

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1

Faculté des Sciences

Département de Chimie

THÈSE DE DOCTORAT-LMD

En Chimie

Option : Chimie des substances naturelles et de biomolécules

**DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES METHODES
D'ANALYSE DE METABOLITES DANS DES
FORMULATIONS, A BASE DES SUBSTANCES
NATURELLES, PAR SPECTROSCOPIE IRTF**

Par

BOUNAAS Karima

Devant le jury composé de :

Z. Chemat-Djenni	Professeur à USD-Blida 1	Présidente
k. Boutemak	Maitre de conférences (A) à USD-Blida 1	Examinatrice
O. Benchabane	Maitre de conférences (A) à ENSA Alger	Examineur
K. Hachama	Maitre de conférences (A) UDB Khemis Miliana	Examineur
N. Bouzidi	Maître de conférences (A) à USD-Blida 1	Co- Directrice de thèse
Y. Daghbouche	Professeur à USD-Blida 1	Directrice de thèse

Blida 2020

ملخص

هذا العمل هو جزء من المجال الواسع لتطوير طرق جديدة للتحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء في المنطقتين الطيفيتين NIR و MIR. تم استخدام الطرق التي تم تطويرها في هذه الرسالة لتحليل المستقلبات في المستحضرات التجارية المعتمدة على المواد الطبيعية.

سمح الجزء التجريبي الأول من هذا العمل بتطوير دراسة مقارنة بين استراتيجيتين للمعايرة، أحادي المتغير و متعدد المتغيرات من أجل التحديد المتزامن لأربعة أحاديات الكربون، الكافور، الثيمول، المنترول و الأكالبيتول في تركيبات تجارية تستخدم للعلاج ضد طفيل الفاروا. تمت معالجة البيانات باستخدام طريقة المعادلات النسبية في الوضع أحادي المتغير و PLS استنادا إلى النموذج 4^2 للمعايرة متعدد المتغيرات. استخدمت العلاجات الطيفية المختلفة لبناء نماذج PLS. تم أخذ خطأ التنبؤ التريبي المتوسط (RMSEP) في الاعتبار لتحديد النموذج الأمثل لكل مونوترين. تم تقييم دقة الإستراتيجيتين المتطورتين من خلال تحديد النسب المئوية للاسترداد من العينات المزودة بكميات مختلفة من المركبات الأربعة. تم تحقيق نسب استرداد 91% إلى 116%.

كما تم تخصيص الجزء التجريبي الثاني لتقييم إمكانيات الطريقتين NIR-TF و MIR-TF للكشف عن غش الزيوت الأساسية التجارية لأنواع مختلفة من النباتات. تم تحليل العينات التي تم الحصول عليها دون علاج مسبق. تم تسجيل أطياف إرسال NIR-TF و ATR-MIR-TF في المنطقة بين 14000 و 4000 سم⁻¹ و بين 4000 و 500 سم⁻¹ على التوالي. تم الحصول على الزيوت الأساسية النقية عن طريق التقطير المائي و التقطير بالبخار و تم استخدام أطياف NIR و MIR كمرجع. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها، وجود المذيبات في تركيبات تجارية معينة وسمحت بالتحقق السريع من الزيوت العطرية النقية المستخرجة بشكل صحيح من الزيوت المخففة.

أما الجزء الأخير فهو مخصص من أجل تحديد غش العينات تجارية من الزيوت الأساسية لنبتة القرنفل، و هذا طريق التقدير الكمي للمحتوى الفعلي للزيوت الأساسية الموجودة (تحليلها على أنه أوجينول، كونه المنتج الرئيسي للزيوت العطرية من (*S. aromaticum* L.) في العينات التجارية بواسطة NIR-TF و ATR-MIR-TF باستعمال PLS كطرق سريعة. قدمت النماذج التي تم إنشاؤها بواسطة NIR و ATR-MIR خطأ متوسط التحقق من الصحة (RMSECV) قدره 0,194% ح/ح و 0,191% ح/ح، و كذلك قيم (RPD) بقيمة 43,5 و 44,4 على التوالي. تم تقييم دقة المنهجية المقترحة أيضا من خلال نتائج استرداد زيت القرنفل النقي الأساسي المضاف إلى العينات التجارية. تم تحقيق مردود بين 97% و 103% و بين 92% و 107% لـ NIR و MIR.

تم استخدام طريقة الكروماتوغرافي (CG) المرتبطة بطريقة الكشف (SM) كطريقة مرجعية. النتيجة التي تم الحصول عليها بواسطة مطيافية IRTF قابلة للمقارنة و مماثلة لنتائج CG-SM، و التي تظهر قدرة المنهجية الطيفية مع ادماج PLS، لتكون أداة بسيطة و بيئية لمراقبة جودة المستحضرات التجارية القائمة على المنتجات الطبيعية. و مع ذلك، يوفر التحليل الطيفي MIR نتائج تنبؤ أفضل من التحليل الطيفي NIR.

الكلمات المفتاحية: مونوترين، زيوت أساسية، غش، المنتجات التجارية، أشعة تحت الحمراء، ATR، IRTF، PLS

RESUME

Ce travail s'inscrit dans le large domaine de développement de nouvelles méthodes d'analyse par spectroscopie infrarouge dans les deux régions spectrales NIR et MIR. Les méthodes développées, dans le cadre de cette thèse, ont été exploitées pour l'analyse de métabolites dans des formulations commerciales à base des substances naturelles.

La première partie expérimentale a permis le développement d'une étude comparative entre deux stratégies de calibration, univariée et multivariée pour la détermination simultanée de quatre monoterpènes, camphre, thymol, menthol et eucalyptol, dans des formulations commerciales utilisées pour lutter contre le varroa. Les données ont été traitées selon la méthode des équations proportionnelles en mode univarié et par PLS, basée sur le modèle 4^2 , pour la calibration multivariée. Différents traitements spectraux ont été utilisés pour la construction des modèles de PLS. L'erreur de prédiction quadratique moyenne (RMSEP) a été prise en compte pour sélectionner le modèle optimisé pour chaque monoterpène. La précision des deux stratégies développées a été évaluée par la détermination des pourcentages de récupération à partir des échantillons enrichis avec différentes quantités des quatre composés. Des pourcentages de récupération compris entre 91-116% ont été atteints.

La deuxième partie expérimentale a été consacrée à l'évaluation du potentiel des deux techniques NIR-TF et MIR-TF pour la détection de l'adultération des huiles essentielles commerciales de différentes espèces de plantes. Les échantillons obtenus ont été mesurés sans traitement préalable. Les spectres de transmission NIR-TF et d'ATR-MIR-TF ont été enregistrés dans la région comprise entre 14000 et 4000 cm^{-1} et entre 4000 et 550 cm^{-1} , respectivement. Les huiles essentielles pures ont été obtenues par hydrodistillation et entraînement à la vapeur d'eau, leurs spectres NIR et MIR ont été utilisés comme référence. Les résultats obtenus ont mis en évidence la présence de solvants dans certaines formulations commerciales et ont permis une authentification rapide des huiles essentielles pures correctement extraites de celles diluées.

La dernière partie expérimentale a été réservée à la détermination de l'adultération des échantillons commerciaux de l'huile essentielle de *S. aromaticum* L. (clous de girofle) et ce, par la quantification de la teneur réelle de l'huile essentielle pure (analysée globalement sous forme d'eugénol, étant le produit majoritaire de l'huile essentielle) présente dans ces échantillons par NIR-TF et ATR-MIR-TF associées à la PLS comme méthodes rapides. Les modèles construits par NIR et ATR-MIR ont fourni une erreur quadratique moyenne de validation croisée (RMSECV) de 0.194% (v/v) et 0.191% (v/v) et des valeurs de déviation résiduelle prédictive (RPD) de 43,5 et 44,1, respectivement. L'exactitude des deux méthodologies développées a également été évaluée à partir des valeurs de récupération de l'huile essentielle de clous de girofle pure ajoutée à des échantillons commerciaux. Des pourcentages de récupération compris entre 97% et 103% et entre 92% et 107% ont été atteints pour le NIR et le MIR, respectivement.

La méthode chromatographique (CG) associée avec la méthode de détection (SM) a été utilisée comme méthode de référence. Le résultat obtenu par spectroscopie IRTF est comparable et similaire à celui de la CG-SM, ce qui montre la capacité des deux méthodologies spectroscopiques avec la régression PLS, d'être un outil simple et écologique pour le contrôle qualité des formulations commerciales à base des produits naturels. Cependant, la spectroscopie MIR fournit de meilleurs résultats de prédiction que la spectroscopie NIR.

Mots clés: Terpènes, huiles essentielles, adultération, formulations commerciales, IRTF, ATR, PLS

Abstract

This work is part of the broad field of development of new infrared spectroscopic analysis methods in the two spectral regions NIR and MIR. The developed methods in this thesis have been used for the analysis of metabolites in commercial formulations based on natural substances.

The first experimental part allowed the development of a comparative study between two calibration strategies, univariate and multivariate for the simultaneous determination of four monoterpenes, camphor, thymol, menthol and eucalyptol in commercial formulations used to fight against varroa mites. The data were processed using the proportional equations method in univariate mode and PLS, based on model 4² for multivariate calibration. Different spectral treatments were used for the built of PLS models. The mean square error of prediction (RMSEP) was taken into account to select the optimized model for each monoterpene. The accuracy of the two developed strategies was evaluated from spiked samples with different amounts of the four compounds. Recovery percentages of 91%-116% have been achieved.

The second experimental part was devoted to evaluate the potential of the two techniques NIR-FT and MIR-FT for the detection of commercial essential oils adulteration of different plant species. The samples obtained were directly measured without any previous treatment. NIR-FT transmission and ATR-MIR-FT spectra of samples were recorded in the range between 14000 and 4000 cm⁻¹ and from 4000 to 550 cm⁻¹, respectively. Pure essential oils were obtained by hydro and steam-distillation, their NIR and ATR-MIR spectra were used as reference. The results obtained showed the presence of solvents in certain commercial formulations and allowed rapid authentication of pure essential oils correctly extracted from diluted ones.

The last experimental part was reserved for the determination of the adulteration of the commercial samples of *S. aromaticum* L. (clove) essential oil and this, by the quantification of the actual content of the pure essential oil present (analyzed globally as eugenol, being the major product of *S. aromaticum* L. essential oil) in commercial samples using NIR-FT and ATR-MIR-FT, combined

with PLS regression as fast methodologies. Models built for NIR and ATR-MIR provided root mean square error of cross validation (RMSECV) of 0.194% v/v and 0.191 % v/v, together with residual predictive deviation (RPD) values of 43,5 and 44,1, respectively. The accuracy of proposed methodologies was evaluated also from recovery studies of commercial oil samples spiked with different amount of pure clove essential oil. Recovery percentages between 97% and 103% and between 92% and 107% were achieved for NIR-FT and MIR-FT respectively. The chromatographic method (GC) associated with the detection method (MS) was used as a reference method. The result obtained by FTIR spectroscopy is comparable and similar to that of GC-MS, which shows the ability of the two spectroscopic methodologies with PLS regression, to be a simple and ecological tool for the quality control of commercial formulations based on natural products. However, MIR spectroscopy provides better prediction results than NIR spectroscopy.

Key words: Terpenes, essential oils, adulteration, commercial formulations, FTIR, ATR, PLS

DEDICACES

A la mémoire de ma chère mère

A mon cher tendre père

A toute ma famille

Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de
mes études

REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à ma directrice de thèse Madame Y. Daghbouche, Professeur à l'université Saad Dahleb-Blida 1, pour son aide précieuse, le suivi et les conseils qu'elle m'a sans cesse prodigués, d'avoir été présente chaque fois que j'en avais besoin et pour la confiance qu'elle m'a accordée pour mener à bien ce projet. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour ses encouragements.

J'adresse mes sincères remerciements à ma co-directrice de thèse, Madame N. Bouzidi, Maitre de conférences (A) à l'université Saad Dahleb-Blida 1, pour l'aide précieuse, le soutien moral et les précieux conseils qu'elle m'a apportée pour faire aboutir à cette thèse.

Je tiens à remercier Madame la présidente ainsi que Mesdames et Messieurs les membres du jury :

Madame Z. Chemat-Djenni, Professeur à l'université Saad Dahleb Blida 1,

Madame k. Boutemak, Maitre de conférences (A) à l'université Saad Dahleb Blida 1,

Monsieur O. Benchabane, Maitre de conférences (A) à Ecole Nationale Supérieure Agronomique Alger,

Monsieur K. Hachama, Maitre de conférences (A) Université Djilali Bounaama Khemis Miliana,

qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur M. El Hattab, Professeur à l'université Saad Dahleb-Blida 1, directeur de laboratoire de chimie des substances naturelles et de biomolécules, pour son aide et ses encouragements.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur M. de la Guardia professeur au département de la chimie analytique Université de Valence Espagne pour son accueil au sein de son laboratoire de chimie analytique, pour son encadrement sans faille et pour sa précieuse aide, et pour la confiance qu'il m'a accordé pour mener à bien ce travail. J'ai pu constamment bénéficier de ses suggestions et de ses encouragements.

J'exprime aussi ma vive reconnaissance à Monsieur S. Garrigues professeur au département de la chimie analytique Université de Valence Espagne, pour m'avoir encadré, pour son aide précieuse, sa gentillesse, sa patience, ses compétences en chimie analytique et son professionnalisme et ses encouragements.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire de chimie analytique, université de Valence Espagne pour leur sympathie, leur amitié et l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée durant mon séjour en Espagne et particulièrement à Madame M.L. Cervera et Messieurs D. Gallart, J. Galileo et M. Ramacciotti.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Monsieur le professeur A. Berbar de l'Institut des sciences vétérinaires, Université Saad Dahleb Blida 1 et à Madame F. Zermane, Maitre de conférences (A) à l'Université Saad Dahleb Blida 1, pour leurs aides précieuses, leurs conseils et leurs encouragements. Merci.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail, en particulier: L. Mebarek, H. Boudissa, H. Chouit, R. Belabbas, H. Khaled, H. Letrech, Z. Boumahdi, N. Ouakli.

Je n'oublie surement pas mes collègues et amies qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun par sa façon à la progression de ce travail dans une ambiance toujours amicale et stimulante.

Pour finir, je voudrais exprimer ma vive reconnaissance et ma profonde gratitude à mon cher père qui m'a entouré de son amour, pour ses sacrifices, sa protection, sa patience, ses conseils et de sa générosité tout au long de la réalisation de ce travail « que dieu le protège ». J'aimerais remercier de la même manière mon cher frère pour sa protection et son aide précieuse, ma famille (ma belle-sœur, ma belle-mère, ma chère tante et mes cousins et cousines). A ces chères personnes je dédie ce travail.

TABLE DES MATIERES

RESUME		
REMERCIEMENTS		
TABLE DES MATIERES		
LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX		
INTRODUCTION		25
CHAPITRE 1 : PARTIE THEORIQUE		
1.1	Huiles essentielles	28
1.1.1	Historique	28
1.1.2	Définition et localisation	29
1.1.3	Composition chimique	29
1.2	Adultération des huiles essentielles et contexte réglementaire	32
1.2.1	Adultération des huiles essentielles	32
1.2.2	Contexte réglementaire	34
1.3	Techniques d'extraction des huiles essentielles	36
1.3.1	Techniques d'extraction conventionnelles	36
1.3.1.1	Entrainement à la vapeur d'eau	36
1.3.1.2	Hydrodistillation	37
1.3.1.3	Hydrodiffusion	38
1.3.1.4	Distillation destructive	39
1.3.1.5	Expression à froid	39
1.3.2	Techniques d'extraction innovantes	40
1.3.2.1	Extraction assistée par ultra-sons (EAU)	40
1.3.2.2	Extraction assistée par micro-ondes (EAM)	43
1.3.2.3	Extraction par fluide supercritique(EFS)	50
1.4	Techniques d'analyses	52
1.4.1	Techniques analytiques classiques	53
1.4.2	Chromatographie en phase gazeuse (CG)	54
1.4.3	Spectroscopie infrarouge (IR)	56

1.5	Lien entre la chimie verte et la chimie analytique verte	68
1.5.1	Principes de la chimie verte	68
1.5.2	Chimie Analytique Verte	69
1.5.3	Composants de l'échelle écologique	70

**CHAPITRE 2: ANALYSE DE FORMULATIONS
COMMERCIALES UTILISEES POUR LE TRAITEMENT CONTRE
LE VARROA PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A
TRANSFORMEE DE FOURIER**

2.1	Introduction	75
2.2	Partie expérimentale	78
2.2.1	Appareil et logiciel	78
2.2.2	Réactifs et produits	79
2.2.3	Préparation des échantillons	80
2.2.4	Mesures MIR-TF	80
2.3	Résultats et discussion	81
2.3.1	Identification des bandes séparées des étalons	81
2.3.2	Optimisation de la sensibilité de détermination	82
2.3.3	Spectres IRTF d'étalons et d'échantillons de formulation	86
2.3.4	Traitement des données par équations proportionnelles pour la calibration univariée	87
2.3.5	Analyse de mélanges synthétiques et de formulations commerciales de camphre, thymol, menthol et eucalyptol en utilisant la calibration univariée	90
2.3.6	Traitement des données par la régression des moindres carrés partiels (PLS)	93
2.3.7	Exactitude et précision de la calibration PLS	94
2.3.8	Evaluation de la durabilité de la méthode	97
2.4	Conclusion	98

**CHAPITRE 3: IDENTIFICATION DE L'ADULTERATION DES
HUILES ESSENTIELLES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE
A TRANSFORMEE DE FOURIER**

3.1	Introduction	99
3.2	Partie expérimentale	102
3.2.1	Matériel	102
3.2.2	Appareillage et méthodes	103
3.2.2.1	Extraction des huiles essentielles	103
3.2.2.2	Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	104
3.2.2.2.1	Proche infrarouge (NIR-TF)	104
3.2.2.2.2	Moyen infrarouge (MIR-TF)	105
3.3	Résultats et discussion	106
3.3.1	Spectres NIR-TF des huiles essentielles pures	106
3.3.2	Spectres NIR-TF des huiles essentielles commerciales	109
3.3.3	Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures	114
3.3.4	Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles commerciales	117
3.3.5	Evaluation des huiles commerciales basée sur la comparaison de leurs spectres NIR-TF et ATR-MIR-TF avec ceux des huiles essentiels pures	122
3.3.6	Identification des solvants dans les huiles essentielles commerciales	123
3.3.7	Confirmation de l'adultération des huiles essentielles commerciales en exploitant la soustraction entre les deux spectres IR	129
3.4	Conclusion	134

**CHAPITRE 4: ANALYSE DE L'HUILE ESSENTIELLE
SYZYGIUM AROMATICUM L. DANS DES ECHANTILLONS
COMMERCIAUX ADULTERES PAR SPECTROSCOPIE
INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER**

4.1	Introduction	135
4.2	Partie expérimentale	139
4.2.1	Matériel et réactifs	139

4.2.2	Appareillage et méthodes	140
4.2.3	Extraction d'huile essentielle	141
4.2.4	NIR-TF procédure	142
4.2.5	ATR-MIR-TF procédure	143
4.2.6	Traitement des données	143
4.2.7	Méthode de référence chromatographique (CG-SM)	144
4.3	Résultats et discussion	145
4.3.1	Détermination d'huile essentielle pure de clous de girofle dans des échantillons commerciaux par spectroscopie NIR-TF	145
4.3.1.1	Spectres NIR-TF des huiles essentielles pures de clous de girofle	145
4.3.1.2	Effet du processus d'extraction de l'huile essentielle de clous de girofle sur l'analyse par spectroscopie NIR-TF	146
4.3.1.3	Spectres NIR-TF des huiles essentielles commerciales de clous de girofle	148
4.3.1.4	Analyse qualitative des échantillons d'huile essentielle commerciale de clous de girofle par spectroscopie NIR-TF	150
4.3.1.5	Effet du solvant (huile végétale) dans l'analyse des huiles essentielles commerciales de clous de girofle sur l'analyse par spectroscopie NIR-TF	151
4.3.1.6	Modèles PLS-NIR pour la détermination de l'huile essentielle dans des échantillons commerciaux	154
4.3.2	Détermination d'huile essentielle pure de clous de girofle dans des échantillons commerciaux par spectroscopie MIR-TF	155
4.3.2.1	Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures de clous de girofle	155
4.3.2.2	Effet du processus d'extraction de l'huile essentielle de clous de girofle sur l'analyse par MIR-TF	156
4.3.2.3	Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles commerciales de clous de girofle	158
4.3.2.4	Analyse qualitative des échantillons d'huile essentielle commerciale de clous de girofle par spectroscopie MIR-TF	160

4.3.2.5	Effet du solvant (huile végétale) dans l'analyse des huiles essentielles commerciales de clous de girofle sur l'analyse par MIR-TF	161
4.3.2.6	Modèles PLS-ATR-MIR-TF pour la détermination de l'huile essentielle de clous de girofle dans des échantillons commerciaux	163
4.3.3	Exactitude et précision des méthodes NIR-TF et ATR-MIR-TF	164
4.3.4	Analyse qualitative des échantillons d'huile essentielle commerciale de clous de girofle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG-SM	165
4.3.5	Quantification de la teneur réelle de l'huile essentielle pure dans des échantillons d'huile essentielle commerciale de clous de girofle	169
4.3.6	Evaluation du caractère vert des méthodologies développées par PLS-NIR-TF et PLS-MIR-TF	170
4.4	Conclusion	172
	CONCLUSION GENERALE	173
	PERSPECTIVES	176
	REFERENCES	177
	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	199
	APPENDICES	

LISTE DES ILLUSTRATION GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1.	Appareillage utilisé pour entrainement à la vapeur d'eau.	37
Figure 1.2.	Montage pour hydrodistillation des huiles essentielles.	38
Figure 1.3.	Appareillage utilisé pour l'hydrodiffusion.	39
Figure 1.4.	Appareillage utilisé pour l'expression à froid.	40
Figure 1.5.	Deux systèmes basiques à ultrasons de 20 à 80 KHz. A gauche: Système de bain à faible intensité; à droite: Système de sonde à ultrasons à haute intensité.	41
Figure 1.6.	Extracteur à ultrasons utilisé pour l'extraction d'une huile essentielle.	42
Figure 1.7.	Schéma du chauffage de l'échantillon par (A) chauffage conventionnel et (B) chauffage par micro-ondes.	44
Figure 1.8.	Distillation assistée par micro-ondes à air comprimé (DMAC).	45
Figure 1.9.	Schéma d'une installation d'hydrodistillation sous vide à micro-ondes (HDVM).	46
Figure 1.10.	Schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDM).	47
Figure 1.11.	Schéma de l'entrainement à la vapeur sous micro-ondes (EVM).	48
Figure 1.12.	Schéma de L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.	49
Figure 1.13.	Schéma de l'hydrodiffusion et la gravité par micro-ondes (HGM).	50
Figure 1.14.	Schéma représentant l'instrumentation de l'extraction supercritique.	52
Figure 1.15.	Diagramme d'un spectromètre IRTF avec interféromètre de Michelson.	58
Figure 1.16.	La relation entre la chimiométrie et les différentes disciplines.	61
Figure 1.17.	Etapas de l'analyse multicomposante basée sur la chimiométrie et la spectroscopie vibrationnelle.	62

Figure 1.18.	Schéma fonctionnel montrant la procédure du fonctionnement de l'algorithme PLS (Calibration).	65
Figure 1.19.	Procédure pour remplir une cellule scellée.	66
Figure 1.20.	Schéma représentatif de la cellule de flux.	66
Figure 1.21.	Quelques exemples de cellules disponibles pour la mesure des spectres de transmission.	67
Figure 1.22.	Mesure de la réflexion interne (réflexion totale atténuée), ATR.	68
Figure 1.23.	Stratégies de la chimie analytique verte dans le cadre des principes de la chimie verte.	70
Figure 1.24.	Certificat vert d'une méthode analytique.	74
Figure 2.1.	Montage IRTF utilisé pour l'introduction des solutions dans la cellule.	79
Figure 2.2.	Spectres IRTF des standards de camphre, thymol, menthol et eucalyptol, dilués dans du dichlorométhane à une concentration de 5 mg mL ⁻¹ pour chaque composé. Les spectres ont été obtenus en accumulant 25 scans et une résolution spectral de 4 cm ⁻¹ .	82
Figure 2.3.	Spectre IRTF d'absorbance de chaque composé à 0,05 mg mL ⁻¹ et un chemin optique de 0,1 mm: (a) Thymol, (b) eucalyptol, (c) camphre, (d) menthol préparés directement dans le CH ₂ Cl ₂ .	83
Figure 2.4.	Spectre IRTF d'absorbance de chaque composé à 0,05 mg mL ⁻¹ et un chemin optique de 0,5 mm: (a) Thymol, (b) eucalyptol, (c) camphre, (d) menthol préparés directement dans le CH ₂ Cl ₂ .	84
Figure 2.5.	Spectre IRTF d'absorbance de chaque composé à 0,05 mg mL ⁻¹ et un chemin optique de 1 mm: (a) Thymol, (b) eucalyptol, (c) camphre, (d) menthol préparés directement dans le CH ₂ Cl ₂ .	85
Figure 2.6.	Spectres IRTF de trois formulations différentes de terpènes anti Varroa dissous dans du dichlorométhane. Les spectres ont été obtenus en accumulant 25 scans et une résolution de 4 cm ⁻¹ .	87

Figure 2.7.	Système d'équations proportionnelles utilisé pour l'analyse d'échantillons de formulations terpéniques anti- varroa en mode univarié.	89
Figure 2.8.	Certificat vert de la méthode développée pour la détermination des terpènes dans des formulations de traitement de varroase par PLS-IRTF.	98
Figure 3.1.	Spectrophotomètre NIR-TF.	105
Figure 3.2.	(A) Spectrophotomètre MIR-TF, (B) module ATR.	106
Figure 3.3.	Spectres NIR-TF des huiles essentielles pures extraites par hydrodistillation: (M.ch.1) <i>M. chamomilla</i> L.; (A.g.1) <i>A. graveolens</i> L.; (C.ca.1) <i>C. Cassia</i> ; (L.n.1) <i>L. nobilis</i> L.; (R.m.1) <i>R. montana</i> L.; (F.v.1) <i>F. vulgare</i> ; (T. v. 1) <i>T. vulgaris</i> ; (P.a.1) <i>P.anisum</i> ; (P.c.1) <i>P. crispum</i> ; (C.lo.1) <i>C. long</i> ; (S.a.1) <i>S. aromaticum</i> L.; (Z.o.1) <i>Z. officinale</i> ; (M.o.1) <i>M. officinalis</i> ; (M.s. 1) <i>M. spicata</i> L., (A.h.1) <i>A. herba-alba</i> , (P.n.1) <i>P. nigrum</i> L.; (C.cy.1) <i>C. cyminum</i> L. et (C.c.1) <i>C. carvi</i> L.	107
Figure 3.4.	Spectres NIR-TF des huiles essentielles pures extraites par entraînement à la vapeur d'eau: (C.l.1) <i>C. limon</i> ; (C.r.1) <i>C. reticulata</i> L.; (C.s.1) <i>C. semperviens</i> L.; (J.c.1) <i>J. communis</i> L.; (P.h.1) <i>P. halepensis</i> ; (E.g.1) <i>E. globulus</i> ; (C.si.1) <i>C. sinensis</i> L.; (M.c.1) <i>M. communis</i> L.; (R.o.1) <i>R. officinalis</i> ; (L.a.1) <i>L. angustifolia</i> ; (M.p.1) <i>M. piperita</i> , (P.g.1) <i>P. gravelen</i> ; (P.l.1) <i>P. lentiscus</i> L. et (S.o.1) <i>S. officinalis</i> .	108
Figure 3.5A.	Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: [(P.a.2), (P.a.3)] <i>P. anisum</i> ; (A.h.2) <i>A. herba-alba</i> ; [(M.ch.3), (M.ch.4)] <i>M. chamomilla</i> L.; [(C.ca.2), (C.ca.3)] <i>C.cassia</i> ; [(C.c.2), (C.c.3)] <i>C. carvi</i> L.; [(C.l.3), (C.l.4)] <i>C. limon</i> L.; [(C.cy.2), (C.cy.3)] <i>C. cyminum</i> L.; (S.a.2) <i>S. aromaticum</i> L.; [(C.lo.2), (C.lo.3)] <i>C. longa</i> ; [(C.s.2), (C.s.3)] <i>C. semperviens</i> ; (E.g.4) <i>E. globules</i> ; (F.v.2) <i>F. vulgare</i> ; (J.c.3) <i>J. communis</i> L. et [(Z. o. 2), (Z. o. 3)] <i>Z. officinale</i> . Figure insérée: Spectre de l'huile de tournesol.	110

- Figure 3.5B. Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (M.c.2) *M. communis* L.; [(L.a.4), (L.a.5)] *L. angustifolia* Mill.; [(P.l.2), (P.l.3), (P.l.4)] *P. lentiscus* L.; (M.o.2) *M. officinalis*; [(M.p.2), (M.p.3)] *M. piperita*; [(M.s.3), (M.s.4)] *M. spicata* L.; [(P.c.2), (P.c.3)] *P. Crispum*; [(P.h.2), (P.h.3)] *P. halepensis*; (P.n.2) *P. nigrum* L.; [(R.o.4), (R.o.5)] *R. officinalis*; [(R.m.2), (R.m.3)] *R. montana*; [(S.o.4), (S.o.5)] *S. officinalis* et (T.v.4) *T. vulgaris*. Figure insérée: Spectre de l'huile de Tournesol. 111
- Figure 3.6. Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (M.ch.2) *M. chamomilla* L.; (A.g.2) *A. graveolens* L.; (C.l.2) *C. limon* L.; (E.g.2) *E. globulus*; (J.c.2) *J. communis* L.; (L.n.2) *L. nobilis*; [(L.a.2), (L.a.3)] *L. angustifolia* Mill.; (C.r.2) *C. reticulata* L.; (M.s.2) *M. spicata* L.; (C.si.2) *C. sinensis* L.; [(R.o.2), (R.o.3)] *R. officinalis*; [(S.o.2), (S.o.3)] *S. officinalis* et [(T.v.2), (T.v.3)] *T. vulgaris*. Figure insérée: Spectre de la vaseline pure. 112
- Figure 3.7. Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (C.ca.4) *C. cassia*; (S.a.3) *S. aromaticum* L. et (Z.o.4) *Z. officinale*. 113
- Figure 3.8. Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (E.g.3) *E. globulus*; (P.g.2) *P. graveolens*; (M. p. 4) *M. piperita* et (T.v.5) *T. vulgaris*. 114
- Figure 3.9. Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures extraites par hydrodistillation: (P.a.1) *P. anisum*; (C.cy.1) *C. cyminum* L.; (S.a.1) *S. aromaticum* L.; (T.v.1) *T. vulgaris*; (C.ca.1) *C. Cassia*; (P.c.1) *P. crispum*; (R.m.1) *R. montana* L.; (P.n.1) *P. nigrum* L.; (F.v.1) *F. vulgare*; (L.n.1) *L. nobilis* L.; (C.lo.1) *C. long*; (M.s.1) *M. spicata* L.; (M.ch.1) *M. chamomilla* L.; (Z.o.1) *Z. officinale*; (A.h.1) *A. herba-alba*; (M.o.1) *M. officinalis*; (C.c.1) *C. carvi* L. et (A. g. 1) *A. graveolens* L. 115

- Figure 3.10. Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures extraites par entraînement à la vapeur d'eau: (P.g.1) *P. gravelens*; (R.o.1) *R. officinalis*; (P.h.1) *P. halepensis*; (C.s.1) *C. semperviens*; (M.p.1) *M. piperita*; (L.a.1) *L. angustifolia* ; (E.g.1) *E. globulus* ; (S.o.1) *S. officinalis*; (P.l.1) *P. lentiscus* L.; (J.c.1) *J. communis* L.; (C.r.1) *C. reticulata* L.; (C.si.1) *C. sinensis* L.; (C.l.1) *C. limon* L. et (M.c.1) *M. communis* L. 116
- Figure 3.11A Spectres ATR-MIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: [(P.a.2), (P.a.3)] *P. anisum*; (A.h.2) *A. herba-alba*; [(M.ch.3), (M.ch.4)] *M. chamomilla* L.; [(C.ca.2), (C.ca.3)] *C. cassia*; [(C.c.2), (C.c.3)] *C. carvi* L.; [(C.l.3), (C.l.4)] *C. limon* L.; [(C.cy.2), (C.cy.3)] *C. cyminum* L.; (S. a.2) *S. aromaticum* L.; [(C.lo.2), (C.lo.3)] *C. longa*; [(C.s.2), (C.s.3)] *C. semperviens*; (E.g.4) *E. globules*; (F.v.2) *F. vulgare*; (J.c.3) *J. communis* L. et [(Z.o.2), (Z.o.3)] *Z. officinale*. Figure insérée: Spectre de l'huile de tournesol. 118
- Figure 3.11B Spectres ATR-MIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (M.c.2) *M. communis* L.; [(L.a.4), (L.a.5)] *L. angustifolia* Mill.; [(P.l.2), (P. l. 3), (P. l. 4)] *P. lentiscus* L.; (M.o.2) *M. officinalis*; [(M.p.2), (M.p.3)] *M. piperita*; [(M.s.3), (M. s. 4)] *M. spicata* L.; [(P.c.2), (P.c.3)] *P. crispum*; [(P.h.2), (P.h.3)] *P. halepensis*; (P.n.2) *P. nigrum* L.; [(R.o.4), (R.o.5)] *R. officinalis*; [(R.m.2), (R.m.3)] *R. montana*; [(S.o.4), (S.o.5)] *S. officinalis* et (T.v.4) *T. vulgaris*. Figure insérée: Spectre de l'huile de tournesol. 119
- Figure 3.12. Spectres ATR-MIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (M.ch.2) *M. chamomilla* L.; (A.g.2) *A. graveolens* L.; [(C.l.2) *C. limon* L.; (E.g.2) *E. globulus*; (J.c.2) *J. communis* L.; (L.n.2) *L. nobilis*; [(L.a.2), (L.a.3)] *L. angustifolia* Mill; (C.r.2) *C. reticulata* L.; (M.s.2) *M. spicata* L.; (J.c.2) *J. Communis* L.; (C.si.2) *C. sinensis* L.; [(R.o.2), (R.o. 3)] *R. officinalis*; [(S.o.2), (S.o.3)] *S. officinalis* et [(T.v.2), (T.v. 3)] *T. vulgaris*. Figure insérée: Spectre de la vaseline pure. 120

Figure 3.13.	Spectres ATR-MIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (C.ca.4) <i>C. cassia</i> ; (S.a.3) <i>S. aromaticum</i> L. et (Z.o.4) <i>Z. officinale</i> .	121
Figure 3.14.	Spectres ATR-MIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (T.v.5) <i>T. vulgaris</i> ; (M.p.4) <i>M. piperita</i> , (P.g.2) <i>P. graveolens</i> et (E.g.3) <i>E. globules</i> .	122
Figure 3.15.	Spectres NIR-TF des huiles essentielles de la lavande (<i>L. angustifolia</i> Mill.), pure (L.a.1) et commerciales (L.a.2), (L.a.3), (L.a.4) et (L.a.5).	124
Figure 3.16.	Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles de la lavande (<i>L. angustifolia</i> Mill.), pure (L.a.1) et commerciales (L.a.2), (L.a.3), (L.a.4) et (L.a.5).	124
Figure 3.17.	Spectres NIR-TF (A) et ATR-MIR-TF (C) d'huile de tournesol et d'huile commerciale de clous de girofle. Spectres NIR-TF(B) et ATR-MIR-TF (D) d'huile essentielle pure de clous de girofle et la différence obtenue entre les spectres l'huile commerciale et celui de tournesol.	133
Figure 4.1.	Dispositif expérimental de l'extraction assistée par micro-Ondes.	142
Figure 4.2.	Spectres NIR-TF des différents échantillons d'huiles essentielles de clous de girofle obtenus par hydrodistillation (Ech. He. 1-4), entraînement à la vapeur d'eau (Ech. He. 5-6) et extraction assistée par micro-ondes (Ech. He. 7-8). Figure insérée: Spectres des standards eugénol et acétate d'eugénol pure.	146
Figure 4.3A.	Spectres NIR-TF d'huiles essentielles commerciales de clous de girofle présentant de grandes similitudes avec les bandes d'huile végétale: (He. Com. C. g.1-9). Figure insérée: Spectre de l'huile de tournesol.	149
Figure 4.3B.	Spectres NIR-TF d'huiles essentielles commerciales de clous de girofle présentant de fortes similitudes avec les bandes d'huile essentielle pure: (He. Com. C. g. 10-11). Figure insérée: Spectre de l'huile essentielle pure de clous de girofle.	150

Figure 4.4.	Spectres NIR-TF de l'huile essentielle de clous de girofle pure (He. Pure) et de la soustraction entre les huiles commerciales (He. Com. C. g.1-9) et l'huile de tournesol: (He. Com. C. g. Sous. 1-9).	151
Figure 4.5.	Spectres NIR-TF des huiles végétales utilisées dans cette étude: huile de tournesol, huile d'olive et huile de maïs.	153
Figure 4.6.	Spectres ATR-MIR-TF des différents échantillons d'huiles essentielles de clous de girofle obtenus par hydrodistillation (Ech. He. 1-4), entraînement à la vapeur d'eau (Ech. He. 5-6) et extraction assistée par micro-ondes (Ech. He. 7-8). Figure insérée: Spectres des standards eugénol et acétate d'eugénol pure.	156
Figure 4.7A.	Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles commerciales de clous de girofle présentant de grandes similitudes avec les bandes d'huile végétale: (He. Com. C. g.1-9). Figure insérée: Spectre de l'huile de tournesol.	159
Figure 4.7B.	Spectres ATR-MIR-TF d'huiles essentielles commerciales de clous de girofle présentant de fortes similitudes avec les bandes d'huile essentielle pure: (He. Com. C. g. 10-11). Figure insérée: Spectre de l'huile essentielle pure de clous de girofle.	160
Figure 4.8.	Spectres ATR-MIR-TF de l'huile essentielle de clous de girofle (He. Pure) et de la soustraction entre les huiles commerciales (He. Com. C. g.1-9) et l'huile de tournesol: (He. Com. C. g. Sous. 1-9).	161
Figure 4.9.	Spectres ATR-MIR-TF des huiles végétales utilisées dans cette étude: huile de tournesol, huile d'olive et huile de maïs.	162
Figure 4.10.	Certificat vert des deux méthodes développées pour la quantification de l'huile essentielle de clous de girofle dans des échantillons commerciaux par PLS-NIR-TF et ATR-MIR-TF comparés, avec la méthode de référence (CG-SM).	171

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1.	Exemples de quelques monoterpènes.	31
Tableau 1.2.	Exemples de quelques sesquiterpènes.	31
Tableau 1.3.	Adultérants de certaines huiles essentielles.	33
Tableau 1.4.	Substances susceptibles d'entraîner des réactions allergiques.	35
Tableau 1.5.	Détecteurs NIR et leurs domaines d'application.	59
Tableau 1.6.	Points de pénalité pour les risques de certains réactifs.	72
Tableau 1.7.	Points de pénalité pour l'énergie de certaines techniques d'analyse.	73
Tableau 2.1.	Droites de calibration obtenues pour la détermination des composés par IRTF en utilisant l'analyse univariée selon des critères Sélectionnés.	89
Tableau 2.2.	Analyse de mélanges synthétiques de camphre, thymol, menthol et eucalyptol par IRTF en utilisant la calibration univariée basée sur le modèle mathématique de système d'équations proportionnelles.	91
Tableau 2.3.	Analyse de camphre, Thymol, menthol et eucalyptol par IRTF dans des formulations en utilisant la calibration univariée basée sur le modèle mathématique de système d'équations proportionnelles.	92
Tableau 2.4.	Résumé des paramètres optimums des modèles PLS optimisés pour la détermination de monoterpènes dans des formulations anti-varroa par IRTF.	94
Tableau 2.5.	Exactitude et précision du modèle, PLS-IRTF, pour la détermination des monoterpènes (camphre, thymol, menthol et eucalyptol) dans des formulations anti-varroa.	95
Tableau 2.6.	Analyse de camphre, Thymol, Menthol et eucalyptol par IRTF en utilisant la calibration PLS.	96

Tableau 2.7.	Calcul des points de pénalité relatifs à la méthode, PLS-IRTF, développée.	97
Tableau 3.1.	Concordance des spectroscopies NIR-TF et MIR-TF pour la détection de la présence d'un solvant dans les échantillons commerciaux utilisés dans cette étude.	125
Tableau 3.2.	Comparaison entre les spectres des huiles essentielles pures et des huiles essentielles commerciales après soustraction du solvant ajouté dans les deux zones spectrales NIR/MIR.	130
Tableau 4.1.	Droites d'étalonnage de l'huile essentielle de clous de girofle obtenues par différents processus d'extraction, dans l'huile de tournesol par NIR-TF.	147
Tableau 4.2.	Droites d'étalonnages de mélanges d'eugénol et d'huile végétale (v/v) par NIR-TF.	153
Tableau 4.3.	Paramètre du modèle PLS-NIR-TF optimisé pour la détermination de la teneur réelle de l'huile essentielle dans des formulations commerciales adultérées d'huile de clous de girofle.	154
Tableau 4.4.	Droites d'étalonnage de l'huile essentielle de clous de girofle obtenues par différents processus d'extraction, dans l'huile de tournesol par MIR-TF.	157
Tableau 4.5.	Droites d'étalonnages de mélanges d'eugénol et d'huile végétale (v/v) par MIR-TF.	163
Tableau 4.6.	Paramètres du modèle PLS-ATR-MIR-TF optimisé pour la détermination de l'huile essentielle dans des formulations commerciales adultérées d'huile de clous de girofle.	164
Tableau 4.7.	Récupération de l'huile essentielle pure de clous de girofle ajoutée aux échantillons commerciaux adultérés par PLS-NIR-TF et PLS-ATR-MIR-TF.	165
Tableau 4.8.	Composition chimique d'échantillons d'huile essentielle (pure et commerciale) de clous de girofle par HS-GC-MS.	166
Tableau 4.9.	Composition chimique des échantillons d'huile essentielle pure de clous de girofle par CG-SM.	167

Tableau 4.10.	Composition chimique des échantillons commerciaux d'huile essentielle de clous de girofle par CG-SM.	168
Tableau 4.11.	Teneur en huile essentielle de clous de girofle analysée globalement sous forme d'eugénol [(v/v)%] dans des échantillons commerciaux adultérés (He. Com. C. g) en utilisant les deux méthodes développées, PLS-NIR-TF, PLS-ATR-MIR-TF et la méthode de référence CG-SM.	170
Tableau 4.12.	Calcul des points de pénalité.	171

INTRODUCTION

Les plantes aromatiques, médicinales et les plantes épicées sont utilisées dans le monde depuis des siècles pour des fins alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques thérapeutiques et agro-alimentaire. L'organisation mondiale de la santé estime que près de 80% de la population mondiale utilise principalement des remèdes à base de plantes et que 40% des produits pharmaceutiques dérivent des plantes [1]. L'importance et la valeur de ces plantes, reviennent à la présence des molécules chimiques complexes dans ces organes «feuilles, tiges, racines et graines», dites métabolites secondaires. Les métabolites secondaires constituent un groupe biologiquement et chimiquement intéressant, qui fait l'objet de nombreuses recherches, notamment la recherche de nouveaux composés bioactifs. Ces métabolites secondaires sont classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les huiles essentielles et ces composés, les composés phénoliques, les saponosides, et les alcaloïdes.

Les huiles essentielles sont des produits naturels très intéressants et l'étude de ces produits est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Elles constituent un groupe des composés aromatiques (odoriférants) volatils (principalement les mono-et sesquiterpénoides, etc.), dotés de diverses propriétés biologiques [2-4].

La Méthode d'obtention des huiles essentielles intervient de façon déterminante dans le rendement en huile et dans la composition de cette dernière, de ce fait, des méthodes non-conventionnelles s'inscrivent dans le concept d'approches vertes ont été développés pour améliorer le rendement et la sélectivité des composants bioactifs à partir de la matière végétale. Les techniques chromatographiques sont considérées comme des techniques, les plus fiables, les plus appropriées pour l'analyse des huiles essentielles à savoir, l'identification des composés volatils, le contrôle de qualité et la détermination de leur adultération en raison de la grande efficacité de séparation, sensibilité et

sélectivité de la détection de la spectrométrie de masse. Cependant, ces techniques impliquent de longues étapes de préparation des échantillons, et l'utilisation des grandes quantités de solvant, en tenant compte des préoccupations actuelles du public sur l'environnement, des études analytiques sur l'environnement et l'utilisation consécutive de réactifs toxiques et de solvants ont pris une telle ampleur qu'il est devenu insoutenable de continuer à fonctionner sans une perspective écologique [5]. Pour ces raisons, le développement de nouvelles méthodes d'analyses plus simples, rapides, disponibles, moins coûteuses et propres est nécessaire pour l'analyse des huiles essentielles comme produit naturel.

L'objectif principal visé, dans le cadre de cette thèse, concerne la contribution dans le large domaine de développement de méthodes d'analyse par spectroscopie infrarouge dans les deux régions spectrales NIR et MIR.

Le travail entrepris dans le cadre de cette thèse est composé de quatre parties: La première partie est une partie bibliographique dont laquelle nous avons présentés différents points, à savoir la définition d'une huile essentielle, sa localisation, ces propriétés, les méthodes utilisées pour l'extraction et les méthodes d'analyse.

La deuxième partie est consacrée à la détermination rapide et simultanée de monoterpènes présents dans des formulations commerciales utilisées pour lutter contre le varroa par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Cette partie de travail a pour objectif d'évaluer et de comparer l'utilisation de deux stratégies de calibration univariée et multivariée, associée à la régression des moindres carrés partiels (PLS).

L'identification de l'adultération des huiles essentielles par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier comme méthode simple a été mise en évidence dans la troisième partie. L'objectif de cette dernière, est d'étudier le pouvoir de la spectroscopie NIR et MIR comme méthodes principales et

approches simples pouvant être employées par de jeunes laboratoires de contrôle qualité pour la détection de l'adultération des huiles essentielles. Les deux techniques ont été comparées pour montrer leurs potentiels en tant que méthodologies directes dans la détection de l'adultération d'huiles essentielles pour un grand nombre d'échantillons disponibles sur le marché.

La dernière partie est consacrée à la détermination de l'adultération des échantillons commerciaux de l'huile essentielle de *S. aromaticum* L. (clous de girofle) et ce, par la quantification de la teneur réelle de l'huile essentielle pure (analysée globalement sous forme d'eugénol, étant le produit majoritaire de l'huile essentielle de *S. aromaticum* L.) présente dans des échantillons commerciaux par NIR-TF et ATR-MIR-TF associées à la PLS comme approches rapides. Le résultat obtenu par spectroscopie IRTF ont été comparés à ceux obtenus par la méthode de référence CG-SM, ceci met en évidence la capacité des deux méthodologies spectroscopiques pour être un outil complémentaire simple, rapide et écologique pour le contrôle qualité des formulations commerciales à base des produits naturels.

Nous avons terminé cette thèse par une conclusion générale suivie de perspectives.

CHAPITRE 1

PARTIE THEORIQUE

1.1 Huiles essentielles

1.1.1 Historique

L'utilisation des parfums et des arômes remonte aux anciennes civilisations lorsque les parfums ont joué un rôle important dans les applications nutritionnelles, esthétiques et spirituelles au cours de la période pharaonique. Des composés aromatiques naturels ont été largement utilisés pour des rituels religieux. Ils ont été découverts dans des bandages de momies. La distillation comme méthode de production d'huile essentielle a été utilisée pour la première fois, en Inde, en Perse et en Egypt. Les grecs et les romains ont apporté leur contribution à la mise en place de principes de base de la distillation, tels que l'invention de «ambix» qui peut être appliqué aussi pour l'extraction que pour la distillation. Au 9^{ème} siècle, la civilisation musulmane a fortement contribué dans le développement des techniques de distillation et d'extraction. Geber (712-815) et Avicenne (930-1037) ont inventé l'alambic, la distillation et le réfrigérant, respectivement [6, 7].

Au 13^{ème} siècle les huiles essentielles ont été fabriquées dans des pharmacies et leurs effets pharmacologiques ont été décrits dans des pharmacopées, mais leurs utilisations ne semblent pas avoir été généralisées en Europe avant le 16^{ème} siècle. L'invention du flacon florentin par Giovanni Battista Della Porta (1533-1615) a facilité la séparation des huiles essentielles et l'eau après l'extraction, et depuis l'industrie des arômes a connu la popularité des parfums pour le cuir au 16^{ème} siècle, la distillation de la bergamote et de l'huile de néroli au 17^{ème} siècle, la diffusion et le développement des premiers aromes synthétiques et des parfums de fougères au 19^{ème} siècle, les parfumeurs renommés et les parfums célèbres au 20^{ème} siècle et l'essor de leur utilisation dans le domaine des parfums, des cosmétiques, produits alimentaires, des

produits pharmaceutiques, ainsi que de leur importance croissante et l'impact sur l'aromathérapie, la psychothérapie et la physiothérapie [6, 7].

1.1.2 Définition et localisation

Selon l'Association Française de Normalisation (AFNOR) et la 7^{ème} édition de la pharmacopée européenne, les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont définies comme «produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par hydrodistillation et distillation à la vapeur, soit par distillation à sec, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est généralement séparée de la phase aqueuse par une méthode physique qui ne provoque pas de changement significatif dans sa composition chimique» [8, 9].

Les huiles essentielles peuvent être trouvées dans divers organes de plantes de différentes familles, dont on a découvert que les familles Lamiaceae, Myrtaceae et Rutaceae ont un niveau élevé de composés aromatiques volatils. En fait, seules 10% des espèces de plantes peuvent synthétiser et sécréter de petites quantités d'essence et on les appelle ainsi les plantes aromatiques. De plus, les huiles essentielles extraites de différents organes dans les mêmes plantes sont variables dans leurs compositions [10].

1.1.3 Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes avec divers constituants chimiques. Chaque constituant a son odeur caractéristique et ses effets. Bien que les huiles essentielles contiennent de nombreux types de composés, un ou deux composants dominant souvent leur action physiologique. Un grand nombre des propriétés de l'huile de menthe poivrée, par exemple, peuvent être attribuées à sa teneur en menthol (40%) et l'action de l'eucalyptus est largement déterminée par sa teneur en 1,8 cinéole (75%). Les composants comprennent deux groupes d'origine biosynthétique distincte. Le groupe principal est composé de terpènes et de terpénoids et l'autre de constituants aromatiques et aliphatiques [3, 11].

- Terpènes

Les terpènes forment des classes avec des structures et des fonctions différentes. Ils sont formés à partir d'associations de plusieurs unités à base de cinq carbones (C5) appelées isoprène. La biosynthèse des terpènes consiste en la synthèse du précurseur de l'isopentényl diphosphate (IPP), l'addition répétitive d'IPP pour former le précurseur du prényldiphosphate des différentes classes de terpènes, la modification du prényldiphosphate allylique par des synthétases spécifiques du terpène pour former le squelette du terpène et enfin, la modification enzymatique secondaire (réaction d'oxydoréduction) du squelette pour attribuer des propriétés fonctionnelles aux différents terpènes [3].

Les principaux terpènes sont les monoterpènes (C10) et les sesquiterpènes (C15), mais il existe également des hémiterpènes (C5), des diterpènes (C20), des triterpènes (C30) et des tétraterpènes (C40). Un terpène contenant de l'oxygène s'appelle un terpenoïde. Les monoterpènes sont formés par le couplage de deux unités d'isoprène (C5). Ce sont les molécules les plus représentatives, constituant 90% des huiles essentielles et permettent une grande variété de structure et ils comportent plusieurs fonctions selon le tableau 1.1 [3].

Les sesquiterpènes sont formés à partir de l'assemblage de trois unités d'isoprène (C5). L'extension de la chaîne augmente le nombre de cyclisations ce qui permet une grande variété de structures. Les fonctions des sesquiterpènes sont similaires à celles des monoterpènes selon le tableau 1.2 [3].

Des exemples de plantes à savoir, bergamote, cumin, céleri, citronnelle, coriandre, eucalyptus, géranium, genévrier, lavande, menthe poivrée, sauge, romarin, peuvent contenir ces composés à des proportions différentes ainsi peuvent être majoritaires ou à l'état de trace [3].

Tableau 1.1 : Exemples de quelques monoterpènes [3].

Monoterpène	Exemple
Carbure	acyclique: myrcène, ocimène, etc monocyclique: terpinènes, p-cimène, phellandrène, etc bicycliques: pinènes, 3-carène, camphène, sabinène, etc
Alcools	acycliques: géraniol, linalol, citronellol, lavandulol, nérol, etc monocyclique: menthol, α -terpinéol, carvéol, etc bicycliques: bornéol, fenchol, chrysanthénol, thuyan-3-ol, etc
Aldéhydes	acycliques: géranial, néral, citronellal, etc
Cétone	acyclique: tegetone, etc monocyclique: menthones, carvone, pulegone, pipéritone, etc bicycliques: Camphre, fenchone, thuyone, ombellulone, etc
Esters	acycliques: Acétate de linalyle, acétate de citronellyle, etc monocyclique: Acétate de menthyle ou d'aterpinyle, etc bicyclique: Acétate d'isobornyle, etc
Ethers	1,8 cinéole, menthofurane, etc
Peroxydes	ascaridole, etc
Phénols	Thymol, carvacrol, etc

Tableau 1.2 : Exemples de quelques sesquiterpènes [3].

Sesquiterpène	Exemple
Carbure	Azulène, β - bisabolène, cadimènes, zingiberène, etc
Alcools	Bisabol, cedrol, farnesol, carotol, β -santalol, etc
Cétone	Germacrone, nootkatone, β -vetinone, turmerones, etc
Peroxydes	oxide de caryophyllene, epoxides d'humulène, etc

- Composés aromatiques

Les composés aromatiques sont constitués essentiellement des dérivés du phénylpropane. Ils sont moins fréquents que les terpènes, sont synthétisés par la voie de la biosynthèse de l'acide shikimique à partir du phosphoénolpyruvate et du 4-phosphate d'érythrose. Ils se caractérisent par une chaîne de trois atomes de carbone liée à un cycle benzénique. Les composés aromatiques comprennent les

aldéhydes (Cinnamaldéhyde), les alcools (Alcool cannelle), les phénols (Chavicol, eugénol), les dérivés méthyloxy (Anéthole, élémicine, estragole, méthyleugénol) et les composés de méthylène dioxy (apiole, myristicine, safrole) [3, 11].

Les principales sources végétales pour ces composés sont: L'anis, la cannelle, les clous de girofle, le fenouil, le persil, l'anis étoilé. Quelques huiles essentielles ont des constituants contenant du soufre, qui ne relèvent d'aucune des catégories précédentes, et encore moins celles qui contiennent de l'azote [3, 11].

1.2 Adultération des huiles essentielles et contexte réglementaire

1.2.1 Adultération des huiles essentielles

Le but de la falsification est d'accroître les profits en ajoutant des substances odorantes ou non odorantes afin de diluer une huile essentielle. Les adultérants odorants peuvent inclure d'autres huiles essentielles, des fractions ou résidus d'huiles essentielles, des produits chimiques synthétiques similaires à ceux présents dans l'huile. Les diluants comprennent des substances telles que l'éthanol, l'huile minérale, glycols et les huiles fixes (végétale). Le tableau 1.3 résume quelques exemples d'adultération [11].

Les huiles essentielles les plus coûteuses sont fortement sujettes à l'adultération. Il s'agit notamment des huiles essentielles de néroli et de rose. Dans d'autres cas l'adultération dépend du prix de l'huile essentielle sur le marché et de l'adultérant proposé. Les huiles essentielles les moins chères, telles que l'orange douce et l'eucalyptus, sont parmi les moins susceptibles d'être adultérées. Une autre forme de falsification qui peut être extrême, ce qui signifie l'absence des éléments étiquetés. Par exemple, le méthyle salicylate synthétique peut être laissé passer pour huile de gingembre, ou benzaldéhyde synthétique comme huile d'amande amère. Des mélanges de composés naturels et synthétiques sont souvent proposés sous forme d'huiles de mélisse ou de verveine [11].

On peut trouver aussi des créations entièrement synthétiques qui sont considérées comme de l'huile naturelle, soit ajoutées comme des adultérants. Ces «huiles reconstituées» sont fabriquées en combinant manuellement des composants uniques similaires à ceux présents dans l'huile naturelle, mais en laissant généralement de côté la plupart des composants en traces. Les huiles reconstituées sont parfois déclarées comme telles, mais peuvent être vendues comme naturelles [11].

Tableau 1.3 : Adultérants de certaines huiles essentielles [11].

Huile essentielle	Exemples des adultérants utilisés
Bergamote	Autres huiles d'agrumes ou leurs résidus, linalol synthétique, limonène ou acétate de linalyle
Pamplemousse	Terpènes d'orange, limonène
Lavande	Huile de sauge espagnole, fractions d'huile de camphre blanc, linalol synthétique ou acétate de linalyle
Citron	Citral ou limonène naturel ou synthétique, terpènes ou sous-produits citronnés
Citronnelle	Citral synthétique
Patchouli	Huile de bois de cèdre, les résidus de distillat de camphre, les huiles végétales
Pin	Huile de térébenthine, mélanges de terpènes tels que α -pinène, camphène et limonène et les esters tels que l'acétate de (-) bornyle et l'acétate d'isobornyle
Rose	Ethanol, 2-phényléthanol, fraction d'huile de géranium
Romarin	Huile d'eucalyptus, huile de camphre blanc et essence de térébenthine
Bois de santal	Huile de bois de santal australien ou est-africain, terpènes de santal, huile de noix de coco et polyéthylène glycol

1.2.2 Contexte réglementaire

Le nombre et la diversité des petites bouteilles teintées contenant des huiles essentielles dans les rayons des magasins ne cessent d'augmenter. La réglementation des huiles essentielles dans le domaine cosmétique, pharmaceutique et alimentaire est relativement succincte.

On n'a pas pu relever une réglementation algérienne concernant l'emploi des huiles essentielles dans différents produits commercialisés, en revanche on a pu collecter quelques dispositions qui régissent l'emploi de certaines plantes, de leur extraits ou d'huiles essentielles.

- En Europe, les produits cosmétiques sont réglementés par la directive cosmétique 76/768/CEE dont certaines dispositions concernent spécifiquement l'utilisation des huiles essentielles dans les produits cosmétiques. L'arrête du 06 février 2001 du journal officiel français cite la liste des substances interdites dans les produits cosmétiques. A titre d'exemple, le méthyleugénol est interdit dans les produits cosmétiques sauf s'il s'agit de méthyleugénol naturellement présent dans les extraits et les huiles essentielles et sous réserve que sa concentration n'excède pas une teneur de 0,0002 à 0,01%, *Juniperus sabina* L. (feuilles, huile essentielle) et l'huile de graines de *Laurus nobilis* L. [12].
- L'arrêté du 17 novembre 2004 et l'article R.5131-4 du code français de la santé publique cite que le récipient et l'emballage de chaque unité de produits cosmétiques doivent mentionner la liste des ingrédients dans l'ordre décroissant de leur importance pondérale au moment de leur incorporation. Les dispositions de la directive 2003/15/CE, prévoit, qu'à partir du 11 mars 2005, la présence de certaines substances, dont le nombre est 26, doit être indiquée dans la liste des ingrédients lorsque leur concentration dépasse un certain seuil. Parmi ces 26 substances, deux sont des extraits naturels, huit sont d'origine exclusivement synthétique et seize peuvent être d'origine synthétique ou naturelle. Ces substances identifiées comme susceptibles d'entraîner des réactions allergiques de contact chez des personnes sensibilisées. Cette obligation est une mesure de santé publique, qui ne vise pas à interdire ces

substances mais à informer le consommateur de leur présence dans le produit [12, 13].

Tableau 1.4 : Substances susceptibles d'entraîner des réactions allergiques [12].

N°	Substance	N°	Substance
01	Jasminaldehyde	14	Alcool anisique*
02	Alcool benzylique*	15	Cinnamate de benzyle*
03	Alcool cinnamique*	16	Farnésol*
04	Citral*	17	Lilial
05	Eugénol*	18	Linalol*
06	7-hydroxycitronellal	19	Benzoate de benzyle*
07	Isoeugénol*	20	Citronellole*
08	Alcool alpha-amyl cinnamyl	21	alpha-hexylcinnamaldéhyde
09	Salicylate de benzyle*	22	Limonène*
10	Cinnamaldéhyde*	23	Folione
11	Coumarine*	24	Isométhyl-alpha-ionone
12	Géraniole*	25	<i>Evernia prunastri</i> L., extraits
13	Lylal	26	<i>Evernia furfuracea</i> L., extraits

Note. (*): Substances d'origine synthétique ou naturelle.

- Un nombre de plus en plus important de produits cosmétiques à base de préparations de plantes est proposé au consommateur, c'est pourquoi le conseil de l'Europe a publié trois volumes de recommandations relatifs à l'utilisation de plantes et préparations à base de plantes utilisées en tant qu'ingrédients dans les produits cosmétiques [14-16].
- Le code français de la santé publique précise dans l'article L.4211-1 modifié en 2014 que «la vente au détail et toute dispensation au public des huiles essentielles dont la liste est fixée par décret, ainsi que leurs dilutions et préparations ne constituant ni des produits cosmétiques, ni des produits à usage ménager, ni des denrées ou boissons alimentaires» [17].

- Le décret N°2007-1221 du 3 août 2007 relatif à ce monopole (article D.4211-13 du code français de la santé publique) énumère une quinzaine d'huiles essentielles dont il précise les noms vernaculaires et les dénominations botaniques des plantes [18] :
 - Grande absinthe (*Artemisia absinthium* L.)
 - Petite absinthe (*Artemisia pontica* L.)
 - Armoise commune (*Artemisia vulgaris* L.)
 - Armoise blanche (*Artemisia herba alba* Asso)
 - Armoise arborescente (*Artemisia arborescens* L.)
 - Chénopode vermifuge (*Chenopodium ambrosioides* L. et *Chenopodium anthelminticum* L.)
 - Hysopé (*Hyssopus officinalis* L.)
 - Moutarde jonciforme (*Brassica juncea* [L.] Czernj. Et Cosson)
 - Rue (*Ruta graveolens* L.)
 - sabine (*Juniperus sabina* L.)
 - Sassafras (*Sassafras albidum* [Nutt.] Nees)
 - Saugé officinale (*Salvia officinalis* L.)
 - Tanaisie (*Tanacetum vulgare* L.)
 - Thuya (*Thuja plicata* Donn)
 - Thuya du Canada ou cèdre blanc (*Thuja occidentalis* L.)
 - Cèdre de Corée (*Thuja koraenensis naka*), dit « cèdre feuille ».

1.3 Techniques d'extraction des huiles essentielles

1.3.1 Techniques d'extraction conventionnelles

1.3.1.1 Entrainement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur est l'une des anciennes méthodes et officiellement approuvées pour isoler les huiles essentielles à partir de matières végétales. La matière végétale chargée dans l'alambic sur une grille est soumise à la vapeur d'eau sans macération dans l'eau. La vapeur injectée traverse la plante de la base de l'alambic jusqu'au sommet. La vapeur chargée d'huile essentielle circule dans une colonne à « col de cygne » puis est condensée avant décantation dans une fiole florentine (figure1.1). Les huiles essentielles plus légères ou plus

lourdes que l'eau forment deux phases non miscibles et peuvent être facilement séparées. Le principe de cette technique est que la pression de vapeur combinée est égale à la pression ambiante à environ 100°C, de sorte que les composants volatils ayant des points d'ébullition allant de 150 à 300°C puissent être évaporés à une température proche de celle de l'eau. En règle générale, le processus de l'entraînement à la vapeur d'eau est la méthode la plus largement acceptée pour la production d'huiles essentielles à grande échelle [6, 19].

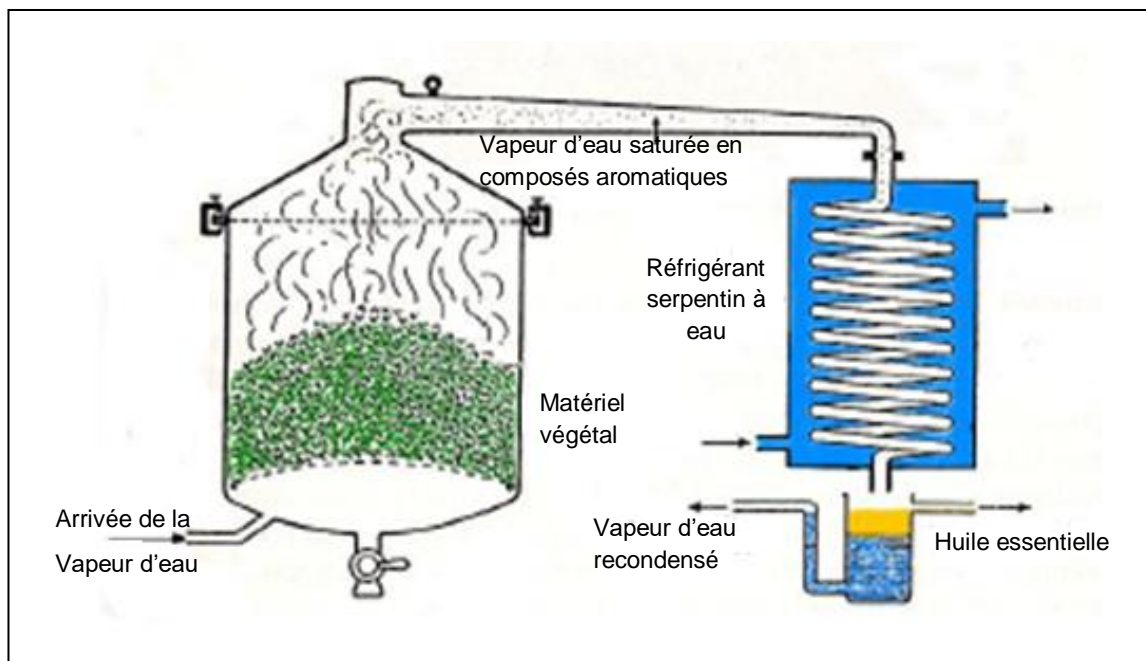


Figure 1.1 : Appareillage utilisé pour entraînement à la vapeur d'eau [20].

1.3.1.2 Hydrodistillation

A la différence de l'entraînement à la vapeur d'eau, la méthode est recommandée par la pharmacopée française pour l'extraction des huiles essentielles des épices séchées et le contrôle de qualité des huiles essentielles au niveau des laboratoires. La matière végétale est directement immergée dans de l'eau. Ce mélange solide-liquide est ensuite chauffé jusqu'à ébullition à la pression atmosphérique dans un alambic, où la chaleur permet la libération de molécules odorantes dans les cellules végétales (figure 1.2). Ces composés aromatiques volatils et l'eau forment un mélange azéotropique qui peut être évaporé ensemble à la même pression, puis condensé et séparé dans une fiole florentine en raison de leur différence d'immiscibilité et de densité. De plus, un système de cohobation

peut recycler l'eau distillée par siphon afin d'améliorer le rendement et la qualité des huiles essentielles [6].

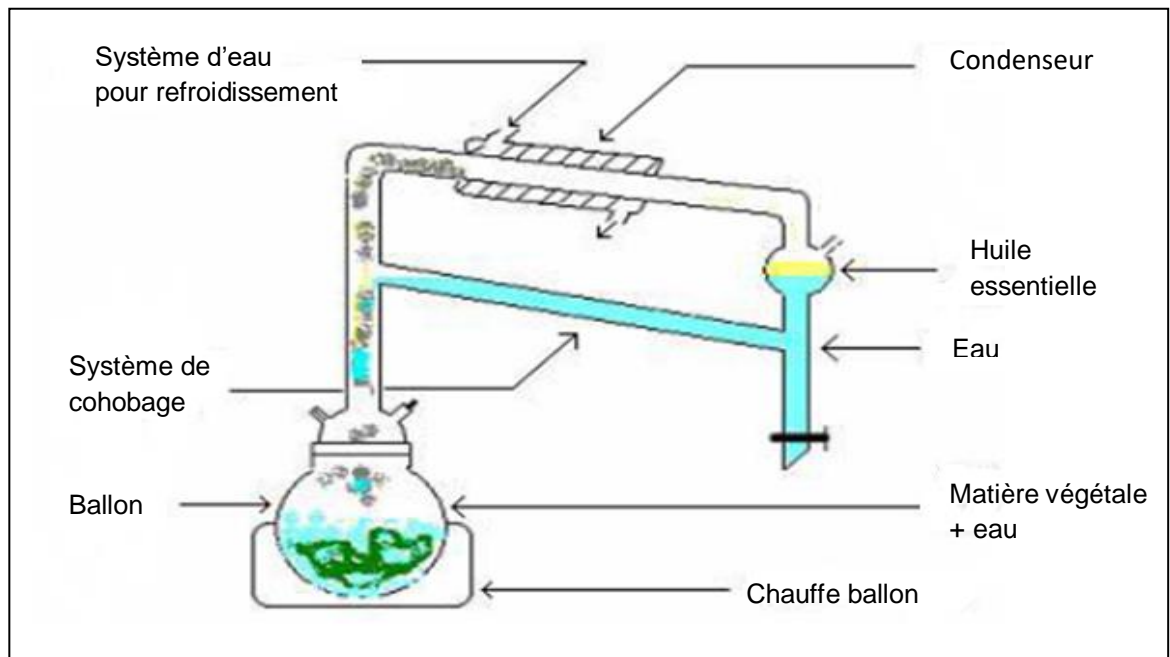


Figure1.2 : Montage pour hydrodistillation des huiles essentielles [20].

1.3.1.3 Hydrodiffusion

Contrairement à l'entraînement à la vapeur d'eau, la vapeur injectée dans ce système va du haut de l'alambic au bas. Le mélange de vapeur avec les huiles essentielles est directement condensé sous le support de la plante à travers un bac perforé (figure 1.3). La méthode de séparer les huiles essentielles est la même que celle utilisée dans les autres méthodes de distillation. Cette méthode permet de réduire la consommation de vapeur et le temps de distillation, tandis qu'un meilleur rendement peut être obtenu en comparaison avec la distillation à la vapeur [6].

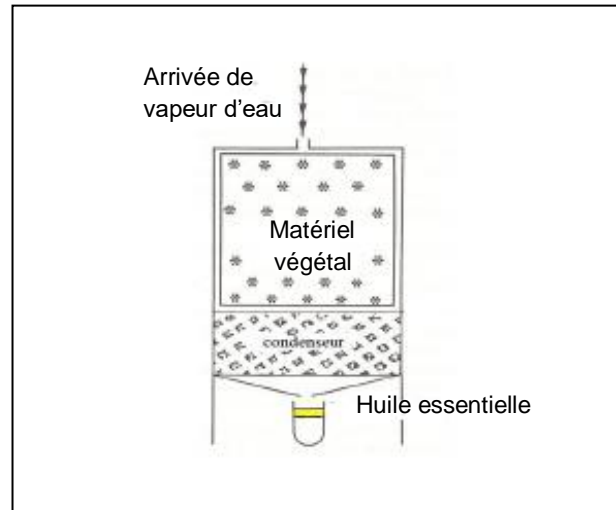


Figure1.3 : Appareillage utilisé pour l'hydrodiffusion [20].

1.3.1.4 Distillation destructive

La distillation destructive, aussi appelée distillation sèche. Cette technique s'applique uniquement sur les matériaux solides, sur les parties les plus difficiles des bois comme les écorces, les branches. La matière est soumise à une distillation sèche à travers un goudron après avoir subi un processus destructif sous une chaleur intense. Une huile typique, coriace et empyreumatique est ensuite obtenue après condensation, décantation et séparation. Rares sont les documents se rapportant à la distillation sèche en tant que méthode d'extraction de composés aromatiques volatils [6, 20].

1.3.1.5 Expression à froid

Cette technique est une extraction sans chauffage pour les huiles essentielles de la famille des agrumes (figure 1.4). Le principe de ce procédé mécanique est basé sur le pressage à la machine des péricarpes d'agrumes à température ambiante pour la libération des huiles essentielles qui sont lavés à l'eau courante froide. L'essence est ensuite isolée par décantation ou centrifugation. Bien que cette méthode conserve une valeur élevée d'odeur d'agrumes, la consommation élevée d'eau peut affecter la qualité des huiles essentielles par suite de l'hydrolyse, de la dissolution de composés oxygénés et du transport de microorganismes [6].

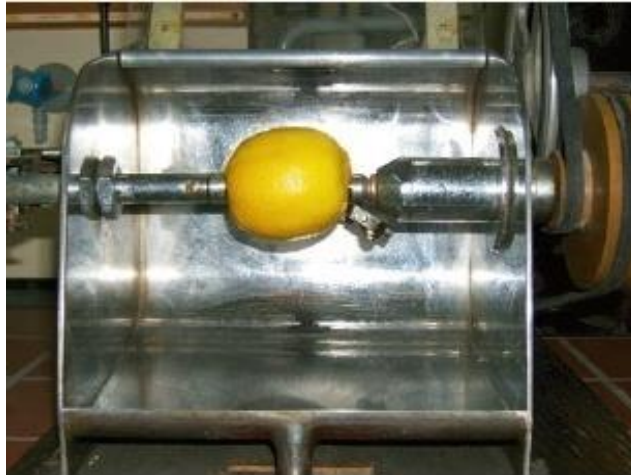


Figure1.4 : Appareillage utilisé pour l'expression à froid [6].

1.3.2 Techniques d'extraction innovantes

Les techniques conventionnelles ne sont pas le seul moyen d'extraction des huiles essentielles depuis que l'économie, la compétitivité, le respect de l'environnement, la durabilité, le rendement élevé et la bonne qualité sont devenus les mots clé de la production industrielle moderne. Les techniques novatrices et les principes d'extraction verte ont constamment émergé pour obtenir des extraits naturels d'une qualité équivalente ou supérieure à celle des méthodes officielle tout en réduisant les unités d'opération, la consommation d'énergie, les émissions de CO₂ et des co-extraits nocifs dans des cas spécifiques. Les principes de l'extraction verte peuvent être généralisés comme la découverte et la conception de procédés d'extraction qui pourraient réduire la consommation d'énergie, permettre l'utilisation de solvants alternatifs et renouvelables, des ressources végétales innovantes pour éliminer les solvants à base de pétrole et assurer des extraits ou des produits surs et de haute qualité [21].

