–150, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.aoas.2019.10.002.

[13] L. Neri *et al.*, "Pulsed electric fields (PEF) as hot air drying pre-treatment: Effect on quality and functional properties of saffron (Crocus sativus L.)," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 67, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.ifset.2020.102592.

[14] Z. Khorasanchi *et al.*, "Crocus sativus a natural food coloring and flavoring has potent anti-tumor properties," *Phytomedicine*, vol. 43. Elsevier GmbH, pp. 21–27, Apr. 01, 2018, doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.041.

[15] S. Patel, M. Sarwat, and T. H. Khan, "Mechanism behind the anti-tumour potential of saffron (Crocus sativus L.): The molecular perspective," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 115. Elsevier Ireland Ltd, pp. 27–35, Jul. 01, 2017, doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.04.010.

[16] M. H. J. Bonyadi, S. Yazdani, and S. Saadat, "The ocular hypotensive effect of saffron extract in primary open angle glaucoma: A pilot study," *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 14, no. 1, 2014, doi: 10.1186/1472-6882-14-399.

[17] S. Ghaffari and N. Roshanravan, "Saffron; An updated review on biological properties with

special focus on cardiovascular effects," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 109. Elsevier Masson SAS, pp. 21–27, Jan. 01, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.031.

[18] O. Mykhailenko, V. Kovalyov, O. Goryacha, L. Ivanauskas, and V. Georgiyants, "Biologically active compounds and pharmacological activities of species of the genus Crocus: A review," *Phytochemistry*, vol. 162. Elsevier Ltd, pp. 56–89, Jun. 01, 2019, doi: 10.1016/j.phytochem.2019.02.004.

[19] K. I. Avgerinos, C. Vrysis, N. Chaitidis, K. Kolotsiou, P. G. Myserlis, and D. Kapogiannis, "Effects of saffron (Crocus sativus L.) on cognitive function. A systematic review of RCTs," *Neurological Sciences*, vol. 41, no. 10. Springer, pp. 2747–2754, Oct. 01, 2020, doi: 10.1007/s10072-020-04427-0.

[20] M. Saeedi and A. Rashidy-Pour, "Association between chronic stress and Alzheimer's disease: Therapeutic effects of Saffron," *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 133. Elsevier Masson s.r.l., Jan. 01, 2020, doi: 10.1016/j.biopha.2020.110995.

[21] E. Tamaddonfard *et al.*, "Safranal, a constituent of saffron, exerts gastro-protective effects against indomethacin-induced gastric ulcer," *Life Sci.*, vol. 224, pp. 88–94, May 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2019.03.054.

[22] M. Shafiee, S. Arekhi, A. Omranzadeh, and A. Sahebkar, "Saffron in the treatment of depression, anxiety and other mental disorders: Current evidence and potential mechanisms of action," *Journal of Affective Disorders*, vol. 227. Elsevier B.V., pp. 330–337, Feb. 01, 2018, doi: 10.1016/j.jad.2017.11.020.

[23] E. Mirhadi, H. Nassirli, and B. Malaekeh-Nikouei, "An updated review on therapeutic effects of nanoparticle-based formulations of saffron components (safranal, crocin, and crocetin)," *Journal of Pharmaceutical Investigation*, vol. 50, no. 1. Springer, pp. 47–58, Jan. 01, 2019, doi: 10.1007/s40005-019-00435-1.

[24] M. Koşar and K. Hüsnü Can Başer, "Beneficial Effects of Saffron (Crocus sativus L.) in Ocular Diseases," in *Saffron: The Age-Old Panacea in a New Light*, Elsevier, 2020, pp. 155–161.

[25] M. Hashemi and H. Hosseinzadeh, "A comprehensive review on biological activities and toxicology of crocetin," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 130. Elsevier Ltd, pp. 44–60, Aug. 01, 2019, doi: 10.1016/j.fct.2019.05.017.

[26] S. Li, Q. Shao, Z. Lu, C. Duan, H. Yi, and L. Su, "Rapid determination of crocins in saffron by near-infrared spectroscopy combined with chemometric techniques," *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 190. Elsevier B.V., pp. 283–289, Feb. 05, 2017, doi: 10.1016/j.saa.2017.09.030.

[27] T. Shahi, E. Assadpour, and S. M. Jafari, "Main chemical compounds and pharmacological activities of stigmas and tepals of 'red gold'; saffron," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 58. Elsevier Ltd, pp. 69–78, Dec. 01, 2016, doi: 10.1016/j.tifs.2016.10.010.

[28] "Administrative Division of Morocco. Ministry of NationalPlanning, Urban Development, Housing and Urban Policy.," *High Comm. Plan, Morocco*, 2018, [Online]. Available: www.hcp.ma.

[29] S. Heydari and G. H. Haghayegh, "Extraction and Microextraction Techniques for the Determination of Compounds from Saffron," *Can. Chem. Trans.*, pp. 221–247, Apr. 2014, doi: 10.13179/canchemtrans.2014.02.02.0097.

[30] S. Chaouqi, N. Moratalla-López, M. Lage, C. Lorenzo, G. L. Alonso, and T. Guedira, "Effect of drying and storage process on Moroccan saffron quality," *Food Biosci.*, vol. 22, no. September 2017, pp. 146–153, 2018, doi: 10.1016/j.fbio.2018.02.003.

[31] J. Ghanbari, G. Khajoei-Nejad, S. W. Erasmus, and S. M. van Ruth, "Identification and characterisation of volatile fingerprints of saffron stigmas and petals using PTR-TOF-MS: Influence of nutritional treatments and corm provenance," *Ind. Crops Prod.*, vol. 141, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111803.

[32] J. Ghanbari, G. Khajoei-Nejad, and S. M. van Ruth, "Effect of saffron (Crocus sativus L.) corm provenance on its agro-morphological traits and bioactive compounds," *Sci. Hortic. (Amsterdam).*, vol. 256, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.scienta.2019.108605.

[33] L. H. Atyane *et al.*, "Study of the influence of geographical origin and environment conditions on the three secondary metabolites of Moroccan saffron by UV-visible spectrometry," in *Acta Horticulturae*, Nov. 2017, vol. 1184, pp. 267–272, doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1184.38.

[34] M. Lage and C. L. Cantrell, "Quantification of saffron (Crocus sativus L.) metabolites crocins, picrocrocin and safranal for quality determination of the spice grown under different environmental Moroccan conditions," *Sci. Hortic. (Amsterdam).*, vol. 121, no. 3, pp. 366–373, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.scienta.2009.02.017.

[35] L. Cardone, D. Castronuovo, M. Perniola, N. Cicco, and V. Candido, "Evaluation of corm origin and climatic conditions on saffron (Crocus sativus L.) yield and quality," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 99, no. 13, pp. 5858–5869, Oct. 2019, doi: 10.1002/jsfa.9860.

[36] M. Vahedi, M. Kabiri, S. A. Salami, H. Rezadoost, M. Mirzaie, and M. R. Kanani, "Quantitative HPLC-based metabolomics of some Iranian saffron (Crocus sativus L.) accessions," *Ind. Crops Prod.*, vol. 118, pp. 26–29, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.03.024.

[37] S. Parizad *et al.*, "The effects of geographical origin and virus infection on the saffron (Crocus sativus L.) quality," *Food Chem.*, vol. 295, pp. 387–394, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.116.

[38] N. Jami, A. Rahimi, M. Naghizadeh, and E. Sedaghati, "Investigating the use of different levels of Mycorrhiza and Vermicompost on quantitative and qualitative yield of saffron (Crocus sativus L.)," *Sci. Hortic. (Amsterdam).*, vol. 262, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.scienta.2019.109027.

[39] M. Jalali-Heravi, H. Parastar, and H. Ebrahimi-Najafabadi, "Self-modeling curve resolution techniques applied to comparative analysis of volatile components of Iranian saffron from different regions," *Anal. Chim. Acta*, vol. 662, no. 2, pp. 143–154, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.aca.2010.01.013.

[40] M. Torki-Harchegani, D. Ghanbarian, V. Maghsoodi, and A. Moheb, "Infrared thin layer drying of saffron (Crocus sativus L.) stigmas: Mass transfer parameters and quality assessment," *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 25, no. 4, pp. 426–432, Apr. 2016, doi: 10.1016/j.cjche.2016.09.005.

[41] A. Lambert and Y. Karra, "Influence of soil composition and drying methods on chemical and physical quality evaluation of saffron," in *Acta Horticulturae*, Nov. 2017, vol. 1184, pp. 165–172, doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1184.24.

[42] A. Koocheki and M. / Sayyedi, "Effects of Different Water Supply and Corm Planting Density on Crocin, Picrocrocin and Safranal, Nitrogen Uptake and Water Use Efficiency of Saffron Grown in Semi-Arid Region," *Not Sci Biol*, vol. 8, no. 3, pp. 334–341, 2016, doi: 10.15835/nsb.8.3.9855.

[43] Z. Aghaei, S. M. Jafari, and D. Dehnad, "Effect of Different Drying Methods on the Physicochemical Properties and Bioactive Components of Saffron Powder," *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 74, no. 2, pp. 171–178, Jun. 2019, doi: 10.1007/s11130-019-00729-7.

[44] F. Fancello, G. Petretto, M. L. Sanna, G. Pintore, M. Lage, and S. Zara, "Isolation and characterization of microorganisms and volatiles associated with Moroccan saffron during different processing treatments," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 273, pp. 43–49, May 2018, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.014.

[45] M. V. García-Rodríguez, N. Moratalla-López, H. López-Córcoles, and G. L. Alonso, "SAFFRON QUALITY OBTAINED UNDER DIFFERENT FORCING CONDITIONS, CONSIDERING VARIOUS VEGETATIVE STAGES OF CORMS," *Sci. Hortic.*

(Amsterdam)., vol. 277, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.scienta.2020.109811.

[46] I. Mzabri *et al.*, "ScienceDirect The Agro-morphological behavior of saffron under the environmental conditions of four areas in Eastern Morocco," 2019. [Online]. Available: www.sciencedirect.com.

[47] Y. Ta, F. Zarinkamar, S. Tajik, and S. Soleimanpour, "Effects of altitude on anatomy and concentration of crocin, picrocrocin and safranal in Crocus sativus L Some of the authors of this publication are also working on these related projects: effect of salicylic acid on phenolic compounds and antioxidant activity of saffron organs View project Effects of altitude on anatomy and concentration of crocin, picrocrocin and safranal in Crocus sativus L," 2011. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/259863928.

[48] D. Chen *et al.*, "Effects of different drying methods on appearance, microstructure, bioactive compounds and aroma compounds of saffron (Crocus sativus L.)," *Lwt*, vol. 120, no. November 2019, p. 108913, 2020, doi: 10.1016/j.lwt.2019.108913.

[49] H. R. Fallahi, M. Aghhavani-Shajari, H. Sahabi, M. A. Behdani, M. H. Sayyari-Zohan, and S. Vatandoost, "Influence of some pre and post-harvest practices on quality of saffron stigmata," *Sci. Hortic. (Amsterdam).*, vol. 278, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.scienta.2020.109846.

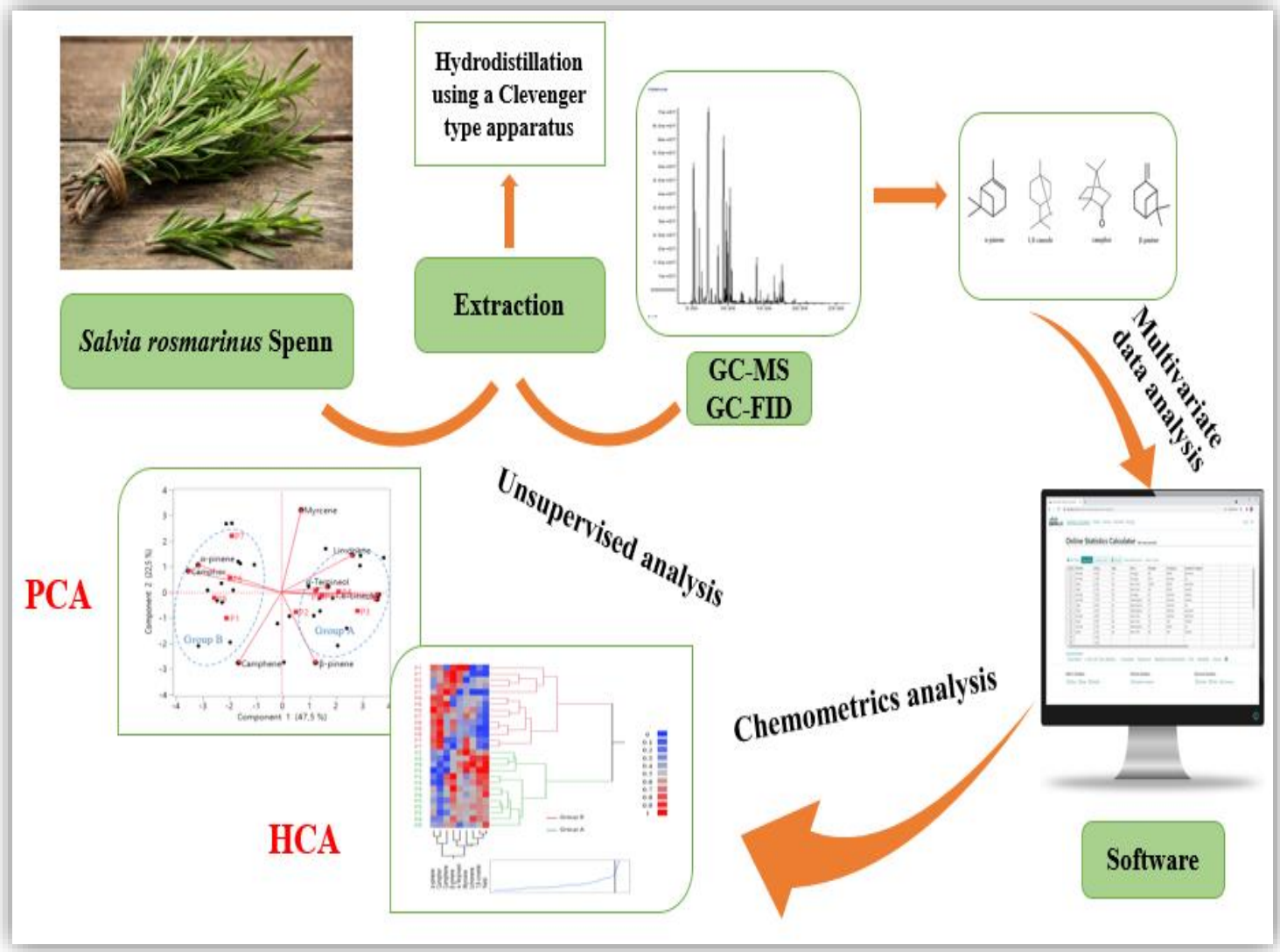
[50] L. Maggi *et al.*, "Changes in saffron volatile profile according to its storage time," *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 5, pp. 1329–1334, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.foodres.2010.03.025.

[51] Y. Tong *et al.*, "The influence of different drying methods on constituents and antioxidant activity of saffron from China," *Int. J. Anal. Chem.*, vol. 2015, 2015, doi: 10.1155/2015/953164.

[52] M. Carmona, A. Zalacain, M. R. Salinas, and G. L. Alonso, "Generation of Saffron Volatiles by Thermal Carotenoid Degradation," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 18, pp. 6825–6834, Sep. 2006, doi: 10.1021/jf0612326.

Article II.

Etude chimiométrique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Salvia rosmarinus* Spenn



ARTICLE II

Etude chimiométrique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Salvia rosmarinus Spenn

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans Molecules : [Q1] et [FI=4.927]

ANNEMER, Saoussan, FARAH, Abdellah, STAMBOULI, Hamid, *et al.* Chemometric Investigation and Antimicrobial Activity of Salvia rosmarinus Spenn Essential Oils. *Molecules*, 2022, vol. 27, no 9, p. 2914.

Résumé

Au Maroc, les plantes aromatiques et médicinales représentent une catégorie importante des produits forestiers non ligneux. Ces produits englobent une large gamme de produits qui existent à l'état spontané, à savoir *Salvia rosmarinus* Spenn qui est une plante largement consommée en art culinaire, a aussi des vertus thérapeutiques. Pour assurer une meilleure production et une gestion durable des ressources naturelles, une enquête chimiométrique a été menée pour examiner l'effet des périodes de coopérative et de récolte sur les rendements et les compositions chimiques des huiles essentielles de *Salvia rosmarinus* Spenn dans la région de l'Oriental au Maroc. Les échantillons ont été collectés dans trois coopératives sur neuf périodes de janvier 2018 à avril 2019. La composition chimique des huiles essentielles de *Salvia rosmarinus* Spenn a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les données de cette étude ont été traitées par des analyses multivariées, notamment l'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse en classification hiérarchique (ACH). La technique de diffusion sur disque et une détermination de la concentration minimale inhibitrice ont été réalisées pour étudier leurs propriétés antibactériennes. L'analyse statistique a montré que la coopérative et la période de récolte ont un effet significatif sur les rendements. Le rendement le plus élevé en huile essentielle a été enregistré en avril 2019 au niveau de la coopérative C1. Les résultats de l'ACP et de l'ACH ont été divisés en deux groupes : Le groupe A pour la période été et le groupe B pour la période hiver. Les échantillons collectés pendant l'été ont été caractérisés par une quantité élevée de composant 1,8-cinéole et un rendement élevé en huile essentielle, tandis que les échantillons collectés pendant l'hiver ont été qualifiés par une quantité élevée de composant α-pinène et un faible rendement en huile essentielle. L'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Salvia rosmarinus Spenn*, a montré que *Mycobacterium smegmatis* ATCC23857 et *Bacillus subtilis*

ATCC 23857 sont les souches les plus sensibles, arrêtant la croissance à 1/500 (v/v). La souche la moins sensible est *Escherichia coli* ATCC25922, avec une valeur de CMI correspondant à 1/250 (v/v). Les résultats de cette étude pourraient avoir un impact économique positif sur l'exploitation du romarin dans la région de l'Oriental, en particulier pendant les meilleures périodes de récolte, car ils indiquent comment obtenir les meilleurs rendements des huiles les plus riches en 1,8-cinéole et en α-pinène.

ARTICLE II

Chemometric investigation and antimicrobial activity of *Salvia rosmarinus* Spenn essential oils

Saoussan Annemer [1], Abdellah Farah [1], Hamide Stambouli [2], Amine Assouguem [1,*], Mikhlid H. Almutairi [3], Amany A. Sayed [4], Ilaria Peluso [5], Taoufik Bouayoun [2], Nehal Ahmed Talaat Nouh [6], Abdelhakim El Ouali Lalami [1,7] and Yassine Ez zoubi [1,8]

[1]Laboratory of Applied Organic Chemistry, Faculty of Sciences and Techniques, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fez B.P. 2202, Morocco;

[2]Institute of Forensic Sciences of Gendarmerie Royal, Rabat-Institute, B.P. 6597, Morocco

[3]Department of Zoology, College of Science, King Saud University, P.O. Box 2455, Riyadh 11451, Saudi Arabia

[4]Zoology Department, Faculty of Science, Cairo University, Giza 12613, Egypt

[5]Research Centre for Food and Nutrition, Council for Agricultural Research and Economics (CREA-AN), Rome, Italy

[6]Inpatient Pharmacy, Mansoura University Hospitals, Mansoura 35516, Egypt

[7]Higher Institute of Nursing Professions and Health Techniques, Regional Health Directorate, EL Ghassani Hospital, Fez 30000, Morocco

[8]Biotechnology, Environmental Technology and Valorization of Bio-Resources Team, Department of Biology, Faculty of Sciences and Techniques Al-Hoceima, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco

Correspondence: Amine Assouguem, Faculty of Sciences and Techniques, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Morocco

Email: assougam@gmail.com

Abstract: To ensure the better production and sustainable management of natural resources, a chemometric investigation was conducted to examine the effect of cooperative and harvesting periods on the crop yields and chemical compositions of *Salvia rosmarinus* Spenn essential oils in the Oriental region of Morocco. The samples were collected from three cooperatives over nine time periods from January 2018 to April 2019. The chemical composition of *Salvia rosmarinus* Spenn essential oils was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The data from this study were processed by multivariate analyses, including principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). The disc diffusion technique and a determination of the minimal inhibitory concentration were performed to study

the antibacterial properties of the oils. Statistical analysis showed that the cooperative and harvest period have a significant effect on yields. The highest yield of essential oil was recorded in April 2019 at cooperative C1. The PCA and the HCA results were divided into two groups: Group A for the summer season and group B for the winter season. The samples collected during summer were characterized by a high amount of 1,8-cineole component and a high yield of essential oil, whereas the samples collected during winter were qualified by a high amount of α-pinene component and a low yield of essential oil. The antibacterial activity of *Salvia rosmarinus* Spenn essential oils showed that *Mycobacterium smegmatis* ATCC23857 and *Bacillus subtilis* ATCC 23857 are the most susceptible strains, stopping growth at 1/500 (v/v). The least susceptible strain is *Escherichia coli* ATCC25922, with an MIC value corresponding to 1/250 (v/v). The findings of this study could have a positive economic impact on the exploitation of rosemary in the Oriental region, especially during the best harvest periods, as they indicate how to obtain the best yields of oils richest in 1,8-cineole and α-pinene chemotypes.

Keywords: antibacterial activity; chemical composition; chemometric investigation; hierarchical cluster analysis; principal components analysis; *Salvia rosmarinus* Spenn

1. Introduction

Due to its geographical position and bioclimatic diversity, Morocco offers a rich, varied flora. It has 800 species of aromatic and medicinal plants alone [1], of which 100 species are exported as dried herbs [2]. Morocco, classified as the twelfth largest exporter of medicinal and aromatic plants in the world, still has considerable untapped potential. The Oriental region is home to the highest proportion of medicinal and aromatic plants exploited in the country, followed by the Fez-Meknes region [3].

Rosmarinus officinalis L. is popularly known as rosemary and, recently, a *Salvia rosmarinus* Spenn (*S. rosmarinus*), which belongs to the Lamiaceae family [4], grows best in hot climates, requires light and heat, and moderately tolerates drought. It is grown in withered, subhumid regions [2]. Rosemary is native to the Mediterranean regions from Spain to the Balkans and into North Africa [5]. In Morocco, rosemary is presented in the High and the Middle Atlas Mountains and the Oriental and the Rif regions [6]. However, it is rarely found in the western part of the country [1]. The Oriental region contains the largest amount of rosemary in the

country [7]. Figuig Province holds 57% of rosemary resources, followed by Taourirt and Jerada [8]. Talsint commune produces more than 71% of the rosemary in Figuig [9].

The essential oil of rosemary is known by its chemical composition, which has beneficial properties. It is applied to cure several diseases, such as diseases related to inflammation [10], cancer [11], diabetes [12], cardiovascular diseases [13], and Alzheimer's [14]. It is used for the treatment of respiratory and inflammatory diseases [15] due to the presence of the 1,8-cineole compound. Rosemary essential oil is also renowned for its antimicrobial activity [10,16], and this activity is associated with major chemical compounds of essential oil (1,8-cineole and α-pinene) [17]. The 1,8-cineole and α-pinene compounds are known for their antimicrobial activity against some microorganisms, such as *Bacillus subtilis* (Gram-positive), *Escherichia coli* (Gram-negative) [18] and *Mycobacterium smegmatis* (Gram-positive) [19]. Rosemary is used in the food industry as a preservative agent [20] and in cosmetics [4] as a stimulating and brightening agent [21], as well as a skin conditioning agent [22]. In Eastern Morocco, the production of rosemary generates about 81,000 days of work per year, with an equivalent value of $500,000 US. Through cooperatives located in Figuig, Taourirt, and Jerrada, the region has succeeded in building on its experience in this sector to enhance it into a source of richness for people by applying new cultivation methods for rosemary fields and adding new species from Asian countries [23].

The objective of this study was to compare the yield of 27 samples of rosemary essential oils and develop PCA and HCA methods to contribute to the knowledge of the effect of the harvest period and the cooperative on the yield and chemical quality of EOs from *S. rosmarinus*.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

The aerial parts of *Salvia rosmarinus* Spenn (*S. rosmarinus*) were collected from three cooperatives (Table 4) located in the Figuig Province in the Oriental region of Morocco (Figure 7). *S. rosmarinus* plants were collected from wild populations during nine periods from January 2018 to April 2019 (P1: January 2018, P2: March 2018, P3: May 2018, P4: July 2018, P5: September 2018, P6: October 2018, P7: December 2018, P8: February 2019, P9: April 2019) on the same day from the three cooperatives. Botanical identification was carried out by Professor Ghanmi Mohammed (a former researcher at the Forestry Research Center, Rabat, Morocco). The variables studied were the average percentage yield and the chemical composition of essential oils of the plant for each harvest period and cooperative.

Table 1: The localization, and the coordinates of the samples from the three cooperatives.

Cooperative	Rural Communities	Province	Region	Altitude (m)	Latitude N	Longitude W	Maximal Annual Mean Temperature (°C)	Minimal Annual Mean Temperature (°C)	Annual Mean Precipitation (mm)
C1	Talsint	Figuig	Oriental	1 332	32°32′7.8	3°26′22.1	26.0	13.8	140.0
C2	Boumeriem	Figuig	Oriental	1025	33°42′56.2	4°36′5.4	21.3	8.6	184.2
C3	Talsint	Figuig	Oriental	1760	32°38′39.8	3°29′4.6	20.1	7.8	156.9

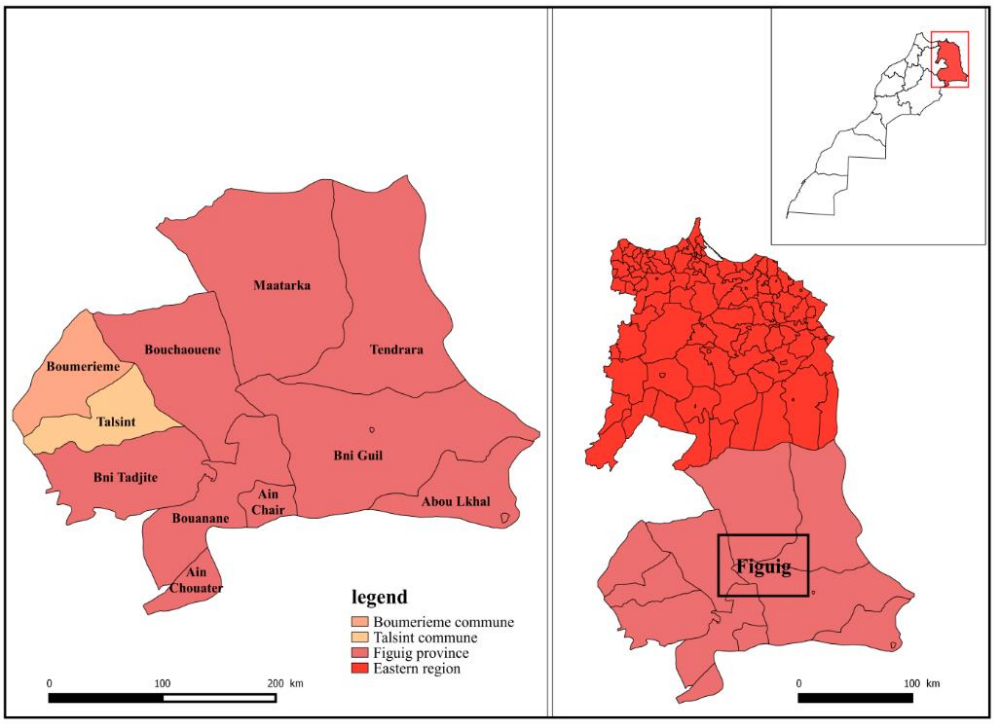


Figure 1: The Geographical localizations of the study area, Figuig provinces, Eastern Morocco [24] Made by the QGIS software.

2.2. Essential Oils Extraction

The aerial parts of the plants were dried in shade at ambient temperatures and then hydro distilled using a Clevenger-type apparatus [25]. This method is recommended for essential oil extraction because it is simpler and faster than other extraction methods, and it allows for a good yield and recovery of the compounds of the essential oil [26]. Each specimen was put in a 2 L glass flask containing 100 g of dry plant material and 800 mL of distilled water [27]. The mixture was then brought to a boil for three hours. The essential oil obtained was placed in an opaque green flask, dried using anhydrous sodium sulfate, and stored at 4°C [28]. The yields of the EOs from the different samples were calculated using formula (1) indicated by [29]. All the experiments were carried out in triplicate.

$$Yield\% = \frac{weight\ of\ EO\ obtained\ by\ distillation\ (g)}{weight\ of\ dry\ biomass\ (g)} \times 100 \quad (1)$$

2.3. Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis

Gas Gas chromatography analyses for all the samples were undertaken on a Hewlett-Packard (HP 6890) gas chromatograph equipped with an HP-5 capillary column (30 m × 0.25 mm, film

thickness of 0.25 µm), an FID detector, and an injector fixed at 275 °C. The oven temperature was set at 50°C for five min and was then raised to 250°C at a rate of 4°C/min. The carrier gas applied was N_2 at 1.8 mL/min, employing a split mode of ratio: 1/50, flow: 72.1 mL/min. The samples were diluted to 1/50 in methanol, and the injection was added manually with an injected volume of 1.2 µL.

The chemical composition was realized by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). This analysis was performed on a Hewlett-Packard gas chromatograph (HP 6890) coupled with a mass spectrometer (HP 5973). The column used was a capillary column equipped with an HP-5MS (cross-linked 5% PHME siloxane) (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 µm). The column temperature was set at 50°C and raised to 250°C at a rate of 2°C/min. The carrier gas was He at 1.5 mL/min, and a split mode ratio was employed: 1/74.7, flow: 112 mL/min. The MS identity of the components was confirmed using the NIST 98 spectra library. The parameters exploited in the mass spectra were ionization voltages of 70 eV, the ion source temperature was 230°C, and the scan mass range was 35–450 m/z. The identification of the components was also verified by the comparison of the compounds' elution order with their relative retention indices indicated in the literature. Each experiment was performed in triplicate.

2.4. Antimicrobial Activity

2.4.1. Bacterial Strains

The antibacterial activities of rosemary essential oils from three cooperatives in Figuig Province in eastern Morocco were evaluated against three bacterial strains: *Escherichia coli* ATCC25922 (Gram-negative), *Bacillus subtilis* ATCC 23857 (Gram-positive), and *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (Gram-positive). These strains were taken from the culture collections of the Laboratory of Microbial Biotechnology at the Faculty of Sciences and Techniques in Fez, Morocco.

2.4.2. Disc Diffusion Method

The antimicrobial activity for each essential oil was determined using a disc diffusion method based on that used in [30] to identify the antibacterial power of the oils. The bacterial suspension was adjusted to 10^8 CFU/mL and was then spread on a plate containing Muller–Hinton agar (MHA). Whatman paper sterile discs (6 mm in diameter) were soaked with 10 µL of essential oil samples and put on the inoculated MHA. In addition, the negative control was prepared in the same manner as the experimental test, and sterile distilled water was added rather than

essential oil. A commercial disc of amoxicillin (30 µg and 86.2% purity) was used as a positive reference standard to determine the sensitivity of the tested strain. The diameters of the inhibition zone around the disks were measured after 24 h incubation at 37°C. All assays were realized in triplicate.

2.4.3. Minimal Inhibitory Concentration

The The minimal inhibitory concentration (MIC) of essential oils was determined in a 96-well microplate using the microdilution method, according to [31] with a slight modification. The EOs were diluted sequentially in Mueller–Hinton broth (MHB) with agar added at 0.15% w/v as an emulsifier. The final concentration of the essential oil was between 1/10 v/v and 1/2000 v/v. The 12th was regarded as a growth control, as it only contained the culture medium and the strain. Afterwards, 50 µL of bacterial suspension was supplemented in each well at a final concentration of 10^6 CFU/mL. After incubation at 37°C for 18 h, the MIC was presented as the lowest essential oil concentration that showed a negative bacterial growth translated by a non-change in resazurin color. A positive MIC is detected by a reduction of blue dye resazurin to pink resorufin. Each experiment was performed in triplicate.

2.5. Statistical Analysis

To examine the significant differences between mean values, an analysis of variance (two-way ANOVA), and a Tukey's post hoc test were utilized (a probability of $p \leq 0.05$ was considered statistically significant) using Origin Pro 2021 software. The percentage composition of 8 major compounds (1,8-cineole, camphor, α-pinene, camphene, β-pinene, myrcene, α-terpineol, and limonene) and the average yield of rosemary essential oil were calculated to determine the variable variation and the correlation between them, as well as to identify the similarities between samples (harvest period and cooperatives) with principal component analysis (PCA). For better visualization of the similarity between harvest periods, a hierarchical cluster analysis (HCA) was performed. This classification tool divided the groups according to the average yield and the 8 major components of rosemary essential oil. The PCA and the HCA were realized using SPSS (version 25) and JMP Pro 14 software.

3. Results and Discussion

3.1. Variations of the Essential Oils Yield

The yield obtained from the samples of rosemary ranged from 1.1 to 3.1% (Figure 1). The results showed that most of the periods had yields of higher than 2%, which is an encouraging

factor for the future exploitation of this region. The yields of the three Moroccan cooperatives in this study were slightly higher than those reported by Sabbahi et al. [9], who found that the yield of rosemary essential oil in Talsint (located in the Figuig Province of Morocco) ranged from 0.6% to 1.7%. In Oujda, which is located in the Oriental region of Morocco, the yield of rosemary essential oil cultivated was about 1.8% [32]. Elyemni et al. [33] indicated that the rosemary yield of the region of Fez, Morocco, was 1.4%. Additionally, the yields of essential oils from four locations in Algeria were lower than those found in our study: 1.9% in the region of Ain Mlila commune (wilaya of Oum-El-Bouaghi), 1.6% in Bibans commune (wilaya of Bordj Bou Arreridj), 1.1% in Maadid commune (East wilaya of M'sila), and 0.7% in the area of Ain Turk commune (wilaya of Oran) [34]. In Tunisia, the yield of rosemary EOs ranged between 1.5% and 2.2% [35]. Statistical analysis revealed that the cooperative and the harvest period studied had a probability (p-value) of less than 5%. Consequently, they significantly affected the variable.

Figure 2 demonstrates the significant differences between the cooperatives and harvest periods in terms of the average yield of *S. rosmarinus* essential oil. There was a significant difference ($p < 0.05$) in the average yield of *S. rosmarinus* EO between cooperatives C1 and C2 as well as between cooperatives C1 and C3, while no significant differences ($p > 0.05$) were noticed among cooperatives C2 and C3 in terms of the average yield of *S. rosmarinus* EO. The highest average yields of the rosemary EOs was found in plants from cooperative C1. Regarding harvest periods, no significant differences were observed among periods P1 (January), P8 (February), P7 (December), and P6 (October) in terms of the average yield of *S. rosmarinus* EO. In addition, no significant differences were noted among periods P2 (March), P5 (September), P3 (May), and P9 (April), whereas significant differences were noted between the periods P2 (March), P4 (July), and P3 (May) in terms of the average yield of *S. rosmarinus* EO. However, highly significant differences were identified among P1 (January) and P9 (April), as well as between P8 (February) and P3 (May). The samples from Period 9 (collected in April) and the samples from Period 3 (collected in May) showed the highest average yields of *S. rosmarinus* EOs (3.1±0.1% and 3.0±0.1%, respectively). The lowest average yield of *S. rosmarinus* EO (1.1±0.1%) was found in the plant collected in period 1 (January). According to two-way ANOVA, the yield of EOs was significantly affected by the harvest period and the cooperative. This finding may be explained by the environmental conditions in Figuig (a Saharan arid climate), especially the hot weather because the biosynthesis of EOs is more prominent in warm

climates. This was shown by Rehman et al. [36], who found that the majority of enzymatic activities for the production of volatile compounds are enhanced by temperature.

Accordingly, the yield of *S. rosmarinus* essential oil was maximized by using plants from cooperative C1 that were harvested in April. The variability of rosemary's essential oil yields could have resulted from the origin of the plant, the harvest time [37,38], the environmental [35] and agronomic conditions [39,40], the plant's phynological stage (Before and during full flowering stages) [41,42] and the extraction method [43].

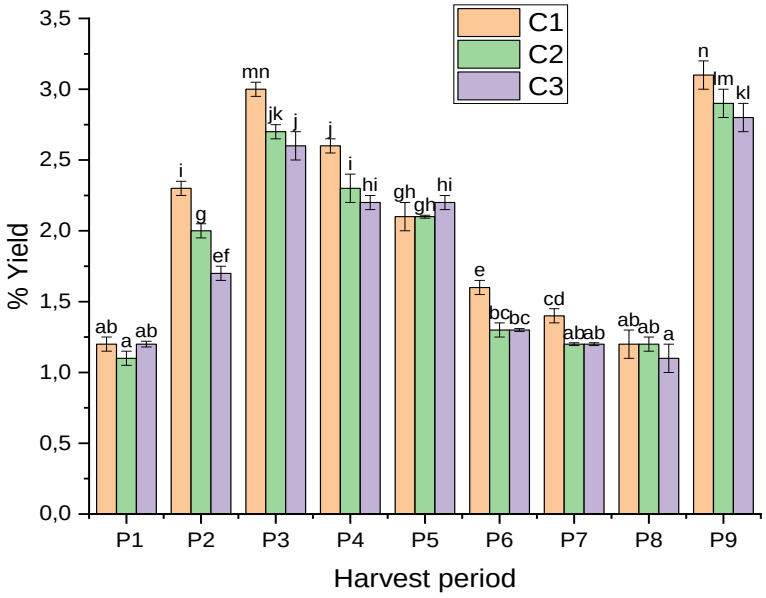


Figure 2: The average yield according to the essential oils from the three cooperatives and during nine harvest periods. Each column presented by different letters (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, and n) indicated a significant difference ($p < 0.05$) based on the Tukey test. Cn: cooperatives, Pn: periods.