1.3.2.1 Extraction assistée par ultra-sons (EAU)

Les ultrasons ont été utilisés dans la préparation des échantillons pour différents processus tels que l'extraction, la dissolution et la digestion. L'utilisation de cette énergie permet de concevoir des méthodologies analytiques plus écologiques. Lorsqu'une solution est exposée à des ultrasons, une cavitation acoustique se produit. Des bulles de gaz sont formées où chaque bulle de

cavitation se comporte comme un microréacteur et qui ensuite implosent, entraînant des augmentations locales de la température et de la pression. L'énergie ultrasonique agit de plusieurs manières pour améliorer l'extraction. Les températures élevées augmentent la solubilité et la diffusivité des composés et les pressions élevées augmentent le pouvoir de pénétration du solvant dans la phase solide ou la seconde phase liquide. Les deux effets entraînent une meilleure récupération des analytes et de temps d'extraction raccourcis. Les ondes sonores d'une fréquence supérieure à 20 KHz de fréquence constituent la région des ultrasons [22, 23].

Une variété de processus à ultrasons peut être utilisée pour mettre en œuvre des ultrasons dans des applications de laboratoire, par exemple, bain à ultrasons et sonde à ultrasons, chacun ayant des performances différentes (figure 1.5). L'application la plus courante des ultrasons dans les laboratoires d'analyse est l'extraction par ultrasons. Ceci est utilisé principalement pour l'extraction d'analytes à partir des échantillons solides (par exemple, du matériel végétal) [22, 23].

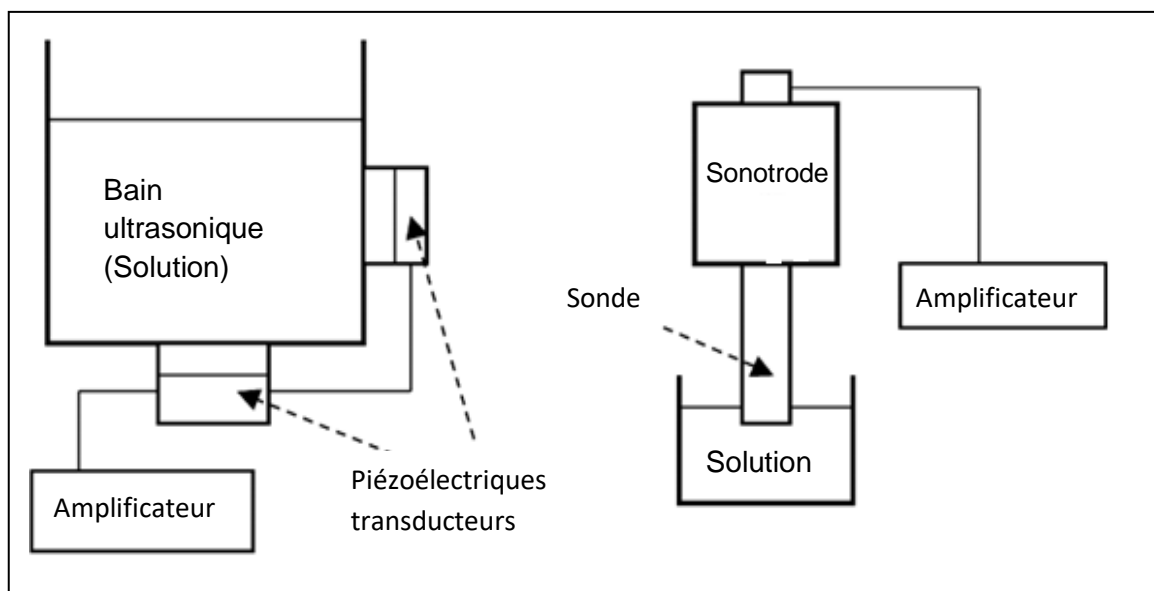


Figure 1.5 : Deux systèmes basiques à ultrasons de 20 à 80 KHz. À gauche: Système de bain à faible intensité; à droite: Système de sonde à ultrasons à haute intensité [24].

Le prétraitement d'échantillons assisté par ultrasons pour l'analyse des traces organiques et inorganiques constitue une approche plus écologique que les prétraitements plus classiques qui utilisent de grandes quantités de solvants et des temps de fonctionnement longs. La préparation des échantillons assistée par ultrasons offre les avantages suivants [6] :

- Une accélération spectaculaire des processus d'extraction, avec pour conséquence une économie d'énergie.
- Utilisation de plus petites quantités de solvants et/ou à une concentration inférieure.
- Procédures plus sûres, puisque les opérations sont effectuées presque à la température ambiante et la pression atmosphérique.
- Moins de possibilité de contamination et/ou de pertes d'analytes pendant le traitement.
- Mise en place de méthodes respectueuses de l'environnement et peu coûteuses avec une augmentation de productivité.

Dans le but d'accroître les rendements d'extraction des huiles essentielles et de réduire la consommation d'énergie, l'extraction assistée par ultrasons a été développée dans ce domaine pour améliorer l'efficacité et réduire le temps d'extraction. Les huiles essentielles obtenues par extraction par ultrasons ont montré moins de dégradation thermique avec une qualité élevée. Cependant le choix de sonotrode devrait être en raison de la contamination métallique qui pourrait accélérer l'oxydation et, par la suite réduire la stabilité des huiles essentielles. Cette technique a déjà prouvé son potentiel de développement, ce qui montre une augmentation de 4% du rendement d'extraction des huiles essentielles de l'agrumes japonais par rapport aux méthodes traditionnelles [6].



Figure 1.6 : Extracteur à ultrasons utilisé pour l'extraction d'une huile essentielle [25].

1.3.2.2 Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'extraction assistée par micro-ondes est considérée comme l'un des jalons dans l'élaboration de stratégies de préparation d'échantillons dans une perspective plus écologique. Le chauffage par micro-ondes est une méthode plus efficace et rapide, sans gradients de température, que les systèmes conventionnels, ce qui permet de réduire la consommation d'énergie et donc le cout (figure1.7).

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 300 et 300000 MHz. L'énergie des micro-ondes est un rayonnement non ionisant constitué d'un champ électrique et d'un champ magnétique. La théorie de l'irradiation par micro-ondes a été prédite en 1864 et démontrée physiquement en 1888. La préparation d'échantillons assistée par micro-ondes a connu une croissance impressionnante du nombre de procédures de chimie analytique depuis Abu-Samra et al. a publié la première application de la technologie à micro-ondes pour la minéralisation d'échantillons biologiques en 1975. Depuis, l'énergie par micro-ondes a montré un potentiel en tant qu'outil efficace pour la préparation des échantillons [6, 10, 23].

L'énergie des micro-ondes interagit avec la matière, provoquant une migration des ions et une rotation des dipôles, mais ne provoque pas de changements dans la structure moléculaire. Dans l'extraction assistée par micro-ondes, un extractant (un solvant) en contact avec des échantillons solides ou liquides est chauffé par micro-ondes. Le chauffage est localisé et par conséquent la température augmente rapidement près ou au-dessus du point d'ébullition de la solution, ce qui conduit à des temps d'extraction très courts. Les principaux paramètres qui influencent l'extraction assistée par micro-ondes sont la nature des solutés (polaire ou apolaire), les paramètres d'extraction (la température et la durée) et la nature de la matrice (taille des particules et teneur en eau) [6, 10, 23].

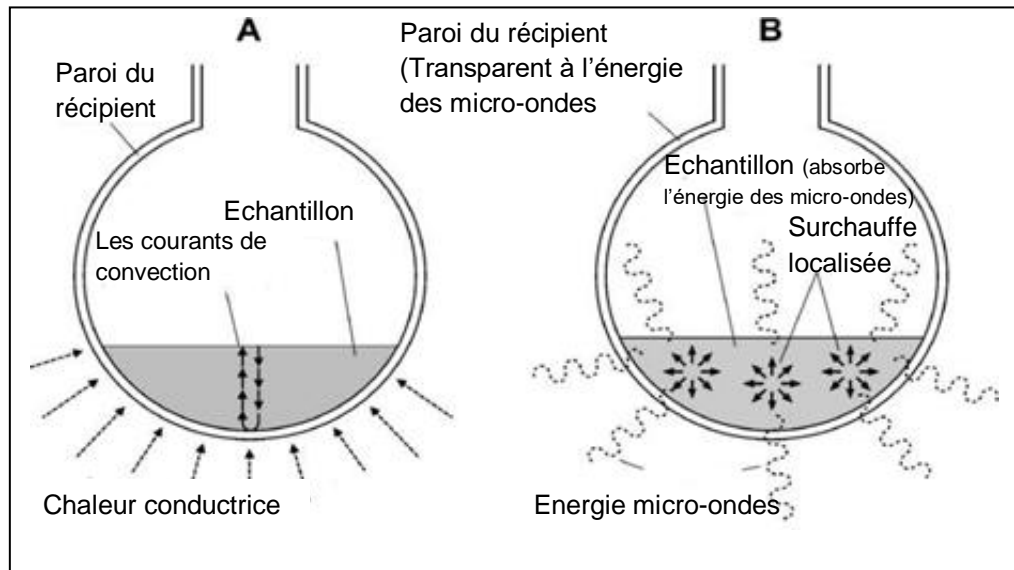


Figure 1.7 : Schéma du chauffage de l'échantillon par (A) chauffage conventionnel et (B) chauffage par micro-ondes [26].

A l'aide de micro-ondes, la distillation peut maintenant être réalisée en quelques minutes au lieu de plusieurs heures avec divers avantages correspondants aux principes d'extraction et de la chimie verte. Dans cette méthode, les matières végétales sont extraites dans un réacteur micro-ondes avec ou sans solvants organiques ou dans de l'eau dans différentes conditions en fonction du protocole expérimental.

La première extraction assistée par micro-ondes des huiles essentielles de plantes aromatiques et d'épices, a été proposée comme distillation à micro-ondes à air comprimé (DMAC) en 1989 par Craveiro et al. (figure 1.8). Le principe est basé sur l'entraînement à la vapeur et utilise l'air comprimé à la place de la vapeur pour extraire l'huile essentielle. De l'air comprimé est injecté en continu dans l'extracteur où les matrices végétales sont immergées dans de l'eau et chauffées par micro-ondes. Après seulement quelques minutes, l'eau et l'huile essentielle sont condensées et séparés à l'extérieur du réacteur à micro-ondes dans des proportions similaires à celle d'un processus conventionnel. L'extraction peut être réalisée en seulement 5 min et il n'y a pas de différence dans les résultats

quantitatifs et qualitatifs entre DMAC et l'extraction conventionnelle de 90 minutes en utilisant l'entraînement à la vapeur d'eau [10].

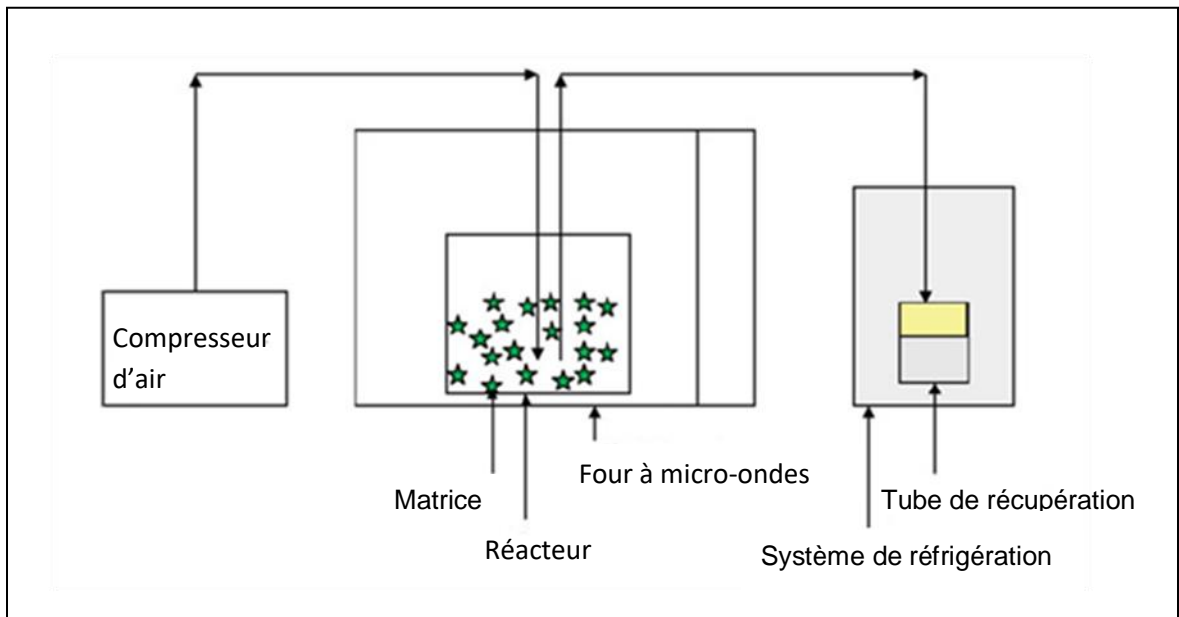


Figure 1.8 : Distillation assistée par micro-ondes à air comprimé (DMAC) [10].

Afin d'obtenir des huiles essentielles de haute qualité, une hydrodistillation sous vide à micro-ondes (HDVM) a été proposée par Mengal et al. en 1993 pour éviter l'hydrolyse. Les matières végétales fraîches ont été exposées à une irradiation par micro-ondes afin de libérer les extraits, réduire la pression permet l'évaporation du mélange azéotrope eau-huile à une température inférieure à 100 °C. Cette opération peut être répétée par étapes avec une puissance micro-ondes constante, qui dépend du rendement souhaité (figure 1.9) [6].

L'HDVM, qui est 5 à 10 fois plus rapide que l'hydrodistillation classique, a présenté un rendement et une composition comparables à ceux des extraits d'hydrodistillation. Les huiles essentielles ont des propriétés organoleptiques très proches aux matériaux d'origine naturels. De plus, l'occurrence de dégradation thermique diminue en raison de la faible température d'extraction [6].

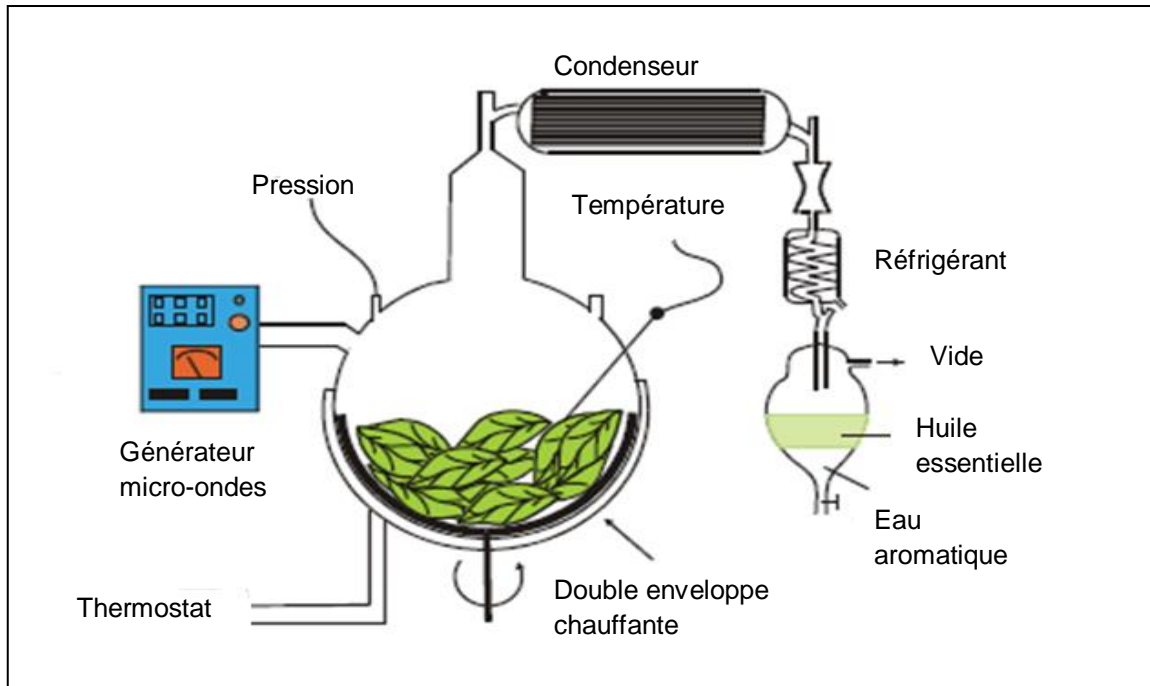


Figure 1.9 : Schéma d'une installation d'hydrodistillation sous vide à micro-ondes (HDVM) [20].

L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDM) qui a été développée par Stashenko et al. en 2004, repose complètement sur le principe classique de l'hydrodistillation, une partie de la chaîne de montage d'hydrodistillation est placée dans le four à micro-ondes (figure 1.10). La matrice est installée avec de l'eau dans un réacteur qui a déjà été placé à l'intérieur du four à micro-ondes. Le système de réfrigération et la partie estimée pour récupérer les essences sont situées à l'extérieur du four. L'huile essentielle est décantée du condensat et séchée. Cette technique a été appliquée pour l'extraction des huiles essentielles de nombreuses plantes aromatiques et épices [10]. A titre d'exemple, les conditions opératoires pour l'extraction *Thymus vulgaris* L. étaient la mise de 60 g de matrice avec 2000 mL d'eau, la puissance des micro-ondes était de 990 W pendant 120 min à la pression atmosphérique. Un rendement de 2.52% d'huile essentielle a été obtenu [27].

En outre, il existe plusieurs techniques modernes assistées par micro-ondes, telles que la turbo-hydrodistillation à micro-ondes et la distillation simultanée à micro-ondes qui ont été développées par Ferhat et al. en 2007 et

Périno-Issartier et al. en 2010, respectivement. Elles sont impressionnantes pour un temps de traitement court et qui utilisent moins de solvant [10].

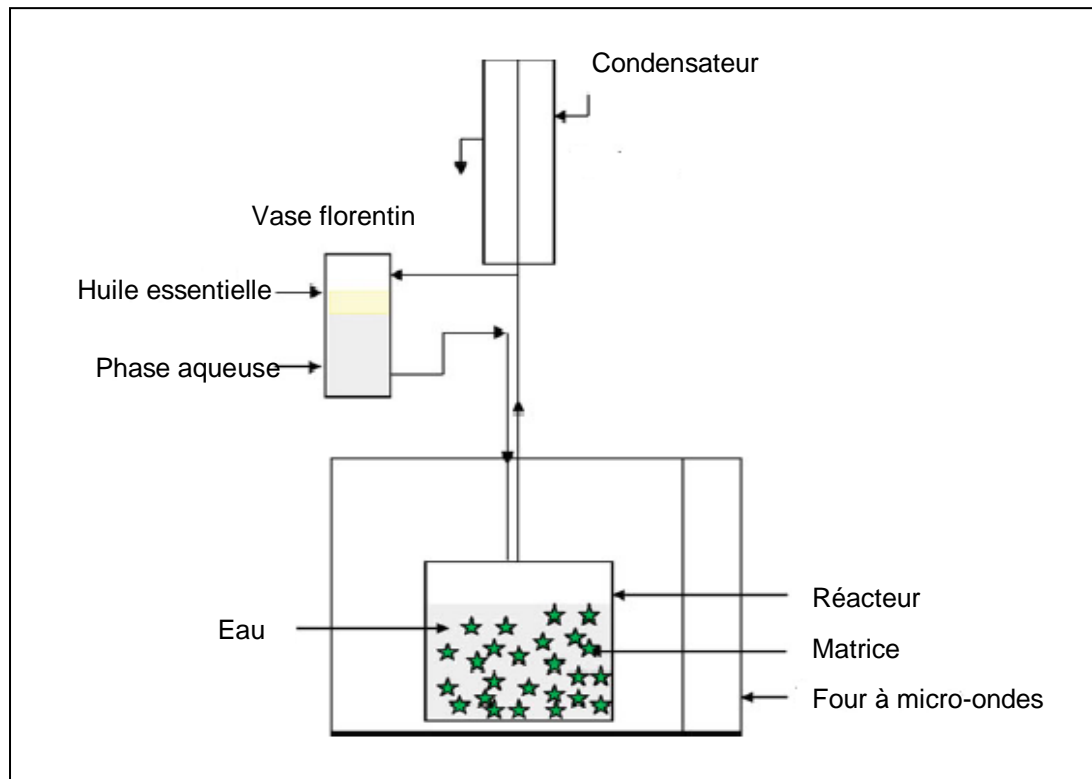


Figure 1.10 : Schéma de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDM) [10].

Une autre innovation, entrainement à la vapeur sous micro-ondes (EVM), a été développée en 2008 par Chemat et al. Le procédé est basé sur le principe classique de l'entrainement à la vapeur d'eau dont lequel le rayonnement micro-ondes n'est appliqué que sur le réacteur d'extraction. Le système de réfrigération et la partie responsable de la récupération des huiles essentielles sont situés à l'extérieur du four (figure 1.11). Cette méthode a été appliquée pour l'extraction d'huile essentielle des fleurs de la lavande (*L. angustifolia* Mill.) [10].

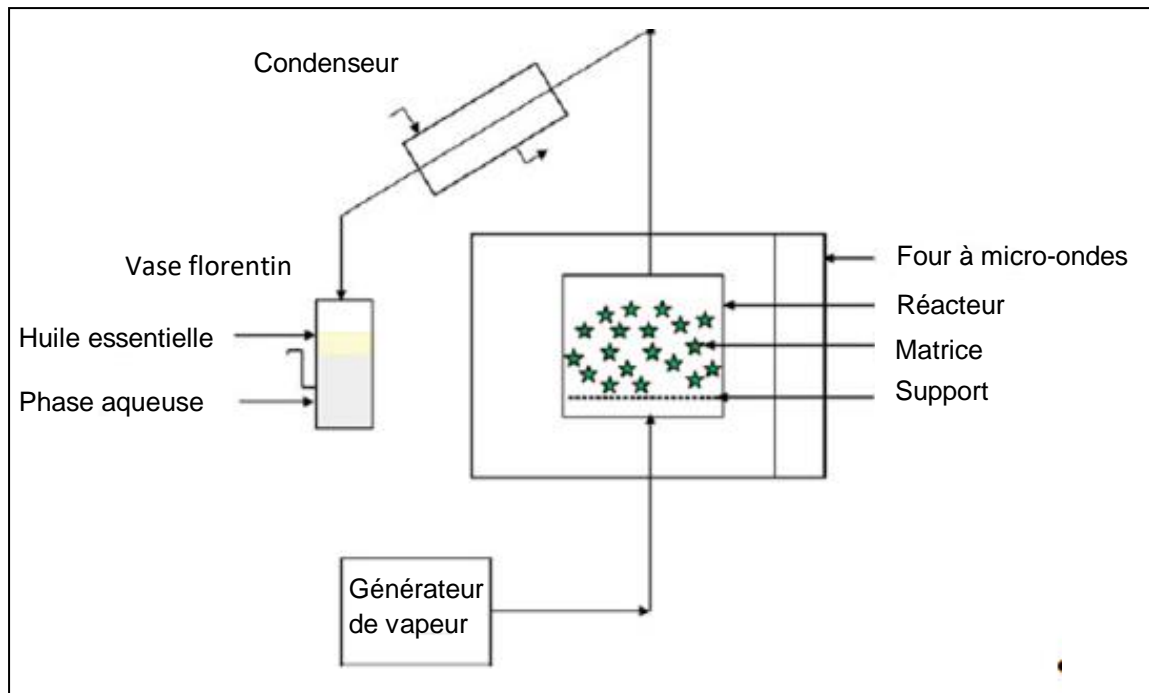


Figure 1.11 : Schéma de l'entraînement à la vapeur sous micro-ondes (EVM) [10].

En raison de la préoccupation croissante pour l'impact des solvants à base des produits pétroliers sur l'environnement et le corps humain, plusieurs processus plus écologiques sans solvant se sont développés au cours de la dernière décennie. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes a été développée et brevetée en 2004 par Chemat et al, avec un succès considérable conformément aux mêmes principes que l'extraction assistée par micro-ondes. Outre les avantages mentionnés précédemment, l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes simplifie les procédures de manipulation et de nettoyage afin de réduire les couts de main d'œuvre, de pollution et de manutention [10].

Le système (figure1.12) permet le chauffage interne de l'eau de la matière végétale (matrice fraîche), ce qui distend les cellules végétales et conduit ainsi à la rupture des glandes oléifères. Le principe décrit une distillation sèche assistée par micro-ondes sans ajouter d'eau ni de solvant organique. Un système de refroidissement situé à l'extérieur du four à micro-ondes permet la condensation continue du mélange eau-huile évaporé à la pression atmosphérique. L'excès d'eau est reflué dans le réacteur afin de maintenir l'humidité appropriée des matières végétales. Il est intéressant de noter que les paramètres opératoires

faciles à contrôler doivent être optimisés pour optimiser le rendement et la qualité d'huile obtenue [10].

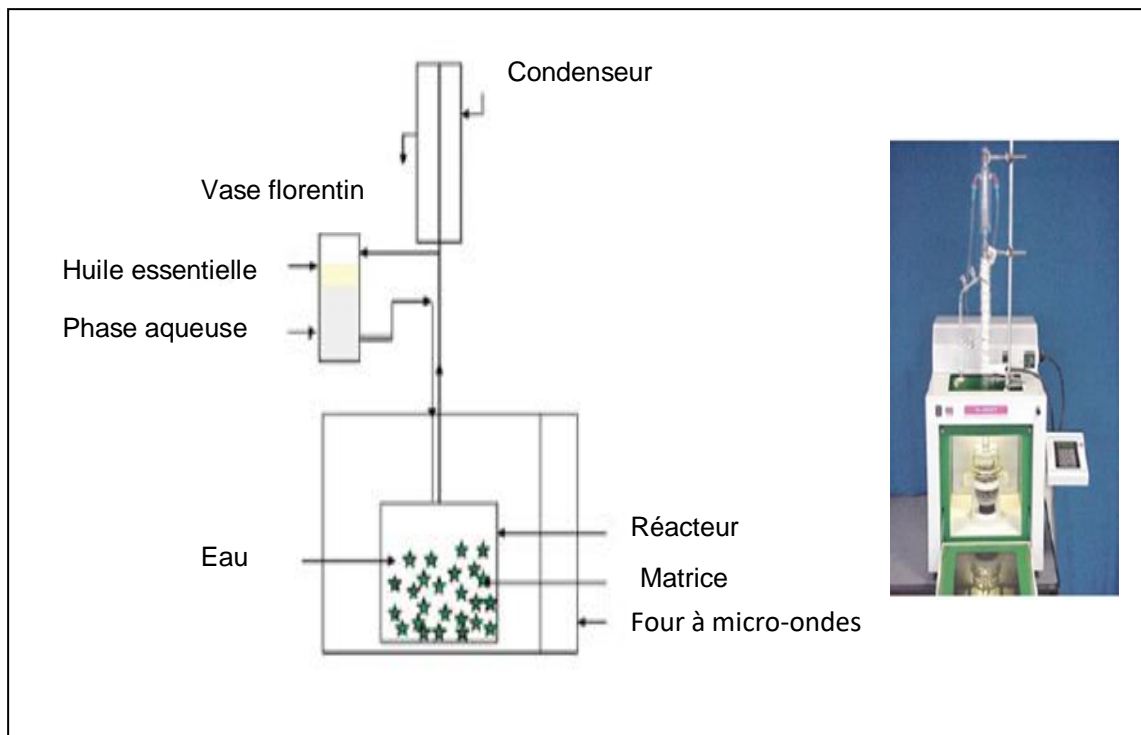


Figure 1.12 : Schéma de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes [10].

Le potentiel d'utilisation de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes à l'échelle de laboratoire et à l'échelle industrielle a été prouvé sur des matériaux végétaux familiers, frais et secs, tels que les épices, les herbes aromatiques et les agrumes [28-30] avec une efficacité considérable par rapport aux techniques conventionnelles. Inspirés de cette méthode, plusieurs de ses dérivés ont vu le jour et offrent des avantages importants, tels qu'une durée d'extraction plus courte, une efficacité supérieure, une fonctionnalité plus propre, des propriétés sensorielles similaires ou supérieures dans des conditions optimales [10].

Une nouvelle technique écologique, à savoir l'hydrodiffusion et gravité par micro-ondes (HGM) a été conçue en 2008 par Chemat et al. (figure 1.13). Cette technique consiste en une hydrodiffusion induite par micro-ondes de matériaux végétaux à la pression atmosphérique, tous les extraits, y compris les huiles

essentielles et l'eau tombent du réacteur des micro-ondes par gravité dans un système de condensation en continu à travers un support perforé en pyrex [10].

Cette procédure a été appliquée à de nombreux types de plantes telles que les plantes aromatiques telle que *Menthe pulegium* L. [31] et les citrus telle que *Citrus limon* L. [32]. De plus, des dérivés de HGM tels que le HGM sous vide et la diffusion sèche et gravité par micro-ondes (DGM) se sont développés plus tard en tenant compte des économies d'énergie, de la pureté des produits finis et du post traitement des eaux usées [10].

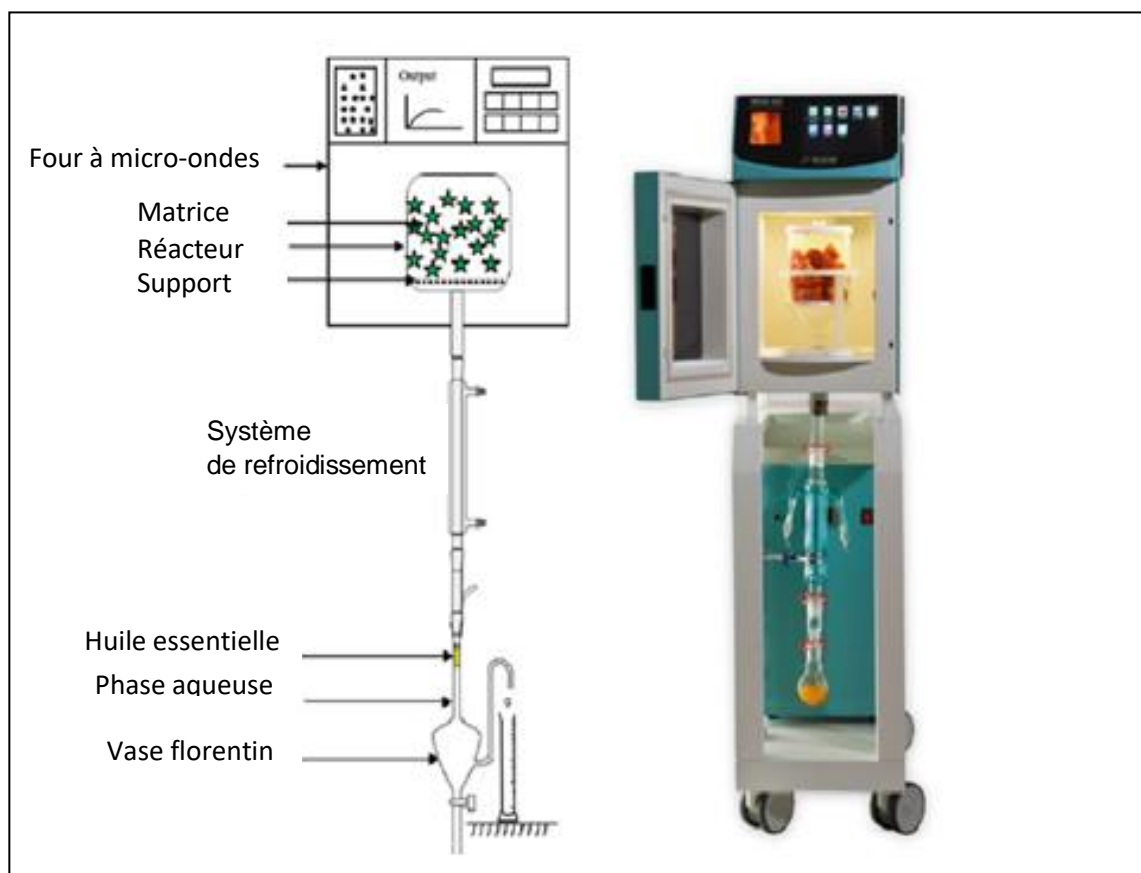


Figure 1.13 : Schéma de l'hydrodiffusion et la gravité par micro-ondes (HGM) [10].

1.3.2.3 Extraction par fluide supercritique (EFS)

L'extraction par fluide supercritique a ouvert une nouvelle porte à l'automatisation de certaines étapes du processus analytiques, ce qui influence grandement la qualité des résultats analytiques. La méthode a été introduite dans

les pratiques de laboratoire par K. Zosel en 1978, une date à laquelle l'intérêt pour cette technique analytique n'a cessé de croître [23, 33].

Pour les fluides, l'état supercritique est atteint dans des conditions bien définies : pression critique (P_c) et température (T_c) et pourraient présenter des propriétés très intéressantes: (i) faible viscosité; (ii) haute diffusivité; (iii) densité proche de celle des liquides. Le dioxyde de carbone est généralement le solvant le plus largement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles, en raison de ses nombreux avantages: (i) le point critique est facilement atteint; (ii) non agressif pour les molécules thermolabiles d'essence de plantes; (iii) il est chimiquement inerte et non toxique; (iv) ininflammable; (v) disponible avec une grande pureté à un coût relativement bas; (vi) élimination facile de ses traces de l'extrait obtenu par simple dépression et (vii) sa polarité similaire à celle du pentane et qui convient à l'extraction de composés lipophiles [9].

Le principe est basé sur l'utilisation et le recyclage de fluide dans des étapes répétées de compression/dépression. En comprimant et en chauffant fortement, le CO_2 atteint l'état supercritique. Il traverse la matière végétale brute en se chargeant des composés volatils et les extraits de plante. Ceci est suivi d'une étape de dépression : l'extrait est acheminé vers un ou plusieurs séparateurs, où le CO_2 est progressivement décomprimé (perdant ainsi son pouvoir solvant) pour séparer l'extrait obtenu du fluide. Ce dernier pourrait être transformé en un gaz libéré puis recyclé. L'utilisation de cette technique pour l'extraction des huiles essentielles a augmenté au cours des deux dernières décennies [9].

Le seul inconvénient de la méthode est que les coûts des équipements, de leurs installations et de leurs opérations de maintenance sont plus élevés que ceux du procédé traditionnel (extraction et séparation), qui est relativement peu-couteux et très facilement évolutif à des fins industrielles [9, 33].

Depuis les composés pharmacologiquement actifs dans les plantes sont généralement en faibles concentrations, le développement de techniques

d'extraction alternatives avec une meilleure sélectivité et une meilleure efficacité est hautement souhaitable. Par conséquent, l'extraction par fluide supercritique en tant qu'une technique d'extraction efficace et respectueuse de l'environnement pour les matériaux solides, a été introduite et étudiée d'une manière approfondie pour la séparation des composés actifs des herbes et des autres plantes. Modey et al ont résumé l'application de la technique dans différentes classes des produits naturels tels que les caroténoïdes, les composés aromatiques, les terpènes, les alcaloïdes et autres. Dans un autre article de synthèse, Revechon a principalement axé sur l'extraction par fluide supercritique des huiles essentielles [34].

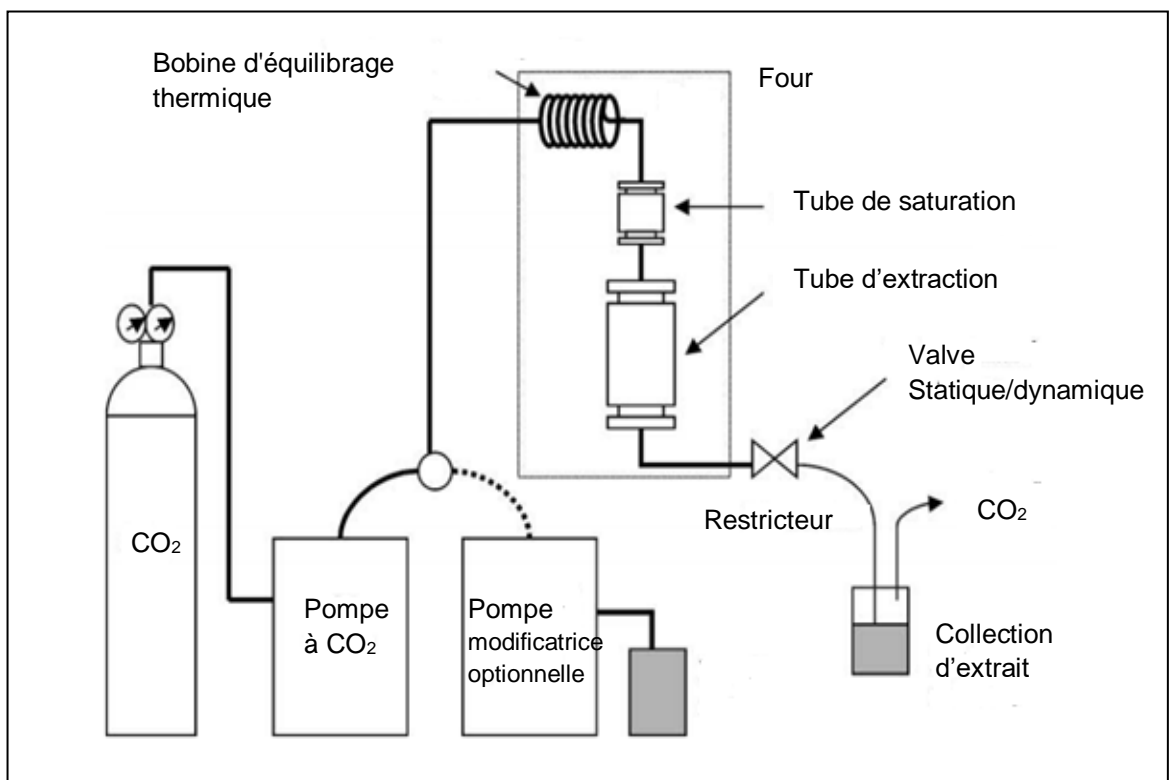


Figure 1.14 : Schéma représentant l'instrumentation de l'extraction supercritique [35].

1.4 Techniques d'analyses

La production d'huiles essentielles s'est industrialisée dans la première moitié du 19^{ème} siècle, en raison d'une demande accrue de ces matrices en tant qu'ingrédients de parfum et d'arôme. En conséquence, la nécessité de mener des études et des recherches systématiques est devenue sans précédent. Outre le grand intérêt à effectuer ces études, il existe également la nécessité de détecter

les adultérations, principalement dans les huiles essentielles économiquement importantes.

1.4.1 Techniques analytiques classiques

L'étude approfondie des huiles essentielles repose sur la relation entre leurs propriétés physiques, chimiques et l'évaluation des qualités organoleptiques. Les premières méthodes analytiques appliquées à l'étude d'une huile essentielle étaient généralement axées sur les aspects qualitatifs, concernant deux propriétés à savoir l'identité et la pureté. D'autres techniques sont couramment appliquées pour évaluer les propriétés physiques d'huile essentielle à savoir:

- la densité spécifique, propriété physicochimique la plus fréquemment citée. Définie comme le rapport des densités d'une huile et de l'eau lorsque les deux sont à des températures identiques. La valeur atteinte est caractéristique de chaque huile essentielle et se situe généralement entre 0,696 et 1,118 à 15 °C.
- La mesure de l'activité optique est également largement reconnue. Elle est déterminée à l'aide d'un polarimètre, avec un angle de rotation dépendant d'une série de paramètres, tels que la nature de l'huile, la longueur de la colonne traversée par la lumière, la longueur d'onde appliquée et la température. Le degré et le sens de rotation ont une grande importance pour l'évaluation de la pureté, car ils sont liés aux structures et à la concentration de molécules chirales dans l'échantillon.
- La détermination de l'indice de réfraction, représente également une constante physique caractéristique d'une huile, généralement comprise entre 1,450 et 1,590. Cet indice est représenté par le rapport du sinus de l'angle d'incidence sur le sinus de l'angle de réfraction d'un faisceau de lumière passant d'un milieu moins dense à un milieu plus dense, tel que de l'air à l'huile essentielle.
- L'évaluation de la pureté des huiles essentielles est basée aussi sur la solubilité dans l'eau. Le test, qui révèle la présence de substances polaires, telles que les alcools, les glycols et leurs esters, et les acétates de glycérine, la procédure est

réalisée comme suit : l'huile est ajoutée à une solution saturée de chlorure de sodium, qui après l'homogénéisation est divisée en deux phases, le volume d'huile (phase organique) doit rester stable, la réduction de volume indique la présence de substances solubles dans l'eau. Par ailleurs, la solubilité, ou l'immiscibilité d'une huile essentielle dans l'éthanol révèle beaucoup sur sa qualité. De plus, les huiles d'une certaine ancienneté et mal conservées présentent souvent une faible solubilité.

- L'estimation des points de fusion et de congélation, ainsi que la région d'ébullition des huiles essentielles, possède aussi une grande importance pour les évaluations d'identité et de pureté. L'évaluation du point de fusion est une modalité précieuse pour contrôler la pureté de l'huile essentielle, puisqu'un grand nombre de molécules dans les huiles essentielles, fond dans une gamme avec une variation de 0,5 °C. La détermination du point de congélation s'applique généralement dans les cas où l'huile essentielle consiste principalement en une molécule, telle que l'huile essentielle de clous de girofle contenant environ 90% d'eugénol, un tel test permet d'évaluer le pourcentage du composé abondant. La détermination de la gamme d'ébullition est considérée comme une autre méthode d'évaluation de la pureté [36].

1.4.2 Chromatographie en phase gazeuse (CG)

La plus part des méthodes appliquées à l'analyse des huiles essentielles reposent sur des procédures chromatographiques qui permettent la séparation et l'identification des composants. Dans le début des recherches dans le domaine des huiles essentielles, l'attention a été consacrée au développement des méthodes permettant d'approfondir les connaissances sur les profils de substances volatiles, cependant, cette méthode a montré des problèmes due à la complexité des échantillons. Au cours des dernières décennies, le domaine de recherche susmentionné a bénéficié des améliorations de la chimie analytique instrumentale, et le nombre de constituants connus a considérablement augmenté [6, 25].

En analyse chromatographique en phase gazeuse, les composés à analyser sont vaporisés et élués par la phase gazeuse mobile, le gaz vecteur, à travers la colonne. Les analytes sont séparés en fonction de leurs pressions de vapeur relatives et de leurs affinités à la phase stationnaire. En général les huiles essentielles sont analysées par la chromatographie en phase gazeuse [6, 25].

L'analyse des huiles essentielles par CG a commencé dans les années 1950, lorsque le professeur Liberti a commencé l'analyse des huiles essentielles d'agrumes quelques années seulement après que James et Martin ont décrit pour la première fois la chromatographie gaz-liquide (CGL), communément appelée CG, une étape importante dans l'évolution des méthodes chromatographiques instrumentales.

Actuellement, les analyses par CG d'huiles essentielles sont plus fréquemment effectuées sur des colonnes capillaires, qui, après leur introduction, ont rapidement remplacé les colonnes remplies garnies. Les composants à l'état de traces peuvent être facilement séparés et quantifiés sans fractionnement préalable ni préconcentration. Il est intéressant de noter que depuis l'introduction des colonnes capillaires en silice fondue, des progrès considérables ont été accomplis dans la technologie des colonnes, et un grand nombre de travaux sur les applications de CG aux huiles essentielles ont été publiés [6, 25].

La spectrométrie de masse (SM) peut être définie comme étant l'étude de systèmes par la formation d'ions, qui sont ensuite caractérisés par leurs rapports masse/charge (m/z) et les abondances relatives. L'analyte peut être ionisé thermiquement, par un champ électrique ou par impact d'électrons, d'ions ou de photons énergétiques. Au cours de la dernière décennie, l'utilisation des spectromètres de masse en tant qu'outil pour les expériences analytiques de routine et la recherche fondamentale a considérablement augmenté. Cela est dû à un certain nombre de fonctionnalités, le plus important et que la technique est très sensible [6, 25].

En outre, le potentiel de la chromatographie en phase gazeuse combinée avec la spectrométrie de masse (CG-SM) pour la détermination des composés volatils, contenu dans des échantillons d'arômes et de parfums très complexes est très connu. L'introduction des puissants systèmes d'acquisition et de traitement de données, notamment les techniques automatisées de recherche en bibliothèque, garantissait que le contenu informationnel des grandes quantités des données générées par les instruments CG-SM ont été pleinement exploitées. La méthode d'identification la plus fréquente et la plus simple en CG-SM consiste à comparer les spectres de masse inconnus acquis avec ceux contenues dans une bibliothèque de référence SM [6, 25].

La chromatographie, en particulier la CG, a évolué pour devenir la méthode dominante d'analyse des huiles essentielles, cela est dû au grand pouvoir de résolution qu'offre cette méthode pour la plupart des mélanges volatils. Un vaste nombre d'études a été mené sur les huiles essentielles, et un grand nombre de ces ingrédients naturels a été étudié à la suite de l'introduction de la CG-SM [6, 25]

1.4.3 Spectroscopie infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge est la méthode spectroscopique la plus couramment utilisée. Plusieurs raisons expliquent son succès et sa diffusion, ces dernières années des développements considérables ont eu lieu dans des techniques spectroscopique, le moyen infrarouge (MIR) et le proche infrarouge (NIR), qui sont considérées comme des outils d'analyse attractifs et prometteurs pour la recherche et les laboratoires de contrôle et industrielles. Les avantages de ces derniers proviennent du large intervalle de nombre d'ondes couvert par le rayonnement infrarouge et des caractéristiques de haute résolution et de balayage rapide de l'instrumentation moderne, qui en font des alternatives utiles et puissantes aux méthodes analytiques traditionnelles. Il est important de noter un aspect, parfois oublié, en les comparants avec les méthodes classiques d'analyse, basées sur la spectroscopie ultraviolette-visible, les techniques de spectroscopie vibrationnelle sont fréquemment non destructives et pourraient fournir une analyse facile, très rapide sans aucun prétraitement préalable de

l'échantillon. Ces techniques peuvent donc être utilisées pour analyser l'état physique (solide, liquide ou gaz) et à n'importe quel niveau (macroscopique ou microscopique). La spectroscopie infrarouge peut également évaluer plusieurs composants d'un échantillon en utilisant une seule mesure instrumentale sans nécessité de séparation physique de ces composants, offrant ainsi des avantages [37, 38].

La région du moyen infrarouge (fondamentale) s'étend de 4000 cm^{-1} ($\lambda=2,5\text{ }\mu\text{m}$) à 400 cm^{-1} ($25\text{ }\mu\text{m}$). Elle est délimitée de la région d'infrarouge lointaine (FIR) de 400 cm^{-1} ($25\text{ }\mu\text{m}$) à 10 cm^{-1} ($1000\text{ }\mu\text{m}$) et par la très importante région du proche infrarouge (NIR) de 12500 cm^{-1} ($0,8\text{ }\mu\text{m}$) à 4000 cm^{-1} ($2,5\text{ }\mu\text{m}$) [38].

Les spectres vibrationnels ont d'abord été étudiés sous la forme de bandes d'absorption dans la région infrarouge, qui a été découverte comme la première région non visible du spectre électromagnétique par l'astronome Sir William Herschel en 1800. Cette hypothèse, liée à la génération non souhaitée de l'association de la chaleur à la lumière au cours de ses observations astronomiques du soleil, a conduit à la célèbre expérience de Herschel qui a découvert ce que nous appelons maintenant la région IR du spectre [39].

Il existe deux types de spectrophotomètres du moyen infrarouge, dispersif et à transformée de Fourier (TF) dont ces derniers sont les plus utilisés. L'avantage des spectrophotomètres TF réside dans le fait que le rayonnement de toutes les longueurs d'ondes est mesuré simultanément et par conséquent, un spectromètre TF est beaucoup plus rapide et plus sensible. Les spectrophotomètres MIR dispersifs ne sont plus disponibles sur le marché, mais ils sont toujours utilisés dans les laboratoires. Le cœur de tout spectrophotomètre IRTF est un interféromètre. L'interféromètre de Michelson consiste essentiellement en un diviseur de faisceau et deux miroirs plats. L'un des miroirs est fixe dans un bras d'interféromètre, l'autre miroir est mobile dans le deuxième bras d'interféromètre. Les séparateurs de faisceau MIR les plus courants sont en KBr (figure 1.15) [40].

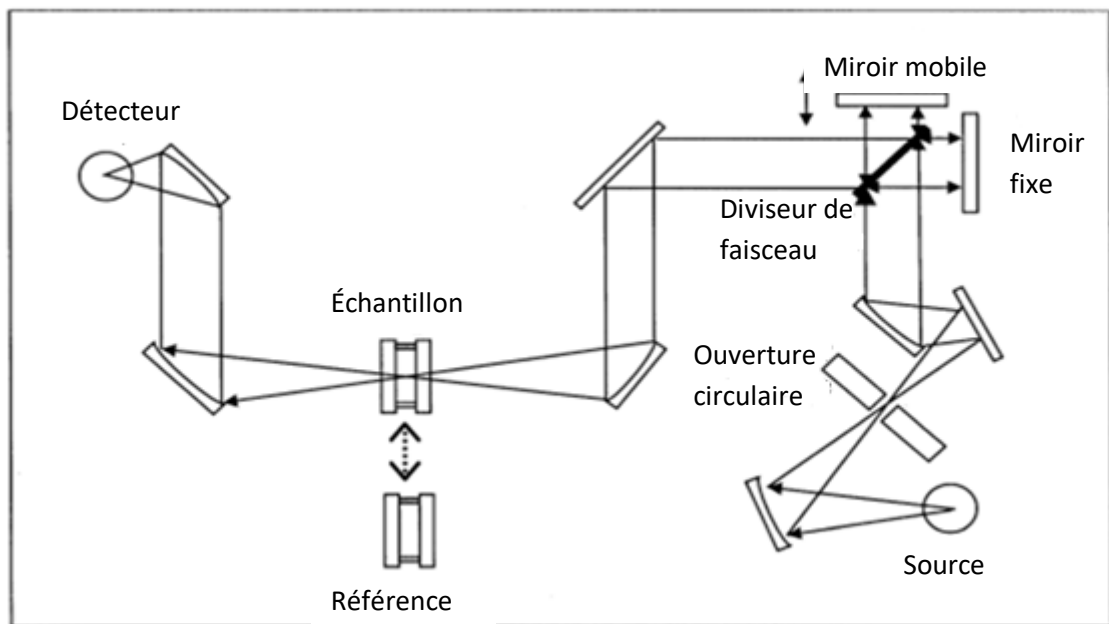


Figure 1.15 : Diagramme d'un spectromètre IRTF avec interféromètre de Michelson [40].

Parmi toutes les méthodes de spectroscopie optique, le NIR offre la plus grande diversité de principes d'instrumentation. Les spectrophotomètres NIR commerciaux varient considérablement en termes de cout, de taille et de portabilité, de temps de mesure et de conditions environnementales pour les applications en ligne dans l'industrie. Les spectrophotomètres NIR appartiennent à l'une des six catégories suivantes :

- 1- Spectrophotomètre à transformée de Fourier;
- 2- Spectrophotomètre à balayage et à réseau;
- 3- Spectrophotomètre à réseaux de diodes (spectrophotomètres à réseau fixe;
- 4- Spectrophotomètre à filtre;
- 5- Spectrophotomètre à diodes électroluminescentes (DEL) ;
- 6- Spectrophotomètre FAAO (filtre accordable acousto-optique).

Les spectrophotomètres NIR-TF sont identiques aux spectrophotomètres TF déjà décrits pour MIR-TF. La source de lumière la plus couramment utilisée est la lampe halogène au tungstène. Les séparateurs de faisceau pour NIR sont généralement fabriqués à partir de CaF_2 [39].

Le détecteur standard dans les instruments IRTF de routine pour le MIR est le détecteur pyroélectrique DTGS (sulfate de triglycine deutéré), dont la réponse dans la région MIR est indépendante de la longueur d'onde. Le détecteur MCT (tellure de mercure-cadmium) est beaucoup plus sensible et plus rapide que le détecteur DTGS. Cependant, il n'y a pas de détecteur disponible pour couvrir toute la gamme NIR ou pour tous les types de spectromètres NIR. Une liste des détecteurs est présentée dans le tableau 1.5.

Tableau 1.5 : Détecteurs NIR et leurs domaines d'application [40].

Détecteurs	Région d'application/nm
Détecteur Ge	600 à 1800
Détecteur Si	400 à 1100
Détecteur InGaAs	900 à 1700
Détecteur PbS	1100 à 3500
Détecteur InAs	1500 à 3500
Détecteur InGaAs étendu	1100 à 2800
Détecteur InSb	2000 à 4000
Détecteur PbS	1000 à 3000
Détecteur PbSe	1100 à 4000

a- Analyse qualitative

Généralement l'analyse qualitative par IRTF est basée sur l'identification des groupements fonctionnels de la substance, comme première étape, plus précisément dans le MIR, il existe des atlas de spectres qui peuvent être consultés à cette fin [41]. Une confirmation de la structure moléculaire par comparaison de la totalité du spectre avec celui d'un composé connu est considérée comme une deuxième étape. La concordance exacte entre le spectre d'un analyte permet d'identifier ce dernier sans aucun doute possible, du fait qu'il n'existe pas deux composés de structure différente qui ont le même spectre IR (Empreinte digitale) [42].

b- Analyse quantitative

Les principes utilisés pour l'analyse quantitative sont fondamentalement les mêmes pour toutes les méthodes de mesure optique et spectrale. Ces méthodes impliquent la mesure de la quantité d'énergie déduite par la méthode de mesure étant corrélée à une forme physique ou chimique, le plus souvent la concentration d'une espèce à analyser.

- **La loi de Bouguer-Beer-Lambert:** (généralement abrégée en loi de Beer) est la loi fondamentale de la spectroscopie d'absorption quantitative et qui établit une relation entre les mesures d'absorbance et l'unité de volume (ou concentration) et la longueur ou de l'épaisseur du trajet optique. La méthode de loi de Beer peut être appliquée et dans laquelle une absorption définie liée à l'analyte peut être définie. Seuls les systèmes simples seront considérés lorsqu'il est nécessaire de mesurer soit un composant, soit quelques composants présentant une interaction minimale et/ ou un chevauchement spectral minimal [43].

A quelques exceptions, les spectres de vibration (MIR, NIR) de la plupart des composés sont de nature relativement complexe. La situation idéale dans toute mesure quantitative consiste à localiser une bande d'absorption isolée de l'analyte en question et à extraire les informations pertinentes d'intensité par hauteur de pic ou par surface de pic. Pour beaucoup de spectres, cette situation idéale n'existe pas et c'est particulièrement le cas pour les spectres NIR, où les bandes d'absorption sont souvent larges, diffuses et présentent des chevauchements. Néanmoins, les spectres NIR contiennent des informations moléculaires sur l'échantillon, et ces informations et d'autres impliquant l'analyse de mélanges complexes, peuvent être extraites au moyen de méthode chimiométrique [40, 43].

- **La chimiométrie:** Plus de 30 ans se sont écoulés depuis que Svante Wold a inventé le terme «Chimiométrie». La chimiométrie concerne les procédures optimales d'extraction d'informations à partir de systèmes multivariés complexes. Ceci est généralement réalisé par une caractérisation multivariée utilisant une instrumentation chimique suivie d'une analyse multivariée des

données. La chimiométrie utilise des éléments de mathématiques, de statistiques et de sciences de l'information pour générer des données chimiques riches en informations et en extraire des informations [44].

La relation entre la chimiométrie et les différentes disciplines est indiquée dans la figure 1.16, cette dernière montre les sciences habilitantes, principalement mathématiques, statistiques, bien sûr, jouent un rôle majeur en chimiométrie, l'informatique qui est important car une grande partie de la chimiométrie repose sur des logiciels. On trouve aussi les principales disciplines de la chimie qui bénéficient de la chimiométrie. La chimie analytique est probablement le domaine le plus important où la chimiométrie a un rôle majeur et trouve ces origines. La majorité des chimistes analytiques admet le besoin des statistiques, telles que la comparaison des moyennes et des erreurs et les tests de signification ensuite passer à des méthodes d'analyse de données plus avancées, principalement la chimiométrie [45].

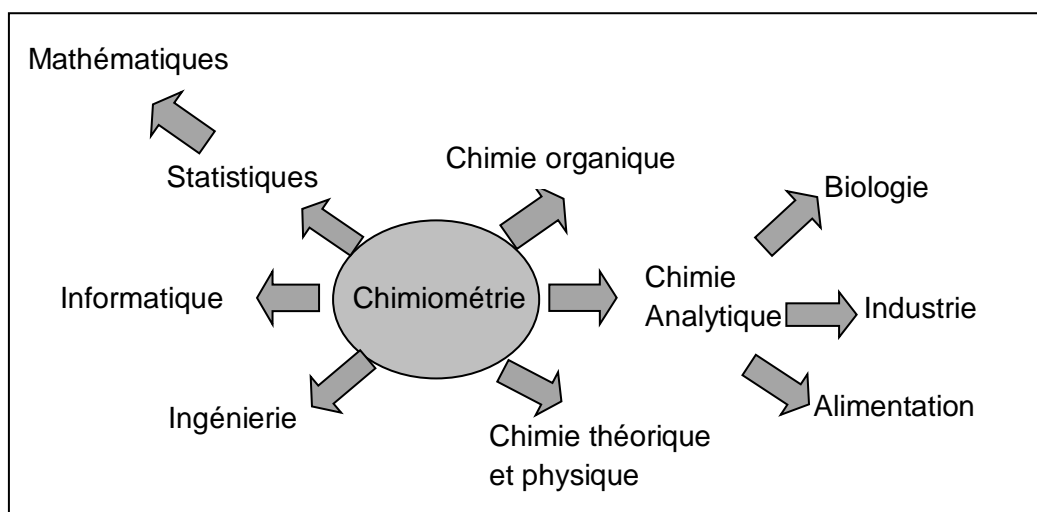


Figure 1.16 : La relation entre la chimiométrie et les différentes disciplines [45].

Le développement de la chimiométrie est étroitement lié au développement des instruments et des ordinateurs. Les nouveaux instruments sophistiqués ont obligé le chimiste à se familiariser avec les méthodes d'analyse des données. Optimisation, analyse des multivariées, calibration multivariable, la résolution multicomposante et l'analyse de processus multivariable sont parmi les concepts importants auxquels les chimistes doivent aujourd'hui être familiarisés.

L'analyse des variables latentes a été introduite et est devenue largement utilisée en chimiométrie. Les données chimiques sont caractérisées par des profils instrumentaux d'origine chromatographique ou spectroscopique (ou des combinaisons des deux) et les variables latentes représentent une méthodologie parfaite pour décomposer de telles structures de données [44].

Bien qu'il est connue que pour la spectroscopie vibrationnelle la coexistence de plusieurs composants chimiques provoque de chevauchements spectraux et rend parfois l'analyse quantitative extrêmement difficile, le traitement chimiométrique des spectres, présentant une quantité importante d'information, ne nécessite ni séparation physique ni traitement chimique préalable des composants de l'échantillon, ce qui réduit les inconvénients environnementaux et oriente l'étude vers le large domaine de la chimie verte. La figure 1.17 montre un schéma des principales étapes impliquées dans l'analyse chimiométrique vibrationnelle des multicomposants, allant de la sélection d'étalons ou d'échantillons à la collection des signaux, de la calibration à l'évaluation et à la validation des facteurs analytiques [37].

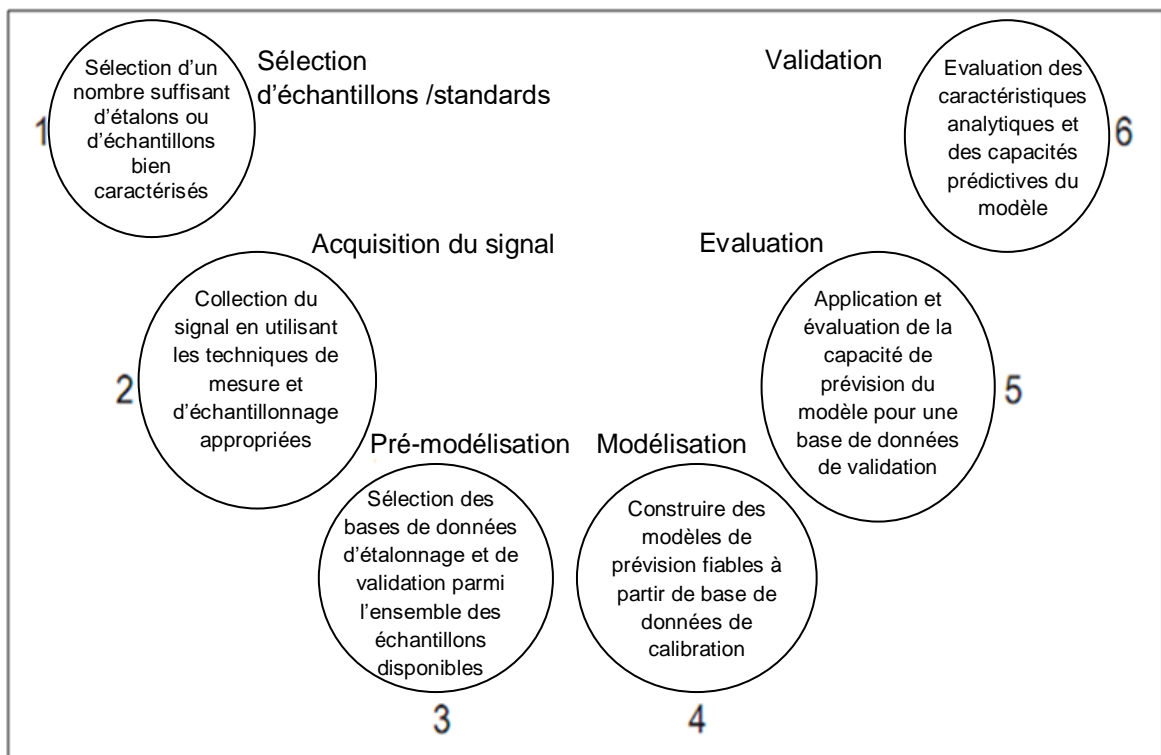


Figure 1.17 : Etapes de l'analyse multicomposant basée sur la chimiométrie et la spectroscopie vibrationnelle [37].

Le processus d'application d'un ou plusieurs des différents algorithmes utilisés pour relier les données spectroscopiques aux compositions des échantillons constitue le processus de calibration. Une considération supplémentaire implique la question de savoir combien de données de facteurs doivent être utilisées dans un modèle de calibration donné ou, alternativement, combien de longueurs d'onde, lorsque c'est la considération appropriée, et lesquelles [46].

L'approche en algorithme des moindres carrés partiels (PLS: Partial Least Squares) est l'une des méthodes de calibration multivariée. La méthode est souvent présentée comme la principale technique de régression pour les données multivariées dans de nombreux domaines et a connu un succès spectaculaire. Elle a été introduite par Wold (1966) et a fait l'objet de nombreux adaptations et développement [46].

La figure 1.18 fournit un aperçu simplifié du fonctionnement de l'algorithme. Une évaluation de la figure révèle que les informations des concentrations de constituants des échantillons sont incluses dans le calcul des facteurs. Le flux cyclique de calculs entre le modèle, les facteurs, les scores et l'inversement indique une caractéristique clé de l'algorithme, plutôt que de travailler uniquement avec un ensemble de facteurs ne modélisant que les principales variations des données spectrales, il inclut également une contribution à partir des informations sur les constituants. Cette inclusion des informations sur les constituants dans le calcul du facteur modifie les facteurs de sorte qu'ils sont plus capables de modéliser ces constituants que de modéliser uniquement les spectres [46].

La méthode est un peu similaire à la méthode en composante principale dans la mesure où les facteurs PLS sont partiellement déterminés par leur capacité à reconstituer les données spectrales, l'inclusion des concentrations de constituants dans les calculs en boucle provoque la «rotation» de ces facteurs (nomenclature statistique utilisée pour décrire cette opération) dans un espace multivarié, dans une direction qui rend les facteurs plus prédictifs de ces

concentrations. Ces facteurs sont optimisés pour leur tâche d'analyse quantitative [46].

La PLS est toujours un outil important lorsque les données sont partiellement connues, un exemple bien connu étant la mesure des protéines dans le blé par spectroscopie NIR. Un modèle peut être obtenu à partir d'une série d'échantillons de blé et PLS utilisera les caractéristiques typiques de cet ensemble de données pour établir une relation avec la quantité connue de protéines. Les modèles de PLS peuvent être très robustes à condition que les futurs échantillons contiennent des caractéristiques similaires aux données d'origine, mais les prédictions sont essentiellement statistiques [45].

Rien ne garantit que le modèle fonctionne bien avec l'existence d'une différence caractéristique spectrale. Il est donc important de connaître les limites de la méthode, en particulier pour garder à l'esprit que l'utilisation de la méthode PLS ne peut pas compenser des expériences mal conçues ou des données expérimentales inadéquates. Une caractéristique importante de la PLS est qu'elle prend en compte les erreurs à la fois dans les estimations de concentration et les spectres. Il est important de noter que la spectroscopie proche infrarouge (NIR), est principalement utilisée dans l'industrie alimentaire et dans des processus de chimie analytique [45].

L'algorithme PLS utilisé dans la pratique varie considérablement et dépend parfois du développeur du logiciel. Il est actuellement difficile de fusionner tous les facteurs en un algorithme standard. Néanmoins, l'algorithme peut être grossièrement classé en au moins deux procédures, PLS1 et PLS2. PLS1, parfois appelé PLS standard, utilise les informations d'un seul constituant chimique pour effectuer la calibration, tandis que PLS2, parfois appelé PLS global, utilise plus de deux composants chimiques simultanément [47].

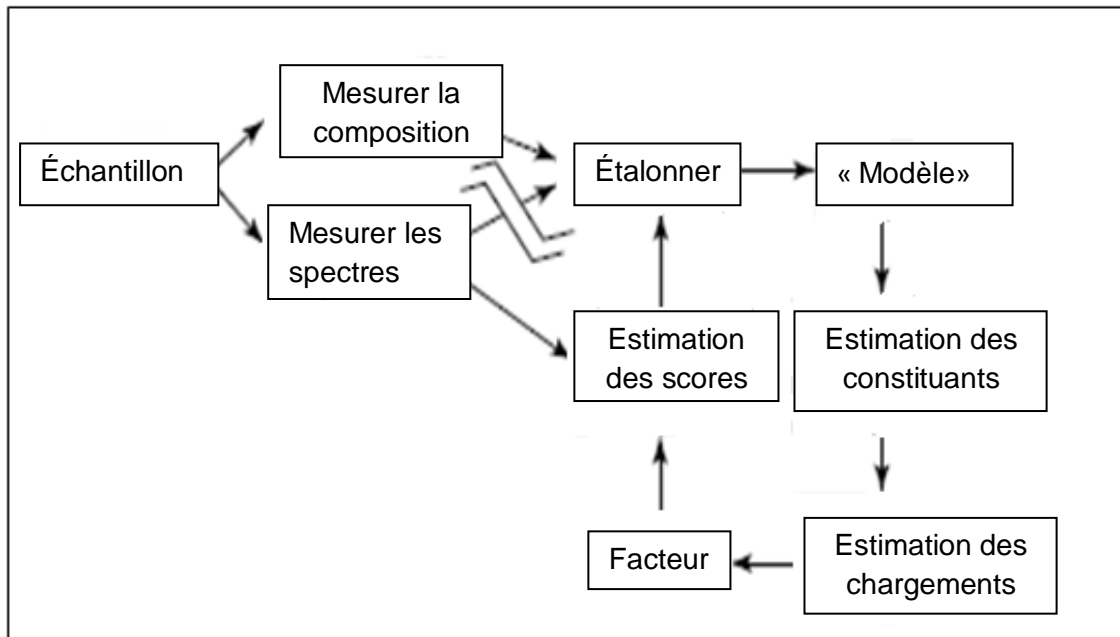


Figure 1.18 : Schéma fonctionnel montrant la procédure du fonctionnement de l'algorithme PLS (Calibration) [46].

Pour la réalisation de l'analyse quantitative, plusieurs modes de mesure peuvent être considérés: (i) mesure en mode statique (batch) où la cellule IR représentée dans la figure 1.19 [48] est, à chaque mesure, retirée de son compartiment pour son nettoyage ou son remplissage, (ii) mesure en écoulement bloqué (flux stoppé), (figure 1.20) [49] où les échantillons sont conservés dans des récipients distincts pendant toutes les opérations unitaires jusqu'au transfert vers le dispositif d'analyse (on utilise une pompe péristaltique pour remplir la cellule, on stoppe momentanément le flux, on obtient le spectre et on rétablit le flux pour laver la cellule avec le solvant ou la remplir avec une autre solution et ce, sans la déplacer), (iii) en mode à flux continu où les diverses opérations unitaires de l'analyse s'effectuent pendant que l'échantillon circule du point d'injection jusqu'à l'unité de mesure [42].

Le verre ou le quartz sont le plus souvent utilisés comme matériaux de fenêtre pour la région NIR (figure 1.21). Une variété de cellule de transmission de liquide à chemin optique fixe sont disponibles et sont souvent utilisées. Les spectres NIR des échantillons liquides, en particulier ceux des solutions aqueuses,

sont sensibles à la température. Ainsi la cellule est souvent insérée dans un support thermostat de cellule [50].

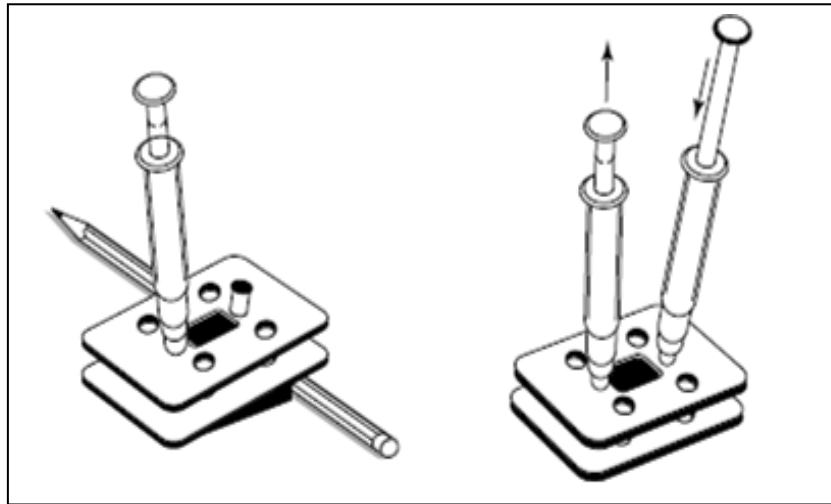


Figure 1.19 : Procédure pour remplir une cellule scellée [48].

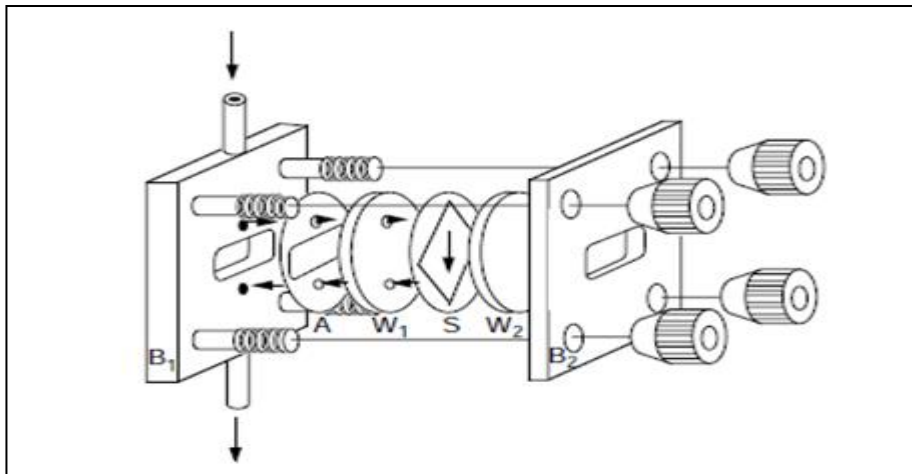


Figure 1.20 : Schéma représentatif de la cellule de flux. A, adaptateur de plomb; B1 et B2, corps de cellule en acier inoxydable ; S, entretoise en plomb; W1, fenêtre à deux trous; W2, fenêtre sans trou [49].

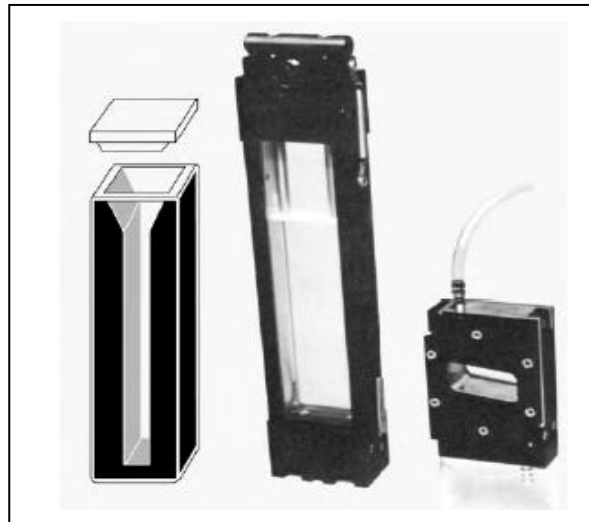


Figure 1.21 : Quelques exemples de cellules disponibles pour la mesure des spectres de transmission [50].

La technique d'échantillonnage à réflexion totale atténuée (ATR) a libéré les utilisateurs de spectroscopie du moyen infrarouge, des techniques laborieuses de préparation d'échantillons permettant d'obtenir des spectres de haute qualité adaptés à l'analyse quantitative. De tel accessoire convient à l'étude d'échantillons solides et liquide épais ou très absorbants. ATR ne nécessite que peu de préparation des échantillons pour la plupart des échantillons. L'échantillon doit être correctement mis en contact optique avec le cristal ATR. Un faisceau infrarouge est dirigé vers un cristal optiquement dense à indice de réfraction élevé, appelé élément de réfraction interne (ERI), à un certain angle, il se crée une onde évanescente qui s'étend au-delà de la surface du cristal dans l'échantillon maintenu au contact du cristal à quelques micromètres [51, 52]. La réponse spectrale est définie par l'interaction du rayonnement à la surface d'ERI et est régie par la profondeur de pénétration (figure 1.22). Bien que la mesure ne soit pas une transmission, il est courant d'enregistrer les données dans un format de transmission et d'utiliser des conversions normales en absorbance pour des mesures quantitatives. Il est également important de noter qu'il existe une dépendance de la longueur d'onde aux intensités de la bande déterminée par la profondeur de pénétration [43].

Pour les accessoires ATR dans le moyen infrarouge (MIR), l'élément de réfraction interne le plus populaire est fabriqué à partir de sélénium de zinc (ZnSe) qui a la tendance à être le plus polyvalent. Ce matériau couvre la plage spectrale de 4000 à 650 cm^{-1} , il est relativement dur et il n'est pas attaqué par l'eau. Cependant, il est réactif aux fortes acides et bases, et il se dégrade avec les oxydants. Ces deux situations entraineront une réponse optique variable du matériau, ce qui entrainera des erreurs quantitatives. D'autres matériaux peuvent être utilisés à la place de ZnSe, comme le silicium, le germanium et le diamant qui est considéré comme le matériau idéal à utiliser, mais la plupart des alternatives ont des gammes de fréquences réduites par rapport au ZnSe. Les cristaux ATR pour le NIR sont généralement en verre de quartz. Le saphir est utilisé pour des applications spéciales [43,53].

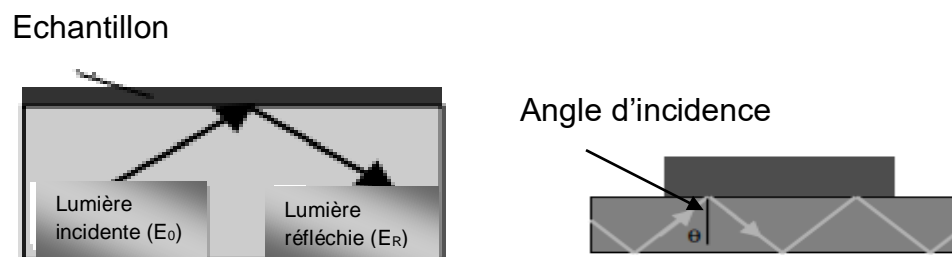


Figure 1.22: Mesure de la réflexion interne (réflexion totale atténuée), ATR [53].

1.5 Lien entre la chimie verte et la chimie analytique verte

1.5.1 Principes de la chimie verte

Paul Anastas, le père de la chimie verte, a établi dans sa littérature sur la chimie verte, l'idée de remplacer les substances par des substances moins polluantes ou, si possible, des produits inoffensifs, et la prévention des déchets à l'origine ainsi que l'utilisation restreinte des matières premières et de l'énergie qui peuvent être résumées en 12 principes (figure 1.23 A). Ces principes sont davantage axés sur la prévention que sur la réaction des effets des produits chimiques sur la pollution et fournissent des lignes directrices pour améliorer les méthodes de synthèse grâce à l'utilisation de matières premières renouvelables, à la maximisation du produit final en termes de masse totale, à la réduction de la

consommation d'énergie et à la recherche pour la réduction de la toxicité chimique des composés impliqués [54, 55].

1.5.2 Chimie Analytique Verte

Les effets secondaires de l'utilisation de méthodes analytiques peuvent comporter des risques graves pour les opérateurs ainsi que des dommages à l'environnement et c'est pour ça il est pertinent de réfléchir aux conséquences de notre activité en tant que chercheurs ou utilisateurs des méthodes analytiques. Dans le cadre d'une évaluation fondamentale des coûts de procédures analytiques nous devons interagir de manière éthique avec l'environnement, en tenant compte des risques inhérents à certains types d'échantillons, ainsi qu'à l'utilisation intensive de réactifs chimiques et de solvants, à la consommation d'énergie associée à une instrumentation moderne et, bien entendu, à la génération des déchets de laboratoire et aux émissions résultant des différentes étapes de procédures analytiques [56].

Ce dernier aspect concerne les consommables ainsi que le budget nécessaire pour éviter ou réparer les dommages environnementaux. Il est considéré que l'écologisation des méthodologies analytiques offre d'excellentes opportunités commerciales et résulte de notre engagement moral envers notre société et notre avenir [56].

Heureusement, les efforts des équipes de recherche telles que celles de Jacek Namie Snick en Pologne et de Mihkel Koel et Mihkel Kaljurand en Estonie ont contribué à établir les principaux principes et stratégies (figure 1.23 B) qui soutiennent les pratiques vertes en chimie analytique. Par la suite, la publication des livres de Koel et Kaljuran en 2010, de de la Guardia et Armenta en 2011, et celui de de la Guardia et Garrigues en 2011 témoignaient que la situation actuelle de la chimie analytique verte est entrain de devenir un mouvement qui peut modifier notre perspective et nos pratiques dans le domaine analytique dans les années à venir [54].

Une idée simple pourrait être de considérer la chimie analytique verte comme une partie de l'idée de la chimie verte, de la même manière que l'on pourrait considérer que la chimie analytique est la partie consacrée au développement et à l'analyse.

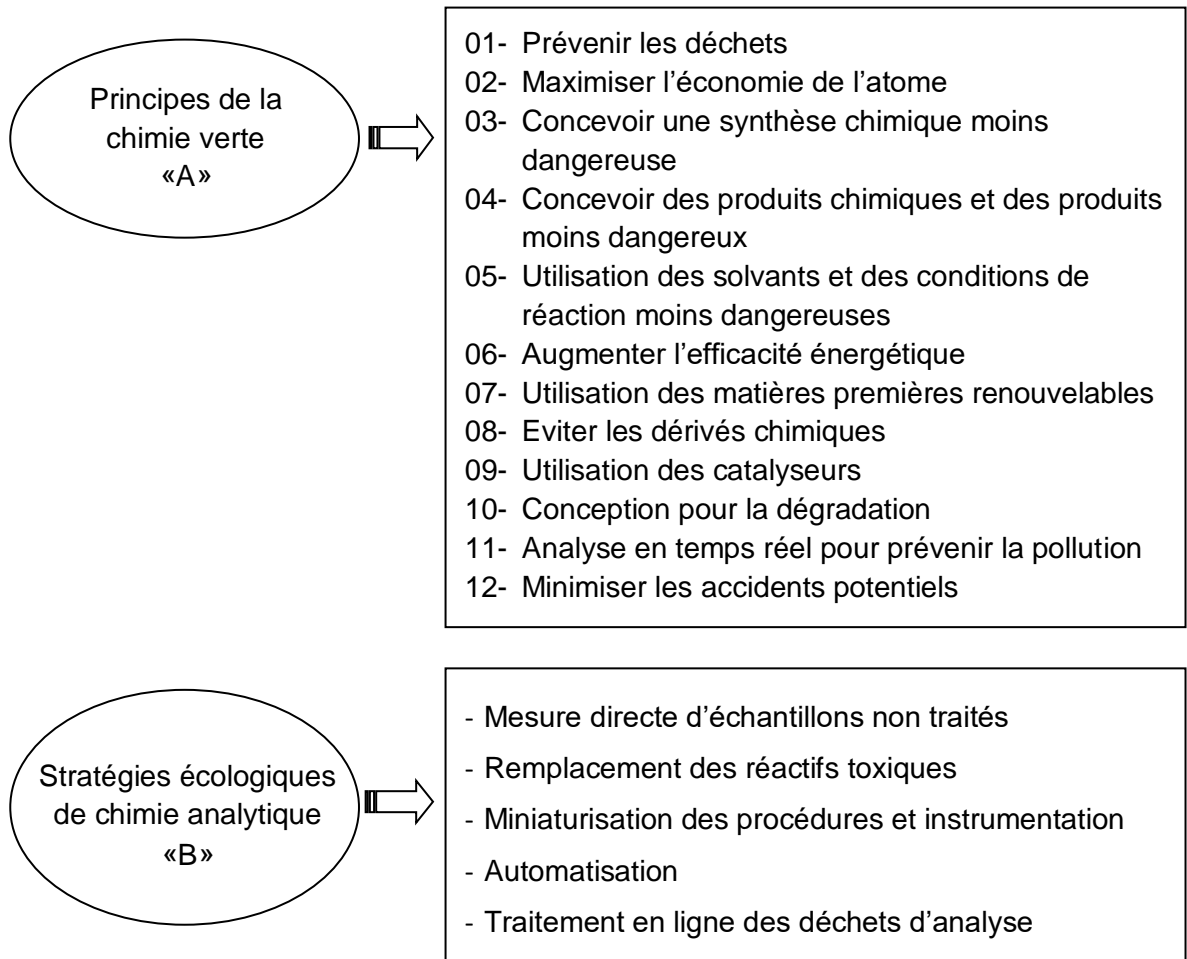


Figure 1.23 : Stratégies de la chimie analytique verte dans le cadre des principes de la chimie verte [54].

1.5.3 Composants de l'échelle écologique

Le concept d'éco-échelle d'analyse qui a été proposé par A. Galuszka et al. repose sur le fait que l'analyse verte idéale a une valeur de 100. Pour chacune des paramètres de la procédure analytique (quantité de réactifs, dangers, énergie et déchets), des points de pénalité sont attribués et la valeur du coefficient de l'efficacité verte indiquera l'écart par rapport à l'analyse idéale verte. Il est important de noter que l'estimation du danger des substances dépend du risque et de la quantité utilisée, de ce fait, il est proposé que le total des points de pénalité

soit calculé en multipliant le sous total des points de pénalité pour une quantité et un risque donné [55].

La somme des points de pénalité pour toute la procédure devrait être incluse dans le calcul d'échelle écologique, selon la formule suivante:

Eco-échelle d'analyse = 100 – points de pénalité totales.

Le résultat du calcul est classé sur une échelle où le score est:

- > 75 représente une excellente analyse verte ;
- > 50 représente une analyse verte acceptable
- < 50 représente une analyse verte inadéquate.

L'attribution de points de pénalité à des catégories de risque et d'énergie nécessite une explication détaillée. Pour évaluer le danger des réactifs utilisés dans les procédures analytiques, différentes classifications de substances dangereuses peuvent être appliquées. Il a été proposé d'évaluer les dangers physiques, environnementaux et de la santé en utilisant le Système Général Harmonisé (SGH) de classification et d'étiquetage des produits chimiques, qui est la classification la plus complète et la plus récente des produits chimiques. Pour plus de commodité et de simplicité, il a été proposé que les pictogrammes et les mots indicateurs soient inclus dans l'évaluation des dangers présentés par les réactifs utilisés dans une procédure d'analyse. Chaque réactif peut être caractérisé par un ou plusieurs des pictogrammes (flamme, flamme sur cercle, corrosion, bouteille de gaz, crâne et os croisés, point d'exclamation, danger pour l'environnement et la santé). Des points de pénalité sont attribués pour chaque pictogramme. Le SGH utilise deux mots clés : danger (risque grave) et avertissement (risque moins grave) [55].

Le système suivant d'attribution de points de pénalité aux dangers a été proposé :

- aucun danger (pas de pictogramme) = 0 points de pénalité
- risque moins grave = 1 point de pénalité
- risque grave = 2 points de pénalité

Un autre critère a été proposé dans lequel moins de 10 mL (g) de réactif s'appliquent pour 1 point de pénalité, entre 10 et 100 mL (g) s'appliquent pour 2 points de pénalité et plus de 100 mL (g) s'appliquent pour 3 points de pénalité. Ces points de pénalité doivent être multipliés par les points de pénalité des dangers.

Des points de pénalité pour la consommation d'énergie ont été attribués selon les valeurs proposées par Raynie et Driver. Exemples de points de pénalité attribués aux réactifs et les techniques analytiques de consommation d'énergie sont indiqués dans les tableaux 1.6 et 1.7 respectivement [55].

Tableau 1.6 : Points de pénalité pour les risques de certains réactifs [55].

Réactifs	Nombre de pictogrammes	Mot de signal	Points de pénalité*
Acide acétique (glacial)	2	danger	4
Acide acétique (30%)	1	danger	2
Acétylène	2 (1,1)	Danger, avertissement	3 (2,1)
Solution d'ammoniac (25%)	3	danger	6
Acide benzoïque	1	avertissement	1
Dichlorométhane	1	avertissement	1
Acide chlorhydrique (30%)	2	danger	4
Acide sulfurique	1	danger	2
Peroxyde d'hydrogène	2	danger	4
n-hexane	4	danger	8
Acide nitrique (65%)	2	danger	4
Dichromate de potassium	5	danger	10
Hydroxyde de sodium	1	danger	2

Note. (*) : Nombre de pictogrammes multiplié par les points de pénalité des dangers.

Tableau 1.7 : Points de pénalité pour l'énergie de certaines techniques d'analyse [55].

Technique	Energie utilisée	Points de pénalité
IRTF	< 0,1 KWh par échantillon	0
Spectrofluorométrie		
Titration		
CLUP		
Spectrométrie UV-Vis		
SAA	≤ 1,5 KWh par échantillon	1
CG		
CL		
CG-SM	1,5 KWh par échantillon	2
CL-SM		
RMN		
Diffraction des rayons X		

Une nouvelle éco-échelle a été proposée par M. de la Guardia et al., appelée «certificat vert». Ce dernier est basé sur l'application d'un code de couleur associé à une lettre, de «A» à «G», étant «A» la plus verte, cela donne une idée de combien la méthode analytique est verte (figure 1.24). Les méthodes d'analyse de la classe «A» sont celles qui ont moins de 10 points de pénalité. Les méthodes de classe «B» totalisent entre 11 et 20 points de pénalité. Les méthodes de classe «C» ont entre 21 et 30 points de pénalité. Les méthodes de classe «D» totalisent entre 31 et 45 points de pénalité, les méthodes de classe «E» ont entre 46 et 60 points de pénalité, les méthodes de classe «F» entre 61 et 80 points de pénalité et enfin, les méthodes de classe «G» représentent plus de 81 points de pénalité [57].

Cependant, en appliquant l'éco-échelle, des situations incohérentes ont été observées où différentes quantités de volume utilisées du même réactif équivalaient au même nombre de points de pénalité. A titre d'exemple, 0,8 mL de

n-hexane équivaldrait à 8 points de pénalité, 9,9 mL de n-hexane équivaldrait à 8 points de pénalité et 10 mL de n-hexane (seulement 0,1 mL de plus que la situation précédente) serai de 16 points de pénalité. Ainsi, il semblait nécessaire de trouver une relation appropriée entre les points de pénalité et le volume de réactifs utilisés ou de déchets générés, fournissant un sens «vrai» de la valeur des points de pénalité lors de l'évaluation de l'aspect vert d'une méthode [57].

Pour faire une évaluation correcte des points de pénalité, concernant l'utilisation de réactifs et de solvants, le paramètre de pénalité a été calculé en fonction du volume de réactifs consommés ou de déchets générés et la relation a été établie. Les résultats sont représenté sous forme d'une équation $y=a \cdot x^b$ avec (y) est la valeur du point de pénalité, (x) le volume des réactifs et (a) et (b) deux coefficients ($a = 0,61 \pm 0,05$) et ($b = 0,31 \pm 0,02$) pour la consommation de réactifs et ($a = 1,50 \pm 0,08$) et ($b = 0,40 \pm 0,02$) pour la production de déchets [57].

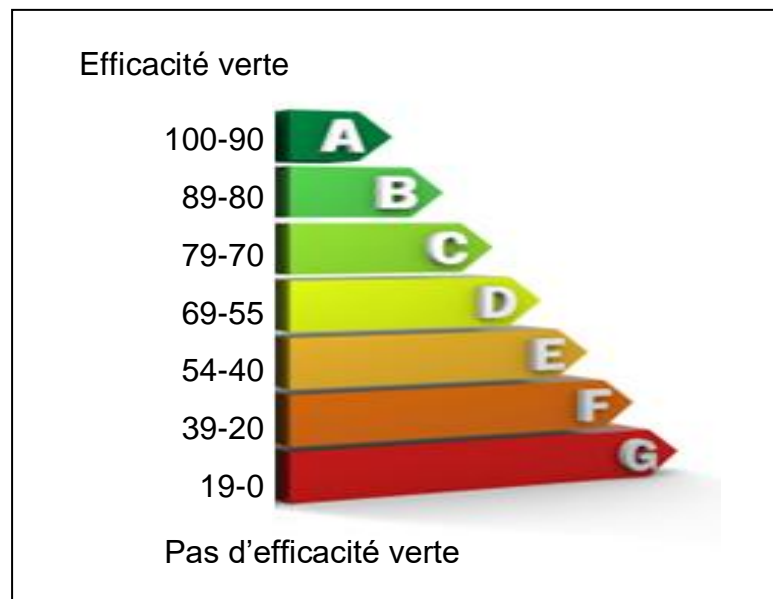


Figure 1.24 : Certificat vert d'une méthode analytique [57].

Cette nouvelle éco-échelle a été adoptée pour estimer l'efficacité verte et attribuer le certificat vert aux différentes études expérimentales développées dans le cadre de ce travail de thèse.

CHAPITRE 2

ANALYSE DE FORMULATIONS COMMERCIALES UTILISEES POUR LE TRAITEMENT CONTRE LE VARROA PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER

2.1 Introduction

L'acarien ectoparasite, *Varroa destructor*, est considéré comme le plus dangereux parasite au monde pour l'abeille occidentale (*Apis mellifera* L.) [58-63]. Cet destructeur acarien qui est un externe et un nouveau parasite de l'abeille [64], est un vecteur de maladies virales graves [65, 66] et un acteur clé dans les pertes de colonies hivernales [61, 67] en provoquant une mortalité en se nourrissant de l'hémolymphe de la couvée et des adultes [63, 66, 68, 69]. De nos jours, Il est difficile de trouver une colonie d'abeilles mellifères sans le parasite varroa [70].

Le parasite Varroa peut causer également ce qu'on appelle, trouble d'effondrement des colonies (Colony Collapse Disorder «CCD»), qui est considéré comme un grave problème pour les abeilles mellifères [66, 71]. De nombreuses méthodes de contrôle ont été utilisées pour préserver la colonie hôte et réduire la population d'acariens varroa [64, 69], car les colonies non traitées s'effondreraient dans quelques années ou dans quelques mois [64, 70]. Cependant, la présence de pesticides dans les produits apicoles doit être soigneusement contrôlée pour protéger la santé humaine. Pour cette raison et à travers la réglementation (CE) n° 396/2005 [72] et la réglementation (CE) n° 37/2010 [73], les limites maximales de résidus (LMR) ont été établies pour les résidus de pesticides dans le domaine agricoles et apicoles [74].

Différentes études réalisées dans différents pays ont montré la présence des résidus d'acaricides dans le miel, la propolis et la cire et son effet négatif sur la santé des abeilles domestiques [62, 75]. A cause de cette situation, des substances

naturelles, telles que les acides organiques (formique, lactique ou oxalique) et certains composés d'huiles essentielles (thymol, eugénol, carvacrol, menthol), pourrait être utilisé pour éviter la présence d'acarien parasite [76-78].

Cependant, il a été prouvé que l'utilisation de produits naturels, y compris le thymol et d'autres monoterpénoïdes, pouvait causer des problèmes en raison de ses effets néfastes sur les abeilles [61, 78]. D'autre part, des résidus de thymol et d'autres monoterpénoïdes peuvent se trouver dans la cire, qui peuvent migrer dans le miel et altérer son goût, ce qui n'est pas autorisé par la réglementation internationale sur le miel. Malgré cela, les résidus de thymol ne présentent pas de danger pour la santé du consommateur s'ils ne dépassent pas 50 mg Kg^{-1} de miel [78, 79]. Plusieurs études ont été menées pour la détermination des pesticides dans les produits ruchers [80]. Cependant, peu d'entre elles se sont concentrées sur la détermination des substances naturelles utilisées comme traitement contre le varroa.

Diverses méthodes d'extraction ont été développées pour isoler les pesticides, notamment des produits chimiques et naturels, principalement l'extraction liquide-liquide (ELL) [79, 81] et l'extraction en phase solide (EPS) [77, 82-84]. Autres techniques d'extraction, la micro-extraction en phase solide (MEPS) [85], extraction par fluide supercritique [86] et QuEChERS, [(quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), (rapide, facile, économique, efficace, robuste et sûr)], une technique de préparation des échantillons [80, 87], ont été appliquées à l'analyse des pesticides dans les produits apicoles. D'autre part, la chromatographie en phase gazeuse (CG) et la chromatographie en phase liquide (CLHP), avec des détecteurs sélectifs, ont été considérées comme les principales méthodes d'analyses pour la détermination des résidus de pesticides dans les produits apicoles [79-85, 87]

La quantification des composés d'huile essentielle est largement effectuée par chromatographie en phase gazeuse ; qui est la méthode instrumentale la plus appropriée pour l'analyse d'échantillons complexes [88, 89]. En raison de la grande efficacité de séparation, la sensibilité et la sélectivité de la détection de la

spectrométrie de masse (SM), la CG-SM a été largement utilisée pour la détermination des composés volatils dans différentes matrices, notamment les huiles essentielles [89, 90] et les produits apicoles [91, 92]. La chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme [76, 77] a été aussi utilisée pour la détermination de certains terpénoïdes utilisés en tant que traitement contre le varroa. De plus, la chromatographie en phase liquide (CL) avec détection de la fluorescence a également été utilisée pour la détermination des terpènes dans le miel [93].

Les techniques de chromatographie étaient généralement employées pour l'analyse des formulations commerciales [94, 95]. Différentes études ont montré le potentiel de CG [96, 97] et de CL [97, 98] pour la détermination des substances actives dans les formulations commerciales. Cependant, ces techniques impliquent de longues étapes pour la préparation des échantillons et l'utilisation de grandes quantités de solvants [94]. C'est pour cette raison que des procédures basées sur la spectroscopie vibrationnelle ont été développées comme de simples alternatives aux procédures chromatographiques en raison de leur simplicité [94, 99, 100]. D'autre part la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) fournit des informations sur la présence d'huiles essentielles [89, 90].

La spectroscopie du moyen infrarouge (MIR) est la technique vibrationnelle la plus importante appliquée dans le contrôle de qualité des formulations commerciales de pesticides [101], fournissant des informations extrêmement utiles sur la structure des analytes [102] et leur quantification.

L'application d'outils chimiométriques qui extraient des informations à partir de grands ensembles de données spectrales augmente le développement de méthodes spectroscopiques d'infrarouge et met en évidence le potentiel d'une analyse spectrale complexe pour la détermination de multianalytes. Cependant, à notre connaissance, aucune tentative n'a été faite pour déterminer les acaricides, y compris les produits naturels, dans les formulations commerciales utilisées en tant que traitement pour lutter contre le Varroa, bien que plusieurs formulations commerciales disponibles contiennent du thymol comme le principal ingrédient actif.

Certaines de ces formulations contiennent également d'autres composés permettant de réduire la quantité de thymol afin d'éviter des effets négatifs sur les abeilles [76].

Donc, l'objectif du présent travail était d'évaluer l'utilisation de deux stratégies de calibration univariée et multivariée basées sur des mesures spectroscopiques dans le moyen infrarouge (MIR), pour la détermination rapide et simultanée de quatre monoterpènes dans des formulations commerciales utilisées dans le traitement de la Varroase.

2.2 Partie expérimentale

2.2.1 Appareil et logiciel

Un spectrophotomètre Bruker modèle Tensor 27 MIR-TF (Brème, Allemagne), équipé d'un détecteur de tryglycine sulfate deutéré (DTGS) stabilisé en température et d'une séparatrice de faisceaux en KBr, a été utilisé pour obtenir les spectres MIR-TF dans l'intervalle spectral compris entre 4000 et 500 cm^{-1} . Pour éviter la manipulation des cellules et augmenter le débit des échantillons, un système à flux bloqué a été utilisé pour l'introduction des échantillons dans le spectrophotomètre MIR-TF. A l'aide d'une pompe péristaltique Gilson P-3 Minipuls, des échantillons ont été recueillis et conduits dans une cellule d'écoulement d'une entretoise en téflon de 1 mm de longueur avec des fenêtres en ZnSe de Specac (Orpington, Royaume-Unit). Des entretoises de 0,1, 0,5 et 1 mm ont été utilisées pour une étude d'optimisation de la longueur du chemin optique. Pour le transport des échantillons des tubes de pompe en viton (iso-versinique), 3 mm d.e. et 1 mm d.i. ont été utilisés. Tous les tubes de connexion utilisés dans le collecteur ont été fabriqués à partir de PTFE avec un d.i. de 0,8 mm (figure 2.1).

Le logiciel OPUS 6.5 de Bruker a été utilisé pour la réalisation des mesures et le traitement des spectres. Les calibrations univariée et multivariée ont été réalisées à l'aide des applications Quant 1 et Quant 2, respectivement, intégrées dans le logiciel d'instrument. Le logiciel de résolution de Microsoft Excel a été utilisé pour résoudre le système d'équations.

Un bain d'eau à ultrasons J.P Selecta (Barcelone, Espagne) d'une fréquence de 40 KHz a été utilisé pour la préparation des échantillons.

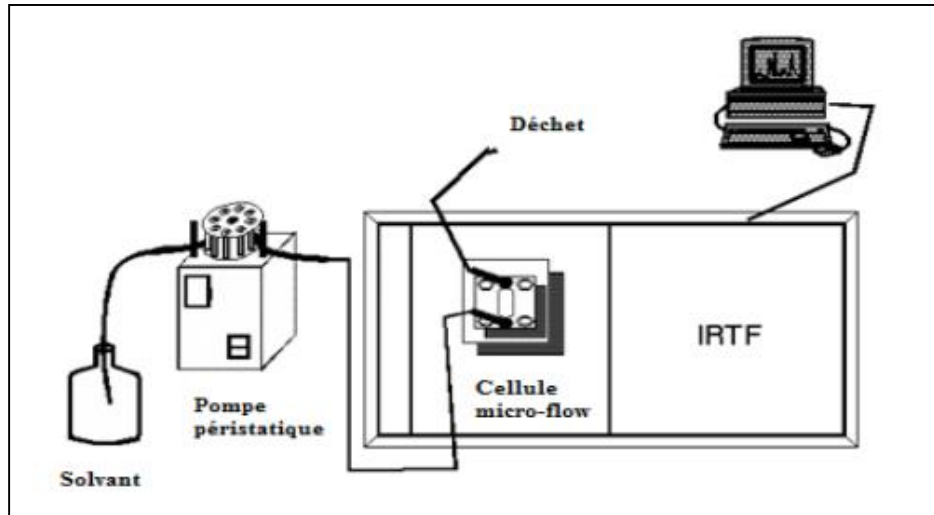


Figure 2.1 : Montage IRTF utilisé pour l'introduction des solutions dans la cellule.

2.2.2 Réactifs et produits

Du dichlorométhane de qualité Multisolvent stabilisé avec 50 ppm d'amylène, de Scharlau (Barcelone, Espagne), a été utilisé pour la préparation des échantillons et les standards ainsi que pour la mesure MIR-TF. Les standards à savoir le camphre de pureté 98%, de Chemonova (Madrid, Espagne), Thymol de pureté 98%, fournie par Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Allemagne) et le menthol de pureté 99%, l'eucalyptol de pureté 99%, tous deux obtenus de Panreac (Barcelone, Espagne), ont été utilisés dans cette étude.

Trois formulations commerciales, deux à base de thymol et une autre avec un mélange de terpènes (76% de thymol, 16,4% d'eucalyptol, 3,9% de camphre et 3,9% de menthol), ont été obtenus sur le marché local Algérien et ont été utilisées dans cette étude pour évaluer l'applicabilité réelle de la méthode MIR-TF développée.

2.2.3 Préparation des échantillons

Les standards ont été préparés à partir de composés terpéniques purs et/ou de mélanges des quatre terpènes considérés. Une quantité adéquate d'échantillon (formulations commerciales) a été pesée avec précision et diluée dans le dichlorométhane afin d'obtenir une concentration d'environ 4 mg mL⁻¹ de thymol pour chaque formulation commerciale. Afin d'assurer une extraction complète des composés terpéniques, des solutions d'échantillons ont été traitées dans un bain à ultrasons pendant 10 min [103]. Pour les études de récupération, les échantillons ont été enrichis avec différentes quantités de thymol, d'eucalyptol, de camphre et de menthol, entre 0,2 et 1,75 mg mL⁻¹, 0,1 et 0,9 mg mL⁻¹, 0,07 et 0,2 mg mL⁻¹ et 0,08 et 0,2 mg mL⁻¹, respectivement.

2.2.4 Mesures MIR-TF

Les spectres MIR-TF des standards et des échantillons de formulation ont été enregistrés entre 4000 et 500 cm⁻¹ avec une résolution nominale de 4 cm⁻¹, en cumulant 25 scans par spectre par rapport au background de la cellule remplie du même solvant que celui utilisé pour la préparation des échantillons et mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et les standards.

Pour l'identification de bandes séparées de chaque étalon, les spectres IRTF de chaque monoterpène (camphre, thymol, menthol et eucalyptol) préparés directement dans le dichlorométhane avec une concentration de 5 mg mL⁻¹ ont été examinés. Des entretoises d'une longueur de 0,1, 0,5 et 1 mm ont été testées.

Pour la calibration univariée, des solutions individuelles contenant du camphre, du thymol, du menthol ou d'eucalyptol ont été préparées dans une plage de concentration allant jusqu'à 5 mg mL⁻¹. Par ailleurs, seize standards mixtes ont été utilisés pour construire un modèle d'étalonnage multivarié PLS. Ces standards correspondent à différents mélanges de camphre, thymol, menthol et eucalyptol à deux niveaux de concentrations différents selon un plan expérimental de 4². A cette fin, le camphre et le menthol ont été préparés, séparément, à des niveaux de

concentrations de 0,025 et 0,25 mg mL⁻¹, le thymol à 0,25 et 5,0 mg mL⁻¹ et l'eucalyptol à 0,1 et 1,0 mg mL⁻¹.

Pour déterminer la concentration de chaque terpène dans les échantillons formulés dans le cas de la calibration univariée, la hauteur du pic d'absorbance des bandes spectrales caractéristiques a été mesurée à 1737 cm⁻¹, 1151cm⁻¹, 1022 cm⁻¹ et 980 cm⁻¹ et corrigée avec une ligne de base commune unique établie à 1933 cm⁻¹, pour le camphre, le thymol, le menthol et l'eucalyptol, respectivement.

Une analyse multivariée PLS a été réalisée en utilisant les régions spectrales comprises entre 1812-1667 cm⁻¹ et 1200-955 cm⁻¹, après centrage moyen des données spectrales et en tenant compte de différentes techniques de prétraitement spectral; telles que la correction d'offset, la soustraction d'une droite, la normalisation vectorielle (SNV), normalisation Min-Max, correction multiplicative de diffusion, la dérivée première et la seconde, et leurs combinaisons.

2.3 Résultats et discussion

2.3.1 Identification des bandes séparées des étalons

Pour identifier les bandes séparées de chaque étalon, les spectres IRTF de chaque monoterpène, camphre, thymol, menthol et eucalyptol, préparés directement dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂) avec une concentration de 5 mg mL⁻¹ sont obtenus. Les fenêtres utilisées dans cette partie pour l'analyse de la phase liquide sont en séléniure de zinc (ZnSe) avec une entretoise en téflon de chemin optique de 0,1 mm et l'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm⁻¹ et un nombre de scans égal à 25 spectres. La figure 2.2 présente les spectres IRTF des quatre étalons, camphre, thymol, menthol et eucalyptol.

Les spectres des quatre étalons groupés montrent la présence d'une bande séparée pour le camphre à 1737 cm⁻¹ alors que les bandes de thymol, eucalyptol et le menthol sont interférées le long du spectre. Nous avons choisi de travailler avec des bandes qui sont moins interférées pour le thymol, menthol et l'eucalyptol à 1151,1022 et 980 cm⁻¹, respectivement.

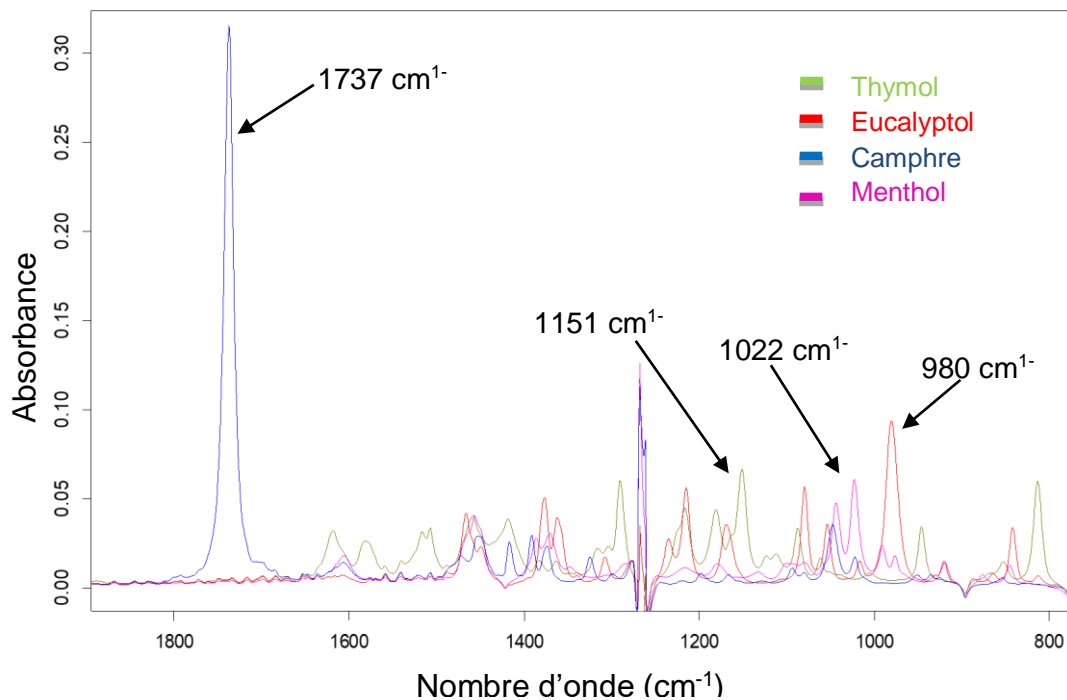


Figure 2.2 : Spectres IRTF des standards de camphre, thymol, menthol et eucalyptol, dilués dans du dichlorométhane à une concentration de 5 mg mL^{-1} pour chaque composé. Les spectres ont été obtenus en accumulant 25 scans et une résolution spectrale de 4 cm^{-1} .

2.3.2 Optimisation de la sensibilité de détermination

Afin d'augmenter la sensibilité et de diminuer les limites inférieures des concentrations des étalons pour atteindre des valeurs de l'ordre de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$, nous avons testé des chemins optiques supérieurs à $0,1 \text{ mm}$ à savoir $0,5$ et 1 mm .

Les figures (2.3-2.5) montrent les spectres des différents composés, thymol, eucalyptol, camphre et menthol obtenus avec des chemins optiques de $0,1$, $0,5$ et 1 mm . D'après les figures 2.3 et 2.4, on peut observer la difficulté d'identifier les bandes spécifiques pour tous les étalons à une concentration de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$. Cependant, les spectres des quatre étalons regroupés dans la figure 2.5 montrent la présence des bandes spécifiques utilisées dans cette étude pour le camphre, le thymol et l'eucalyptol à 1737 , 1551 et 980 cm^{-1} respectivement. La faible bande à 1022 cm^{-1} représente le menthol. De ce fait, le chemin optique de 1 mm a été sélectionné pour la réalisation des analyses spectrales.

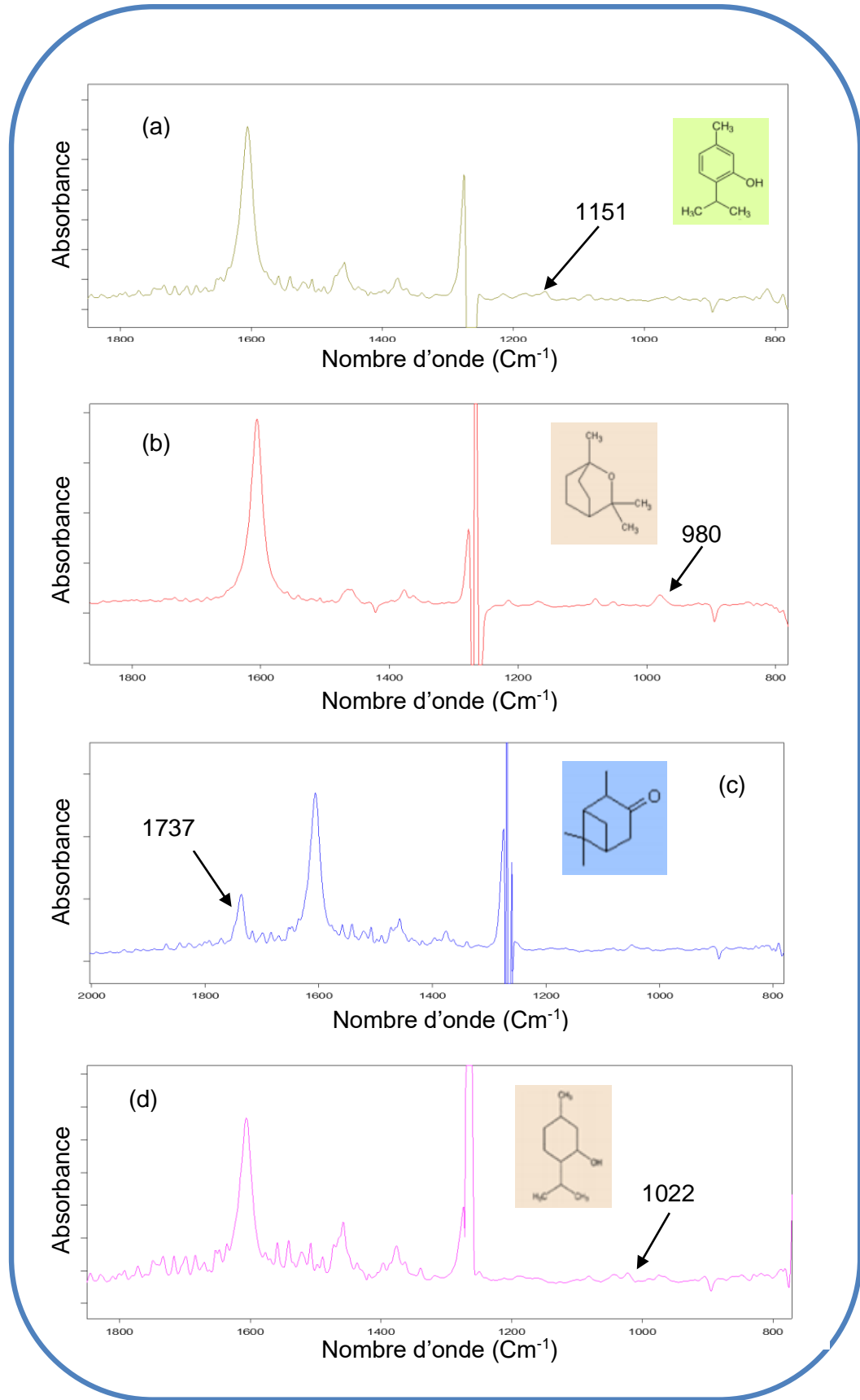


Figure 2.3 : Spectre IRTF d'absorbance de chaque composé à 0,05 mg mL⁻¹ et un chemin optique de 0,1 mm): (a) Thymol, (b) eucalyptol, (c) camphre, (d) menthol préparés directement dans le CH₂Cl₂.

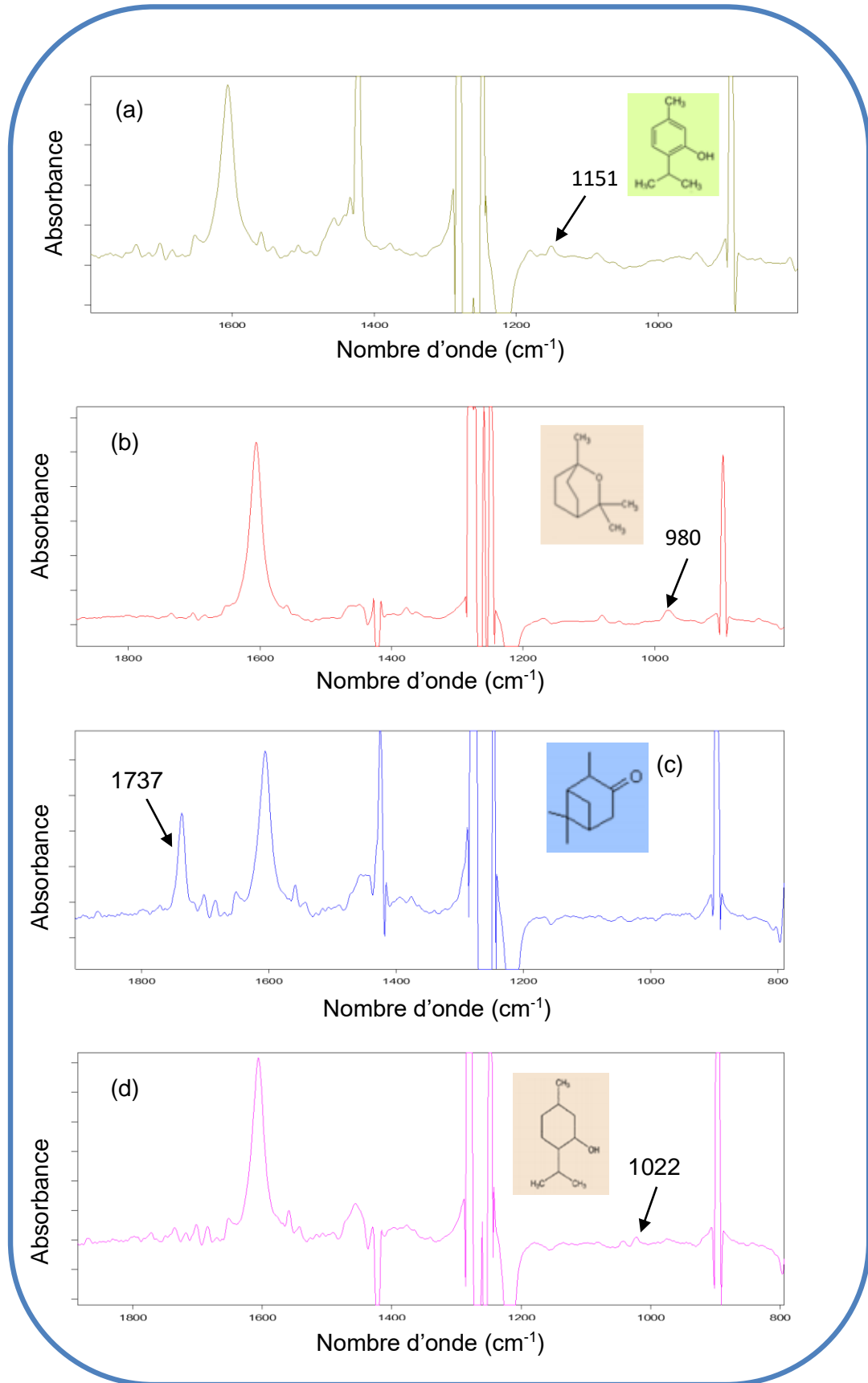


Figure 2.4 : Spectre IRTF d'absorbance de chaque composé à $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ et un chemin optique de $0,5 \text{ mm}$: (a) Thymol, (b) eucalyptol, (c) camphre, (d) menthol préparés directement dans le CH_2Cl_2 .

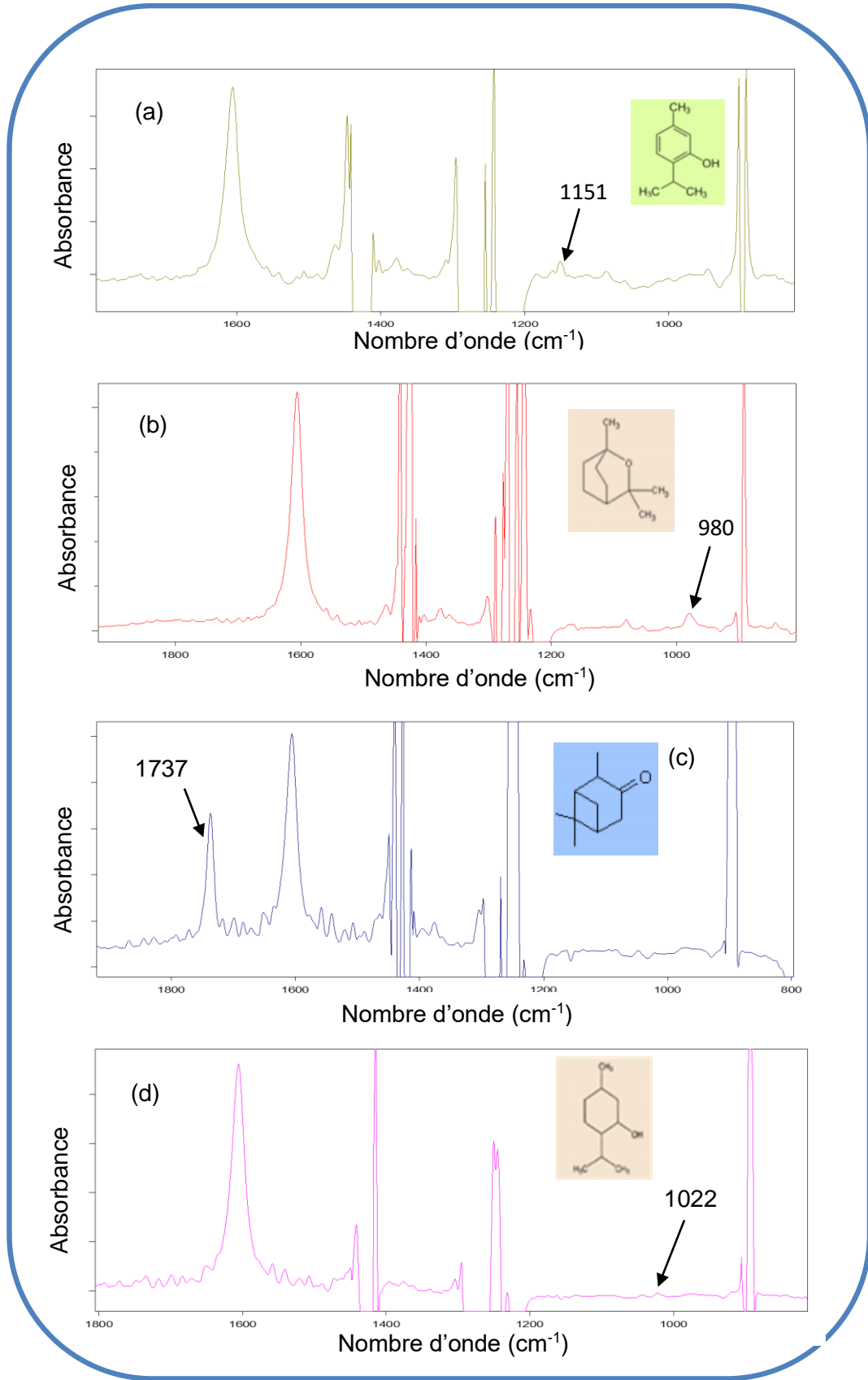


Figure 2.5 : Spectre IRTF d'absorbance de chaque composé à 0,05 mg mL^{-1} et un chemin optique de 1 mm : (a) Thymol, (b) eucalyptol, (c) camphre, (d) menthol préparés directement dans le CH_2Cl_2 .

2.3.3 Spectres IRTF d'étalons et d'échantillons de formulation

La figure 2.2 montre les spectres IRTF des standards de camphre, de thymol, de menthol et d'eucalyptol et la figure 2.6 ceux de formulations commerciales, toutes préparées dans du dichlorométhane. Comme on peut le voir dans ces spectres, certaines régions ne sont pas transparentes en raison de l'absorbance du solvant. La figure 2.2 montre les bandes les plus intenses, qui apparaissent à 1737 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} et à 980 cm^{-1} et qui sont dues aux vibrations d'élongation de C=O, de C–O, à la bande caractéristique de –OH et à la bande caractéristique de la fonction isopropyle pour camphre, thymol, menthol et eucalyptol, respectivement.

Suite à la comparaison des spectres présentés aux figures 2.2 et 2.6, on peut considérer que les formulations commerciales dissoutes présentent les mêmes bandes caractéristiques que les standards, ce qui suggère que l'utilisation de ces bandes pourrait être adéquate pour la détermination simultanée des quatre terpènes dans les échantillons. Cependant, on peut observer un fort chevauchement des bandes terpéniques, à l'exception du groupement carbonyle dans le camphre. Pour cette raison, les méthodes univariées basées sur un étalonnage externe avec des composés purs ne peuvent pas être assez puissantes pour effectuer leur détermination.

Dans cette étude, deux outils mathématiques ont été appliqués pour déterminer les quatre composés et pour réduire l'effet du chevauchement entre des bandes spécifiques pour chaque composé. L'un de ces outils est une stratégie univariée, basée sur l'utilisation d'équations proportionnelles, obtenues à quatre nombres d'onde, avec 16 coefficients déterminés pour chacun des quatre terpènes à chaque nombre d'onde, et le second est une analyse multivariée basée sur la régression des moindres carrés (PLS).

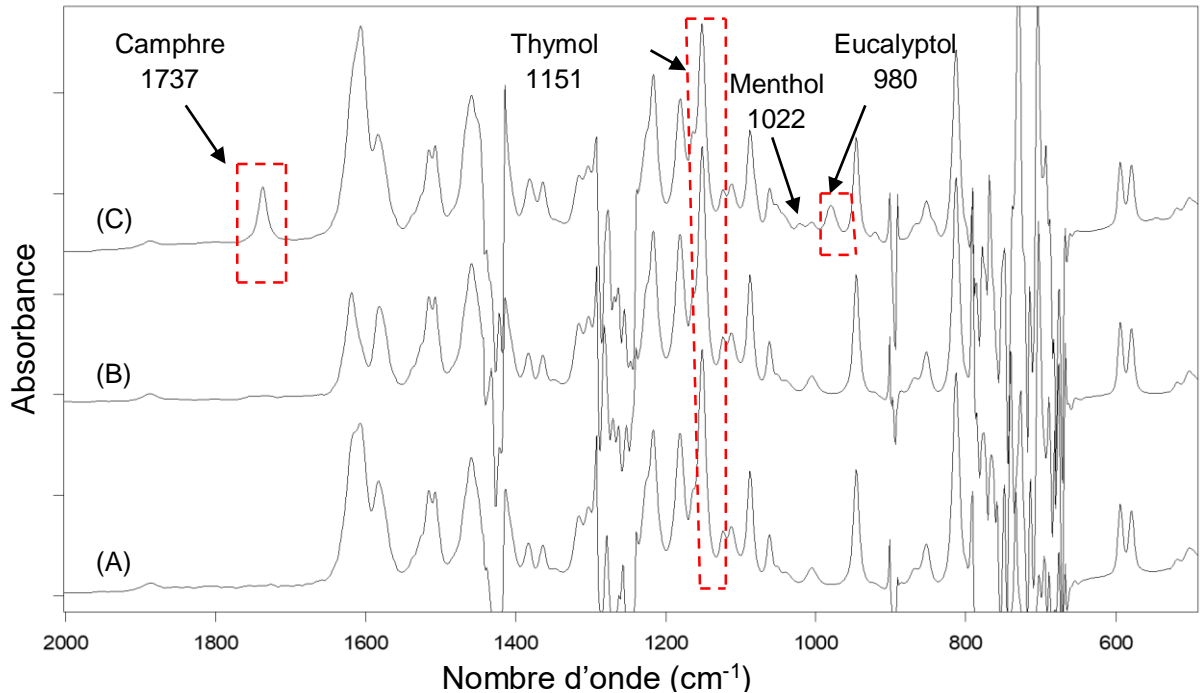


Figure 2.6 : Spectres IRTF de trois formulations différentes de terpènes anti Varroa dissous dans du dichlorométhane. Les spectres ont été obtenus en accumulant 25 scans et une résolution de 4 cm^{-1} .

Note: concentration de thymol est de 5 mg mL^{-1} pour les formulations (A) et (B), et de 5; 1,08; 0,24 et 0,24 mg mL^{-1} pour thymol, eucalyptol, camphre et menthol, respectivement, dans la troisième formulation (C).

2.3.4 Traitement des données par équations proportionnelles pour la calibration univariée

La régression univariée pour la détermination simultanée des monoterpènes a été testée en utilisant des droites de calibration individuelles de ces composés, mais elle a fourni d'énormes erreurs dans l'analyse de formulations commerciales utilisées dans cette étude. Nous avons donc testé l'utilisation d'un système d'équations proportionnelles pour le traitement des données afin de surmonter les difficultés liées au chevauchement des bandes. Dans ce cas, des solutions monoterpéniques, à différents niveaux de concentration, ont été utilisées pour obtenir des droites d'étalonnage pour chacune d'elles et, à partir de leur pente, il a été déterminé une série de 16 coefficients proportionnels pouvant être utilisés pour évaluer la concentration des quatre terpènes considérés dans les différents mélanges. La méthode repose donc sur la résolution d'un système d'équation à

quatre données inconnues et quatre données expérimentales correspondant à la mesure d'échantillons aux quatre longueurs d'ondes sélectionnées.

Différents modes de mesure ont été étudiés, y compris la surface et la hauteur du pic, avec différentes corrections de la ligne de base, afin d'obtenir les meilleures droites de calibration. A partir de la pente des droites d'étalonnage obtenues par régression quadratique moyenne simple, les coefficients d'absorption du camphre, du thymol, du menthol et de l'eucalyptol à 1737 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} et 980 cm^{-1} (en utilisant une correction de ligne de base à 1933 cm^{-1} dans tous les cas), ont été calculés et utilisés pour construire le système d'équations (les données sont présentées dans le tableau 2.1). La figure 2.7 montre également le modèle mathématique construit pour la détermination simultanée des quatre composés ciblés. Les concentrations des échantillons synthétiques et réels ont été calculées à partir de leurs spectres IR et en utilisant le système d'équations sélectionné.

A travers les expressions de la figure 2.7, on peut voir que les mesures d'absorbance à 1737 cm^{-1} sont faiblement affectées par le thymol, le menthol et l'eucalyptol. La même chose est observée à 1151 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} et 980 cm^{-1} pour le thymol, le menthol et l'eucalyptol, respectivement, en présence des autres terpènes considérés. Cependant, il est clair que la stratégie employée est appropriée pour minimiser les erreurs dans la détermination univariée de terpènes dans des mélanges contenant de grandes quantités de certains analytes ciblés.

Tableau 2.1 : Droites de calibration obtenues pour la détermination des composés par IRTF en utilisant l'analyse univariée selon des critères sélectionnés.

Critère de mesure ^a	Camphre		Thymol		Menthol		Eucalyptol	
	Droite de Calibration $A = a C + b^b$	R	Droite de Calibration $A = a C + b^b$	R	Droite de Calibration $A = a C + b^b$	R	Droite de Calibration $A = a C + b^b$	R
H. P 1737 cm ⁻¹	A=0,46301 C+0,04724	0,9993	A=0,00104 C+0,00037	0,9943	A=0,00066 C+0,00009	0,9775	A=0,00084 C+0,00048	0,9569
H. P 1151 cm ⁻¹	A=0,00218 C-0,00157	0,9941	A=0,09106 C+0,00612	0,9994	A=0,00363 C+0,00310	0,9583	A=0,00662 C+0,00099	0,9977
H. P 1022 cm ⁻¹	A=0,02427 C+0,00097	0,9997	A=0,00365 C+0,00003	0,9982	A=0,08691 C+0,00876	0,9984	A=0,00830 C+0,00029	0,9987
H. P 980 cm ⁻¹	A=0,00037 C+0,00003	0,9876	A=0,00260 C+0,00006	0,9986	A=0,01772 C+0,00192	0,9983	A=0,12684 C+0,00674	0,9998

Note : (a): Correction de la ligne de base à 1933 cm⁻¹; (b): A/ Absorbance, C/ la concentration de monoterpène en mg mL⁻¹.

H. P : Hauteur de pic.

$$\begin{cases} A_{1737} = \varepsilon_C C_C + \varepsilon_T C_T + \varepsilon_M C_M + \varepsilon_E C_E \\ A_{1151} = \varepsilon_C C_C + \varepsilon_T C_T + \varepsilon_M C_M + \varepsilon_E C_E \\ A_{1022} = \varepsilon_C C_C + \varepsilon_T C_T + \varepsilon_M C_M + \varepsilon_E C_E \\ A_{980} = \varepsilon_C C_C + \varepsilon_T C_T + \varepsilon_M C_M + \varepsilon_E C_E \end{cases} \longrightarrow \begin{cases} A_{1737} = \underline{0,46301} C_C + 0,00104 C_T + 0,00066 C_M + 0,00084 C_E \\ A_{1151} = 0,00218 C_C + \underline{0,09106} C_T + 0,00363 C_M + 0,00662 C_E \\ A_{1022} = 0,02427 C_C + 0,00365 C_T + \underline{0,08691} C_M + 0,00830 C_E \\ A_{980} = 0,00037 C_C + 0,00260 C_T + 0,01772 C_M + \underline{0,12680} C_E \end{cases}$$

Figure 2.7: Système d'équations proportionnelles utilisé pour l'analyse d'échantillons de formulations terpéniques anti-Varroa en mode univarié.

Note: A: absorbance; C_C, C_T, C_M, C_E: concentration du camphre, thymol, menthol et eucalyptol en mg mL⁻¹.

ε_C, ε_T, ε_M, ε_E: coefficient absorption du camphre, thymol, menthol et eucalyptol.

2.3.5 Analyse de mélanges synthétiques et de formulations commerciales de camphre, thymol, menthol et eucalyptol en utilisant la calibration univariée

Le tableau 2.2 résume les résultats obtenus en utilisant une calibration univariée par équations proportionnelles pour l'analyse de quatre mélanges synthétiques de camphre, thymol, menthol et d'eucalyptol préparés dans du dichlorométhane, afin de tester l'applicabilité de la procédure développée. L'exactitude introduite de la méthode a été évaluée par l'erreur relative entre la quantité théorique et la quantité trouvée de chaque terpène considéré. Comme on peut le constater, la différence relative varie entre -8,4% et 25% pour le camphre, -7,7% et 2,6% pour le thymol, -20% et 3,6% pour le menthol et entre -7,7% et 1,9% pour l'eucalyptol.

Les échantillons de formulation commerciale ont été préparés comme indiqué dans la partie expérimentale pour la détermination des quatre monoterpènes et, pour évaluer la précision de la procédure, les échantillons ont été enrichis à la concentration connue en analytes et analysés à l'aide du modèle mathématique proposé et les valeurs de récupération ont été déterminées. Les résultats obtenus, indiqués dans le tableau 2.3, montrent l'exactitude de la détermination du camphre, du thymol, du menthol et de l'eucalyptol dans des échantillons commerciaux et d'autres qui sont enrichis, avec des valeurs d'erreur relative comprises entre -13% et 15% pour le thymol et entre -11% et 8,7% pour l'eucalyptol. Des valeurs d'erreur relative élevées ont été obtenues pour le menthol et le camphre, respectivement entre -36% et 42% et entre 8,0% et 43%. À l'exception de l'échantillon C2 pour lequel les erreurs étaient de 53% et 94% pour le menthol et le camphre respectivement. Cette variation est due à la faible concentration de ces deux monoterpènes dans les formulations commerciales.

Tableau 2.2 : Analyse de mélanges synthétiques de camphre, thymol, menthol et eucalyptol par IRTF en utilisant la calibration univariée basée sur le modèle mathématique de système d'équations proportionnelles.

Mélange	Composé / Monoterpène											
	Camphre			Thymol			Menthol			Eucalyptol		
	Théorique ^a (mg mL ⁻¹)	Trouvée ^b (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)	Théorique (mg mL ⁻¹)	Trouvée (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)	Théorique (mg mL ⁻¹)	Trouvée (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)	Théorique (mg mL ⁻¹)	Trouvée (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)
01	0,250	0,263	5,1	5,000	4,900	-2,0	0,251	0,235	-6,5	1,002	0,924	-7,7
02	-	-	-	3,000	3,080	2,6	-	-	-	-	-	-
03	0,114	0,142	25	2,280	2,320	1,7	0,114	0,118	3,6	0,492	0,470	-4,5
04	0,095	0,087	-8,4	1,900	1,750	-7,7	0,095	0,076	-20	0,410	0,418	1,9

Note: (a) Considérant la valeur présente dans la formulation et, (b) Valeur calculée expérimentalement.

Erreur (%)= [(valeur trouvée - valeur ajoutée)/ valeur ajoutée]*100.

Tableau 2.3 : Analyse de camphre, thymol, menthol et eucalyptol par IRTF dans des formulations en utilisant la calibration univariée basée sur le modèle mathématique de système d'équations proportionnelles.

Formulations Commerciales	Echantillon	Composés											
		Camphre			Thymol			Menthol			Eucalyptol		
		Théorique ^a (mg mL ⁻¹)	Trouvée ^b (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)	Théorique (mg mL ⁻¹)	Trouvée (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)	Théorique (mg mL ⁻¹)	Trouvée (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)	Théorique (mg mL ⁻¹)	Trouvée (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)
Echantillon A	A1	-	-	-	2,000	1,979	-1,1	-	-	-	-	-	-
	01 enrichi	0,100	0,122	22	3,750	3,937	5,0	0,150	0,096	-36	0,600	0,544	-9,3
	A2	-	-	-	0,500	0,433	-13	-	-	-	-	-	-
	02 enrichi	0,080	0,114	43	0,700	0,686	-2,0	0,200	0,168	-16	0,900	0,929	3,2
	02 enrichi	0,200	0,247	24	1,500	1,523	1,5	0,180	0,155	-14	0,700	0,732	4,6
Echantillon B	B1	-	-	-	2,000	1,924	-3,8	-	-	-	-	-	-
	03 enrichi	0,150	0,162	8,0	3,500	3,580	2,3	0,100	0,081	-19	0,400	0,384	-4,0
	B2	-	-	-	3,000	3,322	11	-	-	-	-	-	-
	04 enrichi	0,170	0,196	15	4,500	5,123	14	0,080	0,064	-20	0,150	0,161	7,3
	04 enrichi	0,070	0,091	30	4,000	4,510	13	0,130	0,120	-7,7	0,550	0,598	8,7
Echantillon C	C1	0,114	0,162	42	2,280	2,287	0,3	0,114	0,162	42	0,492	0,436	-11
	05 enrichi	0,214	0,268	25	3,530	3,595	1,8	0,264	0,313	19	0,792	0,747	-5,7
	C2	0,049	0,095	94	1,000	1,033	3,3	0,049	0,075	53	0,215	0,195	-9,3
	06 enrichi	0,129	0,151	17	1,750	2,005	15	0,230	0,258	12	0,315	0,303	-3,8
	06 enrichi	0,225	0,300	33	2,740	2,875	4,9	0,160	0,193	21	0,835	0,856	-2,5

Note: (a) Valeur présente dans la formulation et valeur ajoutée suite à l'enrichissement, (b) Valeur calculée expérimentalement.

2.3.6 Traitement des données par la régression des moindres carrés partiels (PLS)

Des modèles de (PLS) ont été construits pour la détermination du monoterpène. Cependant, l'absence d'un grand nombre de formulations différentes évite la possibilité de construire les modèles d'étalonnage à partir d'échantillons commerciaux du même type que ceux à analyser. Il a donc été nécessaire de procéder à la calibration basé sur un modèle de 4^2 de mélanges synthétiques des quatre composés à deux niveaux de concentration, comme il a été expliqué dans la section expérimentale. Différentes stratégies spectrales de prétraitement (correction d'offset, la soustraction d'une droite, normalisation vectorielle (SNV), normalisation Min-Max, correction multiplicative de diffusion, dérivée première et seconde, et leur combinaison) et différentes régions spectrales, en prenant en compte les bandes caractéristiques des monoterpènes individuels étudiés, ont été envisagées afin de créer des modèles multivariés suffisamment fiables (Annexe1, Appendice B).

Fréquemment, la validation croisée a été utilisée pour optimiser et sélectionner le modèle PLS présentant les meilleures capacités prédictives [104]. Cependant, dans cette étude, l'erreur quadratique moyenne de prédiction (RMSEP) pour un ensemble séparé d'échantillons, non utilisé pour la calibration, a été utilisée, comme paramètre principal pour sélectionner les meilleurs modèles pour chaque composé (voir tableau 2.4). Le nombre de facteurs de chaque modèle a également été choisi selon les valeurs minimales de RMSEP.

Comme le montre le tableau 2.4, les valeurs minimales de RMSEP ont été trouvées pour les modèles de camphre et de thymol en considérant 3 facteurs. Pour le menthol et l'eucalyptol, 5 et 6 facteurs ont été sélectionnés respectivement pour la construction de modèles. L'utilisation d'un nombre élevé de facteurs n'entraîne pas d'amélioration significative de la capacité de prévision du modèle et pourrait facilement conduire à un surajustement. Les valeurs des coefficients de corrélation pour la calibration (R^2 Cal) et la validation croisée (R^2 CV) indiquent l'adéquation des modèles de calibration construits, l'erreur quadratique moyenne de la calibration (RMSEC) et de la validation croisée (RMSECV) peuvent être utilisées

pour évaluer et confirmer les performances de la calibration des modèles PLS optimisés.

Tableau 2.4 : Résumé des paramètres optimums des modèles PLS optimisés pour la détermination de monoterpènes dans des formulations anti-varroa par IRTF.

Composé	Camphre	Thymol	Menthol	Eucalyptol
Regions spectrales (cm ⁻¹)	1793,8-1685,8 883,4-804,3	1228,7-912,3 653,9-470,6	1793,8-1685,8 1228,7-912,3 653,9-470,6	1793,8-1685,8 1228,7-912,3 883,4-804,3
Prétraitement	correction d'offset centrage moyen	soustraction d'une droite centrage moyen	soustraction d'une droite centrage moyen	correction d'offset centrage moyen
Facteurs	3	3	5	6
RMSEC (mg mL ⁻¹)	0,011	0,034	0,014	0,018
RMSECV (mg mL ⁻¹)	0,014	0,039	0,020	0,026
RMSEP (mg mL ⁻¹)	0,013	0,320	0,023	0,030
R ² Cal	0,9904	0,9998	0,9858	0,9986
R ² CV	0,9836	0,9997	0,9689	0,9966
R ² Pred	0,9726	0,9306	0,9278	0,9912

Note: Coefficient de corrélation de la calibration (R² Cal), de la validation croisée (R² CV) et de la prédiction (R² Pred). Erreur quadratique moyenne de la calibration (RMSEC), de la validation croisée (RMSECV) et de la prédiction (RMSEP).

2.3.7 Exactitude et précision de la calibration PLS

Pour évaluer la performance des modèles PLS et valider l'exactitude de la méthode, une série d'échantillons disponibles dans le commerce et d'autre enrichis avec du camphre, du thymol, du menthol et de l'eucalyptol, à différents niveaux de concentration a été utilisé pour calculer le RMSEP. A partir des spectres IRTF des différents échantillons, les concentrations des terpènes ont été prédites par la méthode PLS développée. Les résultats obtenus pour ces composés ont été utilisés pour calculer le niveau de récupération de chacun d'eux, en tant qu'indicateur de l'exactitude de la méthode proposée.

L'évaluation du pourcentage de récupération de la méthode a également été considérée comme un second critère pour choisir le meilleur modèle (Annexe 2, appendice B). Les niveaux de récupération moyens des quatre monoterpènes pour le modèle optimisé, se situaient entre 91% et 99% pour le camphre, 105,5% et 116,9% pour le thymol, 95% et 108,2% pour le menthol et entre 100,1% et 107,1% pour l'eucalyptol (tableau 2.5).

Comme le montre le tableau 2.6, l'exactitude obtenue en comparant les valeurs prédites avec celles déclarées par le producteur aussi bien pour l'analyse des formulations que pour celles enrichis avec des monoterpènes, a entraîné des erreurs beaucoup moins importantes lors de la calibration multivariée que celles obtenues lors de la calibration univariée, notamment pour le camphre et le menthol. Des valeurs de 7,8%, 7,2%, 10%, 4,1% correspondent aux niveaux de précision moyens des déterminations indépendantes du camphre, du thymol, du menthol et de l'eucalyptol, respectivement

Tableau 2.5 : Exactitude et précision du modèle, PLS-IRTF, pour la détermination des monoterpènes (camphre, thymol, menthol et eucalyptol) dans des formulations anti-varroa.

Formulations commerciales	Composé/ Traitement spectral			
	Camphre Correction d'offset	Thymol Soustraction d'une droite	Menthol Soustraction d'une droite	Eucalyptol Correction d'offset
A	(95 ± 10)%	(116,7 ± 4,3)%	(95 ± 11)%	(100,1 ± 5,1)%
B	(99 ± 10)%	(105,9 ± 5,0)%	(102,0 ± 5,2)%	(100,3 ± 2,3)%
C	(91 ± 4,6)%	(105,5 ± 1,0)%	(108,2 ± 6,7)%	(107,1 ± 7,9)%

Note: concentration de thymol est de 5 mg mL⁻¹ pour les formulations (A) et (B), et de 5; 1,08; 0,24 et 0,24 mg mL⁻¹ pour thymol, eucalyptol, camphre et menthol dans la troisième formulation (C).

R% = [(valeur trouvée-valeur présente)/valeur ajoutée]*100.

R_{Moy} % = (R% ± ε) pour trois mesures indépendantes.

Tableau 2.6 : Analyse de camphre, thymol, menthol et eucalyptol par IRTF en utilisant la calibration PLS.

Formulations Commerciales	Echantillon	Composés											
		Camphre			Thymol			Menthol			Eucalyptol		
		Théorique ^a (mg mL ⁻¹)	Trouvée ^b (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)	Théorique (mg mL ⁻¹)	Trouvée (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)	Théorique (mg mL ⁻¹)	Trouvée (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)	Théorique (mg mL ⁻¹)	Trouvée (mg mL ⁻¹)	Erreur (%)
Échantillon A	A1	-	-	-	2,000	2,142	7,1	-	-	-	-	-	-
	01 enrichi	0,100	0,088	-12	3,750	4,090	9,1	0,150	0,161	7,3	0,600	0,586	2,3
	A2	-	-	-	0,500	0,515	3,0	-	-	-	-	-	-
	02 enrichi	0,080	0,089	11	0,700	0,716	2,3	0,200	0,192	4,0	0,900	0,903	0,3
	02 enrichi	0,200	0,192	4,0	1,500	1,585	5,7	0,180	0,183	1,7	0,700	0,721	3,0
Échantillon B	B1	-	-	-	2,000	2,016	0,8	-	--	-	-	-	-
	03 enrichi	0,150	0,127	15	3,500	3,686	5,3	0,100	0,096	4,0	0,400	0,418	4,5
	B2	-	-	-	3,000	3,456	15	-	-	-	-	-	-
	04 enrichi	0,170	0,156	8,2	4,500	5,271	17	0,080	0,084	5,0	0,150	0,152	1,3
	04 enrichi	0,070	0,075	7,1	4,000	4,639	16	0,130	0,108	17	0,550	0,522	5,1
Échantillon C	C1	0,114	0,125	9,6	2,280	2,292	0,5	0,114	0,139	22	0,492	0,450	8,5
	05 enrichi	0,214	0,212	0,9	3,530	3,600	2,0	0,264	0,309	17	0,792	0,793	0,1
	C2	0,049	0,075	53	1,000	1,060	6,0	0,049	0,034	31	0,215	0,207	3,7
	06 enrichi	0,129	0,115	11	1,750	2,039	17	0,230	0,221	3,9	0,315	0,304	3,5
	06 enrichi	0,225	0,242	7,6	2,740	2,910	6,2	0,160	0,188	1	0,835	0,889	6,5

Note : (a) Valeur présente dans la formulation et valeur ajoutée suite à l'enrichissement, (b) Valeur calculée expérimentalement.
 Erreur (%)= [(valeur trouvée - valeur ajoutée)/ valeur ajoutée]*100.

2.3.8 Evaluation de la durabilité de la méthode

Le tableau 2.7 montre que l'utilisation de PLS-IRTF pour la détermination des monoterpènes dans les formulations commerciales anti-varroa implique l'utilisation d'une quantité totale de 215 mL de CH₂Cl₂ pour la dilution de l'échantillon et la préparation des étalons de calibration, y compris les solutions mères de terpènes, ce qui implique des points de pénalité de 3,2 et 13 dus à la consommation de réactifs et à la génération de déchets selon la correction proposée pour l'évaluation de l'échelle écologique afin de classer une méthode dans le certificat vert (voir la figure 2.8).

On peut donc en conclure que la méthode proposée, avec 83,8 points, est une alternative durable à l'utilisation des approches chromatographiques. De plus, la quantité de CH₂Cl₂ peut être réduite et par conséquent la durabilité de la méthode pourra s'améliorer grâce à l'utilisation du recyclage en ligne du solvant [105].