3.2. Variations of the Essential Oil Compositions

Table 2 shows the results of the major components of the chemical composition of *S. rosmarinus* essential oils identified by gas chromatographic analysis coupled with mass spectrometry (GC/MS) for the three cooperatives during January 2018 and April 2019. Rosemary EOs contained different components according to the harvest period. Eight components were identified, representing a total of 83.7% for the three cooperatives. The major constituents were 1,8-cineole (28.6–51.1%), α-pinene (9.9–16.2%), camphor (5.3–16.8%), β-pinene (2.2–8.0%), camphene (2.3–7.7%), myrcene (0–4.5%), α-terpineol (0–3.8%), and limonene (0–3.3%) for all the samples during all periods. The essential oil from cooperative C1

showed the highest percentage of components. The 1,8-cineole component was present in a higher proportion than the other components, with a maximum value during period 3 (May, 2018); the α-pinene component reached its maximum value during period 6 (October 2018).

The chemical compositions of the 27 individual *S. rosmarinus* EOs were identified as two chemotypes: 1,8-cineole and α-pinene. The 1,8-cineole chemotype was present in period 3 (May 2018), and the α-pinene chemotype was available in period 6 (October 2018). Our results were similar to those reported in [9] in Talsint in the Province of Figuig in the Oriental region of Morocco. In Israel, Sadeh et al. [44] identified 1,8-cineole, camphor, and α-pinene as the major compounds. In the Middle Atlas Mountains of Morocco, Hannour et al. [45] found that rosemary was characterized by the 1,8-cineole (46.2%), camphor (17.3%), borneol (6.8%), α-terpineol (5.3%), β-pinene (5.6%), camphene (2.6%), and terpinen-4-ol (2.2%) and that rosemary from Loukkos was characterized by camphor (21.3%), 1,8-cineole (17.0%), α-pinene (9.2%), β-pinene (8.6%), camphene (7.4%), terpinen-4-ol (2.8%), borneol (4.8%), and p-cymene (2.4%). Bouyahya et al. [46] showed that *S. rosmarinus* from Ouezzan Province in northern Morocco constituted a majority compound consisting of 1,8-cineole (23.7%), camphor (18.7%), borneol (15.5%), and α-pinene (14.1%). The main compounds of *S. rosmarinus* reported in [47] were camphor (31.2%), β-caryophyllene (18.6%), 2,4-hexadiene, 3,4-dimethyl-, (Z, Z) (9.1%), α-fenchene (4.7%), *cis*-verbenone (4.3%), and bornyl acetate (3.4%). In Tunisia, the major components indicated in [48] were α-pinene (12.6–42.8%), α-fenchene (1.2–2.2%), 1,8-cineole (20.8–64.7%), camphor (14.5–20.4%), isoborneol (2.3–9.8%), and myrtenal (4.3–7.4%). Hendel et al. [34] identified camphor (35.3–37.6%), camphene (18.1–22.4%), α-pinene (16.1–21.0%), 1,8-cineole (12.1–14.4%), limonene (2.3–4.3%), ρ-cymene (0.5–2.6%), α-terpineol (0.7–1.2%), and borneol (0.8–3.2%) as the major compounds of Algerian rosemary essential oil. Oils of *S. rosmarinus* from Spain were characterized by the presence of camphor (17.2–34.7%), α-pinene (15.8–21.6%), 1,8-cineole (12.1–14.4%), camphene (5.2–8.6%), borneol (3.2–7.7%), β-pinene (2.3–7.5%), verbenone (2.2–5.8%), β-myrcene (0.9–4.5%), limonene (2.0–3.8%), bornyl acetate (0.2–2.3%), α-terpineol (1.2–2.5%), and ρ-cymene (0.2–1.7%) [49]. In Italy, Leporini et al. [50] mentioned 1,8-cineole (21.89–16.98%), camphor (11.08–7.27%), trans-caryophyllene (10.58–8.62%), α-pinene (10.96–10.37%), camphene (6.87–6.30%), borneol (3.31–5.30%), α-terpineol (3.19–4.05%), sabinene (1.01–2.82%), myrcene (1.32–2.73%), thujene (0.88–2.34%), γ-terpinene (2.42–2.76%), limonene (1.78–2.30%), and α-terpinene (1.19–1.35%) as the compounds of rosemary EOs. Pitarokili et al. [51]

found 1,8-cineole (48.3–58.7%), borneol (8.8–10.4%), α-Pinene (8.4–9.9%), α-terpineol (4.3–5.9%), camphene (2.2–3.5%), β -caryophyllene (0.7–4.4%), bornyl acetate (0.7–3.4%), and ρ-cymene (1.7–3.1%) as the major compounds of rosemary Eos from Greece, whereas, ρ-cymene (44.02%), linalool (20.5%), terpinene (16.62%), β-pinene (3.61%), α-pinene (2.83%), eucalyptol (2.64%), and thymol (1.81%) were the most common compounds of Turkish rosemary EOs [52]. The quantity of components varied according to the isolation method used. The chemical composition of *S. rosmarinus* is highly sensitive. The literature reports that several factors can modify its quality and quantity: the method of extraction [44], the harvest period [53], the environmental condition [54], the site of collection [38], the harvest stages [37] [55], and the plant's genotype [56].

Table 2: The major components of chemical composition of *S. rosmarinus* essential oils from each cooperatives and harvest periods.

	Compounds	RI	RI Lit	Cooperative	Harvest period								
					Period 1	Period 2	Period 3	Period 4	Period 5	Period 6	Period 7	Period 8	Period 9
% Relative Peak Area	α-pinene	939	938	C1	14.8±3.5	12.1±1.2	9.9±0.2	11.9±0.2	12.4±0.7	15.4±1.4	15.0±1.1	15.0±1.1	12.9±0.1
				C2	14.1±3.4	12.1±0.0	11.6±0.5	13.7±0.5	13.8±0.5	14.8±1.6	14.6±1.5	14.6±1.5	13.1±1.0
				C3	13.5±2.1	11.9±0.5	10.7±0.5	11.7±0.3	13.2±0.3	16.2±0.3	14.5±0.4	14.6±0.4	12.7±0.4
	Camphene	953	952	C1	3.5±1.1	3.5±1.1	2.9±0.7	2.9±0.4	3.9±1.4	5.0±0.6	3.4±0.0	4.6±0.6	4.1±1.5
				C2	6.8±0.3	6.3±0.2	6.3±0.2	4.8±0.7	3.8±0.3	7.2±0.5	4.2±0.6	5.3±1.3	5.1±1.0
				C3	7.4±0.1	5.9±0.4	5.9±0.4	4.9±0.8	4.7±0.1	6.5±1.0	4.6±1.1	4.6±0.5	5.4±0.1
	β-pinene	976	980	C1	7.1±0.1	6.1±1.0	6.1±1.0	6.1±1.0	6.8±0.7	4.4±1.1	4.3±0.9	6.8±0.6	6.1±0.1
				C2	7.3±0.6	7.3±0.6	7.3±0.6	7.3±0.6	6.1±0.3	4.1±1.8	3.6±1.5	5.1±0.9	6.7±0.2
				C3	6.9±1.2	6.9±1.2	6.8±1.2	6.8±1.2	6.5±1.2	6.5±1.2	6.1±1.1	6.7±0.4	6.5±0.6
	Myrcene	990	993	C1	3.0±2.6	3.0±2.6	2.9±1.7	1.9±0.6	1.6±0.1	1.6±0.1	2.6±0.1	1.1±0.1	2.7±1.8
				C2	1.2±1.0	0.0±0.0	1.0±0.1	1.6±0.4	1.6±0.1	1.6±0.1	2.6±0.1	1.1±0.1	1.2±0.4
				C3	1.3±1.1	1.3±1.1	1.4±0.5	1.7±0.5	1.9±0.5	1.9±0.4	2.4±0.0	1.3±0.2	1.5±0.3
	Limonene	1030	1031	C1	0.0±0.0	1.9±1.8	1.9±0.1	2.5±0.4	1.5±0.4	1.5±0.4	1.4±0.4	0.9±0.0	2.8±0.5
				C2	0.1±0.1	1.0±0.8	1.6±0.4	1.4±0.1	1.3±0.2	1.3±0.2	1.4±0.1	0.8±0.1	1.5±0.7
				C3	0.0±0.0	1.1±0.7	1.8±0.0	2.4±0.5	1.9±0.1	1.9±0.1	1.5±0.0	0.7±0.1	1.0±0.1
	1,8-cineole	1033	1033	C1	33.2±0.7	39.2±0.3	51.1±1.8	47.1±2.8	42.3±1.0	37.8±0.5	32.3±1.0	33.2±0.7	43.4±1.1
				C2	29.8±1.8	37.8±0.3	46.2±0.3	42.2±0.3	41.9±0.6	35.9±0.4	31.8±0.6	29.8±1.8	41.1±2.0

			C3	28.6±0.8	38.6±0.8	47.3±0.8	43.1±1.3	42.2±0.4	34.2±0.7	32.1±0.3	28.6±0.8	38.5±0.6
Camphor	1143	1144	C1	14.3±0.3	10.8±1.1	7.3±0.5	8.3±0.5	7.2±0.6	16.8±2.3	18.2±1.8	18.8±0.3	5.9±1.2
			C2	12.8±1.2	12.8±1.2	5.8±0.2	6.8±0.2	6.3±0.3	16.8±0.8	17.8±0.9	18.8±0.1	8.7±0.7
			C3	15.5±0.0	15.3±0.1	5.3±0.1	8.8±2.4	7.8±1.2	15.4±0.1	16.4±1.1	17.4±1.1	10.0±0.5
α-Terpineol	1185	1189	C1	2.2±1.6	1.7±1.1	1.4±0.2	1.2±0.2	1.2±0.1	0.8±0.2	0.8±0.1	0.8±0.1	1.6±0.5
			C2	1.7±0.1	1.7±0.1	1.2±0.0	1.4±0.1	1.3±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	1.1±0.1
			C3	0.0±0.0	1.4±0.5	1.1±0.1	1.3±0.1	1.3±0.0	0.9±0.0	0.9±0.0	0.9±0.0	0.4±0.4
Total%			C1	78.1±2.3	78.4±2.3	83.3±0.6	81.9±1.8	77.0±1.9	83.4±0.6	78.2±0.3	81.2±2.6	79.5±0.2
			C2	73.8±4.6	78.9±0.0	81.0±0.7	79.2±0.5	76.2±1.4	82.5±2.3	76.9±0.9	76.1±2.3	78.6±2.5
			C3	73.2±0.1	82.2±3.3	80.3±0.9	80.7±4.0	79.4±1.5	84.0±2.1	78.4±3.1	74.7±1.1	76.0±0.2

Data expressed as mean ± standard deviation of triplicates. Cn: Cooperative. RI: retention indices calculated experimentally using homologous series of C_8-C_{28} alkanes. RI Lit: retention indices from literature [57]. Compounds and their percentage value determined from the chromatograms of three experimentations obtained on the HP-5 MS column.

3.3. Principal Component Analysis

Principal component analysis (PCA) allowed us to identify the correlation among the major compounds and the yield of rosemary essential oil from different cooperatives and harvest periods, as well as to classify similar samples in accordance with the yield and the major compounds of rosemary essential oil. PCA also enabled the explicit representation of individuals and variables to highlight the different profiles between samples according to the harvesting period and the cooperative. The individuals are represented by the 27 essential oil samples taken from three cooperatives during nine different harvest periods. The variables are represented by the average yield in essential oil and the main components of the chemical composition of rosemary. To verify the feasibility of the PCA, the Kaiser–Meyer–Olkin (KMO) index and the Bartlett test were used. Calculation of the KMO index resulted in a value of 0.8, which is greater than 0.5; and Bartlett test has obtained a probability of less than 5%, meaning the test is highly significant. Therefore, the PCA is attainable.

To determine the number of principal components, the components with eigenvalues were greater than one had to be retained [58]. Table 3 demonstrates that the first three principal components had eigenvalues greater than one and that they explained most of the variables. The cumulative percentage of these three components explained 82.9% of the data variability. The first component explained 47.5% of the variables: α-pinene, 1,8-cineole, camphor, α-terpineol, and yield. The second component explained 22.5% of the variables: camphor, β-pinene, and limonene. The third component explained 12.9% of the variables: myrcene.

Table 3: The quality of representation of the variables on the first 3 components, eigenvalues of the components, percentages of variability explained, and cumulative percentages.

	Components		
	PC1	PC2	PC3
α-pinene	−0.8	0.3	0.1
Camphene	−0.4	−0.7	−0.3
β-pinene	0.3	−0.7	0.5
Myrcene	0.2	0.8	0.2
Limonene	0.7	0.4	−0.4
1,8-cineole	0.9	−0.0	−0.2
Camphor	−0.9	0.2	−0.0
α-Terpineol	0.5	0.1	0.8
Yield	0.9	−0.1	−0.2
Eigenvalues	4.3	2.0	1.2
Percentages of explained variability (%)	47.5	22.5	12.9
Cumulative percentages (%)	47.5	70.0	82.9

PC: principal component.

The loading plot or distribution of the variables according to the first principal component (PC1) and the second principal component (PC2) (Figure 3) shows that the variables α-pinene, 1,8-cineole, camphor, yield, and α-terpineol are well represented in axis 1 (PC1), and the variables camphor, β-pinene, and limonene are well represented in axis 2 (PC2). Thus, the loading plot also shows the presence of some correlation among the studied variables. A positive correlation was identified among the yield of essential oil, α-terpineol, and 1,8-cineole. α-pinene and camphor also showed a positive correlation. However, 1,8-cineole and camphor were negatively correlated. Another negative correlation was observed between α-pinene and the

yield of essential oil. These results indicate that when the yield of essential oil increased, the amount of 1,8-cineole increased. However, when the quantity of 1,8-cineole contained in essential oil was higher, the quantity of α-pinene and camphor was lower.

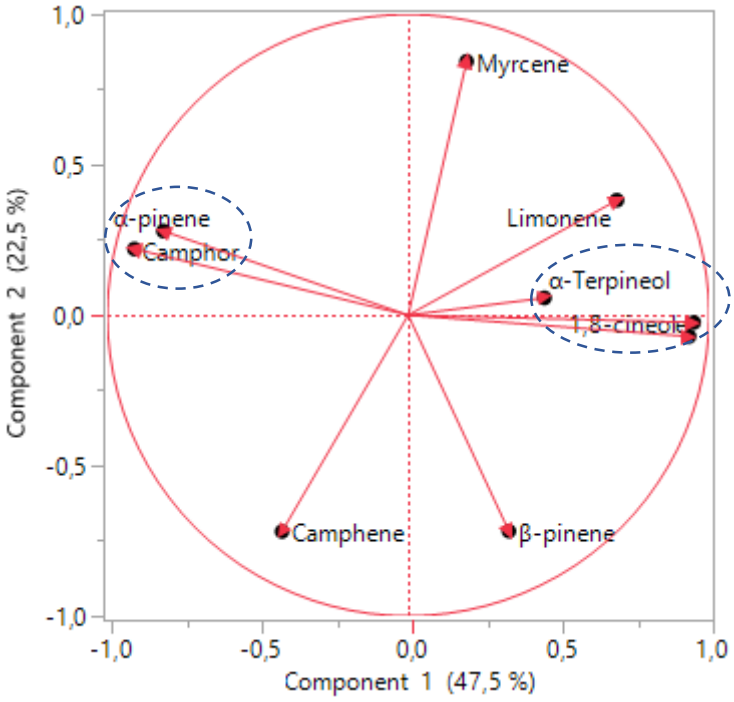


Figure 3: Loading plot that presents the cloud of variables in the first and second principal components.

The score plot (Figure 4) or the distribution of individuals (harvest period and cooperative) in accordance with PC1 and PC2 shows that individuals were separated into two main groups. Group A consists of P9 (April), P3 (May), P4 (July), and P5 (September), or the summer season. Group B is composed of P6 (October), P1 (January), P7 (December), and P8 (February), or the winter season. The intermediary between the two groups was P2 (March), which shared both of their characteristics. No significant difference was found between the essential oils of the three cooperatives because the distribution of cooperatives in the groups was random. This finding may also be due to the locations of the cooperatives being in the same province (Figuig).

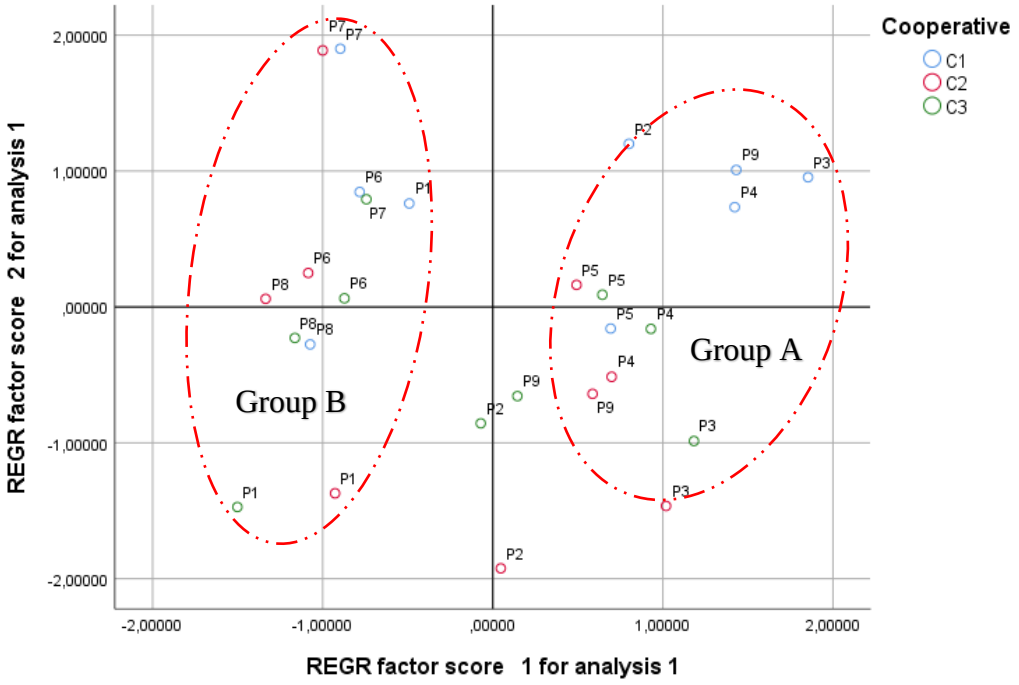


Figure 4: Projection of the cloud of individuals (score plot) in the first and second principal components. Pn: period of harvesting. Group A specifies the summer season. Group B specifies the winter season.

To obtain the biplot, the individual factors were projected on the variables (Figure 5). The graph shows that group A is dominated by the highest amount of 1,8-cineole and α-terpineol compounds and a high yield of essential oil. However, group B presented the opposite trend of group A, which is characterized by α-pinene and camphor compounds, whereas group B was characterized by a low yield of essential oil and a low amount of 1,8-cineole and α-terpineol compounds, especially in P9 (October) and P7 (December) individuals. Period 2 (March) was characterized by an average yield of essential oil and an average amount of the constituents of both groups. Several studies have shown the effect of the harvest period and climatic conditions on the level of certain compounds in rosemary essential oil [59]. Melito et al. [60] found that summer had the highest yield of *S. rosmarinus* essential oils, whereas winter had the lowest yield. These authors confirmed that the chemical composition of *S. rosmarinus* was significantly influenced by the seasons, observing that γ-terpinene and terpinolene values were high in summer (0.8 and 0.7, respectively) and lowest in winter. They also reported that β-pinene and bornyl acetate components were the most elevated in the spring. Ismaili et al. [61] reported that the best harvest time was spring, with a yield of 2.0%, and they also showed that the chemical composition did not vary according to the season. Lemos et al. [62] noted that yields varied during the harvest period, with the highest yield of rosemary essential oil

occurring in April (0.90%). The authors of [62,42] showed that rainfall and light intensity directly influence the production of essential oil.

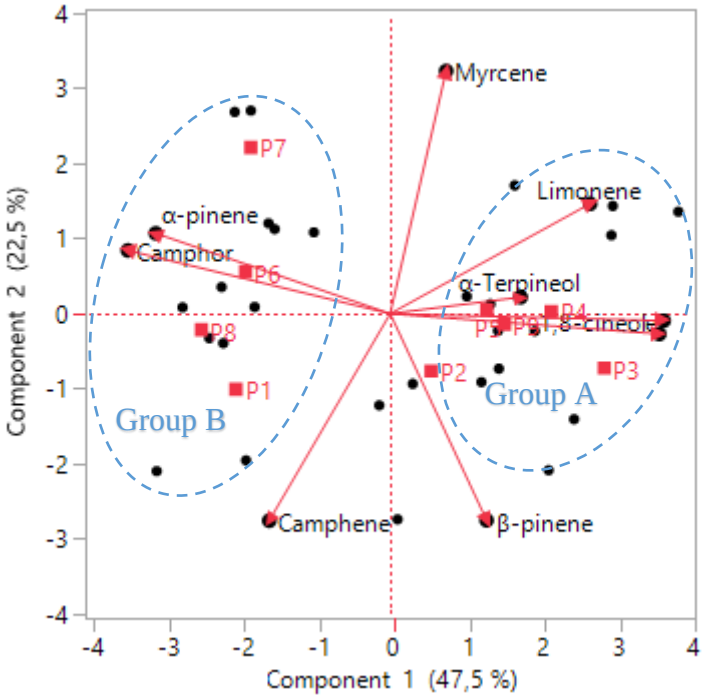


Figure 5: Biplot of variables and individuals in the factorial design. Pn: period of harvesting. Group A specifies the summer season. Group B specifies the winter season.

3.4. Hierarchical Cluster Analysis

To better visualize the classification of the studied samples (harvest period) according to the main components of chemical composition and the yield of rosemary essential oil, an HCA was performed (Figure 6). As a validation of PCA results (scores plot), the individuals were divided into two main groups: Group A represented summer (periods P2, P3, P4, P5, and P9) and Group B represented winter (periods P2, P6, P7, and P8). March (P2) was included in both groups. Thus, it represented the intermediary between the two groups. Group A (winter season) was characterized by a high amount of α-pinene and camphor, a low amount of 1,8-cineole and α-terpineol compounds, and a low yield of essential oil. However, group B (summer season) was characterized by a high amount of 1,8-cineole and α-terpineol compounds, a high yield of essential oil (red color), and a low amount of α-pinene and camphor (blue color). The intermediate group (P2: March) was characterized by an average yield of essential oil and an average amount of *S. rosmarinus* main compounds. The result of both PCA and HCA indicated that the yield and chemical composition of essential oil were significantly influenced by the

harvest period and environmental conditions. The majority of studies indicate that the yield of essential oil and the chemical composition of *S. rosmarinus* are impacted by environmental conditions. Bajalan et al. [63] found a correlation between the major compounds of rosemary essential oil and environmental factors. Sarmoum et al. [64] indicated that the production of rosemary essential oil was directly affected by water stress; this explains why the yield of rosemary essential oil was higher in the summer season and lower in the winter season. Nevertheless, Sadeh et al. [44] showed that the main compounds of rosemary essential oil were not significantly affected by season..

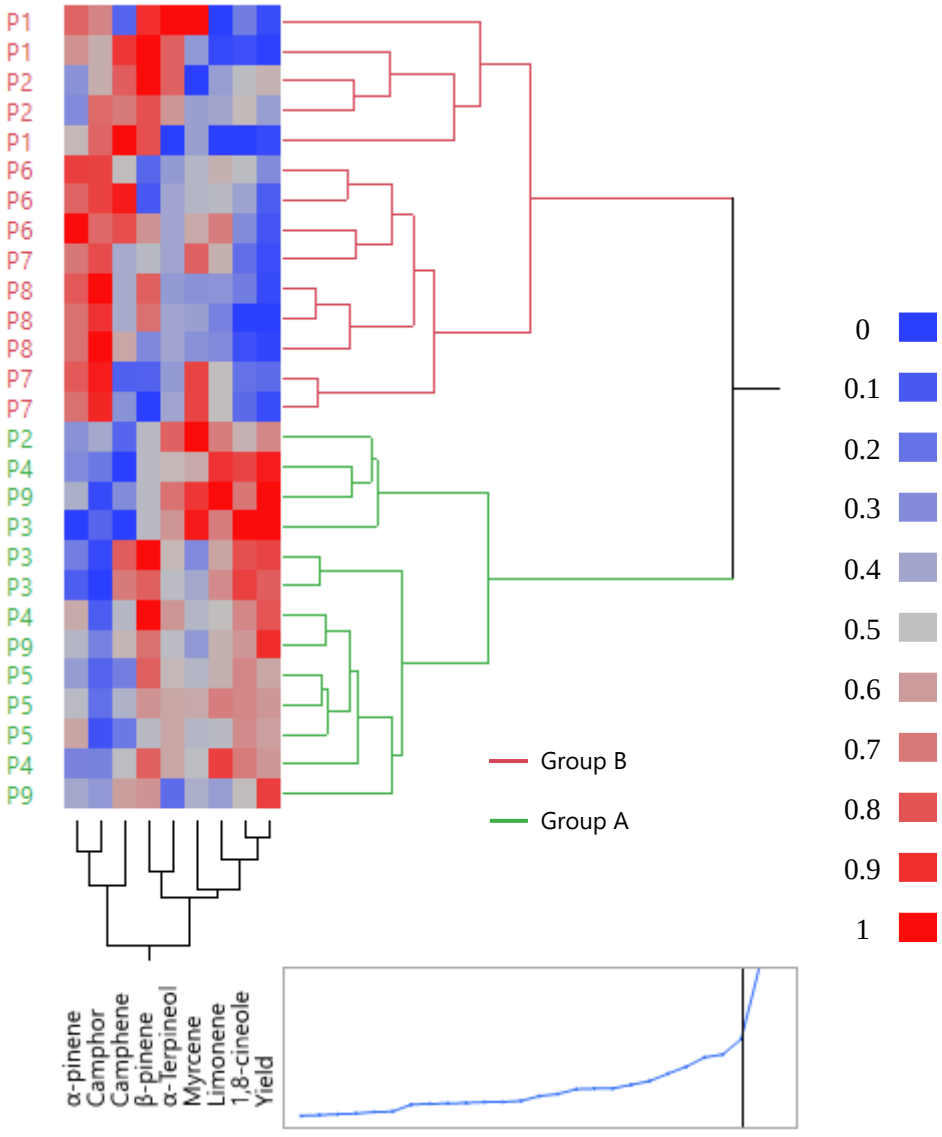


Figure 6: Hierarchical group analysis of samples of *S. rosmarinus* based on the method of ward. Group A specifies the summer season. Group B specifies the winter season.

3.5. Antimicrobial Activity

The essential oils tested were composed of the average of the samples collected during the third period (May 2018), which belongs to summer season (high yield of *S. rosmarinus* essential oil and the highest proportion of 1,8-cienole compound). The antimicrobial activity was first qualitatively tested by the disc diffusion technique with the aim of selecting the most active EOs among those tested. These samples were evaluated against one Gram-negative (*Escherichia coli*) and two Gram-positive (*Bacillus subtilis*) (*Mycobacterium smegmatis*) species.

Figure 7 illustrates the significant differences ($p < 0.05$) in the diameter of inhibition zones of the rosemary essential oil from three cooperatives: C1, C2, and C3. Significant differences were observed among the essential oil from all cooperatives and antibiotics in terms of all bacteria strain inhibition zones. However, no significant difference ($p > 0.05$) was noted between the essential oil from cooperatives C1 and C3, whereas a significant difference was found among the essential oils from the cooperatives C1 and C2, as well as antibiotics in terms of *E. coli* inhibition zones. In terms of inhibition zones of *B. subtilis*, a significant difference was noticed between essential oil from the cooperatives C1, C2, and C3, whereas no significant difference was observed between essential oils from the cooperatives C2 and antibiotics. Regarding *M. smegmatis*, again, significant differences were identified among the essential oils from the cooperatives C1 and C2, as well as antibiotics, whereas no significant difference was identified between the essential oils from cooperatives C2 and C3. Two-way ANOVA showed that there was a statistically significant difference among the means of the inhibition diameters and three cooperative EOs for the three strains used.

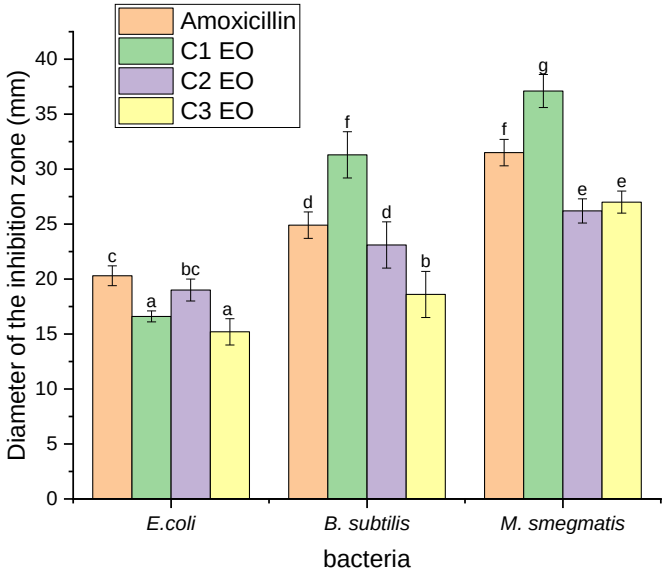


Figure 7: The diameter of inhibition zones of three bacteria strains as a function of the essential oils from the three cooperatives. Each column represented by different letters (a, b, c, d, e, f and g) shown a significant difference ($p < 0.05$) based on the Tukey test. Cn EO: essential oil from different cooperatives.

Figure 7 shows that the essential oil from cooperative C1 had the highest activity, with inhibition zones of 16.6±0.5 mm, 31.3±2.1 mm, and 37.1±1.5 mm for *E. coli* ATCC25922, *B. subtilis* ATCC 23857, and *M. smegmatis* MC2 155, respectively. In the essential oil from cooperative C2, the greatest activity was noted against *M. smegmatis*, with an inhibition diameter of 26.2±1.1 mm. The lowest activity was observed against *E. coli*, with inhibition diameters of 19.0±1.0 mm. The same results were observed in the essential oil from cooperative C3. The inhibition diameters obtained for *M. smegmatis* (27.0±1.1 mm) were higher than those obtained for *B. subtilis* (18.6±2.1 mm) and *E. coli* (15.2±1.1 mm). Many studies have demonstrated that rosemary essential oil provides effective antibacterial activity against various microorganisms [46,48]. Rosemary essential oil was slightly less sensitive against Gram-negative bacteria (*E. coli*) than they against Gram-positive bacteria [65]. Megzari et al. [66] observed that rosemary essential oil presented antibacterial activity against the same bacterial strain, with diameters of inhibition similar to those observed in our study. However, Bajalan et al. [67] stated that the essential oil of rosemary showed antibacterial activity against the four bacteria strains, especially *E. coli*, with an inhibition zone of 18.5 mm, followed by *Staphylococcus aureus* (14.6 mm), *Klebsiella pneumoniae* (13.9 mm), and *Streptococcus agalactiae* (13.1 mm). Abdellaoui et al. [68] revealed that the highest antibacterial activity was

against *E. coli*, which was the most sensitive of the tested strains with the largest inhibition zone (18.4 mm). Chahboun et al. [69] showed that rosemary essential oil in the Taza region of Morocco was active against all strains, except for *Pseudomonas aeruginosa*, with the other strains having diameters between 12.0 and 22.0 mm.

The results of the minimum inhibition concentration are represented in Table 4. The essential oils showed important inhibitor activity against the microorganisms studied. In fact, the bacterial strains as a whole were inhibited at a 1/250 v/v concentration. *M. smegmatis* and *B. subtilis* were the most susceptible strain for all Eos, with growth ending at 1/500 (v/v). *E. coli* was the least sensitive microorganism, an MIC value of with 1/250 (v/v). All EOs exerted strong activity against *M. smegmatis*. Fadil et al. [70] reported that rosemary essential oil exhibited antimicrobial activity against *Salmonella typhimurium*, with an MIC value of 2% (v/v).The MIC value of rosemary essential oil reported in [71] against three bacterial strains (*S.aureus*, *E.coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*) was 3.33, 1.67, and 6.67 µL/mL, respectively. According to [72], rosemary essential oil showed antimicrobial activity against *E. coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Listeria monocytogenes*, and *S. aureus*, with an MIC value of 0.65, 0.65, 0.91, and 0.91 mg/mL, respectively..

Table 4: The minimum inhibition concentration of *S. rosmarinus* essential oils tested.

		MIC *v/v*						
Cooperative	Strains	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{125}$	$\frac{1}{250}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	$\frac{1}{2000}$
	M. smegmatis	-	-	-	-	-	+	+
C1	*E. coli*	-	-	-	-	-	+	+
	B. subtilis	-	-	-	-	-	+	+
	M. smegmatis	-	-	-	-	+	+	+
C2	*E. coli*	-	-	-	-	+	+	+
	B. subtilis	-	-	-	-	-	+	+
	M. smegmatis	-	-	-	-	-	+	+
C3	*E. coli*	-	-	-	+	+	+	+
	B. subtilis	-	-	-	-	-	+	+

Cn: Cooperative. +: Growth. -: No Growth.

It can be concluded that the rosemary essential oil from cooperative C1 exhibited the best antimicrobial activity of the three cooperatives. This can be explained by a high amount of 1,8-cineole compound in rosemary essential oil from cooperative C1 (51.1±1.8%) compared to the cooperatives C2 and C3 (46.2±0.3 and 47.3±0.8%, respectively), but the contributions of α–pinene and camphor compounds should also be noted. In addition, the analysis of the *S. rosmarinus* essential oil from cooperative C1 showed a high rate of camphor (7.3±0.5%) compared to cooperatives C2 (5.8±0.2%) and C3 (5.3±0.1%). The essential oil from cooperative C2 represented the highest amount of α-pinene compound (11.6±0.5%), followed by C3 (10.7±0.5%) and C1, with a value of 9.9±0.2%. The effect of synergy could also be the origin of this activity. Several authors demonstrated that chemical composition has an effect on antimicrobial activity, such as 1,8-cineole and α-pinene[14,73]. According to [74] the antibacterial activity against *M. smegmatis* of rosemary was most likely to occur when high quantities of 1,8-cineole were present. Moreover, Kovač et al. [75] demonstrated that the α-pinene compound exhibited antimicrobial activity against 16 strains of *Campylobacter jejuni*.

Ojeda-Sana et al. [76] indicated that rosemary essential oil has a high antibacterial activity against Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *Enterococcus faecalis*) and against the Gram-negative bacteria (*E. coli* and *K. pneumoniae*). The same authors also demonstrated that the α-pinene compound presented a broad antibacterial spectrum against Gram-negative and Gram-positive bacteria and that the 1,8-cineole compound showed antibacterial activity against pathogenic bacteria by causing a rupture of the cell membrane. It is known by the scientific community that the main compounds of EOs have a key role in antibacterial activity. However, the importance of minor components or a combination thereof could explain the complete activity of EOs against clinical and foodborne pathogens [77,78].

The present study indicates that the most important period to exploit the essential oil of *S. rosmarinus* is in summer for the three studied cooperatives in Figuig Province. This is due to the abundance of the main components that affect antibacterial activity, including 1,8-cineole, α-pinene, and camphor..

4. Conclusions

In this study, we focused on explaining the variations in rosemary essential oil yield, chemical composition, and antibacterial activity in relation to cooperatives and harvest periods. The best yield was obtained in essential oils for plants from cooperative C1 for period 9 (April 2019). The highest amount of the 1,8-cineole component appeared in period 3 (May 2018). PCA and HCA indicated the presence of two groups: group A (winter), which was characterized by camphor and α-pinene, and group B (summer), which was characterized by a high quantity of 1,8-cineole and high yield of rosemary essential oil. These statistical analyses indicated that summer is the best harvest period to exploit the essential oil of this plant in Figuig Province. The antibacterial activity showed an inhibitory potential against all strains, especially among samples from the cooperative C1. Our findings could have a positive economic impact on the exploitation of rosemary in the Oriental region, especially during the best harvest periods, as they show the best yields and the oils richest in 1,8-cineole and α-pinene chemotypes. The use of chemometric tools has the potential to identify the compounds responsible for antibacterial activities and will also make it possible to exploit these results to determine the most active oil fractions against pathogenic strains. In this context, this study could be extended to other bacterial strains of medical and food interest.

References

[1] A. Khia *et al.*, "Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de Rosmarinus officinalis L. du Maroc," *Phytotherapie*, vol. 12, no. 6, pp. 341–347, Dec. 2014, doi: 10.1007/s10298-014-0895-x.

[2] S. Zrira, "Some Important Aromatic and Medicinal Plants of Morocco," *Med. Aromat. Plants World - Africa*, vol. 3, pp. 91–125, 2017, doi: 10.1007/978-94-024-1120-1_5.

[3] M. Jamaleddine, J. El Oualidi, M. S. Taleb, T. Thévenin, and F. E. El Alaoui-Faris, "Inventaire et état de conservation des plantes aromatiques et médicinales (PAM) au Maroc," *Phytotherapie*, vol. 15, no. 3, pp. 114–122, Jun. 2017, doi: 10.1007/s10298-017-1131-2.

[4] L. M. de Macedo *et al.*, "Rosemary (Rosmarinus officinalis L., syn salvia rosmarinus spenn.) and its topical applications: A review," *Plants*, vol. 9, no. 5, May 2020, doi: 10.3390/plants9050651.

[5] B. Sasikumar, "Rosemary," *Handb. Herbs Spices Second Ed.*, vol. 1, pp. 452–468, Aug. 2012, doi: 10.1533/9780857095671.452.

[6] A. Oussaid, M. Azzouzi, A. Ibn Mansour, M. Azouagh, M. Koudad, and A. Oussaid, "Moroccan Journal of Chemistry Assessment of the chemical/biological activities of extracts and essential oil of Rosmarinus Officinalis L. from the Oriental region of Morocco," *Mor. J. Chem*, vol. 8, pp. 732–744, 2020, [Online]. Available: http://revues.imist.ma/?journal=morjchem&page=login.

[7] M. Chetouani, I. Mzabri, A. Aamar, A. Boukroute, N. Kouddane, and A. Berrichi, "Morphological-physiological and biochemical responses of Rosemary (Rosmarinus officinalis) to salt stress," *Mater. Today Proc.*, vol. 13, pp. 752–761, 2019, doi: 10.1016/j.matpr.2019.04.037.

[8] M. Naggar and K. Iharchine, "Pour une valorisation durable des produits forestiers non ligneux: cas des facies à romarin de l'Oriental (Maroc)," *14th World For. Congr.*, pp. 7–11, 2015.

[9] M. Sabbahi, A. El Hassouni, A. Tahani, and A. El Bachiri, "Moroccan Journal of Chemistry Altitude effect on the chemical composition and antioxidant activity of rosemary in the region of Talsint (Morocco)," *J. Chem*, vol. 8, pp. 866–875, 2020, [Online]. Available: http://revues.imist.ma/?journal=morjchem&page=login.

[10] R. S. Borges, B. L. S. Ortiz, A. C. M. Pereira, H. Keita, and J. C. T. Carvalho, "Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 229, pp. 29–45, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jep.2018.09.038.

[11] J. R. De Oliveira, S. E. A. Camargo, and L. D. De Oliveira, "Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent," *Journal of Biomedical Science*, vol. 26, no. 1. BioMed Central Ltd., Jan. 09, 2019, doi: 10.1186/s12929-019-0499-8.

[12] R. Hamidpour, "Rosmarinus Officinalis (Rosemary): A Novel Therapeutic Agent for Antioxidant, Antimicrobial, Anticancer,Antidiabetic, Antidepressant, Neuroprotective, Anti-Inflammatory, and Anti-Obesity Treatment," *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, vol. 1, no. 4, Sep. 2017, doi: 10.26717/bjstr.2017.01.000371.

[13] R. Sedighi, Y. Zhao, A. Yerke, and S. Sang, "Preventive and protective properties of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) in obesity and diabetes mellitus of metabolic disorders: A brief review," *Current Opinion in Food Science*, vol. 2. Elsevier Ltd, pp. 58–70, Apr. 01, 2015, doi: 10.1016/j.cofs.2015.02.002.

[14] G. Nieto, G. Ros, and J. Castillo, "Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (Rosmarinus officinalis, L.): A Review," *Medicines*, vol. 5, no. 3, p. 98, Sep. 2018, doi:

10.3390/medicines5030098.

[15] R. C. Padalia, R. S. Verma, A. Chauhan, P. Goswami, S. K. Verma, and M. P. Darokar, "Chemical composition of Melaleuca linarrifolia Sm. from India: A potential source of 1,8-cineole," *Ind. Crops Prod.*, vol. 63, pp. 264–268, Jan. 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.09.039.

[16] E. Aziz *et al.*, "Rosemary species: a review of phytochemicals, bioactivities and industrial applications," *South African J. Bot.*, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.sajb.2021.09.026.

[17] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, "Biological effects of essential oils - A review," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 2. pp. 446–475, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.

[18] Y. Jiang *et al.*, "Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 32, no. 1, pp. 63–68, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.etap.2011.03.011.

[19] M. Chraibi, A. Farah, O. Elamin, H. Iraqui, and K. Fikri-Benbrahim, "Characterization, antioxidant, antimycobacterial, antimicrobial effcts of Moroccan rosemary essential oil, and its synergistic antimicrobial potential with carvacrol," *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, vol. 11, no. 1, pp. 25–29, Jan. 2020, doi: 10.4103/japtr.JAPTR_74_19.

[20] I. Borrás-Linares *et al.*, "Rosmarinus officinalis leaves as a natural source of bioactive compounds," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 11, pp. 20585–20606, Sep. 2014, doi: 10.3390/ijms151120585.

[21] A. Begum, S. Sandhya, S. S. Ali, K. R. Vinod, S. Reddy, and D. Banji, "An in-depth review on the medicinal flora Rosmarinus officinalis (lamiaceae)," *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, vol. 12, no. 1, pp. 61–73, 2013.

[22] M. M. Fiume *et al.*, "Safety Assessment of Rosmarinus officinalis (Rosemary)-Derived Ingredients as Used in Cosmetics," *Int. J. Toxicol.*, vol. 37, no. 3_suppl, pp. 12S-50S, Nov. 2018, doi: 10.1177/1091581818800020.

[23] J. Fakchich and M. Elachouri, "Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 154, no. 1, pp. 76–87, May 2014, doi: 10.1016/j.jep.2014.03.016.

[24] "Administrative Division of Morocco. Ministry of National Planning, Urban Development, Housing and Urban Policy.," *High Comm. Plan, Morocco*, 2018, [Online]. Available: www.hcp.ma.

[25] J. F. Clevenger, "American pharmaceutical association 345 apparatus for t h e determination of volatile oil.*," *J. Pharm. Sci.*, vol. 17, no. April, pp. 345–349, 1928, doi: 10.1002/jps.3080170407.

[26] D. J. Charles and J. E. Simon, "Comparison of Extraction Methods for the Rapid Determination of Essential Oil Content and Composition of Basil," *J. AMER. SOC HORT. SCI*, vol. 115, no. 3, pp. 458–462, 1990.

[27] M. Fadil, A. Farah, T. Haloui, and S. Rachiq, "Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de Rosmarinus officinalis L. par la méthodologie de surface de réponse Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of Rosmarinus officinalis L. by response surface methodology," *J. Mater. Environ. Sci*, vol. 6, no. 8, pp. 2346–2357, 2015.

[28] M. J. Jordán, R. M. Martínez, C. Martínez, I. Moñino, and J. A. Sotomayor, "Polyphenolic extract and essential oil quality of Thymus zygis ssp. gracilis shrubs cultivated under different watering levels," *Ind. Crops Prod.*, vol. 29, no. 1, pp. 145–153, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.indcrop.2008.04.021.

[29] C. Marion, Y. Pelissier, R. Sabatier, C. Andary, and J. M. Bessiere, "Calculation of essential oil yield without prior extraction—application to the genus Forsythia Vahl. (Oleaceae)," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 379–387, 1994, doi: 10.1080/10412905.1994.9698403.

[30] G. Sacchetti *et al.*, "Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods," *Food Chem.*, vol. 91, no. 4, pp. 621–632, Aug. 2004, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.06.031.

[31] D. F. Basri, C. K. Luoi, A. M. Azmi, and J. Latip, "Evaluation of the combined effects of stilbenoid from Shorea gibbosa and vancomycin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)," *Pharmaceuticals*, vol. 5, no. 10, pp. 1032–1043, Sep. 2012, doi: 10.3390/ph5091032.

[32] A. Wollinger, É. Perrin, J. Chahboun, V. Jeannot, D. Touraud, and W. Kunz, "Antioxidant activity of hydro distillation water residues from Rosmarinus officinalis L. leaves determined by DPPH assays," *Comptes Rendus Chim.*, vol. 19, no. 6, pp. 754–765, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.crci.2015.12.014.

[33] M. Elyemni *et al.*, "Extraction of Essential Oils of Rosmarinus officinalis L. by Two Different Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation," *Sci. World J.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/3659432.

[34] N. Hendel *et al.*, "Essential Oil from Aerial Parts of Wild Algerian Rosemary: Screening of Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities," *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, vol. 22, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2019, doi: 10.1080/0972060X.2019.1590246.

[35] W. Yeddes *et al.*, "Effect of Environmental Conditions on the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from Rosmarinus officinalis L. Growing Wild in Tunisia," *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, vol. 21, no. 4, pp. 972–986, Jul. 2018, doi: 10.1080/0972060X.2018.1533433.

[36] R. Rehman, M. A. Hanif, Z. Mushtaq, and A. M. Al-Sadi, "Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review," *Food Rev. Int.*, vol. 32, no. 2, pp. 117–160, Apr. 2016, doi: 10.1080/87559129.2015.1057841.

[37] Y. Li, D. Kong, Y. Fu, M. R. Sussman, and H. Wu, "The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants," *Plant Physiol. Biochem.*, vol. 148, pp. 80–89, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.

[38] P. A. Riabov *et al.*, "The chemical, biological and thermal characteristics and gastronomical perspectives of Laurus nobilis essential oil from different geographical origin," *Ind. Crops Prod.*, vol. 151, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112498.

[39] H. El-Zaeddi, Á. Calín-Sánchez, L. Noguera-Artiaga, J. Martínez-Tomé, and Á. A. Carbonell-Barrachina, "Optimization of harvest date according to the volatile composition of Mediterranean aromatic herbs at different vegetative stages," *Sci. Hortic. (Amsterdam).*, vol. 267, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.scienta.2020.109336.

[40] K. A. Khalid, "Harvest stages and their influences on Lantana camara L. essential oil," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 22, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.bcab.2019.101403.

[41] R. Ben Ayed *et al.*, "SNP discovery and structural insights into OeFAD2 unravelling high oleic/linoleic ratio in olive oil," *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 20, pp. 1229–1243, 2022.

[42] A. Raffo, E. Mozzanini, S. Ferrari Nicoli, E. Lupotto, and C. Cervelli, "Effect of light intensity and water availability on plant growth, essential oil production and composition in Rosmarinus officinalis L," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 246, no. 1, pp. 167–177, Jan. 2020, doi: 10.1007/s00217-019-03396-9.

[43] L. A. Conde-Hernández, J. R. Espinosa-Victoria, A. Trejo, and J. Guerrero-Beltrán, "CO2-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (Rosmarinus officinalis)," *J. Food Eng.*, vol. 200, pp. 81–86, May 2017, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022.

[44] D. Sadeh, N. Nitzan, D. Chaimovitsh, A. Shachter, M. Ghanim, and N. Dudai, "Interactive effects of genotype, seasonality and extraction method on chemical compositions and yield of essential oil from rosemary (Rosmarinus officinalis L.)," *Ind. Crops Prod.*, vol. 138, Oct. 2019,

doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.068.

[45] K. Hannour, A. Boughdad, A. Maataoui, and A. Bouchelta, "Chemical composition of Rosmarinus officinalis (Lamiaceae) essential oils and evaluation of their toxicity against Bruchus rufimanus (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in Morocco," *Int. J. Trop. Insect Sci.*, vol. 38, no. 3, pp. 192–204, Sep. 2017, doi: 10.1017/S1742758418000012.

[46] A. Bouyahya *et al.*, "Chemical composition of Mentha pulegium and Rosmarinus officinalis essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities," *Microb. Pathog.*, vol. 111, pp. 41–49, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.015.

[47] A. Ainane *et al.*, "Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: Cedrus atlantica, Citrus limonum, Rosmarinus officinalis, Syzygium aromaticum and Eucalyptus globules," *Mater. Today Proc.*, vol. 13, pp. 474–485, 2018, doi: 10.1016/j.matpr.2019.04.004.

[48] A. Farhat *et al.*, "Efficiency of the optimized microwave assisted extractions on the yield, chemical composition and biological activities of Tunisian Rosmarinus officinalis L. essential oil," *Food Bioprod. Process.*, vol. 105, pp. 224–233, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.fbp.2017.07.011.

[49] S. Salido, J. Altarejos, M. Nogueras, A. Saánchez, and P. Luque, "Chemical composition and seasonal variations of rosemary oil from southern Spain," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 10–14, 2003, doi: 10.1080/10412905.2003.9712248.

[50] M. Leporini, M. Bonesi, M. R. Loizzo, N. G. Passalacqua, and R. Tundis, "The essential oil of salvia rosmarinus spenn. From Italy as a source of health-promoting compounds: Chemical profile and antioxidant and cholinesterase inhibitory activity," *Plants*, vol. 9, no. 6, pp. 1–13, Jun. 2020, doi: 10.3390/PLANTS9060798.

[51] D. Pitarokili, O. Tzakou, and A. Loukis, "Composition of the essential oil of spontaneous rosmarinus officinalis from greece and antifungal activity against phytopathogenic Fungi," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 20, no. 5, pp. 457–459, 2008, doi: 10.1080/10412905.2008.9700058.

[52] M. M. Özcan and J. C. Chalchat, "Chemical composition and antifungal activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) oil from Turkey," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 59, no. 7–8, pp. 691–698, 2008, doi: 10.1080/09637480701777944.

[53] J. M. Andrade, C. Faustino, C. Garcia, D. Ladeiras, C. P. Reis, and P. Rijo, "Rosmarinus officinalis L.: An update review of its phytochemistry and biological activity," *Futur. Sci. OA*, vol. 4, no. 4, 2018, doi: 10.4155/fsoa-2017-0124.

[54] Y. Li, D. Kong, Y. Fu, M. R. Sussman, and H. Wu, "The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants," *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 148. Elsevier Masson SAS, pp. 80–89, Mar. 01, 2020, doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.

[55] A. Skender *et al.*, "Morphological and Biochemical Properties in Fruits of Naturally Grown Cornelian Cherry (Cornus mas L.) Genotypes in Northwest Bosnia and Herzegovina," *Sustainability*, vol. 14, no. 8, p. 4579, 2022.

[56] C. Formisano, S. Delfine, F. Oliviero, G. C. Tenore, D. Rigano, and F. Senatore, "Correlation among environmental factors, chemical composition and antioxidative properties of essential oil and extracts of chamomile (Matricaria chamomilla L.) collected in Molise (South-central Italy)," *Ind. Crops Prod.*, vol. 63, pp. 256–263, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.09.042.

[57] A. Elamrani, S. Zrira, B. Benjilali, and M. Berrada, "A study of moroccan rosemary oils," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 487–495, 2000, doi: 10.1080/10412905.2000.9699572.

[58] T. Miwa *et al.*, "The effects of tuberactinomycin—n (tum—n) for severe pulmonary tuberculosis," *Kekkaku(Tuberculosis)*, vol. 50, no. 8, pp. 229–233, 1993, doi: 10.11400/kekkaku1923.50.8_229.

[59] A. Raffo, E. Mozzanini, S. Ferrari Nicoli, E. Lupotto, and C. Cervelli, "Effect of light intensity and water availability on plant growth, essential oil production and composition in Rosmarinus

officinalis L," *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 246, no. 1, pp. 167–177, Jan. 2019, doi: 10.1007/s00217-019-03396-9.

[60] S. Melito, G. L. Petretto, S. Chahine, G. Pintore, and M. Chessa, "Seasonal variation of essential oil in rosmarinus officinalis leaves in sardinia," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 14, no. 7, 2019, doi: 10.1177/1934578X19864005.

[61] M. R. Ismaili *et al.*, "Improvement of Harvesting Practices for Sustainable Development of Moroccan Rosemary Mediterranean's Scrublands," *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, vol. 20, no. 5, pp. 1266–1274, Sep. 2017, doi: 10.1080/0972060X.2017.1401961.

[62] M. F. Lemos, M. F. Lemos, H. P. Pacheco, D. C. Endringer, and R. Scherer, "Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity," *Ind. Crops Prod.*, vol. 70, pp. 41–47, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.02.062.

[63] I. Bajalan, R. Rouzbahani, A. Ghasemi Pirbalouti, and F. Maggi, "Quali-quantitative variation of essential oil from Iranian rosemary (Rosmarinus officinalis L.) accessions according to environmental factors," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 30, no. 1, pp. 16–24, Jan. 2018, doi: 10.1080/10412905.2017.1380542.

[64] R. Sarmoum, S. Haid, M. Biche, Z. Djazouli, B. Zebib, and O. Merah, "Effect of salinity and water stress on the essential oil components of rosemary (Rosmarinus officinalis L.)," *Agronomy*, vol. 9, no. 5, May 2019, doi: 10.3390/agronomy9050214.

[65] S. M. Vahdat, M. Khavarpour, and S. Kazemi, "Chemical Composition, Antimicrobial and Analgesic Properties of Rosmarinus officinalis L. from North of Iran," *J. Med. Plants By-products*, vol. 1, pp. 107–114, 2019.

[66] A. Megzari, A. Farah, M. I. Houssaini, and E. M. EL Hadrami, "Provenance effect on the yield, chemical composition and antibacterial activity of Moroccan rosemary essential oils," *Der Pharma Chem.*, vol. 7, no. 12, pp. 9–22, 2015, [Online]. Available: http://derpharmachemica.com/archive.html.

[67] I. Bajalan, R. Rouzbahani, A. G. Pirbalouti, and F. Maggi, "Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of Rosmarinus officinalis," *Ind. Crops Prod.*, vol. 107, pp. 305–311, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.indcrop.2017.05.063.

[68] M. Abdellaoui, E. dine T. Bouhlali, M. Derouich, and L. El-Rhaffari, "Essential oil and chemical composition of wild and cultivated fennel (Foeniculum vulgare Mill.): A comparative study," *South African J. Bot.*, vol. 135, pp. 93–100, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.sajb.2020.09.004.

[69] N. Chahboun *et al.*, "Extraction and study of the essential oil Rosmarinus officinalis cuellie in the region of Taza, Morocco," *Der Pharma Chem.*, vol. 6, no. 3, pp. 367–372, 2014, [Online]. Available: http://derpharmachemica.com/archive.html.

[70] M. Fadil *et al.*, "Combined treatment of Thymus vulgaris L., Rosmarinus officinalis L. and Myrtus communis L. essential oils against Salmonella typhimurium: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 126, pp. 211–220, May 2018, doi: 10.1016/j.ejpb.2017.06.002.

[71] I. Messaoudi Moussii, K. Nayme, M. Timinouni, J. Jamaleddine, H. Filali, and F. Hakkou, "Synergistic antibacterial effects of Moroccan Artemisia herba alba, Lavandula angustifolia and Rosmarinus officinalis essential oils," *Synergy*, vol. 10, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.synres.2019.100057.

[72] M. V. Alvarez, L. A. Ortega-Ramirez, B. A. Silva-Espinoza, G. A. Gonzalez-Aguilar, and J. F. Ayala-Zavala, "Antimicrobial, antioxidant, and sensorial impacts of oregano and rosemary essential oils over broccoli florets," *J. Food Process. Preserv.*, vol. 43, no. 3, Mar. 2019, doi: 10.1111/jfpp.13889.

[73] A. JAFARI-SALES and M. PASHAZADEH, "Study of chemical composition and

antimicrobial properties of Rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oil on Staphylococcus aureus and Escherichia coli in vitro," *Int. J. Life Sci. Biotechnol.*, Apr. 2020, doi: 10.38001/ijlsb.693371.

[74] S. L. de Rapper, S. Y. Tankeu, G. Kamatou, A. Viljoen, and S. van Vuuren, "The use of chemometric modelling to determine chemical composition-antimicrobial activity relationships of essential oils used in respiratory tract infections," *Fitoterapia*, vol. 154, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.fitote.2021.105024.

[75] J. Kovač *et al.*, "Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)-α-Pinene in Campylobacter jejuni," *PLoS One*, vol. 10, no. 4, Apr. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0122871.

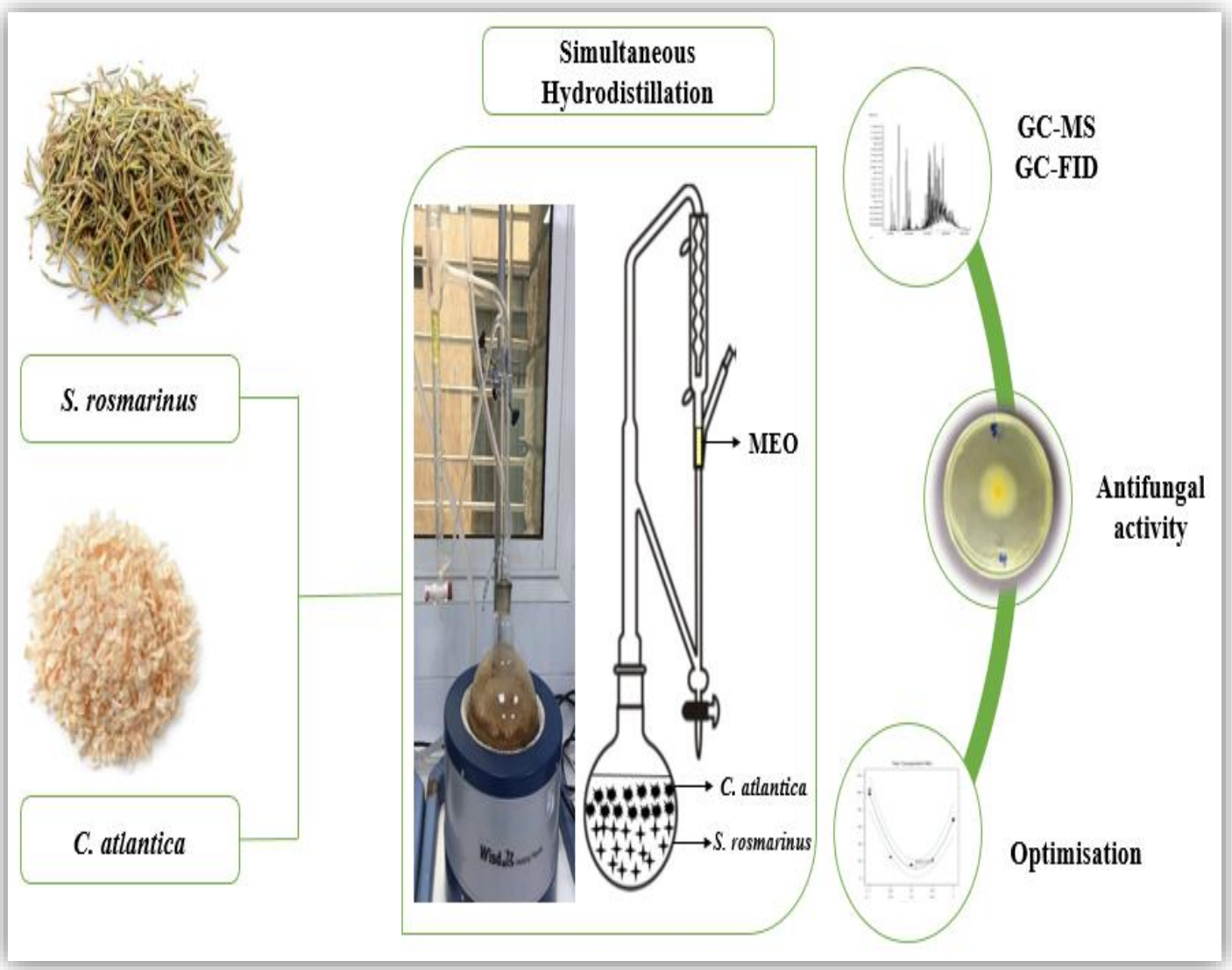
[76] A. M. Ojeda-Sana, C. M. van Baren, M. A. Elechosa, M. A. Juárez, and S. Moreno, "New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components," *Food Control*, vol. 31, no. 1, pp. 189–195, May 2013, doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.022.

[77] S. L. de Rapper, S. Y. Tankeu, G. Kamatou, A. Viljoen, and S. van Vuuren, "The use of chemometric modelling to determine chemical composition-antimicrobial activity relationships of essential oils used in respiratory tract infections," *Fitoterapia*, vol. 154, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.fitote.2021.105024.

[78] D. L. Miladinović, M. V. Dimitrijević, T. M. Mihajilov-Krstev, M. S. Marković, and V. M. Ćirić, "The significance of minor components on the antibacterial activity of essential oil via chemometrics," *LWT*, vol. 136, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2020.110305.

Article III.

Hydrodistillation simultanée de Cedrus atlantica Manetti et de *Salvia rosmarinus* Spenn : Optimisation de l'activité fongique contre la pourriture du bois en utilisant la méthodologie du plan de mélange



ARTICLE III

Hydrodistillation simultanée de Cedrus atlantica Manetti et de Salvia rosmarinus Spenn : Optimisation de l'activité antifongique contre les champignons de la pourriture du bois en utilisant la méthodologie du plan de mélange

Cette étude fait l'objet d'une publication qui sera publié prochainement

Résumé

Les fongicides chimiques sont souvent dangereux pour l'homme et l'environnement en raison de leur toxicité. L'industrie de la protection du bois accorde une grande importance à leur remplacement par des produits naturels. Cette étude visait à déterminer l'activité antifongique des huiles essentielles combinées de *Salvia rosmarinus* Spenn (*S. rosmarinus*) et *Cedrus atlantica* Manetti (*C. atlantica*) obtenues par hydrodistillation simultanée. Les huiles essentielles de *S. rosmarinus* et de *C. atlantica* ont été obtenues par hydrodistillation, et leurs combinaisons (75 %:25 %, 50 %:50 %, 25 %:75 %) ont été obtenues par une hydrodistillation simultanée combinée en utilisant une méthodologie de conception de mélange. L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de macrodilution, et la concentration efficace pour 50 % de l'effet maximal (CE_{50}) a été déterminée contre quatre champignons responsables de la pourriture du bois : *Coniophora puteana* (*C. puteana*), *Coriolus versicolor* (*C. versicolor*), *Gloeophyllum trabeum* (*G. trabeum*), et *Poria placenta* (*P. placenta*). Les résultats du rendement des huiles essentielles extraites par les méthodes précédentes ont révélé qu'avec l'augmentation de la proportion de *Cedrus atlantica* Manetti dans le mélange, les rendements des mélanges d'huiles essentielles augmentent considérablement. L'analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CG/SM) a identifié le myrténal comme un nouveau composant apparaissant dans les combinaisons binaires. Les résultats ont montré que l'hydrodistillation simultanée améliore l'activité antifongique de ces huiles essentielles. L'activité antifongique la plus élevée ou optimale a été trouvée dans une combinaison de 60% d'huiles essentielles de *S. rosmarinus* et 40% de *C. atlantica*, fournissant une valeur CE_{50} de 9,91±1,91 et 9,28±1,55 µg/mL pour *C. puteana* et *C. versicolor*, respectivement. L'activité antifongique optimale pour *G. trabeum* et *P. placenta* a été observée dans la combinaison de 55% d'huiles essentielles de *S. rosmarinus* et 45% d'huiles essentielles de *C. atlantica*, avec une valeur CE_{50} de 11,48 ± 3,73 et 22,619 ± 3,79 µg/mL, respectivement.

Cette activité a indiqué que *C. versicolor* était le champignon le plus sensible à une combinaison binaire d'huiles essentielles, tandis que les champignons les moins sensibles étaient *G. trabeum* et *P. placenta*. L'hydrodistillation simultanée combinée pourrait être utilisée pour améliorer l'activité antifongique et protéger le bois contre les champignons de pourriture du bois.

ARTICLE III

Simultaneous Hydrodistillation of *Cedrus atlantica* Manetti and *Salvia rosmarinus* Spenn: Optimization of anti-wood-decay fungal activity using mixture design methodology

Saoussan Annemer [1], Yassine Ez zoubi [1,2], Badr Satrani [3], Hamid Stambouli [4], Amine Assouguem [1], Taoufik Bouayoun [4], and Abdellah Farah [1,*]

[1]Laboratory of Applied Organic Chemistry, Faculty of Sciences and Techniques, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fez B.P. 2202, Morocco

[2]Biotechnology, Environmental Technology and Valorization of Bio-Resources Team, Department of Biology, Faculty of Sciences and Techniques Al-Hoceima, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco

[3]Forestry Research Center - Rabat, Avenue Omar Ibn Al Khattab, BP 763, - Rabat-Agdal. 10050, Morocco

[4]Institute of Forensic Sciences of Gendarmerie Royal, Rabat-Institute, B.P. 6597, Morocco

Correspondence: Abdellah Farah, Faculty of Sciences and Techniques, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Morocco

Email: farah.abdellah1@gmail.com

Abstract: Chemical fungicides are often harmful to people and the environment because of their toxicity. The wood protection industry places a high priority on replacing them with natural products. Therefore, this investigation focused on developing a formulation of a binary combination *of Salvia rosmarinus* Spenn and *Cedrus atlantica* Manetti obtained by Simultaneous hydrodistillation to protect the wood from decay using a mixture design methodology. The chemical composition of EOs was identified by Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), and their anti-wood-decay fungal activity was assessed using the macrodilution method against four fungi responsible for wood decay: *Coniophora puteana*, *Coriolus versicolor*, *Gloeophyllum trabeum*, and *Poria placenta*. The results of GC/MS identified myrtenal as a new component appearing in all binary combinations. The optimum anti-wood-decay fungal activity was observed in a combination of 60% *S. rosmarinus* and 40% *C. atlantica* essential oils, providing an effective concentration for 50 percent of maximal effect (EC_{50}) value of 9.91 ± 1.91 and 9.28 ± 1.55 µg/mL for *C. puteana*

and *C. versicolor*, respectively. The highest anti-wood-decay fungal activity for *G. trabeum* and *P. placenta* was found in the combination of 55% of *S. rosmarinus* and 45% of *C. atlantica* essential oils, with an EC_{50} value of 11.48±3.73 and 22.619±3.79 µg/mL, respectively. Combined simultaneous hydrodistillation improved the antifungal effect of these essential oils. These results could be used to improve antifungal activity and protect wood against wood-decay fungi.

Keywords: Anti-wood-decay fungal activity, *Cedrus atlantica* Manetti, mixture design, *Salvia rosmarinus* Spenn, simultaneous hydrodistillation.

1. Introduction

Although wood is an organic material, it is often damaged by microorganisms, including fungi, especially in hot, humid areas. Fungi decay significantly impacts the construction industry because of the considerable damage caused to wood in use and storage [1]. Preserving wood to prevent decay and other biodegradation processes is essential during storage, transportation, and use. The two types of wood-decay fungi are white-rot fungi and brown-rot fungi [2,3]. White-rot fungi attack lignin, cellulose, and hemicellulose, while brown-rot fungi degrade cellulose and the hemicellulose of cell walls.

Sometimes, wood-decay fungi demethylate, ionize, or weakly depolymerize lignin [4]. Most wood products are treated with chemical fungicides, such as benzimidazoles, copper acid chromate, copper chromate arsenate, and copper zinc arsenate, to preserve their functionality and extend their lives [5,6]. However, chemical fungicides are often harmful to people and the environment because of their toxicity [7]. Therefore, this re-search focused on developing effective, non-toxic, lower-cost, easy-to-use wood preservatives to protect wood from decay [8]. Several scientists have suggested the utilization of aromatic and medicinal plants as agents to prevent wood-decay fungi [9-12]. Using volatile formulations derived from aromatic and medicinal plants could offer many advantages over current synthetic products. Indeed, essential oils are only mildly toxic to the environment and can exhibit higher biocidal activity [13].

Wood extracts constitute an important class of secondary metabolites [14]. Several wood species seem indebted contain chemical compounds [15,16]. These compounds make trees resistant to insect attacks [17]. One of these trees is the Atlas cedar, one of the most economically and ecologically important species in the mountains of Morocco. *Cedrus*

atlantica Manetti (*C. atlantica*), known as the Atlas cedar, belongs to the Pinaceae family and is considered the oldest tree after Pinusgenus [18]. Cedarwood essential oil is antiseptic, anti-inflammatory [19], antifungal, purifying, and relaxing [20]. Cedarwood essential oils are helpful in perfumery and cosmetics [21] because of the himachalenes they contain, such as β-hemachalene, α-hemachalene and γ-hemachalene [22]. It is also used in perfumery and cosmetology. Moreover, it is prescribed for dermatitis and skin inflammation.

The Mediterranean region is characterized by *Salvia rosmarinus* Spenn (*S.rosmarinus*), commonly known as rosemary, which belongs to the Lamiaceae family. One of the most widely used medicinal plants worldwide, rosemary, is Morocco's most important wild species [23]. The essential oil *S.rosmarinus* is widely used for treating various diseases due to its pharmacological properties [24]. Several studies have shown that the essential oil *S.rosmarinus* presents antioxidant [25], antimicrobial [26], antifungal [27], anti-inflammatory [28], insecticidal [29], and antiparasitic [30] activities. It can act against fungal phytopathogens [31] due to its richness in monoterpene such as 1,8-cineole, camphor and α-pinene [32].

The studied EOs' antifungal activity against wood-decay fungi has been previously reported for *S. rosmarinus* [33] and *C. atlantica* [34]. Yet no study has examined the synergistic effects of binary combinations in achieving effective antifungal activity at sufficiently low concentrations. This combination was chosen to facilitate sesquiterpene extraction using monoterpenes as a green solvent, thus reducing the extraction duration of sesquiterpenes by improving biological activity. This study aimed to develop a formulation of the two essential oils obtained by a simultaneous hydrodistillation of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* to optimize the anti-wood-decay fungal activity against four wood-decay fungi using the methodology of experimental design.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

The aerial parts of *S. rosmarinus* were harvested from the Talsint area (eastern Morocco) (latitude 32°32'18.29"N, longitude 3°26'32.143"W). *C. atlantica* sawdust was collected from a cedarwood sawmill in Azrou (the Middle Atlas Mountains in Morocco) (latitude 33°26'9.226"N, longitude 5°13'21.104"W). All plants were collected during the same period—in April—because it is the best time to exploit rosemary [35]. The herb should be dried in a shady place at an ambient temperature.

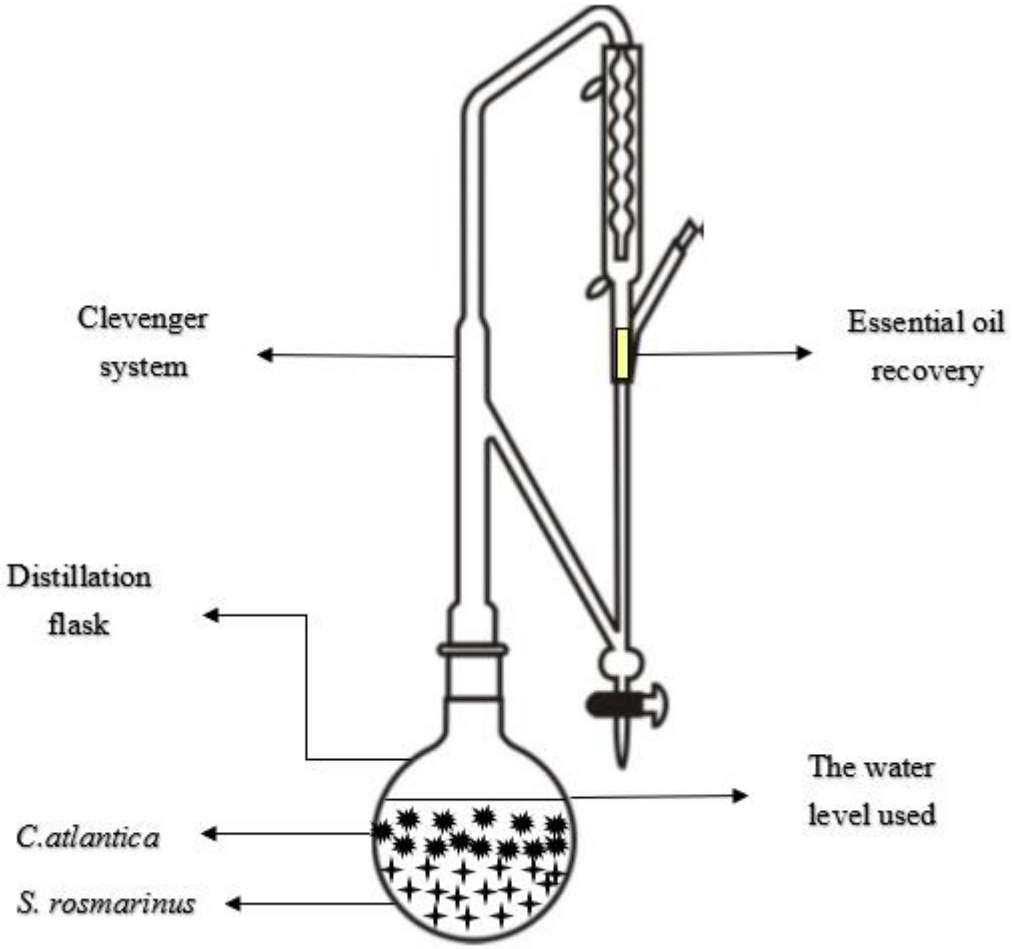


Figure 1: Combined-simultaneous hydrodistillation of *S. rosmarinus* and *C. atlantica*

2.2. Essential Oils Extraction

The aerial parts of *S. rosmarinus*, the wood sawdust of *C. atlantica*, and the binary mixtures of the two plants were distillated by hydrodistillation and simultaneous hydrodistillation, using a Clevenger-type apparatus, as performed by [36-38]. The two plants were placed in two layers, with *S. rosmarinus* at the bottom of the distillation flask and the wood sawdust of *C. atlantica* at the top (Figure 1). The ratio of the plants in the mixture varied according to the mixture design (Table 1). A total of 200 g of dried plants was put in a two L distillation flask containing one L of distilled water, and the mixture was heated for four hours to a boil, except for *S. rosmarinus* and *C. atlantica* alone, which were heated for 3 hours and 8 hours to a boil, respectively. The essential oils were collected, dried with anhydrous sodium sulfate, and stored at 4°C in an opaque green flask until used. The experiments were performed in triplicate.