Tableau 2.7 : Calcul des points de pénalité relatifs à la méthode, PLS-IRTF, développée.

		volume (mL)	Coefficient du danger	Points de pénalité	P.P × Coef. de danger
Réactifs	Ch ₂ Cl ₂	215	1	3,2	3,2
Instruments	Balance		0	0	0
	ultrason		/		
	IRTF		0	0	0
Emissions		0		0	
Déchets		215		13	13
				Points de pénalité totale	16,2
				%	83,8

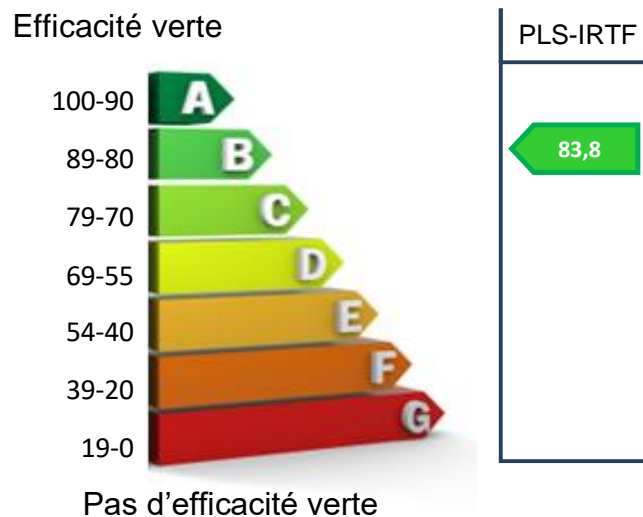


Figure 2.8 : Certificat vert de la méthode développée pour la détermination des terpènes dans des formulations de traitement de varroase par PLS-IRTF.

2.4 Conclusion

Cette étude a mis en évidence le potentiel de la spectroscopie MIR de transmittance pour une détermination directe rapide et simple des monoterpènes dans les formulations commerciales utilisées pour le traitement de la varroase sans qu'il soit nécessaire d'utiliser une séparation préalable. Les résultats obtenus ont montré que la méthode PLS-IRTF développée, utilisant un modèle expérimental simple de 4² mélanges d'étalons terpéniques pour l'étalonnage, offre une précision et une exactitude supérieure à celle de la calibration univariée. De plus, la procédure PLS-IRTF nécessite moins de temps pour obtenir les résultats que la méthode univariée basée sur l'utilisation d'équations proportionnelles et le logiciel disponible simplifie les calculs.

D'autre part, l'utilisation d'une cellule à flux IR réduit la manipulation de l'échantillon pour les mesures et nécessite un faible volume de solution pour enregistrer les spectres IR, avec un bon contrôle des déchets générés. L'approche proposée par PLS-IRTF peut donc être considérée comme une méthodologie adéquate et alternative durable pour le contrôle de la qualité lors de la production d'une formulation commerciale à base de terpène pour le traitement contre le varroa.

CHAPITRE 3

IDENTIFICATION DE L'ADULTERATION DES HUILES ESSENTIELLES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER

3.1 Introduction

Les plantes, en particulier les plantes aromatiques, sont connues pour leurs avantages potentiels pour la santé humaine en raison de leurs différentes propriétés biologiques et organoleptiques [3, 106]. Les huiles essentielles sont des produits naturels obtenus à partir de différentes plantes aromatiques contenant métabolites secondaires issus de leurs bourgeons, fleurs, feuilles, tiges, graines, fruits, racines, bois ou écorce et sont stockés dans des cellules de sécrétion [9, 107].

Les huiles essentielles sont extraites par plusieurs méthodes, notamment l'expression, l'enfleurage, l'extraction par solvant, l'extraction au dioxyde de carbone supercritique, l'extraction assistée par micro-ondes ou par ultrasons [7], l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur. Ces deux dernières étant les procédés de distillation les plus fréquemment utilisés. L'analyse de la composition de l'huile essentielle est principalement réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CG) [9].

Les huiles essentielles sont largement utilisés comme agents aromatisants dans les produits alimentaires, les parfumeries, les produits pharmaceutiques et cosmétiques et pour leurs activités biocides comme bactéricides, virucides et fongicides dans le domaine médical [7, 108].

L'intérêt des huiles essentielles et leurs composés augmente en raison de la forte demande des consommateurs [109]. Le marché des huiles essentielles, en

tant que produits naturels, se développe rapidement et génère plusieurs milliards de dollars chaque année. Cependant, le prix des produits naturels étant souvent beaucoup plus élevé que celui des matériaux synthétique a malheureusement entraîné une falsification par des profits malhonnêtes [25, 109].

Plusieurs facteurs peuvent provoquer une adultération des huiles essentielles, par l'ajout de composés synthétiques liés à la composition de l'huile, en ajoutant des fractions provenant d'autres huiles essentielles moins chères [110, 111] ou en ajoutant des diluants sous forme d'huiles végétales, minérales ou d'alcool [112].

Les méthodes d'adultérations peuvent dégrader la qualité de l'huile et avoir des effets délétères sur sa consommation. Par conséquent, l'authentification, qui est définie pour les produits naturels comme étant exemptes d'adultération au sens de l'absence de corps étrangers ou matières étrangères, constitue un sujet important pour la protection des consommateurs, y compris pour le contrôle de qualité de leur production et est essentielle pour éviter une concurrence déloyale susceptible de déstabiliser le marché et perturber les économies des pays producteurs [25, 113].

Différentes méthodes sont utilisées pour détecter l'adultération dans les huiles essentielles. Certaines d'entre elles sont recommandées par les pharmacopées et les réglementations telles que l'examen organoleptique et les analyses physico-chimiques [108, 112]. D'autres sont basées sur l'utilisation de techniques chromatographiques instrumentales puissantes. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) a été utilisée pour évaluer la qualité des huiles essentielles de bois de santal en évaluant la teneur en santadol comme marqueur pour détecter et identifier les adultérants [114].

La chromatographie en phase gazeuse-combustion-spectrométrie de masse à rapport isotopique (CG-C-SMRI) a été utilisée pour évaluer les

adultérations des huiles essentielles de citron par addition de composés synthétiques ou naturels d'origine botanique différente [111]. La chromatographie capillaire en phase gazeuse et la spectrométrie de masse à rapport isotopique couplée à la chromatographie capillaire en phase gazeuse (CG-SMRI) a été utilisée pour l'analyse spécifique à l'origine et le contrôle de l'authenticité des huiles essentielles comme celle de la mélisse [110]. D'autre part, il a été démontré que les composés non volatils, identifiés dans les huiles essentielles d'agrumes (orange, citron, mandarine), testés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) offrent une efficacité accrue en tant que marqueurs de détection d'adultération [115]. Cependant, toutes les techniques susmentionnées sont longues et coûteuses pour identifier la falsification des huiles essentielles [25].

La spectroscopie vibrationnelle qui est considérée comme une technique rapide et non destructive, a été utilisée comme méthode de criblage pour la caractérisation d'échantillons complexes [8, 116-118]. Cependant, la recherche bibliographique que nous avons réalisée a révélé que peu d'études ont exploité la spectroscopie infrarouge dans le domaine, proche ou moyen (NIR, MIR), comme technique principale pour la détection de l'adultération des huiles essentielles. Nous citons par exemple, l'utilisation de la spectroscopie MIR et NIR, en tant que méthodes analytiques rapides, offrant des alternatives aux méthodes de chromatographie en phase gazeuse, pour le contrôle de qualité des huiles essentielles de géranium [119] et de santal [120] et pour l'évaluation de l'huile essentielle d'eucalyptus [121].

Pour les raisons susmentionnées, la présente étude propose la spectroscopie NIR et MIR comme méthodes principales et approches simples pouvant être employées par de jeunes laboratoires de contrôle pour la détection de l'adultération des huiles essentielles. Les deux techniques ont été comparées pour montrer leur potentiel en tant que méthodologies directes dans la détection de l'adultération d'huiles essentielles pour un grand nombre d'échantillons disponibles sur le marché.

3.2 Partie expérimentale

3.2.1 Matériel

Les différentes espèces végétales sélectionnées dans cette étude sont représentatives des espèces les plus utilisées par les consommateurs et les plus disponibles sur les marchés algériens et espagnols. Elles ont été identifiées par Dr Metai du département des sciences agronomiques, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Blida 1.

Trente-deux (32) espèces végétales, de douze différentes familles (Anacardiaceae, Apiaceae, Astraceae, Géraniacées, Cupressacées, Lamiacées, Lauracées, Mytracées, Pinacées, Pipéracées, Rutacées et Zingibéracées), indiquées dans l'appendice C. *Pimpinella anisum* L. (Anis, P.a.1), *Apium graveolens* L. (Céleri, A.g.1), *Foeniculum vulgare* Mill. (Fenouil, F.v.1), *Carum carvi* L. (Carvi, C.c.1), *Cuminum cyminum* L. (Cumin, C.cy.1), *Cinnamomum cassia* (Cannelle, C.ca.1), *Petroselinum crispum* (Persil, P.c.1), *Artemisia herba-alba* (Armoise blanche, A.h.1), *Thymus vulgaris* (Thym, T.v.1), *Melissa officinalis* (Melisse, M.o.1), *Ruta montana* L. (Rue, R.m.1), *Syzygium aromaticum* L. (Clous de girofle, S.a.1), *Piper nigrum* L. (Poivre noir, P.n.1) et *Curcuma longa* L. (Curcuma, C.lo.1), *Zingiber officinale* (Gingembre, Z.o.1) ont été achetées sur le marché local (Blida, Algérie). Les autres espèces végétales sont *Matricaria chamomilla* L. (Camomille, M.ch.1), *Laurus nobilis* L. (Laurel, L.n.1), *Pelargonium graveolens* (Géranium, P.g.1), *Cupressus sempervirens* (Cyprés, C.s.1), *Juniperus communis* L. (Genévrier, J.c.1), *Lavandula angustifolia* Mill. (Lavande, L.a.1), *Mentha piperita* (Menthe de poivrée, M.p.1), *Mentha spicata* L. (Menthe verte, M.s.1), *Romarinus officinalis* (Romarin, R.o.1), *Salvia officinalis* (Sauge, S.o.1), *Eucalyptus globulus* (Eucalyptus, E.g.1), *Myrtus communis* L. (Myrte, M.c.1), *Pinus halepensis* (Pin d'alep, P.h.1), *Pistacia lentiscus* L. (Lentisque, P.l.1), *Citrus limon* L. (Citron, C.l.1), *Citrus reticulata* (Mandarine, C.r.1) et *Citrus sinensis* (Orange, C.si.1), ont été Récoltées à la main de différents endroits de l'Algérie, triées pour enlever les épiphytes, séchées à l'ombre et stockées à l'abri de la lumière.

(70) échantillons d'huiles essentielles commerciales, des échantillons des trente-deux (32) espèces végétales étudiées ont été achetées sur les marchés locaux de (Blida, Algérie) et de (Valence, Espagne).

L'huile végétale (huile de tournesol) a été achetée sur un marché local de (Valence, Espagne) alors que l'huile de vaseline a été obtenue auprès de PanReac (Barcelone, Espagne).

3.2.2 Appareillage et méthodes

3.2.2.1 Extraction des huiles essentielles

Deux différentes méthodes d'extraction ont été utilisées dans ce travail pour obtenir les huiles essentielles pures. Le choix de la méthode d'extraction la plus appropriée est lié notamment à la nature thermosensible, à la difficulté d'obtention de certaines espèces aromatiques et au faible rendement de quelques autres.

- Extraction par hydrodistillation

Les huiles essentielles des espèces, *P. anisum* L., *A. graveolens* L., *F. vulgare* Mill., *C. carvi* L., *C. cyminum* L., *P. nigrum* L., *C. longa* L., *P. crispum*, *A. herba-alba*, *T. vulgaris*, *R. montana* L., *L. nobilis* L., *M. spicata* L., *M. officinalis*, *M. chamomilla* L., *Z. officinale*, ont été extraites par hydrodistillation pendant 3 heures en utilisant Clevenger comme système de recyclage de la phase aqueuse. Le procédé consiste à immerger la matière végétale dans un ballon de 2 litres remplie d'eau jusqu'au deux tiers de son volume. Les vapeurs chargées des composés volatiles passent au réfrigérant, où aura lieu la condensation, à travers le tube verticale de Clevenger. Les gouttelettes produites s'accumulent dans le tube rempli au préalable d'eau et surnage sur la surface. En raison de la différence de densité des deux espèces *S. aromaticum* L. and *C. cassia*, ces deux dernière ont été soumises à une hydrodistillation classique où l'huile essentielle entraînée par la vapeur se condense directement dans le réfrigérant ensuite le distillat est récupéré dans une ampoule à décanter La quantité d'huile essentielle récoltée est conservée dans l'obscurité à 4°C jusqu'à l'analyse.

- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Les échantillons des huiles essentielles des espèces, *P. graveolens* L., *E. globulus*, *C. sempervivens*, *J. communis* L., *L. angustifolia* Mill., *M. piperita*, *R. officinalis*, *S. officinalis*, *C. limon* L., *C. sinensis* L., *C. reticulata* L., *M. communis* L., *P. halepensis* et *P. lentiscus* L., ont été obtenus par un système d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau industriel de la société des huiles essentielle «Extral Bio» (Blida, Algérie). La méthode est basée sur le passage de la vapeur d'eau à travers la matière végétale placée sur une grille perforée provoquant l'entraînement des composés volatiles. Ces derniers sont condensés dans le réfrigérant et le distillat est récupéré dans un vase de décantation. La quantité d'huile essentielle récoltée est conservée dans l'obscurité à 4°C jusqu'à l'analyse.

3.2.2.2 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

3.2.2.2.1 Proche infrarouge (NIR-TF)

Un spectrophotomètre proche infrarouge à transformée de Fourier (NIR-TF) modèle Analyseur multi-usages (MPA) de marque Bruker (Brême, Allemagne) a été utilisé pour enregistrer les spectres de NIR-TF dans l'intervalle de nombre d'ondes 14000-3500 cm^{-1} . Cet instrument est équipé d'une source NIR, d'un séparateur de faisceau en quartz et d'un détecteur PbS. Le logiciel OPUS (version 6.5) de Bruker a été utilisé pour le contrôle des mesures et le traitement des spectres.

Le travail a été réalisé en transférant directement les échantillons d'huile dans des flacons cylindriques en verre de 1 mL et un diamètre interne de 6 mm. Les spectres ont été obtenus en mode absorption en accumulant 50 scans par spectre, avec une résolution de 4 cm^{-1} . Le spectre du background a été acquis, dans les mêmes conditions instrumentales, à partir d'un spectre d'un flacon en verre vide.



Figure 3.1 : Spectrophotomètre NIR-TF.

3.2.2.2.2 Moyen infrarouge (MIR-TF)

Pour les mesures dans le domaine spectral moyen infrarouge, un spectrophotomètre moyen infrarouge à transformée de Fourier (MIR-TF), modèle Tensor 27 de marque Bruker (Brême, Allemagne), équipé d'un détecteur DLaTGS (Deuterated lanthanum α -alanine-doped triglycine sulphate) a été utilisé. L'analyse a été réalisée en mode de réflexion totale atténuée (ATR) en utilisant un accessoire DuraSampleIR avec une plaque diamantée à neuf reflets/ZnSe DuraDisc de Smiths Detection Inc (Warrington, Royaume-Uni). Les spectres ATR-MIR-TF ont été enregistrés dans la gamme spectrale entre 4000 et 550 cm^{-1} en accumulant 50 scans par spectre, avec une résolution de 4 cm^{-1} . Pour le contrôle des mesures et l'acquisition des données, le logiciel OPUS (version 6.5) de Bruker a été considéré.

Le travail a été réalisé en plaçant dix microlitres (10 μL) de chaque échantillon d'huile directement sur la cellule cristalline (ATR) recouverte d'une couverture en verre pour éviter l'évaporation de l'échantillon. Le spectre du background a été acquis, dans les mêmes conditions instrumentales, à partir du cristal ATR qui est nettoyé immédiatement avant l'acquisition du spectre de chaque échantillon.

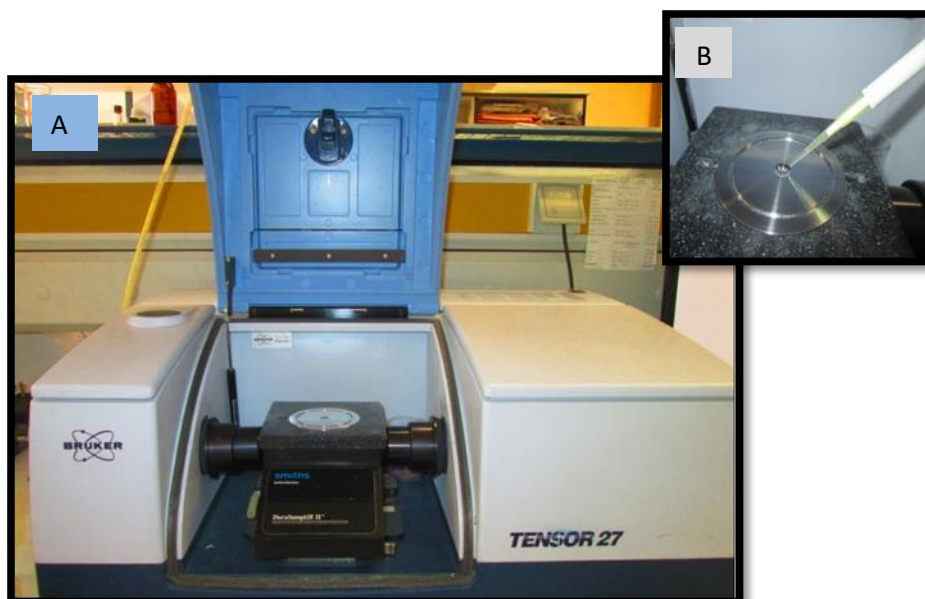


Figure 3.2 : (A) Spectrophotomètre MIR-TF, (B) module ATR.

3.3 Résultats et discussion

3.3.1 Spectres NIR-TF des huiles essentielles pures

Les spectres de transmission NIR-TF des huiles essentielles pures obtenues par hydrodistillation et entraînement à la vapeur sont représentés sur les figures (3.3, 3.4). Comme on peut le voir, les spectres des huiles essentielles analysées sont dominés par des harmoniques et différentes combinaisons de C–H.

L'absorbance de certaines de ces bandes est associée aux deuxièmes harmoniques des vibrations d'élongation de C–H dans les composés aromatiques et le groupement $-\text{CH}_3$ autour de 8770 et 8409 cm^{-1} , respectivement. Quelques huiles telles que l'huile de *T. vulgaris* (Thym) et de *P. crispum* (Persil) présentent une bande à 7057 cm^{-1} qui correspond à la combinaison de C–H d'un composé aromatique.

L'huile de clous de girofle présente également une bande intense à 6911 cm^{-1} relative aux bandes de combinaison de C–H d'un composé aromatique tandis que dans la région spectrale entre 6200 et 6063 cm^{-1} , la majorité des spectres des huiles essentielles telles que huiles de *F. vulgare* Mill. (Fenouil), *C.*

sinensis (Orange), *S. officinalis* (Sauge), *M. spicata* L. (Menthe verte), *carvi* L. (Carvi), *Z. officinale* (Gingembre) présentent des bandes correspondant au premier harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans le groupement =CH₂.

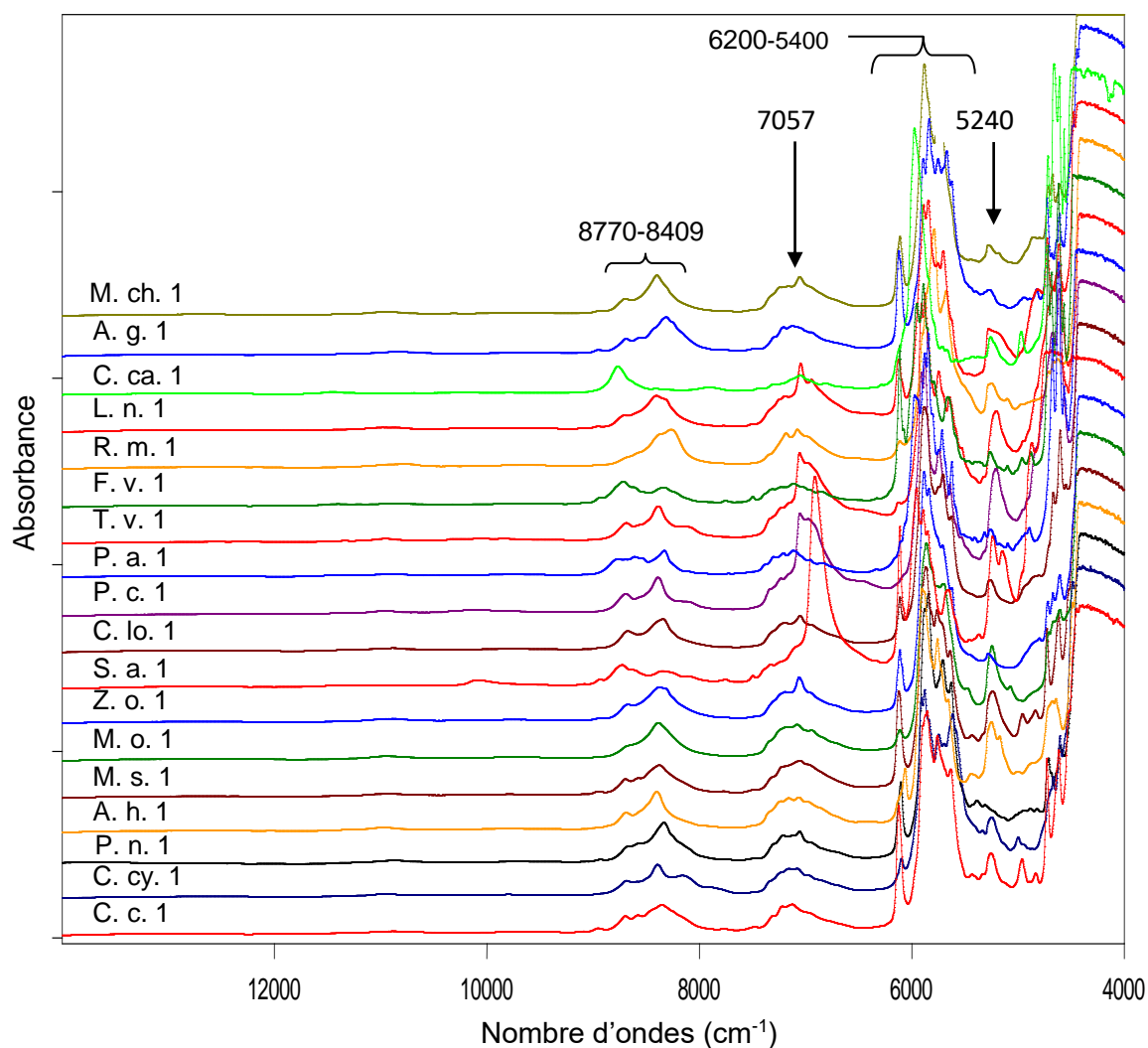


Figure 3.3 : Spectres NIR-TF des huiles essentielles pures extraites par hydrodistillation: (M.ch.1) *M. chamomilla* L.; (A.g.1) *A. graveolens* L.; (C.ca.1) *C. Cassia*; (L.n.1) *L. nobilis* L.; (R.m.1) *R. montana* L.; (F.v.1) *F. vulgare*; (T.v.1) *T. vulgaris*; (P.a.1) *P. anisum*; (P.c.1) *P. crispum*; (C.lo.1) *C. long*; (S.a.1) *S. aromaticum* L.; (Z.o.1) *Z. officinale*; (M.o.1) *M. officinalis*; (M.s.1) *M. spicata* L.; (A.h.1) *A. herba-alba*; (P.n.1) *P. nigrum* L.; (C.cy.1) *C. cyminum* L. et (C.c.1) *C. carvi* L.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

Comme on peut constater, tous les spectres montrent des bandes intenses dans la région entre 6044 et 5400 cm^{-1} qui sont liées au premier harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans les groupements $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$. D'autres bandes autour de 5240 cm^{-1} correspondent à la deuxième harmonique des vibrations d'élongation du groupement C=O présent dans quelques huiles essentielles telles que *A. herba-alba* (Armoise), *M. officinalis* (Mélisse), *C. cyminum* L. (Cumin), *carvi* L. (Carvi), *S. aromaticum* L. (Clous de girofle), *L. angustifolia* Mill. (Lavande) et *L. nobilis* L. (Laurier).

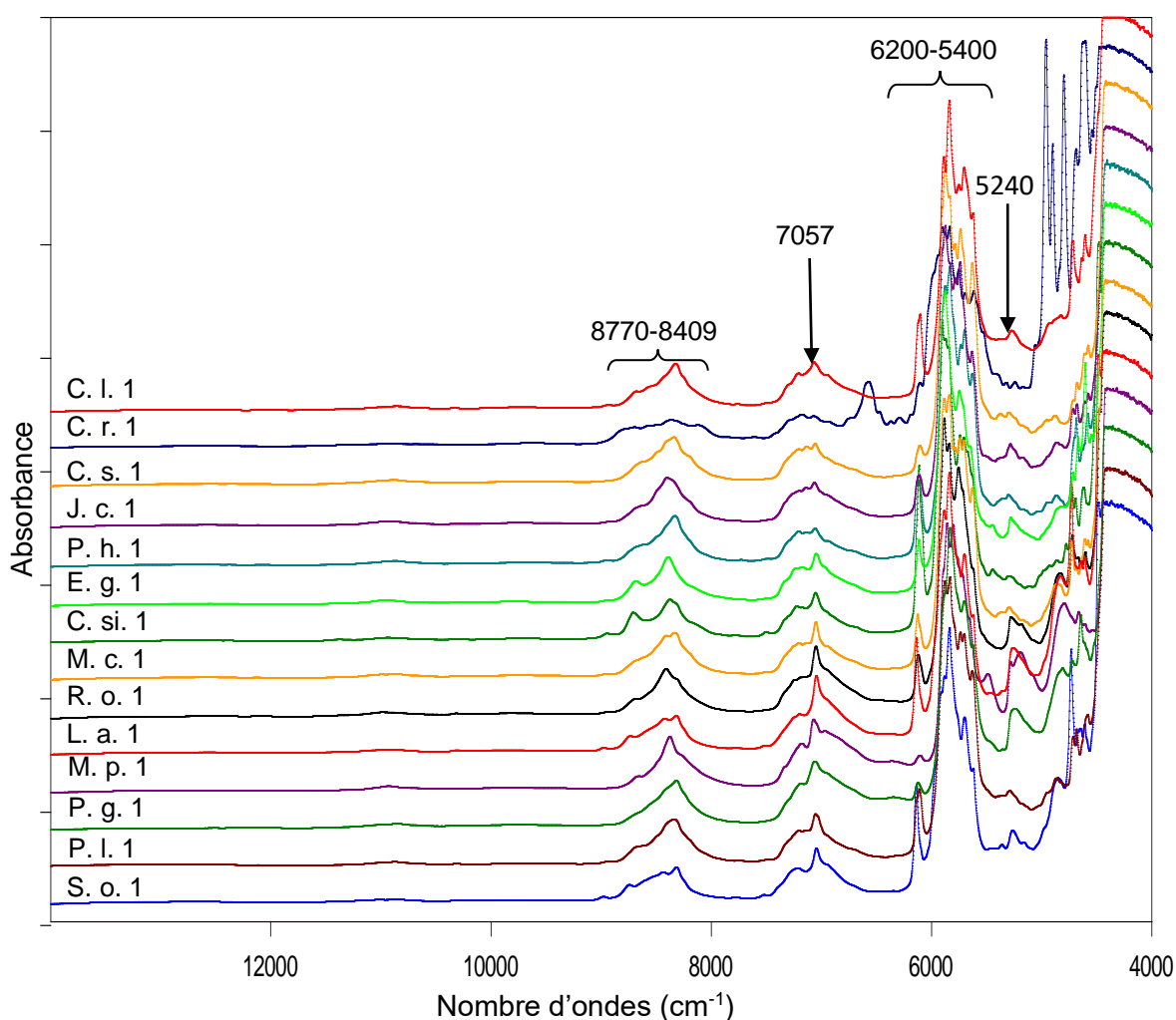


Figure 3.4 : Spectres NIR-TF des huiles essentielles pures extraites par entraînement à la vapeur d'eau: (C.l.1) *C. limon*; (C.r.1) *C. reticulata* L.; (C.s.1) *C. semperviens* L.; (J.c.1) *J. communis* L.; (P.h.1) *P. halepensis*; (E.g.1) *E. globulus*; (C.si.1) *C. sinensis* L.; (M.c.1) *M. communis* L.; (R.o.1) *R. officinalis*; (L.a.1) *L. angustifolia*; (M.p.1) *M. piperita*; (P.g.1) *P. graveolens*; (P.l.1) *P. lentiscus* L. et (S.o.1) *S. officinalis*.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

3.3.2 Spectres NIR-TF des huiles essentielles commerciales

Les figures 3.5 (A-B), 3.6, 3.7 et 3.8 représentent les spectres NIR-TF des échantillons commerciaux d'huiles essentielles des espèces végétales sélectionnées, obtenus dans les mêmes conditions spectrales que les huiles essentielles pures, dans la région comprise entre 14000 et 3500 cm^{-1} . Chaque figure susmentionnée regroupe un ensemble d'huiles commerciales ayant la même allure spectrale contrairement aux huiles essentielles pures obtenues par hydrodistillation et entraînement à la vapeur d'eau.

Les figures 3.5A, 3.5B rassemblant le premier groupe d'échantillons commerciaux, montrent que certains échantillons présentent une bande d'absorption principale à 8266 cm^{-1} qui correspond au deuxième harmonique des vibrations d'élongation de C—H tandis que celles à 7187 et 7077 cm^{-1} sont dues à la bande combinée de C—H du groupement $-\text{CH}_2$. Les pics à 5798 et 5679 cm^{-1} proviennent du premier harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans les groupements $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$. D'autres pics à 4660 cm^{-1} sont associés à des bandes combinées de vibrations d'élongation de C—H et C=O. Ces bandes, présentes dans différents échantillons, pourraient confirmer la présence d'un composé ajouté.

Sur la figure 3.6, les spectres NIR-TF d'un deuxième groupe d'échantillons commerciaux sont dominés par une bande d'absorption intense à 8256 cm^{-1} , qui résulte du deuxième harmonique de l'élongation de C—H dans le groupement $-\text{CH}_2$, d'autres à 7187 et 7077 cm^{-1} sont associés aux bandes de combinaison des bandes d'élongation de C—H dans le groupement $-\text{CH}_2$. Les pics à 5798 et 5673 cm^{-1} correspondent au premier harmonique de l'élongation de C—H dans le groupement $-\text{CH}_2$. De la même manière qu'auparavant, ces bandes pourraient démontrer la présence d'un composé ajouté aux huiles essentielles.

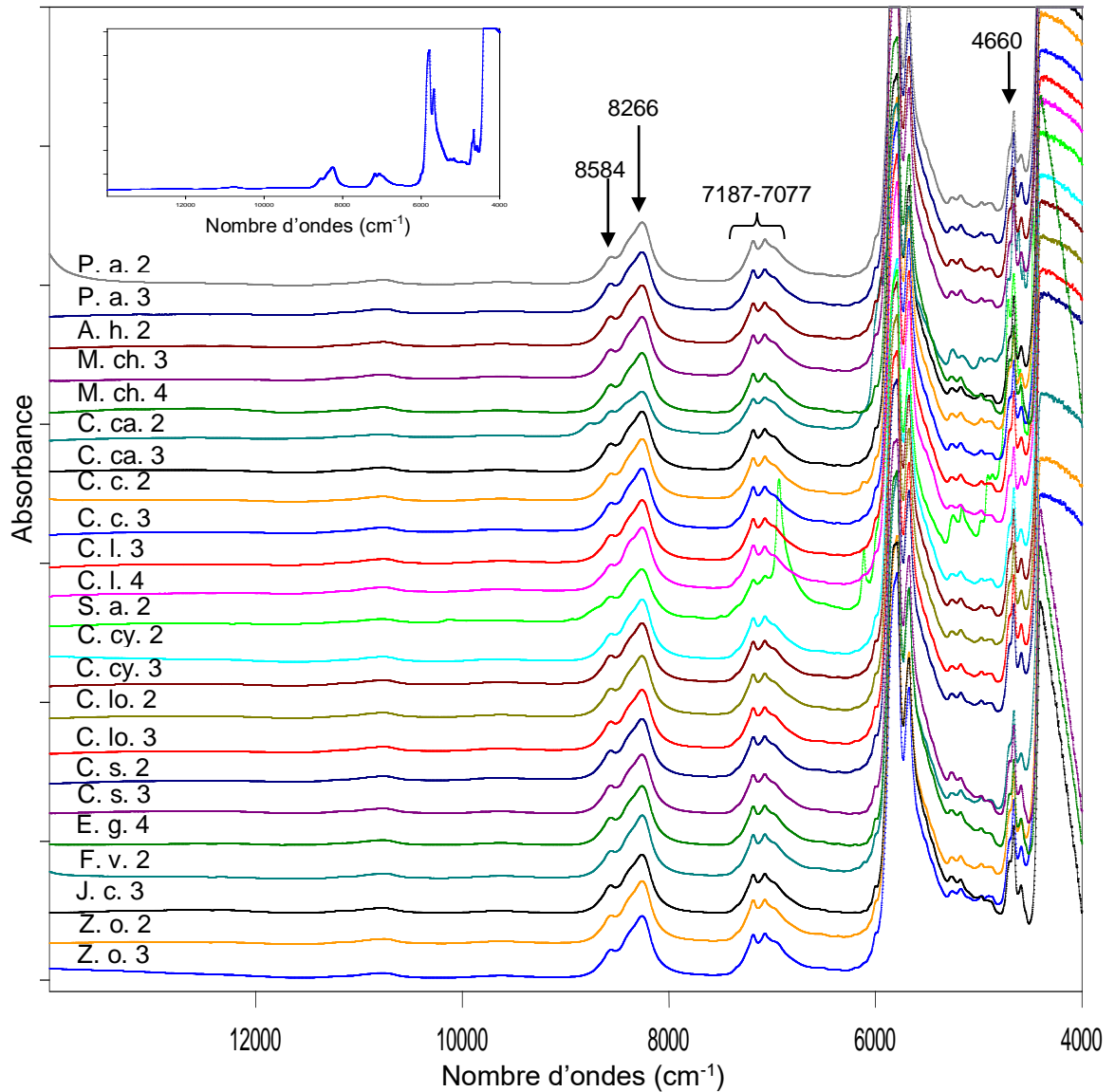


Figure 3.5A: Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: [(P.a.2); (P.a.3)] *P. anisum*; (A.h.2) *A. herba-alba*; [(M.ch.3), (M.ch.4)] *M. chamomilla* L.; [(C.ca.2), (C.ca.3)] *C. cassia*; [(C.c.2), (C.c.3)] *C. carvi* L.; [(C.l.3), (C.l.4)] *C. limon* L.; [(C.cy.2), (C.cy.3)] *C. cyminum* L.; (S.a.2) *S. aromaticum* L.; [(C.lo.2),(C.lo.3)] *C. longa*; [(C.s.2), (C.s.3)] *C. semperviens*; (E.g.4) *E. globules*; (F.v.2) *F. vulgare*; (J.c.3) *J. communis* L. et [(Z.o.2), (Z.o.3)] *Z. officinale*.

Figure insérée: spectre de l'huile de tournesol.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

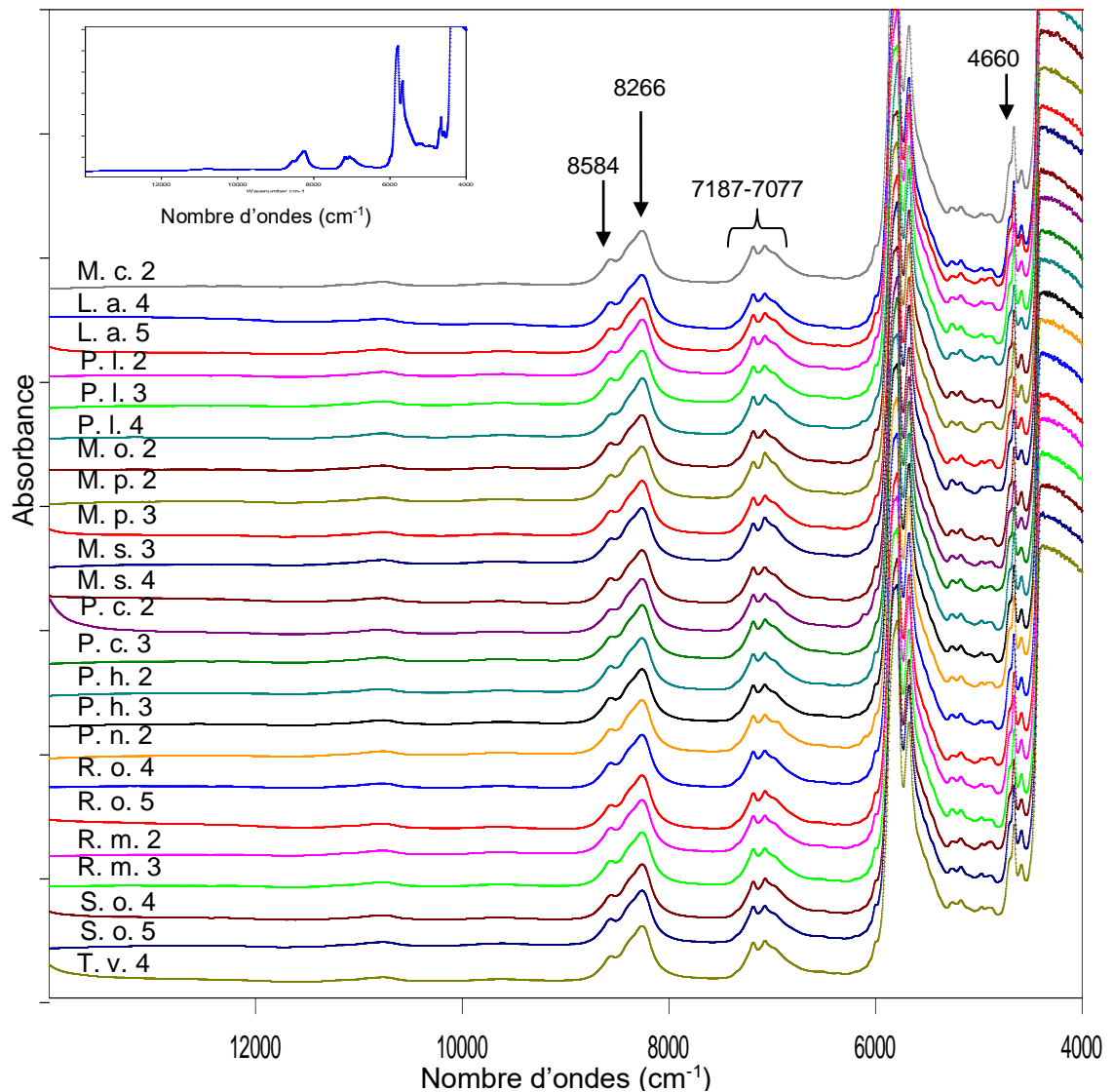


Figure 3.5B : Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (M.c.2) *M. communis* L.; [(L.a.4), (L.a.5)] *L. angustifolia* Mill.; [(P.l.2), (P.l.3), (P.l.4)] *P. lentiscus* L.; (M.o.2) *M. officinalis*; [(M.p.2), (M.p.3)] *M. piperita*; [(M.s.3), (M.s.4)] *M. spicata* L.; [(P.c.2), (P.c.3)] *P. Crispum*; [(P.h.2), (P.h.3)] *P. halepensis*; (P.n.2) *P. nigrum* L.; [(R.o.4), (R.o.5)] *R. officinalis*; [(R.m.2), (R.m.3)] *R. montana*; [(S.o.4), (S.o.5)] *S. officinalis* et (T.v.4) *T. vulgaris*.

Figure insérée: Spectre de l'huile de tournesol.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles

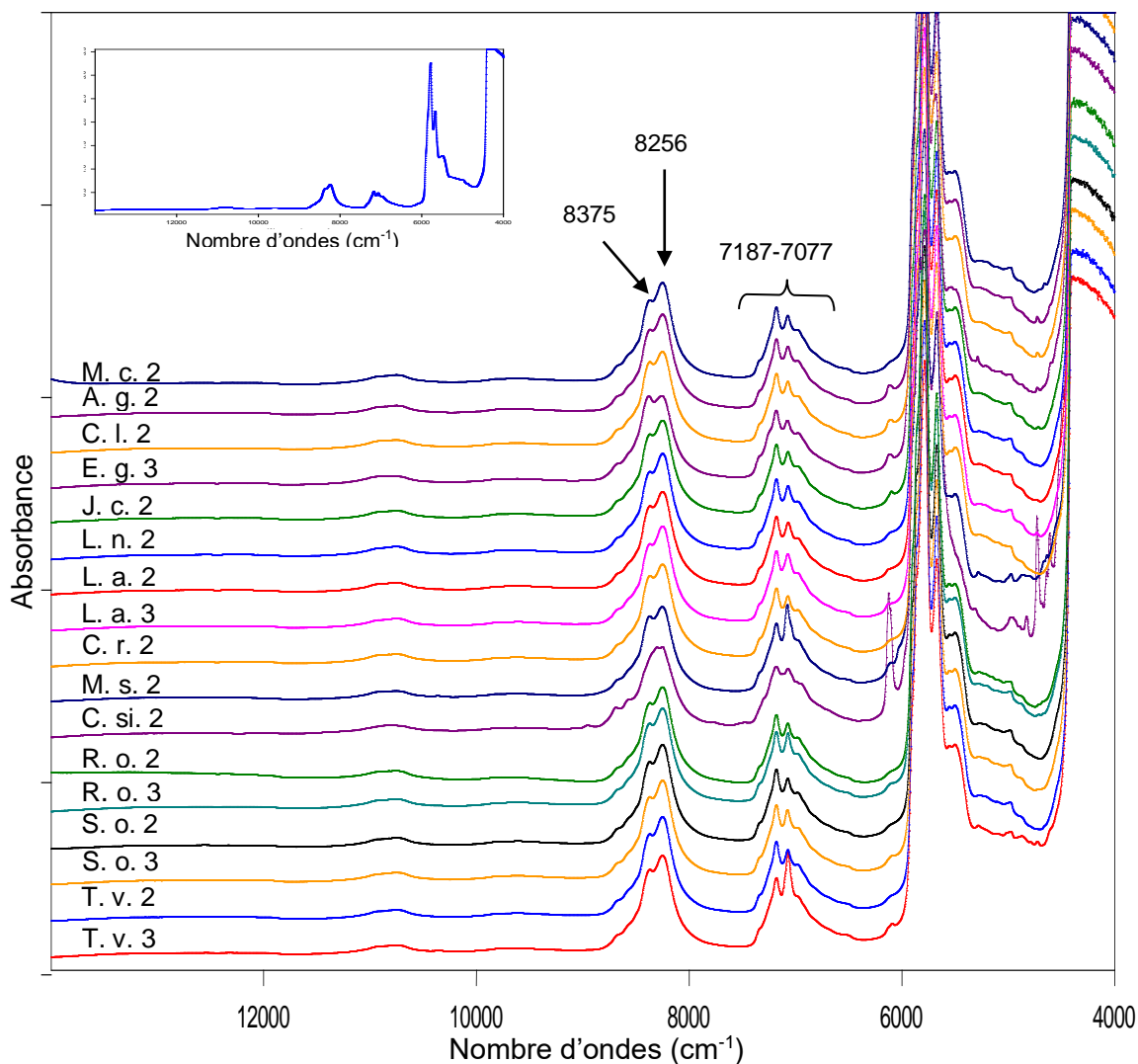


Figure 3.6 : Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (M.ch.2) *M. chamomilla* L.; (A.g.2) *A. graveolens* L.; (C.l.2) *C. limon* L.; (E.g.2) *E. globulus*; (J.c.2) *J. communis* L.; (L.n.2) *L. nobilis*; [(L.a.2), (L.a.3)] *L. angustifolia* Mill.; (C.r.2) *C. reticulata* L.; (M.s.2) *M. spicata* L.; (C.si.2) *C. sinensis* L.; [(R.o.2), (R.o.3)] *R. officinalis*; [(S.o.2), (S.o.3)] *S. officinalis* et [(T.v.2), (T.v.3)] *T. vulgaris*. Figure insérée: spectre de la Vaseline pure.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles

Les spectres des huiles essentielles commerciales suivantes: *S. aromaticum* L. (Clous de girofle), *C. cassia* (Cannelle), *Z. officinale* (Gingembre) représentés dans la figure 3.7, montrent la présence d'autres bandes d'absorption qui sont différentes de celles des huiles essentielles pures et de celles retrouvées dans le premier et le deuxième groupe des échantillons commerciaux.

Ces échantillons présentent des bandes d'absorption à 8442 et 8236 cm^{-1} qui correspondent au second harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans les groupements $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$. Des faibles pics à 7379 et 7263 cm^{-1} correspondent à la combinaison des bandes d'élongation de C—H dans les groupements $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$, respectivement. Des bandes larges situées à 6709 et 6335 cm^{-1} sont associées à l'élongation de N—H. D'autres bandes à 5941 et 5897 cm^{-1} sont associées au premier harmonique de l'élongation de C—H dans les composés aromatiques et dans le groupement $-\text{CH}_3$, respectivement. Cependant celles à 5775 et 5677 cm^{-1} résultent de la présence du premier harmonique de l'élongation de C—H dans le groupement $-\text{CH}_2$. Une bande à 5192 cm^{-1} représente le deuxième harmonique d'élongation de C=O dans le groupement CONH.

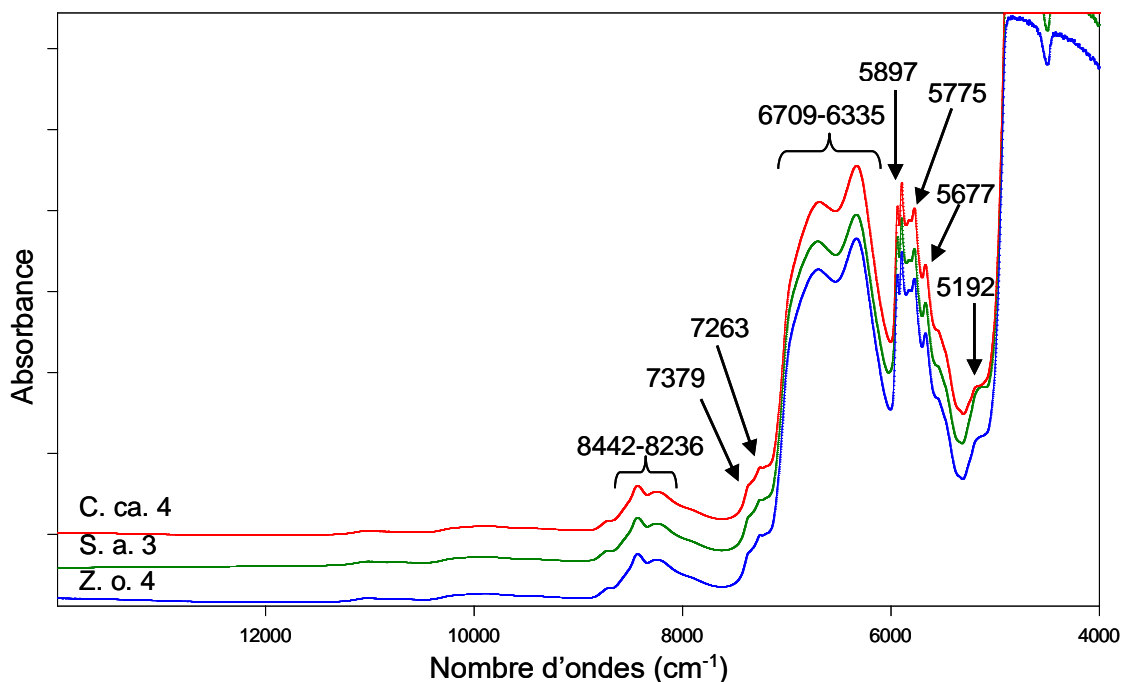


Figure 3.7 : Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (C.ca.4) *C. cassia*; (S.a.3) *S. aromaticum* L. et (Z.o.4) *Z. officinale*.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

Dans le même ordre d'idée, la figure 3.8 illustre les spectres des huiles essentielles commerciales suivantes: *T. vulgaris* (Thym), *P. graveolens* (Géranium), *M. spicata* L. (Menthe verte) et *E. globulus* (Eucalyptus), présentant de fortes similitudes avec les huiles essentielles pures (figures 3.3, 3.4), pour les

principales bandes de vibrations caractéristiques. On peut donc conclure que les solvants sont absents dans les échantillons commerciaux susmentionnés.

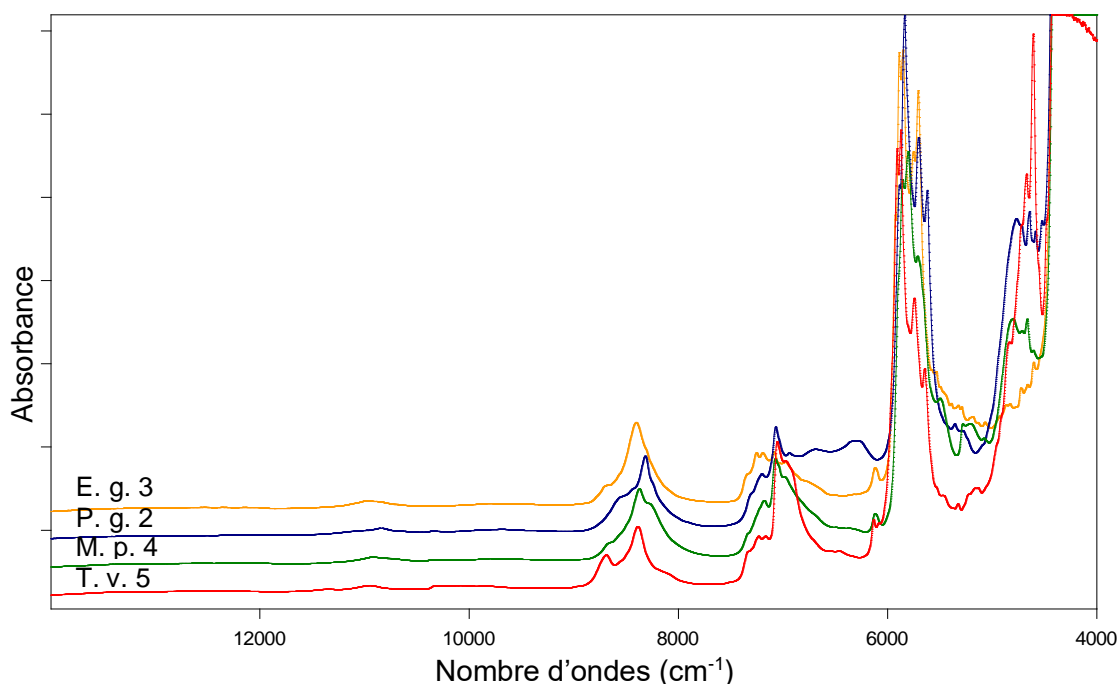


Figure 3.8 : Spectres NIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (E.g.3) *E. globulus*; (P.g.2) *P. graveolens*; (M.p.4) *M. piperita* et (T.v.5) *T. vulgaris*.
Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

3.3.3 Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures

Les figures 3.9 et 3.10 montrent les spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures extraites par hydrodistillation et entraînement à la vapeur respectivement, dans le domaine spectral entre 4000 et 550 cm^{-1} .

On peut observer sur ces figures la présence des bandes de vibrations caractéristiques de chaque huile essentielle, qui semblent appropriées pour leur identification en fonction de la présence de composés principaux. Les absorptions autour de 3400 cm^{-1} sont dues aux vibrations du groupe hydroxyle (OH) qui est présent dans certains spectres d'huiles essentielles tels que *M. piperita* (Menthe poivrée) et *T. vulgaris* (Thym) et *R. officinalis* (Romarin).

Les spectres montrent aussi des bandes intenses dans la région entre 2935 et 2850 cm^{-1} qui correspondent aux groupes $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$. D'autres

bandes intenses étaient associées au groupe carbonyle (C=O) présent dans les esters, aldéhydes ou cétones. On peut remarquer la présence de ce groupement fonctionnel dans les huiles essentielles de *C. cyminum* L. (Cumin) et de *C. carvi* L. (Carvi) à 1741 et 1679 cm^{-1} pour le cumin-aldéhyde et la carvone, respectivement.

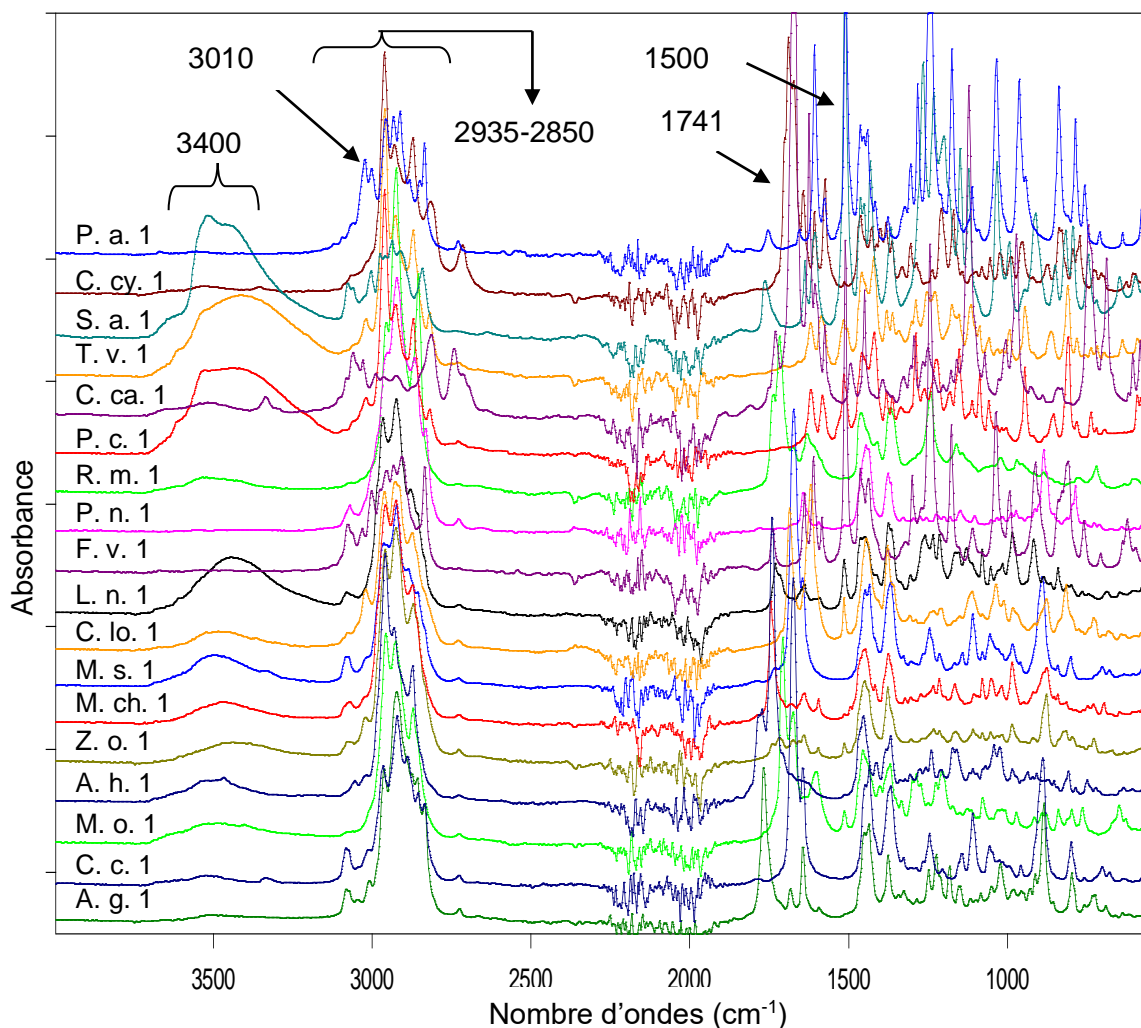


Figure 3.9 : Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures extraites par hydrodistillation: (P.a.1) *P. anisum*; (C.cy.1) *C. cyminum* L.; (S.a.1) *S. aromaticum* L.; (T.v.1) *T. vulgaris*; (C.ca.1) *C. Cassia*; (P.c.1) *P. crispum*; (R.m.1) *R. montana* L.; (P.n.1) *P. nigrum* L.; (F.v.1) *F. vulgare*; (L.n.1) *L. nobilis* L.; (C.lo.1) *C. long*; (M.s.1) *M. spicata* L.; (M.ch.1) *M. chamomilla* L.; (Z.o.1) *Z. officinale*; (A.h.1) *A. herba-alba*; (M.o.1) *M. officinalis*; (C.c.1) *C. carvi* L. et (A.g.1) *A. graveolens* L.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles

On peut également observer l'absorbance du groupement fonctionnel alcène (C=C) autour de 1600 cm^{-1} . D'autres bandes importantes correspondent aux vibrations du noyau aromatique au nombre d'onde autour de 1500 cm^{-1} observées pour *P. anisum* L. (Anis), *T. vulgaris* (Thym) et *S. aromaticum* L. (Clous de girofle).

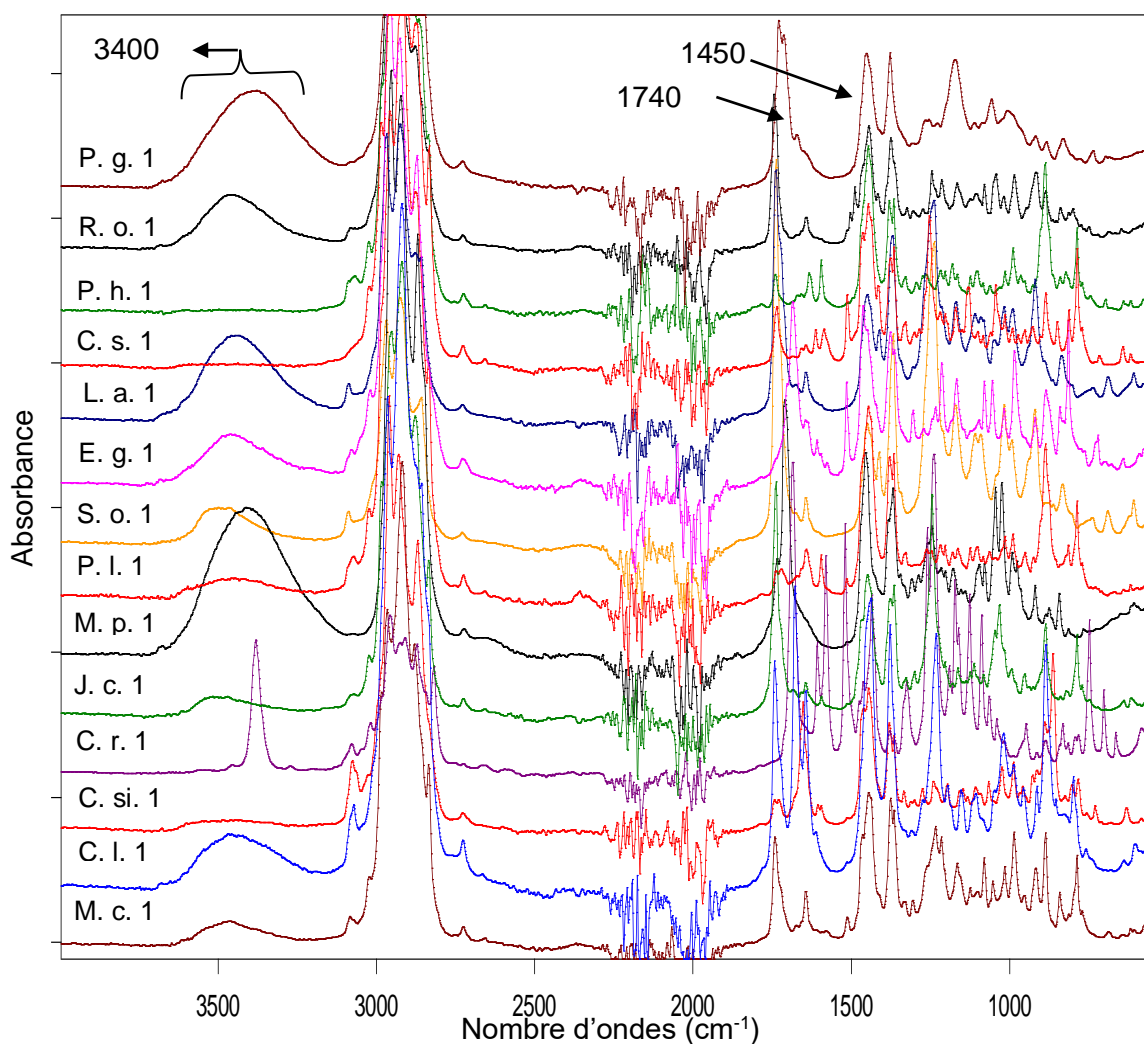


Figure 3.10 : Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures extraites par entraînement à la vapeur d'eau: (P.g.1) *P. graveolens*; (R.o.1) *R. officinalis*; (P.h.1) *P. halepensis*; (C.s.1) *C. sempervivens*; (M.p.1) *M. piperita*; (L.a.1) *L. angustifolia*; (E.g.1) *E. globulus*; (S.o.1) *S. officinalis*; (P.l.1) *P. lentiscus* L.; (J.c.1) *J. communis* L.; (C.r.1) *C. reticulata* L.; (C.si.1) *C. sinensis* L.; (C.l.1) *C. limon* L. et (M.c.1) *M. communis* L.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

3.3.4 Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles commerciales

Les figures 3.11 (A-B), 3.12, 3.13 et 3.14 montrent les spectres ATR-MIR-TF d'échantillons commerciaux d'huiles essentielles des espèces végétales sélectionnées pour cette étude, obtenus dans les mêmes conditions spectrales que celles extraites à l'état pure dans la région comprise entre 4000 et 550 cm^{-1} . Il ya lieu de noter que chaque figure regroupe un ensemble de spectres présentant des similitudes au niveau des bandes caractéristiques. L'analyse de ces spectres nous a permis de les classer en trois principaux types.

Le premier type de spectres est regroupé dans les figures 3.11 A et 3.11 B présentant une allure complètement différentes des spectres des huiles pures (Figures 3.8, 3.9) en montrant des bandes caractéristiques à 3010 cm^{-1} , ce qui est dues à la présence de liaisons $=\text{C}-\text{H}$ aromatiques, à 2924 et 2854 cm^{-1} correspondant aux bandes d'élongation $\text{C}-\text{H}$ symétriques et antisymétriques d'alcanes, une bande forte à 1747 cm^{-1} correspondant à la vibration d'élongation du carbonyle $\text{C}=\text{O}$. Un fort chevauchement de bandes a été observé dans la région entre 1335 et 970 cm^{-1} , avec une absorbance maximale à 1161 cm^{-1} . Suite à cela, on peut conclure que tous ces échantillons pourraient avoir été dilués avec le même solvant.

La figure 3.12 montre un deuxième type de spectres d'échantillons d'huiles essentielles commerciales dont l'allure est aussi différente que celles des huiles essentielles pures et caractérisés par l'absence de la bande correspondante à la vibration d'élongation du carbonyle $\text{C}=\text{O}$ qui était spécifique des spectres des 3.11A et 3.11B. Pour cette série de spectres, les bandes les plus intenses se situaient à 2952, 2921 et 2852 cm^{-1} , associées à l'élongation de $\text{C}-\text{H}$ de $-\text{CH}_3$ symétrique, $-\text{CH}_2$ antisymétrique et $-\text{CH}_2$ symétrique, respectivement. La bande observée à 1460 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongation de $\text{C}-\text{H}$ de $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$ des groupements aliphatiques. D'autres bandes apparaissent à 1377 et 721 cm^{-1} liées aux vibrations de déformation de $\text{C}-\text{H}$ des groupes $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$. Une fois encore, le fait que différents échantillons d'huiles essentielles puissent fournir de fortes similarités entre les bandes les plus intenses pourrait

mettre en évidence la présence d'un composé ajouté ou d'un solvant utilisé comme diluant d'échantillon.

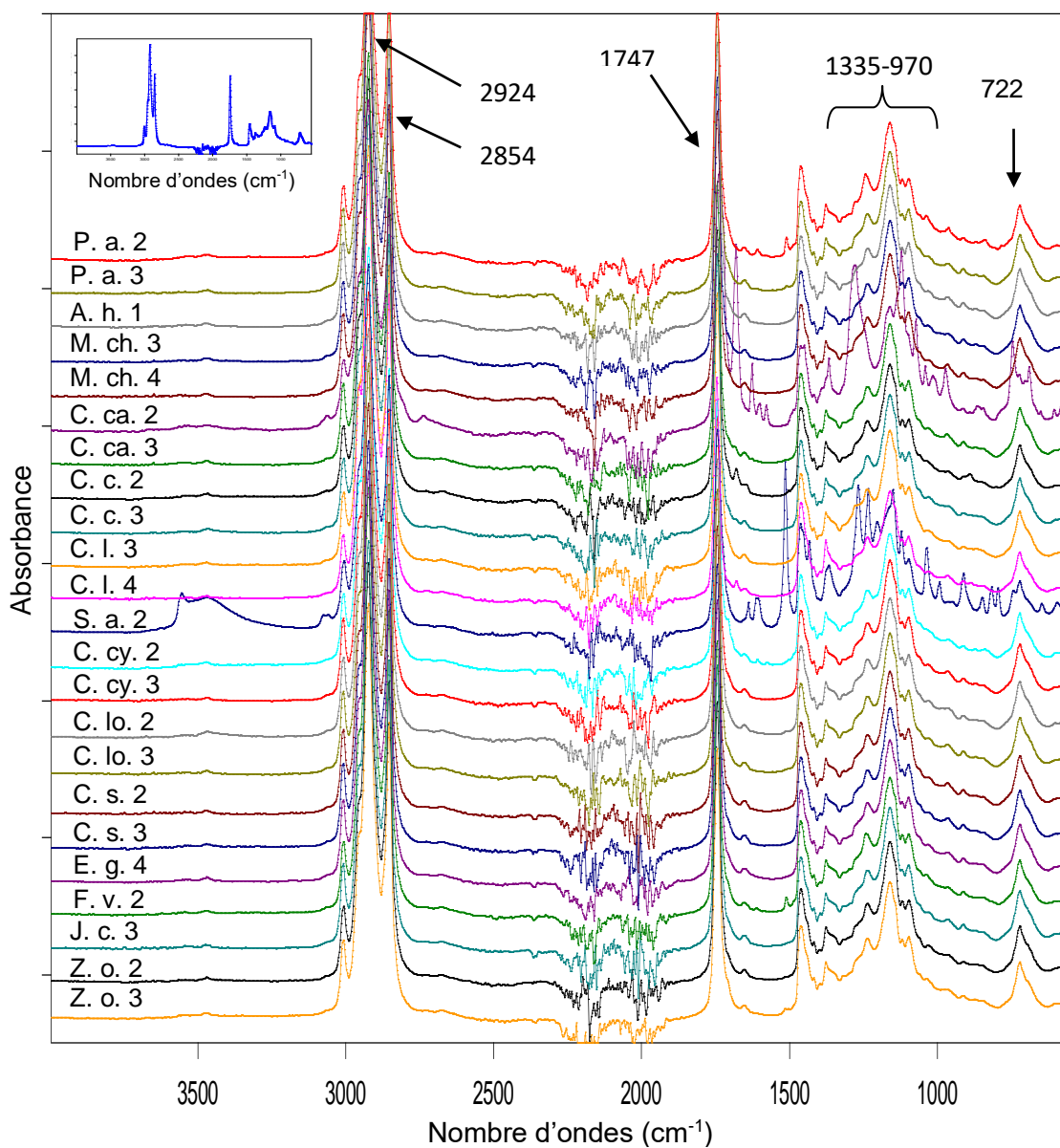


Figure 3.11A : Spectres ATR-MIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: [(P.a.2), (P.a.3)] *P. anisum*; (A.h.2) *A. herba-alba*; [(M.ch.3), (M.ch.4)] *M. chamomilla* L.; [(C.ca.2), (C.ca.3)] *C. cassia*; [(C.c.2), (C.c.3)] *C. carvi* L.; [(C.l.3), (C.l.4)] *C. limon* L.; [(C.cy.2), (C.cy.3)] *C. cyminum* L.; (S.a.2) *S. aromaticum* L.; [(C.lo.2),(C.lo.3)] *C. longa*; [(C.s.2), (C.s.3)] *C. semperviens*; (E.g.4) *E. globules*; (F.v.2) *F. vulgare*; (J.c.3) *J. communis* L. et [(Z.o.2), (Z.o.3)] *Z. officinale*.

Figure insérée : Spectre de l'huile de tournesol.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles

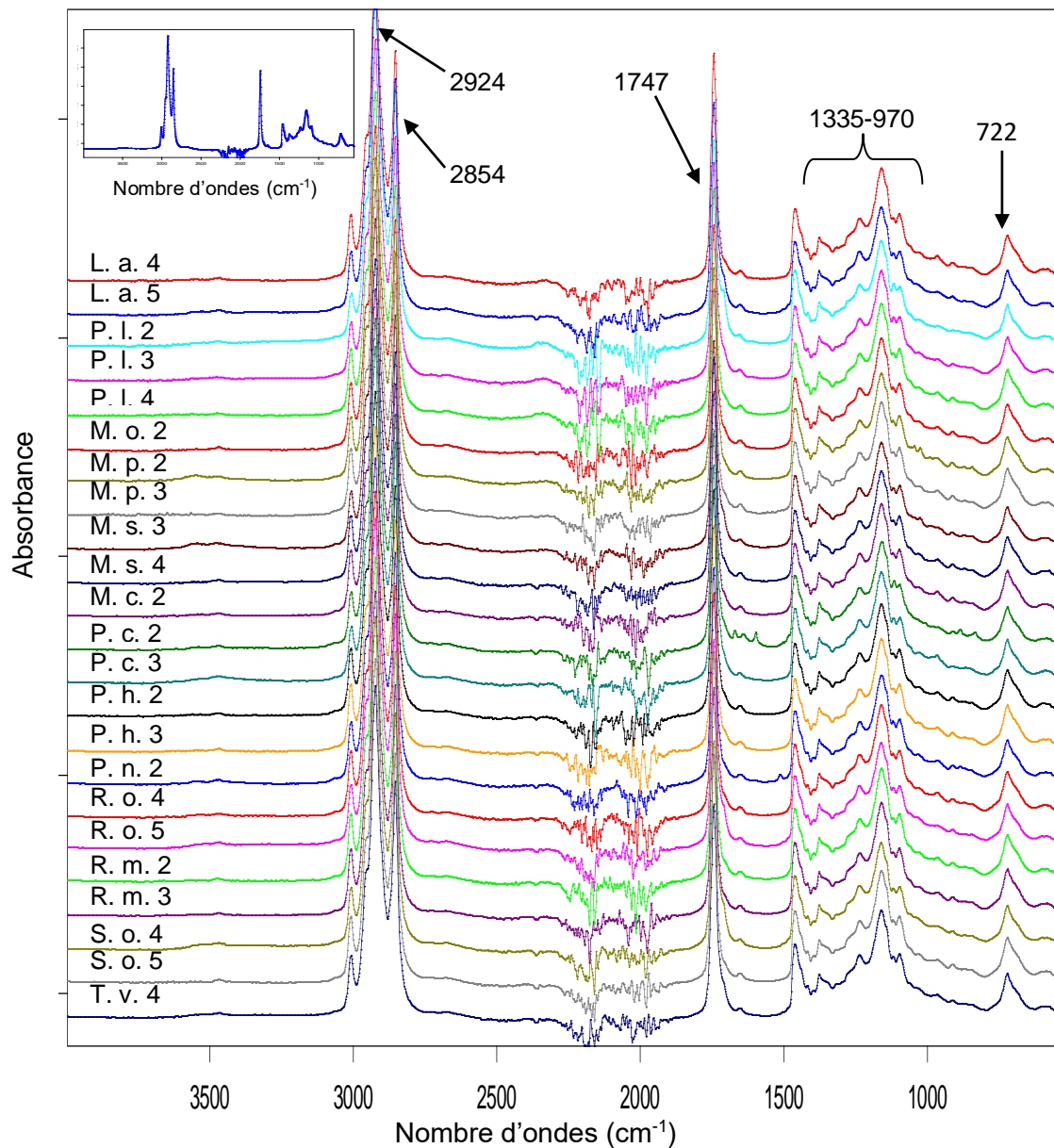


Figure 3.11B : Spectres ATR-MIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (M.c.2) *M. communis* L.; [(L.a.4), (L.a.5)] *L. angustifolia* Mill.; [(P.l.2), (P.l.3), (P.l.4)] *P. lentiscus* L.; (M.o.2) *M. officinalis*; [(M.p.2), (M.p.3)] *M. piperita*; [(M.s.3), (M.s.4)] *M. spicata* L.; [(P.c.2), (P.c.3)] *P. crispum*; [(P.h.2), (P.h.3)] *P. halepensis*; (P.n.2) *P. nigrum* L.; [(R.o.4), (R.o.5)] *R. officinalis*; [(R.m.2), (R.m.3)] *R. Montana*; [(S.o.4), (S.o.5)] *S. officinalis* et (T.v.4) *T. vulgaris*.
Figure insérée : Spectre de l'huile de tournesol.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

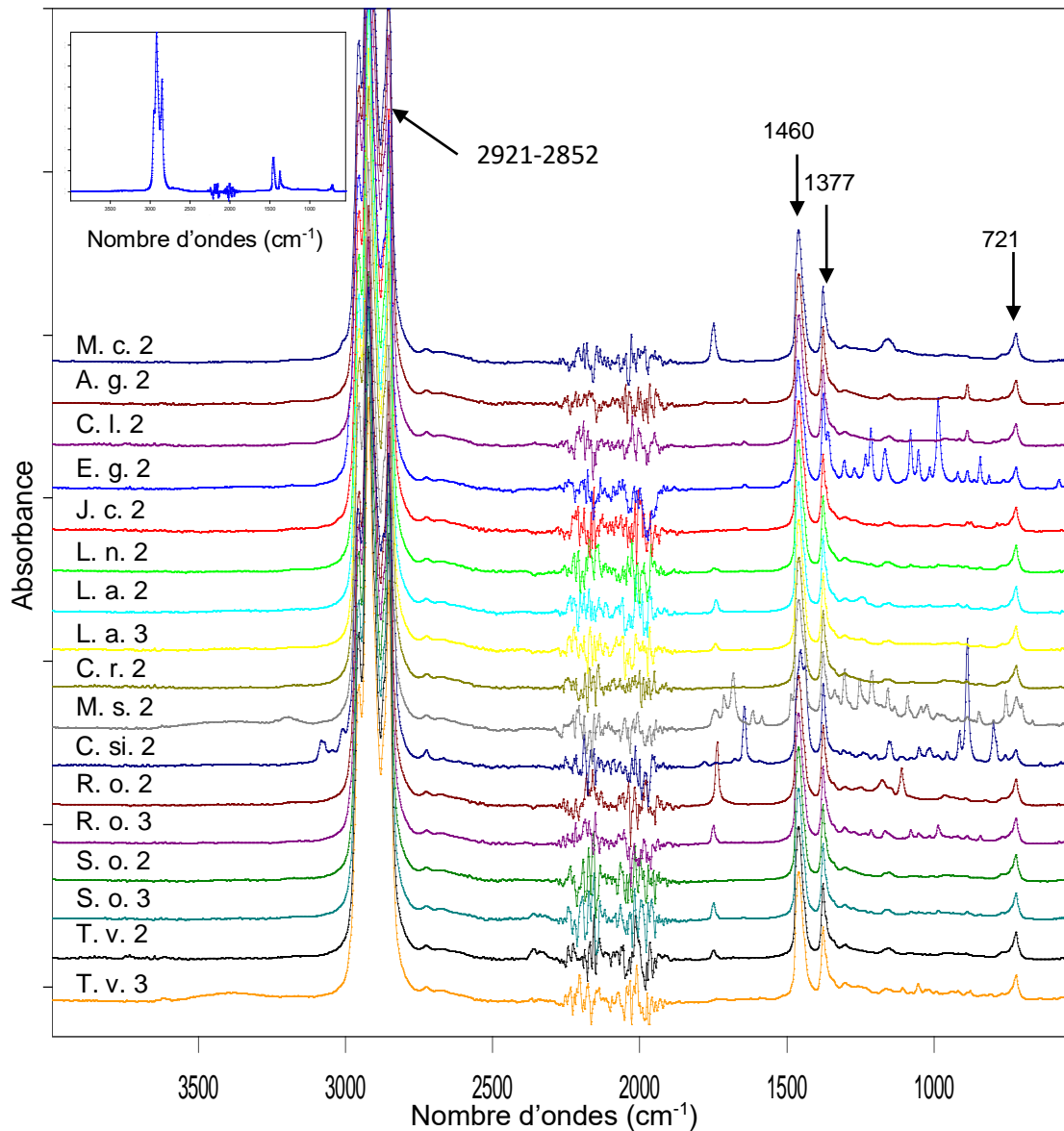


Figure 3.12 : Spectres ATR-MIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (M.ch.2) *M. chamomilla* L.; (A.g.2) *A. graveolens* L.; [(C.l.2) *C. limon* L.; (E.g.2) *E. globulus*; (J.c.2) *J. communis* L.; (L.n.2) *L. nobilis*; [(L.a.2), (L.a.3)] *L. angustifolia* Mill.; (C.r.2) *C. reticulata* L.; (M.s.2) *M. spicate*; (C.si.2) *C. sinensis* L.; [(R.o.2), (R.o.3)] *R. officinalis*, [(S.o.2), (S.o.3)] *S. officinalis* et [(T.v.2), (T.v.3)] *T. vulgaris*.