2.3. Chromatographic analysis

The essential oils were chemically analyzed employing gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) and flame ionization detection (GC-FID). GC-FID analysis was performed for component quantification, whereas GC/MS analysis was carried out for identification.

All the samples were analyzed with gas chromatography using a capillary column equipped with HP-5 (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 µm), an FID detector, and an injector set at 275°C. After five minutes, the oven temperature was increased from 50°C to 250°C at a rate of 4°C/min. Nitrogen (1.8 ml/min) was used as the carrier gas. Samples were diluted 1/50 in methanol and injected in a 1 µl volume, utilizing a split mode at a 1/50 ratio and a flow rate of 72.1 ml/min. The component proportions of the EOs were given as percentages evaluated applying peak area normalization. The retention indices (RI) on the HP-5 MS column were calculated employing homologous series (C_8–C_{28}) alkanes.

The gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis was conducted using a Hewlett-Packard gas chromatographer (HP 6890) and a mass spectrometer (HP and stationary syringe 5973). The employed column was HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness). The column temperature was set at 50°C and increased to 250°C at a rate of 2°C/min. The carrier gas was helium (99.995% purity), the flow rate was 1.5 mL/min, the split ratio was 1/74.7, and the flow rate was 112 mL/min. The MS identities of the components were approved employing the NIST 98 spectral library. The ionization voltage was 70 eV, the ion source temperature was 230°C, and the scan mass range was 35–450 m/z. Component identification was verified by checking the elution order of the compounds with the relative retention indices reported in the literature. All the experiments were conducted in triplicate.

2.4. Anti-Wood-Decay Fungal Activity

The anti-wood-decay fungal activities of the essential oils were evaluated against four wood-decay fungi using the methods of Remmal et al. [39] and Satrani et al. [40], with slight modification. The wood-decay fungal strains were one white-rot fungi (*Coriolus versicolor* [Linnaeus] Quélet, [ATCC 12679]) and tree brown-rot fungi (*Gloeophyllum trabeum* [Persoon ex Fries] Murril [ATCC 11539]), (*Coniophora puteana* [Schumacher ex Fries] Karsten [ATCC 9351]), and (*Poria placenta* [Fries] Cooke sensu J. Eriksson [ATCC 9891]). These fungi were taken from the Culture Collections of the Mycotheque of Microbiology and Mycology Laboratory at the Forest Research Center in Rabat, Morocco.

EOs diluted serially in a sterile agar solution at 0.2% 20 mL of solid medium malt ex-tract were kept in sterilized Petri dishes to obtain final concentrations of 7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 µg/L (w/v). A negative control was prepared by substituting the EOs with an agar solution of 0.2%. One fragment of 1 cm^3 diameter was put in the center of the Petri dishes. Each Petri dish was closed with parafilm and incubated at 25°C for seven days. Anti-wood-decay fungal assays were carried out in triplicate. The anti-wood-decay fungal activity was expressed as EC_{50} (the effective concentration for 50 percent of maximal effect). EC_{50} values (concentrations that are 50% inhibitory of mycelium growth) were calculated by the following measurement of the inhibition (percentage) of mycelial growth:

$$Mycelial\ growth\ inhibition\ (\%) = \frac{DC - DT}{DC} \times 100 \qquad Eq.\ (1)$$

Where DC and DT are the average diameters (mm) of mycelial growth Zone in the control and the test, respectively, the positive control was Nystatin. The EC_{50} values were calculated for each investigated EO using probit analysis [41].

2.5. Experimental Mixture design

The mixture design was performed to optimize the Anti-wood-decay fungal activity (EC_{50}) against four wood-decay fungi with minimal experiments. This investigation was tested to determine an optimal formulation using a combination of two plants: *S. rosmarinus* and *C. atlantica*.

A simplex-lattice design of experiments (DoE) was performed to investigate the formulation of two components, *S. rosmarinus* and *C. atlantica*, for the EC_{50} of four wood-decay fungi, *Coniophora puteana*, *Coriolus versicolor*, *Gloeophyllum trabeum*, and *Poria placenta*, to minimize the response values. The experimental design comprised five experiments (Table 1), which included two pure components in the vertices of the segment (Experiments 1 and 7), the central point 0.5:0.5 (Experiment 3), and two axial points 0.75:0.25 and 0.25:0.75 (Experiment 2 and 6) (Figure 2). The sum of the components of the mixture was 100%.

$$\sum_{i=1}^{n} x_i = 100\%$$

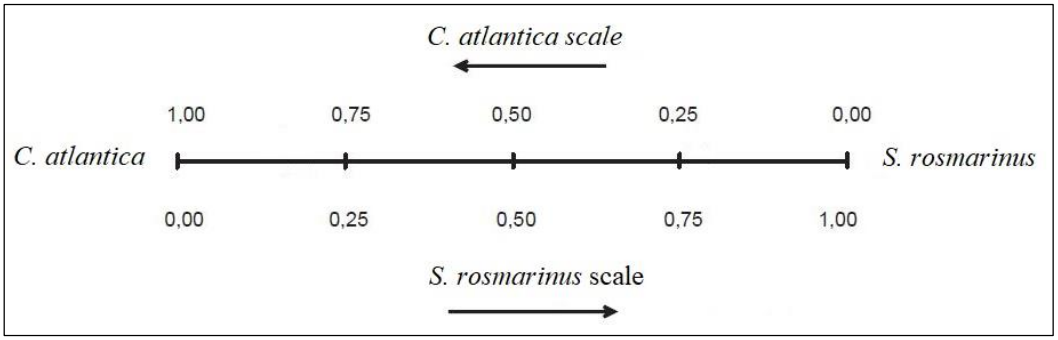


Figure 2: The segment of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* binary mixture design

Table 1: Simplex-lattice design for two components

Exp	*S. rosmarinus*	*C. atlantica*
1	1	0
2	0.75	0.25
3	0.5	0.5
4	0.5	0.5
5	0.5	0.5
6	0.25	0.75
7	0	1

The following Scheffe quadratic model was applied to the mixture design in Equation (2):

$$Y = a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 + \varepsilon \qquad Eq.\ (2)$$

Where Y is the measured response variable (the EC_{50} of four wood-decay fungi), and a_1, a_2, and a_{12} represent the linear terms and the interaction term coefficients, X_i represents the proportion of components, and ε represents the error related with the experiments.

An analysis of variance (ANOVA) was conducted to test the fitted models, and the F-value was carried to determine whether the models were statistically significant. The determination coefficients (R^2 and *adjusted* R^2) were performed to ensure the quality of the adopted models and their predictions [42-44].

Finally, the significance of the regression coefficients in each component was determined using the t-student test [45]. All the tests were conducted at a 95% confidence level.

DESIGN EXPERT software version 13 (Stat-Ease, Minneapolis, Minnesota, USA) was performed in the DoE to treat all experimental design treatments.

2.6. Statistical Analysis

Experiments were carried out through an analysis of variance based on Tukey's test of $p < 0.05$ to determine the significance of the means of the essential oil yield of the mixture design using Origin 2021 software (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA).

3. Results and discussion

3.1. Essential oils yield

The results for the essential oil yields were calculated to evaluate the effect of hydrodistillation and simultaneous hydrodistillation (Figure 3). The yield of the essential oil varied from 2.25% to 3.20%. The highest yield (3.20%) was found in *C. atlantica* essential oil obtained by hydrodistillation. The binary mixture of *S. rosmarinus*: *C. atlantica* (0.25:0.75) presented with a value of 2.96 %, followed by *S. rosmarinus*: *C. atlantica* (0.5:0.5) mixture (2.54 %), and the *S. rosmarinus* and *C. atlantica* mixture (0.75:0.25) (2.41%), were obtained by simultaneous hydrodistillation. The lowest yield (2.25%) was observed in *S. rosmarinus* essential oil obtained by hydrodistillation. The plant ratio, in combination with simultaneous hydrodistillation, significantly affect EO yields. The results showed that the yield increases with an increase in the proportion of *C. atlantica*, which explains why *C. atlantica* contains more essential oil than *S. rosmarinus*. Our results differ from those observed by [36], who found that the EO yields of the plant combinations were significantly higher than those of individual plants.

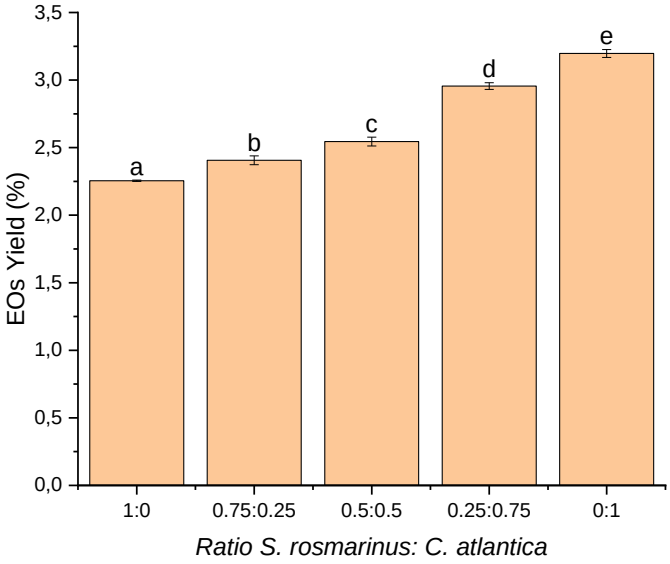


Figure 3: The average yield of the essential oils a function of the plant's ratio. Different letters (a, b, c, d, and e) listed in each column illustrate a significant difference ($p < 0.05$) according to the Tukey test.

3.2. Chemical composition of essential oil

The analyses of the essential oils of *S. rosmarinus*, *C. atlantica*, and their binary combination by gas chromatography coupled to mass spectroscopy allowed for the identification of sixty-six compounds representing 99.34–100% of total oils. Table 2 shows the retention indices, percentage composition, and identification methods.

As Table 2 indicates, the chemical analysis of *S. rosmarinus* EOs identified twenty-six components (100%) that were main volatile constituents, namely 1,8-cineole (50.86%), camphor (18.81%), α-pinene (9.36%), α-terpineol (4.40%), β-pinene (1.48%), borneol (3.90%), camphene (3.04%), p-cymene (2.21%), linalool (1.42%), and terpinen-4-ol (1.03%). The oxygenated monoterpenes represented the dominant class in *S. rosmarinus* EO (81.64 ±3.02%), followed by hydrocarbon monoterpene (17.63±1.41%), whereas sesquiterpenes were detected in much lower amounts. This composition is similar to that found by Annemer et al. [35] and Sabbahi et al. [46], who also harvested in the Province of Figuig, the Oriental region of Morocco. The *S. rosmarinus* Eos from the Province of Ouezzan, in the north of Morocco, was composed of 1,8-cineole (23.70%), camphor (18.70%), borneol (15.50%), and α-pinene (14.10%) [47]. The rosemary from Loukkos had the following composition: camphor (21.30%), 1,8-cineole (17.0%), α-pinene (9.20%), β-pinene (8.60%), camphene (7.40%), terpinen-4-ol

(2.80%), borneol (4.80%), and p-cymene (2.40%). However, the major components of *S. rosmarinus* EO from the Middle Atlas Mountains of Morocco were 1,8-cineole (46.2%), camphor (17.3%), borneol (6.80%), α-terpineol (5.30%), α-pinene (5.60%), camphene (2.60%), and terpinen-4-ol (2.20%) [48]. This Moroccan EO predominantly comprised 1,8-cineole and camphor.

Thirty-nine components were identified in *C. atlantica* EO with a mean percentage of 100%. It was dominated by oxygenated sesquiterpenes (67.2%±2.05%) and sesquiterpene hydrocarbons (31.6±0.89%). However, the quantities of oxygenated monoterpenes and monoterpenes hydrocarbons nearly ceased to exist. The *C. atlantica* EO consisted of β-himachalene (11.46%), (E)-α-atlantone (10.87%), deodarnone (10.74%), Himachalol (10.52%), α-himachalene (7.55%), E(E)-γ-atlantone (6.96%), (Z)-α-atlantone (5.56%), and γ-himachalene (3.66%). Chemical analysis showed that the chemical composition of *C. atlantica* sawdust essential oil was similar to that indicated by Zrira and Ghanmi [20], who identified the main compounds as α-(E)-atlantone (19.30 %), β-himachalene (15.10%), 8-Cedren-13-ol, (13.10%), α-himachalene (5.10%), cedroxyde (4.60%) and deodarone (4.60%). According to Bennouna et al. [49], γ-himachalane (4.05%), β-himachalane (7.23%), γ-calamenene (7.77%), δ-cadinene (7.34%), iso-cedranol (13.78%), cedranone (19.35%), cedrol (4.44%), and caryophyllene oxide (8.73%) were the major compounds of Moroccan *C. atlantica* located in Azrou in the Middle Atlas region. In contrast, Fidah et al. [34] found that E-γ-Atlantone (19.73%), E-α-Atlantone (16.86%), Isocedranol (11.68%), 9-iso-Thujopsanone (4.45%), Cedranone (4.13%), and Z α-Atlantone (4.02%) were the main components in Moroccan Cedarwood oil. Then, Ainane et al. [22] determined that α-himachalene (15.63%), β-himachalene (31.24%), and γ-himachalene (14.46%) were the most abundant compounds in *C. atlantica*. The essential oil of *C. atlantica* from the Khemisset region (located in the central plains of Morocco) was found to consist of atlantones (19.73%), 5-isocedranol (11.70%), 9-iso-thujopsanone (4.45%), and cedranone (4.30%) [50].

Forty-three components were identified in a binary combination of 75% of *S. rosmarinus* and 25% of *C. atlantica* (99.53%). The EO contained a significant proportion of oxygenated monoterpenes (72.97±2.28%) and monoterpene hydrocarbons (15.18±1.62%), but low proportions of the oxygenated sesquiterpene (7.23±1.09%) and hydro-carbon sesquiterpenes (4.15±0.98%). The major compounds were 1,8-cineole (44.85%), camphor (16.78%), α-pinene (9.36%), myrtenal (4.04%), and borneol (3.60%).

A total of forty-four compounds were identified in a binary combination of 50% of *S. rosmarinus* and 50% of *C. atlantica* (99.34%). The essential oils were featured by a substantial amount of oxygenated monoterpenes (62.07±1.52%) and oxygenated sesquiterpenes (15.32±1.61%). Conversely, low amounts of monoterpenes hydrocarbons (13.78±1.21%) and sesquiterpenes hydrocarbons (8.17±1.74%) were noted. The main constituants were 1,8-cineole (38.51%), camphor (14.09%), α-pinene (7.50%), myrtenal (3.41%), β-himachalene (3.39%), and borneol (3.19%).

The total number of identified compounds determined in a binary combination of 25% of *S. rosmarinus* and 75% of *C. atlantica*, with a total of 99.98%, was twenty-six. The oxygenated monoterpene and oxygenated sesquiterpenes (37.15±2.53% and 35.49±1.19%, respectively) were found at higher levels than the monoterpene hydrocarbons and sesquiterpenes hydrocarbons (19.02±1.56% and 8.32±1.01%, respectively) in the es essential oil. The EO was dominated by 1,8-cineole (22.66%), camphor (8.11%), β-himachalene (6.96%), deodarnone (6.52%), (E)-α-atlantone (5.76%), Himachalol (5.08%), α-himachalene (4.71%), α-pinene (4.35%), and E(E)-γ-atlantone (4.13%).

These terpenes were previously found in the individual essential oils while in different amounts, notably 1,8-cineole, camphor, α-pinene, borneol, camphene, p-cymene, β-himachalene, deodarnone, β-pinene, (E)-α-atlantone, α-himachalene, himachalol, and E(E)-γ-atlantone. When the quantity of *C. atlantica* in the binary combination was high, the amount of sesquiterpene increased. Yet when the quantity of *S. rosmarinus* in the binary combination was increased, the amounts of monoterpene were elevated. During the hydrodistillation of the binary combinations of *S. rosmarinus* and *C. atlantica*, new component appeared, namely, the myrtenal compound. The latter component was assumed to have a high value at a binary combination of 75% of *S. rosmarinus* - 25% *C. atlantica* (4.04%), followed by 50% of *S. rosmarinus* - 50% *C. atlantica* (3.41%), and 25% of *S. rosmarinus* - 75% *C. atlantica* (2.02%).

Table 2: Chemical composition of *S. rosmarinus, C. atlantica* Eos and their binary combination.

No.	Compounds	RI	RI Lit.	% Relative peak area				
				S. rosmarinus (100%)	*S. rosmarinus: C. atlantica (75%-25%)*	*S. rosmarinus: C. atlantica (50%-50%)*	*S. rosmarinus: C. atlantica (25%-75%)*	*C. atlantica (100%)*
1	α-pinene	936	938	9.36±2.18	8.10±1.10	7.50±1.25	4.35±0.51	-
2	Camphene	952	952	3.04±1.15	2.68±0.64	2.44±1.79	1.46±0.31	-
3	β-pinene	981	980	1.48±1.21	1.34±0.42	1.20±0.32	0.68±0.11	-
4	Myrcene	991	993	0.87±0.19	0.74±0.09	0.65±0.21	0.37±0.01	-
5	δ-3-carene	1007	1011	0.09±0.01	-	-	-	-
6	α-terpinene	1019	1018	0.31±0.18	0.14±0.02	0.12±0.04	0.08±0.01	-
7	p-cymene	1026	1026	2.21±1.65	1.89±0.61	1.68±0.21	1.01±0.22	-
8	4-acetyl-1-methylcyclohexene	1035	1031	-	-	-	-	0.33±0.04
9	1,8-cineole	1037	1033	50.86±3.5	44.85±2.30	38.51±1.76	22.66±1.54	-
10	γ-Terpinene	1059	1062	0.08±0.02	0.09±0.01	-	-	-
11	terpinolene	1088	1089	0.19±0.08	0.2±0.51	0.19±0.65	0.18±0.31	-
12	Linalool	1095	1098	1.42±0.34	1.23±0.33	1.03±0.46	0.58±0.11	-
13	fenchol	1116	1113	0.09±0.06	0.09±0.10	-	-	-
14	Trans rose oxyde	1130	1127	-	-	-	0.16±0.02	0.87± 0.02
15	Camphor	1149	1144	18.81±2.1	16.78±1.21	14.09±1.45	8.11±0.99	-
16	pinocarvone	1164	1163	0.28±0.08	0.22±0.07	-	-	-
17	borneol	1170	1166	3.90±1.14	3.60±0.86	3.19±1.12	1.79±1.58	-
18	terpinen-4-ol	1179	1178	1.03±0.12	0.95±0.74	0.79±0.11	0.43±0.51	-
19	α-terpineol	1184	1189	4.40±1.5	0.27±0.02	0.44±0.22	0.76±0.41	-

20	Myrtenal *	1192	1194	-	4.04±1.01	3.41±0.52	2.02±1.90	-
21	Dodecane*	1204	1200	-	-	-	0.19±0.01	-
22	verbenone	1213	1205	0.49±0.09	0.52±0.32	0.38±0.28	0.24±0.10	-
23	carvone	1241	1243	0.1±0.01	0.07±0.01	0.08±0.02	0.05±0.01	-
24	bornyl acetate	1280	1286	0.08±0.01	0.1±0.03	-	0.12±0.18	-
25	thymol	1286	1290	0.07±0.00	0.09±0.01	-	0.13±0.09	-
26	carvacrol	1297	1293	0.11±0.04	0.16±0.01	0.15±0.02	0.10±0.01	-
27	longifolene	1391	1387	-	-	-	0.27±0.14	0.55±0.04
28	tetradecane	1402	1399	-	-	-	0.38±0.08	0.74±0.09
29	himachala-2,4-diene	1409	1424	-	-	-	0.18±0.09	0.24±0.01
30	β-Caryophyllene	1431	1419	0.31±0.06	0.24±0.12	0.22±0.10	0.06±0.01	-
31	α-himachalene	1446	1447	-	1.15±1.03	1.84±0.99	4.71±2.69	7.55±1.1
32	Thujopsadiene	1463	1460	-	0.17±0.18	0.25±0.11	0.24±0.21	0.44±0.03
33	8,9-dehydro neoisolongifolène	1471	1469	-	-	-	0.19±0.02	0.23±0.01
34	γ-himachalene	1477	1476	-	0.36±0.12	0.75±0.05	2.23±1.15	3.66±1.5
35	γ-curcumene	1483	1480	-	-	-	0.11±0.07	0.36±0.03
36	(E)-β-ionone	1490	1485	-	-	-	0.28±0.03	0.29±0.01
37	β-himachalene	1499	1499	-	1.63±1.25	3.39±1.41	6.96±2.90	11.46±2.3
38	Cuparène	1502	1502	-	-	-	0.08±0.01	0.15±0.10
39	α-deshydro-ar-himachlene	1510	1511	-	0.09±0.02	0.27±012	0.14±0.09	0.34±0.03
40	δ-cadinene	1520	1524	-	0.07±0.00	0.1±0.01	0.76±0.12	0.85±0.1
41	γ-Dehydro-ar-himachalene	1528	1529	-	0.16±0.01	0.22±0.02	0.7±0.20	1.14±1.6
42	α-calacorene	1540	1542	-	0.18±0.07	0.2±0.03	0.38±0.01	1.38±1.2
43	β-calacorene	1561	1563	-	-	0.77±0.08	1.45±1.01	1.97±0.5

44	oxydo himachalene	1570	1574	-	-	-	1.03±0.05	1.35±0.07
45	Turmoil	1587	1578	-	-	0.25±0.09	0.64±0.02	1.38±0.8
46	carotol	1591	1594	-	-	-	0.56±0.04	0.71±0.01
47	Caryophyllene oxide	1599	1581	0.06±0.00	-	-	-	-
48	Cedrol	1603	1605	-	-	0.19±0.01	0.55±0.10	0.98±0.08
49	β-himachalene oxyde	1610	1611	-	0.52±0.12	1.04±0.91	1.21±1.00	2.77±0.7
50	Cedranone	1618	1620	-	0.28±0.01	0.32±0.19	-	2.7±1.2
51	1-epi-cubenol	1628	1628	-	0.33±0.15	0.67±0.02	1.73±1.10	2.52±2.6
52	3-iso-thujopsanone	1638	1637	-	0.65±0.10	1.36±0.78	1.63±0.34	2.65±2.1
53	α-cadinol*	1655	1653	-	-	-	0.14±0.01	-
54	Himachalol	1647	1647	-	1.06±1.01	1.42±0.59	5.08±1.39	10.52±2.5
55	Isocedranol	1661	1661	-	-	0.23±0.10	0.28±023	1.00±1.4
56	Cadalene	1667	1674	-	0.1±0.02	0.16±0.01	0.18±0.01	0.54±1.6
57	β-bisabolol	1670	1673	0.23±0.03	-	-	-	-
58	acorenone	1682	1685	0.13±0.02	0.17±0.10	0.19±0.09	0.49±0.45	0.69±0.1
59	deodarnone	1694	1694	-	1.43±0.31	2.50±0.16	6.52±1.10	10.74±3.3
60	E(E)-γ-atlantone	1707	1704	-	1.00±0.40	2.32±0.17	4.13±1.73	6.96±2.1
61	(Z)-α-atlantone	1719	1717	-	0.64±0.76	1.66±0.55	2.96±1.23	5.56±2.5
62	khusimol	1735	1736	-	-	0.24±0.01	0.35±0.11	0.76±0.10
63	benzyl benzoate	1763	1762	-	-	0.50±0.44	1.12±1.24	2.44±0.2
64	(E)-α-atlantone	1783	1773	-	1.15±1.40	2.43±1.52	5.76±0.13	10.87±2.3
65	4-hydroxy-muurolene	1795	1775	-	-	-	0.54±0.82	1.25±0.22
66	14 hydroxy- δ-cadinene	1808	1799	-	-	-	0.49±0.68	1.06±0.8

Monoterpene hydrocarbons	17.63±1.41	15.18±1.62	13.78±1.21	8.32±1.01	-
Oxygenated monoterpenes	81.64±3.02	72.97±2.28	62.07±1.52	37.15±2.53	1.2±0.81
Sesquiterpene hydrocarbor	0.31±0.02	4.15±0.98	8.17±1.74	19.02±1.56	31.6±0.89
Oxygenated sesquiterpenes	0.42±0.12	7.23±1.09	15.32±1.61	35.49±1.19	67.2±2.05
Total identified (%)	100±0.00	99.53±0.32	99.34±0.45	99.98±0.01	100±0.00

Compounds are identified by GC-FID , GC/MS in order of elution in a HP-5 apolar column; RI: calculated retention indices relative to n-alkanes (C8-C28) on the HP-5 MS column; RI Lit: retention indices from literature [51,52]. Volatile compounds and their proportions were identified from the chromatograms obtained on the HP-5 MS column; - : absence; Data expressed as mean ± standard deviation of triplicates; *: a new compound appeared in binary combination.

3.3. Anti-Wood-Decay Fungal Activities of the tested binary combinations

The effective concentrations of 50% of the maximal effect (EC_{50}) values obtained for each essential oil and chemical fungicide (Nystatin) are indicated in Table 3. The anti-wood-decay fungal activities of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* EOs and their binary combination of 50% *S. rosmarinus* - 50% *C. atlantica* against *Poria placenta* at different concentrations are indicated in Figure 4. It shows that the mixture of 50% *S. rosmarinus* - 50% *C. atlantica* and Nystatin presented the lowest EC_{50} values of all the studied fungi (9.98-26.22, 3. 07-12.25 µg/L), followed by the 75% *S. rosmarinus* - 25% *C. atlantica* mixture (16.92-37.62 µg/L), the 25% *S. rosmarinus* - 75% *C. atlantica* mixture (22.33-40.45 µg/L), and the *S. rosmarinus* EO (29.42-85.93 µg/L) mixture. The EC_{50} values were higher than those of *C. atlantica* EO against white and brown wood rot fungi (60.00-130.44 µg/L). C. versicolor was the most susceptible fungus in all treatments. A low concentration of 50% *S. rosmarinus* - 50% *C. atlantica* EO mixture (9.98±0.61 µg/mL) was considered sufficient to inhibit 50% of the mycelium growth of this fungus. *P. placenta* was the most resistant fungus to all treatments. The 50% *S. rosmarinus* - 50% *C. atlantica* mixture EO inhibited 50% of the *P. placenta*, with an EC_{50} value of 26.22 µg/mL. The EC_{50} values of the EOs indicated different action levels, which may be due to the chemical composition of each mixture and the fungal species.

Table 3: Effective concentration values (EC_{50}) of different mixtures of essential oils (EO) of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* against wood rot fungi.

Wood decay fungi	Mixture		EC_{50} (µg/mL) (95% confidence intervals)	Slope ± SE	Intercept± SE	R^2	*P-value*
	S. rosmarinus (%)	*C. atlantica* (%)					
C. puteana	100	0	31.62 (31.21-32.03)	1.34±0.20	2.94±0.45	0.91	0.00
	75	25	19.19 (18.19-20.19)	1.49±0.22	3.09±0.53	0.93	0.00
	50	50	11.28 (10.67-11.89)	1.47±0.23	3.43±0.54	0.92	0.00
	50	50	11.00 (10.45-11.55)	1.62±0.22	2.65±0.54	0.91	0.00
	50	50	10.89 (9.88-11.09)	1.61±0.22	2.65±0.56	0.92	0.00
	25	75	27.26 (26.04-28.48)	1.63±0.23	2.66±0.55	0.93	0.00
	0	100	71.03 (67.41-74.65)	0.96±0.11	3.23±0.26	0.97	0.00
	Nystatin		4.26 (3.40-5.12)	1.75±0.19	2.55±0.40	0.95	0.00
C. versicolor	100	0	29.42 (28.21-30.61)	1.39±0.25	2.96±0.59	0.91	0.00
	75	25	16.92 (15.97-17.87)	1.29±0.25	3.26±0.61	0.90	0.00
	50	50	10.67 (9.72-11.48)	1.26±0.19	3.69±0.46	0.92	0.00
	50	50	10.34 (9.41-11.27)	1.24±0.18	3.70±0.48	0.92	0.00
	50	50	9.98 (9.37-10.59)	1.27±0.20	3.68±0.47	0.91	0.00
	25	75	22.33 (20.88-23.78)	0.81±0.16	3.93±0.38	0.90	0.00
	0	100	60.00 (56.76-63.24)	0.73±0.07	3.89±0.16	0.97	0.00
	Nystatin		3.07 (2.21-3.93)	1.05±0.27	3.72±0.39	0.94	0.00
G. trabeum	100	0	67.51 (65.12-69.89)	1.69±0.29	1.91±0.69	0.90	0.00
	75	25	21.32 (20.37-22.27)	1.54±0.20	2.95±0.50	0.93	0.00
	50	50	15.97 (14.97-16.97)	1.55±0.26	3.13±0.62	0.91	0.00
	50	50	15.76 (14.84-16.63)	1.54±0.25	3.12±0.61	0.91	0.00
	50	50	15.69 (14.89-16.49)	1.55±0.24	3.12±0.63	0.92	0.00
	25	75	24.81 (23.37-26.25)	1.56±0.27	2.83±0.65	0.90	0.00
	0	100	103.46 (99.29-107.53)	0.93±0.08	3.12±0.20	0.96	0.00
	Nystatin		6.77 (5.78-7.76)	1.85±0.25	3.01±0.62	0.92	0.00
P. placenta	100	0	85.93 (81.49-90.37)	1.18±0.19	2.71±0.46	0.91	0.00
	75	25	37.62 (35.61-39.63)	1.25±0.22	3.03±0.53	0.90	0.00
	50	50	26.42 (25.66-27.18)	1.41±0.20	2.99±0.49	0.92	0.00
	50	50	26.32 (25.41-27.23)	1.42±0.21	3.01±0.50	0.93	0.00
	50	50	26.22 (25.21-27.23)	1.41±0.21	3.02±0.52	0.92	0.00
	25	75	40.45 (37.13-43.77)	1.13±0.18	3.11±0.43	0.91	0.00
	0	100	130.44 (125.71-135.17)	1.27±0.20	2.31±0.49	0.91	0.00
	Nystatin		12.25 (11.23-13.27)	1.34±0.19	3.50±0.45	0.94	0.00

EC_{50}: effective concentration of 50 percent of maximal effect; Slope ± SE: slope of the concentration/ inhibition regression line ± standard error; Intercept ± SE: intercept of the concentration/ inhibition regression line ± standard error; Df: degrees of freedom (Total); Significant effect at *P-value <0.05*.

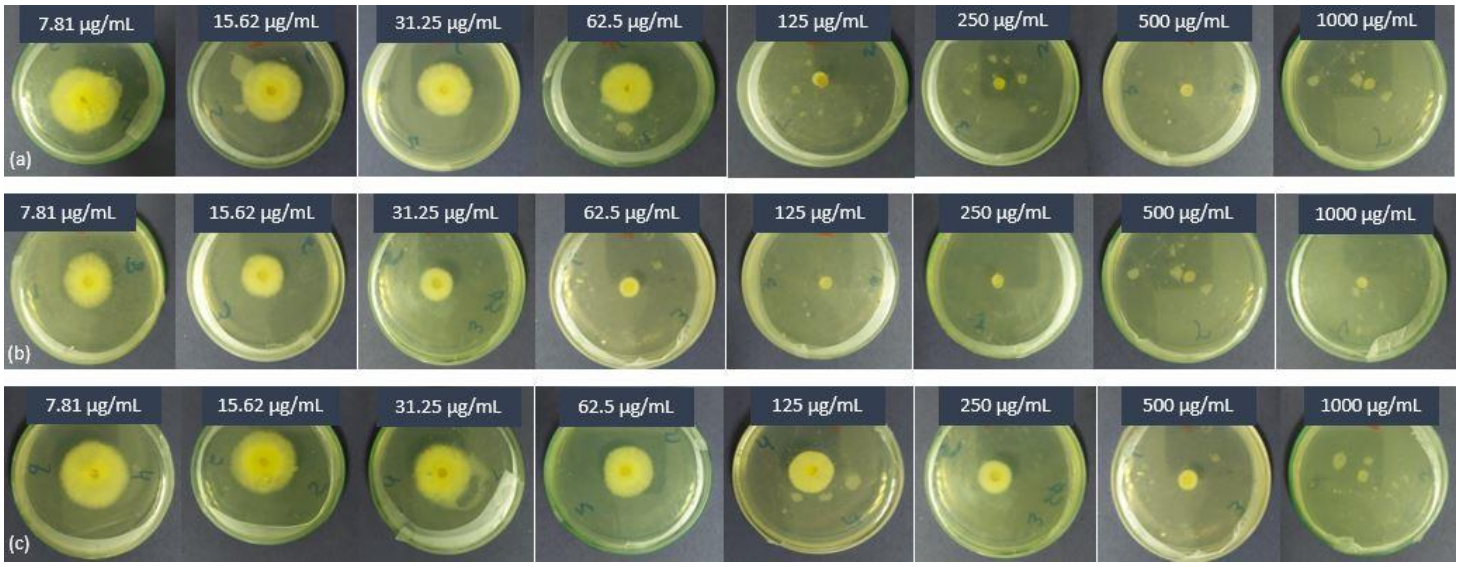


Figure 4: Anti-wood-decay fungal activities of (a) *S. rosmarinus*, (c) *C. atlantica* EOs and (b) their binary combination 50%-50% against wood decay fungi growth of *Coniophora puteana* after incubation at 25 ± 1 ◦C.

3.4. Establishment of response prediction models

The results of the seven tests obtained by the binary mixture design are presented in Table 4. Before proceeding to the analysis by mixture design, the results show that the 50% of *S. rosmarinus* - 50% *C. atlantica* mixture indicated the best anti-wood-decay fungal activity against the four wood-decay fungi.

Table 4: Experimental design and observed response values of EC_{50} of anti-wood-decay fungal using a simplex-lattice DoE with 7 essays, including three replicates of central points.

Essay	Mixture		Observed response values[a]			
	S. rosmarinus (%)	*C. atlantica* (%)	CP EC_{50} (µg/mL)	CV EC_{50} (µg/mL)	GT EC_{50} (µg/mL)	PP EC_{50} (µg/mL)
1	100	0	31.62±0.41	29.42±1.20	67.51±2.38	85.93±4.44
2	75	25	19.19±1.00	16.92±0.95	21.32±0.95	37.62±2.01
3	50	50	11.28±0.61	10.67±0.88	15.97±1.00	26.42±0.67
4	50	50	11.00±0.55	10.34±0.93	15.76±0.62	26.32±0.91
5	50	50	10.89±1.01	9.98±0.61	15.69±0.80	26.22±1.01
6	25	75	27.26±1.22	22.33±1.45	24.81±1.44	40.45±3.32
7	0	100	71.03±3.62	60.00±3.24	103.46±4.12	130.44±4.73

EC_{50}: effective concentration for 50 percent of maximal effect. CP: *Coniophora puteana*, CV: *Coriolus versicolor*, GT; *Gloeophyllum trabeum*, and PP: *Poria placenta*. a: The observed value of three replicates is given with standard deviation.

The results posted in the analysis of the variance (Table 5) show that the main effect of the regression is significant since the probability of *p-value* risk significance is less than 0.05. Based on the table, the model does not show a lack of fit since the probability of risk significance (*p-value*) is greater than 0.05. The coefficient of determination values (R^2 and *adjusted* R^2) for the four models were close to 1 (between 0.95 and 0.98). These values demonstrate good correlation between the experimental and predicted values of the fitted models and their ability to predict the four responses.