Figure insérée : Spectre de la Vaseline pure.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

La figure 3.13 présentée ci-dessous montre la présence d'un troisième groupe d'échantillons à savoir: *S. aromaticum* L. (Clous de girofle), *C. cassia* (Cannelle), *Z. officinale* (Gingembre). On peut observer une similitude entre les

spectres de ces échantillons qui sont différents des spectres des huiles essentielles pures et qui montrent la présence éventuelle d'un solvant commun.

Les échantillons présentent une large bande à 3330 cm^{-1} qui est due probablement à un chevauchement entre l'élongation de N—H pour les composés aminés et l'élongation d'O—H pour les composés aromatiques. Des bandes à 2971 , 2927 et 2879 cm^{-1} sont associées à l'élongation de C—H de $-\text{CH}_3$ symétrique, $-\text{CH}_2$ antisymétrique et $-\text{CH}_2$ symétrique. Un autre chevauchement de bandes a été observé dans la région entre 1456 et 1232 cm^{-1} . Des bandes apparaissent à 1136 , 1076 et 1040 cm^{-1} correspondent à l'élongation de C—O tandis que celles à 990 , 920 et 838 cm^{-1} sont liées aux vibrations de déformation de C—H. Une faible bande à 803 cm^{-1} .

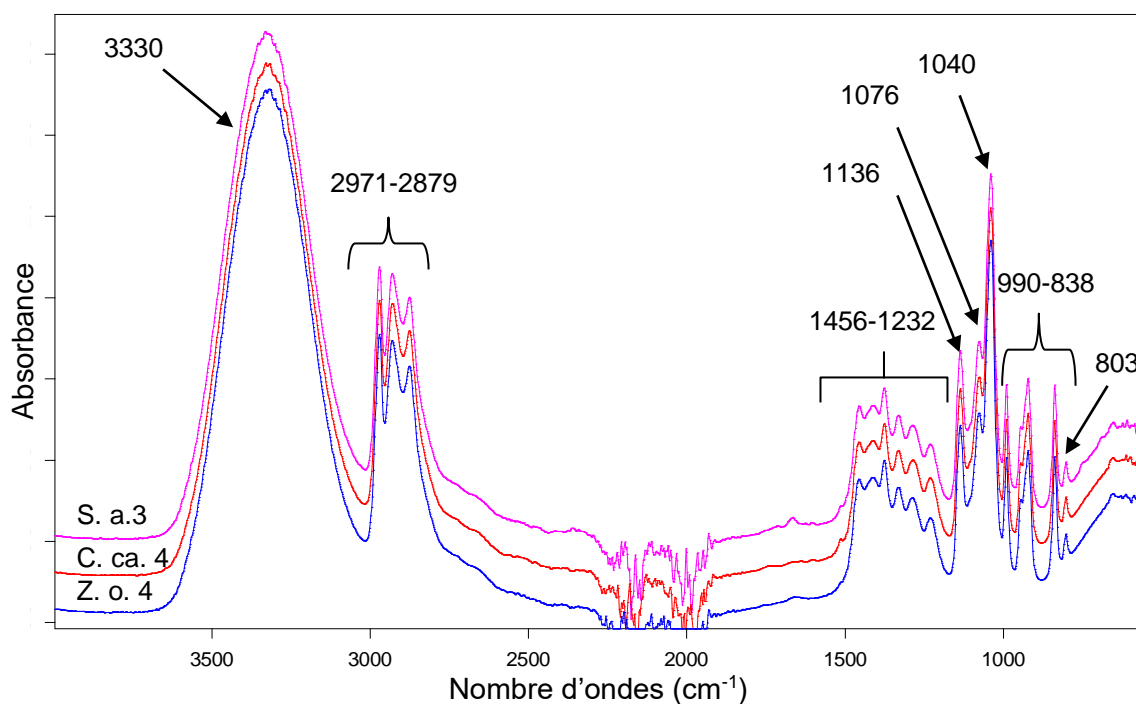


Figure 3.13 : Spectres ATR-MIR-TF des différentes d'huiles essentielles commerciales: (C.ca.4) *C. cassia*, (S.a.3) *S. aromaticum* L. et (Z.o.4) *Z. officinale*.
Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

Concernant les spectres des échantillons d'huile essentielle commerciale, *T. vulgaris* (Thym), *P. graveolens* (Géranium), *M. piperita* (Menthe poivrée), *E. globulus* (Eucalyptus) résumés sur la figure 3.14, on peut voir la similitude spectrale avec ceux des huiles pures pour la même espèce de plante et qui sont

extraites par hydrodistillation ou par entraînement à la vapeur d'eau rapportés dans les figures 3.9 et 3.10. On peut conclure dans ce cas que la possibilité d'ajout de solvants dans les échantillons commerciaux susmentionnés est écartée.

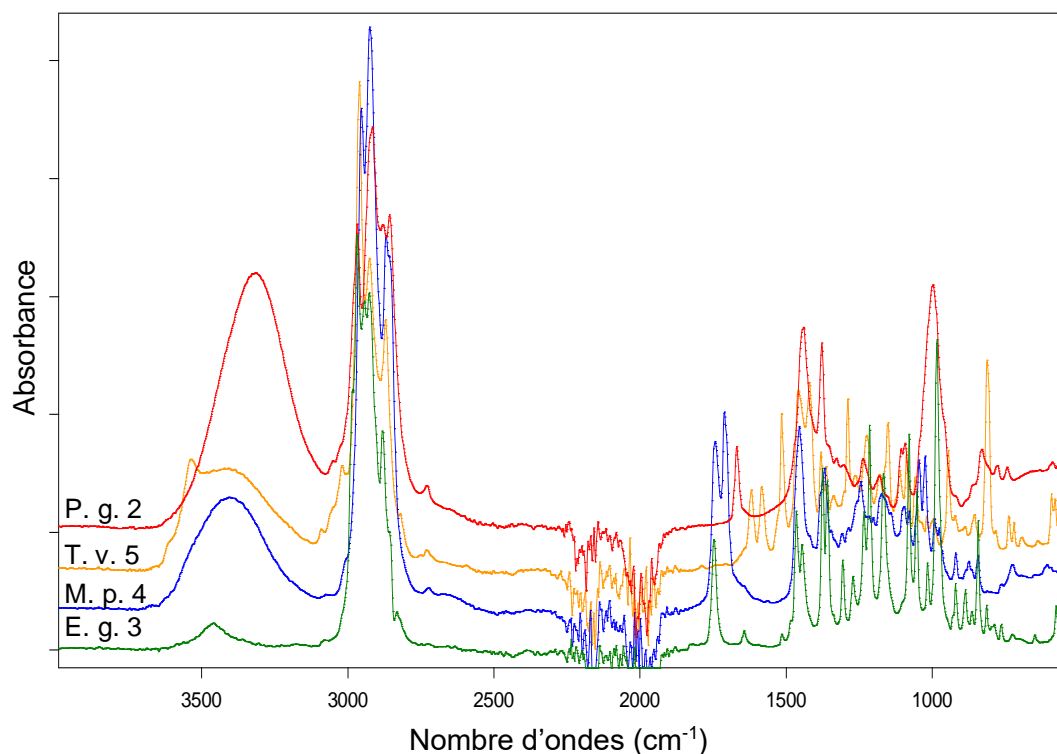


Figure 3.14 : Spectres ATR-MIR-TF des différentes huiles essentielles commerciales: (T.v.5) *T. vulgaris*; (M.p.4) *M. piperita*; (P.g.2) *P. graveolens* et (E.g.3) *E. globulus*.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

3.3.5 Evaluation des huiles commerciales basée sur la comparaison de leurs spectres NIR-TF et ATR-MIR-TF avec ceux des huiles essentielles pures

Les huiles essentielles dépendent fortement de la nature et de l'origine des plantes spécifiques utilisées pour leur obtention et ainsi dans de nombreux cas, les huiles de différentes parties de plantes ou d'origine géographique ne sont pas identiques dans leur composition chimiques ni dans leurs spectres IR. Cependant, des similarités entre la plupart des spectres NIR (figures 3.5A et 3.5B) et MIR (figures 3.11A et 3.11B) correspondant aux différents échantillons d'huiles essentielles commerciales considérés dans cette étude ont été observées. Cette

similitude de spectres ne peut être interpréter que par la présence d'un solvant commun dans ce premier groupe d'échantillons.

En ce qui concerne le deuxième groupe d'échantillons commerciaux (figures 3.6 et 3.12 pour les spectres NIR-TF et ATR-MIR-TF respectivement), les bandes les plus intenses pourraient être attribuées à la présence d'un alcane comme solvant potentiellement commun. Par contre pour le troisième groupe d'échantillons commerciaux, le solvant ajouté n'a pas pu être déterminé.

3.3.6 Identification des solvants dans les huiles essentielles commerciales

Il reste important dans cette étude, l'identification des solvants ajoutés aux huiles commerciales. Pour cela, les spectres NIR-TF et ATR-MIR-TF de différents solvants ont été obtenus dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi, il a été reconnu que l'huile de tournesol a été ajoutée au premier type d'échantillons commerciaux (Voir la figure insérée sur les figures 3.5A, 3.5B et 3.11A, 3.11B pour les analyses NIR et MIR, respectivement), alors que pour le deuxième type d'échantillons, l'huile de vaseline a été ajoutée (Voir la figure insérée sur les figures 3.6 et 3.12 pour les spectres NIR-TF et ATR-MIR-TF, respectivement).

A titre d'exemple, les figures 3.15 et 3.16 comparent les quatre échantillons commerciaux d'huile de lavande à leur huile essentielle pure correspondante. Il a été observé que les quatre échantillons commerciaux ont été adulterés par la dilution de l'huile essentielle pure par une huile végétale ou minérale ou par l'ajout de certains principaux terpènes constituant l'huile essentielle de l'espèce *L. angustifolia* Mill. (Lavande).

Des conclusions similaires pourraient être faites pour des échantillons suite à la détection d'une contribution importante des bandes d'huile diluante et ce, en comparant les bandes principales des spectres NIR-TF et ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures et des échantillons commerciaux, (voir les figures 3.3,

3.4 et 3.9, 3.10 et les comparer avec les figures 3.5 (A-B), 3.6, 3.7 et 3.11 (A-B), 3.12, 3.13, respectivement).

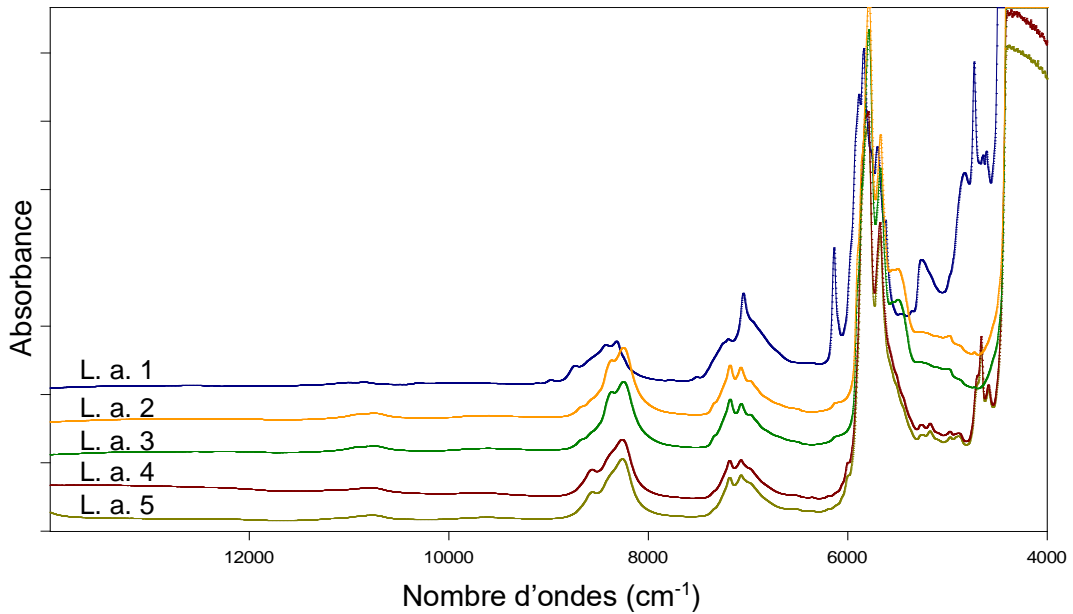


Figure 3.15 : Spectres NIR-TF des huiles essentielles de la lavande (*L. angustifolia* Mill.), pure (L.a.1) et commerciales (L.a.2), (L.a.3), (L.a.4) et (L.a.5).
Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

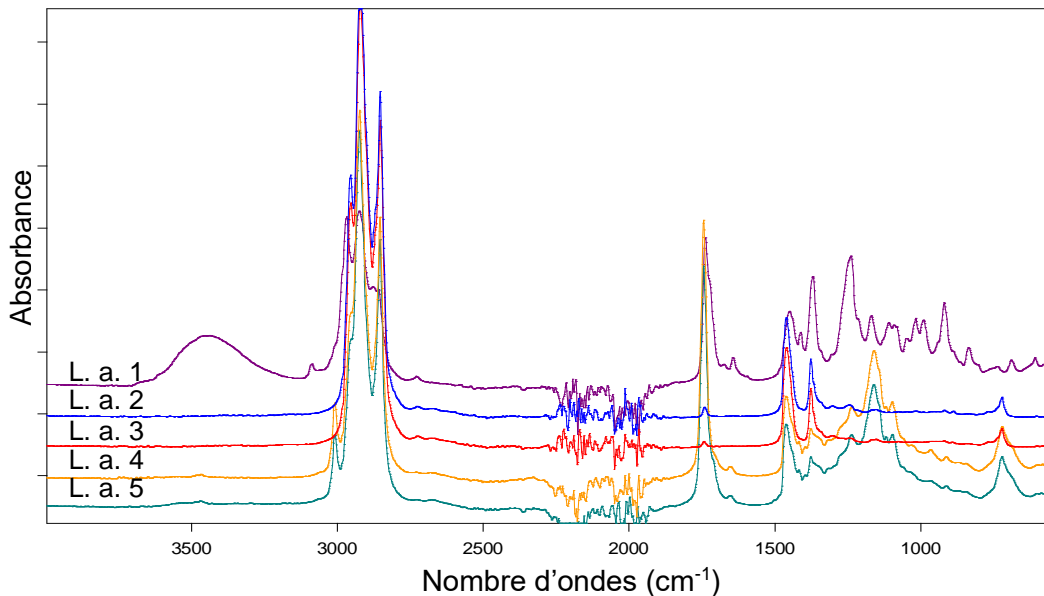


Figure 3.16 : Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles de la lavande (*L. angustifolia* Mill.), pure (L.a.1) et commerciales (L.a.2), (L.a.3), (L.a.4) et (L.a.5).
Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

Effectivement, les résultats confirment la parfaite concordance des réponses spectrales NIR et MIR pour l'identification de l'adultération des huiles essentielles commerciales. Les données résumées dans le tableau 3.1 montrent que pratiquement tous les échantillons commerciaux considérés correspondent à des dilutions avec de l'huile végétale ou de l'huile minérale. Seulement trois échantillons commerciaux indiquent dilutions par un solvant mais non identifié dans cette étude. Quatre échantillons commerciaux pourraient être attribués à des huiles essentielles non diluées, démontrant ainsi que la commercialisation d'huiles essentielles diluées, plutôt que d'huiles essentielles pures, est une pratique étendue dans le marché.

Tableau 3.1 : Concordance des spectroscopies NIR-TF et MIR-TF pour la détection de la présence d'un solvant dans les échantillons commerciaux utilisés dans cette étude.

Espèce végétale	Echantillon	NIR-TF	MIR-TF
<i>Pimpinella anisum</i>	P.a.1	pure	pure
	P.a.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	P.a.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Apium graveolens</i> L.	A.g.1	pure	pure
	A.g.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
<i>Foeniculum vulgare</i>	F.v.1	pure	pure
	F.v.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Carum carvi</i> L.	C.c.1	pure	pure
	C.c.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	C.c.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Cuminum cyminum</i> L.	C.cy.1	pure	pure
	C.cy.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	C.cy.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Petroselinum Crispum</i>	P.c.1	pure	pure
	P.c.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	P.c.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Artemisia herba-alba</i>	A.h.1	pure	pure
	A.h.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale

Tableau 3.1 (suite)

Espèce végétale	Echantillon	NIR-TF	MIR-TF
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	M.ch.1	pure	pure
	M.ch.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	M.ch.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	M.ch.4	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Pelargonium graveolens</i>	P.g.1	pure	pure
	P.g.2	huile commerciale non diluée	huile commerciale non diluée
<i>Cupressus sempervirens</i>	C.s.1	pure	pure
	C.s.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	C.s.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Juniperus communis</i> L.	J.c.1	pure	pure
	J.c.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	J.c.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	L.a.1	pure	pure
	L.a.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	L.a.3	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	L.a.4	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	L.a.5	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Mentha piperita</i>	M.p.1	pure	pure
	M.p.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	M.p.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	M.p.4	huile commerciale non diluée	huile commerciale non diluée
<i>Mentha spicata</i> L.	M.s.1	pure	pure
	M.s.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	M.s.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	M.s.4	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Melissa officinalis</i>	M.o.1	pure	pure
	M.o.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Laurus nobilis</i> L.	L.n.1	pure	pure
	L.n.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale

Tableau 3.1 (suite)

Espèce végétale	Echantillon	NIR-TF	MIR-TF
<i>Ruta montana</i> L.	R.m.1	pure	pure
	R.m.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	R.m.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Rosmarinus officinalis</i>	R.o.1	pure	pure
	R.o.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	R.o.3	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	R.o.4	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	R.o.5	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Salvia officinalis</i>	S.o.1	pure	pure
	S.o.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	S.o.3	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	S.o.4	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	S.o.5	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Thymus vulgaris</i>	T.v.1	pure	pure
	T.v.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	T.v.3	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	T.v.4	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	T.v.5	h. commerciale non diluée	h. commerciale non diluée
<i>Cinnamomum cassia</i>	C.ca.1	pure	pure
	C.ca.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	C.ca.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	C.ca.4	solvant non déterminé	solvant non déterminé
<i>Eucalyptus globulus</i>	E.g.1	pure	pure
	E.g.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	E.g.3	huile commerciale non diluée	huile commerciale non diluée
	E.g.4	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Myrtus communis</i> L.	M.c.1	pure	pure
	M.c.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Syzygium aromaticum</i> L.	S.a.1	pure	pure
	S.a.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale

Tableau 3.1 (suite)

Espèce végétale	Echantillon	NIR-TF	MIR-TF
<i>Syzygium aromaticum</i> L.	S.a.3	solvant non déterminé	solvant non déterminé
<i>Pinus halepensis</i>	P.h.1	pure	pure
	P.h.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	P.h.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Piper nigrum</i> L.	P.n.1	pure	pure
	P.n.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	P.l.1	pure	pure
	P.l.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	P.l.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	P.l.4	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Citrus limon</i> L.	C.l.1	pure	pure
	C.l.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
	C.l.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	C.l.4	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Citrus reticulata</i> L.	C.r.1	pure	pure
	C.r.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
<i>Citrus sinensis</i> L.	C.si.1	pure	pure
	C.si.2	solution d'h. minérale	solution d'h. minérale
<i>Curcuma longa</i> L.	C.lo.1	pure	pure
	C.lo.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	C.lo.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
<i>Zingiber officinale</i>	Z.o.1	pure	pure
	Z.o.2	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	Z.o.3	solution d'h. végétale	solution d'h. végétale
	Z.o.4	solvant non déterminé	solvant non déterminé

3.3.7 Confirmation de l'adultération des huiles essentielles commerciales en exploitant la soustraction entre les deux spectres IR

Comme a été indiqué précédemment, la présence d'huile végétale et minérale a été identifiée dans certains échantillons commerciaux d'huiles essentielles considérées dans cette étude en utilisant la spectroscopie NIR-TF et MIR-TF. La plupart des bandes spectrales ont été attribuées à une huile végétale ou minérale typique. Nous exploitons dans cette étude l'opération de soustraction entre deux spectres infrarouge pour détecter l'adultération des huiles essentielles dans des échantillons commerciaux.

A titre d'exemple, Les figure 3.17. (C) et (A) montrent les spectres NIR-TF et ATR-MIR-TF de l'huile essentielle commerciale de *S. aromaticum* L. (Clous de girofle) et celle de l'huile de tournesol, qui pourraient être suggérés comme solvant adultérant dans cet échantillon. En faisant la soustraction de l'huile de tournesol à celle de l'échantillon *S. aromaticum* L (Clous de girofle), on peut obtenir le spectre de soustraction (voir figure 3.17 (B) et (D) qui est assez similaire de celui de l'extrait pur obtenu par hydrodistillation. Cela confirme que l'échantillon commercial étudié correspond vraiment à une dilution de l'huile essentielle dans une matrice similaire à l'huile de tournesol. Les résultats de la soustraction des autres spectres des échantillons sont présentés dans l'appendice D.

Les résultats de la comparaison entre les spectres des huiles essentielles pures et des huiles essentielles commerciales après soustraction du solvant ajouté, une fois identifié, obtenus par NIR-TF et MIR-TF pour la détection de l'adultération de l'huile essentielle dans les échantillons commerciaux sont présentés dans le tableau 3.2. On peut conclure de ces résultats que de nombreux échantillons commerciaux sont clairement des solutions d'huiles essentielles pures dans un solvant (huile végétale ou minérale). La détection de l'huile pure dépend de la quantité ajoutée au solvant comme l'illustre le tableau 3.2, pour la détection de l'adultération des huiles essentielles pures dans les échantillons commerciaux. Il a été observé que la méthode de soustraction de spectres donne plus d'informations spectrales en exploitant la zone du MIR que celle du NIR.

Tableau 3.2 : Comparaison entre les spectres des huiles essentielles pures et des huiles essentielles commerciales après soustraction du solvant ajouté dans les deux zones spectrales NIR/MIR.

N°	Echantillon	Huile présent dans la matrice	Comparaison des spectres de soustraction avec ceux d'huile essentielles pures	
			(MIR-TF)	(NIR-TF)
01	Anis (P.a.2)	végétale	+	-
02	Anis (P.a.3)	végétale	-	-
03	Armoise (A.h.2)	végétale	-	-
04	Chamomille (M.ch.2)	minérale	+	-
05	Chamomille (M.ch.3)	végétale	-	-
06	Chamomille (M.ch.4)	végétale	-	-
07	Cannelle (C.ca.2)	végétale	+	+
08	Cannelle (C.ca.3)	végétale	-	-
09	Cannelle (C.ca.4)	solvant non déterminé	/	/
10	Carvi (C.c.2)	végétale	+	+
11	Carvi (C.c.3)	végétale	-	-
12	Celeri (A.g.2)	minérale	+	+
13	Citron(C.l.2)	minérale	+	+
14	Citron(C.l.3)	végétale	+	-
15	Citron (C.l.4)	végétale	+	-
16	Clous de girofle (S.a.2)	végétale	++	++
17	Clous de girofle (S.a.3)	solvant non déterminé	/	/
18	Cumin (C.cy.2)	végétale	-	-
19	Cumin (C.cy.3)	végétale	-	-
20	Curcuma (C.lo.2)	végétale	-	-
21	Curcuma (C.lo.3)	végétale	-	-
22	Cyprés (C.s.2)	végétale	-	-
23	Cyprés (C.s.3)	végétale	-	-
24	Eucalyptus (E.g.2)	minérale	+	+

Tableau 3.2 (suite)

N°	Echantillon	Huile présente dans la matrice	Comparaison des spectres de soustraction avec ceux d'huiles essentielles pures	
			(MIR-TF)	(NIR-TF)
25	Eucalyptus (E.g.3)	Pas de solvant	+	+
26	Eucalyptus (E.g.4)	végétale	-	-
27	Fenouil (F.v.2)	végétale	+	+
28	Juniper (J.c.2)	minérale	+	+
29	Juniper (J.c.3)	végétale	-	-
30	Gingembre (Z.o.2)	végétale	-	-
31	Gingembre (Z.o.3)	végétale	-	-
32	Gingembre (Z.o.4)	solvant non déterminé	/	/
33	Laurel (L.n.2)	minérale	+	-
34	Lavande (L.a.2)	minérale	+	+
35	Lavande (L.a.3)	minérale	+	-
36	Lavande (L.a.4)	végétale	+	-
37	Lavande (L.a.5)	végétale	-	-
38	Geranium (P.g.2)	Pas de solvant	+	+
39	Lentisque (P.l.2)	végétale	-	-
40	Lentisque (P.l.3)	végétale	-	-
41	Lentisque (P.l.4)	végétale	-	-
42	Mandarine (C.r.2)	minérale	-	-
43	Melisse (M.c. 2)	végétale	-	-
44	Menthe poivrée (M.p.2)	Végétale	+	+
45	Menthe poivrée (M.p.3)	Végétale	-	-
46	Menthe poivrée (M.p.4)	Pas de solvant	+++	+++
47	Menthe verte (M.s.2)	minérale	+	+
48	Menthe verte (M.s.3)	végétale	-	-
49	Menthe verte (M.s.4)	végétale	-	-

Tableau 3.2 (suite)

N°	Echantillon	Huile présente dans la matrice	Comparaison des spectres de soustraction avec ceux d'huiles essentielles pures	
			(MIR-TF)	(NIR-TF)
50	Persil (P.c.2)	Végétale	+	-
51	Persil (P.c.3)	Végétale	-	-
52	Myrte (M.c.2)	végétale	-	-
53	Orange (C.si.2)	minérale	+	+
54	Pin d'alep (P.h.2)	végétale	-	-
55	Pin d'alep (P.h.3)	végétale	-	-
56	Poivre noir (P.n.2)	végétale	+	+
57	Romarin (R.o.2)	minérale	+	-
58	Romarin (R.o.3)	minérale	+	-
59	Romarin (R.o.4)	végétale	-	-
60	Romarin (R.o.5)	végétale	-	-
61	Rue (R.m.2)	végétale	-	-
62	Rue (R.m.3)	végétale	-	-
63	Sauge (S.o.2)	minérale	-	-
64	Sauge (S.o.3)	minérale	+	-
65	Sauge (S.o.4)	végétale	-	-
66	Sauge (S.o.5)	végétale	-	-
67	Thym (T.v.2)	minérale	-	-
68	Thym (T.v.3)	minérale	+	+
69	Thym (T.v.4)	Végétale	-	-
70	Thym (T.v.5)	Pas de solvant	+++	+++

Note: (+++): accord parfait, (++) : bandes identifiées avec une faible intensité, (+) : présence de quelques bandes, (-) : absence des bandes.

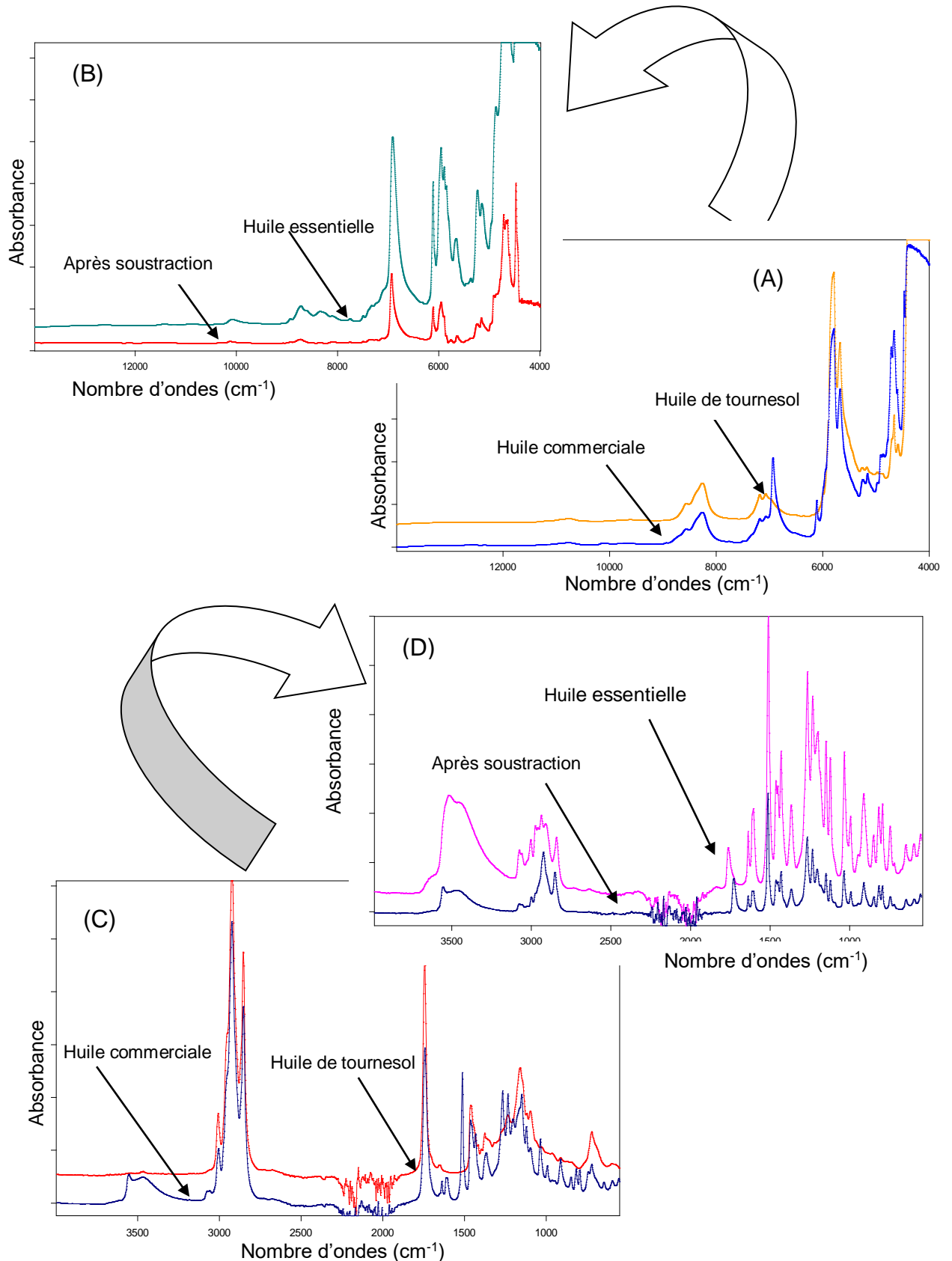


Figure 3.17 : Spectres NIR-TF (A) et ATR-MIR-TF (C) d'huile de tournesol et d'huile commerciale de clous de girofle. Spectres NIR-TF (B) et ATR-MIR-TF (D) d'huile essentielle pure de clous de girofle et la différence obtenue entre les spectres de l'huile commerciale et celui de tournesol.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différentes huiles considérées.

3.4 Conclusion

Les résultats obtenus à partir de cette étude montrent la haute performance de la spectroscopie NIR-TF et ATR-MIR-TF entant que méthodologies rapides, une instrumentation à coût relativement faible, offrant une alternative aux procédures basées sur l'utilisation de la chromatographie, non destructives et écologiques pour la détection de l'adultération dans les échantillons commerciaux d'huiles essentielles.

En général, les deux techniques donnent de bons résultats pour l'identification des solvants ajoutés dans les échantillons commerciaux. Cependant, la méthode de soustraction des spectres a fourni de meilleurs résultats avec ATR-MIR-TF qu'avec le NIR-TF pour la détection des huiles essentielles pures dans les échantillons adultérés.

D'autres études sont nécessaires pour exploiter d'avantage les performances de la spectroscopie NIR-TF et ATR-MIR-TF pour la détermination quantitative de la quantité d'huiles essentielles pures réellement présente dans les échantillons commerciaux adultérés et pour ce faire, on procède à l'utilisation d'une calibration multivariée, basée sur des niveaux de concentrations connues d'échantillons d'huiles essentielles qui permettra d'évaluer quantitativement ce paramètre.

CHAPITRE 4

ANALYSE DE L'HUILE ESSENTIELLE *SYZYGIUM AROMATICUM* L. DANS DES ECHANTILLONS COMMERCIAUX ADULTERES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER

4.1 Introduction

Syzygium aromaticum L. synonyme (*Eugenia aromatica* ou *Eugenia caryophyllata*) communément appelé clous de girofle, appartenant à la famille des Myrtaceae est originaire des îles Maluku dans l'est de l'Indonésie. Maintenant, il est largement cultivé dans les pays tropicaux et subtropicaux tels que l'Inde, la Malaisie, le Sri Lanka, le Madagascar et la Tanzanie [122-124].

L'huile de clous de girofle fait partie de la catégorie des huiles essentielles et a été classée «généralement reconnue comme sans danger» [generally recognized as safe (GRAS)] par l'administration américaine de denrées alimentaires et des médicaments [United States Food and Drug Administration (FAD)] [122, 125, 126]. L'huile essentielle de clous de girofle est utilisée dans le monde entier comme aromatisant dans les aliments. Elle est reconnue pour ses diverses activités biologiques telles que les propriétés antibactériennes, antifongiques, insecticides et antioxydantes. Elle a également plusieurs effets thérapeutiques, notamment antiphlogistique, analgésique, antivomissant, antiseptique et antispasmodique [125-129].

De nombreux facteurs, y compris la variation génétique, l'écotype ou la variabilité des plantes, d'emplacement géographique, les variations saisonnières, le stress pendant la croissance ou la maturité, le séchage et le stockage après la récolte, ainsi que les techniques d'extraction utilisées affectent la composition chimique d'une huile essentielle [112, 130]. Les huiles essentielles peuvent contenir plus de soixante composants différents, les constituants principaux

peuvent aller jusqu'à 90%, tandis que d'autres composants ne sont présents qu'à l'état de traces [7, 131]. L'huile essentielle de clous de girofle contient principalement quatre composés majoritaires en présence d'autres composés de faibles proportions, tels que l'eugénol suivi de l'acétate d'eugénol, du β -caryophyllène et de l' α -humulène [122, 131, 132]. L'eugénol est considéré comme le principal constituant de l'huile de clous de girofle représentant plus de 50% de la composition totale extraite [133]. Les proportions d'huile de clous de girofle varient considérablement pour les raisons susmentionnées. Par exemple, l'une des études a montré que l'eugénol présentant 47,64%, avec 34,10% d'alcool benzylique et 1% de caryophyllène [134], alors qu'une autre étude a révélé une concentration élevée d'eugénol de 88,58%, d'acétate d'eugényle de 5,62%, le β -caryophyllène de 1,39% et de 0,19% de l' α -humulène [135].

L'huile de clous de girofle est principalement obtenue par hydrodistillation, entraînement à la vapeur d'eau ou extraction par solvant [128, 136]. Cependant, ces procédés traditionnels peuvent avoir des inconvénients tels que la dégradation thermique, l'hydrolyse, la solubilisation dans l'eau de certains constituants, la durée d'extraction prolongée et la pollution par des résidus des extraits provenant par solvants [128, 136, 137].

De nouvelles techniques d'extraction d'huile essentielle s'inscrivant dans le concept d'approches vertes, ont été développées, ces dernières reposent sur la capacité de produire des huiles essentielles présentant les mêmes qualités et propriétés sensorielles que celles obtenues par les techniques classiques mais plus rapidement et à moindre coût [138, 139]. Parmi ces techniques, l'extraction par fluide supercritique (SFE) qui a été reconnue comme une technique peu nuisible à l'environnement [122, 128, 139]. Plusieurs études de recherche concernant l'extraction de l'huile essentielle de clous de girofle ont porté sur la technique d'extraction par fluide supercritique (SFE) [140, 141]. Le dioxyde de carbone sous forme de fluide supercritique (SC-CO₂) a été évalué dans différents travaux [133, 136, 137, 142-145].

L'extraction assistée par ultrasons (EAU) est une autre technique novatrice qui a été utilisée pour séparer l'huile essentielle de clous de girofle. L'obtention d'un rendement plus élevé et une teneur plus importante en fraction phénolique totale dans l'extrait brut a prouvé que l'EAU permet l'extraction de l'huile des clous de girofle plus facilement et efficacement [132]. Une étude a révélé que l'extraction de l'huile de clous girofle à l'aide du dioxyde de carbone supercritique assisté par ultrasons (USC-CO₂) a augmenté l'efficacité des processus par rapport au dioxyde de carbone supercritique classique (SC-CO₂) [133].

L'extraction assistée par micro-ondes (EAM) a été largement utilisée dans l'extraction des huiles essentielles de différentes matrices végétales en raison de ses nombreux avantages, notamment la réduction de la consommation d'énergie et l'utilisation de solvants toxiques [146]. Cette technique a été utilisée pour isoler l'huile essentielle de clous de girofle de haute qualité avec moins de consommation d'eau, de temps et d'énergie, ainsi qu'un rejet de CO₂ réduit par rapport à la technique d'hydrodistillation [122].

Habituellement, l'analyse fiable des huiles essentielles pour l'identification de composés chimiques est réalisée en utilisant des méthodes chromatographiques [147]. Selon la littérature, la plupart des études montrent que la composition chimique de l'huile essentielle de clous de girofle a été obtenue en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tant que méthode de détection sensible [123, 128, 131, 136, 137, 139, 143, 148, 149].

En ce qui concerne l'utilisation de la spectroscopie vibrationnelle, la spectroscopie Raman est considérée comme une technique non destructive, applicable à presque toutes les disciplines des sciences naturelles [147]. Des études antérieures montrent l'utilisation de la spectroscopie Raman pour évaluer la qualité et distinguer différents types d'huiles essentielles telles que les huiles de l'anis (*Pimpinella anisum*), le géranium (*Pelargonium graveolens*), de gingembre (*Zingiber officinale*), de patchouli (*Pogostemon cablin*), d'eucalyptus (*Eucalyptus*

globolus), d'orange (*Citrus sinensis*), de sauge (*Salvia officinalis*), de thym (*Thymus vulgaris*) et la cannelle (*Cinnamomum cassia*) [150-152]. Les grands avantages de la spectroscopie Raman font de cette technique une option analytique exceptionnelle et appropriée pour le contrôle qualité dans les industries impliquées dans l'extraction de l'huile essentielle de clous de girofle [147].

Certaines études ont été menées pour étudier le contenu en terpénoïdes dans les plantes aromatiques en utilisant les méthodes chimiométriques couplées à la spectroscopie infrarouge. Dans ces études, l'eucalyptol, le linalol, l'estragole, l'eugénol et le méthyleugénol ont été quantifiés en utilisant la spectroscopie réflexion totale atténuée/infrarouge à transformée de Fourier (ATR-IRTF) et l'infrarouge proche (NIR) dans des chimotypes de basilic (*Ocimum basilicum*) en exploitant un modèle de calibration (PLS) [152].

Dans une autre étude, la spectroscopie proche infrarouge associée à une analyse chimiométrique a été utilisée pour quantifier les principaux composés de la lavande (*Lavandula angustifolia*), les huiles essentielles de lavandin [153]. Récemment, une méthode d'analyse chimiométrique dans le domaine spectral NIR a été développée afin de fournir une analyse rapide, simple et non destructive des composés terpénoïdes dans les plantes aromatiques, comprenant le thym (*Thymus vulgaris*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), le basilic (*Ocimum basilicum*), le genévrier (*Juniperus communis*), le poivre noir (*Piper nigrum*), le laurier (*Laurus nobilis*), la lavande (*Lavandula latifolia*), la menthe verte (*Mentha spicata*) et le gingembre (*Zingiber officinale*) [154].

Le but de la présente étude est d'évaluer le potentiel de l'application de la spectroscopie NIR et MIR en utilisant la PLS pour la détermination directe de la teneur réelle de l'huile essentielle de clous de girofle (*Syzygium aromaticum* L.) dans des échantillons commerciaux adultérés.

4.2 Partie expérimentale

4.2.1 Matériel et réactifs

Le matériel végétal choisi dans cette étude est représenté par les clous de girofle (*Syzygium aromaticum* L.). Plusieurs échantillons de clous de girofle secs ont été achetés auprès des arboristes (Algérie, Espagne). Ils ont été récupérés dans des sacs propres et scellés. En utilisant un broyeur électrique, chaque échantillon de la matière végétale a été pesé et finement broyé séparément, pour réduire la taille, et améliorer par conséquent les rendements d'extraction pour leur ultérieure analyse.

Les échantillons d'huiles essentielles commerciales de l'espèce végétale étudiée, clous de girofle, ont été achetés sur les marchés locaux de (Blida, Algérie) et de (Valence, Espagne).

Les étalons utilisés lors de cette étude, eugénol de pureté 99% et acétate d'eugénol de pureté 98%, ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich [(Singapour, Indonésie) et (Shanghai, Chine)] respectivement. L'étalon terpinén-4-ol 95% de pureté obtenu de Sigma Aldrich (Madrid, Espagne) a été employé comme étalon interne dans l'analyse chromatographique.

Le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) à 99% fourni par Sigma-Aldrich (Vienne, Autriche), a été utilisé pour sécher des échantillons d'huiles essentielles pures après le processus d'extraction.

Le *n*-Hexane à 96% de pureté obtenu auprès de Scharlau (Barcelone, Espagne), il a été utilisé pour la dilution des étalons et des échantillons dans la méthode chromatographique.

Les huiles végétales à savoir: Huile de tournesol, de maïs et d'olive, ont été obtenues auprès du marché local espagnol et ont été utilisées pour la préparation des échantillons.

4.2.2 Appareillage et méthodes

Un spectrophotomètre proche infrarouge à transformée de Fourier (NIR-FT) modèle Analyzeur multi-usages (MPA) de marque Bruker (Brême, Allemagne) a été utilisé pour enregistrer les spectres de NIR-FT. Cet instrument est équipé d'une source NIR, d'un séparateur de faisceau en quartz et d'un détecteur PbS. Le logiciel OPUS (version 6.5) de Bruker (Brême, Allemagne) a été utilisé pour le contrôle des mesures, l'acquisition des données et le traitement des spectres. Pour les mesures de transmission, on a utilisé des flacons en verre transparent d'un diamètre interne de 6 mm.

Pour les mesures dans le domaine de moyen infrarouge, un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (MIR-FT), modèle Tensor 27 de marque Bruker (Brême, Allemagne), équipé d'un détecteur DLaTGS (Deuterated Lanthanum α Alanine doped TriGlycine Sulphate) a été utilisé. Des échantillons d'huile de clous de girofle, purs et commerciaux ont été mesurés en mode de réflexion totale atténuée (ATR) en utilisant un accessoire DuraSampleIR avec une plaque diamantée à neuf reflets / ZnSe DuraDisc de Smiths Detection Inc (Warrington, Royaume-Uni). Pour le contrôle des mesures et l'acquisition des données, le logiciel OPUS (version 6.5) de Bruker (Brême, Allemagne) a été utilisé.

Un système de chromatographie en phase gazeuse 7890A Agilent Technologies (Palo alto, Californie, Etats-Unis), équipé d'une colonne capillaire Zebron ZB-5MS (30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m) et d'un détecteur quadripolaire à triple axe, Agilent Technologies 5975 inerte XL EI/ CL MSD a été utilisé pour l'analyse des échantillons commerciaux. Un échantillonneur d'espace de tête (Head space), Agilent Technologies 7697 A est lié au système chromatographique pour l'analyse des échantillons.

Un four à micro-ondes Orbegozo (Murcie, Espagne), d'une puissance de 700 W (puissance maximale) et une fréquence de 2450 MHz a été utilisé pour l'extraction de l'huile essentielle de clous de girofle.

4.2.3 Extraction d'huile essentielle

Trois méthodes d'extraction ont été utilisées lors de cette étude pour isoler l'huile essentielle de clous de girofle, afin de la comparer aux échantillons commerciaux de clous de girofle.

- Extraction par hydrodistillation

Des échantillons de clous de girofle, sont soumis à une hydrodistillation conventionnelle. Le procédé consiste à immerger une quantité de la matière végétale (100 g) dans un ballon de 2 L en 2/3 d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition pendant 3 heures en utilisant un chauffe-ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le réfrigérant et elles se condensent. Le distillat « huile+ eau » est récupéré dans une ampoule à décanter. En raison de la différence de densité, l'huile de clous de girofle se dépose au-dessous de la phase aqueuse (eau), se sépare par décantation et récupérée sans l'utilisation d'un solvant organique, ensuite elle est séchée par un déshydratant (Na_2SO_4) pour éliminer les traces d'eau. Les huiles essentielles obtenues sont conservées dans des flacons à l'abri de la lumière et à une température de 4-5°C.

- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans cette technique d'extraction, la matière végétale utilisée, clous de girofle, est introduite dans une ampoule à décanter modifié pour le montage de l'entraînement à la vapeur et traversée par un courant de vapeurs d'eau issue de l'ébullition de l'eau dans un ballon de 2 L. Les vapeurs chargées des composés volatiles sont condensées dans le réfrigérant et le mélange « eau+ huile » est récupéré dans une ampoule à décanter. L'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par sa différence de densité et elle se dépose dans la partie inférieure de l'ampoule à décanter, aucun solvant n'a été utilisé lors de la séparation. Ensuite elle est séchée par un déshydratant (Na_2SO_4). Les huiles essentielles récupérées sont conservées dans des flacons à l'abri de la lumière et à une température de 4-5°C.

- Extraction assistée par micro-ondes

Ce procédé a été réalisé dans un four à micro-ondes domestique avec un dispositif d'extraction composé de deux erlenmeyer, une colonne vigreuse et de trois pinces de sécurité (figure 4.1). Dans cette technique, le matériel végétal (10 g) est placé dans une erlenmeyer de 100 mL [155]. La matrice doit être humide sans pour autant qu'elle soit tremper dans l'eau. Le dispositif a été placé dans la cavité à four micro-ondes, la durée d'extraction est fixée à 10 minutes de chauffage à une puissance minimale du four micro-ondes.

L'huile essentielle de clous de girofle obtenue a été séparée de l'eau par simple décantation ensuite séchée en utilisant un desséchant de type sulfate de sodium (Na_2SO_4) afin d'éliminer toute trace d'eau. Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole. L'extraction a été répétée trois fois en raison d'augmenter le rendement d'extraction. Les huiles essentielles récupérées sont conservées dans des flacons à l'abri de la lumière et à une température de 4-5°C.



Figure 4.1 : Dispositif expérimental d'extraction assistée par micro-ondes.

4.2.4 NIR-TF procédure

Les échantillons d'huile ont été directement transférés dans des flacons cylindriques en verre de 1 mL avec une bande passante de 6 mm. Les spectres ont été obtenus en mode absorption en accumulant 50 scans par spectre, avec une résolution nominale de 4 cm^{-1} dans une région spectrale entre 14000 et 4000 cm^{-1} . Le spectre de background d'un flacon cylindrique de verre vide a été acquis

dans les mêmes conditions instrumentales. Cinq mesures dépendantes de chaque échantillon ont été obtenues en faisant pivoter la position du flacon d'échantillon entre les répliques afin d'assurer la meilleure représentativité. Les cinq spectres individuels de chaque échantillon ont été utilisés pour construire des modèles de PLS pour des analyses de prédiction.

4.2.5 ATR-MIR-TF procédure

Le travail a été réalisé en plaçant dix microlitres (10 μL) de chaque échantillon d'huile directement sur la cellule cristalline au diamant à réflexion totale atténuée (ATR) et recouverte d'un couvercle de verre pour éviter l'évaporation de l'échantillon. Les spectres ATR-MIR-TF ont été enregistrés dans une gamme spectrale de 4000 à 550 cm^{-1} en accumulant 50 scans par spectre avec une résolution nominale de 4 cm^{-1} . Le spectre de background de la cellule ATR a été acquis, dans les mêmes conditions instrumentales, à partir du cristal ATR nettoyé immédiatement avant l'acquisition du spectre de chaque échantillon. Un spectre du blanc a été enregistré pour assurer l'absence d'effets mémoire. Les cinq spectres individuels ATR-MIR de chaque échantillon ont été utilisés pour construire des modèles de régression pour des analyses de prédiction.

4.2.6 Traitement des données

Le traitement des données chimiométriques, y compris la quantification à l'aide de la régression des moindres carrés partiels PLS, a été effectué à l'aide de l'outil mathématique QUANT2 fourni par le logiciel OPUS (version 6.5) de Bruker (Brême, Allemagne). Les modèles PLS-NIR et PLS-ATR-MIR ont été développés à partir des données spectrales de 12 mélanges binaires d'échantillons d'huile essentielle de clous de girofle et d'huile de tournesol préparés en mélangeant des volumes appropriés de chacun, en tenant compte des différentes régions spectrales et en testant différents prétraitements spectraux afin de sélectionner le meilleurs modèle de calibration, à savoir: le centrage moyen, la correction d'offset, la soustraction d'une droite, la normalisation vectorielle, la normalisation min-max, la correction multiplicative de diffusion, première et seconde dérivées, ainsi que leur combinaison. Le nombre optimal de variables latentes a été déterminé pour obtenir : i) le coefficient de régression le plus élevé pour la calibration (R^2_{cal}) et la

validation croisée (R^2_{cv}), ii) l'erreur quadratique moyenne la plus faible pour la calibration (RMSEC) et pour la validation croisée (RMSECV), iii) Déviation résiduelle de prédiction (RPD) adéquate.

4.2.7 Méthode de référence chromatographique (CG-SM)

Dans cette étude, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection par la spectrométrie de masse (CG-SM) et (HS-GC-MS) a été utilisée comme méthode de référence pour l'analyse des échantillons d'huiles essentielles commerciales de clous de girofle. Pour la méthodologie (HS-GC-MS), une quantité appropriée de quatre échantillons (He. Com. C .g. 1-4), comprise entre 50 et 70 mg a été pesée avec précision dans une fiole jaugée, diluée dans 10 mL d'hexane, un volume de 1 mL de ces derniers a été dilué à nouveau dans 10 mL d'hexane. Un volume de 100 μ L d'échantillons dilués a été introduit dans des flacons en verre de 10 mL. La vaporisation directe des composés à partir de flacons en verre bouchés a été réalisée à 175 °C pendant 8 minutes. La fraction espace de tête a été injectée à travers une boucle d'un volume de vapeur de 1 mL à 180 °C en mode split (1:8) à 225 °C, en utilisant un débit constant de 1,3 mL min^{-1} de l'hélium comme gaz vecteur.

Pour la deuxième méthodologie, la même quantité d'échantillons (He. Com. C. g. 2-9) que la méthodologie précédente, a été prise et pesée avec précision dans une fiole jaugée, diluée dans 10 mL d'hexane, à l'exception de trois échantillons (C. Com. C. g. 1, 10 et 11), après leur dilution dans 10 mL d'hexane, un volume de 1 mL de ces derniers a été dilué à nouveau dans 10 mL d'hexane. Un volume de 108 μ L de 1,86 mg mL^{-1} de standard interne est introduit dans la solution finale. Un volume de 1 μ L de cette dernière a été injecté en mode splitless à 200 °C en utilisant un débit constant d'hélium de 1,1 mL $^{-1}$ comme gaz vecteur.

Le programme de température de four du chromatographe en phase gazeuse utilisé était le même pour les deux méthodologies et était initialement à une température de 60 °C, maintenue pendant 5 minutes, augmentée à une vitesse de 10°C min^{-1} jusqu'à 230 °C et maintenue pendant 5 minutes. Les

températures de la ligne de transfert et de la source étaient respectivement de 280 et 276 °C.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Détermination d'huile essentielle pure de clous de girofle dans des échantillons commerciaux par spectroscopie NIR-TF

4.3.1.1 Spectres NIR-TF des huiles essentielles pures de clous de girofle

La figure 4.2 montre les spectres NIR-TF d'échantillons d'huiles essentielles pures de clous de girofle obtenus par hydrodistillation, entraînement à la vapeur et extraction assistée par micro-ondes, dans la région comprise entre 14000 et 4000 cm^{-1} . Comme on peut le constater, les spectres des huiles essentielles analysées sont dominés par des harmoniques et des différentes combinaisons de C—H.

L'absorbance de certaines de ces bandes autour de 8740 et 8354 cm^{-1} est associée au second harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans les composés aromatiques et dans le groupement $-\text{CH}_3$ respectivement. Les bandes les plus intenses apparaissent à 6913 cm^{-1} en raison du premier harmonique d'élongation du groupement hydroxyle (OH) de l'eugénol en tant que composé majoritaire de l'huile essentielle de clous de girofle (voir figure insérée dans la figure 4.2).

Des pics intenses à 6115 et à 5958 cm^{-1} résultent du premier harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans le groupement $=\text{CH}_2$ et des composés aromatiques alors que ceux à 5891 et 5660 cm^{-1} sont dues au premier harmonique d'élongation de C—H dans les groupements $-\text{CH}_3$ et $-\text{CH}_2$, respectivement. D'autres pics à 5250 et 5134 cm^{-1} proviennent du deuxième harmonique du groupement C=O, qui peuvent représenter l'acétate d'eugénol étant l'un des principaux composés de l'huile essentielle de clous de girofle (voir figure insérée dans la figure 4.2) et à la déformation d'O—H, respectivement.

De larges bandes apparaissent à 4740 cm^{-1} sont associées aux bandes combinées des vibrations d'élongation de C—H et de C—O.

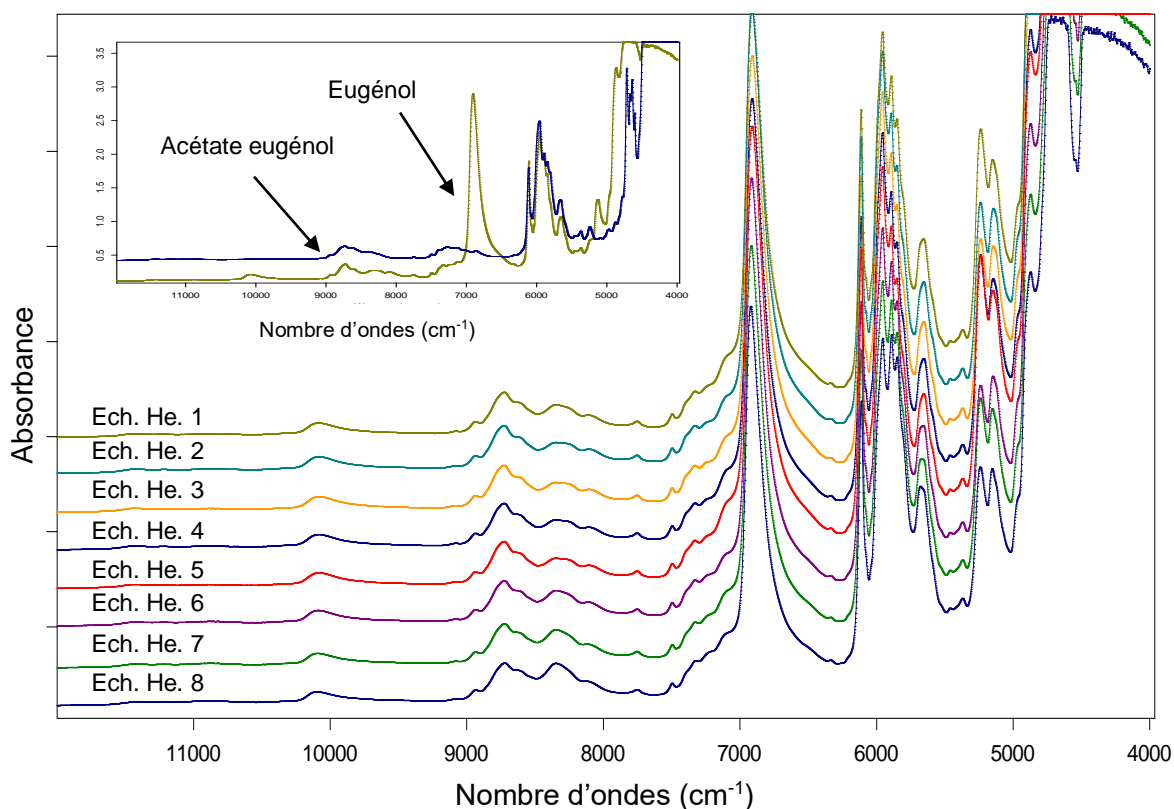


Figure 4.2 : Spectres NIR-TF des différents échantillons d'huiles essentielles de clous de girofle obtenus par hydrodistillation (Ech. He. 1-4), entrainement à la vapeur d'eau (Ech. He. 5-6) et extraction assistée par micro-ondes (Ech. He. 7-8).
Figure insérée: Spectres des standards eugénol et acétate d'eugénol pure.
Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons considérés.

4.3.1.2 Effet du processus d'extraction de l'huile essentielle de clous de girofle sur l'analyse par spectroscopie NIR-TF

Le rendement, le temps d'extraction et la composition chimique des huiles essentielles sont fortement influencés par les conditions environnementales, la variété génétique et l'organe considéré de la plante, dépendent également de la procédure d'extraction [139, 156]. Dans cette étude, les huiles essentielles de clous de girofle ont été obtenues à partir de différents échantillons de clous de girofle, en utilisant différentes méthodes d'extraction.

Des séries d'étalonnage préparées avec des proportions volumiques différentes (v/v) en huile essentielle, obtenues à partir de divers échantillons de clous de girofle et procédés d'extraction, dans l'huile de tournesol et ont été mesurées dans les mêmes conditions spectrales. Les meilleures droites d'étalonnage ont été obtenues en utilisant la hauteur du pic à 6936 cm^{-1} , corrigées avec une ligne de base établie entre 7020 et 6600 cm^{-1} . Les résultats regroupés dans le tableau 4.1 mettent en évidence le faible effet de l'origine de l'échantillon et le procédé d'extraction sur les spectres NIR-TF de l'huile essentielle de clous de girofle. Cependant, des extraits fraîchement préparés par extraction assistée par micro-ondes ont fourni une variabilité relative moyenne de l'ordre de 6% par rapport aux pentes des droites d'étalonnages des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation et entrainement à la vapeur.

Tableau 4.1 : Droites d'étalonnage de l'huile essentielle de clous de girofle obtenues par différents processus d'extraction, dans l'huile de tournesol par NIR-TF.

Huile essentielle pure (lot/extraction)	Analyse NIR-TF	
	Droite d'étalonnage $A = a C + b$	R^2
01-HD	$A = 0,0319 C + 0,0018$	0,999
02-HD	$A = 0,0324 C + 0,0046$	0,999
03-HD	$A = 0,0351 C + 0,0016$	0,999
04-HD	$A = 0,0335 C + 0,0030$	0,998
05-EV	$A = 0,0342 C + 0,0055$	0,996
06-EV	$A = 0,0330 C + 0,0059$	0,998
07-MO	$A = 0,0330 C - 0,0074$	0,999
08-MO	$A = 0,0298 C - 0,0109$	0,999

Note: Le procédé d'extraction correspond à (HD) : Hydrodistillation, (EV) : Entrainement à la vapeur, (MO) : Extraction assistée par micro-ondes.

Les mesures dans le NIR-TF correspondent à la hauteur du pic à 6936 cm^{-1} , avec une ligne de base stabilisée entre 7020 et 6600 cm^{-1} .

Niveau de concentration employé pour HD et EV jusqu'à 10%, pour MO jusqu'à 7% dans l'huile de tournesol.

4.3.1.3 Spectres NIR-TF des huiles essentielles commerciales de clous de girofle

Les figures 4.3A et 4.3B présentent les spectres NIR-TF d'échantillons commerciaux de l'huile essentielle de clous de girofle obtenus dans les mêmes conditions que les échantillons purs dans la région comprise entre 14000 et 4000 cm^{-1} . Dans la figure 4.3A, sont rassemblés les échantillons du premier groupe indiquant la même allure des spectres et qui présentent une absorption à 8261 cm^{-1} résultant du deuxième harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans le groupement $-\text{CH}_2$. D'autres à 7181 et 7075 cm^{-1} correspondent à la combinaison des bandes de C—H, tandis que celles à 6937 et à 6113 cm^{-1} sont associées respectivement au premier harmonique des vibrations d'élongation d'O—H et de C—H dans le groupement $-\text{CH}_2$. Les pics à 5809 et 5687 cm^{-1} proviennent du premier harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans les groupements $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{HC}=\text{CH}$. A 4662 cm^{-1} , les spectres montrent des petites bandes qui sont dues à des vibrations d'élongation de C—H et de C=O.

Comme on peut l'observer, les échantillons fournissent des spectres différents de ceux des huiles essentielles pures obtenues par les différentes méthodes d'extraction utilisées dans cette étude (voir figure insérée dans la figure 4.3B). On peut donc en conclure que ces échantillons commerciaux pourraient avoir quelque chose de plus que l'huile essentielle de clous de girofle. En fait, il a été observé un bon accord avec le spectre de l'huile de tournesol obtenue dans les conditions précitées (voir figure insérée dans la figure 4.3A).

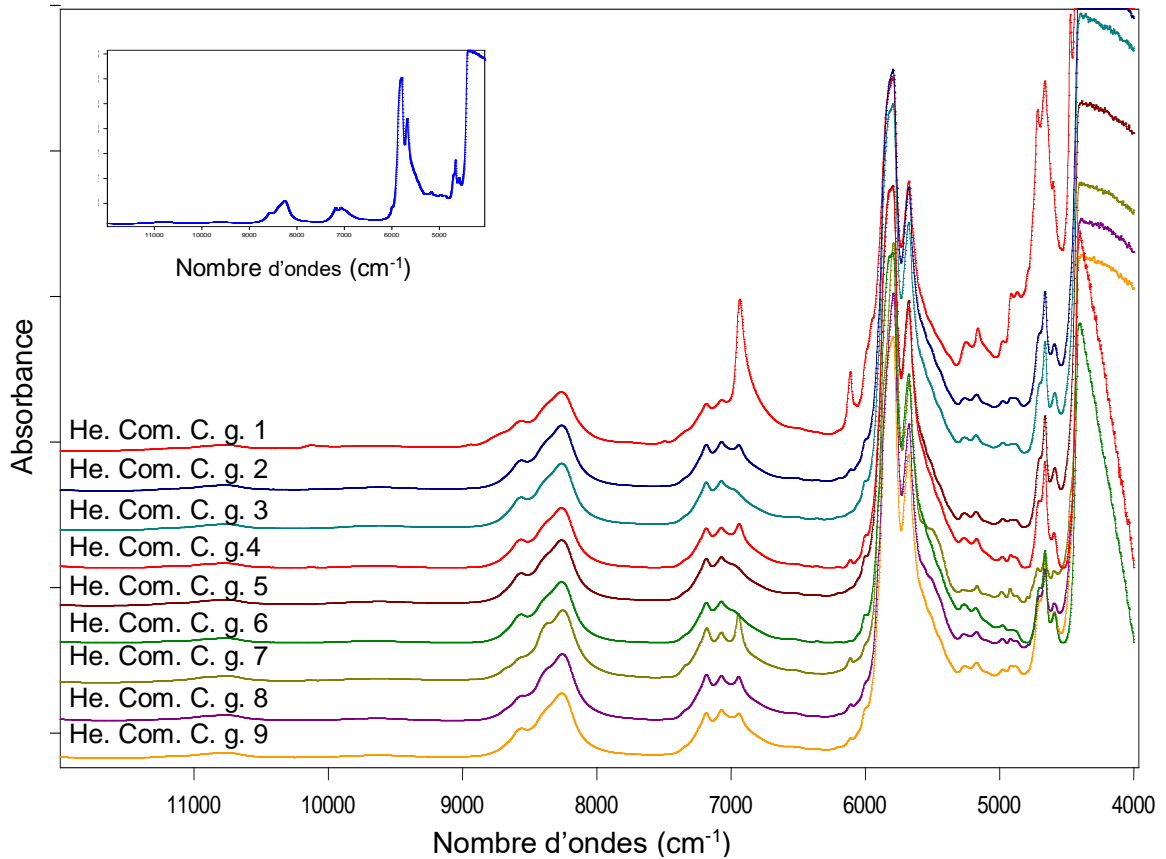


Figure 4.3A : Spectres NIR-TF d'huiles essentielles commerciales de clous de girofle présentant de grandes similitudes avec les bandes d'huile végétale: (He. Com. C. g. 1-9). Figure insérée: Spectre de l'huile de tournesol.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons considérées.

La figure 4.3B présente le deuxième groupe d'échantillons commerciaux d'huile essentielle de clous de girofle. Comme on peut le voir, les spectres des deux échantillons montrent une similarité avec celui de l'huile essentielle pure (voir figure insérée dans la figure 4.3B). Ils représentent les mêmes bandes caractéristiques. On peut donc en conclure que les solvants sont absents dans les échantillons commerciaux des huiles de clous de girofle susmentionnés.

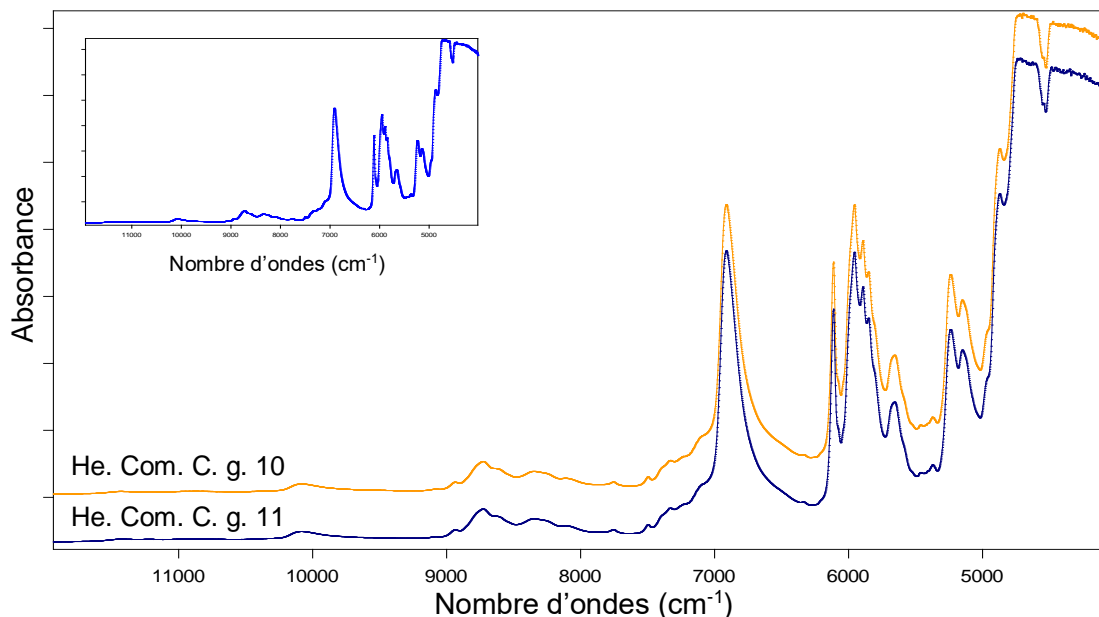


Figure 4.3B : Spectres NIR-TF d'huiles essentielles commerciales de clous de girofle présentant de fortes similitudes avec les bandes d'huile essentielle pure: (He. Com. C. g. 10-11).

Figure insérée: Spectre de l'huile essentielle pure de clous de girofle.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons considérés.

4.3.1.4 Analyse qualitative des échantillons d'huile essentielle commerciale de clous de girofle par spectroscopie NIR-TF

Comme on peut l'observer sur la figure 4.4, certains spectres obtenus après la soustraction spectrale entre des échantillons commerciaux d'huile essentielle et de l'huile de tournesol sont assez similaires à celui d'une huile essentielle pure avec un niveau de dilution différent. Ce résultat confirme que ces échantillons ne représentent pas seulement l'huile essentielle de clous de girofle mais sont probablement une dilution d'huile essentielle pure ou d'eugénol dans une huile végétale. Il a été remarqué que d'autres spectres ne présentent pas de bandes importantes dans la région du proche infrarouge en raison de la faible quantité d'huile essentielle ou de son absence. La présence d'un autre composé étranger peut également être observée pour deux échantillons (He. Com. C. g. 7 et He. Com. C. g. 8) présentant des bandes, situées à 5787, 5673 et 5478 cm^{-1} , différentes de celles de l'huile essentielle pure.

En général, on peut conclure à partir des résultats obtenus que ces échantillons commerciaux sont, dans le meilleur des cas, des solutions diluées d'huiles essentielles pures dans un solvant.

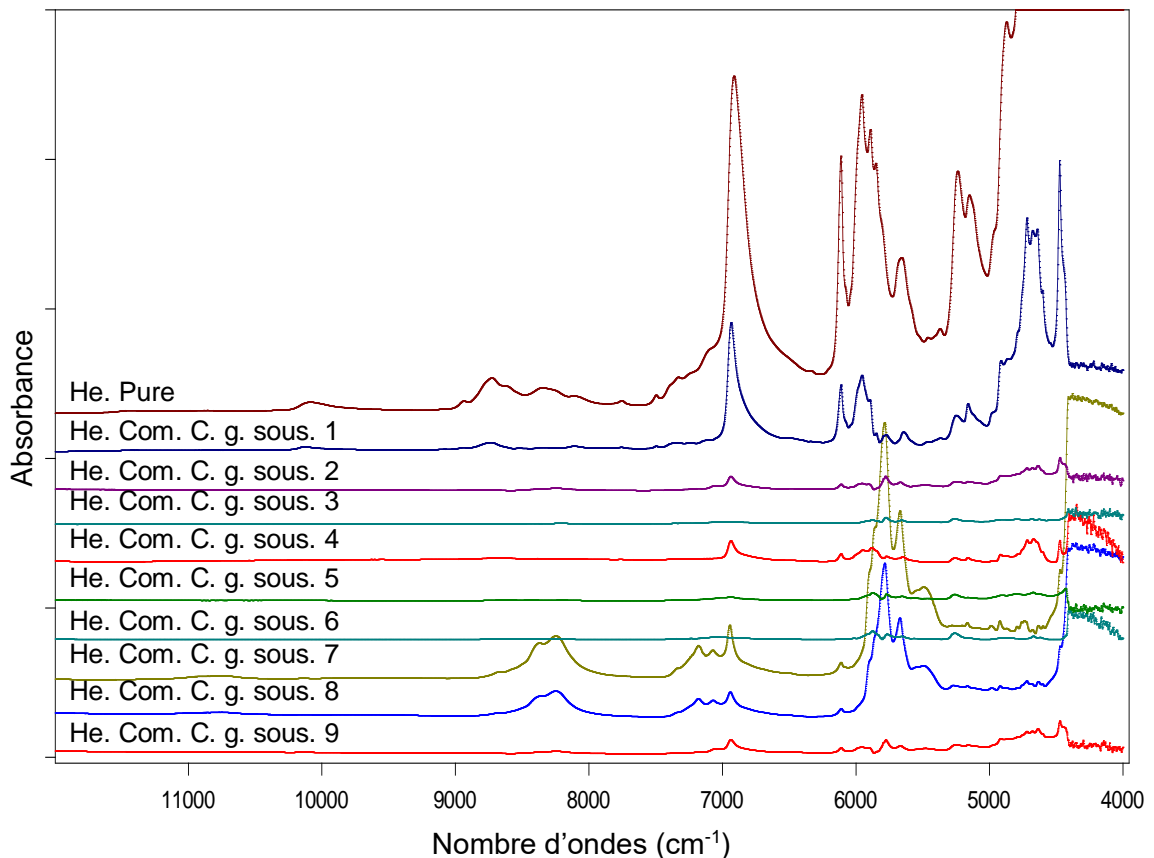


Figure 4.4 : Spectres NIR-TF de l'huile essentielle de clous de girofle pure (He. Pure) et de la soustraction entre les huiles commerciales (He. Com. C. g.1-9) et l'huile de tournesol (He. Com. C. g. Sous. 1-9).

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons considérés.

4.3.1.5 Effet du solvant (huile végétale) dans l'analyse des huiles essentielles commerciales de clous de girofle sur l'analyse par spectroscopie NIR-TF

Comme il a été mentionné précédemment, l'huile végétale a été détectée dans la plupart des échantillons commerciaux d'huiles essentielles de clous de girofle considérées dans cette étude. Cependant, le type d'huile végétale utilisée dans l'adultération reste inconnu. De ce fait, il est important de vérifier l'effet de la nature de l'huile végétale sur la quantification de l'huile essentielle de clous de

girofle présente réellement dans des échantillons commerciaux. Pour cela, les huiles essentielles de clous de girofle ont été analysées globalement sous forme d'eugénol, car ce dernier est leur produit majoritaire.

La figure 4.5 présente les spectres NIR-TF de trois différents types d'huiles végétales considérées dans cette étude, y compris l'huile de tournesol, de maïs et l'huile d'olive dans la région comprise entre 12000 et 4000 cm^{-1} . Les bandes d'absorbance autour de 8584 et 8266 cm^{-1} sont associées aux vibrations d'élongation de C—H du deuxième harmonique dans les groupements —CH₃ et —CH₂, tandis que celles autour de 7194 et 7081 cm^{-1} sont dues à la bande combinée de C—H. Les bandes à 6006 cm^{-1} sont causées par le premier harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans le groupement =CH₂. Deux bandes à 5794 et 5684 cm^{-1} sont attribuées au premier harmonique des vibrations d'élongation de C—H dans le groupement —CH₂. Les petits pics à 5269 et 5180 cm^{-1} sont dus au second harmonique des vibrations d'élongation du groupement C=O alors que ceux de 4706 et 4663 cm^{-1} sont dus à des vibrations d'élongation de C—H et de groupement C=O. De plus, des vibrations d'élongation asymétriques de C—H dans —HC=CH— sont observées à 4596 cm^{-1} [157, 158].

Trois séries de calibration ont été préparées à partir de mélanges d'eugénol et de différentes huiles alimentaires en différentes proportions (v/v), de 0% à 22% d'eugénol. Une mesure de la surface d'une bande limitée entre 7000 et 6800 cm^{-1} , spécifique à l'eugénol, (voir figure insérée dans la figure 4.2) a été utilisée afin d'obtenir les meilleures droites d'étalonnage. Les résultats de calibration sont rapportés dans le tableau 4.2.

Sachant que les huiles végétales ont des groupes fonctionnels communs, donnant des spectres infrarouge similaires avec les mêmes bandes caractéristiques, et de petites différences de sensibilité de ces bandes (voir figure 4.5) [159], les valeurs constantes des pentes des droites d'étalonnage obtenues par simple régression quadratique moyenne, indiquent que la présence de l'huile végétale n'a présenté aucune interférence sur la bande spécifique de l'eugénol par

conséquent la nature de l'huile végétale n'a pas d'effet sur la détermination de l'huile essentielle par la spectroscopie NIR-TF.

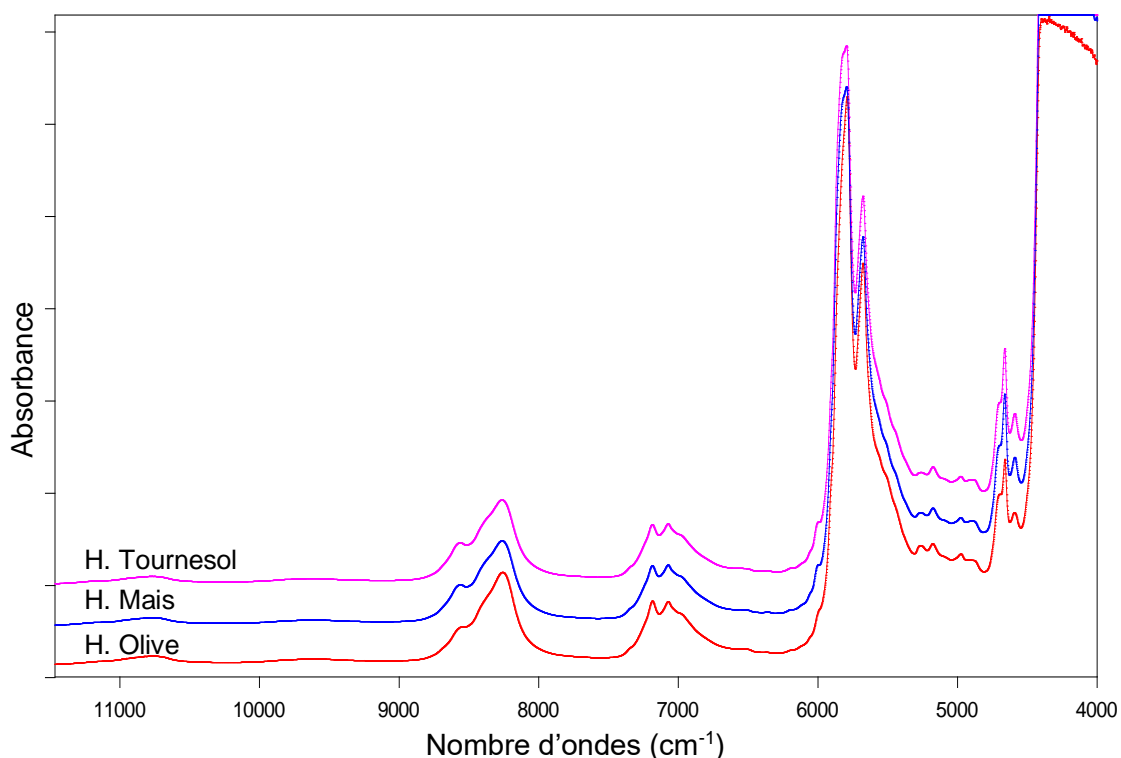


Figure 4.5 : Spectres NIR-TF des huiles végétales utilisées dans cette étude: huile de tournesol, huile d'olive et huile de maïs.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons considérées.

Tableau 4.2 : Droites d'étalonnages de mélanges d'eugénoï et d'huile végétale (v/v) par NIR-TF.

Eugénoï/Huile végétale	Analyse NIR-TF	
	Droite d'étalonnage $A = a C + b$	R^2
Eugénoï/H. Tournesol	$A = 2,5985 C + 0,6264$	0,999
Eugénoï/H. Maïs	$A = 2,5454 C + 0,6044$	0,999
Eugénoï/H. Olive	$A = 2,5890 C + 0,5602$	0,998

Note: Les mesures pour NIR-TF correspondent à une aire de pic, spécifique à l'eugénoï, limitée entre 7000 et 6800 cm^{-1} .

4.3.1.6 Modèles PLS-NIR pour la détermination de l'huile essentielle de clous de girofle dans des échantillons commerciaux

Des modèles PLS ont été développés sur la base des données NIR-TF pour la détermination de la teneur réelle en huile essentielle de clous de girofle (v/v) dans les huiles commerciales adultérées, en combinant différentes régions de nombre d'ondes et méthodes de prétraitement, comme il a été mentionné dans la partie expérimentale, en tenant compte des bandes caractéristiques de l'huile essentielle de clous de girofle, analysée globalement sous forme d'eugénol, étant le principal composé identifié dans tous les échantillons. Les paramètres les plus importants du modèle PLS-NIR développé et optimisé sont résumés dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Paramètre du modèle PLS-NIR-TF optimisé pour la détermination de la teneur réelle de l'huile essentielle dans des formulations commerciales adultérées d'huile de clous de girofle.

Modèle PLS/ Région (cm⁻¹)	RMSEC (% v/v)	R²_{Cal}	RMSECV (% v/v)	R²_{CV}	RPD	VLs
NIR-TF (8001,4-4462,6)	0,120	0,9998	0,194	0,9995	43,5	3

Note: R²(Cal): Coefficient de corrélation de la calibration, R²(CV): Coefficient de corrélation de la validation croisée, RMSEC: Erreur de moyenne carrée de racine de la calibration, RMSECV: Erreur de moyenne carrée de racine de la validation croisée, RPD: Déviation résiduelle de prédiction, VLs: variables latentes.

Comme on peut le constater, les meilleurs résultats de la prévision de la concentration en huiles essentielles ont été obtenus en utilisant la dérivée première en combinaison avec la normalisation vectorielle et le centrage moyen des spectres dans une région spectrale comprise entre 8001,4 et 4462,6 cm⁻¹ et en considérant trois variables latentes. Des valeurs de 0,9998, 0,9995 pour R² (cal), R² (cv) ont été obtenues, avec des valeurs de RMSEC, RMSECV de 0,120% (v/v), 0,194% (v/v) respectivement. La valeur de RPD de 43.5 a été obtenue, considérée comme une valeur suffisante pour les besoins de l'analyse avec une excellente précision [160]. Les paramètres des modèles PLS-NIR développés pour la détermination de la quantité réelle d'huile essentielle dans des

formulations commerciales adultérées sont résumés dans l'annexe 1, d'appendice E.

4.3.2 Détermination d'huile essentielle pure de clous de girofle dans des échantillons commerciaux par spectroscopie MIR-TF

4.3.2.1 Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles pures de clous de girofle

La figure 4.6 montre les spectres ATR-MIR-TF d'échantillons d'huile essentielle pure de clous de girofle extraite par hydrodistillation, entraînement à la vapeur d'eau et l'extraction assistée par micro-ondes. On peut constater que tous les spectres étaient comparables, malgré l'utilisation de différentes techniques d'extraction. Dans la région entre 4000 et 550 cm^{-1} , on peut observer la présence des bandes de vibrations caractéristiques correspondantes aux principaux composés de l'huile essentielle de clous girofle.

Les bandes d'absorbance autour de 3500 cm^{-1} sont dues à des vibrations d'élongation du groupement hydroxyle O—H de l'eugénol présentant le composé principal pour l'huile essentielle de clous de girofle (voir figure insérée dans la figure 4.6) et celles à 3072 cm^{-1} correspondent aux vibrations d'élongation de =C—H du cycle aromatique. Des bandes situées autour de 3006 et 2976 cm^{-1} proviennent des vibrations d'élongation de =C—H et de C—H asymétriques dans le groupement —CH₃, tandis que celles à 2936 et 2845 cm^{-1} sont associées à des vibrations d'élongation asymétriques et symétriques de C—H dans le groupement —CH₂, respectivement.

La bande d'absorbance à 1765 cm^{-1} résulte des vibrations d'élongation du groupement C=O des esters correspondant à la présence de l'un des principaux composés de l'huile essentielle de clous de girofle, l'acétate d'eugénol (voir figure insérée dans la figure 4.6) et les bandes situées à 1638 et 1606 cm^{-1} sont dues aux vibrations d'élongation du groupement C=C. A 1511 cm^{-1} les spectres montrent la présence des pics importants qui correspondent aux vibrations du groupement C=C du cycle aromatique. D'autres bandes situées à 1435 et 1365

cm^{-1} sont dues aux vibrations de déformation des groupements $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$, tandis que celles à 1270, 1235, 1203, 1150, 1123 et 1032 cm^{-1} sont associées à des vibrations d'élongation de C—O. On peut également observer que les bandes à 914, 852, 819, 795 et 749 cm^{-1} correspondent aux vibrations de déformation du groupement $-\text{CH}_2$. L'analyse des spectres ATR-MIR-TF confirme la présence d'eugénol et d'acétate eugénol dans des échantillons d'huile essentielle pure de clous de girofle.

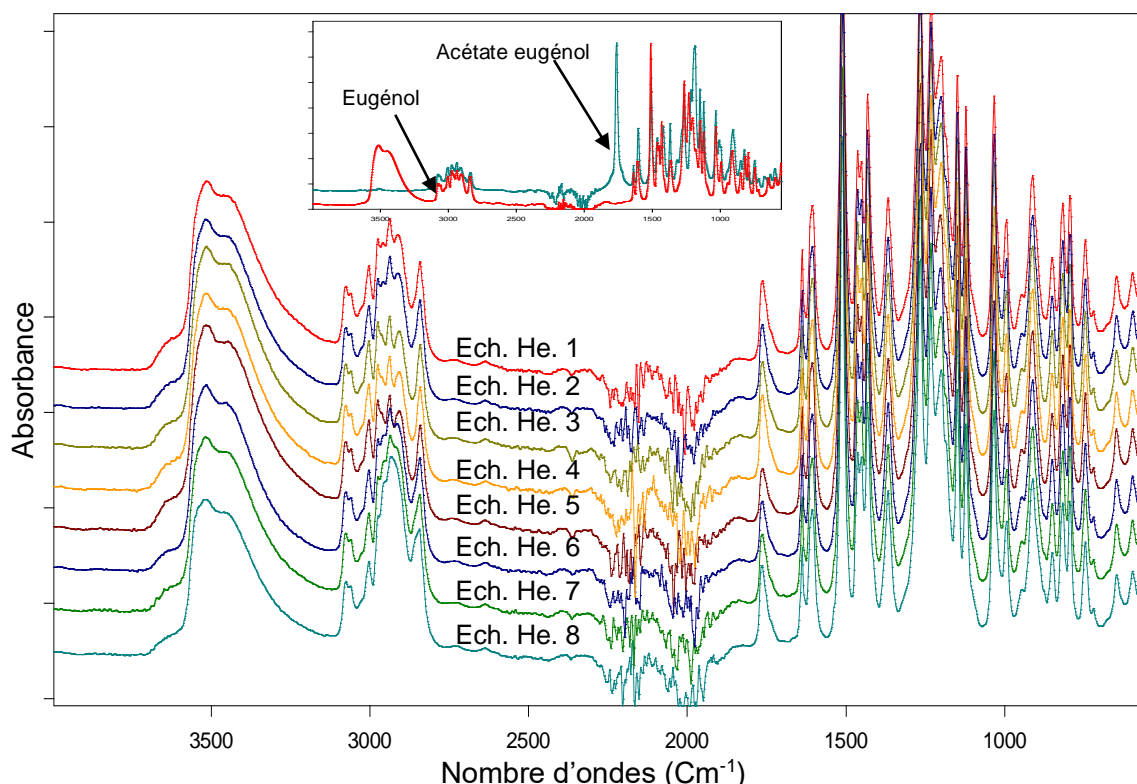


Figure 4.6 : Spectres ATR-MIR-TF des différents échantillons d'huiles essentielles de clous de girofle obtenus par hydrodistillation (Ech. He. 1-4), entraînement à la vapeur d'eau (Ech. He. 5-6) et par extraction assistée par micro-ondes (Ech. He. 7-8).

Figure insérée : Spectre des standards eugénol et acétate d'eugénol pure.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons

4.3.2.2 Effet du processus d'extraction de l'huile essentielle de clous de girofle sur l'analyse par MIR-TF

Comme il a été mentionné précédemment, la composition chimique de l'huile essentielle peut être affectée par nombreux paramètres [160] et afin de vérifier l'identité de tous les lots préparés par hydrodistillation, entraînement à la

vapeur et extraction assistée par micro-ondes, différentes courbes d'étalonnage avec de l'huile essentielle diluée dans de l'huile de tournesol ont été obtenues en utilisant des mesures de hauteur de pic à 1514 cm^{-1} , corrigées avec une ligne de base stabilisée entre 1558 et 1481 cm^{-1} .

Les résultats résumés dans le tableau 4.4 montrent, comme c'était le cas pour l'analyse NIR-TF, l'absence de modifications significatives des principales caractéristiques d'étalonnage dans le mode de mesure ATR-MIR-TF. Cependant, il faut noter que la bande principale d'acétate d'eugénole à 1765 cm^{-1} est fortement recouverte par la bande caractéristique de l'ester de l'huile de tournesol, évitant ainsi son utilisation pour les différentes intégrations.

Tableau 4.4 : Droites d'étalonnage de l'huile essentielle de clous de girofle obtenues par différents processus d'extraction, dans l'huile de tournesol par MIR-TF.

Huile essentielle pure (Lot/Extraction)	Analyse MIR-TF	
	Droite d'étalonnage $A = a C + b$	R^2
01-HD	$A = 0,0558 C + 0,0032$	0,997
02-HD	$A = 0,0574 C + 0,0077$	0,996
03-HD	$A = 0,0605 C + 0,0054$	0,998
04-HD	$A = 0,0563 C + 0,0188$	0,997
05-EV	$A = 0,0582 C + 0,0055$	0,995
06-EV	$A = 0,0561 C + 0,0101$	0,997
07-MO	$A = 0,0556 C - 0,0097$	0,999
08-MO	$A = 0,0526 C - 0,0181$	0,998

Note: Le procédé d'extraction correspond à (HD): Hydrodistillation, (EV): Entraînement à la vapeur, (MO): Extraction assistée par micro-ondes.

Les mesures pour le MIR-TF correspondent à la hauteur de pic à 1514 cm^{-1} , corrigées avec une ligne de base stabilisée entre 1558 et 1481 cm^{-1} .

Niveau de concentration employé pour HD et EV jusqu'à 10%, pour MO jusqu'à 7% dans l'huile de tournesol.

4.3.2.3 Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles commerciales de clous de girofle

Les figures 4.7A et 4.7B montrent les spectres ATR-MIR-TF d'échantillons commerciaux d'huile essentielle de clous de girofle obtenus dans les mêmes conditions que les échantillons des huiles essentielles pures dans la région comprise entre 4000 et 550 cm^{-1} .

La figure 4.7A regroupe le premier type d'échantillons, utilisé dans ce travail qui présentent une similitude dans l'allure des spectres ATR-MIR-TF. Ces échantillons présentent les bandes les plus intenses à 3015 et 2955 cm^{-1} qui sont dues à $=\text{C}-\text{H}$ et aux vibrations asymétriques d'élongation de $\text{C}-\text{H}$ du groupement $-\text{CH}_3$, respectivement. Tandis que celles à 2926 et 2857 cm^{-1} sont associées à des vibrations d'élongation asymétrique et symétrique de $\text{C}-\text{H}$ du groupement $-\text{CH}_2$, respectivement. Les bandes d'absorbance à 1749 et 1654 cm^{-1} résultent de l'élongation des esters $\text{C}=\text{O}$ et des vibrations d'élongation du groupement $\text{C}=\text{C}$, respectivement. Des bandes situées à 1463 et 1377 cm^{-1} sont associées à des vibrations de déformation de $\text{C}-\text{H}$ des groupements $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$ et celles à environ 1236, 1161, 1120 et 1098 cm^{-1} correspondent à des vibrations d'élongation de $\text{C}-\text{O}$. Les bandes à 724 cm^{-1} proviennent des vibrations de déformation du groupement $-\text{CH}_2$.

On peut conclure, à partir des spectres obtenus, la présence d'un composé étranger, qui ne correspond pas aux composants des huiles essentielles pures, dans ces échantillons. Encore une fois le spectre ATR-MIR de l'huile de tournesol obtenu dans les conditions susmentionnées (voir figure insérée sur la figure 4.7A) confirme que les neuf échantillons correspondent à une dilution d'huile essentielle de clous de girofle dans une huile végétale.

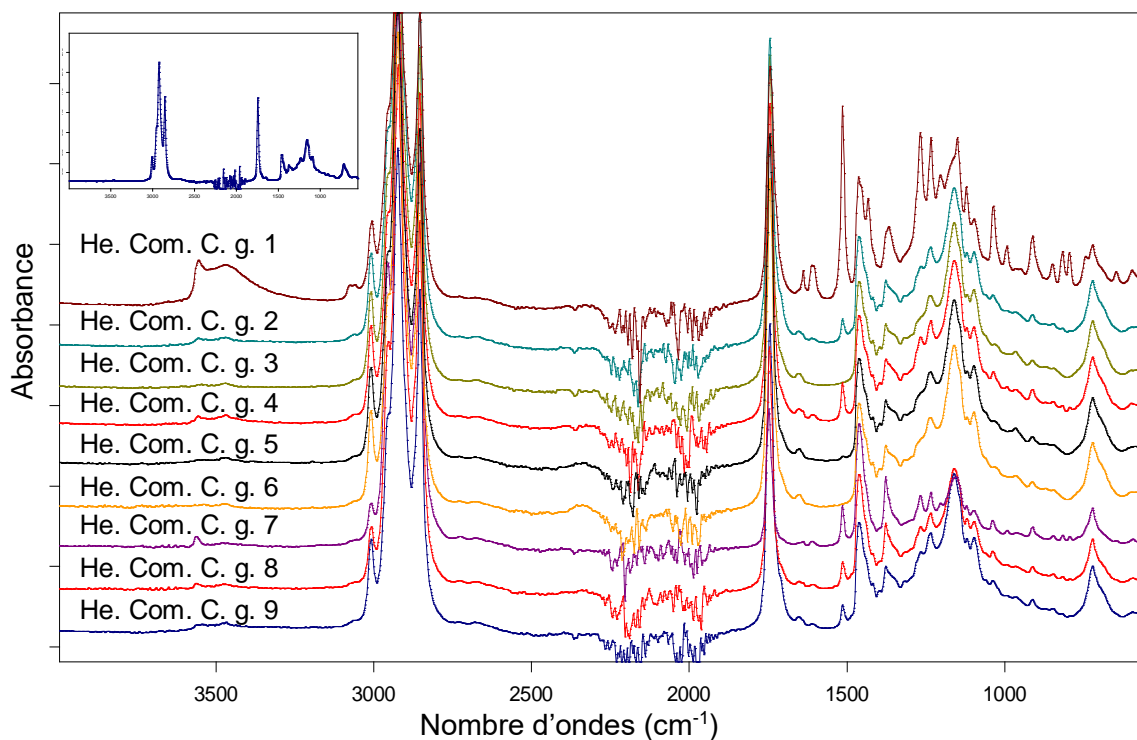


Figure 4.7A : Spectres ATR-MIR-TF des huiles essentielles commerciales de clous de girofle présentant de grandes similitudes avec les bandes d'huile végétale (He. Com. C. g. 1-9).

Figure insérée: Spectre de l'huile de tournesol.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons

La figure 4.7B montre les spectres ATR-MIR-TF du second groupe d'huiles essentielles commerciales de clous de girofle. En comparant ces spectres avec ceux des huiles essentielles pures, on peut confirmer la présence de bandes caractéristiques de l'huile essentielle de clous de girofle (voir figure insérée dans la figure 4.7B). Il semble donc évident que ces échantillons commerciaux (11 et 12) ne contiennent pas d'huile végétale comme diluant ce qui confirme leur bonne qualité par rapport aux précédents.

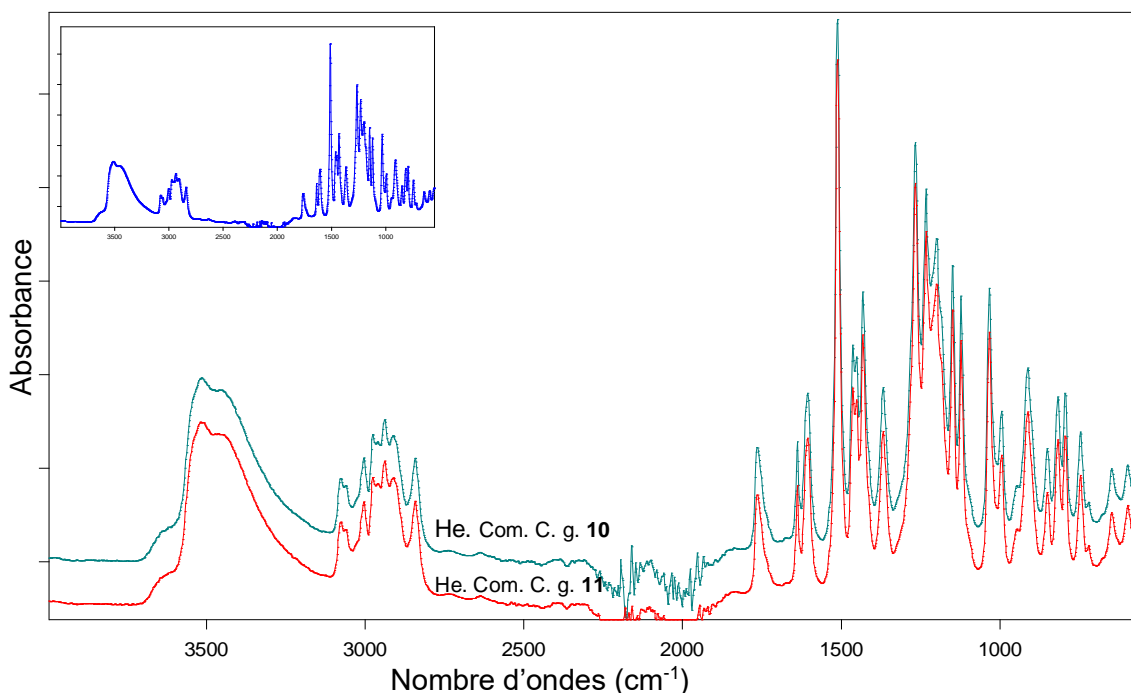


Figure 4.7B : Spectres ATR-MIR-TF d'huiles essentielles commerciales de clous de girofle présentant de fortes similitudes avec les bandes d'huile essentielle pure: (He. Com. C. g. 10-11).

Figure insérée : Spectre de l'huile essentielle pure.

Note: Les spectres sont décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons considérés.

4.3.2.4 Analyse qualitative des échantillons d'huile essentielle commerciale de clous de girofle par spectroscopie MIR-TF

Comme cela a été indiqué précédemment, différentes bandes caractéristiques d'huile végétale (voir figure insérée sur la figure 4.7A) ont été identifiées dans les spectres ATR-MIR-TF d'échantillons commerciaux indiquant la présence d'un solvant.

Ce résultat a été confirmé après la soustraction du spectre de tournesol aux échantillons commerciaux d'huile essentielle de clous de girofle (He. Com. C. g.1-9). On peut constater que les spectres obtenus après soustraction sont assez similaires à celui d'une huile essentielle pure à différents niveaux de concentration (voir figure 4.8). De plus, les spectres ATR-MIR montrent la présence d'un autre solvant différent de l'huile végétale pour deux échantillons (He. Com. C. g. 7 et 8)

présentant des bandes, situées à 1459 et 1380 cm^{-1} , différentes de celles de l'huile essentielle pure.

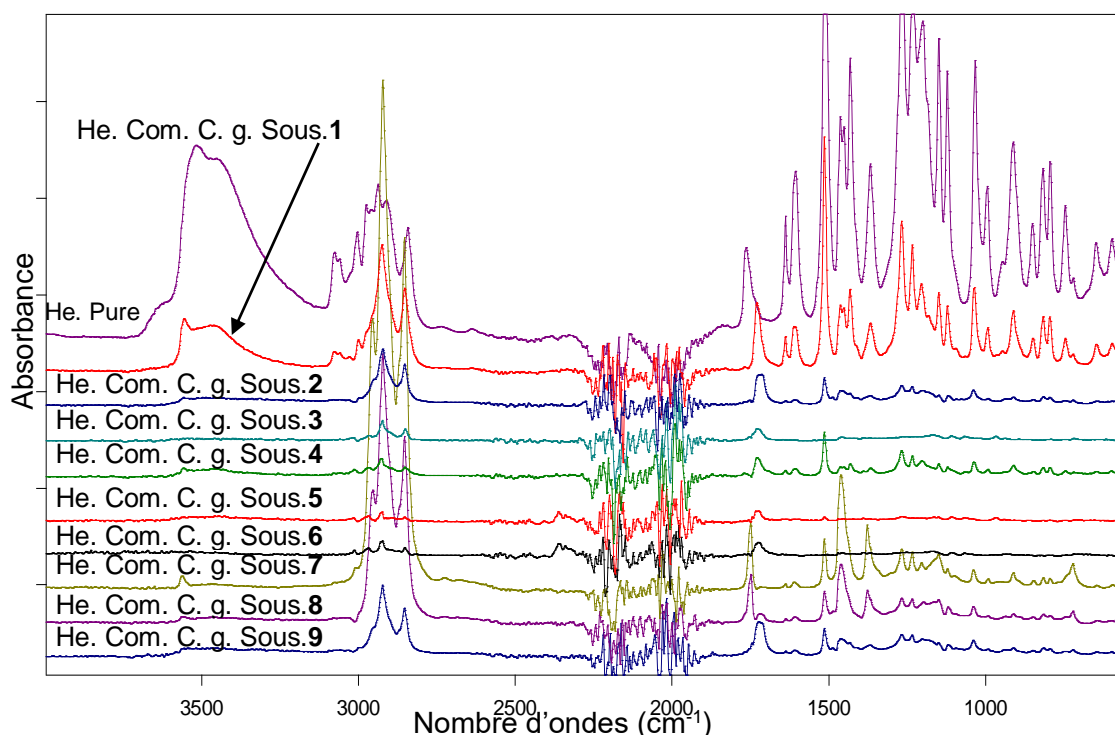


Figure 4.8 : Spectres ATR-MIR-TF de l'huile essentielle de clous de girofle pure (He. pure) et de la soustraction entre les huiles commerciales (He. Com. C. g. 1-9) et l'huile de tournesol: (He. Com. C. g. Sous. 1-9).

Note: Les spectres étaient décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons considérés.

4.3.2.5 Effet du solvant (huile végétale) dans l'analyse des huiles essentielles commerciales de clous de girofle sur l'analyse par MIR-TF

Les spectres ATR-MIR-TF de la figure 4.9 montrent les modes vibrationnels d'absorption caractéristiques des huiles de tournesol, de maïs et d'olive qui présentent une différence d'hauteur des bandes dans la région comprise entre 4000 et 550 cm^{-1} [161].

La bande d'absorption des vibrations d'élongation de $=\text{C}-\text{H}$ d'acides gras insaturés a été observée à 3009 cm^{-1} et la bande située autour de 2958 cm^{-1} provient de vibrations d'élongation asymétriques de $\text{C}-\text{H}$ du groupement $-\text{CH}_3$. Les bandes situées à 2923 et 2853 cm^{-1} sont associées aux vibrations d'élongation de $\text{C}-\text{H}$ du groupement $-\text{CH}_2$, asymétriques et symétriques,

respectivement. La bande intense apparaissant à 1749 cm^{-1} est due à l'étirement de l'ester $\text{C}=\text{O}$, tandis que celle à 1654 cm^{-1} résulte des vibrations d'élongation de $\text{C}=\text{C}$ cis. Les autres bandes à 1460 et 1378 cm^{-1} proviennent des vibrations de cisaillement des groupements $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$, respectivement, celles à 1241 , 1162 , 1121 et 1095 cm^{-1} sont attribuées aux vibrations d'élongation de CO . Le pic à 721 cm^{-1} correspond au mode de basculement du groupement $-\text{CH}_2$ [158, 162].

L'effet de l'huile végétale utilisée pour la dilution des huiles essentielles de clous de girofle a été évalué dans la région MIR-TF en comparant les différentes droites d'étalonnages obtenues à partir de série de solutions étalons d'un mélange d'eugénol et d'huile végétale dans des proportions volumiques (v/v) différentes. Les valeurs de surface de pic ont été intégrées entre 1558 et 1481 cm^{-1} . Il est important de rappeler que l'huile essentielle de clous de girofle a été analysée globalement sous forme d'eugénol étant son produit majoritaire. Les résultats indiqués dans le tableau 4.5 montrent que les principaux paramètres de ces calibrations sont exempts d'effet de l'huile végétale dans les mesures ATR-MIR-TF.

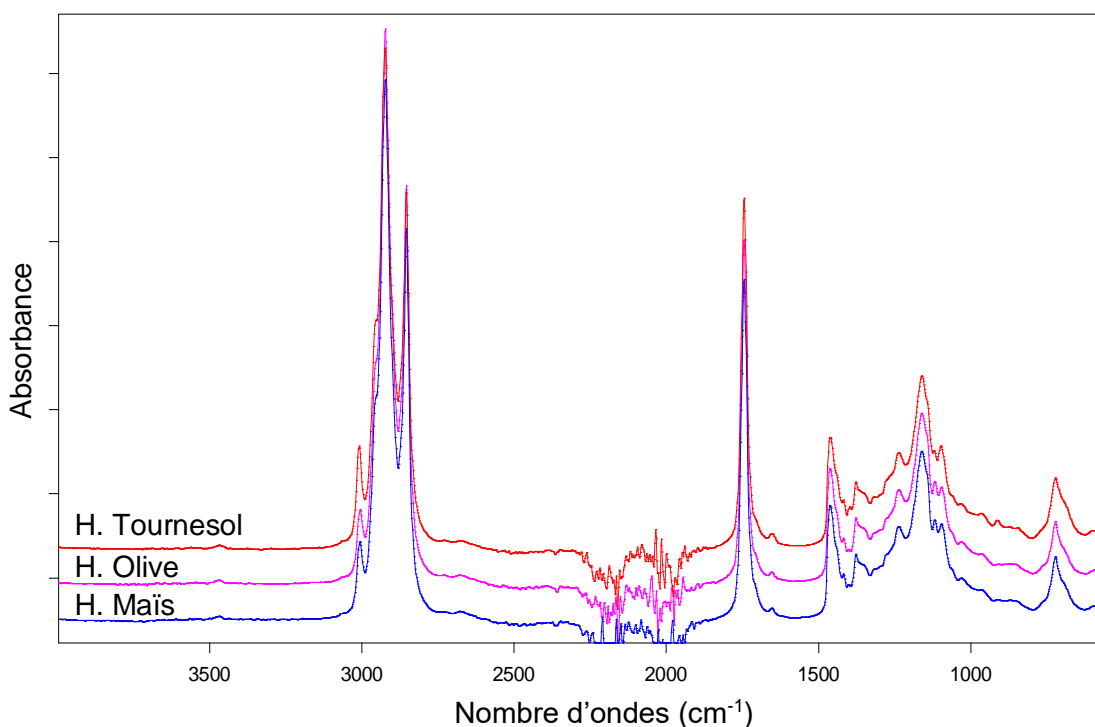


Figure 4.9 : Spectre ATR-MIR-TF des huiles végétales utilisées dans cette étude: huile de tournesol, huile d'olive et huile de maïs.

Note: Les spectres étaient décalés sur l'axe des Y pour distinguer les différents échantillons considérés.

Tableau 4.5 : Droites d'étalonnages de mélanges d'eugéno1 et d'huile végétale (v/v) par MIR-TF.

Eugéno1/Huile végétale	Analyse MIR-TF	
	Droite d'étalonnage $A = a C + b$	R^2
Eugéno1/H. Tournesol	$A = 0,8389 C + 0,0052$	0,999
Eugéno1/H. Maïs	$A = 0,7874 C + 0,0132$	0,999
Eugéno1/H. Olive	$A = 0,8195 C + 0,0163$	0,998

Note: Les mesures pour MIR-TF correspondent à une aire de pic, spécifique à l'eugéno1, limitée entre 1558 et 1481 cm^{-1} .

4.3.2.6 Modèles PLS-ATR-MIR-TF pour la détermination de l'huile essentielle de clous de girofle dans des échantillons commerciaux

Pour construire des modèles PLS-ATR-MIR-TF permettant d'évaluer la teneur réelle en huile essentielle de clous de girofle dans des échantillons commerciaux adultérés et étiquetés comme étant des huiles essentielles pures de clous de girofle, les mêmes ensembles d'étalonnage et de validation utilisés précédemment pour le modèle de régression PLS-NIR-TF ont été utilisés. L'objectif principal était de comparer les régions MIR et NIR pour la prédiction par PLS du niveau de concentration d'huile essentielle dans les huiles essentielles commerciales adultérées.

La combinaison de la première dérivée avec la normalisation vectorielle et du centrage moyen des données a fourni les meilleurs résultats de prévision en considérant la région spectrale comprise entre 1801,5 et 578,7 cm^{-1} et trois variables latentes. Comme on peut le voir dans le tableau 4.6, le modèle montre une bonne corrélation avec des valeurs pour R^2 (cal), R^2 (c v) de 0,9998, 0,9995 et RMSEC, RMSECV de 0,118% (v/v), 0,191% (v/v), respectivement. Une valeur RPD de 44.1 a été obtenue ce qui est considéré comme adéquat pour l'analyse avec une excellente précision. Les paramètres des modèles PLS-ATR-MIR pour la détermination de la quantité d'huile essentielle dans des formulations commerciales adultérées sont présentés dans l'annexe 2, d'appendice E.

Tableau 4.6 : Paramètres du modèle PLS-ATR-MIR-TF optimisé pour la détermination de l'huile essentielle dans des formulations commerciales adulterées d'huile de clous de girofle.

Modèle PLS/ Région (cm⁻¹)	RMSEC (% v/v)	R²_{Cal}	RMSECV (% v/v)	R²_{CV}	RPD	VLs
MIR-TF (1801,5-578,7)	0,118	0,9998	0,191	0,9995	44,1	3

Note: R² (Cal): Coefficient de corrélation de la calibration, R²(CV): Coefficient de corrélation de la validation croisée, RMSEC: Erreur de moyenne carrée de racine de la calibration, RMSECV: Erreur de moyenne carrée de racine de la contre-vérification, RPD: Déviation résiduelle de prédiction, VLs: variables latentes.

4.3.3 Exactitude et précision des méthodes NIR-TF et ATR-MIR-TF

Pour évaluer les performances des méthodes PLS-NIR-TF et PLS-ATR-MIR-TF développées au cours de cette étude et pour valider leur exactitude, une série d'expériences de récupération a été réalisée. Quatre échantillons commerciaux d'huile essentielle de clous de girofle ont été enrichis avec de l'huile essentielle pure à différents niveaux de concentration.

Les spectres de NIR-TF et ATR-MIR-TF des échantillons enrichis ont été traités par PLS en utilisant les modèles sélectionnés et les résultats obtenus ont été utilisés pour calculer le niveau de pourcentage de récupération des concentrations ajoutées comprises entre 2 et 3,5% v/v. Les niveaux moyens de récupération de l'huile essentielle pure de clous de girofle se situaient entre 97% et 103% pour PLS-NIR-TF et entre 92% et 107% pour les méthodes PLS-ATR-MIR-TF (tableau 4.7). Les résultats des pourcentages de récupération pour tous les traitements spectraux sont résumés dans l'annexe1 et 2 d'appendice F.

Tableau 4.7 : Récupération de l'huile essentielle pure de clous de girofle ajoutée aux échantillons commerciaux adultérés par PLS-NIR-TF et PLS-ATR-MIR-TF.

Echantillon	Huile essentielle de clous de girofle ajoutée (% v/v)	PLS-NIR-TF		PLS-ATR-MIR-TF	
		Récupération ± s (%)	C.V (%)	Récupération ± s (%)	C.V (%)
He. Com. C. g. 2	2,5	97,0 ± 2,1	2,2	107,0 ± 3,2	3,0
He. Com. C. g. 3	3,5	97,0 ± 2,8	2,9	92,0 ± 3,4	3,7
He. Com. C. g. 4	2,0	102,0 ± 2,7	2,6	101,0 ± 2,1	2,1
He. Com. C. g. 5	3,0	103,0 ± 5,6	5,4	99,0 ± 5,9	6,0

Note : s : Ecart type de trois analyses indépendantes.

C.V : Coefficient de variance.

$R\% = \left[\frac{\text{valeur trouvée}}{[\text{valeur présente} \cdot (\text{volume échantillon} / \text{volume totale}) + [100 \cdot (\text{volume ajouté} / \text{volume totale})]} \right] \cdot 100$.

4.3.4 Analyse qualitative des échantillons d'huile essentielle commerciale de clous de girofle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG-SM

Les différents échantillons d'huile essentielle commerciale de clous de girofle ont fait l'objet d'une analyse chromatographique. L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales NIST02.L, Wiley7n.I et NBS75k.L, avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%. L'analyse par HS-GC-MS, dans les conditions citées auparavant, pour quelques échantillons commerciaux (He. Com. C. g. 1-4) et l'huile essentielle pure (1-HD et 5-EV) a permis l'identification de quelques composés pour l'échantillon (He. Com. C. g. 1), cependant il n'était pas possible de les identifier dans les autres échantillons commerciaux, probablement due à la présence d'une quantité minime d'huile essentielle pure dans ces échantillons (tableau 4.8).

L'analyse par CG-SM de tous les échantillons a révélé d'une part l'identification des composés majoritaires (Appendice G), et d'un autre part l'absence totale de ces composés dans certains échantillons. Les principaux

produits identifiés des différents échantillons purs ou commerciaux avec le nom du composé, et le pourcentage en aire sont représentés dans les tableaux 4.9 et 4.10, respectivement.

D'après les résultats obtenus de l'analyse par les deux méthodes chromatographiques, on constate que la détermination de l'adultération par la méthode chromatographique dépend des conditions expérimentales et de la sensibilité de la méthode

Tableau 4.8 : Composition chimique d'échantillons d'huile essentielle (pure et commerciale) de clous de girofle par HS-GC-MS.

Tr (min)	composé	Aire (%)					
		Echantillons d'huile essentielle (pure et commerciale)					
		01-HD	05-EV	He.Com . C.g. 1	He.Com . C.g. 2	He.Com . C.g. 3	He.Com . C.g. 4
10,22	Menthol	-	-	-	43,83	-	-
12,88	Eugénol	81,65	89,79	61,96	-	-	-
13,82	Caryophyllène	8,43	3,43	31,14	56,17	-	-
13,84	NI	-	-	-	-	-	100
14,30	NI	0,64	0,59	3,50	-	-	-
15,01	Isoeugénol	9,28	6,19	-	-	-	-
15,90	NI	-	-	3,31	-	-	-

Note: Le procédé d'extraction correspond à (HD): Hydrodistillation, (EV): Entraînement à la vapeur.

NI: Un composé non identifié

Tr: Temps de rétention

Tableau 4.9 : Composition chimique des échantillons d'huile essentielle pure de clous de girofle par CG-SM.

Tr (min)	Nom du composé	Aire (%)							
		Echantillons huile essentielle pure							
		01	02	03	04	05	06	07	08
		(HD)	(HD)	(HD)	(HD)	(EV)	(EV)	(MO)	(MO)
11,62	α -Cubébène	-	-	-	-	-	-	-	1,19
11,72	Eugénol	72,83	70,66	80,51	61,10	84,82	67,44	57,43	46,55
12,62	Caryophyllène	1,44	11,51	-	5,62	-	17,56	22,79	31,43
13,10	α - Caryophyllène	1,65	1,22	-	-	-	1,79	2,56	3,50
13,88	Acétate d'eugénol	24,07	16,61	19,49	25,32	15,18	13,21	17,22	17,32
14,96	Hexadécane	-	-		7,95	-	-	-	-

Note: Le procédé d'extraction correspond à (HD): Hydrodistillation, (EV): Entraînement à la vapeur, (MO): Extraction assistée par micro-ondes.
Tr: Temps de rétention.

Tableau 4.10 : Composition chimique des échantillons commerciaux d'huile essentielle de clous de girofle par CG-SM.

Tr (min)	composé	Aire (%)										
		Echantillons d'huile essentielle commerciale (He. Com. C. g)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
5,27	Eucalyptol	-	-	-	-	-	15,00	-	-	-	-	-
7,48	NI	-	-	-	-	0,22	-	-	-	-	-	-
8,19	Camphre	-	-	-	-	-	10,80	-	-	-	-	-
10,18	Linalyl anthranilate	-	-	-	-	-	18,47	-	-	-	-	-
11,72	Eugénol	81,28	45,67	-	66,58	39,17	-	97	51,83	45,39	78,16	79,72
12,62	Caryophyllène	13,49	24,51	-	15,04	-	-	-	19,53	28,83	3,73	3,53
13,10	α -Caryophyllène	1,59	2,78	-	1,99	-	-	-	2,35	3,44	0,40	0,40
13,88	Acétate d'eugénol	1,55	10,99	-	16,40	-	-	-	24,82	14,31	17,52	16,02
14,66	Oxide de caryophyllène	2,09	8,99	-	-	-	-	-	1,48	8,04	0,20	0,32
14,96	Hexadécane	-	5,06	100	-	60,76	19,16	0,20	-	-	-	-
15,45	Pentadecane	-	-	-	-	-	-	1,25	-	-	-	-
15,74	NI	-	-	-	-	-	-	1,53	-	-	-	-
20,61	octadecyne	-	-	-	-	-	19,25	-	-	-	-	-
20,67	NI	-	-	-	-	-	17,32	-	-	-	-	-
21,17	NI	-	0,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21,21	NI	-	0,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23,50	Pentadecyne	-	4,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25,70	NI	-	0,69	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: Tr: Temps de rétention; He. Com. C. g (1-11): Echantillons commerciaux d'huile essentielle de clous de girofle; NI: Un composé non identifié.

4.3.5 Quantification de la teneur réelle de l'huile essentielle pure dans des échantillons d'huile essentielle commerciale de clous de girofle

La quantification de la teneur réelle de l'huile essentielle pure analysée globalement sous forme d'eugénol, car il constitue le produit majoritaire de cette huile, dans des échantillons commerciaux d'huile essentielle de clous de girofle (He. Com. C. g. 1-9), adultérés avec de l'huile végétale, a été déterminée à l'aide de deux méthodes développées, PLS-NIR-TF et PLS-ATR-MIR-TF. Les teneurs trouvées (voir tableau 4.5), exprimées en pourcentage d'eugénol dans l'huile commerciale, varient entre 0,00% - 22,7% et 0,00% - 23,2% en utilisant le NIR-TF et l'ATR-MIR-TF, respectivement, et la précision des mesures a été exprimée par les coefficients de variance qui variaient de 0,0 à 4,6% pour les mesures NIR-TF et de 0,0 à 7,7%. Pour les mesures de MIR-TF.

En outre, de la validation partielle des deux méthodes développées par l'optimisation des paramètres analytiques de détermination, les résultats obtenus sont aussi validés par leur comparaison avec ceux obtenus par une méthode de référence CG-SM. Les résultats de la CG-SM fournissent des résultats comparables à ceux obtenus par spectroscopie NIR-TF et ATR-MIR-TF. Les équations de régression entre les résultats de spectroscopie NIR-TF et MIR-TF (y) et ceux de la chromatographie (x) sont $y = (0,93 \pm 0,03) x + (0,16 \pm 0,18)$ et $y = (0,954 \pm 0,005) x + (0,07 \pm 0,04)$ respectivement, ce qui montre que les trois méthodes testées ont une précision comparable.

Tableau 4.11 : Teneur en huile essentielle de clous de girofle analysée globalement sous forme d'eugénoles [(v/v)%] dans des échantillons commerciaux adultérés (He. Com. C. g) en utilisant les deux méthodes développées, PLS-NIR-TF, PLS-ATR-MIR-TF et la méthode de référence CG-SM.

Echantillon	Teneur en huile essentielle de clous de girofle (Eugénoles)				
	PLS-NIR		PLS-ATR-MIR		CG-SM
	PLS-NIR	%C.V	PLS-ATR-MIR	%C.V	
He. Com. C. g. 1	22,7 ± 0,11	0,5	23,2 ± 0,02	0,1	24,3
He. Com. C. g. 2	1,75 ± 0,08	4,6	1,07 ± 0,01	0,9	1,04
He. Com. C. g. 3	0,00 ± 0,00	0,0	0,00 ± 0,00	0,0	0,00
He. Com. C. g. 4	3,18 ± 0,03	0,9	3,20 ± 0,01	0,3	3,09
He. Com. C. g. 5	0,22 ± 0,01	4,5	0,13 ± 0,01	7,7	0,20
He. Com. C. g. 6	0,00 ± 0,00	0,0	0,00 ± 0,00	0,0	0,00
He. Com. C. g. 7	2,20 ± 0,02	0,9	7,28 ± 0,02	0,3	3,25
He. Com. C. g. 8	1,10 ± 0,02	1,8	1,84 ± 0,02	1,1	1,84
He. Com. C. g. 9	1,55 ± 0,004	0,3	1,14 ± 0,02	1,8	1,03

Note: s: Ecart type de trios analyses indépendantes.

C. V: coefficient de variance.

4.3.6 Evaluation du caractère vert des méthodologies développées par PLS-NIR-TF et PLS-MIR-TF

Le caractère vert des deux méthodologies développées a été évalué sur la base des critères établis dans la littérature pour définir le certificat vert, en tenant compte de la quantité de solvant employée et de la génération de déchets analytiques. Le certificat a été développé à partir des douze principes de la chimie verte et a été conçu pour évaluer les études de techniques en fonction des volumes de réactifs utilisés et des déchets générés. L'évaluation des méthodes analytiques a été réalisée par l'attribution de points de pénalité en fonction de la toxicité et des dangers associés aux réactifs utilisés et aux déchets générés. Par conséquent, il permet de classer les méthodes analytiques dans l'échelle dite du certificat vert, qui est établie de classes «A» à «G» en tenant compte également des quantités d'énergie consommées.

Les résultats résumés dans le tableau 4.12 montrent qu'aucun point de pénalité n'a été attribué à la PLS-NIR-TF dans l'éco-échelle en raison de

l'absence de solvant utilisé et 1.22 points de pénalité à l'ATR-MIR-TF en raison de la faible consommation de réactifs (1 mL). La dilution requise pour la méthodologie de référence (CG-SM) était marquée de 19,7 points de pénalité dans le certificat vert (10,2 et 9,5 points de pénalité qui correspond à un volume de 100 mL de réactif utilisé et de 99,992 mL des déchets générés, respectivement). 2 points de pénalité supplémentaires ont été attribués pour cette dernière en raison de la consommation d'énergie. On peut donc en conclure que la méthode proposée, PLS-NIR-TF et ATR-MIR-TF avec 100 et 98,8 points, respectivement, est une alternative durable à l'utilisation des approches chromatographiques comme l'illustre la figure 4.10.

Tableau 4.12 : Calcul des points de pénalité.

	Points de pénalité		
	NIR-TF	ATR-MIR-TF	CG-SM
Réactifs	0	1,2	10,2
Instrument	0	0	2
Emission	0	0	0
Déchets	0	0	9,5
PP totales	0	1.2	21,7
Score totale	100	98,8	78,3

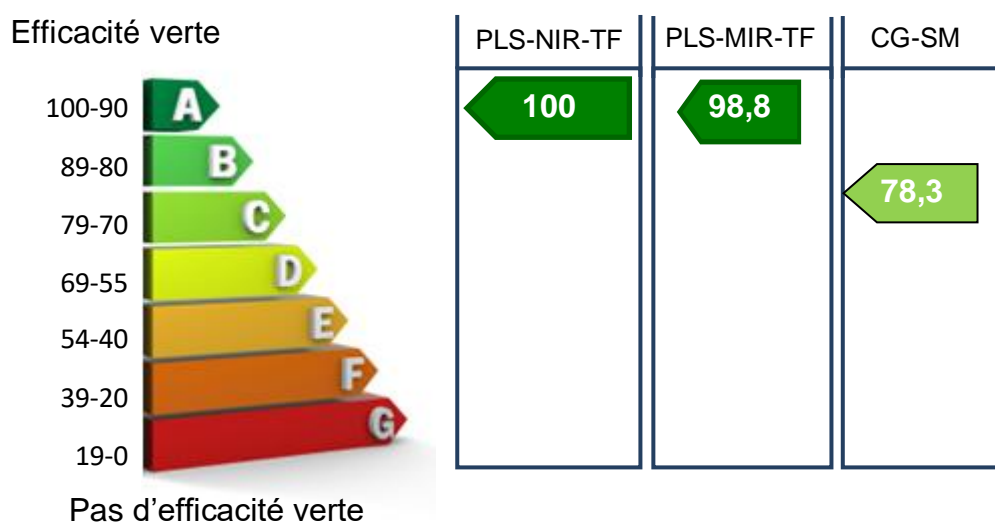


Figure 4.10 : Certificat vert des deux méthodes développées pour la quantification de l'huile essentielle de clous de girofle dans des échantillons commerciaux par PLS-NIR-TF et ATR-MIR-TF comparés, avec la méthode de référence (CG-SM).

4.4 Conclusion

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que la spectroscopie à transmission proche infrarouge (NIR-TF) et à réflexion totale atténuée (ATR-MIR-TF) combinée à la régression PLS fournissent un outil de contrôle qualité simple et rapide pour la détection de l'adultération dans des échantillons commerciaux (He. Com. C. g) et pour la quantification de niveau d'huile essentielle pure réellement dans ces échantillons.

Des études antérieures ont montré que le NIR-TF fournit de meilleurs résultats de prévision que la spectroscopie MIR-TF pour l'analyse d'échantillons d'huile [150], probablement en raison de la bonne précision des mesures NIR-TF. Cependant, dans la présente étude, la spectroscopie MIR-TF montre de meilleurs résultats que la spectroscopie NIR-TF en raison de la grande sensibilité du MIR-TF et de sa capacité à discriminer les principales bandes d'huiles essentielles dans les échantillons adultérés. Cependant les deux méthodologies pourraient être considérées comme des outils simples et écologiques adéquats pour la détermination de l'adultération d'échantillons commerciaux d'huile essentielle de clous de girofle.

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de notre travail, le potentiel de la spectroscopie infrarouge, dans les deux zones spectrales NIR et MIR, a été exploité pour la détermination simultanée des composés aromatiques dans des formulations commerciales par spectroscopie MIR-TF d'une part, et la détermination de l'adultération dans des formulations commerciales d'huiles essentielles par NIR et MIR d'autre part.

Le contenu de ce travail est réparti sur quatre chapitres distincts. Le premier chapitre regroupe les bases théoriques ainsi qu'une synthèse bibliographique liée au thème de notre recherche et les trois derniers chapitres illustrent les résultats des trois parties expérimentales.

- Le Premier chapitre rassemble une synthèse bibliographique portant sur, les huiles essentielles (définition, composition chimique, caractérisation et l'adultération de ces produits naturels), la description des méthodes d'extraction conventionnelles et non-conventionnelles qui sont utilisées pour l'obtention des huiles essentielles ainsi que les techniques d'analyses. Nous avons également abordé les bases théoriques et l'intérêt de la chimie analytique verte.
- Dans le deuxième chapitre, une étude quantitative est effectuée pour la détermination simultanée des monoterpènes (camphre, thymol, menthol et l'eucalyptol) utilisés dans des formulations commerciales pour lutter contre le parasite varroa. Les spectres IRTF des monoterpènes, dilués dans le dichlorométhane, sont traités en considérant deux stratégies de calibration, monovariante (système des équations) et multivariante (associée à la régression des moindres carrées partielles «PLS» et en considérant le modèle 4². Cette dernière a montré des résultats plus fiables en la comparant avec ceux obtenus avec l'analyse monovariante. La méthode développée dans cette étude peut être considérée comme une méthode

adéquate alternative aux méthodes chromatographiques pour la détermination des terpènes dans les formulations commerciales, vu qu'elle nécessite moins de temps, un faible volume de solvant et un bon contrôle des déchets générés avec 83,8 points.

- Les deux derniers chapitres 3 et 4 faisant objet analyses qualitative et quantitative par spectroscopie NIR et MIR, ont permis la détermination directe de l'adultération dans des formulations commerciales des huiles essentielles de différentes plantes, sans aucune préparation préalable des échantillons considérés dans cette étude.

L'étude qualitative de ces formulations, en utilisant la méthode de soustraction, a révélé l'ajout des huiles végétale et/ou minérale à la majorité des échantillons étudiés (pour certains échantillons, l'identification du solvant ajouté n'a pas pu être réalisée à cause de sa complexité). L'étude développée illustre le potentiel des deux méthodologies spectroscopiques pour l'identification directe de l'adultération cela confirme qu'elles peuvent être considérées comme des méthodes alternatives aux méthodes fréquemment utilisées. Cependant, et après une étude comparative entre les deux méthodologies développées dans ce travail, la méthode spectroscopique MIR en utilisant l'accessoire ATR fournit de meilleurs résultats que la méthode spectroscopique NIR en mode transmission et cela en raison de la quantité des informations spectrales obtenues dans la région du moyen infrarouge.

L'étude quantitative est liée à la détermination de l'adultération des échantillons commerciaux de l'huile essentielle de *S aromaticum* L. (clous de girofle) et ce, par la quantification de la teneur réelle de l'huile essentielle pure présente (analysée globalement sous forme d'eugénol, étant le produit majoritaire de l'huile essentielle de *S aromaticum* L.) dans ces échantillons par NIR-TF et ATR-MIR-TF associées à la PLS comme méthodes rapides. Il a été nécessaire d'effectuer une étude, en utilisant la méthode de soustraction des spectres, sur l'effet de l'huile végétale utilisée dans la préparation des formulations commerciales pour l'identification de l'adultération. Les trois types d'huile

(tournesol, maïs, olive) testés ont montré l'absence de l'effet de type d'huile végétale utilisée sur l'analyse.

La méthode chromatographique (CG) associée à la méthode de détection (SM) a été utilisée comme méthode de référence. Le résultat obtenu par spectroscopie IRTF est comparable et similaire à celui obtenu par CG-SM, ce qui montre la capacité des deux méthodologies spectroscopiques avec la régression PLS, d'être un outil simple, rapide et écologique pour le contrôle qualité des formulations commerciales à base de produits naturels, avec des points de 100 et 98,8 pour PLS-NIR-TF et ATR-MIR-TF, respectivement.

PERSPECTIVES

- S'élargir sur l'utilisation d'autres méthodes chimiométriques et des logiciels pour le développement d'études descriptives de discrimination.
- Détermination des monoterpènes, considérés dans cette étude (chapitre 1), dans les produits apicoles en utilisant les deux méthodes spectroscopique, NIR-TF et MIR-TF.
- Elaboration d'une banque de données élargie sur la majorité des huiles essentielles commercialisées sur le marché national afin de mettre à la disposition des instances concernées par la répression des fraudes. Un outil de contrôle rapide et efficace.
- Développement de méthodes simples et rapides basées sur la spectroscopie IRTF (MIR/NIR) pour la détection de l'adultération des échantillons de miel commercialisés.

REFERENCES

1. Newman D.J., Cragg G.M., Natural Products as Sources of New Drugs over the last 25 years, *Journal of Natural Products*, 70, (2007), 461-477.
2. Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., Saidi f., Hakim Y., Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium rosat (*Pelarganium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie), *Nature et Technologie*, 03, (2010), 37-45.
3. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., Biological effects of essential oils -A review, *Food and Chemical Toxicology*, 46, (2008), 446-475.
4. Hüsnü Can Başer K., Buchbauer G., Introduction, *Handbook of essential oils (Science, Technology, and Applications)*, Taylor & Francis Group, USA, (2010).
5. Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M., Green Analytical Chemistry, *Trend in Analytical Chemistry*, 27 (2008), 497-511.
6. Li Y., Fabiano-Tixier A-S, Chemat F., *Essential oils as reagents in green chemistry*, Springer, Inde, (2014).
7. Burt S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-A review, *International Journal Food Microbiology*, 94, (2004), 223-253.
8. Do T.K.T., Hadji-Minaglou F., Antoniotti S., Fernandez X., Authenticity of essential oils, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, (2015), 146-157.
9. El Asbahani A., Miladi K., Badri W., Sala M., Ait Addi E.H., Casabianca H., El Mousadik A., Hartmann D., Jilale A., Renaud F.N., Elaissari A., Essential oils: from extraction to encapsulation, *International Journal Pharmaceutical*, 483, (2015), 220-243.
10. Chemat F., Abert-Vian M., Fernandez X., Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas, *Microwave-assisted extraction for bioactive compound : theory and peractice*, Springer, USA, (2013).
11. Tisserand R., Young R., *Essential oil composition, Essential oil safety, a guide for health care professionals*, elsevier, Royaume-Uni, (2014).

12. Recommandations relatives à l'évaluation du risque lié à l'utilisation des huiles essentielles dans les produits cosmétiques, direction de l'évaluation de la publicité, des produits cosmétiques et biocides, unité d'évaluation toxicologique et microbiologique, Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, (2010).
13. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, direction de l'Evaluation de la Publicité, des Produits Cosmétiques et Biocides, département de l'évaluation des produits cosmétiques, biocides et de tatouage, (2008).
14. Patri F., Silano V., les plantes dans les cosmétiques: plantes et préparations à base de plantes utilisées en tant qu'ingrédients dans les produits cosmétiques conseil de l'Europe, V 1, (2002).
15. Anton R., Patri F., Silano V., les plantes dans les cosmétiques: plantes et préparations à base de plantes utilisées en tant qu'ingrédients dans les produits cosmétiques, conseil de l'Europe, V 2, (2001).
16. Patri G., Silano V., Anton R., Plantes en cosmétique, Composants potentiellement nocifs préparés par le Comité d'experts sur les produits cosmétiques, conseil de l'Europe, V 3, (2006).
17. Article L4211-1 modifié, dispositions générales, titre 1^{er}: Monopole des pharmaciens, livre 2 : Professions de la pharmacie, quatrième partie: Professions de la santé, partie législative, code français de la santé publique, (2014)
18. Article D4211-13 modifié, dispositions générales, titre 1^{er}: Monopole des pharmaciens, livre 2 : Professions de la pharmacie et de la physique médicale, quatrième partie : Professions de la santé, partie réglementaire, code français de la santé publique, (2007).
19. Schmidt E., Production of essential oils, Handbook of essential oils (Science, Technology and Applications), Taylor & Francis Group, USA, (2010).
20. Boutemak K., contribution conventionnels et innovants appliqués à la récupération de l'huile essentielle de l'armoise blanche d'Algérie (*Artemisia herba alba*), département de chimie des procédés, Faculté des sciences de l'ingénieur, université Blida I, (2011).
21. Chemat F., Vian M-A., Cravotto G., green extraction of natural products: concept and principles, International Journal of Molecular Sciences, 13, (2012), 8615-8627.

22. Bendicho C., Lavilla I., Pena F., Costas M., Green sample preparation methods, challenges in green analytical chemistry, Royal society of chemistry, Royaume-Uni, (2011).
23. Tobiszewski M., Mechlińska A., Namieśnik, Green analytical chemistry approaches in sample preparation, Handbook of green analytical chemistry, John Wiley and Sons, Royaume-Uni, (2012).
24. Ashley K., Sonification as a sample preparation method for elemental analysis, sample preparation for trace element analysis, Ottawa, Canada, (2003).
25. Assami K., Pingret D., Chemat S., Meklati B. Y., Chemat F., Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds, Chemical Engineering Processing, 62, (2012), 99-105.
26. King E.E., Barclay D., Microwave-based extraction, Sample preparation for trace element analysis, Ottawa, Canada, (2003).
27. Golmakani M.T., Rezaei K., Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L., Food Chemistry, 109, (2008), 925-930.
28. Luchesie M.E., Chemat F., Smadja J., Solvent-free microwaves extraction of essential oil from spices, Flavour Fragrance Journal, 19, (2004), 134-138.
29. Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F., Comparison of different isolation methods of essential oil from citrus fruits : cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation, Flavour Fragrance Journal, 22, (2007), 494-504.
30. Tigrine-Kordjani N., Meklati B.Y., Chemat F., Microwave 'dry' distillation as an useful tool for extraction of edible essential oils, International Journal Aromatherapy, 16, (2006), 141-147.
31. Vian M.A., Fernandez X., Visoni F., Chemat F., Microwave hydrodiffusion and gravity: A new technique for extraction of essential oils, Journal of Chromatography A, 1190, (2008), 14-17.
32. Bousbia N., Vian M. A., Ferhat M. A., Meklati B. Y., Chemat F., A new process for extraction of essential oil from citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity, Journal of Food Engineering, 90, (2009), 409-413.
33. Valcárcel M., Tena M.T., Applications of supercritical fluid extraction in food analysis, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 358, (1997), 561-573.

34. Lang Q., Wai C.M., Supercritical fluid extraction in herbel and natural product studies- a practical review, *Talanta*, 53, (2001), 771-782.
35. Alzaga R., Diez S., Bayona J.M., Supercritical fluid extraction, Sample preparation for trace element analysis, Ottawa, canada, (2003).
36. d'Acampora Zellner B., Dugo P., Dugo G., Analysis of essential oil, *Handbook of essential oils (Science, Technology and Application)*, Taylor & Francis Group, USA, (2010).
37. Moros J., Garrigues S., de la Guardia, Vibrational spectroscopy provides a green tool multi-component analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 29, (2010), 578-590.
38. Hof M., Basics of Optical Spectroscopy, *Optical spectroscopy, Handbook of spectroscopy*, Wiley-VCH & Co. KGaA, Weinheim, Allemagne, (2003).
39. Sheppard N., The historical Development of Experimental Techniques in Vibrational Spectroscopy, *Introduction to the theory and practice of vibrational spectroscopy, Theory and Instrumentation, Handbook of vibrational spectroscopy*, Wiley, Royaume-Uni, V.1 (2002).
40. Salinskas V., Instrumentation, *Optical spectroscopy, Handbook of spectroscopy*, Wiley-VCH & Co. KGaA, Allemagne, (2003).
41. Lider Jr.D.R., Status Report on Critical Compilation of physical Chemical Data, *Annual Review of Physical Chemistry*, 24, (1973), 135-158.
42. Bouzidi N., Contribution à l'étude chimique d'algues marines mediterraneennes : Alalyse quantitative des sterols de l'extrait lipidique par spectrometrie infrarouge a transformée de Fourier, Département de chimie, faculté des sciences, Université Blida 1, (2009).
43. Coates J., Classical Methodes of Quantitative analysis, *Quantitative Analysis, Sample Characterization and Spectral Data Processing, Handbook of vibrational spectroscopy*, Wiley, Royaume-Uni, V. 3, (2002).
44. Kvalheim O.M., Introduction to Factor-based Approaches, *Discriminant analysis, Sample Characterization and Spectral Data Processing Handbook of vibrational spectroscopy*, Wiley, Royaume-Uni, V. 3, (2002).
45. Brereton R.G., *Chemometrics: Data analysis for laboratory and chemical plant*, John Wiley & Sons Ltd, Royaume-Uni, (2003).

46. Mark H., Quantitative Spectroscopic Calibration, Quantitative Analysis, Sample Characterization and Spectral Data Processing, Handbook of vibrational spectroscopy, Wiley, Royaume-Uni, V. 3, (2002).
47. Hasegawa T., Principal Component Regression and Partial Least Squares Modeling, Quantitative Analysis, Sample Characterization and Spectral Data Processing, Handbook of vibrational spectroscopy, Wiley, Royaume-Uni, V. 3, (2002).
48. Hannah R.W., Standard Sampling Techniques for Infrared Spectroscopy, MID- and Near-Infrared transmission Spectroscopy, Sampling Techniques for Vibration Spectroscopy, Handbook of vibrational spectroscopy, Wiley, Royaume-Uni, V. 2, (2002).
49. Hashimoto M., Yuzawa T., Kato C., Iwata K, Hamaguchi H., Fast Time-resolved Mid-infrared Spectroscopy Using Grating Spectrometers, The Resolved Spectroscopy, Theory and Instrumentation, Handbook of vibrational spectroscopy, Wiley, Royaume-Uni, V. 1, (2002).
50. Yukihiro O., Berry R. J., Sampling Techniques in Near-Infrared for Spectroscopy, MID-and Near-Infrared transmission Spectroscopy, Sampling Techniques for Vibration Spectroscopy, Handbook of vibrational spectroscopy, Wiley, Royaume-Uni, V. 2, (2002).
51. Armenta S., de la Guardia M., Direct Analysis of Samples, Handbook of Green Analytical Chemistry, Wiley, Royaume-Uni, (2012).
52. Salinskas V., Steiner G., Hof M., Applications, Optical spectroscopy, Handbook of spectroscopy, Wiley-VCH & Co. KGaA, Allemagne, (2003).
53. Steiner G., Measurements techniques, Optical spectroscopy, Handbook of spectroscopy, Wiley-VCH & Co. KGaA, Allemagne, (2003).
54. de la Guardia M., Garrigues S., The Concept of Green Analytical Chemistry, Handbook of Green Analytical Chemistry, Wiley, Royaume-Uni, (2012).
55. Galuszka A., Konieczka P., Migaszewski Z. M., Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, TrAC-Trends in Analytical Chemistry, 37, (2012), 61-72.
56. de la Guardia M., Garrigues S., An Ethical Commitment and an Economic Opportunity, Challenges in green analytical chemistry, Royal Society of Chemistry, Royaume-Uni, (2011).

57. Armenta S., de la Guardia M., Namiésnik J., Green Microextraction, Analytical Microextraction Techniques, R.L.M. Valcárcel, S. Cárdenas, Bentham Science, (2017).
58. Wilkinson D., Smith G.C., A model of the mite parasite, *Varroa destructor*, on honeybees (*Apis mellifera*) to investigate parameters important to mite population growth, Ecological Modelling, 148, (2002), 263-275.
59. Papachristoforou A., Papaefthimiou C., Zafeiridou G., Goundy V., Watkins M., Theophilidis G., Monitoring the gravitational reflex of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. A novel bioassay for assessing toxic effects of acaricides, Pesticide Biochemistry Physiology, 101, (2011), 109-117.
60. Annoscia D., Del Piccolo F., Nazzi F., How does the mite *varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera* ? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees, Journal of Insect Physiology, 58, (2012), 1548-1555.
61. Boncristiani H., Underwood R., Evans J.D., Pettis J., Engelsdorp D.V., Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*, Journal of Insect Physiology, 58, (2012), 613-620.
62. Garrido P.M., Antúnez K., Martin M., Porrini M.P., Zunino P., Eguaras M.J., Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifer*) exposed to synthetic acaricides, Journal of Insect Physiology, 59, (2013), 113-119.
63. Beaurepaire A.L., Krieger K.J., Moritz R.F.A., Seasonal cycle inbreeding and recombination of the parasitic mite *varroa destructor* in honeybee colonies and its implication for the selection of acaricide resistance, Infection Genetics Evolution, 50, (2017), 49-54.
64. Gregorc A., Poklukar J., Rotenone and oxalic acid as alternative acaricidal treatments for *Varroa destructor* in honeybee colonies, Veterinary Parasitology, 111, (2003), 351-360.
65. Giacobino A., Molineri A., Cagnolo N.B., Merke J., Orellano E., Bertozzi E., Masciangelo G., Pietronave H., Pacini A., Salto C., Signorini M., Key management practices to prevent high infestation levels of *Varroa destructor* in honeybee colonies at the beginning of the honey yield season, Preventive Veterinary Medicine, 131, (2016), 95-102.
66. Kang Y., Blanco K., Davis T., Wang Y., DeGrandi-Hoffman G., Disease dynamics of honeybees with *varroa destructor* as parasite and virus vector, Mathematical Biosciences, 275, (2016), 71-92.

67. Giacobino A., Pacini A., Molineri A., Cagnolo N.B., Merke J., Orellano E., Bertozzi E., Masciangelo G., Pietronave H., Signorini M., Environment or beekeeping management : What explains better prevalence of honey bee colonies with high levels of *varroa destructor*?, *Research Veterinary Science*, 112, (2017), 1-6.
68. Hamiduzzaman M.M., Guzman-Novoa E., Goodwin P.H., Reyes-Quitana M., Koleoglu G., Correa-Benitez A., Petukhova T., Differential responses of Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) to viral replication following mechanical transmission of *Varroa destructor* parasitism, *Journal of Invertebrate Pathology*, 126, (2015), 12-20.
69. Rinkevich F.D., Danka R.G., Healy K.B., Influence of Varroa Mite (*Varroa destructor*) Management Practices on Insecticide Sensitivity in the Honey Bee (*Apis mellifera*), *Insects*, 9, (2017), 1-12.
70. Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B., Biology and control of *varroa destructor*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, (2010), 96-119.
71. McMenamin A.J., Genersch E., Honey bee colony losses and associated viruses, *Current Opinion in Insect Science*, 8, (2015), 121-129.
72. Règlement (CE) NO 396/2005 du parlement européen et du conseil du 23 février 2005 sur les teneurs maximales en résidus de pesticides dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive du conseil 91/414/EEC., *O.J.E.U.L*, 70, (2005).
73. Règlement (UE) No 37/2010 of 22 décembre 2009 de la commission sur les substances pharmacologiquement actives et leur classification concernant les limites maximales de résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale, *O.J.E.U.L*, 15, (2010).
74. Juan-Borrás M., Domenech E., Escriche I., Mixture-risk-assessment of pesticide residues in retail polyfloral honey, *Food Control*, 67, (2016), 127-134.
75. González-Martin M.I., Revilla I., Vivar-Quintana A.M., Betances Salcedo E.V., Pesticide residues in propolis from Spain and Chile. An approach using near infrared spectroscopy, *Talanta*, 165, (2017), 533-539.
76. Nozal M.J., Bernal J.L., Jiménez J.J., González M.J., Higes M., Extraction of thymol, eucalyptol, menthol and camphor residues from honey and beeswax. Determination by gas chromatography with flame ionization, *Journal of Chromatography A*, 954, (2002), 207-215.