Table 5: The coefficients of determination R^2, the adjusted coefficient of determination R_{adj}^2, and the Analysis of variance of CP EC_{50}, CV EC_{50}, GT EC_{50}, and PP EC_{50}

	Source	degrees of freedom	Sum of squares	F-value	*p-value*
CP EC_{50}	Model	2	1388.64	13758.35	< 0.0001*
	Error	4	0.4037		
	Total	6	2777.69		
	Lack of Fit	2	0.3229	3.99	0.2003
	Pure Error	2	0.0809		
	R^2	0.99			
	R_{adj}^2	0.99			
CV EC_{50}	Model	2	4183.03	1881.54	< 0.0001*
	Error	4	4.45		
	Total	6	4187.48		
	Lack of Fit	2	4.21	17.67	0.0536
	Pure Error	2	0.238		
	R^2	0.99			
	R_{adj}^2	0.98			
GT EC_{50}	Model	2	6818.94	18017.91	< 0.0001*
	Error	4	0.7569		
	Total	6	6819.69		
	Lack of Fit	2	0.7144	16.82	0.0561
	Pure Error	2	0.0425		
	R^2	0.99			
	R_{adj}^2	0.98			
PP EC_{50}	Model	2	9517.64	49628.37	< 0.0001*
	Error	4	0.3836		
	Total	6	9518.03		

Lack of Fit	2	0.3636	18.18	0.0521
Pure Error	2	0.02		
R^2	0.99			
R_{adj}^2	0.98			

*: Statistically significant at $p < 0.05$. EC_{50}: effective concentration for 50 percent of maximal effect. CP: *Coniophora puteana*, CV: *Coriolus versicolor*, GT; *Gloeophyllum trabeum*, and PP: *Poria placenta*

The graph (Figure 5) shows that most points are on a straight line, indicating that the curve of the observed values versus the predicted values will appear perfectly straight. This graph is in agreement with the coefficient of determination presented in Table 5.

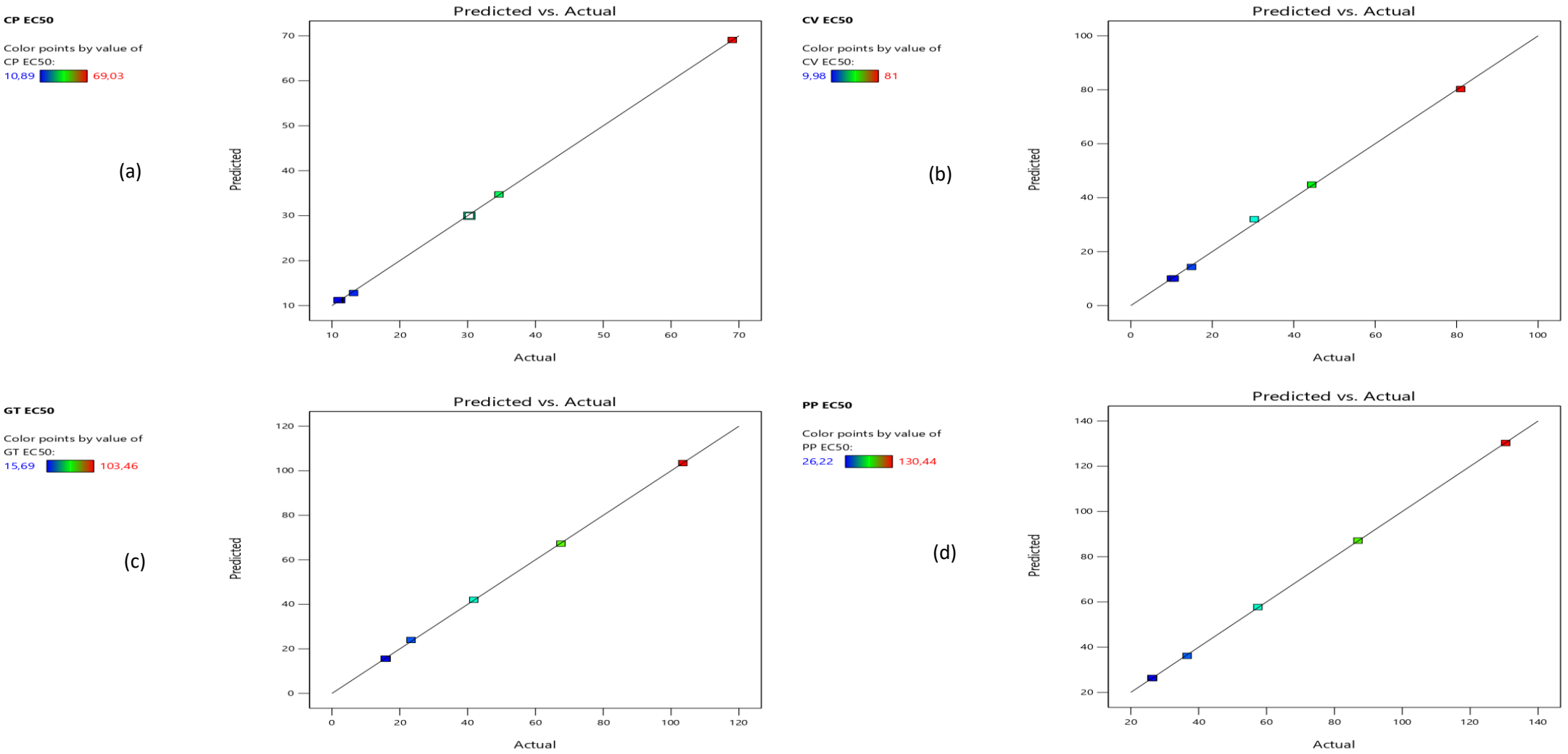


Figure 5: Observed vs. predicted values curve of (a) CP EC_{50}, (b) CV EC_{50}, (c) GT EC_{50}, and (d) PP EC_{50}. EC_{50}: effective concentration for 50 percent of maximal effect. CP: *Coniophora puteana*, CV: *Coriolus versicolor*, GT: *Gloeophyllum trabeum*, and PP: *Poria placenta*.

The effects of the two studied components were determined using the t-student test, with a significance level of 95% reported in Table 6. According to this table, all coefficients are statistically significant, with a *p-value* of less than 0.05. Therefore, the proposed model had to include all coefficients.

The mathematical models adopted for anti-wood-decay fungal activity against four wood-decay fungi are as follows:

$CP\ EC_{50} = 34.73(S.\ rosmarinus) + 69.09(C.\ atlantica) - 162.741(S.\ rosmarinus * C.\ atlantica) + \varepsilon$ *Eq. (4)*

$CV\ EC_{50} = 44.86(S.\ rosmarinus) + 80.28(C.\ atlantica) - 210.08(S.\ rosmarinus * C.\ atlantica) + \varepsilon$ *Eq. (5)*

$GT\ EC_{50} = 67.29(S.\ rosmarinus) + 103.45(C.\ atlantica) - 279.17(S.\ rosmarinus * C.\ atlantica) + \varepsilon$ *Eq. (6)*

$PP\ EC_{50} = 87.14(S.\ rosmarinus) + 130.28(C.\ atlantica) - 329.37(S.\ rosmarinus * C.\ atlantica) + \varepsilon$ *Eq. (7)*

Table 6: Estimated values of the regression coefficients of postulated models for CP EC_{50}, CV EC_{50}, GT EC_{50}, and PP EC_{50}

	Terms	Coefficient	Standard error	*t-student*	*p-value*
CP EC_{50}	*S. rosmarinus*	34.73	0.2977	9.42	0.0007*
	C. atlantica	69.09	0.2977	18.97	< 0.0001*
	*S. rosmarinus*C. atlantica*	-162.74	1.14	-11.40	0.0003*
CV EC_{50}	*S. rosmarinus*	44.86	0.988	10.64	0.0004*
	C. atlantica	80.28	0.988	19.63	< 0.0001*
	*S. rosmarinus*C. atlantica*	-210.08	3.80	-12.03	0.0003*
GT EC_{50}	*S. rosmarinus*	67.29	0.407	9.71	0.0006*
	C. atlantica	103.45	0.407	13.97	0.0002*
	*S. rosmarinus*C. atlantica*	-279.17	1.57	-10.51	0.0005*
PP EC_{50}	*S. rosmarinus*	87.14	0.29	10.43	0.0005*
	C. atlantica	130.28	0.29	14.44	0.0001*
	*S. rosmarinus*C. atlantica*	-329.37	1.12	-10.07	0.0005*

*: Statistically significant at $p < 0.05$. EC_{50}: effective concentration for 50 percent of maximal effect. CP: *Coniophora puteana*, CV: *Coriolus versicolor*, GT; *Gloeophyllum trabeum*, and PP: *Poria placenta*

After the models were validated, the next step consisted of a search for the optimal proportions that led to a minimal value of EC_{50}. Figure 6 illustrates that the desirable anti-wood-decay fungal activity against the four wood-decay fungi was in the compromise zone between 50% of *S. rosmarinus* - 50% *C. atlantica* and 75% of *S. rosmarinus* - 25% *C. atlantica*.

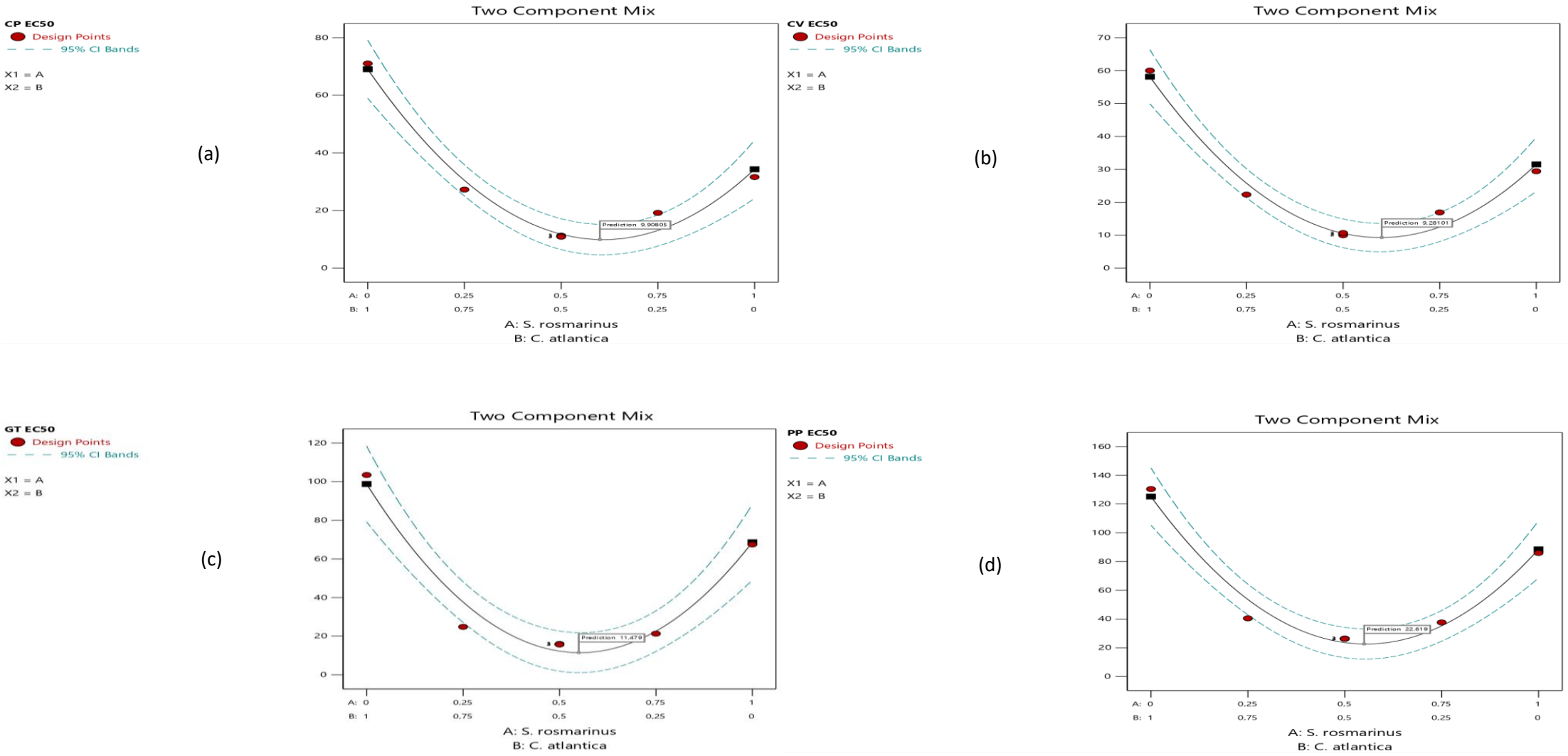


Figure 6: Binary mixture plot of (a) CP EC_{50}, (b) CV EC_{50}, (c) GT EC_{50}, and (d) PP EC_{50} according to the two plants *S. rosmarinus* and *C. atlantica*. CP: *Coniophora puteana*, CV: *Coriolus versicolor*, GT: *Gloeophyllum trabeum*, and PP: *Poria placenta*

The desirability function might help determine the best compromise among the various options for the optimum value of the studied response. Figure 7 indicates the desirability plots for the responses of CP EC_{50}, CV EC_{50}, GT EC_{50}, and PP EC_{50} obtained by the validated model. Figure 8 shows that desirability achieved a maximum value of 0.99 for a CP EC_{50} of 9.91 µg/mL and a CV EC_{50} of 9.28 µg/mL when the proportion was 60% of *S. rosmarinus* and 40% of *C. atlantica*. The proportion should be 55% of *S. rosmarinus* and 45% of *C. atlantica* to attain a GT EC_{50} of 11.48 µg/mL and a PP EC_{50} of 22.62 µg/mL, with a desirability level of 0.99.

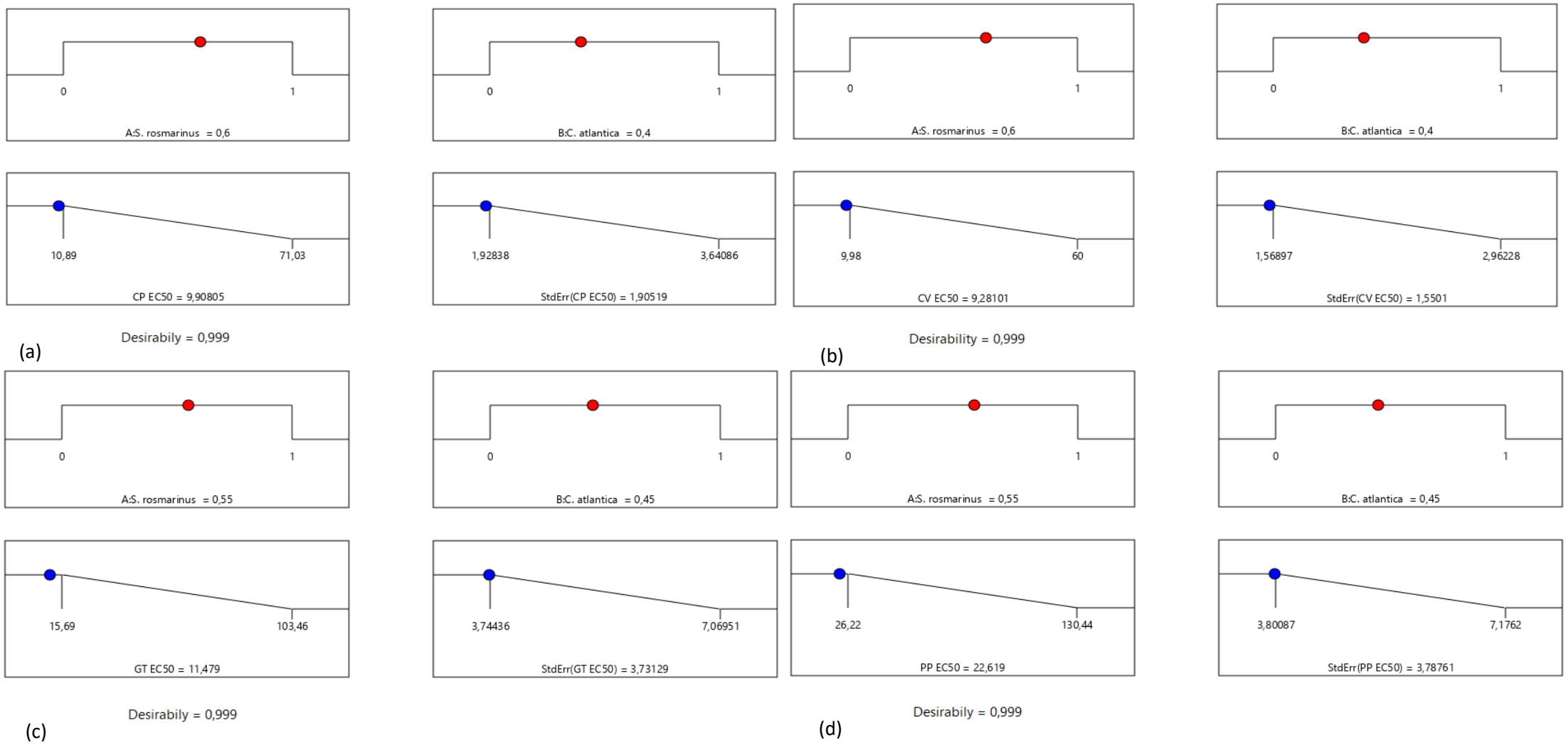


Figure 7: Desirabily plot of (a) CP EC_{50}, (b) CV EC_{50}, (c) GT EC_{50}, and (d) PP EC_{50}. CP: *Coniophora puteana*, CV: *Coriolus versicolor*, GT: *Gloeophyllum trabeum*, and PP: *Poria placent*

Through experimental design methodology, which involves employing mixture de-sign models, several studies have investigated the applications of experiment design as antimicrobial properties [53-56]. Nonetheless, no studies have been published on applying mixture design models to inhibit wood-decay fungi. This study is the first to do this. In this study, the binary mixture of 55% *S. rosmarinus* and 45% *C. atlantica* showed the highest inhibition effect against white and brown wood-decay fungi. The efficiency of this mixture could be due to the synergistic effect of the main components of *S. rosmarinus*, mainly 1,8-cineole (50.86±3.5%), camphor (18.81±2.1%), and α-pinene (9.36±2.18%), on those of *C. atlantica* (β-himachalene (11.46±2.3%), deodarnone (10.74±3.3%), himachalol (10.52±2.5%), (E)-α-atlantone (10.87±2.3%), and α-himachalene (7.55±1.1%). The synergy produced in this mixture may be due to the interactions between 1,8-cineole and β-himachalene belonging to oxygenated monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons (alcohols and ketones), respectively. The minor components may also have helped achieve synergy. This interaction between the different compounds is supported by the appearance of new compounds in binary mixtures, including myrtenal and α-cadinol. These results align with those indicated in the literature [33]: *S. rosmarinus* EO rich in camphor and 1,8-cineole presented a strong effect against *G. trabeum* and *P. placenta*. Another study found that *S. rosmarinus* essential oil containing 1,8-Cineole (19.60%), camphor (17.01%), α -pinene (15.12%) presented an EC_{50} value of 517 µg/mL against *Hexagonia apiaria* [57]. Zhang et al. [58] found that monoterpenes significantly contribute to protecting wood against white wood-decay fungi, *Trametes hirsuta*, *Schizphylhls commune*, and *Pycnoporus sanguineus*. Camphor compound exhibited a low EC_{50} against *G. trabeum* and *C. versicolor*, with values of 0.123 and 1.5 mg/mL, respectively [59]. Moreover, *C. atlantica* EO containing E-γ-Atlantone (19.73%), E-α-Atlantone (16.86%), 5-Isocedranol (11.68%), 9-iso-Thujopsanone (4.45%), Cedranone (4.13%), and Z α-Atlantone (4.02%) exhibited significant antifungal activity against *T. versicolor*, *C. puteana*, *O. placenta*, and *G. trabeum* fungus, inhibiting their growth with 1/800, 1/400, 1/400, and 1/1000 v/v concentrations, respectively [34]. Rhafouri et al. [60] found that both wood-decay fungi, *G. trabeum* and *P. placenta*, were stopped growth at a concentration of 1/250 v/v Atlas cedar seed essential oil. Another study indicated that the antifungal effect of sesquiterpenes against the brown-decay fungus *L. sulphureus* was high compared to that of the white-decay fungus *L. betulina* [16]. In addition, Ljunggren et al. [61] found that himachalene showed effective antifungal activity against *C. puteana*.

A test point was carried out on wood-decay fungi employing an optimal mixture to complete the testing of the proposed model's validity. Table 7 indicates no statistically significant difference between the experimental and predicted responses for the four wood-decay fungi. The binary mixture of 60% *S. rosmarinus* - 40% *C. atlantica* demonstrated significant wood-decay fungal activity against *C. puteana* and *C. versicolor*, with EC_{50} values of 9.99±1.52 µg/mL and 9.33±1.22 µg/mL, respectively. The binary mixture 55% *S. rosmarinus* - 45% *C. atlantica* showed significant wood-decay fungal activity against *G. trabeum* and *P. placenta*, with EC_{50} values of 11.50±1.98 µg/mL and 22.53±2.51 µg/mL, respectively. These findings support the theoretical results obtained by the desirability test, which revealed that the mixture of 60% *S. rosmarinus* - 40% *C. atlantica* could inhibit *C. puteana* and *C. versicolor*, with EC_{50} values of 9.91±1.91 µg/mL and 9.28±1.55 µg/mL, respectively. In contrast, the mixture of 55% *S. rosmarinus* - 45% *C. atlantica* could inhibit *G. trabeum* and *P. placenta* with EC_{50} values of 11.48±3.73 µg/mL and 22.62±3.79 µg/mL, respectively.

Table 7: Predicted and observed values for test points achieved for the optimal mixture of four wood-destroying fungi.

Wood-Decay Fungi	Mixture		Predicted response values EC_{50} (µg/mL)	Observed response values EC_{50} (µg/mL)
	S. rosmarinus (%)	*C. atlantica* (%)		
Coniophora puteana	60	40	9.91±1.91	9.99 ± 1.52
Coriolus versicolor	60	40	9.28±1.55	9.33±1.22
Gloeophyllum trabeum	55	45	11.48±3.73	11.50±1.98
Poria placenta	55	45	22.62±3.79	22.53±2.51

Predicted response values EC_{50}: The predicted value is provided with the response's standard deviation determined by the model; Observed response values EC_{50}: The observed value of three replicates is given with standard deviation.

4. Conclusions

In this study, we investigated the anti-wood-decay fungal activity of the essential oils of *S. rosmarinus* and *C. atlantica*, alone and in binary combination, against four wood-decay fungi using a mixture design methodology. Most compounds of the studied mixture were the same as those of the EO alone, although new compounds appeared, namely, myrtenal. The percentage of these compounds decreased or increased in the mixture according to the proportions of *S.*

rosmarinus and *C. atlantica*. The results indicated that the simultaneous extraction of the binary combination of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* maximized anti-wood-decay fungal activity. The binary combination of 60% *S. rosmarinus* and 40% *C. atlantica* EOs resulted in the highest anti-wood-decay fungal activity against *G. trabeum* and *P. placenta*. The binary combination of 55% of *S. rosmarinus* and 45% of *C. atlantica* EOs exhibited the highest anti-wood-decay fungal activity against *C. puteana* and *C. versicolor*. These activities were explained by the synergistic effect between monoterpene and sesquiterpene, which consolidate to the appearance of myrtenal components. These results could allow for the use of the anti-wood-decay fungal properties of these mixtures in industrial wood preservation to prevent wood from deteriorating and protect the environment from chemical contamination. Future research should focus on developing natural products against wood rot fungi.

References

[1] K. Yue, X. Cheng, Z. Chen, L. Tang, and W. Liu, "Investigation of decay resistance of poplar wood impregnated with alkaline copper, urea–formaldehyde, and phenol–formaldehyde resins," *Wood Fiber Sci.*, vol. 50, no. 4, pp. 392–401, 2018, doi: 10.22382/wfs-2018-051.

[2] T. Li *et al.*, "Wood decay fungi: an analysis of worldwide research," *J. Soils Sediments*, vol. 22, no. 6, pp. 1688–1702, Jun. 2022, doi: 10.1007/s11368-022-03225-9.

[3] A. Aguiar, D. Gavioli, and A. Ferraz, "Extracellular activities and wood component losses during Pinus taeda biodegradation by the brown-rot fungus Gloeophyllum trabeum," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 82, pp. 187–191, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.ibiod.2013.03.013.

[4] M. El Ajjouri *et al.*, "Activité antifongique des huiles essentielles de Thymus bleicherianus Pomel et Thymus capitatus (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre," *Biotechnol. Agron. Soc. Env.*, vol. 12, no. 4, pp. 345–351, Mar. 2008.

[5] A. Barbero-López, J. Monzó-Beltrán, V. Virjamo, J. Akkanen, and A. Haapala, "Revalorization of coffee silverskin as a potential feedstock for antifungal chemicals in wood preservation," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 152, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.ibiod.2020.105011.

[6] M. Zyani, D. Mortabit, S. El Abed, A. Remmal, and S. Ibnsouda Koraichi, "Antifungal activity of Five Plant Essential Oils against wood decay fungi isolated from an old house at the Medina of Fez," *Int. Res. J. Microbiol.*, vol. 2, no. 3, pp. 104–108, 2011.

[7] T. P. Schultz, D. D. Nicholas, and A. F. Preston, "A brief review of the past, present and future of wood preservation," *Pest Management Science*, vol. 63, no. 8. pp. 784–788, Aug. 2007, doi: 10.1002/ps.1386.

[8] A. Sil, K. Pramanik, P. Samantaray, M. F. Mondal, and V. Yadav, "Essential oils: A boon towards eco-friendly management of phytopathogenic fungi," *~ 1884 ~ J. Entomol. Zool. Stud.*, vol. 8, no. 4, pp. 1884–1891, 2020, [Online]. Available: http://www.entomoljournal.com.

[9] S. S. Cheng, C. Y. Lin, H. J. Gu, and S. T. Chang, "Antifungal activities and chemical composition of wood and leaf essential oils from cunninghamia konishii," *J. Wood Chem. Technol.*, vol. 31, no. 3, pp. 204–217, Jul. 2011, doi: 10.1080/02773813.2010.515049.

[10] S. Moutaouafiq, A. Farah, Y. Ez zoubi, M. Ghanmi, B. satrani, and D. Bousta, "Antifungal Activity of Pelargonium graveolens Essential Oil and its Fractions Against Wood Decay Fungi," *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, vol. 22, no. 4, pp. 1104–1114, Jul. 2019, doi: 10.1080/0972060X.2019.1646164.

[11] M. El Ajjouri *et al.*, "Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de Thymus algeriensis Boiss. & Reut. et Thymus ciliatus (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois," *Acta Bot. Gall.*, vol. 157, no. 2, pp. 285–294, 2010, doi: 10.1080/12538078.2010.10516206.

[12] B. Ekhlil *et al.*, "Chemical quality, antibacterial and antifungal activities of Cotula cinerea essential oil from South Morocco," *Environemental Sci.*, vol. 12, no. 5, pp. 209–216, 2016, [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/301292319.

[13] K. P. Hsu, M. L. Yang, L. Y. Wei, H. T. Ho, and C. L. Ho, "Chemical Composition and In Vitro Anti-Wood-Decay Fungal Activities of Dysphania ambrosioides Leaf Essential Oil From Taiwan," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 17, no. 5, May 2022, doi: 10.1177/1934578X221099971.

[14] T. P. Schultz and D. D. Nicholas, "Development of environmentally-benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators," *Phytochemistry*, vol. 61, no. 5, pp. 555–560, 2002, doi: 10.1016/S0031-9422(02)00267-4.

[15] S. K. Bhardwaj, S. K. Singla, and R. K. Bhardwaj, "Evaluation of plant extracts as antifungal agents against wood rotting fungi Coriolus versicolor (L.: Fr.) Quelet," *J. Indian Acad. Wood*

Sci., vol. 9, no. 1, pp. 62–65, Jun. 2012, doi: 10.1007/s13196-012-0065-4.

[16] C. C. Wu, S. L. Huang, C. H. Ko, and H. T. Chang, "Antifungal Sesquiterpenoids from Michelia formosana Leaf Essential Oil against Wood-Rotting Fungi," *Molecules*, vol. 27, no. 7, Apr. 2022, doi: 10.3390/molecules27072136.

[17] S. H. Soidrou *et al.*, "Fungicidal activity of four essential oils from Piper capense, Piper borbonense and Vetiveria zizanoides growing in Comoros against fungi decay wood," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 216–223, Jan. 2013, doi: 10.1080/10412905.2013.767758.

[18] S. Moukrim *et al.*, "Modélisation de la distribution potentielle de Cedrus atlantica Manetti au Maroc et impacts du changement climatique," *BOIS FORETS DES Trop.*, vol. 344, pp. 3–16, Jul. 2020, doi: 10.19182/bft2020.344.a31888.

[19] U. A. Shinde, A. S. Phadke, A. M. Nair, A. A. Mungantiwar, V. J. Dikshit, and M. N. Saraf, "Membrane stabilizing activity - A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil," *Fitoterapia*, vol. 70, no. 3, pp. 251–257, 1999, doi: 10.1016/S0367-326X(99)00030-1.

[20] S. Zrira and M. Ghanmi, "Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential of Cedrus atlantica (Cedarwood oil)," *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, vol. 19, no. 5, pp. 1267–1272, Jul. 2016, doi: 10.1080/0972060X.2015.1137499.

[21] S. Zriraa, "The value chain of aromatic and medicinal plants in the maghreb," *Acta Hortic.*, vol. 997, pp. 297–304, 2013, doi: 10.17660/actahortic.2013.997.36.

[22] A. Ainane *et al.*, "Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: Cedrus atlantica, Citrus limonum, Rosmarinus officinalis, Syzygium aromaticum and Eucalyptus globules," *Mater. Today Proc.*, vol. 13, pp. 474–485, 2018, doi: 10.1016/j.matpr.2019.04.004.

[23] S. Zrira, "Some Important Aromatic and Medicinal Plants of Morocco," *Med. Aromat. Plants World - Africa*, vol. 3, pp. 91–125, 2017, doi: 10.1007/978-94-024-1120-1_5.

[24] S. Habtemariam, "The Therapeutic Potential of Rosemary (Rosmarinus officinalis) Diterpenes for Alzheimer's Disease," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2016, pp. 1–14, 2016, doi: 10.1155/2016/2680409.

[25] S. Sivakanthan, S. Rajendran, A. Gamage, T. Madhujith, and S. Mani, "Antioxidant and antimicrobial applications of biopolymers: A review," *Food Res. Int.*, vol. 136, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109327.

[26] I. Messaoudi Moussii, K. Nayme, M. Timinouni, J. Jamaleddine, H. Filali, and F. Hakkou, "Synergistic antibacterial effects of Moroccan Artemisia herba alba, Lavandula angustifolia and Rosmarinus officinalis essential oils," *Synergy*, vol. 10, Jun. 2020, doi: 10.1016/j.synres.2019.100057.

[27] M. M. Özcan and J. C. Chalchat, "Chemical composition and antifungal activity of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) oil from Turkey," *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 59, no. 7–8, pp. 691–698, 2008, doi: 10.1080/09637480701777944.

[28] R. S. Borges, B. L. S. Ortiz, A. C. M. Pereira, H. Keita, and J. C. T. Carvalho, "Rosmarinus officinalis essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 229, pp. 29–45, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jep.2018.09.038.

[29] S. M. Ahsaei, S. Rodríguez-Rojo, M. Salgado, M. J. Cocero, K. Talebi-Jahromi, and G. Amoabediny, "Insecticidal activity of spray dried microencapsulated essential oils of Rosmarinus officinalis and Zataria multiflora against Tribolium confusum," *Crop Prot.*, vol. 128, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.cropro.2019.104996.

[30] M. A. O. Dawood *et al.*, "Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: An alternative approach for sustainable aquaculture," *Pathogens*, vol. 10, no. 2. MDPI AG, pp. 1–38, Feb. 01, 2021, doi: 10.3390/pathogens10020185.

[31] S. Felšöciová, N. Vukovic, P. JeAowski, and M. Kačániová, "Antifungal activity of selected

volatile essential oils against Penicillium sp.," *Open Life Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 511–521, Jan. 2020, doi: 10.1515/biol-2020-0045.

[32] D. J. Charles and D. J. Charles, "Rosemary," *Antioxid. Prop. Spices, Herbs Other Sources*, pp. 495–507, 2013, doi: 10.1007/978-1-4614-4310-0_48.

[33] V. W. Yang and C. A. Clausen, "Inhibitory Effect of Essential Oils on Decay Fungi and Mold Growth on Wood," *Am. Wood Prot. Assoc.*, pp. 62–70, 2007.

[34] A. Fidah *et al.*, "Natural durability of cedrus Atlantica wood related to the bioactivity of its essential oil against wood decaying fungi," *Maderas Cienc. y Tecnol.*, vol. 18, no. 4, pp. 567–576, 2016, doi: 10.4067/S0718-221X2016005000049.

[35] S. Annemer *et al.*, "Chemometric Investigation and Antimicrobial Activity of Salvia rosmarinus Spenn Essential Oils," *Molecules*, vol. 27, no. 9, p. 2914, 2022, doi: 10.3390/molecules27092914.

[36] S. El Kharraf, M. L. Faleiro, F. Abdellah, S. El-Guendouz, E. M. El Hadrami, and M. G. Miguel, "Simultaneous hydrodistillation-steam distillation of rosmarinus officinalis, lavandula angustifolia and citrus aurantium from morocco, major terpenes: Impact on biological activities," *Molecules*, vol. 26, no. 18, Sep. 2021, doi: 10.3390/molecules26185452.

[37] S. El Kharraf *et al.*, "Hydrodistillation and simultaneous hydrodistillation-steam distillation of Rosmarinus officinalis and Origanum compactum: Antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial effect of the essential oils," *Ind. Crops Prod.*, vol. 168, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113591.

[38] S. El kharraf, A. Farah, M. G. Miguel, S. El-Guendouz, and E. M. El Hadrami, "Two Extraction Methods of Essential Oils: Conventional and Non-conventional Hydrodistillation," *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, vol. 23, no. 5, pp. 870–889, 2020, doi: 10.1080/0972060X.2020.1843546.

[39] A. Remmal, T. Bouchikhi, K. Rhayour, M. Ettayebi, and A. Tantaoui-Elaraki, "Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 5, no. 2, pp. 179–184, 1993, doi: 10.1080/10412905.1993.9698197.

[40] B. Satrani, A. Farah, M. Fechtal, M. Talbi, M. Blaghen, and A. Chaouch, "Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Satureja calaminthe et Satureja alpine du Maroc.," *Ann. Fals. Exp. Chim.*, vol. 94, pp. 241–50, 2001.

[41] D. J. Finney, "Statisical logic in the monitoring of reactions to therapeutic drugs.," *Methods Inf. Med.*, vol. 10, no. 4, pp. 237–245, 1971, doi: 10.1055/s-0038-1636052.

[42] S. Ghafari, H. A. Aziz, M. H. Isa, and A. A. Zinatizadeh, "Application of response surface methodology (RSM) to optimize coagulation-flocculation treatment of leachate using poly-aluminum chloride (PAC) and alum," *J. Hazard. Mater.*, vol. 163, no. 2–3, pp. 650–656, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.07.090.

[43] S. S. Abu Amr, H. A. Aziz, and M. J. K. Bashir, "Application of Response Surface Methodology (RSM) for Optimization of Semi-Aerobic Landfill Leachate Treatment Using Ozone," in *Sewage and Landfill Leachate: Assessment and Remediation of Environmental Hazards*, Berghahn Books, 2016, pp. 225–246.

[44] S. N. Nam, H. Cho, J. Han, N. Her, and J. Yoon, "Photocatalytic degradation of acesulfame K: Optimization using the Box–Behnken design (BBD)," *Process Saf. Environ. Prot.*, vol. 113, pp. 10–21, 2018, doi: 10.1016/j.psep.2017.09.002.

[45] A. H. Ammar, F. Zagrouba, and M. Romdhane, "Optimization of operating conditions of Tunisian myrtle (Myrtus communis L.) essential oil extraction by a hydrodistillation process using a 24 complete factorial design," *Flavour Fragr. J.*, vol. 25, no. 6, pp. 503–507, Nov. 2010, doi: 10.1002/ffj.2011.

[46] M. Sabbahi, A. El Hassouni, A. Tahani, and A. El Bachiri, "Moroccan Journal of Chemistry Altitude effect on the chemical composition and antioxidant activity of rosemary in the region

of Talsint (Morocco)," *J. Chem*, vol. 8, pp. 866–875, 2020, [Online]. Available: http://revues.imist.ma/?journal=morjchem&page=login.

[47] A. Bouyahya *et al.*, "Chemical composition of Mentha pulegium and Rosmarinus officinalis essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities," *Microb. Pathog.*, vol. 111, pp. 41–49, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.015.

[48] K. Hannour, A. Boughdad, A. Maataoui, and A. Bouchelta, "Chemical composition of Rosmarinus officinalis (Lamiaceae) essential oils and evaluation of their toxicity against Bruchus rufimanus (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in Morocco," *Int. J. Trop. Insect Sci.*, vol. 38, no. 3, pp. 192–204, Sep. 2018, doi: 10.1017/S1742758418000012.

[49] F. Bennouna, M. Lachkar, S. El Abed, and I. Saad, "Cedrus atlantica essential oil: Antimicrobial activity and effect on the physicochemical properties of cedar wood surface.," *Moroccan Journal of Biology*, vol. 16. pp. 35–45, 2020, [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/342643382.

[50] N. Salhi, A. Fidah, M. Rahouti, M. R. Ismaili, B. Kabouchi, and A. Famiri, "Preservative effect of tetraclinis articulata and cedrus Atlantica wood extractives against fungal decay," *Madera y Bosques*, vol. 26, no. 3, p. 1, Sep. 2020, doi: 10.21829/myb.2020.2632093.

[51] M. Aberchane, B. Satrani, M. Fechtal, and A. Chaouch, "Effet de l'infection du bois de Cèdre de l'Atlas par Trametes pini et Ungulina officinalis sur la composition chimique et l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles," *Acta Bot. Gall.*, vol. 150, no. 2, pp. 223–229, 2003, doi: 10.1080/12538078.2003.10515420.

[52] A. Elamrani, S. Zrira, B. Benjilali, and M. Berrada, "A study of moroccan rosemary oils," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 487–495, 2000, doi: 10.1080/10412905.2000.9699572.

[53] M. Fadil *et al.*, "Combined treatment of Thymus vulgaris L., Rosmarinus officinalis L. and Myrtus communis L. essential oils against Salmonella typhimurium: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 126, pp. 211–220, May 2018, doi: 10.1016/j.ejpb.2017.06.002.

[54] M. Chraibi, M. Fadil, A. Farah, S. Lebrazi, and K. Fikri-Benbrahim, "Antimicrobial combined action of Mentha pulegium, Ormenis mixta and Mentha piperita essential oils against S. aureus, E. coli and C. tropicalis: Application of mixture design methodology," *LWT*, vol. 145, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111352.

[55] R. Kachkoul *et al.*, "The Synergistic Effect of Three Essential Oils against Bacteria Responsible for the Development of Lithiasis Infection: An Optimization by the Mixture Design," *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 2021, 2021.

[56] H. Falleh, M. Ben Jemaa, K. Djebali, S. Abid, M. Saada, and R. Ksouri, "Application of the mixture design for optimum antimicrobial activity: Combined treatment of Syzygium aromaticum, Cinnamomum zeylanicum, Myrtus communis, and Lavandula stoechas essential oils against Escherichia coli," *J. Food Process. Preserv.*, vol. 43, no. 12, Dec. 2019, doi: 10.1111/jfpp.14257.

[57] A. S. O. Mohareb, M. E. I. Badawy, and S. A. M. Abdelgaleil, "Antifungal activity of essential oils isolated from Egyptian plants against wood decay fungi," *J. Wood Sci.*, vol. 59, no. 6, pp. 499–505, Dec. 2013, doi: 10.1007/s10086-013-1361-3.

[58] Z. Zhang *et al.*, "Antifungal activity of monoterpenes against wood white-rot fungi," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 106, pp. 157–160, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.ibiod.2015.10.018.

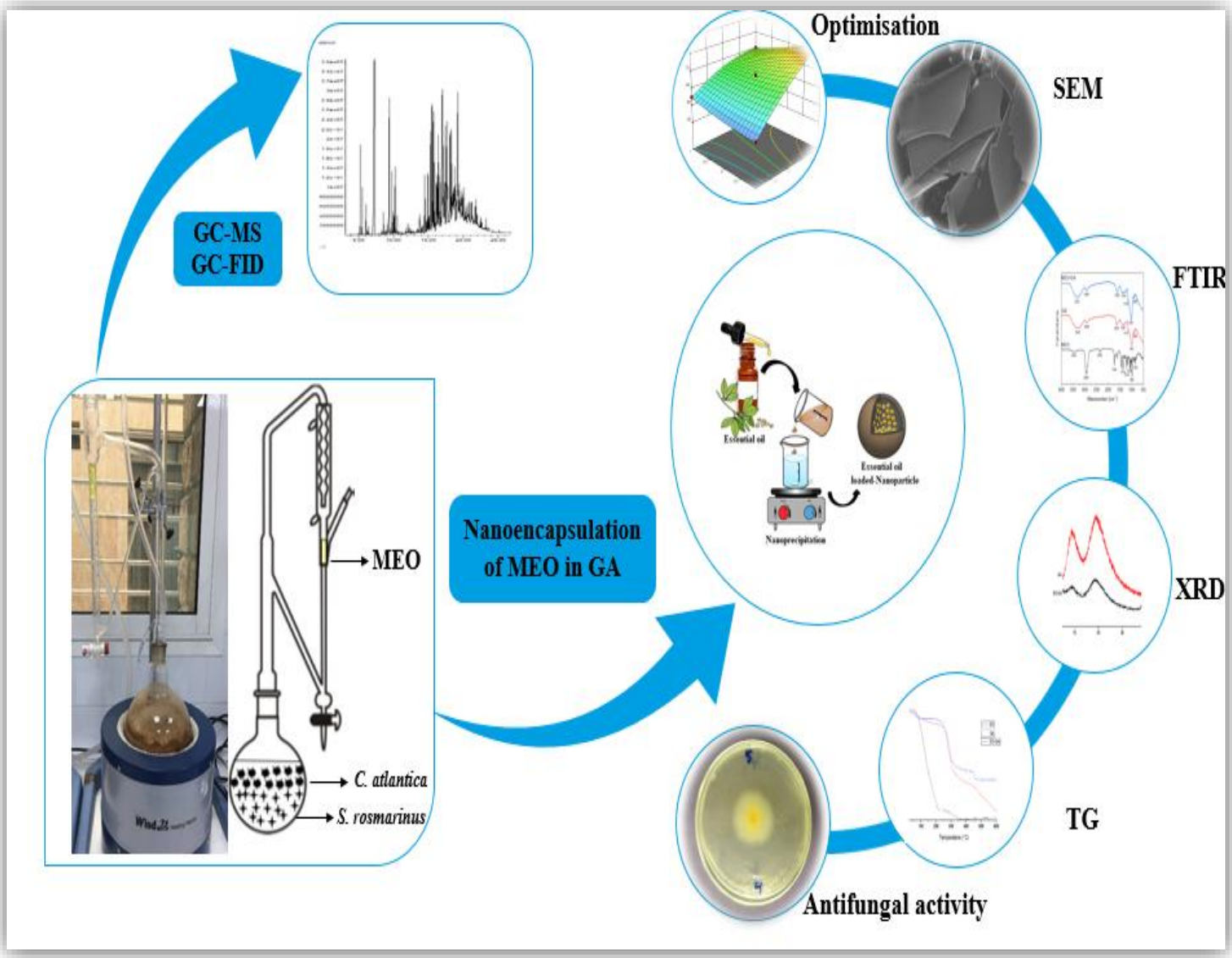
[59] Q. Li, X. X. Wang, J. G. Lin, J. Liu, M. S. Jiang, and L. X. Chu, "Chemical Composition and Antifungal Activity of Extracts from the Xylem of Cinnamomum camphora," *BioResources*, vol. 9, no. 2, pp. 2560–2571, 2014, doi: 10.15376/biores.9.2.2560-2571.

[60] R. Rhafouri *et al.*, "Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the Cedrus atlantica (Endl.) Manettiex Carrière seeds essential oil," *Mediterr. J. Chem.*, vol. 3, no. 5, pp. 1027–1036, Oct. 2014, doi: 10.13171/mjc.3.5.2014.10.14.23.44.

[61] J. Ljunggren, M. Edman, B. G. Jonsson, D. Bylund, and E. Hedenström, “Evaluation of fractionally distilled Picea abies TMP-turpentine on wood-decaying fungi: in vitro, microcosm and field experiments,” *Wood Sci. Technol.*, vol. 54, no. 4, pp. 847–868, Jul. 2020, doi: 10.1007/s00226-020-01192-3.

Article IV.

Nanoencapsulation de l'huile essentielle combinée de Salvia rosmarinus Speen et Cedrus atlantica Manetti dans la gomme arabique : optimisation et application comme conservateur du bois



ARTICLE IV

Nanoencapsulation de l'huile essentielle combinée de Salvia rosmarinus Speen et Cedrus atlantica Manetti dans la gomme arabique : optimisation et application comme conservateur du bois

Cette étude fait l'objet d'une publication qui sera publié prochainement

Résumé

Les huiles essentielles et les extraits naturels de plantes sont des alternatives efficaces dans le secteur de la préservation du bois, car elles ne sont pas toxiques pour l'homme et l'environnement. Cependant, la stabilité, la sensibilité et la volatilité des HEs étant l'une des limitations les plus importantes, la nano-encapsulation a été considérée comme l'une des techniques les plus efficaces pour résoudre ces problèmes. Cette étude visait à étudier les conditions de nanoencapsulation des huiles essentielles de *Salvia rosmarinus* Speen et *Cedrus atlantica* Manetti (MEO) combinées dans de la gomme arabique (GA) par la méthode de lyophilisation, en utilisant la méthodologie de surface de réponse (RSM), en particulier le Central Composite Design (CCD). La variable dépendante Y : l'efficacité d'encapsulation, a été optimisée en fonction de deux variables indépendantes, le rapport solide-liquide (MEO/GA) et le rapport liquide-liquide (MEO/éthanol). La caractérisation de la poudre récupérée a été suivie par différentes techniques telles que le microscope électronique à balayage (MEB), la diffractométrie des rayons X (DRX), la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et l'analyse thermo-gravimétrique (ATG). Les conditions optimales de nanoencapsulation obtenues à partir de la méthodologie de surface de réponse (MSR) étaient les rapports MEO/gomme arabique de 1:10 (w/w) et MEO/éthanol de 10 % (v/v), qui ont fourni la plus grande efficacité d'encapsulation de 87 %. Selon les résultats de MEB, DRX, DLS, et IRTF, l'encapsulation de MEO en utilisant GA a modifié la forme des particules et la structure moléculaire. En outre, les résultats de l'analyse ATG ont indiqué que le complexe d'inclusion présente une stabilité thermique supérieure à celle du MEO. En ce qui concerne l'activité antifongique, la non-encapsulation du MEO dans GA a révélé l'effet inhibiteur le plus élevé contre les champignons de la pourriture brune du bois avec une concentration efficace pour 50 pour cent de l'effet maximal (CE_{50}) de 5,15±0,88 et 12,63±0,65 µg/mL pour *Gloeophyllum trabeum* et *Poria placenta*, respectivement. Cette activité a montré que MEO-GA a amélioré l'activité antifongique de manière significative

contre les champignons de la pourriture brune du bois. En conclusion, ce produit peut être appliqué comme un conservateur naturel pour la protection du bois dans les industries de la construction durable et de la construction verte.

ARTICLE IV

Nanoencapsulation of combined Salvia rosmarinus Speen and Cedrus atlantica Manetti essential oil in gum arabic: optimization and application as wood preservative

Saoussan Annemer[1], Amine Ez-zoubi[1],Yassine Ez zoubi[1,2], Badr Satrani[3], Hamid Stambouli[4], Taoufik Bouayoun[4], Nezha Fettoukh[4], and Abdellah Farah[1,*]

[1]Laboratory of Applied Organic Chemistry, Faculty of Sciences and Technology, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fez B P 2202, Morocco.

[2]Biotechnology, Environmental Technology and Valorization of Bio-Resources Team, Department of Biology, Faculty of Sciences and Techniques Al-Hoceima, Abdelmalek Essaadi University, Tetouan, Morocco.

[3]Forestry Research Center - Rabat, Avenue Omar Ibn Al Khattab, BP 763, - Rabat-Agdal. 10050, Morocco.

[4]Forensic Sciences Institute of Royal Gendarmerie, BP 6597, Rabat-Institut, 10000, Morocco.

Correspondence: Abdellah Farah, Faculty of Sciences and Techniques, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, Morocco

Email: farah.abdellah1@gmail.com

Abstract: The stability, sensitivity, and volatility of EOs are some of their most serious limitations, and nanoencapsulation has been considered one of the most effective techniques for solving these problems. This research aimed to investigate the inclusion complex of a *Salvia rosmarinus* Speen and *Cedrus atlantica* Manetti (MEO) essential oil mixture in gum arabic (GA) and to evaluate nanoencapsulation's ability to promote antifungal activity against two brown-rot fungi responsible for wood decay *Gloeophyllum trabeum* and *Poria placenta*. The optimization of encapsulation efficiency was performed using response surface methodology (RSM) with two parameters: solid-to-solid (MEO/GA ratio) and solid-to-liquid (MEO/ethanol). The recovered powder characterization was followed with various techniques using a scanning electron microscope (SEM), X-ray diffractometry (XRD), dynamic light scattering (DLS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and thermo-gravimetric analysis (TGA). The optimal nanoencapsulating conditions obtained from response surface methodology (RSM) were ratios of MEO/GA of 1:10 (w/w) and MEO/ethanol of 10 % (v/v), which provided the greatest encapsulation efficiency (87%). The results of SEM, XRD, DLS, FTIR, and TGA showed that the encapsulation of MEO using GA modified particle form and molecular

structure and increased thermal stability. An antifungal activity assay indicated that an effective concentration of MEO had an inhibitory effect on brown wood-rot fungi. It had 50% of the maximal effect (EC_{50}) value of 5.15±0.88 µg/mL and 12.63±0.65 µg/mL for *G. trabeum* and *P. placenta*, respectively. Therefore, this product can be applied as a natural preservative for wood protection in sustainable construction and green building industries.

Keywords: Essential oil mixture, Gum Arabic, nanoencapsulation, response surface approach, wood-decay fungus.

1. Introduction

The wood industry is currently experiencing an increase in demand for a safe, and natural wood preservative[1,2]. Finding antifungal compounds in nature is crucial because of growing worries about the negative effects of commercial fungicides [3]. Researchers and the industry are paying increasingly more attention to natural anti-wood-decay fungi due to their long shelf life and preservation of the quality and safety of wood products [4].

Essential oils are well-known viable alternatives for use in the wood preservation sector since they are non-toxic to humans and the environment [5,8]. However, the stability, water solubility, and bioavailability of the active components of essential oils are recognized as serious problems [9], and encapsulation technology is used to overcome them [10]. The encapsulation of bioactive components using natural biopolymers has piqued researchers' interest. Among the biopolymers, gum arabic has been extensively employed as an encapsulating material because of its stability, biodegradability, bioavailability, effectiveness, low toxicity, high-water solubility, and low solution viscosity, all of which enhance its ability to incorporate compounds [11,12].

Gum arabic is commonly used in the food, pharmaceutics, paint, textile, and printing industries as a stabilizer, emulsifier, bulking agent, shelf-life increaser, satiating agent, and encapsulating agent for bioactive components [13]. It is a natural product of acacia exudate from the trees *Acacia senegal* and *Acacia seyal*, which belong to the Fabaceae family. This dried sap, which has a high commercial value, is a globally used product, mostly harvested in Africa and Western Asia [14]. Gum arabic is a complex polysaccharide and protein mixture, mostly composed of arabinogalactan (90% of total mass), arabinogalactan protein (10% of total mass), and glycoprotein (1% of total mass) [15,16]. Arabinogalactan protein is an excellent emulsifier due

to its interfacial property, which ensures emulsification [17]. The arabinogalactan protein's structure includes polypeptide chains and hydrophilic carbohydrate blocks, giving the protein favorable emulsifying properties [18].

The nanoencapsulation preparation process involves techniques such as ionic gelation, coacervation, emulsification, freeze drying, and spray drying [19]. Freeze drying is a commonly used method for essential oil nanoencapsulation [20]. The nanoencapsulation process is influenced by different parameters during the molecular inclusion phase. Preparation technique, volume ratio, reaction time, stirring rate, time, pH, type, the concentration of wall material, and cross-linking agents are the main parameters that can influence the complexation process [21]. Therefore, more significance should be granted to these parameters to improve nanoencapsulation and, subsequently, its application in various industrial systems.

Recently, the nanoencapsulation of essential oils in biopolymers has been widely studied in various fields, such as food preservation and pharmacology. No study, however, has evaluated the potential for the nanoencapsulation of a mixture of essential oils to prevent wood against wood-decay fungi. Therefore, the current work aimed to evaluate an *S. rosmarinus* and *C. atlantica essential* mixture (MEO) with proven antifungal activity by nanoencapsulating it in gum arabic (GA) to generate MEO-GA complex. The nanoencapsulation condition was optimized using response surface methodology (RSM), focusing on the independent parameters of the solid-to-liquid ratio of MEO/ethanol and the solid-to-solid ratio of MEO/GA and using encapsulation efficacy as dependent responses. The efficacy of this MEO-GA complex was assessed for its capacity to preserve wood against brown-rot wood-decay fungus, including *Gloeophyllum trabeum* and *Poria placenta*.

2. Material and methods

2.1. Plant Material and Essential oils extraction

Leaves from *S. rosmarinus* and *C. atlantica* sawdust were collected in April from the Talsint area (Oriental region, Morocco) and the Azrou forest (Middle Atlas Mountains, Morocco), respectively. The botanical identification was performed by Professor Satrani Badr at the Forestry Research Center Laboratory, Rabat, Morocco. The essential mixture of 55% of *S. rosmarinus* and 45% *C. atlantica* (MEO) was extracted by simultaneous hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus, as described by Annemer et al. [22]. A combination of 55% *S. rosmarinus* (110 g) and 45% *C. atlantica* (90 g), or 200 grams of plants, was used. The plants

were placed in two layers in the distillation flask, with *C. atlantica* wood sawduston the top and S. *rosmarinus* on the bottom. One liter of water was added to the distillation flask, and the mixture was boiled for 4 h. The MEO was stored at 4°C until further use.

2.2. Chromatographic analysis

The chemical analysis of the EO mixture was conducted using gas chromatography combined with mass spectrometry (GC/MS) and a flame ionization detector (GC/FID). Component identification was accomplished using GC/MS analysis, and component quantification was performed using GC-FID analysis.

2.2.1. Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis

A Hewlett-Packard gas chromatograph (HP 6890) and a mass spectrometer (HP 5973) were used for chemical analysis. An HP-5MS (cross-linked 5% PHME siloxane) (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 m) column was used. The temperature of the column was fixed at 50°C and gradually raised to 250°C at a rate of 2°C/min. Helium was utilized as the carrier gas at 1.5 mL/min, with a split mode ratio of 1/74.7 and a flow rate of 112 mL/min. The NIST 98 spectrum library was used to confirm the components' MS identification. The ionization voltage was 70 eV, the ion source temperature was 230°C, the scan mass range was 35–450 m/z, and the ionization voltage was 70 eV.

2.2.2. Gas chromatography (GC-FID) analysis

Samples were analyzed using a Hewlett-Packard gas chromatograph (HP 6890) equipped with an HP-5 capillary column (30 m × 0.25 mm, film thickness 0.25 mm), an injector set to 275°C, and an FID detector. The oven temperature was set at 50°C for five minutes before it was increased to 250°C at a rate of 4°C/min. The carrier gas utilized was nitrogen (1.8 mL/min).
All the samples were dissolved to 1/50 in methanol, and the injection volume was 1 L in a split mode with a ratio of 1/50 and a flow rate of 72.1 mL/min. Peak area normalization was used to determine the percentages representing the relative proportions of the EO's components. The retention indices (RI) of the HP-5 MS column were determined using a homologous series of C_8–C_{28} alkanes. The components were also identified by comparing the elution order of the components to the relative retention indices described in the literature.

2.3. Encapsulation process of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* essential oil mixture in gum arabic

The MEO-GA complexes were prepared using the freeze-drying technique described by Hu et al. [23]. A quantity of gum arabic (GA) was dissolved in 10 mL of distilled water under a magnetic stirring field and stirred at 40°C for 1 hr, followed by filtration to eliminate the insoluble part. The MEO was then diluted in ethanol and added to the aqueous GA solution, as shown in Table 1. The mixture was then cooled to 25°C and agitated gently in the dark. Finally, the suspension was freeze dried at -80°C for 48 hours according to Muhoza et al.'s [24] methodology and kept at 4°C for further analysis (Figure 1).

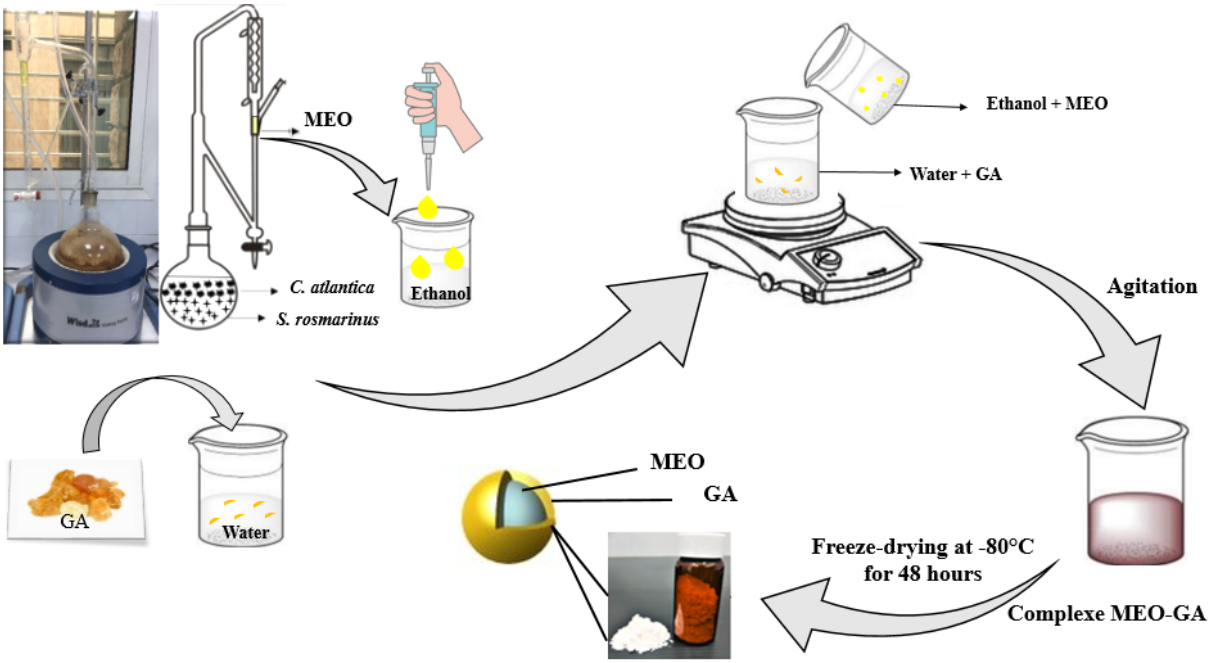


Figure 1 : Encapsulation process illustration of MEO using GA

2.4. Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE) was performed based on Ez-Zoubi et al.'s [25] methodology. A calibration curve was produced utilizing various EO concentrations diluted in ethanol at λ_{max} = 210 nm (BK-D580 Spectrophotometer). The sample was then diluted in ethanol and placed in an ultrasonic water bath at 50°C, and the EE was calculated by *Eq. 1*.

$$EE\ (\%) = \frac{Weight\ of\ incorporated\ MEO}{Total\ weight\ of\ MEO} \times 100 \qquad (Eq.1)$$

2.5. Characterization of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* essential oil mixture in gum arabic

2.5.1. Morphology and particles size analysis

A morphological examination of the wall material (GA) and MEO inside GA (MEO/GA) was performed by scanning with an electron microscope (JSM-IT500HR), as described by Karrar et al. [26]. The samples were placed under a high vacuum at an acceleration voltage of 16 KV and a magnitude of 500×. After suspending 5 mg of MEO-GA in 20 mL of deionized water, the particle size of the sample was assessed by dynamic light scattering (Litesizer 500), following Al-Maqtari et al.'s [27] methodology.

2.5.2. X-ray powder diffraction analysis

The crystallinity of MEO after the encapsulation process was achieved by X-ray diffraction (Xpert-Pro). The measurements were determined by Cu radiation to be from 5° to 50° (2θ) at room temperature, with generator settings of 40 kV and 30 mA.

2.5.3. Fourier transform infrared spectroscopy analysis

The Fourier transform infrared spectroscopy spectra (VERTEX 70 – BRUKER) of the samples above and the MEO were processed using the KBr-pellet method at a resolution of 4 cm^{-1}, and 32 scans, ranging from 400 to 4000 cm^{-1}, were made [28].

2.5.4. Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) of the samples was performed by LINSEIS STA PT1600 in an air atmosphere and heated at 10°C per minute from 20°C to 600°C, following Paula et al.'s [29] methodology.

2.6. Antifungal activity

The antifungal activities of gum arabic (GA) and encapsulated mixture essential oil (MEO-GA) were performed against two brown-rot wood-decay fungi utilizing the methodology described by Remmal et al. [30] and Satrani et al. [31], with minor modifications. Two brown-rot fungi (*Gloeophyllum trabeum* [Persoon ex Fries] Murril [ATCC 11539]), and (*Poria placenta* [Fries] Cooke sensu J. Eriksson [ATCC 9891]) were provided by the Microbiology Mycotheque Culture Collections and the Mycology Laboratory at the Centre de Recherche Forestier in Rabat, Morocco.

To conduct the experiments, the MEO and GA were serially diluted in a 0.2% sterile agar solution, and 20 milliliters of solid medium malt extract were added to each dilution to attain the desired concentrations (7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1,000 g/L [w/v]) after the mixtures were poured into Petri dishes. The positive control (Nystatin) was prepared using the same procedure. The negative control was produced by replacing the MEO-GA and GA with a 0.2% agar solution. A 1 cm^3 diameter piece was placed in the center of each Petri dish. The Petri dishes were then covered with parafilm and incubated for seven days at 25°C. Each assay was performed in triplicate. The antifungal activity of the MEO-GA and GA was assessed by determining their concentration for a 50% inhibition of mycelial growth (EC_{50}) or the effective concentration for 50% of the maximal effect (EC_{50}). The EC_{50} was calculated with the following equation (*Eq. 2*):

$$Mycelial\ growth\ inhibition\ (\%) = \frac{C - T}{C} \times 100 \qquad (Eq.2)$$

where C is the control's mean diameter of the mycelial growth zone (mm), and T is the test's mean diameter of the mycelial growth zone (mm). Probit analysis was used to calculate the EC_{50} values (concentrations that are 50% inhibitory of mycelium growth) for the studied samples (MEO-GA and GA) [32].

2.7. Experimental design and data analysis

A central composite design (CCD) was conducted to investigate optimum encapsulation conditions. The effect of the two parameters (independent variables)—the solid-to-solid (MEO/GA ratio) and solid-to-liquid (MEO/ethanol ratio)—on the output response was inclusion encapsulation efficiency (*Y*), which maximized the response value. The levels of the independent parameters in the experiment are listed in Tables 1 and 2. All experiments were performed in triplicate. Notably, the design involved four runs at the corners of the square, four runs at the middle of the square, and four axial runs. For the coded variables, the corners of the square were (X_1, X_2) = (−1, −1), (1, −1), (−1, 1), (1, 1); the center points were at (X_1, X_2) = (0, 0); and the axial runs were (X_1, X_2) = (−1.21, 0), (1.21, 0), (0, −1.21), (0,1.21) (Figure 2).

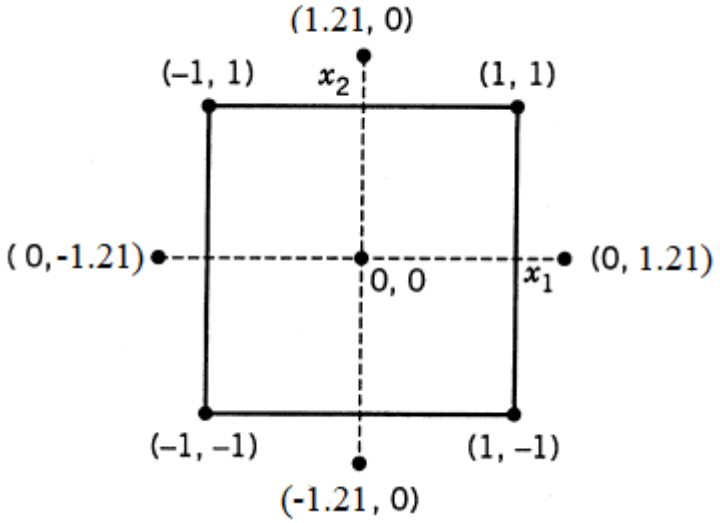


Figure 2: Central composite design for two parameters.

Table 1: Two-parameter Central Composite Design.

Runs	X_1	X_2
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	-1.21	0
8	+1.21	0
9	0	-1.21
10	0	+1.21
11	0	0
12	0	0

To correlate the dependent variable (Y) with the independent parameters (X_i, i = 1, 2), a second-order multiple linear regression model was utilized as follows:

$$Y = a0 + \sum_{i=1}^{K} a_i X_i + \sum_{i=1}^{K} a_{ii} {X_{ii}}^2 + \sum_{i=1}^{K} a_{ij} X_i X_j + \varepsilon \qquad (Eq.3)$$

Table 2: Parameters and levels utilized for Central Composite Design.

Parameters	Code	Level -1	Level 0	Level +1
MEO/GA (w/w)	X_1	1:1	1:5.5	1:10
MEO/ethanol (w/v) (%)	X_2	0	25	50

where Y is the dependent variable measured (in this study, Y represents encapsulation efficiency), and a_0, a_i, and a_{ii} indicate the regression coefficients for the constant term, second order, and interaction effects, respectively. X_i and X_j represent the coded independent studied parameters, and k and ε represent the total number of the optimized parameters and the error associated with the experiments, respectively. Multiple regressions to the fitted model were used to assess the experiments' data. An analysis of variance test (ANOVA) was performed to assess significant differences among the independent variables. The coefficients of determination (R^2 and *adjusted* R^2) were used to assess the performance of the postured models and their predictions [33,34]. The fitted model's surface responses and contour plots were displayed using Design Expert version 13 software (Stat-Ease Society, Minneapolis, MN, USA) to visualize the relationship between the independent and dependent variables.

2.8. Statistical analysis

Each experiment was carried out in triplicate. The means ± standard deviations were then calculated. Tukey post hoc's test ($p < 0.05$) was utilized to examine significant differences among samples using OriginPro 2021 software (OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA).

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition

The chemical compositions of the two essential oils, *S. rosmarinus* and *C. atlantica*, alone and in binary combinations (55%/45%), were determined using gas chromatographic analysis and mass spectrometry (GC/MS), as shown in Table 3.

Twenty-six compounds were identified in the S. *rosmarinus* EO, representing a total of 100%. Monoterpenes were predominant in *S. rosmarinus* EO (99.04±0.65%). There was also a significant amount of oxygenated monoterpenes (80.33±3.21%). The percentage of monoterpene hydrocarbons was 18.71±1.14%, but the quantities of sesquiterpenes were almost nonexistent (0.96±0.02%). The major components were 1,8-cineole (50.20±3.80%), camphor

(18.47±2.1%), α-pinene (9.96±2.21%), α-terpineol (3.78±1.15%), borneol (3.56±1.41%), and camphene (3.38±1.52%). These compounds were similar to those found in many studies[22,35]. According to Hannour et al. [36], *S. rosmarinus* EO from the Oriental region in Morocco, the Middle Atlas Mountains, and northern Morocco are characterized by a 1,8-cineole component, whereas camphor was the most abundant compound in *S. rosmarinus* EO from Loukkos [37].

Thirty-nine compounds were identified in the *C. atlantica* sawdust EO, representing a total of 100%. The sesquiterpenes were dominant (98.70±1.72%), and there were large amounts of oxygenated sesquiterpenes (67.25±2.52%) and sesquiterpene hydrocarbons (31.6±0.89%). Monoterpenes were found in low percentages (1.30±0.16%). The major component of the EO was β-himachalene (11.23±1.32%), followed by (E)-α-atlantone (10.33±2.41%), deodarnone (10.52±2.92%), himachalol (10.13±2.04%), α-himachalene (6.83±1.02%), E(E)-γ-atlantone (6.14±2.01%), (Z)-α-atlantone (5.32±2.75%), and γ-himachalene (3.28±1.22%). This EO was characterized by a himachalene chemotype in three isomers: α, β, and γ [38,39]. However, Zrira et al. [40] found that α-(E)-atlantone and le β-himachalène were the most abundant components.

The chemical composition of the binary combination of 55% *S. rosmarinus* and 45% *C. atlantica* was determined under the same identification conditions as the previous EO. Forty-four compounds were identified, representing a total of 99.55%. Chromatography analysis showed that the 55% *S. rosmarinus* and 45% *C. atlantica* EO was mainly composed of monoterpenes (70.84±1.56%), with a significant amount of oxygenated monoterpenes (58.78±1.24%) and fewer monoterpene hydrocarbons (12.06±1.13%). In addition, the MEO consisted of sesquiterpene compounds (28.71±1.51%) with oxygenated sesquiterpenes (19.63±1.17%) and a small amount of sesquiterpenes hydrocarbons (9.08±1.45%). The amount of monoterpene was higher than that of sesquiterpene, which may be because the quantity of *S. rosmarinus* was higher than that of *C. atlantica* in the binary combination (55% of *S. rosmarinus* and 45% of *C. atlantica*). The EO composed of 55% *S. rosmarinus* and 45% *C. atlantica* mainly comprised 1,8-cineole (36.25±1.67%), camphor (13.87±1.54%), α-pinene (6.70±1.52%), myrtenal (3.04±0.25%), β-himachalene (3.85±1.14%), and borneol (3.01±1.21%). These compounds were detected in small amounts in binary combination, even though they were present in the individual oil in a relatively high percentage. Simultaneous hydrodistillation led to a new component in the binary mixtures: a myrtenal compound (3.04±0.25%). This finding can be explained by the interaction between the different

compounds, the effect of the temperature during simultaneous hydrodistillation, or the appearance of compounds that already existed in trace amounts in the individual oils.

The results of the chemical composition of the binary mixture indicated that the main compounds were nearly the same as those identified in previous studies [22]. Yet they differed in percentages due to the number of plants used in the binary combination during simultaneous hydrodistillation. Confirming the results of our study, El Kharraf et al. [41] found that the major components detected in EO mixtures were the same as those present in the individual EOs. However, Muturi et al.'s [42] findings differed from ours in that the number of components in the EO mixtures was lower than that in individual EOs. A new component in the chemical composition of EOs was found when mixing *A. sativum* (bulbs) and *C. paradisi* (leaves) [43]. Wangrawa et al. [44] found that components such as isopiperitone, p-cymene, b-elemol, carvacrol, and caryophylenne were present in the *Lippia multiflora+Cymbopogon schoenanthus* combination.

Table 3: Chemical composition of EO of *S. rosmarinus*, *C. atlantica* alone, and in combination.