77. Bogdanov S., Imdorf A., Kilchenmann V., Residues in wax and honey after Apilife VAR treatment, *Apidologie*, 29, (1998), 513-524.
78. Tonello N., M. Moressi B., Robledo S.N., D'Eramo F., Marioli J.M., Square wave voltammetry with multivariate calibration tools for determination of eugenol, carvacrol and thymol in honey, *Talanta*, 158, (2016), 306-314.
79. Martel A.C., Zeggane S., Determination of acaricides in honey by high-performance chromatography with photodiode array detection, *Journal of Chromatography A*, 954, (2002), 173-180.
80. Barganska Ž., Ślebioda M., Namieśnik J., Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland, *Food Control*, 31, (2013), 196-201.
81. Rissato S.R., Galhiane M.S., de Almeida M.V., Gerenutti M., Apon B.M., Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination, *Food Chemistry*, 101, (2017), 1719-1726.
82. Korta E., Bakkali A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., Study of semi-automated solid-phase extraction for the determination of acaricide residues in honey by liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 930, (2001), 21-29.
83. Korta E., Bakkali A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., Bogdanov S., Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax, *Analytica Chimica Acta*, 475, (2003) 97-103.
84. Adamczyk S., Lázaro R., Pérez-Arquillué C., Herrera A., Determination of synthetic acaricides residues in beeswax by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector, *Analytica Chimica Acta*, 581, (2007), 95-101.
85. Rial-Otero R., Gaspar E.M., Moura I., Capelo J.L., Gas chromatography mass spectrometry determination of acaricides from honey after a new fast ultrasonic-based solid phase micro-extraction sample treatment, *Talanta*, 71, (2007), 1906-1914.
86. Rissato S.R., Galhiane M.S., Knoll F.R.N., Gerenutti M., Apon B.M., Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection, *Journal of Chromatography A*, 1048, (2004), 153-159.

87. Shendy A.H., Al-Ghobashy M.A., Mohammed M.N., Gad Alla S.A., Lotfy H.M., Simultaneous determination of 200 pesticide residues in honey using gas chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with streamlined quantification approach, *Journal of Chromatography A*, 1427, (2016), 142-160.
88. Gallart-Mateu D., Rodriguez-Sojo S., de la Guardia M., Determination of tea tree oil terpenes by headspace gas chromatography mass spectrometry, *Analytical Methods*, 8, (2016), 4576-4583.
89. Cai J., Zhu P.X., Su Q., Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC-FTIR and GC-MS, *Food Chemistry*, 99, (2006), 401-407.
90. Li Y-Q., Kong D-X., Wu H., Analysis and evaluation of essential oil compounds of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy, *Industrial Crops and Products*, 41, (2013), 269-278.
91. Alissandrakis E., Daferera D., Tarantilis P.A., Polissiou M., Harizanis P.C., Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey, *Food Chemistry*, 82, (2003), 575-582.
92. Cacho J.I., Campillo N., Evaluation of three headspace sorptive extraction coatings for the determination of volatile terpenes in honey using gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1399, (2015), 18-24.
93. Viñas P., Soler-Romera M.J., Hernández-Córdoba M., Liquid chromatographic determination of phenol, thymol and carvacrol in honey using fluorimetric detection, *Talanta*, 69, (2006), 1063-1067.
94. Armenta S., Quintás G., Garrigues S., de la Guardia M., Determination of cyromazine in pesticide commercial formulations by vibrational spectrometric procedures, *Analytica Chimica Acta*, 524, (2004), 257-264.
95. Plonka M., Walorczyk S., Miszczyk M.M., Chromatographic methods for the determination of active substances and characterization of their impurities in pesticide formulations, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 85, (2016), 67-80.
96. Karasali H., Anagnostopoulos H., Ekonomopoulou H., Hourdakis A., Quality control data of fenthion and trifluralin determination in pesticide formulations, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 84, (2004), 55-63.
97. Siebers J., Besinger-Riedel A., Vinke C., Determination of active substances, co-formulants and impurities in plant protection products using high

- performance liquid chromatography and gas chromatography, *Journal of consumer Protection and food safety*, 9, (2014), 137-144.
98. Balayianmis G., Karasali H., Ambrus A., Rapid determination of fumoxadone and cymoxanil in commercial pesticide formulation by high performance liquid chromatography using C18 monolithic rod column, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93, (2014), 775-780.
99. Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M., Partial least squares-near infrared determination of pesticides commercial formulations, *Vibrational Spectroscopy*, 44, (2007), 273-278.
100. Gallart-Mateu D., Armenta S., de la Guardia M., Implementing the contamination prevention programs in the pesticide industry by infrared spectroscopy, *Talanta*, 119, (2014), 321-319.
101. Armenta S., Quintás G., Garrigues S., de la Guardia M., Mid-infrared and Raman spectrometry for quality control of pesticide formulations, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 24, (2005), 772-781.
102. Quintás G., Morales-Noé A., Garrigues S., de la Guardia M., Fourier transform infrared determination of Fluometuron in pesticide formulations, *Vibrational Spectroscopy*, 31, (2003), 63-69.
103. Peña R.M., Barciela J., Herrero C., Garcia-Martin S., Comparison of ultrasound-assisted extraction and direct immersion solid-phase microextraction methods for the analysis of monoterpenoids in wine, *Talanta*, 67, (2005), 129-135.
104. Harris R.J., *A primer of Multivariate statistics*, third ed., Lawrence Erlbaum Associates, publishers, Royaume-Uni, (2001).
105. Bouhsain Z., Garrigues S., de la Guardia M., Clean method for the simultaneous determination of propyphenazone and caffeine in pharmaceuticals by flow injection Fourier transform infrared spectrometry, *Analyst*, 122, (1997), 441-445.
106. Teixeira B., Marques A., Ramos C., Batista I., Serrano C., Matos O., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Saraiva J.A., Nunes M.L., European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil, *Industrial Crops Products*, 36, (2012), 81-87.

107. Hassiotis C.N., Lazari D.M., Decomposition process in the Mediterranean region. Chemical compounds and essential oil degradation from *Myrtus communis*, International Biodeterioration and Biodegradation, 64, (2010), 356-362.
108. Fisher K., Phillips C., Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?, Trends Food Science and Technology, 19, (2008), 156-164.
109. Hosni K., Zahed N., Chrif R., Abid I., Medfei W., Kallel M., Brahim N.B., Sebei H., Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence, Food Chemistry, 123, (2010), 1098-1104.
110. Avanço G.B., Ferreira F.D., Bomfim N.S., Peralta R.M., Brugnari T., Mallmann C.A., Abreu Filho B.A.D., Mikcha J.M.G., Machinski Jr.M., *Curcuma longa* L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production, Food Control, 73, (2017), 806-813.
111. Al-Asmari A.K., Athar M.T., Al-Faraidy A.A., Almuhaiza M.S., Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7, (2017), 147-150.
112. Raut J.S., Karuppayil S.M., A status review on the medicinal properties of essential oils, Industrial Crops Products, 62, (2014), 250-264.
113. Filiptsova O.V., Gazzavi-Rogozina L.V., Timoshyna I.A., Naboka O.I., Dyomina Y.V., Ochkur A.V., The essential oil of rosemary and its effect on the human image and numerical short-term memory, Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences, 4, (2017), 107-111.
114. Laribi B., Kouki K., Bettaieb T., Mougou A., Marzouk B., Essential oils and fatty acids composition of Tunisian, German and Egyptian caraway (*Carum carvi* L.) seed ecotypes: A comparative study, Industrial Crops Products, 41, (2013), 312-318.
115. Fillatre Y., Rondeau D., Daguin A., Communal P.Y., A workflow for multiclass determination of 256 pesticides in essential oils by liquid chromatography tandem mass spectrometry using evaporation and dilution approaches: Application to lavandin, lemon and cypress essential oils, Talanta, 149, (2016), 178-186.
116. Pellati F., Orlandini G., van Leeuwen K.A., Anesin G., Bertelli D., Paolini M., Benvenuti S., Camin F., Gas chromatography combined with mass

- spectrometry, flame ionization detection and elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry for characterizing and detecting the authenticity of commercial essential oils of *Rosa damascena* Mill, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27, (2013), 591-602.
117. Peter k. v., *Handbook of herbs and spices*, first ed., Cambredge, England, (2001).
118. Lohumi S., Lee S., Lee H., Cho B-K., A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration, *Trends in Food Science and Technology*, 46, (2015), 85-98.
119. Santana F.B., Gontijo L.C., Mitsutake H., Mazivila S.J., Souza L.M., Borges Neto W., Non-destructive fraud detection in rosehip oil by MIR spectroscopy and chemometrics, *Food Chemistry*, 209, (2016), 228-233.
120. Samojlik I., Mijatovic V., Petkovic S., Skrbic B., Bozin B., The influence of essential oil of aniseed (*Pimpinella anisum*, L.) on drug effects on the central nervous system, *Fitoterapia*, 83, (2012), 1466-1473.
121. Pavela R., Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*, *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17, (2014), 287-293.
122. Kapadiya S.M., Parikh J., Desai M.A., A greener approach towards isolating clove oil from buds of *Syzygium aromaticum* using microwave radiation, *Industrial Crops and products*, 112, (2018), 626-632.
123. Amzad Hossain M., Rashid AL Harbi S., Mohammed Weli A., Al-Riyami Q, Al-Sabahi Nasser J., Comparison of chemical constituents and antimicrobial activities of three essential oils from three different brands' clove samples collected from Gulf region, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, (2014), 262-268.
124. Cortés-Rojas D.F., Fernandes de Souza C.R., Oliveira W.P., Clove (*Syzygium aromaticum* L.): a precious spice, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, (2014), 90-96.
125. Gülçin İ, Elmastaş M., Aboul-Enein H.Y., Antioxidant activity of clove oil- A powerful antioxidant source, *Arabian Journal of Chemistry*, 5, (2012), 489-499.
126. Sang-Eun M., Hye-Young K., Jeong-Dan C., Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria, *Archives of oral biology*, 56, (2011), 907-916.

127. Vijayasteltar L., Gopinathan Nair G., Balu M., Kuttan R., Krishna kumar I.M., Safety assessment of standardized polyphenolic extract of clove buds: Subchronic toxicity and mutagenicity studies, *Toxicology Reports*, 3, (2016), 439-449.
128. Wenqiang G., Shufen L., Ruixiang Y., Shaokun T., Can Q., Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods, *Food Chemistry*, 101, (2007), 1558-1564.
129. Chen X., Ren L., Li M., Qian J., Fan J., Du B., Effects of clove essential oil and eugenol on quality and browning control of fresh-cut lettuce, *Food Chemistry*, 214, (2017), 432-439.
130. Dima C., Dima S., Essential oils in foods: extraction, stabilization and toxicity, *Current option in food science*, 5, (2015), 29-35.
131. Santamarina M.P., Roselló J., Giménez S., Blázquez M.A., Commercial *Laurus nobilis* L. and *Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry essential oils against post-harvest phytopathogenic fungi on rice, *LWT-Food Science and Technology*, 65, (2016), 325-332.
132. Alexandru L., Cravotto G., Giordana L., Binello A., Chemat F., Ultrasound-assisted extraction of clove buds using batch-and flow-reactors: A comparative study on a pilot scale, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, (2013), 167-172.
133. Yang Y-C., Wei M-C., Hong S-J., Ultrasound-assisted extraction and quantitation of oils from *Syzygium aromaticum* L. flower bud (clove) with supercritical carbon dioxide, *Journal of Chromatography A*, 1323, (2014), 18-27.
134. Pawar V.C., Thaker V.S., In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*, *Mycoses*, 49, (2006), 316-323.
135. Chaieb K., Hajlaoui H., Zmantar T., Ben Kahla-Nakbi A., Rouabhia M., Mahdouani k., Bakhrouf A., The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review, *Phytotherapy Research*, 21, (2007), 501-506.
136. Santana de Oliveira M., Almeida da Cosla W., Santiago Pereira D, Rafael Santos Botelho J., de Alencar Menezes T.O., de Aguiar Andrade E.H., Marques da Silva S.H., Pedro da Silva Sousa Filho A., de Carvalho Junior R.N., Chemical composition and phytotoxic activity of clove (*Syzygium*

- aromaticum* L.) essential oil obtained with supercritical CO₂, The Journal of Supercritical Fluids, 118, (2016), 185-193.
137. Della Porta G., Taddeo R., D'Urso E., Reverchon E., Isolation of Clove Bud and Star Anise Essential Oil by Supercritical CO₂ Extraction, LWT-Food Science and Technology, 31, (1998), 454-460.
138. Li Y., Fabiano-Tixier A.S., Chemat F., Essential oils: From Conventional to Green Extraction. Green chemistry for sustainability, Cham: Springer International Publishing, (2014).
139. González-River J., Duce C., Falconieri D., Ferrari C., Ghezzi L., Piras A., Tine M., Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): chemical composition and thermal analysis, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 33, (2016), 308-318.
140. Tekin K., Kuddusi Akalin M., GülŞeker M., Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design, Industrial Crops and Products, 77, (2015), 954-960.
141. Scopel R., Falcão M.A., Lucas A.M., Almeida R. N., Gandolfi P.H.K., Cassel E., Vargas R.M.F., Supercritical fluid extraction from *Syzygium aromaticum* buds: Phase equilibrium, mathematical modeling and antimicrobial activity, The Journal of Supercritical Fluids, 92, (2014), 223-230.
142. Gopalakrishnan N., Pillai V Shanti P., Narayanan C.S., Composition of clove (*Syzygium aromaticum*) Bud Oil Extracted Using Carbon Dioxide, Journal of Science of Food Agriculture, 50, (1990), 111-117.
143. Reverchon E., Marrone C., Supercritical extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling, Chemical Engineering Science, 52, (1997), 3421-3428.
144. Clifford A.A., Basile A., Al-Saidi S.H.R., A comparison of the extraction of clove buds with supercritical carbon dioxide and superheated water, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 364, (1999), 635-637.
145. Chatterjee D., Bhattacharjee P., Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Eugenol from Clove Buds, Food Bioprocess Technology, 6, (2013), 2587-2599.

146. Desai M., Parikh J., Parikh P.A., Extraction of Natural Products Using Microwaves as a Heat Source, *Separation and Purification Reviews*, 39, (2010), 1-32.
147. Vargas Jentzsch P., Gualpa F., Ramos L.A., Ciobota V., Adulteration of clove essential oil: Detection using a handheld Raman spectrometer, *Flavour and Fragrance Journal*, 33, (2018), 184-190.
148. Srivastava A.K., Srivastava S.K., Syamsunda K.V., Bud and leaf essential oil composition of *syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour and Fargrance Journal*, 20, (2005), 51-53.
149. Plata-Rueda A., Mendonça Campos J., da Silva Rolim G., Carlos Martínez L., Henrique Dos Santos M., Lemes Fernandes F., Eduardo Serrão J., Cola Zanuncio J., Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behaviour repellency response on granary weevil, *Sitophilus granaries*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, (2018), 263-270.
150. Vargas Jentzsch P., Ciobotă V., Raman spectroscopy as an analytical tool for analysis of vegetable and essential oils, *Flavour and Fragrance Journal*, 29, (2014), 287-295.
151. Vargas Jentzsch P., Ramos L.A., Ciobotă V., Handheld Raman spectroscopy for the distinction of essential oils used in the cosmetics industry, *Cosmetics*, 2, (2015), 162-176.
152. Schulz H., Schrader B., Quilitzsch R., Pfeffer S., Krüger H., Rapid Classification of Basil Chemotypes by Various Vibrational Spectroscopy Methods, *Journal of Agriculture Chemistry*, 51, (2003), 2475-2481.
153. Lafhal S., Vanloot P., Bombarda I., Kister J., Dupuy N., Chemometric analysis of French lavender and lavandin essential oils by near infrared spectroscopy, *Industrial Crops and Products*, 80, (2016), 156-164
154. Ercioglu E., Murat Velioglu H., Hakki Boyaci I., Determination of terpenoid contents of aromatic plants using NIRS, *Talanta*, 178, (2018), 716-721.
155. Perino S., Petitcolas E., de la Guardia, M., Chemat F., Portable microwave assisted extraction: An original concept for green analytical chemistry, *Journal of Chromatography A*, 1315, (2013), 200-203

156. Hosni K., Hassen I., M'Rabet Y., Casabianca H., Biochemical response of *Cupressus sempervirens* to cement dust: Yields and chemical composition of its essential oil, *Arabian Journal of Chemistry*, 12, (2019), 1308-1314.
157. Sinelli N., Cerretani L., Di Egidio V., Bendini A., Casiraghi E., Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity, *Food Research International*, 43, (2010), 369-375.
158. Talpur M.Y., Kara H., Sherazi S.T.H., Filiz Ayyildiz H., Topkafa M., NurArslan F., Naz S., Durmaz F., Sirajuddin. Application of multivariate chemometric techniques for simultaneous determination of five parameters of cottonseed oil by single bounce attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy, *Talanta*, 129, (2014), 473-480.
159. Moghaddam M., Miran S.N.Kh., Pirbalouti A. Gh., Mehdizadeh L., Ghaderi Y., Variation in essential oil composition and antioxidant activity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) fruits during stages of maturity, *Industrial crops and products*, 70, (2015), 163-169.
160. Cascant M.M., Garrigues S., de la Guardia M., Comparison of near and mid infrared spectroscopy as green analytical tools for the determination of total polar materials in fried oils, *Microchemical Journal*, 135, (2017), 55-59.
161. Bachion de Santana F., Caixeta Gontijo L., Mitsutake H., Mazivila S.J., de Souza L.M., Borges Neto W., Non-destructive fraud detection in rosehip oil by Mir spectroscopy and chemometrics, *Food Chemistry*, 209, (2016), 228-233.
162. Kuligowski J., Quintás G., Garrigues S., de la Guardia M., Determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements using partial least squares-Fourier transform infrared spectroscopy, *Talanta*, 77, (2008), 229-234.
163. Sowbhagya H.B., Srinivas P., Krishnamurthy N., Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds, *Food Chemistry*, 120, (2010), 230-234.
164. Alves-Silva J.M., Dias dos Santos S.M., Pintado M.E., Pérez-Álvarez J.A., Fernández-López J., Viuda-Martos M., Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal, *Food Control*, 32, (2013), 371-378.
165. Pavela R., Žabka M., Bednář J., Tříška J., Vrchotová N., New knowledge for yield, composition and insecticidal activity of essential oils obtained from the

- aerial parts or seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), *Industrial Crops Products*, 83, (2016), 275-282.
166. González-Rivera J., Duce C., Falconieri D., Ferrari C., Ghezzi L., Piras A., Tine M. R., Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 33, (2016), 308-318.
167. Zoubiri S., Baaliouamer A., Seba N., Chamouni N., Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil, *Arab Journal of Chemistry*, 7, (2014), 480-485.
168. Moghaddam M., Miran S.N.K., Pirbalouti A.G., Mehdizadeh L., Ghaderi Y., Variation in essential oil composition and antioxidant activity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) fruits during stages of maturity, *Industrial Crops Products*, 70, (2015), 163-169.
169. Rihawy M.S., Bakraji E.H., Odeh A., PIXE and GC-MS investigation for the determination of the chemical composition of Syrian *Cuminum cyminum* L., *Applied Radiation Isotopes*, 86, (2014), 118-125.
170. Simon J.E., Quinn J., Characterisation of essential oil of parsley, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, (1988), 467-472.
171. Abu-Darwish M. S., Cabral C., Goncalves M.J., Cavaleiro C., Cruz M.T., Efferth T., Salgueiro L., Artemisia herba-alba essential oil from Buseirah (South Jordan): Chemical characterization and assessment of safe antifungal and anti-inflammatory doses, *Journal of Ethnopharmacol*, 174, (2015), 153-160.
172. Salido S., Valenzuela L.R., Altarejos J., Nogueras M., Sánchez A., Cano E., Composition and infraspecific variability of Artemisia herba-alba from southern Spain, *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, (2004), 265-277.
173. Formisano C., Delfine S., Oliviero F., Tenore G.C., Rigano D., Senatore F., 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), *Industrial Crops Products*, 63, (2015), 256-263.
174. Roby M.H.H., Sarhan M.A., Selim K.A.H., Khalel K.I., Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum*

- vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), *Industrial Crops Products*, 44, (2013), 437-445.
175. Boukhatem M.N., Kameli A., Saidi F., Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): Chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens, *Food Control*, 34, (2013), 208-213.
176. Boukhris M., Ben Nasri-Ayachi M., Mezghani I., Bouaziz M., Boukhris M., Sayadi S., Trichomes morphology, structure and essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Hér. (Geraniaceae), *Industrial Crops Products*, 50, (2013), 604-610.
177. Tapondjou A.L., Adler C., Fontem D.A., Bouda H., Reichmuth C., Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val, *Journal of Stored Products Research*, 41, (2005), 91-102.
178. Vernin G., Boniface C., Metzger J., Ghiglione C., Hammoud A., Suon K., Fraisse D., Parkanyi C., GC-MS-specma bank analysis of *Juniperus Communis* needles and berries, *Phytochemistry*, 27, (1988), 1061-1106.
179. Rashed M.M.A., Tong Q., Nagi A., Li J-P, Khan N.U., Chen L., Rotail A., Bakry A.M., Isolation of essential oil from *Lavandula angustifolia* by using ultrasonic-microwave assisted method preceded by enzymolysis treatment, and assessment of its biological activities, *Industrial Crops Products*, 100, (2017), 236-245.
180. Kumar P., Mishra S., Malik A., Satya S., Efficacy of *Mentha piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L, *Industrial Crops Products*, 39, (2012), 106-112.
181. Zhao D., Xu Y.W., Yang G.L., Husaini A.M., Wu W., Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. and *Mentha spicata* L. from China, *Industrial Crops Products*, 42, (2013), 251-260.
182. Chauhan R.S., Kaul M.K., Shahi A.K., Kumar A., Ram G., Tawa A., Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India, *Industrial Crops Products*, 29, (2009), 654-656.
183. Rehman S-U., Latief R., Bhat K.A., Khuroo M.A., Shawl A.S., Chandra S., Comparative analysis of the aroma chemicals of *Melissa officinalis* using hydrodistillation and HS-SPME techniques, *Arab Journal Chemistry*, 10, (2017), S2485-S2490.

184. Jalal Z., El Atki Y., Lyoussi B., Abdellaoui A., Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: Preventive approach against nosocomial infections, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5, (2015), 458-461.
185. El Ouadi Y., Manssouri M., Bouyanzer A., Majidi L., Bendaif H., Elmsellem H., Shariati M. A., Melhaoui A., Hammouti B., Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples, *Microbial Pathogenesis*, 107, (2017), 321-326.
186. Hosni K., Hassen I., Chaâbane H., Jemli M., Dallali S., Sebei H., Casabianca H., Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity, *Industrial Crops Products*, 47, (2013), 291-299.
187. Zermane A., Larkeche O., Meniai A.H., Crampon C., Badens E., Optimization of Algerian rosemary essential oil extraction yield by supercritical CO₂ using response surface methodology, *Comptes Rendus Chimie*, 19, (2016), 538-543.
188. Hayouni el A., Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J.Y., Mohammed H., Hamdi M., Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat, *International Journal of Food Microbiology*, 125, (2008), 242-251.
189. Russo A., Formisano C., Rigano D., Senatore F., Delfine S., Cardile V., Rosselli S., Bruno M., Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions, *Food and Chemical Toxicology*, 55, (2013), 42-47.
190. Ghasemi Pirbalouti A., Hashemi M., Ghahfarokhi F.T., Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L., *Industrial Crops Products*, 48, (2013), 43-48.
191. Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J., Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*, *Food Microbiology*, 21, (2004), 33-42.
192. Boulila A., Hassen I., Haouari L., Mejri F., Amor I.B., Casabianca H., Hosni K., Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.), *Industrial Crops Products*, 74, (2015), 485-493.

193. Mediouni Ben Jemâa J., Tersim N., Toudert K.T., Khouja M.L., Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition, *Journal of Stored Products Research*, 48, (2012), 97-104.
194. Jeyaratnam N., Nour A.H., Kanthasamy R., Nour A.H., Yuvaraj A.R., Akindoyo J.O., Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation, *Industrial Crops Products*, 92, (2016), 57-66.
195. Wang R., Wang R., Yang B., Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, (2009), 289-292.
196. Harkat-Madouri L., Asma B., Madani K., Bey-Ould Si Said Z., Rigou P., Grenier D., Allalou H., Remini H., Adjaoud A., Boulekbache-Makhlouf L., Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria, *Industrial Crops Products*, 78, (2015), 148-153.
197. Luís Â., Duarte A., Gominho J., Domingues F., Duarte A.P., Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils, *Industrial Crops Products*, 79, (2016), 274-282.
198. Gardeli C., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris T., Komaitis M., Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chemistry*, 107, (2008), 1120-1130.
199. Bouzabata A., Cabral C., Goncalves M.J., Cruz M.T., Bighelli A., Cavaleiro C., Casanova J., Tomi F., Salgueiro L., *Myrtus communis* L. as source of a bioactive and safe essential oil, *Food and Chemical Toxicology*, 75, (2015), 166-172.
200. Hossain M.A., Harbi S.R.A.L., Weli A.M., Al-Riyami Q., Al-Sabahi J.N., Comparison of chemical constituents and antimicrobial activities of three essential oils from three different brands' clove samples collected from Gulf region, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, (2014), 262-268.
201. Djerrad Z., Kadik L., Djouahri A., Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances,

- depending on geographic variation and environmental conditions, *Industrial Crops Products*, 74, (2015), 440-449.
202. Fekih N., Allali H., Merghache S., Chaïb F., Merghache D., El Amine M., Djabou N., Muselli A., Tabti B., Costa J., Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, (2014), 97-103.
203. Jelen H.H., Gracka A., Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: A comparison of terpenes profiles with hydrodistillation, *Journal Chromatography A*, 1418, (2015), 200-209.
204. Bagheri H., Abdul Manap M.Y., Solati Z., Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO(2) extraction and hydrodistillation, *Talanta*, 121, (2014), 220-228.
205. Aissi O., Boussaid M., Messaoud C., Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities, *Industrial Crops Products*, 91, (2016), 56-65.
206. Simas D.L.R., de Amorim S.H.B.M., Goulart F.R.V., Alviano C.S., Alviano D.S., da Silva A.J.R., Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit, *Industrial Crops Products*, 98, (2017), 108-115.
207. Fouad H.A., da Camara C.A.G., Chemical composition and bioactivity of peel oils from *Citrus aurantiifolia* and *Citrus reticulata* and enantiomers of their major constituent against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), *Journal of Stored Products Research*, 73, (2017), 30-36.
208. Khadhri A., Bouali I., Belkhir S., El Mokni R., Smiti S., Almeida C., Nogueira J.M.F., Araújo M.E.M., Chemical Variability of Two Essential Oils of Tunisian Rue: *Ruta montana* and *Ruta chalepensis*, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17, (2014), 445-451.
209. Boutoumi H., Moulay S., khodja M., Essential Oil from *Ruta montana* L. (Rutaceae) Chemical Composition, Insecticidal and Larvicidal Activities, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12, (2009), 714-721.
210. Zhang L., Yang Z., Wei J., Su P., Chen D., Pan W., Zhou W., Zhang K., Zheng X., Lin L., Tang J., Du Z., Contrastive analysis of chemical composition of essential oil from twelve *Curcuma* species distributed in China, *Industrial Crops Products*, 108, (2017), 17-25.

211. Angel G. R., Menon N., Vimala B., Nambisan B., Essential oil composition of eight starchy Curcuma species, *Industrial Crops Products*, 60, (2014), 233-238.
212. Noori S., Zeynali F., Almasi H., Antimicrobial and antioxidant efficiency of nanoemulsion-based edible coating containing ginger (*Zingiber officinale*) essential oil and its effect on safety and quality attributes of chicken breast fillets, *Food Control*, 84, (2018), 312-320.
213. Tavares da Silva F., Furtado da Cunha k., Martins Fonseca L., Dias Antunes M., Lisie Mello El Halal, Fiorentini Â. M., da Rosa Zavareze E., Guerre Dias A. R., Action of ginger essential oil (*Zingiber Officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ, *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, (2018), 107-115.
214. Singh G., Kapoor I.P.S., Singh P., de Haluani C.S., de Lampasona M.P., Catalan C.A.N., Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *zingiber officinale*, *Food and Chemical Toxicology*, 46, (2008), 3295-3302.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

1- **Article (1):** Bounaas K., Bouzidi N., Daghbouche Y., Garrigues S., de la Guardia M., El Hattab M., Fourier transform infrared analysis of commercial formulations for Varroa treatment , *Analytical Methods*, 9, (2017), 6574-6582.

2- **Article (2):** Bounaas K., Bouzidi N., Daghbouche Y., Garrigues S., de la Guardia M., El Hattab M., Essential oil counterfeit identification through middle infrared spectroscopy, *Microchemical Journal*, 139, (2018), 347-356.

3- Deux articles sont soumis pour publication.

COMMUNICATIONS

1- Bounaas K., Bouzidi N., Daghbouche Y., Garrigues S., de la Guardia M., El Hattab M., Fourier Transform infrared analysis of commercial formulations for Varroa treatment, XXI Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, Valencia, Espagne, (2017).

2- Bounaas K., Bouzidi N., Daghbouche Y., Garrigues S., de la Guardia M., El Hattab M., Essential oil counterfeit identification through middle infrared spectroscopy, 9^{ème} édition du congrès national de la Société Algérienne de la Chimie (SAC) à l'USTHB (2018).

3- Bounaas K., Bouzidi N., Daghbouche Y., El Hattab M., Garrigues S., de la Guardia M., Near and middle infrared spectroscopy as green analytical tool for the determination of essential oils adulteration, Séminaire International des Sciences Alimentaires (SISA), Universités Frères Mentouri Constantine, (2018).

4- Bounaas K., Bouzidi N., Daghbouche Y., El Hattab M., Gallart-Mateu D., Garrigues S., de la Guardia M., Infrared base analysis of *Syzygium aromaticum* L. essential oil in commercial samples, 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem), Ankara/ Turquie, (2019).

- 5- Bounaas K., Bouzidi N., Daghbouche Y., El Hattab M., Gallart-Mateu D., Garrigues S., de la Guardia M., Green Infrared analysis of *Syzygium aromaticum* L. in adulterated commercial samples, XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, Valladolid/ Espagne, (2019).

APPENDICE A

LISTE DES ABREVIATIONS

A:	Absorbance
ATR:	Attenuated total reflectance
cm:	Centimètre
CG-SM :	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse
CL-SM :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse
CG- SMRI :	la spectrométrie de masse à rapport isotopique couplée à la chromatographie capillaire en phase gazeuse
CH ₂ Cl ₂ :	Dichloromethane
CL :	Chromatographie en phase liquide
°C :	Degrés Celsius
EAU :	Extraction assistée par ultrason
EAM :	Extraction assistée par micro-ondes
EFS :	Extraction par fluide supercritique
ELL :	Extraction liquide-liquide
EPS :	Extraction en phase solide
FAD	United States Food and Drug Administration Administration américaine de denrées alimentaires et des médicaments
g:	Gramme
GRAS :	Generally recognized as safe Généralement reconnue comme sans danger
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance
IRTF :	Infrarouge à transformée de Fourier
Kg :	Kilogramme
KWh :	Kilowatt-heure
LMR :	Limites maximales de résidus
MEPS :	Micro-extraction en phase solide
mg :	Milligramme
min :	Minute
mm :	Millimètre
MIR :	Middle infrared Infrarouge moyen
mL :	Millilitre
MPA :	Multi purpose Analyser

NIR :	Near infrared Infrarouge proche
PLS :	Partial least square Régression des moindres carrés partiels
R :	Coefficient de régression
RMSEC :	Root mean square error of calibration Erreur quadratique moyenne de calibration
RMSECV :	Root mean square error of cross validation Erreur quadratique moyenne de la validation croisée
RMSEP :	Root mean square error of prediction Erreur quadratique moyenne de prédiction
RPD :	Residual predictive deviation Ecart prédictif résiduel
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
SAA :	Spectroscopie d'absorption atomique
SC-CO ₂ :	Dioxyde de carbone supercritique classique
USC-CO ₂ :	Dioxyde de carbone supercritique assisté par ultrasons
UV-Vis :	Spectroscopie ultraviolet-visible
V/V :	proportions volumiques
VLs:	variables latentes
W :	Watts
μL :	Microlitre

APPENDICE B

Appendice B/ Annexe 1: Représentation des meilleurs modèles de PLS-IRTF.

Composé/ Camphre							
Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R ² (Cal)	R ² (CV)	R ² (Pré)	VLs
Pas de prétraitement des données	0,009	0,012	0,016	0,9939	0,9888	0,9569	4
	0,011	0,014	0,017	0,9907	0,9851	0,9506	2
Correction d'offset	0,011	0,014	0,013	0,9904	0,9836	0,9726	3
	0,012	0,014	0,014	0,9894	0,9845	0,9665	3
	0,013	0,015	0,016	0,9882	0,9826	0,9593	3
Soustraction d'une droite	0,011	0,013	0,019	0,9908	0,9875	0,9409	2
	0,010	0,013	0,024	0,9927	0,9873	0,9020	3
Normalisation vectorielle (SNV)	0,011	0,027	--	0,9914	0,9426	--	9
	0,008	0,011	--	0,9957	0,9910	--	8
Normalisation Min-Max	0,019	0,030	--	0,9722	0,9289	--	3
	0,024	0,030	--	0,9574	0,9276	--	4
	0,020	0,034	--	0,9721	0,9098	--	6
Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,021	0,023	--	0,9696	0,9256	--	8
	0,031	0,035	--	0,9620	0,9035	--	5
Dérivée première	0,010	0,012	0,020	0,9920	0,9888	0,9346	2
	0,010	0,012	0,026	0,9925	0,9882	0,8884	3
Dérivée seconde	0,012	0,015	0,015	0,9892	0,9832	0,9623	7
	0,013	0,017	0,016	0,9890	0,9770	0,9564	7
Dérivée première + soustraction d'une droite	0,010	0,012	0,040	0,9924	0,9888	0,7417	5
	0,010	0,0132	0,037	0,9928	0,9862	0,7700	8
Dérivée première + normalisation vectorielle (SNV)	0,007	0,011	--	0,9971	0,9909	--	9
	0,011	0,023	--	0,9923	0,9597	--	10
Dérivée première + correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,025	0,036	--	0,9558	0,8984	--	5
	0,023	0,040	--	0,9628	0,8745	--	8

Note: domaine spectral de 1793,8-1685,8; 1410-1307,8; 883,41-804,33; 653,9-470,6.

Appendice B/ Annexe 1 (suite)

Composé/ Thymol							
Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R ² (Cal)	R ² (CV)	R ² (Pré)	VLs
Pas de prétraitement des données	0,033	0,041	0,320	0,9998	0,9997	0,9295	5
	0,030	0,042	0,334	0,9999	0,9997	0,9229	6
	0,027	0,040	0,362	0,9999	0,9997	0,9117	5
Correction d'offset	0,108	0,111	0,287	0,9980	0,9978	0,9432	2
	0,034	0,039	0,350	0,9998	0,9997	0,9175	3
	0,033	0,042	0,331	0,9998	0,9997	0,9244	4
Soustraction d'une droite	0,034	0,039	0,0320	0,9998	0,9997	0,9306	3
	0,041	0,047	0,339	0,9997	0,9996	0,9209	3
	0,031	0,043	0,360	0,9998	0,9997	0,9124	4
Normalisation vectorielle (SNV)	0,062	0,115	--	0,9994	0,9976	--	9
	0,141	0,197	--	0,9968	0,9931	--	5
Normalisation Min-Max	0,063	0,085	--	0,9994	0,9987	--	6
	0,068	0,091	--	0,9993	0,9982	--	7
Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,071	0,181	--	0,9993	0,9942	--	12
	0,088	0,187	--	0,9988	0,9938	--	11
Dérivée première	0,061	0,093	0,335	0,9994	0,9985	0,9226	5
	0,102	0,122	0,349	0,9982	0,9973	0,9160	3
	0,082	0,095	0,351	0,9989	0,9984	0,9151	4
Dérivée seconde	0,096	0,105	0,324	0,9985	0,9980	0,9275	4
	0,092	0,128	0,331	0,9986	0,9971	0,9246	7
	0,095	0,105	0,331	0,9985	0,9980	0,9244	4
	0,083	0,093	0,339	0,9988	0,9985	0,9209	4
Dérivée première + soustraction d'une droite	0,060	0,100	0,311	0,9994	0,9982	0,9335	5
	0,032	0,035	0,357	0,9998	0,9997	0,9119	7
	0,035	0,039	0,435	0,9998	0,9997	0,8692	3
Dérivée première + normalisation vectorielle (SNV)	0,289	0,328	--	0,9865	0,9808	--	7
	0,297	0,337	--	0,9858	0,9798	--	6
Dérivée première + correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,533	0,693	--	0,9589	0,9146	--	13

Note: domaine spectral de 1793,8-1685,8; 1410-1307,8; 883,41-804,33; 653,9-470,6.

Appendice B/ Annexe 1 (suite)

Composé/ Menthol							
Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R ² (Cal)	R ² (CV)	R ² (Pré)	VLs
Pas de prétraitement des données	0,012	0,018	--	0,9898	0,9749	--	6
	0,007	0,012	--	0,9964	0,9887	--	8
Correction d'offset	0,014	0,021	0,023	0,9854	0,9641	0,9250	6
	0,006	0,011	--	0,9975	0,9904	--	9
	0,008	0,014	--	0,9962	0,9851	--	8
Soustraction d'une droite	0,014	0,020	0,023	0,9858	0,9689	0,9278	5
	0,013	0,018	--	0,9883	0,9737	--	6
Normalisation vectorielle (SNV)	0,065	0,082	--	0,7015	0,4658	--	5
	0,021	0,041	--	0,9704	0,8675	--	11
Normalisation Min-Max	0,022	0,057	--	0,9703	0,7441	--	13
Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,084	0,097	--	0,4895	0,2582	--	4
Dérivée première	0,012	0,021	--	0,990	0,9658	--	12
Dérivée seconde	0,016	0,023	0,0171	0,9832	0,9582	0,9582	7
Dérivée première + soustraction d'une droite	0,010	0,019	--	0,9934	0,9719	--	13
Dérivée première + normalisation vectorielle (SNV)	0,032	0,043	--	0,9340	0,8529	--	11
Dérivée première + correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,055	0,063	--	0,7996	0,6889	--	9

Note: domaine spectral de 1793,8-1685,8; 1410-1307,8; 883,41-804,33; 653,9-470,6.

Appendice B/ Annexe 1 (suite)

Composé/ Eucalyptol							
Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R ² (Cal)	R ² (CV)	R ² (Pré)	VLs
Pas de prétraitement des données	0,016	0,028	0,044	0,9989	0,9961	0,9804	8
Correction d'offset	0,018	0,026	0,029	0,9986	0,9966	0,9981	6
	0,025	0,030	0,039	0,9972	0,9954	0,9852	4
	0,027	0,033	0,036	0,9966	0,9947	0,9874	3
	0,023	0,029	0,032	0,9977	0,9960	0,9897	4
	0,024	0,029	0,033	0,9974	0,9959	0,9892	3
Soustraction d'une droite	0,026	0,029	0,034	0,9969	0,9958	0,9882	2
	0,031	0,014	0,035	0,9953	0,9805	0,9880	2
	0,021	0,034	0,036	0,9981	0,9942	0,9871	4
Normalisation vectorielle (SNV)	0,036	0,073	--	0,9946	0,9737	--	10
	0,028	0,064	--	0,9969	0,9802	--	14
Normalisation Min-Max	0,023	0,076	--	0,9979	0,9716	--	14
	0,028	0,066	--	0,9968	0,9788	--	12
Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,063	0,105	--	0,9830	0,9459	--	10
	0,129	0,175	--	0,9264	0,8492	--	7
Dérivée première	0,024	0,033	0,036	0,9975	0,9946	0,9869	8
	0,024	0,032	0,037	0,9975	0,9949	0,9864	9
	0,023	0,030	0,037	0,9978	0,9955	0,9861	10
Dérivée seconde	0,026	0,037	0,045	0,9970	0,9931	0,9800	9
Dérivée première + soustraction d'une droite	0,024	0,033	0,037	0,9975	0,9947	0,9863	8
	0,026	0,037	0,042	0,9975	0,9931	0,9820	9
Dérivée première + normalisation vectorielle (SNV)	0,141	0,196	--	0,9177	0,8116	--	12
	0,157	0,244	--	0,8968	0,7060	--	11
Dérivée première + correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,266	0,219	--	0,6566	0,7996	--	11
	0,337	0,258	--	0,4401	0,7049	--	7

Note: domaine spectral de 1793,8-1685,8; 1410-1307,8; 883,41-804,33; 653,9-470,6.

Appendice B/ Annexe 2: Pourcentage de récupération pour le camphre, le thymol, le menthol et l'eucalyptol.

Composé/ Camphre				
Traitement spectral	VLs	A	B	C
Pas de prétraitement des données	4	(93,1 ± 3,5)%	(101,9 ± 5,7)%	(81,1 ± 6,4)%
	2	(73,5 ± 24,4)%	(99,4 ± 6,7)%	(75,6 ± 20,2)%
Correction d'offset	3	(94,7 ± 10,3)%	(98,7 ± 10,1)%	(77,2 ± 21,0)%
Dérivée première	2	(81,8 ± 14,6)%	(90,6 ± 7,3)%	(69,1 ± 32,2)%
Dérivée seconde	7	(73,5 ± 20,8)%	(92,0 ± 3,5)%	(75,0 ± 14,03)%

Composé/ Thymol				
Traitement spectral	VLs	A	B	C
Pas de prétraitement des données	6	(113,8 ± 6,5)%	(104,8 ± 9,6)%	(113,8 ± 12,2)%
	5	(118,6 ± 6,9)%	(104,8 ± 9,04)%	(105,8 ± 1,3)%
Correction d'offset	4	(117,04 ± 4,7)%	(108,7 ± 1,5)%	(105,8 ± 1,8)%
Soustraction d'une droite	4	(116,7 ± 4,3)%	(105,9 ± 5,0)%	(105,5 ± 1,0)%
Dérivée première	4	(113,9 ± 6,0)%	(99,6 ± 16,4)%	(105,6 ± 6,7)%
Dérivée seconde	5	(116,2 ± 5,2)%	(111,1 ± 11,7)%	(106 ± 5,6)%
Dérivée première + soustraction d'une droite	5	(116,1 ± 4,3)%	(103,6 ± 12,6)%	(105,8 ± 8,7)%

Composé/ Menthol				
Traitement spectral	VLs	A	B	C
Correction d'offset	6	(86,3 ± 14,7)%	(95,2 ± 6,0)%	(111,7 ± 20,3)%
Soustraction d'une droite	5	(94,7 ± 10,7)%	(101,7 ± 5,2)%	(108,2 ± 6,7)%
Dérivée seconde	9	(93,9 ± 14,5)%	(110,5 ± 3,0) %	(103,3 ± 2,3)%

Appendice B/ Annexe 2 (la suite)

Composé/ Eucalyptol				
Traitement spectral	VLs	A	B	C
Pas de prétraitement des données	8	(103,0 ± 9,8)%	(111,1 ± 3,4)%	(114,5 ± 7,6)%
Correction d'offset	6	(100,1 ± 5,0)%	(100,3 ± 2,3)%	(107,1 ± 7,9)%
	3	(100,5 ± 4,2)%	(100,8 ± 3,2)%	(117,0 ± 9,6)%
	4	(104,8 ± 6,3)%	(97,4 ± 4,6)%	(115 ± 4,1)%
	3	(107,0 ± 7,0)%	(101,7 ± 2,2)%	(112,1 ± 4,1)%
Soustraction d'une droite	2	(107,4 ± 6,5)%	(102,0 ± 3,7)%	(113,5 ± 5,0)%
	2	(104,9 ± 6,1)%	(102,8 ± 3,3)%	(109,3 ± 4,3)%
	4	(108,2 ± 5,8)%	(104,8 ± 1,5)%	(104,3 ± 9,9)%
Dérivée première	8	(105 ± 7,5)%	(102,3 ± 4,9)%	(110,7 ± 3,0)%
Dérivée seconde	9	(103,6 ± 7,4)%	(100,2 ± 6,0)%	(111 ± 4,3)%
Dérivée première + soustraction d'une droite	8	(104,1 ± 7,4)%	(102 ± 5,2)%	(110,7 ± 3,1)%

APPENDICE C

Huiles essentielles évaluées dans cette étude ainsi que leurs principaux composants chimiques tels que rapportés dans la littérature.

Famille	espèce végétale	nom commun	composés principaux	Réf.
Apiaceae	<i>Pimpinella anisum</i> L.	Anis	trans-Anéthol (88,50%), γ -himachalène (3,10%)	[120]
			trans-Anéthol (81,30%), γ -himachalène (12,30%)	[121]
	<i>Apium graveolens</i> L.	Celeri	Limonène (63,90%), β -selinène (16,40%)	[163]
			β -Selinène (37,40%), phéllandral (17,20%), limonène (16,00%)	[164]
	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Fenouil	trans -Anéthol (59,97%, 63,23%), fenchone (21,42%, 25,04%), estragole (3,76%, 4,75 %), limonène (2,68%, 2,99%)	[165]
			trans -Anéthol (81,60%, 79,00%), fenchone (8,70%, 10,90%), estragole (4%, 4,20%), limonène (3,50%, 3.20%).	[166]
			trans-Anéthol (72,86%), fenchone (12,93 %), estragole (3,41%), limonène (6,37%)	[167]
	<i>Carum carvi</i> L.	Carvi	Carvone (76,37%), limonène (19,52%)	[114]
			Carvone (77,35%), limonène (16,15%)	
			Carvone (61,58%), limonène (29,11%)	
			Carvone (53,60%), limonène (45,59%)	[25]
	<i>Cuminum cyminum</i> L.	Cumin	γ -Terpinène (24,30%), aldéhyde cuminique (21,07%), p-cymène (16, 56%), β -pinène (13,74%), safranal (12,95%)	[168]
			γ -Terpinène (12,62%), aldéhyde cuminique (38,50%), o-cymène (10,98%), β -pinène (11,50%)	[169]
γ -Terpinène (16,30%), aldéhyde cuminique (32,80%), o-cymène (9,74%), β -pinène (10,30%)				
Apiaceae	<i>Petroselinum crispum</i>	Persil	α -Pinène (26,42%), β -pinène (18,04%), P-Mentha-1,3,8-triène (16,41%), myristicine (11,92%),	[170]

Appendice C (Suite)

Famille	espèce végétale	nom commun	composés principaux	Réf.
Apiaceae	<i>Petroselinum crispum</i>	Persil	α-Pinène (27,41%) β-pinène (17,83%), P-Mentha-1,3,8-triène (15,96%)	[170]
			α-Pinène (15,73%), β-pinène (10,01%), myristicine (39,65), apiole (18,32%),	
Asteraceae	<i>Artemisia herba-alba</i>	Armoise	α-et β- Thuyone (57,00%), camphre (24,00%)	[3]
			β-Thuyone (25,10%), α-thuyone (22,90%), 1,8 cinéol (20,10%), camphre (10,50%)	[171]
			1,8 Cinéol (25,80%), p-cymène (15,50%), α-pinène (11,30%)	[172]
			1,8 Cinéol (41,10%), p-cymène (12,70%), α-pinène (8,20%)	
			1,8 Cinéol (8,60%), p-cymène (19,90%), α-pinène (17,20%), Myrcène (10,90%)	
	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Chamomille	Spathulenol (12,50%), (E)-β-farnesène (10,40%), B oxide α-bisabodol (6,50%)	[173]
			Spathuléol (7,30%), (E)-β-farnesène (6,00%), B oxide α-bisabodol (11,40%)	
			Spathuléol (6,70%), (E)-β-farnesène (6,00%), B oxide α-bisabodol (20%), A oxide α-bisabodol (11,90%)	
			B oxide α- Bisabodol (48,22%), B oxide α-bisabodol (23,31%), α-bisabodol (12,10%).	[174]
Geraniaceae	<i>Pelargonium graveolens</i>	Geranium	Citronéol (30,20%), formate de citronellyle (9,30%), géraniole (7,60%), guai-6,9-diène (5,40%)	[175]
			β-Citronéol (24,14%), formate de citronellyle (11,75%), géraniole (16,45%), linalool (7,99%)	[176]
Cupressaceae	<i>Cupressus sempervirens</i>	Cyprés	α-Pinène (48,10%), δ-3-carène (24,40%)	[156]
			Sabinène (14,80%), terpinène-4-ol (11,40%), α-pinène (9,90%), δ-3-carène (4,20%)	[177]
	<i>Juniperus communis</i> L.	Genevrier	Sabinène (48,40%), limonène (20,00%), α-pinène (16,50%)	[178]
			α-Pinène (80,00%), sabinène (2,00%), limonène (1,00%)	
			α-Pinène (34,00%), sabinène (22,00%), limonène (5,00%)	
α-Pinène (57,00%), limonène (12,00%), sabinène (3,00%)				
Sabinène (39,00%), α-pinène (20,00%), limonène (5,00%)				

Appendice C (Suite)

Famille	espèce végétale	nom commun	composés principaux	Réf.
Cupressaceae	<i>Juniperus communis</i> L.	Genevrier	α -Pinène (40,00%), sabinène (18,00%)	[178]
Lamiaceae	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lavande	1,8 Cinéol (33,00%, 44,40%), camphre (23,10%, 25,10%), α -bisabolool (14,10%, 6,50%)	[166]
			Linalool (25,31%), anthranilate de linalyle (18,35%), acétate de lavandulyle (11,14%)	[179]
	<i>Mentha piperita</i>	Menthe poivrée	Menthol (26,53%), menthone (25,83%)	[180]
			Menthol (59,00%), menthone (19,00%)	[3]
	<i>Mentha spicata</i> L.	Menthe verte	Carvone (65,40-46,70%), menthol (8,70-2,00%), menthone (6,90-1,50%), pulégone (7,90-1,40%)	[181]
			Carvone (76,65%), limonène (9,57%)	[182]
	<i>Melissa officinalis</i>	Melisse	Citronellal (31,10%), citronellool (18,30%), E-citral (11,20%), β -caryophyllène (12,00%)	[183]
			Citronellal (10,20%), Z-citral (19,60%), β -caryophyllène (13,20%)	
			Citronellal (14,40%), acétate de géraniol (10,2%), oxide de caryophyllène (11%)	[184]
			p-Mentha-1, 2, 3-triol (13,10%), p-menth-3-en-8-ol (8,80%), pulégone (8,80%)	[185]
	<i>Romarinus officinalis</i>	Romarin	1,8 Cinéol (55,90%), camphre (10,58%), α -pinène (9,38%)	[186]
			Camphre (52,12%), 1,8 cinéol (9,65%), camphène (7,55%), α -pinène (6,05%)	[187]
			α -Pinène (28,20%, 21,90%), verbénone (11,60%, 12,70%), Camphre (7,90%, 9,90%), 1,8 Cinéol (7,40%, 9,40%)	[166]
	<i>Salvia officinalis</i>	Sauge	1,8 Cinéol (33,27%), β -thuyone (18,40%), α -thuyone (13,45%)	[188]
			α -Thuyone (20,10%), camphre (16%), 1,8 cinéol (7,00%), β -thuyone (5,00%)	[189]
β -Thuyone (16,40%), α -thuyone (15,80%), 1,8 cinéol (2,70%)				
Camphor (21,30%), α -thuyone (15,40%), 1,8 cinéol (9,50%), β -thuyone (3,70%)				
			Camphre (23,80%, 37,30%), 1,8 cinéol (13,70%, 17,90%)	[119]

Appendice C (Suite)

Famille	espèce végétale	nom commun	composés principaux	Réf.
Lamiaceae	<i>Thymus vulgaris</i>	Thym	Thymol (40,97%), p-cymène (13,11%), γ -terpinène (10,96%), carvacrol (8,35%)	[190]
			Thymol (47%), p-Cymène (34,00%)	[191]
			o-Thymol (38,71%), tetra hydro-3-méthyle (12,19%), p-cymène (2,77%)	[117]
Lauraceae	<i>Laurus nobilis L.</i>	Laurel	1,8 cinéol (38,76%), acétate de α -terpényle (13,35%), α -Pinène (10,17%), Linalool (10,03%)	[192]
			1,8 Cinéol (24,55%), linalool (17,67%), eugénol méthyl éther (12,40%)	[193]
			1,8 Cinéol (34,62%), linalool (12,57%)	
			1,8 Cinéol (38,86%), linalool (9,45%), isovaléraldéhyde (10,47%)	
	<i>Cinnamomum cassia</i>	Cannelle	trans-Cinnamaldéhyde (84,40%), acétate de cinnamyle (2,50%)	[194]
trans-Cinnamaldéhyde (79,60%), β caryophyllène (3,60%)			[195]	
trans-Cinnamaldéhyde (30,36%), 3- methoxy-1,2-propanediol (29,30%), o-methxy-cinnamaldéhyde (25,39%)				
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus	1,8 Cinéol (55,29%), spathulenol (7,44%), α -terpinéol (5,46%)	[196]
			1,8 Cinéol (63,81%), α -pinène (16,06%)	[197]
	<i>Myrtus communis L.</i>	Myrte	Acétate de myrtényle (39,00 %), 1, 8 cinéol (19,60 %), α -pinène (11,60%), linalool (15,80%)	[198]
			1, 8 Cinéol (29,60%), α -pinène (24,71%), Acétate de myrtényle (10,60%)	[107]
			1,8 Cinéol (21,90%), α -pinène (50,90%), linalool (2,70%)	[199]
			1,8 Cinéol (13,30%), α -pinène (33,60%), linalool (14,80%)	
	<i>Syzygium aromaticum L.</i>	Clous de girofle	Eugénol (81,60, 79,0%), acetate d'eugénol (6,40%), caryophyllène (5,10%, 24,80%)	[166]
			Eugénol (57,17%), acétate d'eugénol (5,93%), caryophyllène (29,94%)	[200]
			Eugénol (63,64%), acétate d'eugénol (4,61%), caryophyllène (23,20%)	

Appendice C (Suite)

Famille	espèce végétale	nom commun	composés principaux	Réf.
Myrtaceae	<i>Syzygium aromaticum</i> L.	Clous de girofle	Eugénol (54,97%), acétate d'eugénol (2,45%), caryophyllène (31,46%)	[200]
Pinaceae	<i>Pinus halepensis</i>	Pin d'alep	z-β-Caryophyllène (25,90%), α-pinène (13,70%), myrcène (24,10%), p-cymène (11,90%), oxide de caryophyllène (12,50%)	[201]
			z-β-Caryophyllène (16,70%), α-pinène (8,50%), Myrcène (17,10%), p-cymène (14,60%)	
			z-β-Caryophyllène (22,50%), α-pinène (22,30%), Myrcène (13,90%), p-cymène (11,20%)	
			E-β-Caryophyllène (10,90%), α-pinène (16,80%), myrcène (25,20%), terpinolène (8,30%)	[202]
Piperaceae	<i>Piper nigrum</i> L.	Poivre noir	D-Limonène (12,20-20,10%), caryophyllène (8,60-25,80%), 3-carène (15,60-28,60%)	[203]
			Limonène (14,95, 15,64%), β-caryophyllène (18,64, 25,38%), 3-carène (8,58, 9,34%), sabinène (13,19, 13,63%)	[204]
Anacardiaceae	<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Lentisque	α-Pinène (9,40-24,90%), limonène (9-17,80%)	[198]
			α-Pinène (9,90%), limonène (8,50%), germacrène D (11,90%)	[205]
Rutaceae	<i>Citrus limon</i> L.	Citron	Limonène (78,84%), ocimène (3,85%), valencène (3,34%)	[108]
			Limonène (53,90%), β-pinène (13,10%), γ-terpinène (12,20%)	[206]
	<i>Citrus reticulata</i> L.	Mandarine	Limonène (80,20%), myrcène (6,70%), linalool (3,70%)	[207]
			Limonène (92,60%), α-pinène (1,53%)	[109]
	<i>Citrus sinensis</i> L.	Orange	Limonène (88,21%), α-pinène (6,37%), citral (3,00%)	[108]
			Limonène (96-97,30%), α-pinène (1,45-1,82%)	[109]
	<i>Ruta montana</i> L.	Rue	2-Undécane (52,20%), 1-nonène (13,50%), 2-nonanone (10,10%)	[208]
			2-Undécane (52,20%), 6-(3,5-benzodioxyl)-2 hexanone (8,20%), 2-décane (7,60%)	[209]
Zingibéraceae	<i>Curcuma longa</i> L.	Curcuma	ar-Turmerone (12,90%), α-turmerone (42,60%), β-turmerone (16%)	[110]
			ar-Turmerone (11,81%), zingiberène (8,62%)	[210]
			ar-Turmerone (49,80%), α-turmerone (9,10%), β-turmerone (7,90%)	[211]

Appendice C (Suite)

Famille	espèce végétale	nom commun	composés principaux	Réf.
Zingibéraceae	<i>Zingiber officinale</i>	Gingembre	α - Zingiberène (24,96%), β -sesquiphéllandrène (12,74%), sesquisabinène hydrate (6,19%), camphène (5,90%)	[212]
			Zingiberène (16,1%), acétate de géranyle (8,40%), géranial (14,40%), α -pinène (6,1%)	[213]
			α -Zingiberène (9,50%), β -sesquiphéllandrène (5,10%), geranial (25,90%), α -farnesène (7,60%)	[214]

APPENDICE D

Annexe 1 : Résultats des paramètres des meilleurs modèles PLS pour la détermination de la quantité d'huile essentielle par spectroscopie NIR-TF

Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	R ² (Cal)	R ² (CV)	RPD	Bias	VLs	Domaine spectral
Pas de prétraitement des données	0,290	0,434	0,9989	0,9973	19,5	-0,0356	2	[1]
	0,182	0,326	0,9996	0,9985	26	-0,0342	3	[1]
	0,292	0,430	0,9989	0,9974	19,7	-0,0336	2	[2]
	0,180	0,389	0,9996	0,9979	22,1	-0,0774	3	[2]
	0,178	0,320	0,9996	0,9986	26,5	-0,0296	4	[2]
Correction d'offset	0,177	0,238	0,9996	0,9992	35,5	-0,0160	2	[1]
	0,177	0,232	0,9996	0,9992	36,3	0,0083	3	[1]
	0,260	0,341	0,9991	0,9984	24,7	0,0078	2	[2]
	0,187	0,268	0,9995	0,9990	31,5	0,0010	3	[2]
Soustraction d'une droite	0,177	0,222	0,9996	0,9993	37,9	0,0025	2	[1]
	0,175	0,242	0,9996	0,9992	34,9	0,0149	3	[1]
	0,176	0,222	0,9996	0,9993	37,9	-0,0022	2	[2]
	0,175	0,243	0,9996	0,9992	34,9	0,0110	3	[2]
Normalisation vectorielle (SNV)	0,142	0,185	0,9997	0,9995	45,6	0,0021	2	[1]
	0,131	0,235	0,9998	0,9992	35,9	-0,0169	3	[1]
	0,148	0,191	0,9997	0,9995	44,2	0,0011	2	[2]
	0,140	0,248	0,9997	0,9991	34	-0,0091	3	[2]
Normalisation Min-Max	0,270	0,382	0,9990	0,9979	22,1	-0,0167	2	[1]
	0,172	0,266	0,9996	0,9990	31,7	0,0038	3	[1]
	0,268	0,377	0,9990	0,9980	22,4	-0,0154	2	[2]
	0,189	0,317	0,9995	0,9986	26,7	-0,0316	3	[2]
Correction multiplicative de diffusion	0,172	0,216	0,9996	0,9993	39	0,0041	2	[1]
	0,163	0,261	0,9997	0,9990	32,3	-0,0095	3	[1]
	0,164	0,256	0,9996	0,9991	32,9	-0,0036	2	[2]
	0,161	0,270	0,9997	0,9990	31,2	-0,0027	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 5	0,173	0,232	0,9996	0,9992	36,3	0,0061	2	[1]
	0,161	0,290	0,9997	0,9988	29,1	-0,0149	3	[1]
	0,173	0,232	0,9996	0,9992	36,3	0,0061	2	[2]
	0,161	0,290	0,9997	0,9988	29,1	-0,0151	3	[2]
Dérivée première pts de lissage : 9	0,168	0,218	0,9996	0,9993	38,6	0,0063	2	[1]
	0,158	0,290	0,9997	0,9988	29	0,0006	3	[1]
	0,168	0,218	0,9996	0,9993	38,6	0,0067	2	[2]
	0,158	0,290	0,9997	0,9988	29	0,0005	3	[2]
Dérivée première pts de lissage : 13	0,166	0,211	0,9996	0,9994	39,9	0,0060	2	[1]
	0,157	0,275	0,9997	0,9989	30,6	0,0015	3	[1]
	0,166	0,211	0,9996	0,9994	39,9	0,0060	2	[2]
	0,157	0,276	0,9997	0,9989	30,6	0,0015	3	[2]

Appendice D/ Annexe 1 (Suite)

Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	R ² (Cal)	R ² (CV)	RPD	Bias	VLs	Domaine spectral
Dérivée première pts de lissage : 17	0,167	0,210	0,9996	0,9994	40,2	0,0059	2	[1]
	0,158	0,257	0,9997	0,9991	32,7	0,0035	3	[1]
	0,167	0,210	0,9996	0,9994	40,2	0,0059	2	[2]
	0,158	0,258	0,9997	0,9991	32,7	0,0036	3	[2]
Dérivée seconde pts de lissage : 9	0,163	0,350	0,9996	0,9983	24	0,0054	2	[1]
	0,163	0,280	0,9997	0,9989	30,1	-0,0009	3	[1]
	0,163	0,351	0,9996	0,9983	24	0,0053	2	[2]
	0,162	0,280	0,9997	0,9989	30,1	-0,0011	3	[2]
Dérivée seconde pts de lissage : 13	0,186	0,256	0,9995	0,9991	24	0,0054	2	[1]
	0,164	0,283	0,9996	0,9989	30,1	-0,0009	3	[1]
	0,186	0,256	0,9995	0,9991	24	0,0053	2	[2]
	0,164	0,283	0,9996	0,9989	30,1	-0,0011	3	[2]
Dérivée seconde pts de lissage : 17	0,174	0,230	0,9996	0,9993	36,6	0,0062	2	[1]
	0,163	0,282	0,9996	0,9989	30	-0,0211	3	[1]
	0,174	0,230	0,9996	0,9993	36,6	0,0062	2	[2]
	0,163	0,282	0,9996	0,9989	30	-0,0212	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 5 + soustraction d'une droite	0,173	0,232	0,9996	0,9992	36,3	0,0061	2	[1]
	0,161	0,290	0,9997	0,9988	29,1	-0,0150	3	[1]
	0,173	0,232	0,9996	0,9992	36,3	0,0061	2	[2]
	0,161	0,290	0,9997	0,9988	29,1	-0,0152	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 9+ soustraction d'une droite	0,168	0,218	0,9996	0,9993	38,7	0,0063	2	[1]
	0,158	0,291	0,9997	0,9988	29	0,0007	3	[1]
	0,168	0,218	0,9996	0,9993	38,6	0,0062	2	[2]
	0,158	0,291	0,9997	0,9988	29	0,0006	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 13 + soustraction d'une droite	0,166	0,211	0,9996	0,9994	39,9	0,0060	2	[1]
	0,157	0,277	0,9997	0,9989	30,5	0,0013	3	[1]
	0,166	0,211	0,9996	0,9994	39,9	0,0060	2	[2]
	0,157	0,277	0,9997	0,9989	30,5	0,0013	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 17 + soustraction d'une droite	0,167	0,210	0,9996	0,9994	40,2	0,0058	2	[1]
	0,158	0,259	0,9997	0,9991	32,5	0,0036	3	[1]
	0,167	0,210	0,9996	0,9994	40,2	0,0058	2	[2]
	0,158	0,259	0,9997	0,9991	32,5	0,0036	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 5+ normalisation vectorielle (SNV)	0,211	0,313	0,9994	0,9986	26,9	-0,0068	2	[1]
	0,120	0,194	0,9998	0,9995	43,5	-0,0113	3	[1]
	0,120	0,312	0,9994	0,9986	27	-0,0066	2	[2]
	0,210	0,194	0,9998	0,9995	43,6	-0,0112	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 9 + normalisation vectorielle (SNV)	0,194	0,286	0,9995	0,9988	29,5	-0,0061	2	[1]
	0,119	0,190	0,9998	0,9995	44,4	-0,0112	3	[1]
	0,193	0,284	0,9995	0,9989	29,6	-0,0060	2	[2]
	0,119	0,190	0,9998	0,9995	44,4	-0,0111	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 13 + normalisation vectorielle (SNV)	0,173	0,251	0,9996	0,9991	35,5	-0,0045	2	[1]
	0,118	0,189	0,9998	0,9995	44,5	-0,0093	3	[1]
	0,172	0,250	0,9996	0,9991	33,7	-0,0044	2	[2]
	0,118	0,189	0,9998	0,9995	44,5	-0,0093	3	[2]

Appendice D/ Annexe 1 (Suite)

Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	R ² (Cal)	R ² (CV)	RPD	Bias	VLs	Domaine spectral
Dérivée première pts, de lissage : 17 + normalisation vectorielle (SNV)	0,157	0,223	0,9997	0,9993	37,8	-0,0028	2	[1]
	0,121	0,193	0,9998	0,9995	43,7	-0,0085	3	[1]
	0,156	0,222	0,9997	0,9993	40,2	0,0058	2	[2]
	0,121	0,193	0,9998	0,9995	32,5	0,0036	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 5+ Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,173	0,217	0,9996	0,9993	38,8	0,0127	2	[1]
	0,155	0,256	0,9997	0,9991	32,9	0,0018	3	[1]
	0,173	0,217	0,9996	0,9993	38,9	0,0126	2	[2]
	0,155	0,256	0,9997	0,9991	32,9	0,0016	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 9+ Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,166	0,206	0,9996	0,9994	40,9	0,0079	2	[1]
	0,156	0,271	0,9997	0,9990	31,1	0,0076	3	[1]
	0,166	0,206	0,9996	0,9994	40,9	0,0079	2	[2]
	0,156	0,271	0,9997	0,9990	31,1	0,0077	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 13+ Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,166	0,206	0,9996	0,9994	40,8	0,0080	2	[1]
	0,156	0,270	0,9997	0,9990	31,1	0,0077	3	[1]
	0,166	0,206	0,9996	0,9994	40,9	0,0079	2	[2]
	0,156	0,270	0,9997	0,9990	31,1	0,0077	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 17+ Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,168	0,208	0,9996	0,9994	40,4	0,0050	2	[1]
	0,156	0,264	0,9997	0,9990	31,9	-0,0006	3	[1]
	0,168	0,208	0,9996	0,9994	40,4	0,0050	2	[2]
	0,156	0,264	0,9997	0,9990	31,9	-0,0005	3	[2]

Note. [1]: Domaine spectrale de 8001.4 à 4462.6 cm⁻¹

[2]: Domaine spectrale de 11538.3 à 4462.6 cm⁻¹

Annexe 2: Résultats des paramètres des meilleurs modèles PLS pour la détermination de la quantité d'huile essentielle par spectroscopie MIR-TF

Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	R ² (Cal)	R ² (C.V)	RPD	Bias	VLs	Domaine spectral
Pas de prétraitement des données	0,183	0,294	0,9996	0,9988	28,7	-0,0104	2	[1]
	0,179	0,343	0,9996	0,9983	25,1	0,0665	3	[1]
	0,212	0,274	0,9994	0,9989	30,7	0,0044	2	[2]
	0,198	0,280	0,9995	0,9989	30,0	0,0031	3	[2]
Correction d'offset	0,204	0,254	0,9994	0,9991	33,2	0,0032	2	[1]
	0,187	0,287	0,9995	0,9988	29,4	0,0169	3	[1]
	0,217	0,275	0,9994	0,9989	30,7	0,0068	2	[2]
	0,203	0,268	0,9995	0,9990	31,4	-0,0002	3	[2]
Soustraction d'une droite	0,207	0,260	0,9994	0,9991	32,5	0,0041	2	[1]
	0,189	0,269	0,9995	0,9990	31,4	0,0208	3	[1]
	0,209	0,262	0,9994	0,9990	32,2	0,0065	2	[2]
	0,148	0,287	0,9997	0,9988	29,4	-0,0096	3	[2]
Normalisation vectorielle (SNV)	0,156	0,193	0,9997	0,9995	43,6	0,0035	2	[1]
	0,143	0,216	0,9997	0,9993	39,0	0,0092	3	[1]
	0,202	0,258	0,9995	0,9991	32,7	0,0063	2	[2]
	0,154	0,294	0,9997	0,9988	28,6	0,0019	3	[2]
Normalisation Min-Max	0,285	0,348	0,9989	0,9983	24,2	0,0055	2	[1]
	0,262	0,356	0,9991	0,9982	23,7	0,0059	3	[1]
	0,240	0,310	0,9992	0,9986	27,2	0,0019	2	[2]
	0,215	0,332	0,9994	0,9984	25,4	-0,0191	3	[2]
Correction multiplicative de diffusion	0,221	0,272	0,9993	0,9990	31,0	0,0015	2	[1]
	0,173	0,327	0,9996	0,9985	26,2	0,0568	3	[1]
	0,230	0,296	0,9993	0,9988	28,5	0,0083	2	[2]
	0,181	0,283	0,9996	0,9989	29,8	-0,0030	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage: 5	0,206	0,259	0,9994	0,9991	32,5	0,0046	2	[1]
	0,183	0,251	0,9996	0,9991	33,6	-0,0043	3	[1]
	0,210	0,269	0,9994	0,9990	31,3	0,0067	2	[2]
	0,152	0,260	0,9997	0,9990	32,5	-0,0227	3	[2]
Dérivée première pts de lissage: 9	0,205	0,251	0,9997	0,9991	32,8	0,0052	2	[1]
	0,193	0,247	0,9995	0,9991	34,1	0,0021	3	[1]
	0,266	0,266	0,9990	0,9990	31,7	0,0064	2	[2]
	0,167	0,266	0,9996	0,9990	31,7	-0,0109	3	[2]
Dérivée première pts de lissage: 13	0,204	0,256	0,9994	0,9991	32,9	0,0058	2	[1]
	0,193	0,247	0,9995	0,9991	34,1	0,0095	3	[1]
	0,209	0,264	0,9994	0,9990	31,9	0,0064	2	[2]
	0,165	0,268	0,9996	0,9990	31,4	-0,0046	3	[2]
Dérivée première pts de lissage: 17	0,204	0,255	0,9994	0,9991	33,1	0,0059	2	[1]
	0,189	0,251	0,9995	0,9991	33,6	0,0157	3	[1]
	0,208	0,263	0,9994	0,9990	32,1	0,0058	2	[2]
	0,157	0,270	0,9997	0,9990	31,2	-0,0019	3	[2]
Dérivée seconde pts de lissage: 9	0,211	0,266	0,9994	0,9990	31,7	0,0043	2	[1]
	0,183	0,256	0,9996	0,9991	33,0	-0,0132	3	[1]

Appendice D/ Annexe 2 (Suite)

Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	R ² (Cal)	R ² (C,V)	RPD	Bias	VLs	Domaine spectral
Dérivée seconde pts de lissage: 9	0,215	0,277	0,9994	0,9989	30,4	0,0085	2	[2]
	0,157	0,263	0,9997	0,9990	32,1	-0,0241	3	[2]
Dérivée seconde pts de lissage: 13	0,208	0,262	0,9994	0,9990	32,2	0,0049	2	[1]
	0,195	0,254	0,9995	0,9991	33,2	-0,0061	3	[1]
	0,212	0,269	0,9994	0,9990	31,3	0,0069	2	[2]
	0,171	0,267	0,9996	0,9990	31,6	-0,0015	3	[2]
Dérivée seconde pts de lissage: 17	0,207	0,259	0,9994	0,9991	32,6	0,0055	2	[1]
	0,196	0,250	0,9995	0,9991	33,6	-0,00056	3	[1]
	0,211	0,267	0,9994	0,9990	31,6	0,0069	2	[2]
	0,176	0,269	0,9994	0,9990	31,4	-0,0068	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 5 + soustraction d'une droite	0,206	0,259	0,9994	0,9991	32,5	0,0046	2	[1]
	0,183	0,251	0,9996	0,9991	33,6	-0,0043	3	[1]
	0,210	0,269	0,9994	0,9990	31,3	0,0067	2	[2]
	0,152	0,260	0,9997	0,9990	32,5	-0,0227	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 9+ soustraction d'une droite	0,205	0,257	0,9994	0,9991	32,8	0,0052	2	[1]
	0,193	0,247	0,9995	0,9991	34,1	0,0020	3	[1]
	0,209	0,266	0,9994	0,9990	31,7	0,0064	2	[2]
	0,266	0,266	0,9990	0,9990	31,7	-0,011	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 13 + soustraction d'une droite	0,204	0,256	0,9994	0,9991	32,9	0,00577	2	[1]
	0,193	0,247	0,9995	0,9991	34,1	0,00924	3	[1]
	0,209	0,264	0,9994	0,9990	31,9	0,00635	2	[2]
	0,166	0,268	0,9996	0,9990	31,4	-0,00460	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 17 + soustraction d'une droite	0,204	0,255	0,9994	0,9991	33,1	0,00594	2	[1]
	0,189	0,251	0,9995	0,9991	33,7	0,0155	3	[1]
	0,208	0,262	0,9994	0,9990	32,1	0,00582	2	[2]
	0,158	0,269	0,9997	0,9990	31,3	-0,00193	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 5+ normalisation vectorielle (SNV)	0,157	0,228	0,9997	0,9993	37	-0,0093	2	[1]
	0,118	0,191	0,9998	0,9995	44,1	-0,0141	3	[1]
	0,158	0,190	0,9997	0,9995	44,3	0,00287	2	[2]
	0,0954	0,226	0,9999	0,9993	37,5	-0,0274	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 9 + normalisation vectorielle (SNV)	0,139	0,189	0,9997	0,9995	44,6	-0,00445	2	[1]
	0,116	0,168	0,9998	0,9996	50,3	-0,00895	3	[1]
	0,167	0,211	0,9996	0,9994	39,9	0,00787	2	[2]
	0,127	0,237	0,9998	0,9992	35,6	-0,0103	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 13 + normalisation vectorielle (SNV)	0,137	0,176	0,9998	0,9996	47,9	-0,000719	2	[1]
	0,122	0,165	0,9996	0,9993	51,1	-0,00408	3	[1]
	0,179	0,223	0,9997	0,9992	37,8	0,0066	2	[2]
	0,138	0,239	0,9997	0,9996	35,3	-0,00571	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 17 + normalisation vectorielle (SNV)	0,143	0,179	0,9997	0,9996	47,2	0,00166	2	[1]
	0,132	0,172	0,9998	0,9996	49	-0,000657	3	[1]
	0,188	0,235	0,9995	0,9992	35,8	0,0073	2	[2]
	0,147	0,239	0,9997	0,9992	35,2	-0,00641	3	[2]

Appendice D/ Annexe 2 (Suite)

Traitement spectral	RMSEC	RMSECV	R ² (Cal)	R ² (CV)	RPD	Bias	VLs	Domaine spectral
Dérivée première pts, de lissage : 5+ Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,204	0,257	0,9994	0,9991	32,8	0,00727	2	[1]
	0,159	0,257	0,9997	0,9991	32,8	-0,00596	3	[1]
	0,221	0,286	0,9993	0,9989	29,5	0,0153	2	[2]
	0,149	0,264	0,9997	0,9990	32	-0,0173	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 9+ Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,217	0,275	0,9994	0,9989	30,7	0,00772	2	[1]
	0,185	0,266	0,9995	0,9990	31,7	-0,00253	3	[1]
	0,224	0,286	0,9993	0,9988	29,5	0,00999	2	[2]
	0,169	0,289	0,9996	0,9989	29,6	-0,0056	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 13+ Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,194	0,278	0,9995	0,9989	29,3	0,00798	2	[1]
	0,227	0,288	0,9993	0,9988	30,4	0,00972	3	[1]
	0,230	0,293	0,9993	0,9988	28,8	0,00822	2	[2]
	0,174	0,292	0,9996	0,9988	28,8	0,00316	3	[2]
Dérivée première pts, de lissage : 17+ Correction multiplicative de diffusion (MSC)	0,233	0,293	0,9993	0,9988	28,7	0,00701	2	[1]
	0,188	0,299	0,9995	0,9987	28,3	0,0323	3	[1]
	0,233	0,286	0,9993	0,9988	28,8	0,00822	2	[2]
	0,168	0,294	0,9996	0,9988	28,8	0,00316	3	[2]

Note. [1]: Domaine spectrale de 1801,5 à 578,7 cm⁻¹

[2]: Domaine spectrale de 3701,4 à 2758,2 cm⁻¹ et de 1801,5 à 578,7 cm⁻¹

APPENDICE E

Annexe 1: Résultats d'analyse par spectroscopie NIR des échantillons enrichis.