Peak N°	Compounds	RI	RI Lit	% Relative peak area		
				S. rosmarinus (100%)	*S. rosmarinus: C. atlantica* (55%-45%)	*C. atlantica* (100%)
1	α-pinene	936	938	9.96±2.21	6.70±1.52	-
2	Camphene	952	952	3.38±1.52	2.01±1.97	-
3	β-pinene	981	980	1.50±1.12	0.98±0.23	-
4	Myrcene	991	993	0.88±0.20	0.55±0.12	-
5	δ-3-carene	1007	1011	0.08±0.01	-	-
6	α-terpinene	1019	1018	0.34±0.16	0.10±0.02	-
7	p-cymene	1026	1026	2.30±1.56	1.53±0.12	-
8	4-acetyl-1-methylcyclohexene	1035	1031	-	-	0.35±0.02
9	1,8-cineole	1037	1033	50.20±3.80	36.25±1.67	-
10	γ-Terpinene	1059	1062	0.06±0.01	-	-
11	terpinolene	1088	1089	0.21±0.07	0.19±0.56	-
12	Linalool	1095	1098	1.64±0.43	0.97±0.64	-

13	fenchol	1116	1113	0.08±0.03	-	-
14	Trans rose oxyde	1130	1127	-	-	0.92± 0.01
15	Camphor	1149	1144	18.47±2.10	13.87±1.54	-
16	pinocarvone	1164	1163	0.31±0.04	-	-
17	borneol	1170	1166	3.56±1.41	3.01±1.21	-
18	terpinen-4-ol	1179	1178	1.22±0.21	0.68±0.13	-
19	α-terpineol	1184	1189	3.78±1.15	0.54±0.19	-
20	Myrtenal *	1192	1194	-	3.04±0.25	-
21	verbenone	1213	1205	0.54±0.06	-	-
22	carvone	1241	1243	0.15±0.02	0.34±0.25	-
23	bornyl acetate	1280	1286	0.10±0.01	0.08±0.01	-
24	thymol	1286	1290	0.09±0.02	-	-
25	carvacrol	1297	1293	0.19±0.02	-	-
26	longifolene	1391	1387	-	0.14±0.03	0.65±0.03
27	tetradecane	1402	1399	-	-	0.82±0.06
28	himachala-2,4-diene	1409	1424	-	-	0.33±0.02
29	β-Caryophyllene	1431	1419	0.38±0.07	-	-
30	α-himachalene	1446	1447	-	0.20±0.009	6.83±1.02
31	Thujopsadiene	1463	1460	-	1.67±0.87	0.51±0.02
32	8,9-dehydro neoisolongifolène	1471	1469	-	0.25±0.09	0.32±0.02
33	γ-himachalene	1477	1476	-	-	3.28±1.22
34	γ-curcumene	1483	1480	-	0.79±0.03	0.41±0.01
35	(E)-β-ionone	1490	1485	-	-	0.35±0.02
36	β-himachalene	1499	1499	-	3.85±1.14	11.23±1.32
37	Cuparène	1502	1502	-	-	0.20±0.09
38	α-deshydro-ar-himachlene	1510	1511	-	0.25±0.21	0.43±0.01
39	δ-cadinene	1520	1524	-	0.12±0.02	0.90±0.01
40	γ-Dehydro-ar-himachalene	1528	1529	-	0.32±0.01	1.22±1.15

41	α-calacorene	1540	1542	-	0.28±0.04	1.41±1.05
42	β-calacorene	1561	1563	-	0.97±0.06	2.14±0.05
43	oxydo himachalene	1570	1574	-	-	1.51±0.05
44	Turmoil	1587	1578	-	0.52±0.08	1.56±0.08
45	carotol	1591	1594	-	-	0.78±0.01
46	Caryophyllene oxide	1599	1581	0.08±0.01	-	-
47	Cedrol	1603	1605	-	0.29±0.02	1.12±0.04
48	β-himachalene oxyde	1610	1611	-	1.15±0.19	2.32±0.07
49	Cedranone	1618	1620	-	0.34±0.20	2.52±1.01
50	1-epi-cubenol	1628	1628	-	0.89±0.01	2.75±2.41
51	3-iso-thujopsanone	1638	1637	-	1.44±0.87	2.87±2.33
52	Himachalol	1647	1647	-	2.24±0.95	10.13±2.04
53	Isocedranol	1661	1661	-	-	1.54±1.11
54	Cadalene	1667	1674	-	0.24±0.09	0.66±1.45
55	β-bisabolol	1670	1673	0.30±0.02	-	-
56	acorenone	1682	1685	0.20±0.01	0.17±0.01	0.94±0.12
57	deodarnone	1694	1694	-	3.54±1.11	10.52±2.92
58	E(E)-γ-atlantone	1707	1704	-	3.26±0.61	6.14±2.01
59	(Z)-α-atlantone	1719	1717	-	1.87±0.45	5.32±2.75
60	khusimol	1735	1736	-	0.29±0.01	1.02±0.08
61	benzyl benzoate	1763	1762	-	0.64±0.06	2.48±0.12
62	(E)-α-atlantone	1783	1773	-	2.99±0.71	10.33±2.41
63	4-hydroxy-muurolene	1795	1775	-	-	1.58±0.12
64	14 hydroxy- δ-cadinene	1808	1799	-	-	1.61±0.08
Monoterpene hydrocarbons				18.71±1.14	12.06±1.13	-
Oxygenated monoterpenes				80.33±3.21	58.78±1.24	1.30±0.16
Sesquiterpene hydrocarbons				0.38±0.01	9.08±1.45	31.45±0.91
Oxygenated sesquiterpenes				0.58±0.02	19.63±1.17	67.25±2.52
Total identified (%)				100±0.00	99.55±0.22	100±0.00

Components are noted in order of their elution in a HP-5 apolar column.; RI : retention indices on HP-5 MS column, experimentally calculated utilizing homologous n-alkanes series (C_8-C_{28}); RI Lit: retention indices taken from Aberchane et al. [45] and Elamrani et al. [46]; - : absence; Results from triplicates are presented as mean ± standard deviation; *: new component appeared.

3.2. Optimization of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* essential oil mixture encapsulation condition in gum arabic

To select the parameters that most impacted encapsulation efficiency, preliminary studies were performed based on literature data to optimize the encapsulation procedure in GA. The parameters were a solid-to-solid ratio of MEO/GA and a solid-to-liquid ratio of MEO/ethanol. Due to the low water solubility of EOs, ethanol was required as a co-solvent in the encapsulation process [47]. An ethanol concentration of greater than 50%, though, leads to low encapsulation efficiency [48]. To minimize dissipation during the inclusion process, the ratios of MEO/ethanol and MEO/GA were varied in the range of 5.80%–54.2% (v/v) and 1/0.05–1/10.945, respectively [49,23].

A central composite design (CCD) was performed to optimize the encapsulation parameters. By employing CCD, a matrix of 12 experiments was created. Table 4 shows the observed response values for each experiment's results.

Table 4: Central composite design and response variables for the preparation of the encapsulation of an EO mixture of 55% *S. rosmarinus* and 45% *C. atlantica*.

Run	Parameters		Response variables
	X_1 : MEO/GA	X_2 : MEO/ethanol (%)	Encapsulation effieciency (%)
1	1/1	10	49.00±1.52
2	1/10	10	87.00±3.41
3	1/1	50	55.00±2.21
4	1/10	50	70.20±3.52
5	1/5.5	30	67.80±1.84
6	1/5.5	30	68.20±1.96
7	1/0.05	30	45.20±2.01
8	1/10.945	30	77.60±3.24
9	1/5.5	5.8	72.00±2.46
10	1/5.5	54.2	66.00±1.75
11	1/5.5	30	68.00±1.63
12	1/5.5	30	67.60±1.44

Table 5 indicates the results of an analysis of variance (ANOVA) test conducted to validate the regression models. The results revealed that the quadratic polynomial model was a good target response. Based on these results, the probability of risk significance *p-values* for the postulated model was less than 0.05, showing that the adopted model was highly significant. The probability of a lack of fit for encapsulation efficiency was 0.06, indicating that the obtained model's lack of fit was insignificant. The encapsulation efficiency model was judged as fair for explaining the experiments' results based on the analysis of variance and the lack of fit of the results. Furthermore, the coefficient of determination and the coefficient of determination-adjusted values (R^2 = 0.99 and $R_{ajd}{}^2$ = 0.99) were high, demonstrating a good correlation between the observed and predicted values of the adopted model.

Table 5: Analysis of variance for the postulated model.

Source	Degrees of freedom	Sum of square	Mean square	*F-Ratio*	*p-value*
Model	5	1484.39	296.88	950.19	<0.0001*
Error	6	1.87	0.31		
Total	11	1486.27			
Lack of fit	3	1.67	0.56	8.37	0.06
Pure Error	3	0.20	0.07		
R^2	99.87%				
R_{adj}^2	99.77%				
Standard Deviation	0.56				

*: Statistically significant at $p<0.05$.

Figure 3 illustrates the observed value of the output response according to the predicted value. As illustrated, most points formed a straight line, demonstrating good agreement between the experiments' values for encapsulation efficiency and the predicted ones. This finding is consistent with the results shown in Table 5. When R^2 was close to 1, the predicted points formed one line as a function of observed values [50,51].

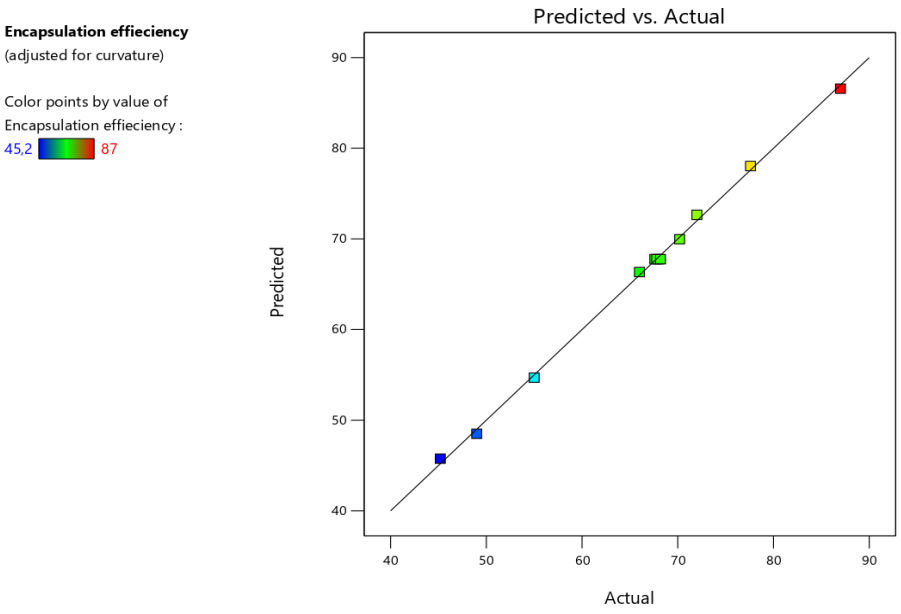


Figure 3: Observed vs predicted values for encapsulation efficiency.

Table 6 displays the significance of the coefficients in the second-order multiple linear regression models with a 95% confidence interval, as determined by a Student's t-test. The least squares method was used to estimate the regression coefficients for linear, quadratic, and interaction (Table 6). All the coefficients had a highly significant effect, as the *p-value* was less than 0.05. Furthermore, it has been shown that the lower the *p-value*, the more significant the coefficients are in the regression model [52,53].

The results also indicated that the concentration of the ratio of MEO/GA had the most significant impact on the EE%, followed by the interaction of MEO/GA and MEO/ethanol and the second-order interaction of MEO/GA. Thus, MEO/GA positively impacted the EE%, with a high positive t-ratio (62.81). However, the values of [(MEO/GA)*(MEO/ethanol)], $(MEO/GA)^2$, and *MEO/ethanol* had a significant negative impact on the EE%, with t ratios of -20.39, -14.86, and -12.28, respectively.

Table 6: Estimated regression coefficients and their significance in the second-order multiple linear regression models for the fitted model.

Term	Estimation	Error standard	*t ratio*	*Prob. > |t|*
Constant	67.77	0.27	248.08	<0.0001*
MEO/GA	13.34	0.21	62.81	<0.0001*
MEO/ethanol	-2.61	0.21	-12.28	<0.0001*
(MEO/GA)*(MEO/ethanol)	-5.70	0.28	-20.39	<0.0001*
$(MEO/GA)^2$	-4.01	0.27	-14.86	<0.0001*
$(MEO/ethanol)^2$	1.18	0.27	4.37	0.0047*

*: Statistically significant at $p<0.05$.

The mathematical models of the response surfaces of the adopted model were presented as second-order polynomials. The equations displayed the significant terms of the model for encapsulation efficiency (EE%).

$$EE\ \% = 67.77 + 13.34\,(MEO/GA) - 2.61(MEO/ethanol) - 5.70\,[(MEO/GA) * (MEO/ethanol)] - 4.01(EO/GA)^2 + 1.18(MEO/ethanol)^2 + \varepsilon \qquad (EQ.4)$$

After validating the models obtained from the RSM, the optimal fit of the two parameters that enabled high encapsulation efficiency was the focus of this study. The effects of the ratios MEO/GA and MEO/ethanol on encapsulation efficiency are illustrated in the response surface shown in Figure 4. The optimum zone for the two factors exists on the area of the cube formed by the area where the ratio of MEO/ethanol is minimal and the ratio of MEO/GA is maximal.

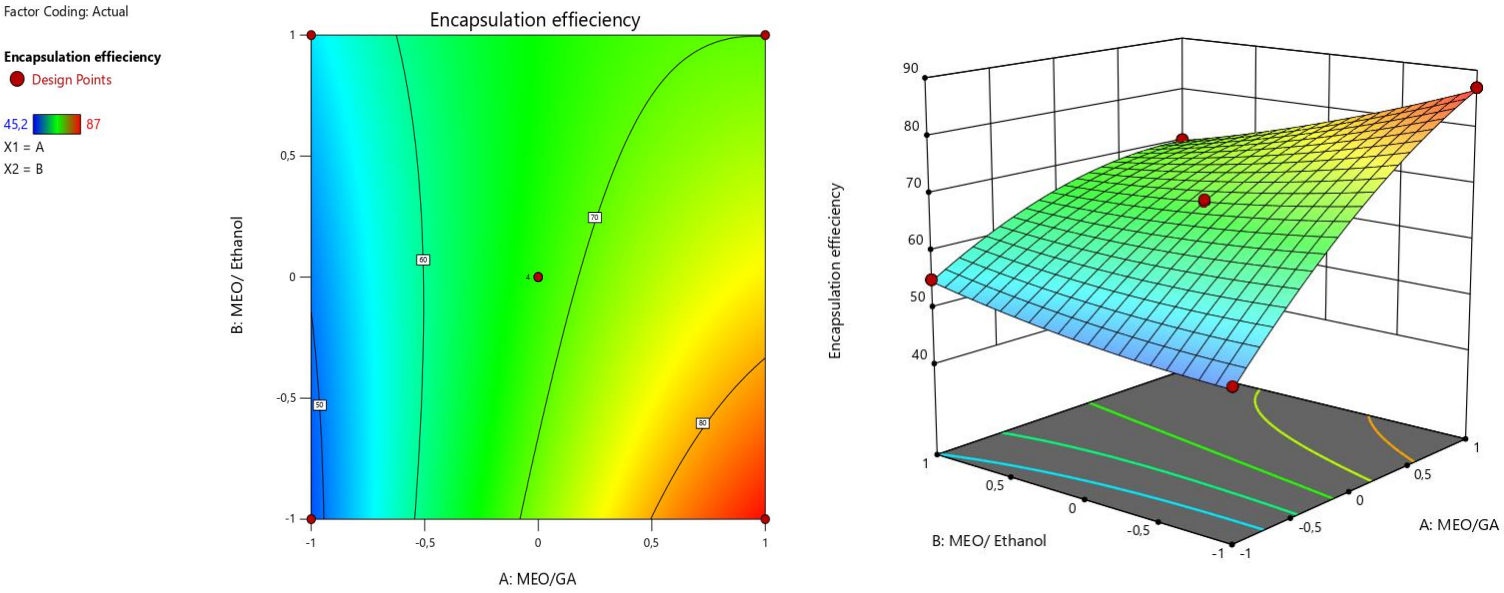


Figure 4: 2D (a) and 3D (b) representation of the optimized parameters leading to the desired encapsulation efficiency.

Figure 5 shows desirability plots corresponding to the responses for encapsulation efficiency. Apparently, the encapsulation efficiency reached its maximal value (86.58%) with an MEO/GA ratio of 1/10 and an MEO/ethanol percentage of 10%, with a desirability of 99%.

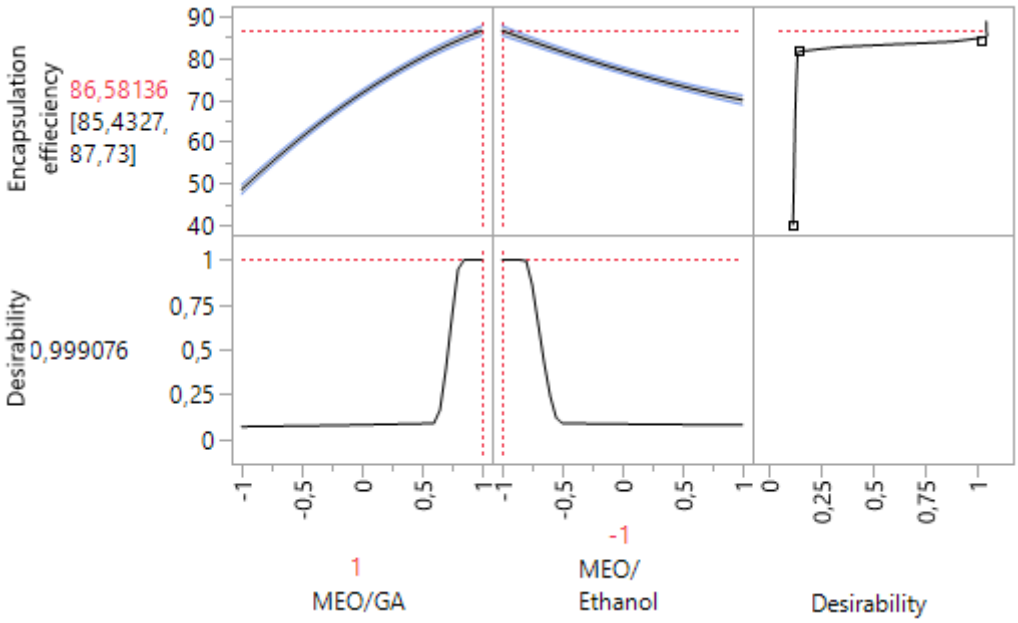


Figure 5: Profile for predicting optimal conditions for encapsulation efficiency.

The results indicated that the optimized conditions corresponding to the experimental design corner (run 2) had an MEO/ethanol volume ratio of 1:10 and an MEO/GA percentage of 10%.

This finding confirms previous research, which indicated that encapsulation efficiency was reduced by enhancing the co-solvent ratios of ethanol [54-56]. This reduction could be explained by the high quantities of ethanol disturbing the non-covalent bonding required for essential oil (EO) inclusion in the GA. The introduction of GA improved the encapsulating ability of the MEOs. When the weighted EO-to-GA ratio was 1:10, the maximum encapsulation efficiency was 87%. The MOE emulsion droplets likely moved more freely in the medium [57]. Due to the increased amount of GA, the number of essential oil molecules diffused into the combined solution likely increased. This increase might also allow for better protection of the oil from coalescence, which eventually is integrated into the GA.

A test point was performed on encapsulation efficiency employing an optimal nanoencapsulation condition to complete the testing of the proposed model's validity. Table 7 indicates no statistically significant difference between the experimental and predicted responses for the encapsulation efficiency. The optimized conditions of a 1:10 MOE/ethanol volumetric ratio and 10% MOE/GA percentage showed significant encapsulation efficiency, with an EE% value of 86.89%. These results confirm the theoretical results obtained by the desirability test, which revealed that the nanoencapsulation conditions of 1:10 MOE/GA ratio

and 10% MOE/ethanol percentage could reach their maximum value, with an EE% value of 86.58%.

Table 7: Predicted and observed values for test points achieved for the nanoencapsulation condition of encapsulation efficiency.

MOE/ethanol (%)	MOE/GA (ratio)	Predicted response values [a] EE (%)	Observed response values [b] EE (%)
10	1:10	86.58±2.45	86.89 ± 2.12

a: The predicted value is provided with the response's standard deviation determined by the model.
b: The observed value of three replicates is given with standard deviation.

3.3. Characterization of nanocapsules

3.3.1. Morphology and particles size analysis

A scanning electron microscope (SEM) was used to study GA and MEO-GA morphology at 500×. According to Figure 6, the pure sample of GA occurs in amorphous, irregular crystals of various sizes with no defined form. The MEO-GA decreased in particle size and changed in morphology compared to GA. The SEM micrographs of GA showed continuous tissues, and those of MEO-GA exhibited porous surfaces with amorphous shapes. Their porous surfaces were caused by the amount of essential oil present in the GA.

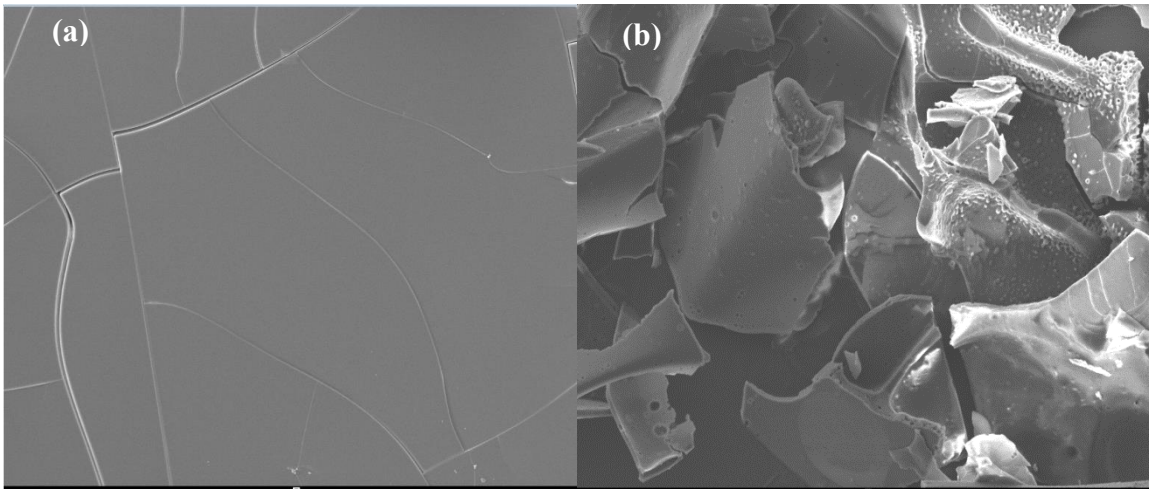


Figure 6: The SEM micrographs of GA (a) and MEO-GA (b) at ×500.

The mean hydrodynamic diameter of the nanoparticles was measured using dynamic light scattering (DLS). As shown in Figure 7, the MEO-GA exhibited a mean diameter of 124.98 nm, which was consistent with the results attained by Matche and Adeogun [58]. These results seem to confirm previous research by Barre et al. [15], showing that adding EO-to-GA

decreased the particle size of the nanoencapsulated essential oil mixed with the GA. Hasheminejad et al. [59] contended that this decrease may have been caused by the enhanced protonation of amino groups, leading to the completion of ionic cross-linking. Likewise, the nanoelaboration method's reduction in nanocapsule particle size may be attributed to a greater packing of polymer chains because of the large number of amino groups in GA that induced EO–GA association [59].

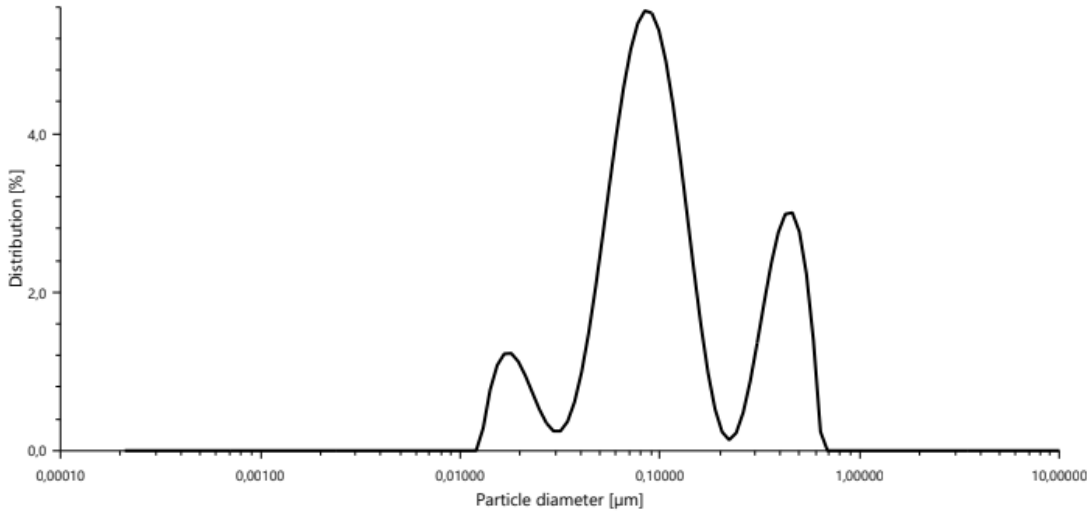


Figure 7: Particle size (µm) of MEO-GA nanoparticles distribution.

3.3.2. X-ray powder diffraction analysis

X-ray diffraction (XRD) was used to identify the differences in peaks' positions and intensity in GA and MEO-GA. As shown in Figure 8, the two samples were characterized by two large peaks at ~ 8° and 18° (2θ), with little modifications in position and significant variations in intensity. These differences in the morphologies of GA indicate the transition of GA from cage-type packaging to channel-type packing, which is facilitated by molecular invite and is typically interpreted as evidence of inclusion complex development [60]. Other studies have also found that essential oil can successfully be incorporated into GA [61,62].

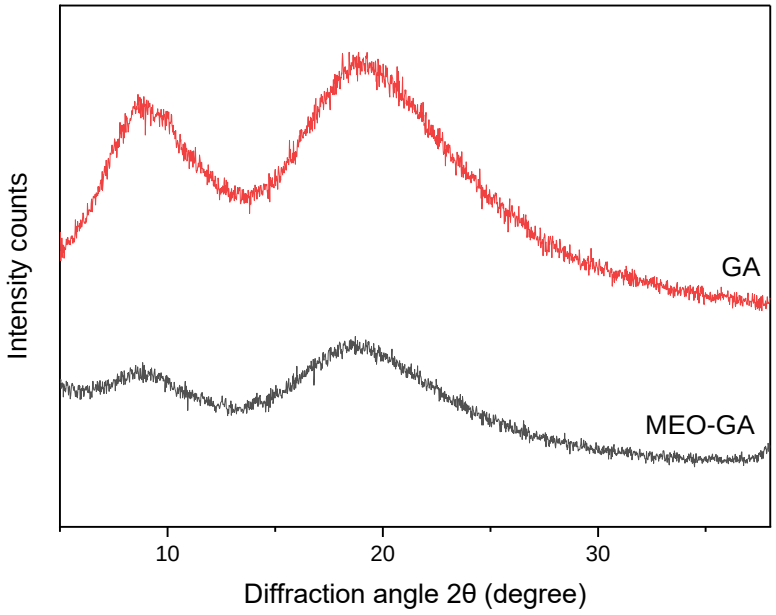


Figure 8: XRD patterns of GA and MEO-GA.

3.3.3. Fourier transform infrared spectroscopy analysis

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed to investigate the inclusion complex of MOE in GA. The FTIR spectra of the MEO, GA, and MEO-GA samples are illustrated in Figure 9. Differences in band position, shape, and intensity are indicators of interactions between the invited molecules and GA [63]. The MEO spectrum indicated that the characteristic broadband was at 3,465 cm^{-1} relative to O-H bond stretching, and those of CH_2 asymmetric stretching were at 2,929 cm^{-1}. The sharp band at 1,748 cm^{-1} was assigned to the bending vibration of C=O groups, whereas the sharp bands at 1,442 cm^{-1} and 1,374 cm^{-1} were associated with CH_3, CH_2 and O-H bending, respectively. The bands at 1,218 cm^{-1}, 1,078 cm^{-1}, and 980 cm^{-1} were assigned to C-C and C-O bond stretching and to out-of-the-plane C-H and O-H stretching, respectively. These observations were consistent with the presence of 1,8-cineole, camphor, α-pinene, myrtenal, β-himachalene, and borneol, which are the main components of MEO (Table 3). Several authors have already studied the compounds presented in this essential oil [64,47].

The spectra of GA were characterized by prominent vibrational peaks at 993 cm^{-1} (stretching vibrations of C-O), 1,367 cm^{-1} (CH_3 and C–H bending bands), 1,639 cm^{-1} (C=O bond stretching), and 2,929 cm^{-1} (CH_2 asymmetric stretching). The band at 3,302 cm^{-1} resulted from the hydrogen-bonded OH group [65]. The typical absorption band for the amino group of GA

in the area of 3,400–3,500 cm^{-1} was likely obscured by the broad O-H group absorption band [23].

The FTIR spectra of the MEO-GA formulations were a combination of previously characterized spectra. In addition, the C-H and O-H absorption bands were altered in position, intensity, and shape, thus indicating success in combining MEO with GA. The interaction of the polysaccharide with the essential oil may have influenced structural composition alteration [66]. According to Singh et al. [67], the alterations generated by adding EO to GA indicated that chemical modifications occurred due to the incorporation of essential oils into GA. Consequently, the essential oil's interaction with the functional groups contained in the polymer matrix led to identified modifications in peaks and displacements caused by stretching, vibrations, and bending. Furthermore, Vali et al. [68] found that the peak shift indicated that the EO interacted with the GA due to the edible coatings and was effectively encapsulated.

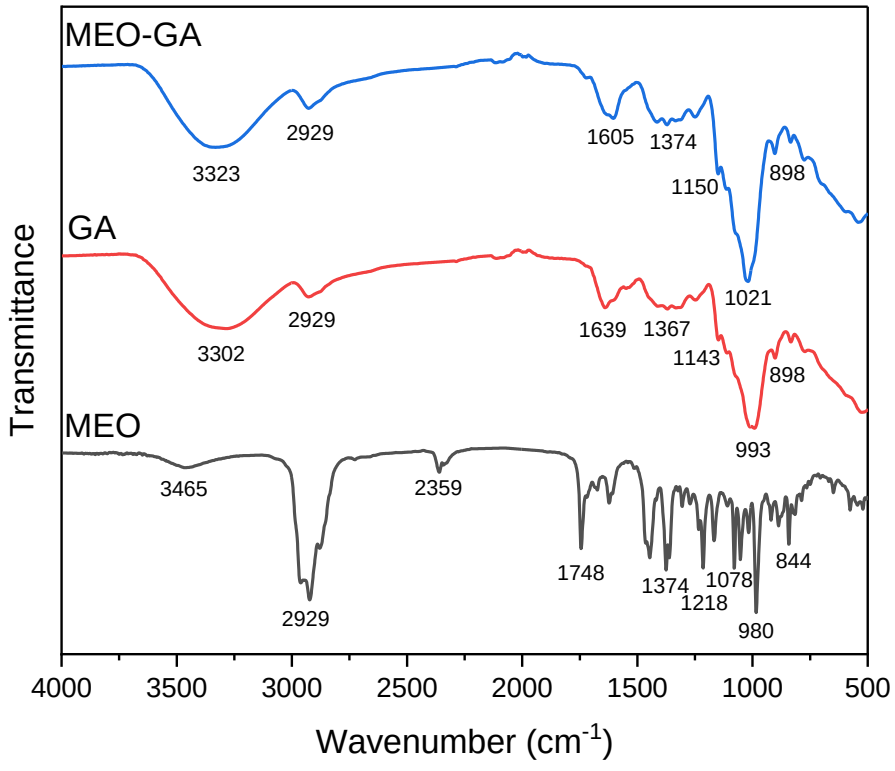


Figure 9: FTIR spectra of MEO, GA and MEO-GA.

3.3.4. Thermogravimetric analysis

Thermogravimetric analysis (TGA) confirmed the thermal stability of essential oil after the encapsulation process [69]. The thermal behavior of EO was investigated in both forms (free and encapsulated) (Figure 10). The MEO began to evaporate at room temperature, and the weight loss was 90% at 217°C, illustrating MEO's unstable nature. In the case of GA, the first one caused the dehydration process (112°C), and the decomposition process (250°C) caused the second one. In addition to GA's dehydration and decomposition, the TGA of MEO-GA was characterized by additional weight loss caused by the volatilization of MEO until 440°C. These findings provided further justification for the incorporation of MEO into GA and indicated that, during the encapsulation process, the MEO became more stable. The addition of MEO reduced the melting temperature of the nanoparticles, which could be related to the interaction of the EO with the polymer [70]. This illustrates the successful encapsulation of *S. rosmarinus* and *C. atlantica* (MEO) essential oil combined with GA and the bioactive compound's encapsulation. This finding was comparable to that of Hadidi et al.'s [71] study, which found that the inclusion complexes formed between eucalyptus oil and GA led to the effective encapsulation of eucalyptus essential oil inside a carrier polymer (GA). Azadmanesh et al. [72] determined that including *Eucalyptus globulus* oil in nanomaterials, such as GA nanocapsules, enhanced the nanocapsules' thermal stability. Lian et al. [73] established that contact between EO and polysaccharides could enhance the polysaccharide–EO complex's thermal stability and that polysaccharides could improve heat resistance through intermolecular synergy, including hydrophobic synergy.

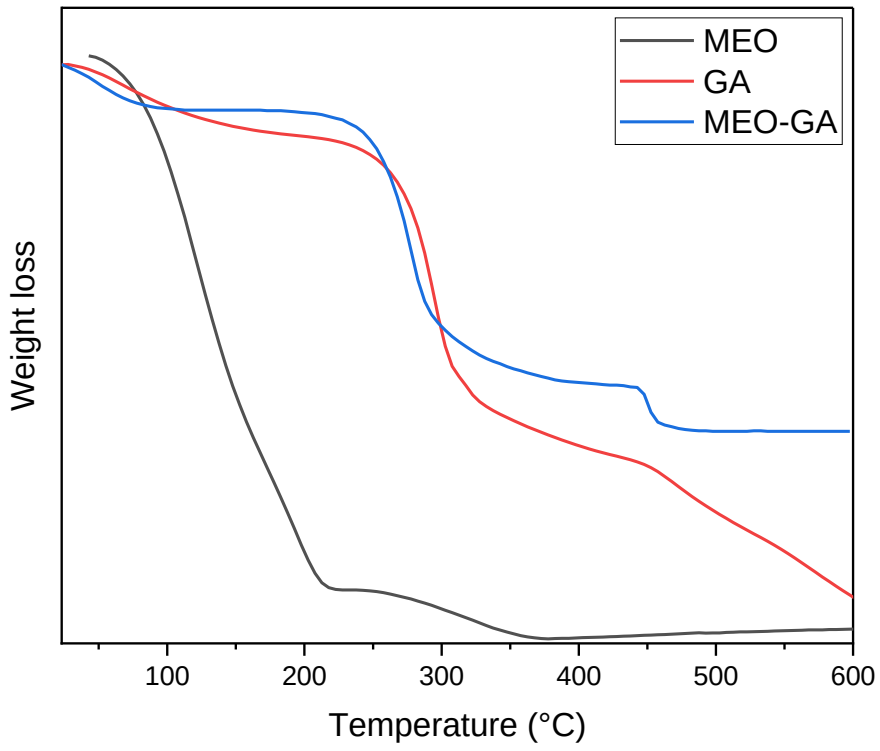


Figure 10: The TGA thermogram of MEO, GA and MEO-GA.

3.4. Antifungal activity

The antifungal activity of the essential oil mixture, both in free and encapsulated forms, was among the most active forms examined. These samples were tested against two brown wood-rot fungi: *Poria placenta* and *Gloeophyllum trabeum*.

The percentage of mycelial growth inhibition in the essential oil mixture, both in free and encapsulated forms, against *P. placenta* and *G. trabeum* at different concentrations, is illustrated in Figure 11. According to the results shown in Figure 11, the percentage of mycelial growth inhibition increases with concentration, this response is dose-dependent, which all three graphs indicate. Figure 11 and 12 show the significant differences between the samples in the average mycelial growth inhibition of *P. placenta* (Figure 11 (a)) and *G. trabeum* (Figure 11 (b)). A significant difference ($p < 0.05$) was identified in the average mycelial growth inhibition between (a) GA and MEO, (b) GA and MEO-GA, and (c) MEO and MEO-GA. The highest average mycelial growth inhibition for both brown-rot fungi was found in the MEO-GA sample, followed by the MEO sample. The MEO-GA samples, followed by the MEO sample, showed

the highest average mycelial growth inhibition for both brown-rot fungi. The lowest average mycelial growth inhibition for both brown-rot fungi was found in the GA samples. Based on two-way ANOVA tests, the applied treatment significantly affected mycelial growth inhibition for both brown-rot fungi.

The effective concentrations of 50% of the maximal effect (EC_{50}) of the samples and chemical fungicide (Nystatin) are listed in Table 8, with a lower EC_{50} reflecting high antifungal activity. Table 7 indicates that MEO-GA provided the lowest EC_{50} values of all the fungi investigated (5.15 and 12.63 µg/L for *P. placenta* and *G. trabeum, respectively*), followed by MEO (15.69 and 26.42 µg/L for *P. placenta* and *G. trabeum, respectively*), and GA (144.88 and 327.36 µg/L for *P. placenta* and *G. trabeum, respectively*).

Several researchers have investigated the application of GA in the nanoencapsulation of essential oils as food preservatives [74]. Nevertheless, few studies have considered the application of encapsulated essential oils as wood protection against decay fungi [75], and no studies have investigated the nanoencapsulation of a mixture of essential oils for application in wood protection. The strong antifungal effect of MEO could be attributed to the synergistic effect of the major compounds of *S. rosmarinus* (monoterpene) on those of *C. atlantica* (sesquiterpene), as Annemer et al.'s [22] study indicated. MEO-GA, as an edible coating, showed more marked results for wood preservation than MEO against *P. placenta* and *G. trabeum.* This significant potential can be explained by synergistic actions in a mixture of essential oils with complex combinations of several components and GA. The authors [76-78] observed that edible coatings, for instance, GA, could increase essential oil fungicidal activity by attaching to the fungal surface and liberating their contents close to the cell membrane or transferring the fungal components immediately. In contrast, Maqbool et al. [75] determined that GA molecules had no fungicidal effects. Lili Cai et al. [79] indicated that four essential oils encapsulated with methyl-β-cyclodextrin (MβCD) substantially slowed the fungal growth of both fungi *P. placenta* and *G. trabeum.*

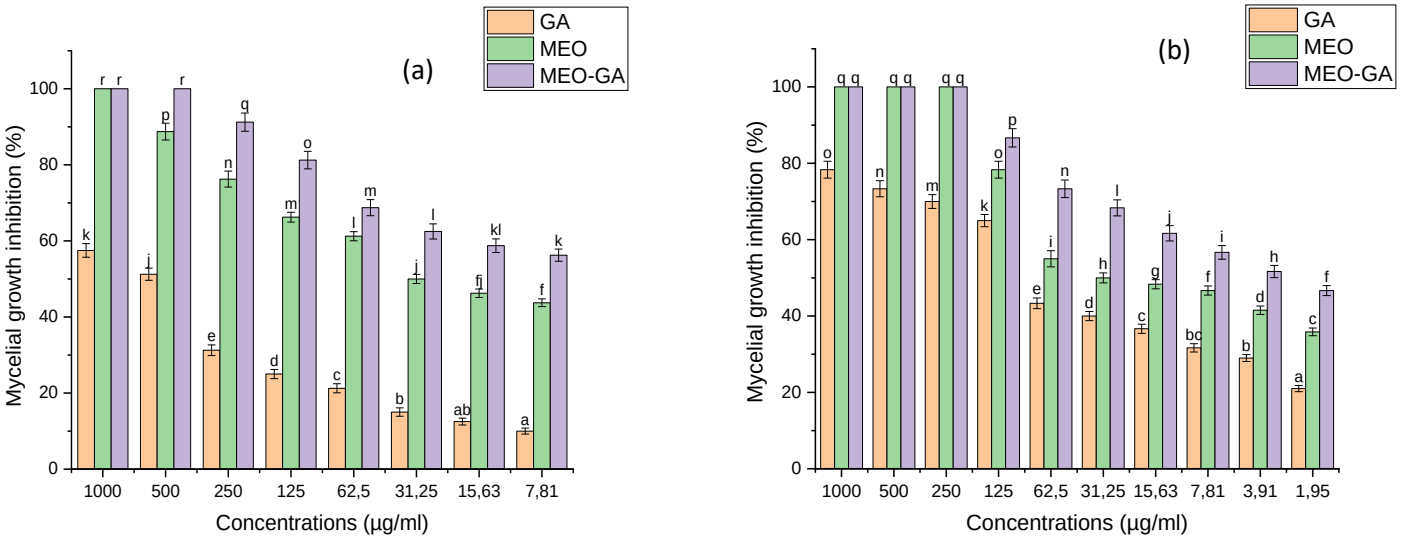


Figure 11: The inhibition percentages of GA, MEO, and MEO-GA against wood decay fungi growth of (a) *Poria placenta* and (b) *Gloeophyllum trabeum*.

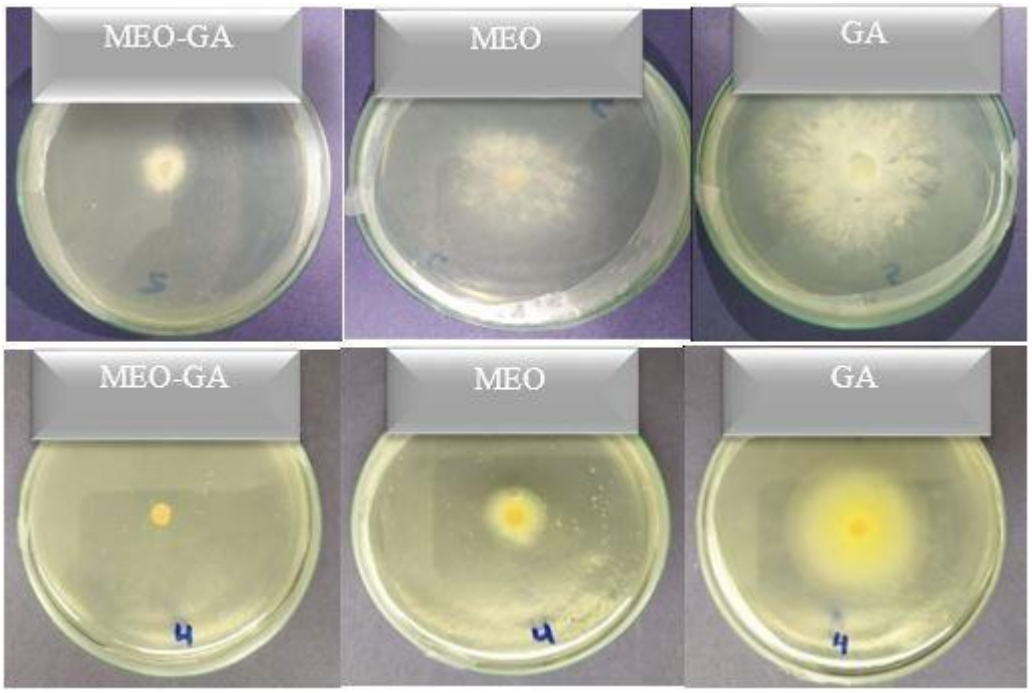


Figure 12: Antifungal activity of; complex essential oil-gum arabic (MEOC-GA), mixture essential oil (MEO) and gum arabic (GA) against wood decay fungi growth of (a) *Poria placenta* and (b) *Gloeophyllum trabeum*. All in the concentration of 62.5 µg/mL.

Table 8: Effective concentration values (EC_{50}) of GA, MEO-GA, and MEO against brown wood rot fungi.

Wood decay fungi	Samples	EC_{50} (µg/mL) (95% confidence intervals)	Slope ± SE	Intercept ± SE	R^2	*P-value*
G. trabeum	GA	144.88 (142.56-147.20)	0.83±0.08	3.29±0.19	0.97	0.00
	MEO-GA	5.15 (4.27-6.03)	1.22±0.16	4.13±0.34	0.95	0.00
	MEO	15.69 (14.89-16.49)	1.55±0.24	3.12±0.63	0.92	0.00
	Nystatin	6.71 (5.72-7.71)	1.82±0.21	2.94±0.59	0.94	0.00
P. placenta	GA	327.36 (324.15-330.57)	0.99±0.12	2.48±0.29	0.90	0.00
	MEO-GA	12.63 (11.98-13.28)	1.38±0.19	3.48±0.44	0.94	0.00
	MEO	26.42 (25.66-27.18)	1.41±0.20	2.99±0.49	0.92	0.00
	Nystatin	12.36 (11.51-13.22)	1.32±0.16	3.48±0.42	0.96	0.00

EC_{50}: Effective concentration of 50 percent of maximal effect; Slope ± SE: Slope of regression line ± standard error; Intercept ± SE: Intercept of regression line ± standard error; GA: gum Arabic; MEO: essential oil mixture; MEO-GA: essential oil mixture encapsulated with Gum Arabic

4. Conclusion

In the present study, the inclusion complex of MEO in GA was optimized using a response surface design, and the effect of nanoencapsulation on antifungal activity was evaluated against brown-rot fungus decay. The oil mixture was successfully nanoencapsulated into GA, as determined by characterization evaluation. The RSM results indicated that encapsulation efficiency could achieve a value of 87% in optimal conditions: 10% of MEO/ethanol and a 1:10 ratio of MEO/GA. FTIR and XRD analysis revealed that GA and MEO complexes exhibited different properties before and after the inclusion procedure, which enabled the conclusion of the inclusion process. The TGA results also indicated that the presented inclusion complex showed higher thermal stability than the MOE. Regarding antifungal activity, the nanoencapsulation of MEO with GA significantly improved the activity against *G. trabeum* and *P. placenta*. Therefore, the MEO-GA formulated in this research can be used as a green alternative for controlling brown-rot fungi and, therefore, can potentially be applied in the wood industry.

Reference

[1] M. Z. M. Salem, Y. E. Zidan, M. M. A. Mansour, N. M. N. El, and W. A. A. Abo, "International Biodeterioration & Biodegradation Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by fi ve common mold fungi," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 106, pp. 88–96, 2016, doi: 10.1016/j.ibiod.2015.10.010.

[2] M. M. A. Mansour and M. Z. M. Salem, "International Biodeterioration & Biodegradation Evaluation of wood treated with some natural extracts and Paraloid B-72 against the fungus Trichoderma harzianum : Wood elemental composition , in-vitro and application evidence," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, vol. 100, pp. 62–69, 2015, doi: 10.1016/j.ibiod.2015.02.009.

[3] T. P. Schultz, D. D. Nicholas, and A. F. Preston, "A brief review of the past, present and future of wood preservation," *Pest Management Science*, vol. 63, no. 8. pp. 784–788, Aug. 2007, doi: 10.1002/ps.1386.

[4] A. Sil, K. Pramanik, P. Samantaray, M. F. Mondal, and V. Yadav, "Essential oils: A boon towards eco-friendly management of phytopathogenic fungi," *~ 1884 ~ J. Entomol. Zool. Stud.*, vol. 8, no. 4, pp. 1884–1891, 2020, [Online]. Available: http://www.entomoljournal.com.

[5] S. S. Cheng, C. Y. Lin, H. J. Gu, and S. T. Chang, "Antifungal activities and chemical composition of wood and leaf essential oils from cunninghamia konishii," *J. Wood Chem. Technol.*, vol. 31, no. 3, pp. 204–217, Jul. 2011, doi: 10.1080/02773813.2010.515049.

[6] S. Moutaouafiq, A. Farah, Y. Ez zoubi, M. Ghanmi, B. satrani, and D. Bousta, "Antifungal Activity of Pelargonium graveolens Essential Oil and its Fractions Against Wood Decay Fungi," *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, vol. 22, no. 4, pp. 1104–1114, Jul. 2019, doi: 10.1080/0972060X.2019.1646164.

[7] M. El Ajjouri *et al.*, "Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de Thymus algeriensis Boiss. & Reut. et Thymus ciliatus (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois," *Acta Bot. Gall.*, vol. 157, no. 2, pp. 285–294, 2010, doi: 10.1080/12538078.2010.10516206.

[8] B. Ekhlil *et al.*, "Chemical quality, antibacterial and antifungal activities of Cotula cinerea essential oil from South Morocco," *Environemental Sci.*, vol. 12, no. 5, pp. 209–216, 2016, [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/301292319.

[9] C. Turek and F. C. Stintzing, "Stability of essential oils: a review," *Compr. Rev. food Sci. food Saf.*, vol. 12, no. 1, pp. 40–53, 2013.

[10] A. R. Bilia, C. Guccione, B. Isacchi, C. Righeschi, F. Firenzuoli, and M. C. Bergonzi, "Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2014, 2014.

[11] F. Vahidmoghadam, R. Pourahmad, A. Mortazavi, D. Davoodi, and R. Azizinezhad, "Characteristics of freeze-dried nanoencapsulated fish oil with whey protein concentrate and gum arabic as wall materials," *Food Sci. Technol.*, vol. 39, pp. 475–481, 2019.

[12] P. S. Gils, D. Ray, and P. K. Sahoo, "Designing of silver nanoparticles in gum arabic based semi-IPN hydrogel," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 46, no. 2, pp. 237–244, 2010.

[13] T. Zeng, Z. Wu, J. Zhu, S. Yin, C. Tang, and L. Wu, "Development of antioxidant Pickering high internal phase emulsions (HIPEs) stabilized by protein / polysaccharide hybrid particles as potential alternative for PHOs," *Food Chem.*, vol. 231, pp. 122–130, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.116.

[14] M. A. Ashour, W. Fatima, M. Imran, M. M. Ghoneim, S. Alshehri, and F. Shakeel, "A review on the main phytoconstituents, traditional uses, inventions, and patent literature of gum Arabic emphasizing Acacia seyal," *Molecules*, vol. 27, no. 4, p. 1171, 2022.

[15] M. S. Barre, F. B. Ali, M. E. S. Mirghani, N. F. Hazri, H. Anuar, and N. A. M. Nasir, "Potential food additive of boswellia carterii essential oil encapsulated within gum arabic: A

particle size distribution and zeta potential analysis," *Food Res*, vol. 4, pp. 19–23, 2020.

[16] M. Atgié, J.-C. Garrigues, A. Chennevière, O. Masbernat, and K. Roger, "Gum Arabic in solution: Composition and multi-scale structures," *Food Hydrocoll.*, vol. 91, pp. 319–330, 2019.

[17] S. Patel and A. Goyal, "Applications of natural polymer gum arabic: a review," *Int. J. Food Prop.*, vol. 18, no. 5, pp. 986–998, 2015.

[18] P. A. Williams and G. O. Phillips, "Gum arabic," in *Handbook of hydrocolloids*, Elsevier, 2021, pp. 627–652.

[19] A. K. Chaudhari, V. K. Singh, S. Das, and N. K. Dubey, "Nanoencapsulation of essential oils and their bioactive constituents: A novel strategy to control mycotoxin contamination in food system," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 149, no. January, p. 112019, 2021, doi: 10.1016/j.fct.2021.112019.

[20] W. Weisany *et al.*, "Targeted delivery and controlled released of essential oils using nanoencapsulation: A review," *Adv. Colloid Interface Sci.*, p. 102655, 2022.

[21] A. K. Chaudhari, V. K. Singh, S. Das, and N. K. Dubey, "Nanoencapsulation of essential oils and their bioactive constituents: A novel strategy to control mycotoxin contamination in food system," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 149, p. 112019, 2021.

[22] S. Annemer, B. Satrani, H. Stambouli, A. Assouguem, T. Bouayoun, and A. Farah, "Simultaneous Hydrodistillation of Cedrus atlantica Manetti and Salvia rosmarinus Spenn: Optimization of anti-wood-decay fungal activity using mixture design methodology," 2022.

[23] L. Hu *et al.*, "Microencapsulation of brucea javanica oil: Characterization, stability and optimization of spray drying conditions," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 36, pp. 46–54, 2016.

[24] B. Muhoza, S. Xia, X. Wang, and X. Zhang, "The protection effect of trehalose on the multinuclear microcapsules based on gelatin and high methyl pectin coacervate during freeze-drying," *Food Hydrocoll.*, vol. 105, p. 105807, 2020.

[25] A. Ez-Zoubi, A. Ramzi, M. Fadil, A. E. O. Lalami, and A. Farah, "Ethanol and glycerol green emulsifying solvent for the formation of a Lavandula stoechas essential oil/β-cyclodextrin inclusion complex: mixture design and adulticidal activity against Culex pipiens," *Heliyon*, vol. 8, no. 8, p. e10204, 2022.

[26] E. Karrar *et al.*, "Effect of maltodextrin combination with gum arabic and whey protein isolate on the microencapsulation of gurum seed oil using a spray-drying method," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 171, pp. 208–216, 2021.

[27] Q. A. Al-Maqtari *et al.*, "Stabilization of water-in-oil emulsion of Pulicaria jaubertii extract by ultrasonication: Fabrication, characterization, and storage stability," *Food Chem.*, vol. 350, p. 129249, 2021.

[28] J. G. Galvão *et al.*, "β-cyclodextrin inclusion complexes containing Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oil: An alternative to control Aedes aegypti larvae," *Thermochim. Acta*, vol. 608, pp. 14–19, 2015.

[29] H. C. B. Paula, F. M. Sombra, F. O. M. Abreu, and R. Paul, "Lippia sidoides essential oil encapsulation by angico gum/chitosan nanoparticles," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 21, pp. 2359–2366, 2010.

[30] A. Remmal, T. Bouchikhi, K. Rhayour, M. Ettayebi, and A. Tantaoui-Elaraki, "Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 5, no. 2, pp. 179–184, 1993, doi: 10.1080/10412905.1993.9698197.

[31] B. Satrani, A. Farah, M. Fechtal, M. Talbi, M. Blaghen, and A. Chaouch, "Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de Satureja calaminthe et Satureja alpine du Maroc.," *Ann. Fals. Exp. Chim.*, vol. 94, pp. 241–50, 2001.

[32] D. J. Finney, "Statisical logic in the monitoring of reactions to therapeutic drugs.," *Methods Inf.*

Med., vol. 10, no. 4, pp. 237–245, 1971, doi: 10.1055/s-0038-1636052.

[33] S. Ghafari, H. A. Aziz, M. H. Isa, and A. A. Zinatizadeh, "Application of response surface methodology (RSM) to optimize coagulation-flocculation treatment of leachate using poly-aluminum chloride (PAC) and alum," *J. Hazard. Mater.*, vol. 163, no. 2–3, pp. 650–656, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.07.090.

[34] S. S. Abu Amr, H. A. Aziz, and M. J. K. Bashir, "Application of Response Surface Methodology (RSM) for Optimization of Semi-Aerobic Landfill Leachate Treatment Using Ozone," in *Sewage and Landfill Leachate: Assessment and Remediation of Environmental Hazards*, Berghahn Books, 2016, pp. 225–246.

[35] S. Annemer *et al.*, "Chemometric Investigation and Antimicrobial Activity of Salvia rosmarinus Spenn Essential Oils," *Molecules*, vol. 27, no. 9, p. 2914, 2022, doi: 10.3390/molecules27092914.

[36] K. Hannour, A. Boughdad, A. Maataoui, and A. Bouchelta, "Chemical composition of Rosmarinus officinalis (Lamiaceae) essential oils and evaluation of their toxicity against Bruchus rufimanus (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) in Morocco," *Int. J. Trop. Insect Sci.*, vol. 38, no. 3, pp. 192–204, Sep. 2018, doi: 10.1017/S1742758418000012.

[37] A. Bouyahya *et al.*, "Chemical composition of Mentha pulegium and Rosmarinus officinalis essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities," *Microb. Pathog.*, vol. 111, pp. 41–49, Oct. 2017, doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.015.

[38] A. Ainane *et al.*, "Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: Cedrus atlantica, Citrus limonum, Rosmarinus officinalis, Syzygium aromaticum and Eucalyptus globules," *Mater. Today Proc.*, vol. 13, pp. 474–485, 2018, doi: 10.1016/j.matpr.2019.04.004.

[39] M. Aberchane and M. Fechtal, "Analysis of Moroccan Atlas Cedarwood Oil (Cedrus atlantica Manetti)," vol. 16, no. December, pp. 542–547, 2004.

[40] S. Zrira and M. Ghanmi, "Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential of Cedrus atlantica (Cedarwood oil)," *J. Essent. Oil-Bearing Plants*, vol. 19, no. 5, pp. 1267–1272, Jul. 2016, doi: 10.1080/0972060X.2015.1137499.

[41] S. El Kharraf, M. L. Faleiro, F. Abdellah, S. El-Guendouz, E. M. El Hadrami, and M. G. Miguel, "Simultaneous hydrodistillation-steam distillation of rosmarinus officinalis, lavandula angustifolia and citrus aurantium from morocco, major terpenes: Impact on biological activities," *Molecules*, vol. 26, no. 18, Sep. 2021, doi: 10.3390/molecules26185452.

[42] E. J. Muturi, J. L. Ramirez, K. M. Doll, and M. J. Bowman, "Combined toxicity of three essential oils against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) larvae," *J. Med. Entomol.*, vol. 54, no. 6, pp. 1684–1691, 2017.

[43] S. Mahanta and B. Khanikor, "Mosquitocidal activity of twenty-eight plant essential oils and their binary mixtures against Culex quinquefasciatus,(Diptera: Culicidae)," *Heliyon*, vol. 7, no. 2, p. e06128, 2021.

[44] D. W. Wangrawa *et al.*, "Essential oils and their binary combinations have synergistic and antagonistic insecticidal properties against Anopheles gambiae s. l. (Diptera: Culicidae)," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 42, no. February, 2022, doi: 10.1016/j.bcab.2022.102347.

[45] M. Aberchane, B. Satrani, M. Fechtal, and A. Chaouch, "Effet de l'infection du bois de Cèdre de l'Atlas par Trametes pini et Ungulina officinalis sur la composition chimique et l'activité antibactérienne et antifongique des huiles essentielles," *Acta Bot. Gall.*, vol. 150, no. 2, pp. 223–229, 2003, doi: 10.1080/12538078.2003.10515420.

[46] A. Elamrani, S. Zrira, B. Benjilali, and M. Berrada, "A study of moroccan rosemary oils," *J. Essent. Oil Res.*, vol. 12, no. 4, pp. 487–495, 2000, doi: 10.1080/10412905.2000.9699572.

[47] S. El Kharraf *et al.*, "Encapsulation of Rosmarinus officinalis essential oil in β-cyclodextrins," *J. Food Process. Preserv.*, vol. 45, no. 10, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1111/jfpp.15806.

[48] M. Mehran, S. Masoum, and M. Memarzadeh, "Microencapsulation of Mentha spicata

essential oil by spray drying: Optimization, characterization, release kinetics of essential oil from microcapsules in food models," *Ind. Crops Prod.*, vol. 154, p. 112694, 2020.

[49] C. Cai, "Preparation and antimicrobial activity of thyme essential oil microcapsules prepared with gum," pp. 19740–19747, 2019, doi: 10.1039/c9ra03323h.

[50] S. Mohajeri, H. A. Aziz, M. H. Isa, M. A. Zahed, and M. N. Adlan, "Statistical optimization of process parameters for landfill leachate treatment using electro-Fenton technique," *J. Hazard. Mater.*, vol. 176, no. 1–3, pp. 749–758, 2010.

[51] H. Zhang, X. Ran, X. Wu, and D. Zhang, "Evaluation of electro-oxidation of biologically treated landfill leachate using response surface methodology," *J. Hazard. Mater.*, vol. 188, no. 1–3, pp. 261–268, 2011.

[52] K. Yetilmezsoy and A. Saral, "Stochastic modeling approaches based on neural network and linear–nonlinear regression techniques for the determination of single droplet collection efficiency of countercurrent spray towers," *Environ. Model. Assess.*, vol. 12, pp. 13–26, 2007.

[53] R. Arunachalam and G. Annadurai, "Optimized response surface methodology for adsorption of dyestuff from aqueous solution.," *J. Environ. Sci. Technol.*, vol. 4, no. 1, pp. 65–72, 2011.

[54] M. D. López and M. J. Pascual-Villalobos, "Analysis of monoterpenoids in inclusion complexes with β-cyclodextrin and study on ratio effect in these microcapsules.," *Julius-Kühn-Archiv*, no. 425, p. 705, 2010.

[55] E. I. Paramera, S. J. Konteles, and V. T. Karathanos, "Stability and release properties of curcumin encapsulated in Saccharomyces cerevisiae, β-cyclodextrin and modified starch," *Food Chem.*, vol. 125, no. 3, pp. 913–922, 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.071.

[56] C. S. Mangolim *et al.*, "Curcumin-β-cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application," *Food Chem.*, vol. 153, pp. 361–370, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.12.067.

[57] H. C. F. Carneiro, R. V Tonon, C. R. F. Grosso, and M. D. Hubinger, "Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials," *J. Food Eng.*, vol. 115, no. 4, pp. 443–451, 2013.

[58] R. S. Matche and O. O. Adeogun, "Physicochemical characterisations of nanoencapsulated Eucalyptus globulus oil with gum Arabic and gum Arabic nanocapsule and their biocontrol effect on anthracnose disease of Syzygium malaccense Fruits," *Sci. African*, vol. 18, p. e01421, 2022, doi: 10.1016/j.sciaf.2022.e01421.

[59] N. Hasheminejad, F. Khodaiyan, and M. Safari, "Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles," *Food Chem.*, vol. 275, pp. 113–122, 2019.

[60] R. L. Abarca, F. J. Rodriguez, A. Guarda, M. J. Galotto, and J. E. Bruna, "Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component," *Food Chem.*, vol. 196, pp. 968–975, 2016.

[61] A. A. Mahdi *et al.*, "Microencapsulation of fingered citron extract with gum arabic, modified starch, whey protein, and maltodextrin using spray drying," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 152, pp. 1125–1134, 2020.

[62] A. Ali, Q. A. Al-maqtari, J. Khaleel, W. Al-ansi, H. Cui, and L. Lin, "Enhancement of antioxidant activity , antifungal activity , and oxidation stability of Citrus reticulata essential oil nanocapsules by clove and cinnamon essential oils," *Food Biosci.*, vol. 43, no. June, p. 101226, 2021, doi: 10.1016/j.fbio.2021.101226.

[63] T. Xu, C. Gao, X. Feng, Y. Yang, X. Shen, and X. Tang, "Structure, physical and antioxidant properties of chitosan-gum arabic edible films incorporated with cinnamon essential oil," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 134, pp. 230–236, 2019.

[64] M. Sghir Taleb, "Aromatic and Medicinal Plants in Morocco: Diversity and Socio-Economic

Role," *Int. J. Agric. Biosyst. Eng.*, vol. 11, no. 12, p. 5, 2017.

[65] S. C. Chew, C. P. Tan, and K. L. Nyam, "Microencapsulation of refined kenaf (Hibiscus cannabinus L.) seed oil by spray drying using β-cyclodextrin/gum arabic/sodium caseinate," *J. Food Eng.*, vol. 237, pp. 78–85, 2018.

[66] M. E. Sotelo-Boyás, Z. N. Correa-Pacheco, S. Bautista-Baños, and M. L. Corona-Rangel, "Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles and nanocapsules incorporated with lime essential oil and their antibacterial activity against food-borne pathogens," *LWT*, vol. 77, pp. 15–20, 2017.

[67] V. K. Singh, S. Das, A. K. Dwivedy, R. Rathore, and N. K. Dubey, "Assessment of chemically characterized nanoencapuslated Ocimum sanctum essential oil against aflatoxigenic fungi contaminating herbal raw materials and its novel mode of action as methyglyoxal inhibitor," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 153, pp. 87–95, 2019.

[68] C. S. Vali, A. Khan, M. P. Bharathi, S. S. Prasad, and A. Srikanth, "Research Article Development and Characterization of Eucalyptus Oil Loaded Poly Lactic Co-Glycolic Acid - Albumin Nanocapsules," vol. 68, no. 32, pp. 206–212, 2021, doi: 10.47583/ijpsrr.2021.v68i01.032.

[69] N. G. Hădărugă, G. N. Bandur, I. David, and D. I. Hădărugă, "A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes," *Environ. Chem. Lett.*, vol. 17, pp. 349–373, 2019.

[70] A. Fraj, F. Jaâfar, M. Marti, L. Coderch, and N. Ladhari, "A comparative study of oregano (Origanum vulgare L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability," *Ind. Crops Prod.*, vol. 140, p. 111669, 2019.

[71] M. Hadidi, S. Pouramin, F. Adinepour, S. Haghani, and S. M. Jafari, "Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities," *Carbohydr. Polym.*, vol. 236, p. 116075, 2020.

[72] R. Azadmanesh, M. Tatari, A. Asgharzade, S. F. Taghizadeh, and A. Shakeri, "GC/MS profiling and biological traits of Eucalyptus globulus L. essential oil exposed to solid lipid nanoparticle (SLN)," *J. Essent. oil Bear. plants*, vol. 24, no. 4, pp. 863–878, 2021.

[73] H. Lian, J. Shi, X. Zhang, and Y. Peng, "Effect of the added polysaccharide on the release of thyme essential oil and structure properties of chitosan based film," *Food Packag. Shelf Life*, vol. 23, p. 100467, 2020.

[74] D. M. Miss-Zacarías, M. Iñiguez-Moreno, M. Calderón-Santoyo, and J. A. Ragazzo-Sánchez, "Optimization of ultrasound-assisted microemulsions of citral using biopolymers: characterization and antifungal activity," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 43, no. 9, pp. 1373–1382, 2022, doi: 10.1080/01932691.2020.1857264.

[75] M. Maqbool, A. Ali, P. G. Alderson, M. T. M. Mohamed, Y. Siddiqui, and N. Zahid, "Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 62, no. 1, pp. 71–76, 2011.

[76] M. Izadi, S. A. M. Jorf, M. Nikkhah, and S. Moradi, "Antifungal activity of hydrocolloid nano encapsulated Carum copticum essential oil and Peganum harmala extract on the pathogenic fungi Alternaria alternata," *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, vol. 116, p. 101714, 2021.

[77] A. A. C. K. Cheong and N. Zahid, "Composite effect of propolis and gum arabic to control postharvest anthracnose and maintain quality of papaya during storage," *Int. J. Agric. Biol.*, vol. 16, no. 6, 2014.

[78] S. Valiathan and K. A. Athmaselvi, "Gum arabic based composite edible coating on green chillies," *Int. Agrophysics*, vol. 32, no. 2, pp. 193–202, 2018.

[79] L. Cai, H. Lim, D. D. Nicholas, and Y. Kim, "Bio-based Preservative using Methyl-β-cyclodextrin-Essential Oil Complexes for Wood Protection," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 147,

pp. 420–427, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.056.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVE

Ces dernières années, les plantes aromatiques et médicinales ont suscité un grand intérêt de la part des consommateurs et des scientifiques du monde entier, mais ils n'ont pas encore réussi à promouvoir leurs applications à grande échelle en raison de l'immaturité et de l'insuffisance de leur système de contrôle de la qualité.

Dans de nombreux rapports, l'identification et le contrôle de la qualité des PAM sont encore effectués par l'analyse qualitative et quantitative de quelques composés majoritaires. Or, ces derniers ne sont pas toujours adaptés au contrôle de la qualité des PAM, car de nombreuses espèces végétales ne possèdent pas de composés chimiques uniques, ce qui ne reflète pas la complexité des échantillons biologiques et ignore les effets synergiques entre les composés. Ces techniques sont puissantes et instructives pour les échantillons et les mélanges complexes.

Les approches chimiométriques s'appuient sur les relations inhérentes entre plusieurs composés pour afficher le profil chimique des sources végétales. Elle permet de comparer des données complexes en recherchant les relations entre les variables et les similitudes entre des individus. Pour cette raison, elle devient la méthode préférée de comparaison des échantillons pour les exigences d'assurance qualité. L'importance de la méthode chimiométrique a été soulignée en raison de sa large utilisation dans le contrôle de la qualité. Pour une utilisation efficace et sûre, une série de méthodes chimiométriques d'évaluation de la qualité ont été développées pour garantir la qualité des PAM selon les différentes parties de la plante, l'origine géographique, la période de récolte et les conditions de cultures.

Les travaux de recherche menés au cours de cette thèse de doctorat ont contribué à la valorisation et l'évaluation de la qualité des PAM par des outils chimiométriques par la gestion gestion de la qualité de *Crocus sativus* L. de Taliouine et Taznakht ainsi que la comparaison des différents profils des échantillons selon les différentes altitudes, puis la contribution à la connaissance du calendrier des récoltes et la caractéristique de la provenance de la plante *Salvia rosmarinus* Spenn sur le rendement et la qualité chimique des huiles essentielles par des techniques multivariées notamment, l'analyse en composantes principales, l'analyse en classification hiérarchique et la régression en moindre carré partielle. Ainsi que le développement de nouvelles formulations naturelles, éco-compatibles, stables et durables pour la préservation du bois en utilisant la technique de l'encapsulation couplée à la conception de plan d'expérience en particulier, le plan de mélange et le plan de surface de réponse.

Lors de ce travail de thèse, il nous est apparu essentiel, dans un premier temps, de réaliser une recherche bibliographique approfondie sur les PAM et les outils chimiométriques applicables dans ce secteur.

Dans le deuxième chapitre de cette thèse, nous avons étudié la qualité du safran cultivé dans les régions du sud du Maroc (région de Taliouine et de Tazenakhet) à différentes altitudes (haute, moyenne et basse). Les analyses multivariées à savoir l'ACP nous ont permis de confirmer le lien fort entre l'altitude et la qualité du safran ainsi que le lien entre l'humidité et la qualité du safran.
La PLSR nous a permis d'aboutir à un modèle mathématique analysé et validé pour prédire le pouvoir colorant des échantillons du safran en fonction de leurs absorbances dans les zones étudiées. Les résultats de l'étude peuvent être utilisés pour développer des conditions optimales pour la culture du safran afin d'améliorer la production et la qualité de cette espèce précieuse.

Dans le troisième chapitre, nous avons procédé à l'étude de l'effet de la période de récolte et la provenance sur la qualité et la quantité chimique des huiles essentielles de *S. rosmarinus*, par l'utilisation des techniques non supervisées notamment, l'ACP et l'ACH. L'analyse par ACP nous a permis de déterminer les périodes de récolte selon lesquelles les échantillons donnent le maximum rendement en huile essentielle de *S. rosmarinus* et la plus grande quantité du composant 1,8-cinéole. L'analyse par ACH nous a permis de mieux visualiser la classification des échantillons étudiés (période de récolte) en fonction des principaux composants de la composition chimique et du rendement en huile essentielle de *S. rosmarinus*. Ensuite, une activité antibactérienne de l'huile essentielle qui contient les plus grandes quantités de composé 1,8-cinéole contre les trois souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, et *Mycobacterium smegmatis*). L'activité antibactérienne a montré un potentiel inhibiteur contre toutes les souches étudiées. Enfin, les outils chimio-métriques permettant d'orienter les coopératives à mieux exploiter *S. rosmarinus* en précisant les périodes de récolte optimales pour maximiser le composé 1,8-cinéole et le rendement en huile essentielle.

Les attaques fongiques sont la principale cause des maladies infectieuses émergentes chez les bois d'œuvre. Au cours des dernières décennies, le nombre de pathogènes fongiques invasifs au monde a augmenté de manière exponentielle.
Le quatrième chapitre a été consacré à l'élaboration d'une formulation d'une combinaison binaire de *Salvia rosmarinus* Spenn et *Cedrus atlantica* Manetti obtenue par hydrodistillation

simultanée pour optimiser l'activité antifongique contre quatre champignons de pourriture du bois (*Coniophora puteana*, *Coriolus versicolor*, *Gloeophyllum trabeum*, et *Poria placenta*) en utilisant la méthodologie de plan de mélange.
La combinaison binaire de 60 % d'HE de *S. rosmarinus* et de 40 % d'HE de *C. atlantica* a donné lieu à la plus grande activité antifongique contre *G. trabeum* et *P. placenta*. La combinaison binaire de 55 % d'HE de *S. rosmarinus* et de 45 % d'HE de *C. atlantica* a présenté la plus forte activité antifongique contre *C. puteana* et *C. versicolor*. En revanche, ces activités ont été expliquées par l'effet synergique entre les monoterpènes et les sesquiterpènes existant dans *S. rosmarinus* et *C. atlantica*, respectivement, qui consolide l'apparition des nouveaux composés notamment, myrtenal. Ainsi, l'utilisation des plans d'expériences dans la formulation nous a prouvé que ces outils pourraient représenter un moyen judicieux dans la planification des expériences, l'analyse et l'optimisation des résultats. Ceci nous a permis d'opter pour des choix d'avantages précis tout en réduisant le nombre d'expériences à réaliser.

Les huiles essentielles sont des alternatives potentielles bien connues pour une application dans l'industrie de la préservation du bois, qui présentent une toxicité négligeable pour l'homme et l'environnement. Cependant, la stabilité, la solubilité dans l'eau et la biodisponibilité des composants actifs des HEs sont reconnues comme les problèmes les plus sérieux. La technologie d'encapsulation est utilisée pour surmonter ces problèmes de composants actifs.
Le dernier chapitre a été consacré à l'optimisation des conditions de la nano-encapsulation par la gomme arabique en utilisant le plan de surface de réponse ainsi que la caractérisation physicochimique de complexe d'inclusion optimale. Le mélange d'huile a été nano-encapsulé avec succès dans la gomme arabique, comme le montre l'évaluation de la caractérisation. Nous avons ensuite évalué, in vitro, l'influence des nano-encapsulations par la gomme arabique sur les activités antifongiques. Les résultats ont montré que la gomme arabique conserve ou même améliore les activités antifongiques. Ceci a mis en évidence l'importance de la gomme arabique dans le développement d'alternatives écologiques pour la conservation du bois.
Dans l'ensemble, les résultats de l'étude nous a permis d'une part de minimiser l'expérience, et d'autre part de maximiser l'inclusion par la définition du réglage optimal correspondant à la meilleure inclusion.

Les travaux réalisés et présentés dans cette thèse nous ont permis de démontrer que les méthodes statistiques telles que l'ACP, l'ACH, la PLSR et les PE peuvent s'inscrire dans une démarche

scientifique et technique visant à aboutir à des meilleures compréhensions et représentations des phénomènes physiques, chimiques et biologiques. Ces travaux nous ont aussi montré que les techniques d'analyse couplées aux outils statistiques permettent d'évaluer la qualité chimique des PAM et de développer des formulations pour l'amélioration des activités biologiques plus rapides et moins coûteuses afin de garantir une meilleure valorisation des PAM.

Pour cela, il est nécessaire de mener d'autres études afin d'établir des approches réalisables et fiables combinées à des méthodes de résolution chimiométrique, qui peuvent offrir une voie totalement nouvelle pour des analyses rapides et précises de systèmes pratiques complexes inconnus.

Dans la littérature scientifique, très peu d'études ont été réalisées sur la préservation du bois à l'aide des mélanges des huiles essentielles encapsulées par la gomme arabique contre les champignons de pointure du bois. Pour cela, il est nécessaire d'évaluer l'activité antifongique *in vivo* des mélanges encapsulés sur des éprouvettes du bois dur et tendre pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*. Ce qui est donc très intéressant d'un point de vue applicatif pour la préservation du bois. Ainsi qu'une optimisation supplémentaire (solubilisation, protection, libération) des formulations AG/HE qui ont donné les meilleurs résultats. Il serait possible d'enrober les complexes d'inclusion dans les vecteurs lipidiques comme les liposomes pour améliorer la vectorisation et la libération des HEs.

Ses différentes perspectives pourraient constituer une source d'information particulièrement utile pour développer de nouveaux produits en particulier « des vernis » contre les agents fongiques ayant pour principes actifs des molécules naturellement présentes dans les PAM. Ces produits peuvent s'inscrire comme une solution écologique à moindre coût et ouvrent des perspectives d'application intéressantes dans ce domaine.