R% PLS-NIR						
Traitement spectral	LVs/région spectrale	He.Com.C.g. 2	He.Com.C.g. 3	He.Com.C.g. 4	He.Com.C.g. 5	
Sans prétraitement des données	2/ [1]	101,2	112,2	105,3	105,7	
		99,1	109,3	122,4	126,3	
		101,4	112,4	118,4	95,9	
	Moy ± s	100,6 ± 1,2	111,3 ± 1,7	115,3 ± 8,9	109,3 ± 15,0	
	3/ [1]	103,8	103,4	102,9	113,9	
		99,5	102,3	111,5	109,6	
		101,7	96,6	108,8	104,1	
	Moy ± s	101,6 ± 2,8	100,8 ± 3,7	107,7 ± 4,4	109,2 ± 4,9	
	Correction d'offset	2/ [1]	103,5	106,7	100,8	113,9
			100,0	104,8	106,8	108,6
102,4			109,9	104,1	103,2	
Moy ± s		102 ± 1,8	107,2 ± 2,6	103,9 ± 3,0	108,6 ± 5,4	
3/ [1]		103,9	107,7	101,1	115,4	
		101,3	105,1	105,8	108,9	
		104	108,1	103	103,1	
Moy ± s	103,1 ± 1,5	107 ± 1,6	103,3 ± 2,4	109,1 ± 6,2		
Soustraction d'une droite	2/ [1]	105,4	105,3	101,3	113,3	
		101,2	104	106,4	108,6	
		103,9	109,2	104,2	103	
	Moy ± s	103,5 ± 2,2	106,1 ± 2,7	104 ± 2,5	108,3 ± 5,1	
	3/ [1]	105,2	108	101,5	115,8	
		102,6	105,5	105,7	109,2	
		105,6	108	103,1	103,1	
Moy ± s	104,4 ± 1,6	107,2 ± 1,5	103,4 ± 2,1	109,4 ± 6,3		
normalisation vectorielle (SNV)	2/ [2]	102,7	105,7	114,8	114,9	
		99,9	103,6	131,6	108,9	
		102,2	108,7	126,6	103,7	
	Moy ± s	101,6 ± 1,5	106 ± 2,6	124,3 ± 8,6	109,2 ± 5,6	
	2/[1]	103,6	104,383107	104,274032	113,1	
		100,4	102,9	112,8	107,9	
102,9		107,7	109,8	102,4		

Appendice E/ Annexe 1 (Suite)

R% PLS-NIR					
Traitement spectral	LVs/région spectrale	He.Com.C.g. 2	He.Com.C.g. 3	He.Com.C.g. 4	He.Com.C.g. 5
normalisation vectorielle (SNV)	Moy ± s	102,3 ± 1,7	105 ± 2,4	109 ± 4,3	107,8 ± 5,3
	3/ [1]	101,7	104,4	103,7	113,1
		97,8	103	112,1	109,2
		100,6	109,2	108,9	103
	Moy ± s	100 ± 2,0	105,5 ± 3,2	108,2 ± 4,3	108,4 ± 5,1
Normalisation Min-Max	2/ [1]	98,3	94,6	97,1	103
		95,6	93,3	104,1	98,4
		97,8	97,1	101,5	94,1
	Moy ± s	97,2 ± 1,4	95 ± 1,9	100,9 ± 3,5	98,5 ± 4,5
	3/ [1]	100,3	95,7	99,9	111,9
		96,8	94,3	104,8	106,7
		99,5	97,7	102,5	101,1
Moy ± s	98,9 ± 1,8	95,9 ± 1,7	102,4 ± 2,5	106,5 ± 5,4	
Correction multiplicative de diffusion (MSC)	2/ [1]	104,9	110,5	105,7	117,6
		101,7	108,7	113,7	112
		104,3	113,7	110,6	106,2
	Moy ± s	103,6 ± 1,7	111 ± 2,5	110 ± 4,0	111,9 ± 5,7
	3/ [1]	105,1	106,7	105	113,5
		101,7	105	112,5	108,7
		104,5	110,4	109,3	103,1
Moy ± s	103,8 ± 1,8	107,3 ± 2,8	109 ± 3,8	108,4 ± 5,2	
Dérivée 1 pts. de lissage : 5	2/ [1]	106,3	100,2	100,6	116,7
		102,1	98,9	105,8	111,3
		105,1	103,7	103,5	104,5
	Moy ± s	104,5 ± 2,2	100,9 ± 2,5	103,3 ± 2,6	110,8 ± 6,1
	3/ [1]	105,6	101,6	100,9	119
		101,8	99,9	106,2	113,2
		105,1	104,2	103,8	105,8
Moy ± s	104,2 ± 2,1	101,9 ± 2,2	103,6 ± 2,6	112,7 ± 6,6	
Dérivée 1 pts. de lissage : 5	2/ [1]	106,3	99,6	100,8	116
		102	98,2	106,1	110,5
		105,1	103	103,8	103,8
	Moy ± s	104,5 ± 2,2	100,3 ± 2,5	103,6 ± 2,6	110,1 ± 6,1
	3/ [1]	105,4	107,8	101	119,4
		102,5	105,6	105,6	113,2
		105,8	108,9	102,9	105,9
Moy ± s	104,6 ± 1,8	107,4 ± 1,7	103,2 ± 2,3	112,8 ± 6,8	

Appendice E/ Annexe 1 (Suite)

R% PLS-NIR					
Traitement spectral	LVs/région spectrale	He.Com.C.g. 2	He.Com.C.g. 3	He.Com.C.g. 4	He.Com.C.g. 5
Dérivée 2 pts. de lissage: 5	2/ [1]	106,3	99	100,7	114
		102,1	97,9	106,7	108,7
		105,1	102,9	104,4	101,2
	Moy ± s	104,5 ± 2,2	99,9 ± 2,6	103,9 ± 3,0	108 ± 6,5
Dérivée 2 pts. de lissage: 9	3/ [1]	105,4	99,4	100,4	114,4
		101,3	98,3	106,5	109,1
		104,7	103	104,2	101,5
	Moy ± s	103,8 ± 2,2	100,2 ± 2,5	103,7 ± 3,1	108,3 ± 6,5
Dérivée (1 pts. de lissage: 5) + soustraction d'une droite	2/ [1]	106,3	100,2	100,6	116,7
		102,1	98,9	105,8	111,2
		105,1	103,6	103,5	104,4
	Moy ± s	104,5 ± 2,2	100,9 ± 2,4	103,3 ± 2,6	110,8 ± 6,2
	3/ [1]	105,6	101,5	100,9	118,9
		101,8	99,9	106,2	113,1
		105,1	104,2	103,7	105,7
Moy ± s	104,2 ± 2,1	101,9 ± 2,2	103,6 ± 2,6	112,6 ± 6,6	
Dérivée 1 (pts. de lissage: 9) + soustraction d'une droite	2 / [1]	106,3	99,6	100,8	116
		102,1	98,2	106	110,5
		105,1	102,9	103,7	103,7
	Moy ± s	104,5 ± 2,2	100,2 ± 2,4	103,5 ± 2,6	110,1 ± 6,1
	3/ [1]	105,4	107,7	101	119,4
		102,4	105,6	105,5	113,2
		105,8	108,9	102,9	105,9
Moy ± s	104,6 ± 1,8	107,4 ± 1,7	103,2 ± 2,3	112,8 ± 6,8	
Dérivée 1 (pts. de lissage : 5) + normalisation vectorielle (SNV)	2/ [1]	100,8	91,9	98,5	101,8
		96,9	90,9	103,5	97,4
		99,7	95,2	101,3	91,8
	Moy ± s	99,1 ± 2,0	92,7 ± 2,3	101,1 ± 2,5	97 ± 5,0
	3/ [1]	98,8	96,4	99,2	108,4
		94,7	95,4	104,6	104,1
97,7		100,7	102,4	97,3	
Moy ± s	97,1 ± 2,1	97,5 ± 2,8	102,1 ± 2,7	103,3 ± 5,6	
Dérivée1 (pts. de lissage: 9) + normalisation vectorielle (SNV)	2/ [1]	101,7	93,7	107,7	99
		97,7	92,7	105,5	92,6
		100,6	97,1	105,1	98,3
	Moy ± s	100 ± 2,1	94,5 ± 2,3	106,1 ± 1,4	96,6 ± 3,5
	3/ [1]	100,4	97,7	99,4	109,4

Appendice E/ Annexe 1 (Suite)

R% PLS-NIR					
Traitement spectral	LVs/région spectrale	He.Com.C.g. 2	He.Com.C.g. 3	He.Com.C.g. 4	He.Com.C.g. 5
Dérivée1 (pts. de lissage: 9) + normalisation vectorielle (SNV)	3/ [1]	96,1	97	104,7	105,3
		99,1	102,3	102,6	98,8
	Moy ± s	98,5 ± 2,2	99 ± 2,9	102,2 ± 2,7	104,5 ± 5,4
Dérivée 1 (pts. de lissage : 5) + Correction multiplicative de diffusion (MSC)	2/ [1]	108,2	105	100,8	124,1
		103,7	104,1	105,8	118,8
		106,9	109,8	103,9	111,1
	Moy ± s	106,2 ± 2,3	106,3 ± 3,1	103,5 ± 2,6	118 ± 6,5
	3/ [1]	108,6	109	100	123,1
		104,1	108,1	105,1	118,3
		107,4	113,9	103,1	110,6
Moy ± s	106,7 ± 2,3	110,3 ± 3,2	102,7 ± 2,6	117,4 ± 6,3	
Dérivée 1 pts. de lissage : 9+ Correction multiplicative de diffusion (MSC)	2/ [1]	108,7	100,9	100,7	124,4
		104,2	104,4	105,7	119,2
		107,4	110	103,7	111,6
	Moy ± s	106,8 ± 2,3	105,1 ± 4,6	103,4 ± 2,5	118,4 ± 6,4
	3/ [1]	108,8	108,2	100,1	120,8
		104,1	107,2	105	116,2
		107,5	113,2	103	109
Moy ± s	106,8 ± 2,4	109,5 ± 3,2	102,7 ± 2,5	115,4 ± 6,0	

Note. [1] : Domaine spectrale de 8001.4 à 4462.6 cm⁻¹.

[2] : Domaine spectrale de 11538.3 à 4462.6 cm⁻¹.

Annexe 2: Résultats d'analyse par spectroscopie MIR des échantillons enrichis.

R% PLS-ATR-MIR						
Traitement spectral	LVs/région spectrale	He.Com.C.g. 2	He.Com.C.g. 3	He.Com.C.g. 4	He.Com.C.g. 5	
Sans prétraitement des données	2/ [1]	107	106,4	102	123,4	
		103,7	107,2	106,1	117,2	
		107,9	110	103,6	112,3	
	Moy ± s	106 ,2 ± 2,2	107,8 ± 1,9	103,9 ± 2,1	117,6 ± 5,5	
	3/ [1]	105,3	99,7	100,9	123,1	
		103,9	100,3	104,1	115,9	
		108,2	104,1	102,7	108,4	
	Moy ± s	105,8 ± 2,2	101,4 ± 2,4	102,5 ± 1.6	115,8 ± 8	
	Correction d'offset	2/ [1]	107,5	110,4	100,8	125,3
			104	111	104,4	120,8
107,7			114	102,7	114,8	
Moy ± s		106,4 ± 2,1	111,8 ± 1,9	102,6 ± 1,8	120,3 ± 5,3	
3/ [1]		106,8	98,1	100,3	121,6	
		104	99,02	105,3	115,6	
		109,1	102,6	102,1	109,5	
Moy ± s		106,6 ± 2,6	99,9 ± 2,4	102,5 ± 2,5	115,6 ± 6,1	
Soustraction d'une droite		2/ [1]	105,9	101,7	101,3	118,7
			102,8	102,3	105,5	112,3
	107		105,3	103,2	106,4	
	Moy ± s	105,2 ± 2,1	103,1 ± 1,9	103,3 ± 2,1	112,4 ± 6,2	
	3/ [1]	103,6	107	100,5	119,7	
		101,5	107	104,5	114,5	
		104,1	108,1	101,3	108,9	
	Moy ± s	103,1 ± 1,3	107,4 ± 0,6	102,1 ± 2,1	114,4 ± 5,4	
	2/ [2]	106,5	100,0	101,3	123,2	
		103,2	100,8	105,5	116,8	
107,6		103,6	103,1	111,3		
Moy ± s		105,8±2,3	101,5±1,9	103,3±2,1	117,1±6	
normalisation vectorielle (SNV)	2/ [1]	106,9	104,1	100,6	116,3	
		103,4	104,8	104,9	110,4	
		108	107,9	102,9	104,9	
	Moy ± s	106,1 ± 2,4	105,6 ± 2,02	102,8 ± 2,1	110,5 ± 5,7	
	3/ [1]	109	96,7	101,5	116,1	
		104,6	97,6	105,2	110,6	
		109,1	101,6	103	103,8	
	Moy ± s	107,5 ± 2,6	98,7 ± 2,6	103,2 ± 1,9	110,2 ± 6,2	

Appendice E/ Annexe 2 (Suite)

R% PLS-ATR-MIR					
Traitement spectral	LVs/région spectrale	He.Com.C.g, 2	He,Com,C,g, 3	He,Com,C,g, 4	He,Com,C,g, 5
Normalisation Min-Max	2/ [2]	103,4	112,03	100,9	121,5
		101,9	112,6	104,7	115
		105,8	115,6	103,6	107,8
	Moy ± s	103,7 ± 2,0	113,4 ± 1,9	103,1 ± 2,0	114,9 ± 6,9
	3/ [2]	102,7	108,8	85,5	118,2
		101,4	109,2	89,4	113,3
		104,3	109,9	87,4	104,7
Moy ± s	102,8 ± 1,4	109,3 ± 0,5	87,4 ± 1,9	112,1 ± 6,8	
Correction multiplicative de diffusion (MSC)	2/ [1]	108,4	99,3	101,3	122,9
		104,9	105,9	104,4	116,2
		109,5	109,1	102,7	110,7
	Moy ± s	107,6 ± 2,4	104,8 ± 5,0	103,5 ± 2,2	116,6 ± 6,2
	3/ [1]	107,2	95,9	100,6	112,7
		103,4	96,4	105,4	108
		107,7	101,1	102,4	98,4
Moy ± s	106,1 ± 2,3	97,8 ± 2,9	102,7 ± 2,4	106,4 ± 7,3	
Dérivée 1 pts, de lissage : 5	2/ [1]	105,4	103,5	101,2	120,5
		102,4	104,2	105,5	114,4
		106,4	107	103,3	108,5
	Moy ± s	104,7 ± 2,1	104,9 ± 1,8	103,3 ± 2,2	114,5 ± 6,0
	3/ [1]	104,4	107,2	101,6	120,2
		102,05	107	106,8	114,5
		105,3	107,9	102,6	108,9
Moy ± s	103,9 ± 1,7	107,4 ± 0,5	103,6 ± 2,7	114,5 ± 5,6	
Dérivée 1 pts. de lissage : 9	2/ [1]	105,2	103,4	101,2	120,2
		102,4	104	105,6	113,9
		106,3	106,6	103,2	108
	Moy ± s	104,6 ± 2,0	104,6 ± 1,7	103,3 ± 2,2	114 ± 6,1
	3/ [1]	103,7	107,4	101,3	121,3
		101,7	107,5	106,1	115,5
		104,7	108,5	102,8	109,8
	Moy ± s	103,4 ± 1,6	107,8 ± 0,6	103,4 ± 2,5	115,5 ± 5,8
	4/ [1]	103,3	96	102,4	114,4
		101,6	97,6	108,2	109,6
103,6		98,5	103,6	100,7	
Moy ± s	102,8 ± 1,1	97,4 ± 1,3	104,8 ± 3,1	108,2 ± 7,0	

Appendice E/ Annexe 2 (Suite)

R% PLS-ATR-MIR					
Traitement spectral	LVs/région spectrale	He,Com,C,g, 2	He,Com,C,g, 3	He,Com,C,g, 4	He,Com,C,g, 5
Dérivée 2 pts. de lissage : 9	2/ [1]	105,9	103,6	101,2	120,6
		102,4	104,4	105,6	114,6
		106,8	107,4	103,6	108,8
	Moy ± s	105 ± 2,3	105,1 ± 2,02	103,5 ± 2,2	114,7 ± 5,9
	3/ [1]	105,3	104,8	101,9	121
		101,9	104,4	107	114,8
		105,4	105,6	102,9	109,3
	Moy ± s	104,2 ± 2,0	104,9 ± 0,6	103,9 ± 2,7	115,04 ± 5,9
	3/ [2]	105,9	103,6	101,2	120,6
		102,4	104,4	105,6	114,6
106,8		107,4	103,6	108,8	
Moy ± s	105 ± 2,3	105,1 ± 2,02	103,5 ± 2,2	114,7 ± 5,9	
*Dérivée 1 pts. de lissage : 5 + soustraction d'une droite	2/ [1]	105,4	103,5	101,2	120,5
		102,4	104,2	105,5	114,4
		106,4	106,9	103,3	108,5
	Moy ± s	104,7 ± 2,1	104,9 ± 1,8	103,3 ± 2,2	114,5 ± 6,01
	3/ [1]	104,3	107,2	101,6	120,2
		101,9	107	106,8	114,5
		105,1	107,8	102,6	108,9
	Moy ± s	103,8 ± 1,7	107,3 ± 0,5	103,6 ± 2,7	114,5 ± 5,6
	3/ [2]	103,2	89,4	99,5	111,7
		100,7	89,8	105,2	105
104,7		89,8	101,6	97,7	
Moy ± s	102,9 ± 2,03	89,7 ± 0,2	102,1 ± 2,9	104,8 ± 7,0	
Dérivée 1 pts. de lissage : 9 + soustraction d'une droite	2/ [1]	105,2	103,4	101,2	120,1
		102,4	104	105,6	113,9
		106,3	106,6	103,2	108
	Moy ± s	104,6 ± 2,0	104,6 ± 1,7	103,3 ± 2,2	114 ± 6,1
	3/ [1]	103,7	107,4	101,3	121,3
		101,7	107,5	106,1	115,5
		104,7	108,5	102,8	109,8
Moy ± s	103,4 ± 1,6	107,8 ± 0,6	103,4 ± 2,5	115,6 ± 5,8	
Dérivée 1 pts. de lissage : 5+ normalisation vectorielle (SNV)	2/ [1]	105,2	92,6	99,3	102,4
		101,5	93,5	103,6	97,4
		106,2	96,2	101,8	92,6
	Moy ± s	104,3 ± 2,5	94,1 ± 1,9	101,6 ± 2,2	97,5 ± 4,9
	2/ [2]	105,6	102,3	100,5	115,6
		101,7	103,2	104,7	109,9
		106,4	106,4	103,1	104,3
	Moy ± s	104,6 ± 2,5	104 ± 2,2	102,7 ± 2,1	109,9 ± 5,6
	3/ [1]	108,3	89,8	98,8	103,4
		103,4	91,3	102,7	98
109,4		96,2	101,7	91,6	
Moy ± s	107 ± 3,2	92,4 ± 3,4	101,1 ± 2,1	97,7 ± 5,9	

Appendice E/ Annexe 2 (Suite)

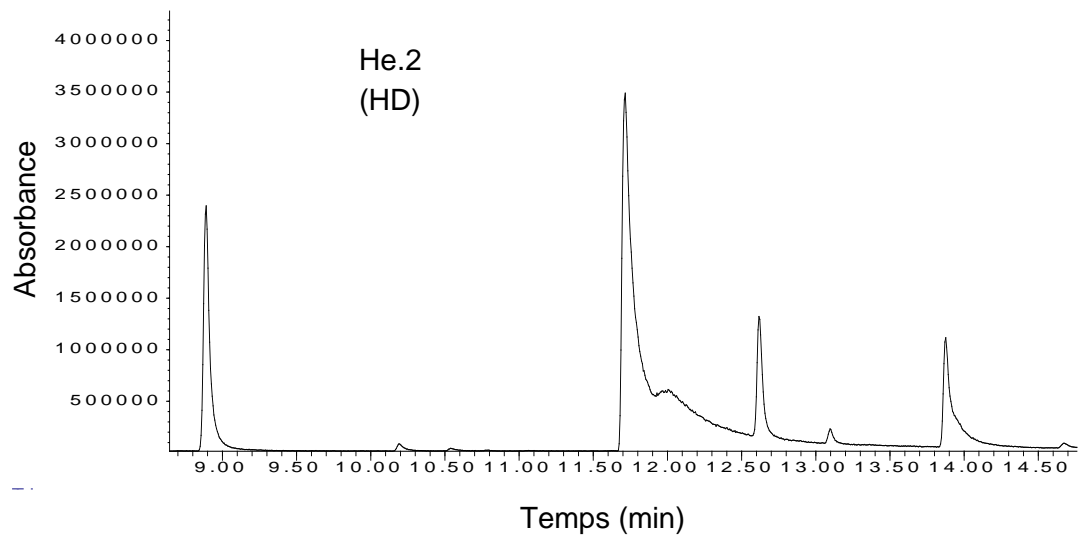
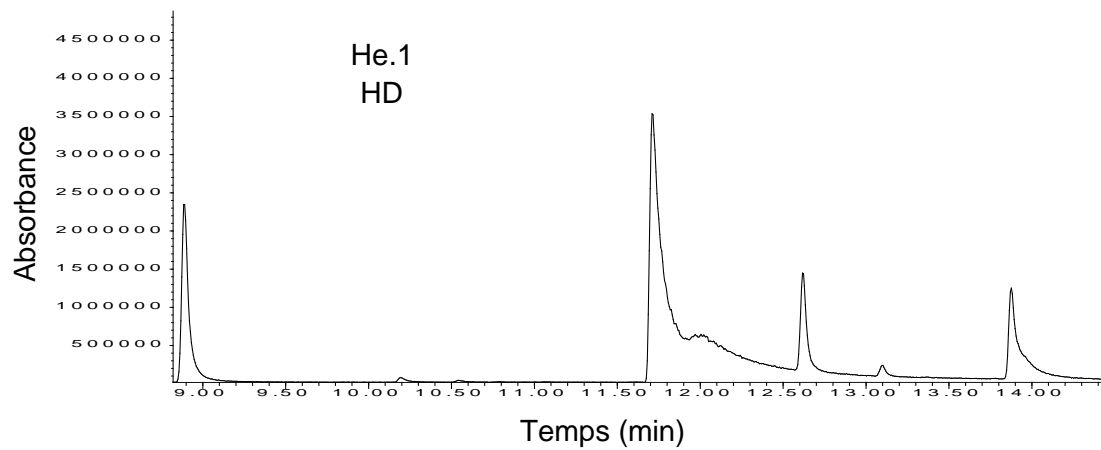
R% PLS-ATR-MIR					
Traitement spectral	LVs/région spectrale	He.Com.C.g. 2	He.Com.C.g. 3	He,Com,C,g, 4	He,Com,C,g, 5
Dérivée 1 pts, de lissage : 5 + normalisation vectorielle (SNV)	3/ [2]	103,6	89	98,9	108,4
		100,4	89,9	104,3	102,1
		105	92,8	101,8	94,3
	Moy ± s	103 ± 2,3	90,5 ± 2,0	101,7 ± 2,7	101,6 ± 7,1
Dérivée1 (pts. de lissage : 9) + normalisation vectorielle (SNV)	2/ [1]	106,5	96,9	99,7	107,1
		102,9	97,8	104	101,8
		107,6	100,6	102,1	96,8
	Moy ± s	105,7 ± 2,5	98,4 ± 1,9	101,9 ± 2,1	101,9 ± 5,1
	3/ [1]	131,4	92,4	98,5	109,4
		126,9	94,	102,5	103,5
		132,8	98,6	101,3	97,2
Moy ± s	130,4 ± 3,1	95 ± 3,2	100,8 ± 2,01	103,4 ± 6,1	
Dérivée 1 (pts. de lissage : 5) + Correction multiplicative de diffusion (MSC)	2/ [1]	111,0	97,5	100,8	114,4
		107,2	98,6	105	108,3
		112	102,4	102,8	101,5
	Moy ± s	110,1 ± 2,6	99,5 ± 2,5	102,9 ± 2,1	108,04 ± 6,4
	3/ [1]	108,6	100,2	101,8	116,2
		105	100,3	107,3	110,7
		108,6	101,7	101,8	103,2
Moy ± s	107,4 ± 2,1	100,7 ± 0,9	103,6 ± 3,3	110,02 ± 5,6	
Dérivée 1 (pts. de lissage : 9) + Correction multiplicative de diffusion (MSC)	2/ [1]	111,4	99,4	101,3	116,4
		107,6	100,5	105,4	110,2
		112,4	104,2	103,5	103,6
	Moy ± s	110,5 ± 2,6	101,4 ± 2,5	103,4 ± 2,1	110,1 ± 6,4
	3/ [1]	106,9	105,7	102,1	119,3
		104,5	106,6	107,4	114,1
		107,5	107,5	103,7	107,4
Moy ± s	106,3 ± 1,6	106,6 ± 0,9	104,4 ± 2,7	113,6 ± 5,9	

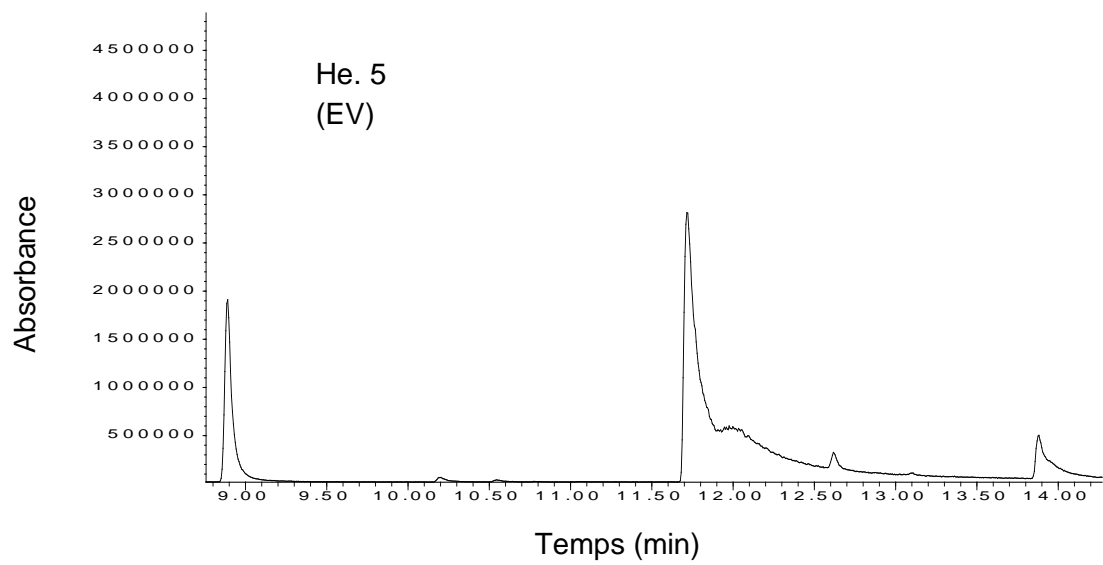
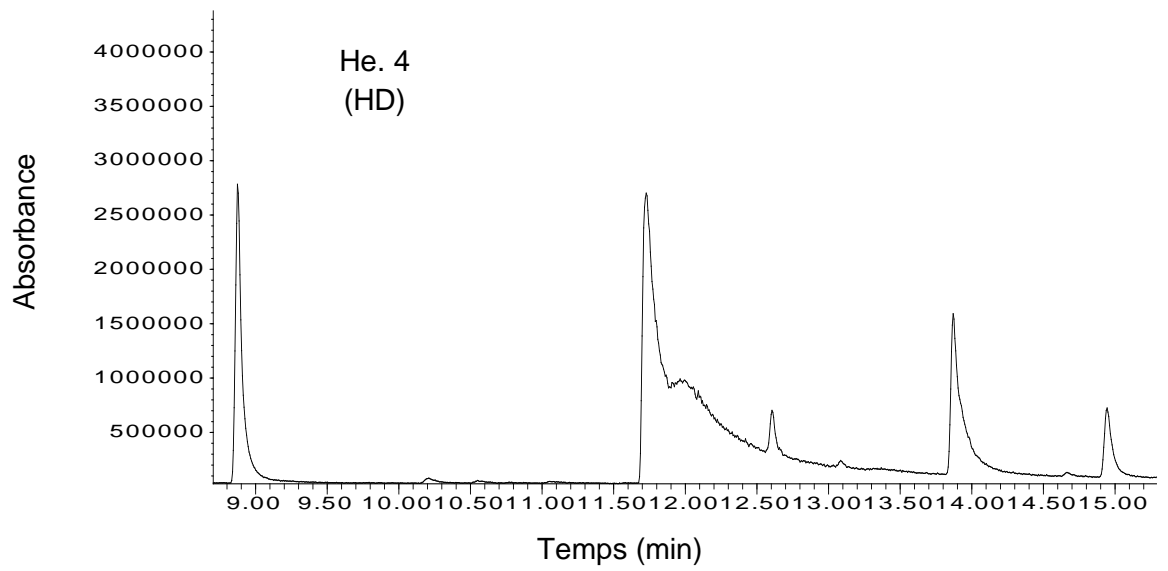
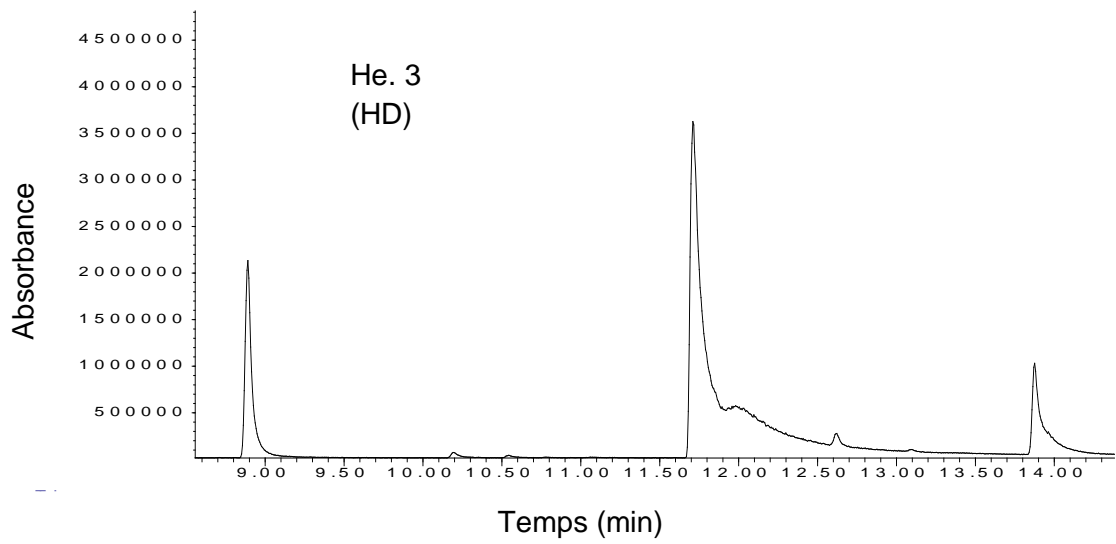
Note. [1] : Domaine spectrale de 1801,5 à 578,7 cm⁻¹.

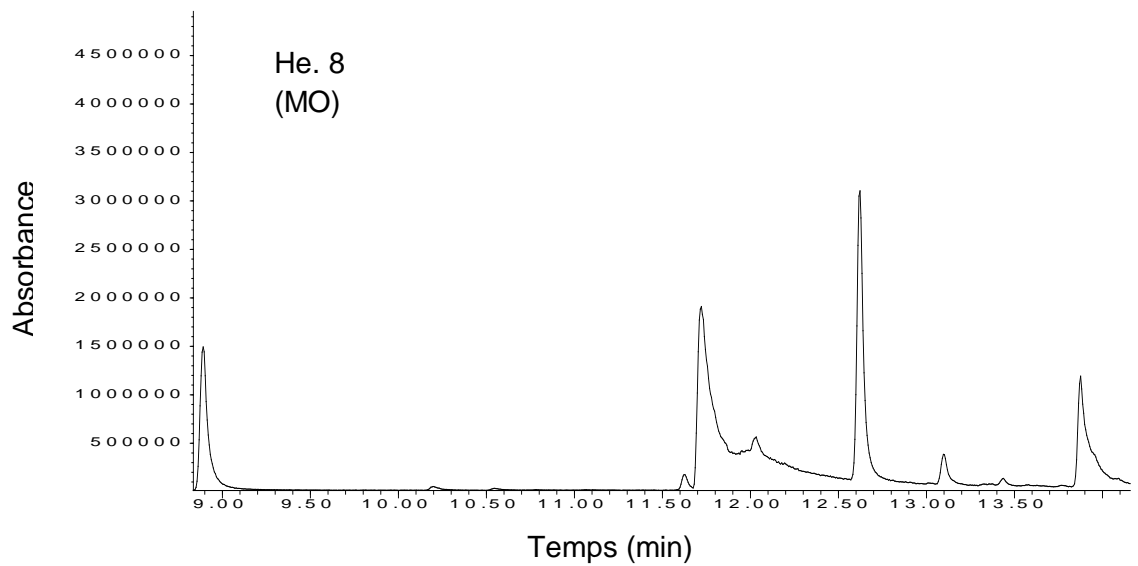
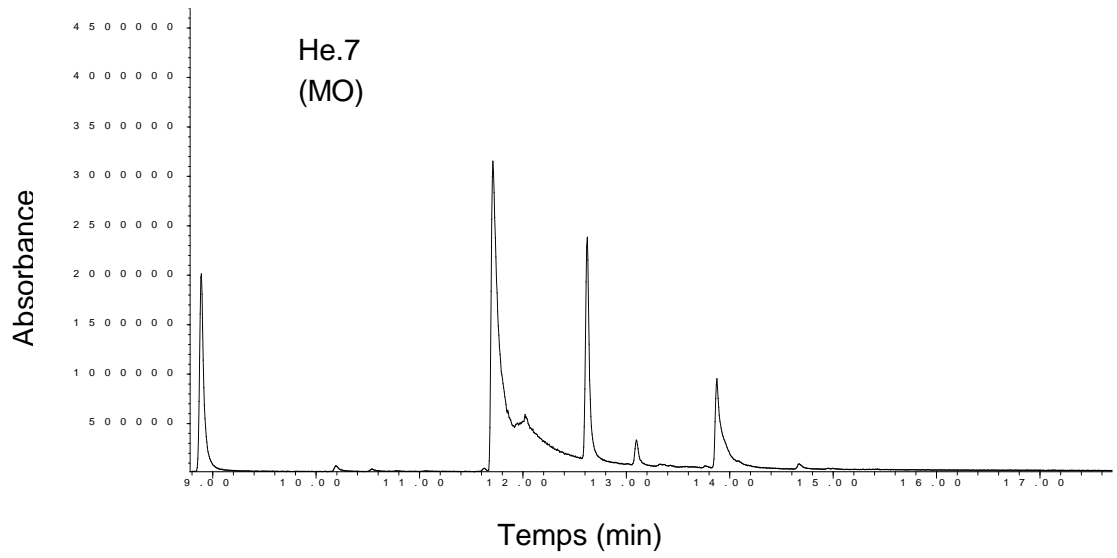
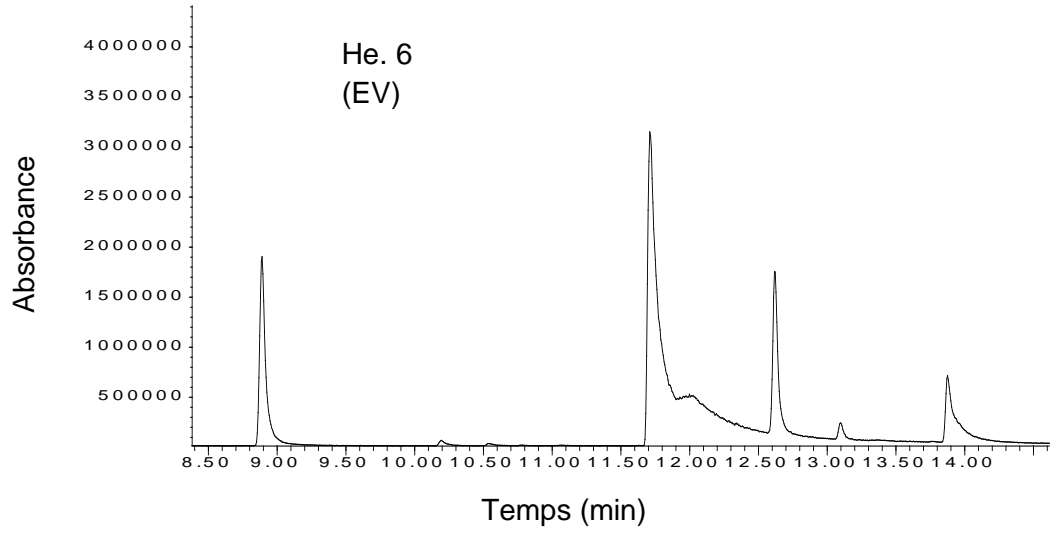
[2] : Domaine spectrale de 3701,4 à 2758,2 cm⁻¹ et de 1801,5 à 578,7 cm⁻¹.

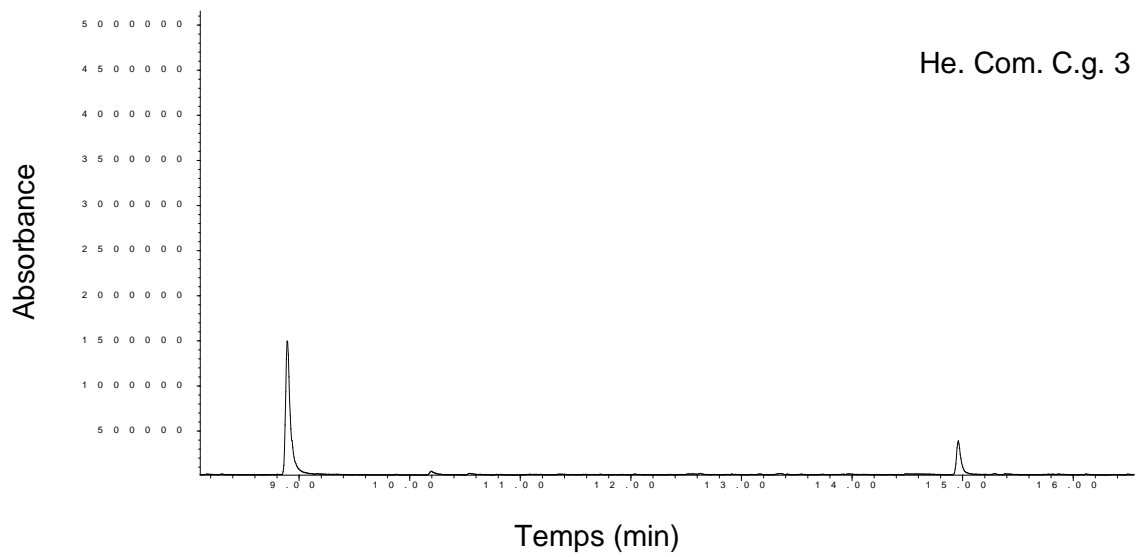
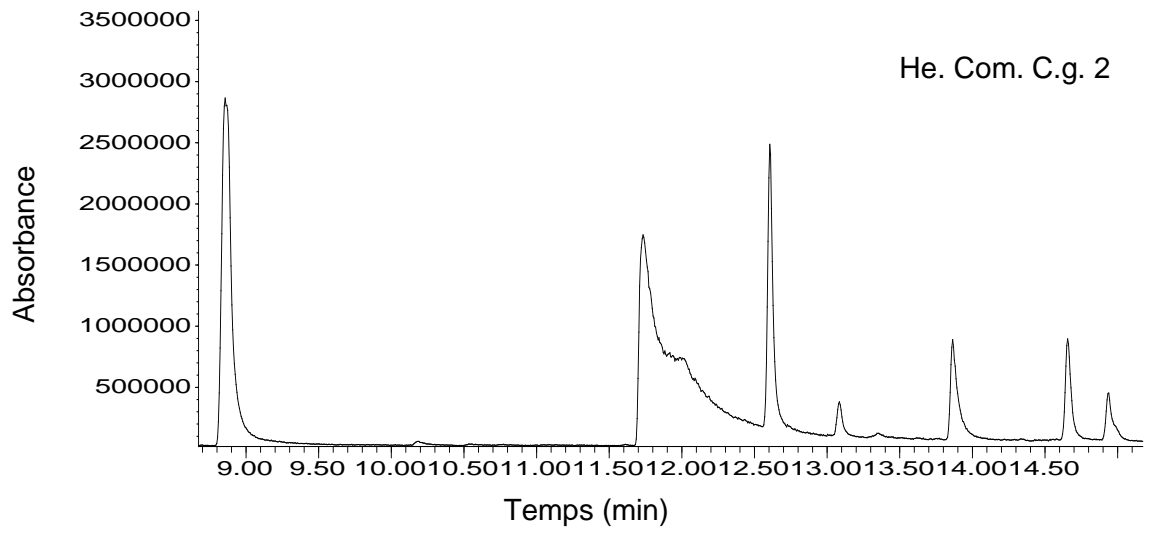
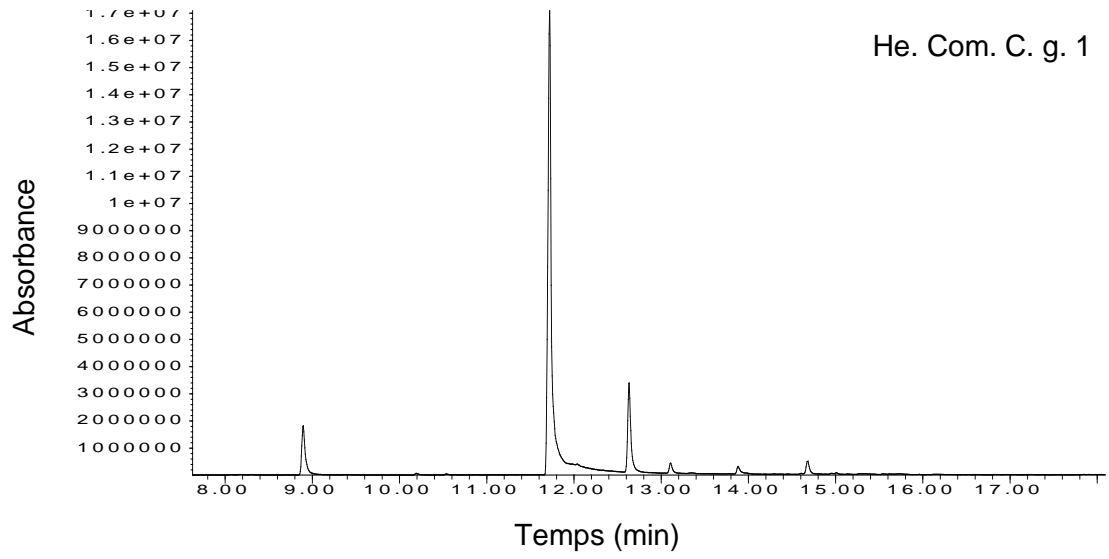
APPENDICE F

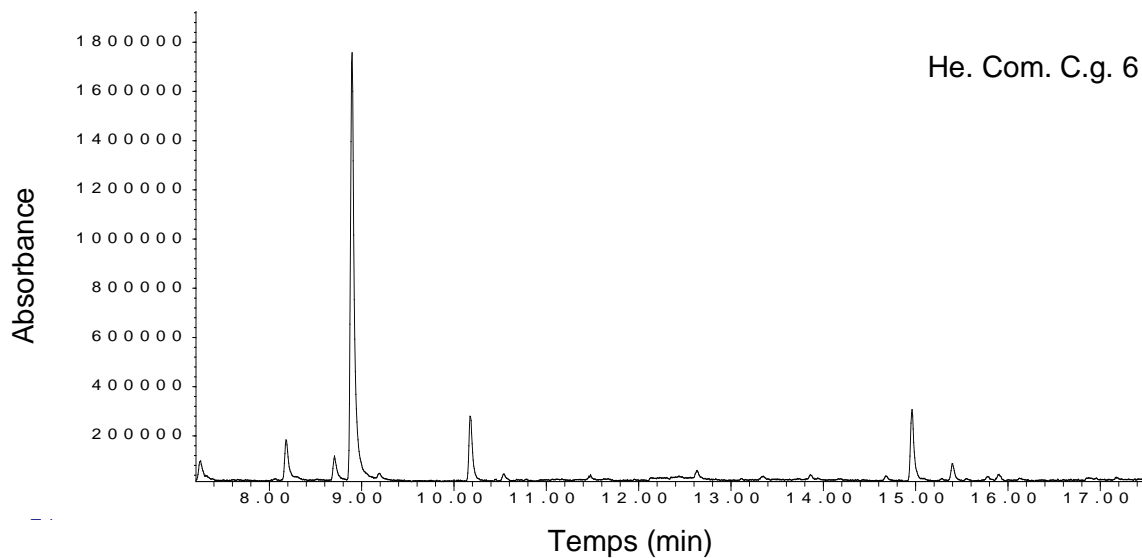
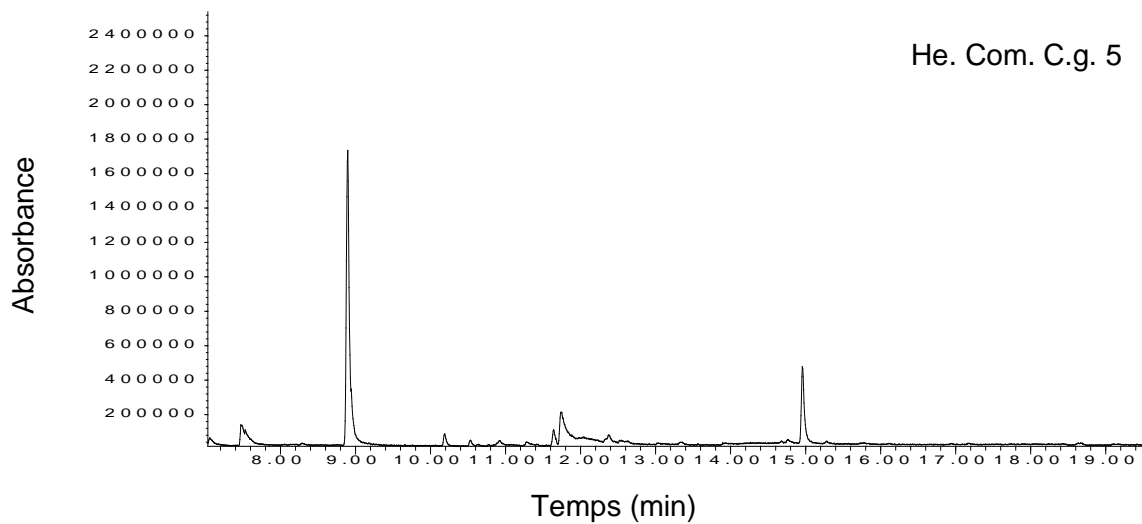
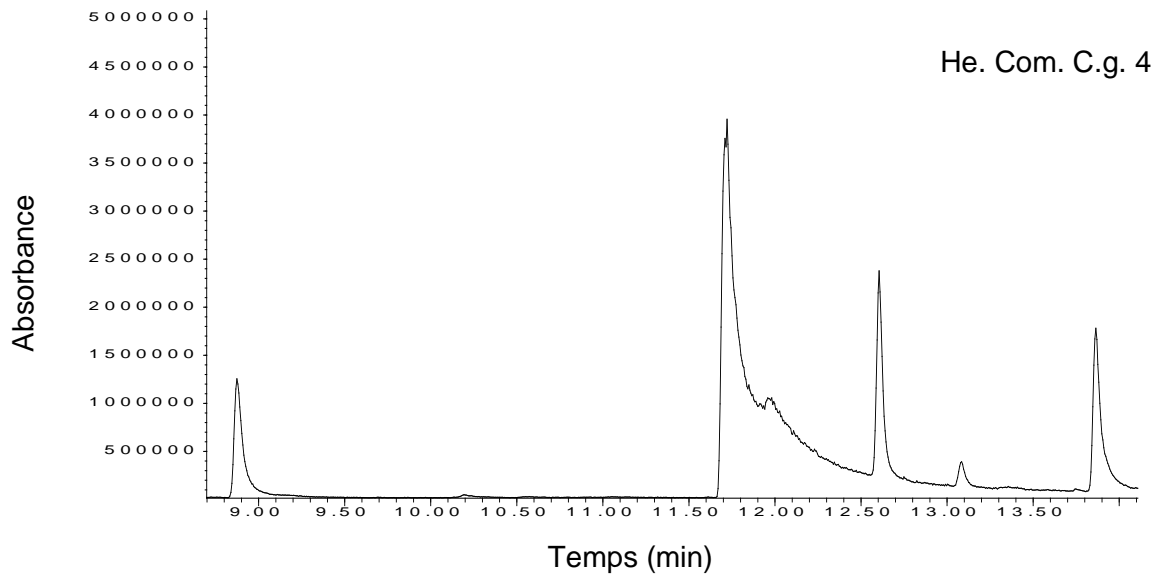
Chromatogrammes des échantillons d'huile essentielle pure (He.1-8) et les échantillons commerciaux (He. Com.C.g 1-11) de clous de girofle

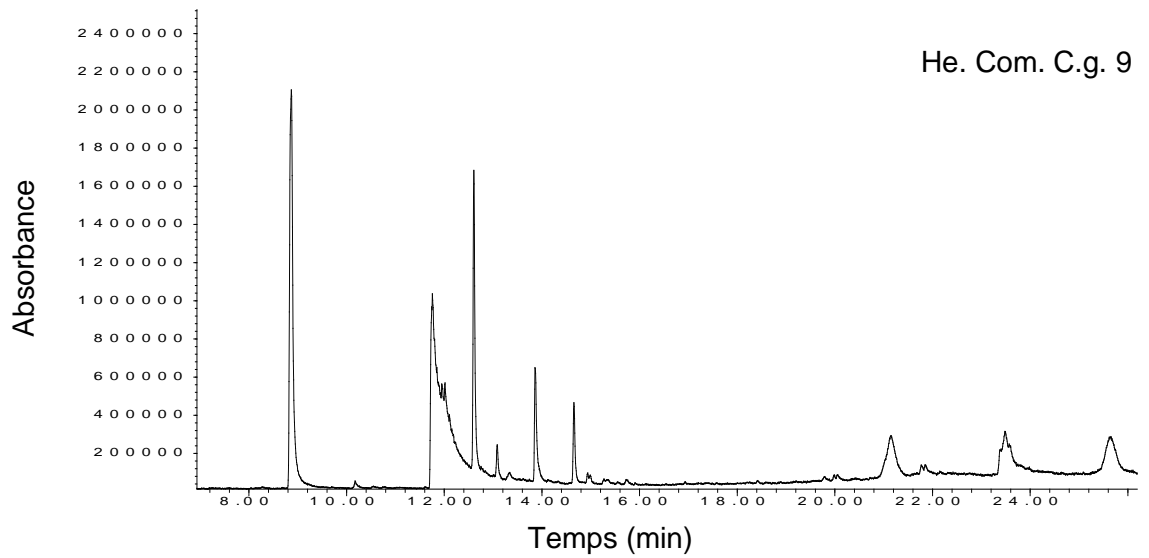
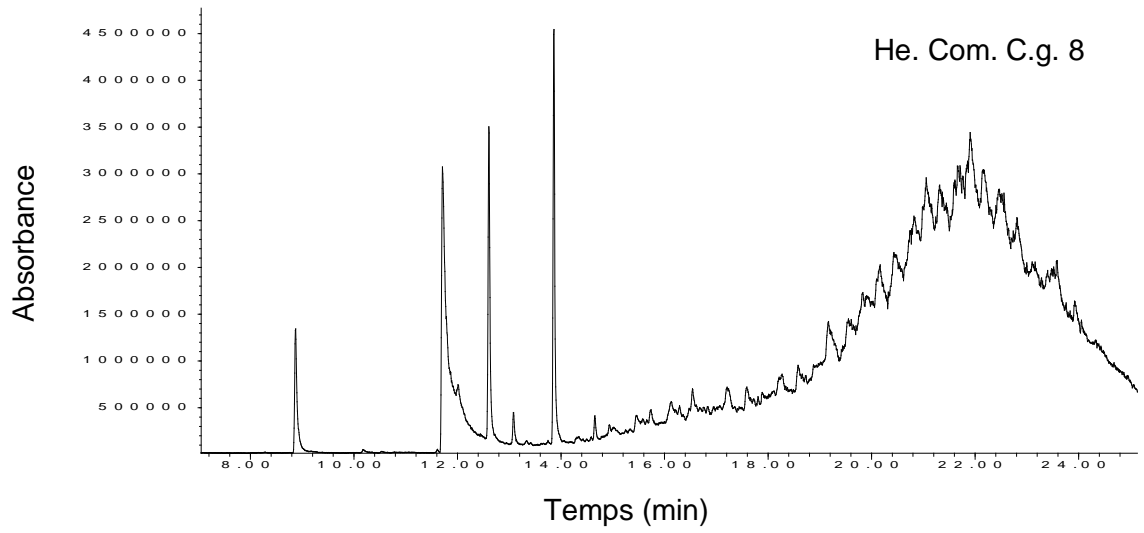
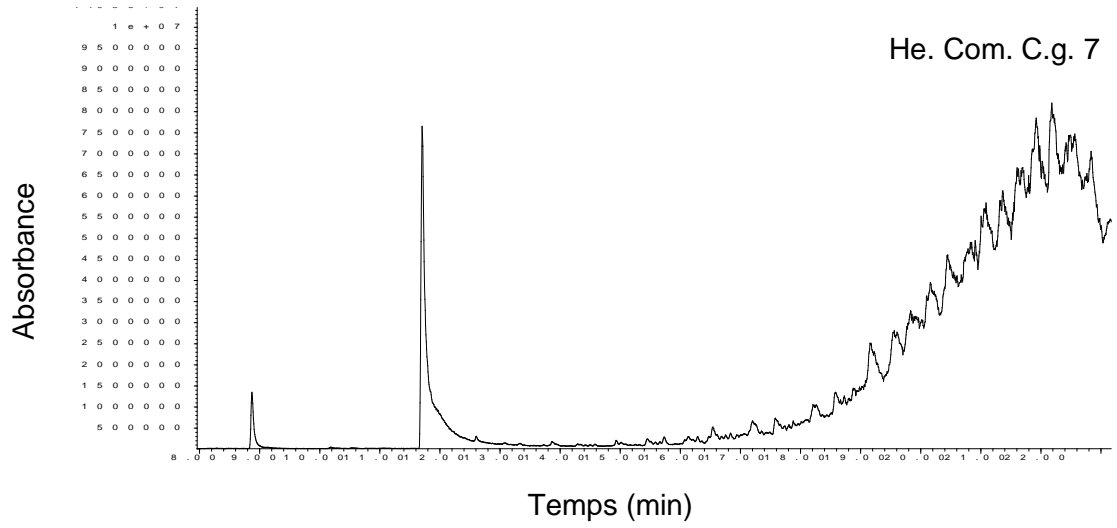


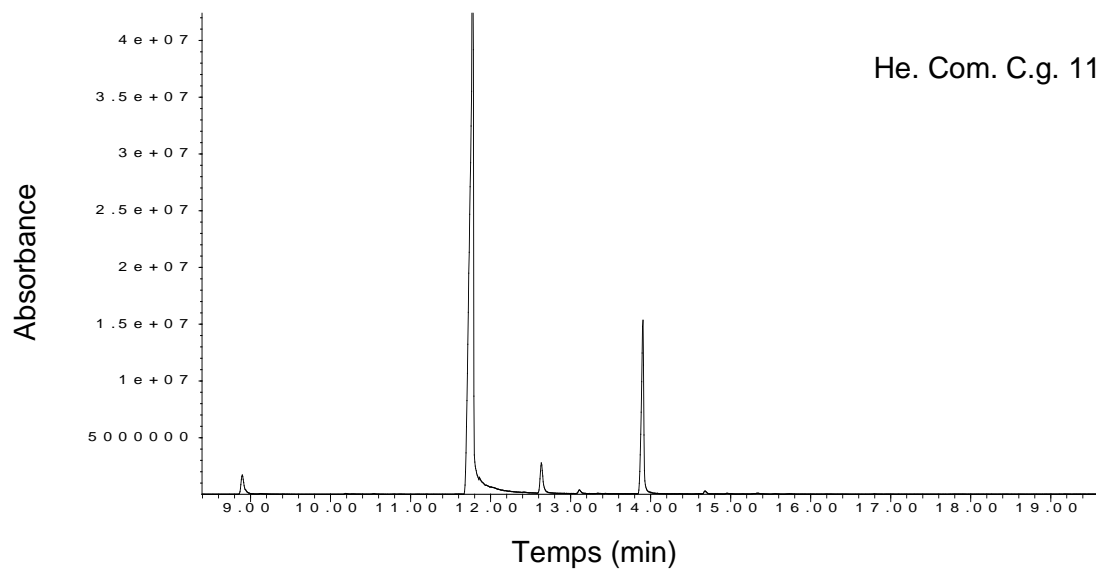
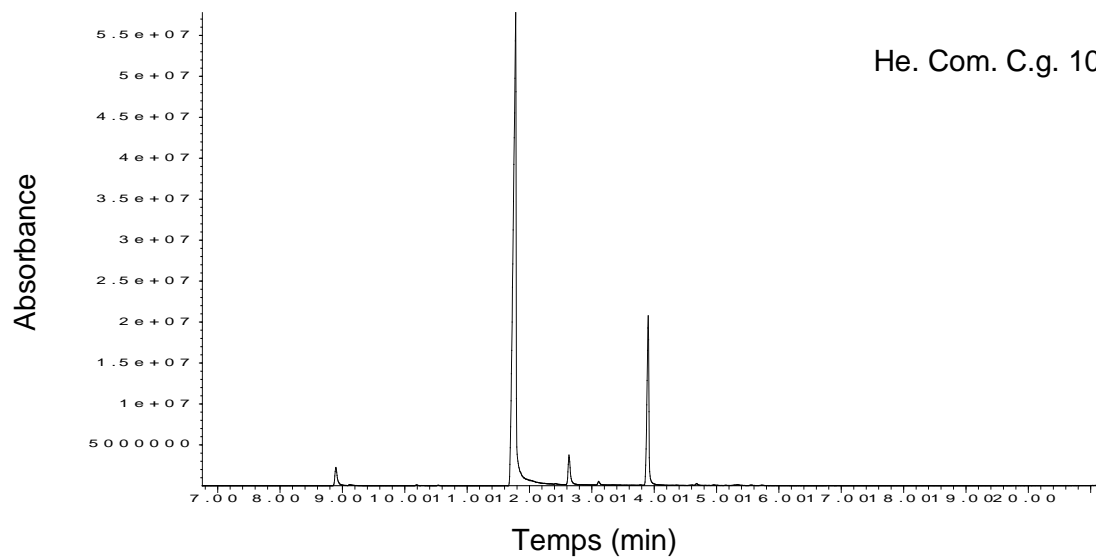












PAPER

Cite this: *Anal. Methods*, 2017, 9, 6574

Fourier transform infrared analysis of commercial formulations for *Varroa* treatment

K. Bounaas,^a N. Bouzidi,^a Y. Daghbouche,^{ID} *^{ab} S. Garrigues,^{ID} ^c M. de la Guardia^c and M. El Hattab^a

A comparative study has been carried out between univariate and multivariate calibration strategies for the simultaneous determination of camphor, thymol, menthol and eucalyptol in commercial formulations used for *Varroa* treatment. Absorbance peak heights of the transmission mid-infrared (MIR) spectra of individual monoterpenes, prepared in dichloromethane, were measured at 1737, 1151, 1022 and 980 cm⁻¹ (corrected with a base-line at 1933 cm⁻¹) for camphor, thymol, menthol and eucalyptol, respectively. Data were processed using the proportional equations approach in univariate mode. For multivariate calibration, partial least squares (PLS) regression based on a classical 4² design for standards was employed. It was used to obtain information from spectral ranges between 1812–1667 cm⁻¹ and 1200–955 cm⁻¹ to build PLS models using different spectral pre-processing techniques after mean centering of infrared data. The root mean square error of prediction (RMSEP) was considered to select the optimum model for each monoterpene. The accuracy of both assayed strategies was evaluated from samples spiked with different amounts of the four compounds. Recovery percentages from 91% to 98.7%, 105.5% to 116.9%, 95% to 108.2% and 100.1% to 107.1% were achieved for camphor, thymol, menthol and eucalyptol, respectively, by using PLS.

Received 27th August 2017
Accepted 26th October 2017

DOI: 10.1039/c7ay02058a

rsc.li/methods

1. Introduction

Ectoparasitic mite, *Varroa destructor*, is considered as the most serious worldwide pest of the western honeybee (*Apis mellifera* L.).^{1–6} This destructive mite which is an external and new parasite of the honeybee⁷ is a vector of severe viral diseases^{8,9} and a key player for winter colony losses^{4,10} by causing a mortality in feeding the host hemolymph of brood and adults.^{6,9,11,12} So nowadays, it is difficult to find a *Varroa*-free honeybee colony anywhere.¹³ *Varroa* can also cause the so-called Colony Collapse Disorder (CCD), which is a serious problem of honeybees.^{9,14} Many control methods have been used to preserve the host colony and reduce *Varroa* mite population,^{7,12} because untreated colonies would collapse in few years or in few months.^{7,13} However, the presence of pesticides in bee products must be carefully controlled to protect human health. For this reason and through Regulation (EC) 396/2005¹⁵ and Regulation (EC) 37/2010,¹⁶ maximum residue limits (MRLs) have been established for pesticide residues in agricultural and apicultural practices.¹⁷ Different studies from different countries have shown the presence of acaricide residuals in honey, propolis and wax and its negative

effect on honeybee health.^{5,18} Due to this situation, natural substances, such as organic acids (formic, lactic or oxalic) and some essential oil compounds (thymol, eugenol, carvacrol, menthol), could be used to avoid *Varroa*.^{19–21} However, it has been evidenced that the use of natural products including thymol and other monoterpenoids can be problematic due to their negative effects on bees.^{4,21} On the other hand, the residues of thymol and other monoterpenoids may be found in wax, which can migrate into honey and affect the honey taste, which is not permitted according to the international honey regulations. In spite of that, thymol residues pose no health danger for consumers if they do not exceed the level of 50 mg per kg of honey.^{21,22}

Several studies were carried out for the determination of pesticides in apiary products.²³ However, few of them have been focused on the determination of natural substances used for treatment against *Varroa*. Various extraction methods have been developed to isolate pesticides, which include chemical and natural products, mainly liquid–liquid extraction (LLE)^{22,24} and solid phase extraction (SPE).^{20,25–27} Other extraction techniques, solid phase microextraction (SPMG),²⁸ supercritical fluid extraction,²⁹ and the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) sample preparation technique,^{23,30} have been applied in the analysis of pesticides in bee products. On the other hand, gas chromatography (GC)^{24,26,28–30} and liquid chromatography (LC),^{22,23,25,27} with selective detectors, have been considered as the main analytical methods for the determination of pesticide residues in bee products.

^aLaboratory of Natural Products Chemistry and of Biomolecules, University of Blida 1, P.O. Box 270, Blida 09000, Algeria. E-mail: ydaghbouche@yahoo.fr

^bMedicinal and Aromatic Plants Laboratory, University of Blida 1, P.O. Box 270, Blida 09000, Algeria

^cDepartment of Analytical Chemistry, University of Valencia, Research building, 50 Dr Moliner Street, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

Quantification of essential oil compounds is widely performed by gas chromatography, which is the most appropriate instrumental method for the analysis of complex samples.^{31,32} Because of the high separation efficiency and highly sensitive and selective detection of mass spectrometry (MS), GC-MS has been widely employed for the determination of volatile compounds in different matrices including essential oils^{32,33} and bee products.^{34,35} Also gas chromatography (GC) with flame ionization detection^{19,20} was used for the determination of some terpenoids used for treatment against the *Varroa* mite disease. In addition liquid chromatography (LC) with fluorescence detection was also used for the determination of terpene in honey.³⁶

Chromatography techniques were usually employed for formulation analysis.^{37,38} Different studies showed the potential of GC^{39,40} and LC^{40,41} for the determination of active substances in formulations. However, these techniques involve long sample preparation steps and the use of large amounts of solvents.³⁷ Because of that, vibrational spectroscopy-based procedures have been developed as simple alternatives to chromatography procedures due to their simplicity.^{37,42,43} On the other hand, FT-IR provides information in the presence of volatile oils.^{32,33}

The mid-infrared spectroscopy is the most important vibrational technique applied in the quality control of pesticide formulations⁴⁴ providing highly useful information about the structure of analytes⁴⁵ and their quantification. The application of chemometric tools that extract information from large spectral data sets increases the development of IR methods and evidences the potential for complex multianalyte determinations based on spectral analysis. However, to our knowledge, no attempt has been made for the determination of acaricides including natural products in commercial formulations used for treatment to fight against *Varroa*, despite the fact that there are several available commercial formulations containing thymol as the main active ingredient. Some of these formulations also contain other compounds to reduce the quantity of thymol in order to avoid its negative effects on bees.¹⁹

So, the objective of the present work is to evaluate the use of univariate and multivariate calibration strategies, based on MIR spectroscopy measurements, for the rapid and simultaneous determination of monoterpenes in commercial formulations used for *Varroa* treatment.

2. Experimental

2.1. Apparatus and software

A Bruker model Tensor 27 FT-IR spectrometer (Bremen, Germany), equipped with a temperature-stabilized deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector and a KBr beamsplitter, was employed to obtain the FT-IR spectra in the spectral range between 4000 and 500 cm^{-1} .

To avoid cell manipulation and to increase the sample throughput, a stopped-flow system was employed for sample introduction into the FT-IR spectrophotometer. Using a Gilson P-3 Minipuls peristaltic pump, samples were collected and conducted to a flow cell of 1 mm path length with ZnSe windows

from Specac (Orpington, United Kingdom). For sample transport, 3 mm o.d. and 1 mm i.d. Viton (Iso-versinic) pump tubes were used. All the connecting tubes employed in the manifold were made from PTFE with an i.d. of 0.8 mm.

Opus 6.5 software from Bruker was used for instrument control and measurement. Univariate calibration and multivariate calibration were carried out by using the applications Quant1 and Quant2, respectively, integrated in the instrument software package. Solver from Microsoft Excel software was used to solve the equation system.

A J.P Selecta ultrasonic water bath (Barcelona, Spain) of 40 kHz of frequency was employed for sample preparation.

2.2. Reagents

Dichloromethane of multisolvent grade stabilized with 50 ppm of amylene from Scharlau (Barcelona, Spain) was employed for sample and standards preparation and FT-IR measurements. Standards of camphor, 98% purity, from Cheminova (Madrid, Spain), thymol, 98% purity, provided by Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) and menthol, 99% purity, and eucalyptol, 99% purity, both obtained from Panreac (Barcelona, Spain), were used in this study. Three commercial formulations, two based on thymol and another one with a mixture of terpenes (76% thymol, 16.4% eucalyptol, 3.9% camphor and 3.9% menthol), were obtained from the Algerian local market and were used in this study to evaluate the real applicability of the developed FT-IR method.

2.3. Sample preparation

Standards were prepared from pure terpene compounds and/or mixtures of the four terpenes considered. An adequate amount of sample (commercial formulations) was accurately weighed and diluted with dichloromethane, in order to obtain a concentration around 4 mg mL^{-1} of thymol for each commercial formulation. In order to assure a complete extraction of terpene compounds, sample solutions were treated in an ultrasound bath for 10 min.⁴⁶

For recovery studies, samples were spiked with different amounts of thymol, eucalyptol, camphor and menthol, in the range between 0.2 and 1.75 mg mL^{-1} , 0.1 and 0.9 mg mL^{-1} , 0.07 and 0.2 mg mL^{-1} and 0.08 and 0.2 mg mL^{-1} , respectively, and allowed to stand before their analysis.

2.4. FT-IR measurements

The mid-FT-IR spectra of standards and formulation samples were recorded between 4000 and 500 cm^{-1} with a nominal resolution of 4 cm^{-1} accumulating 25 scans per spectrum *versus* a background of the cell filled with the same solvent employed for sample preparation and measured under the same conditions as samples and standards.

For univariate calibration, individual solutions containing camphor, thymol, menthol or eucalyptol were prepared in a concentration range until 5 mg mL^{-1} . On the other hand, sixteen mixed standards were used to build a PLS calibration model. These standards correspond to different mixtures of camphor, thymol, menthol and eucalyptol at two different

concentration levels in an experimental design of 4^2 . For this purpose, camphor and menthol were prepared at concentration levels of 0.025 and 0.25 mg mL^{-1} , thymol at 0.25 and 5.0 mg mL^{-1} , and eucalyptol at 0.1 and 1.0 mg mL^{-1} .

To determine the concentration of each terpene in formulated samples by univariate calibration, the absorbance peak height of characteristic spectral bands was measured at 1737 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} and 980 cm^{-1} using a common single point base-line established at 1933 cm^{-1} for camphor, thymol, menthol and eucalyptol, respectively.

Multivariate PLS analysis was performed using the spectral ranges between $1812\text{--}1667\text{ cm}^{-1}$ and $1200\text{--}955\text{ cm}^{-1}$, after mean centering of infrared data and considering different spectral pre-processing techniques, such as constant offset elimination, straight line subtraction, first and second order

derivative spectra and first derivative plus straight line subtraction.

3. Results and discussion

3.1. FT-IR spectra of standards and formulation samples

Fig. 1 shows the FT-IR spectra of camphor, thymol, menthol and eucalyptol standards and Fig. 2 those of commercial formulations, all of them prepared in dichloromethane. As can be seen in these spectra, some regions are not transparent due the absorbance of the solvent. The most intense bands, which appear at 1737 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} and 980 cm^{-1} , are due to C=O stretching vibrations, C–O stretching, the characteristic band of O–H and the characteristic band of the isopropyl function for camphor, thymol, menthol and eucalyptol,

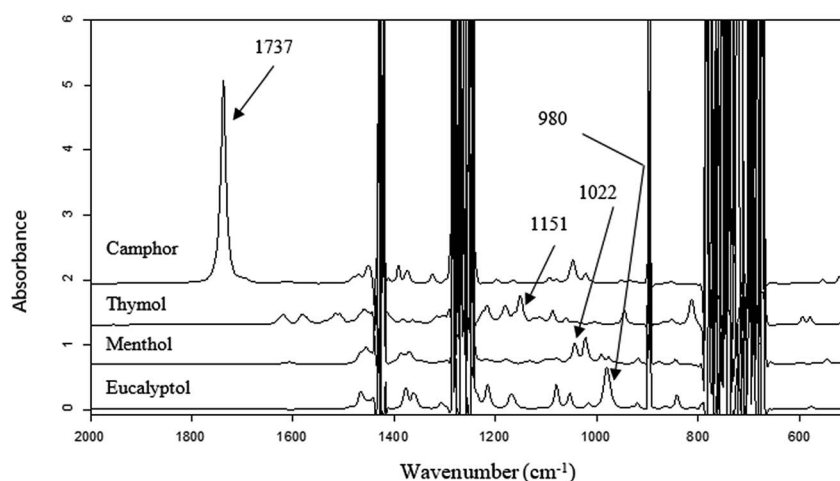


Fig. 1 FT-IR spectra of camphor, thymol, menthol and eucalyptol standards, diluted with dichloromethane at a concentration of 5 mg mL^{-1} for each compound. The spectra were obtained by accumulating 25 scans with a spectral resolution of 4 cm^{-1} .

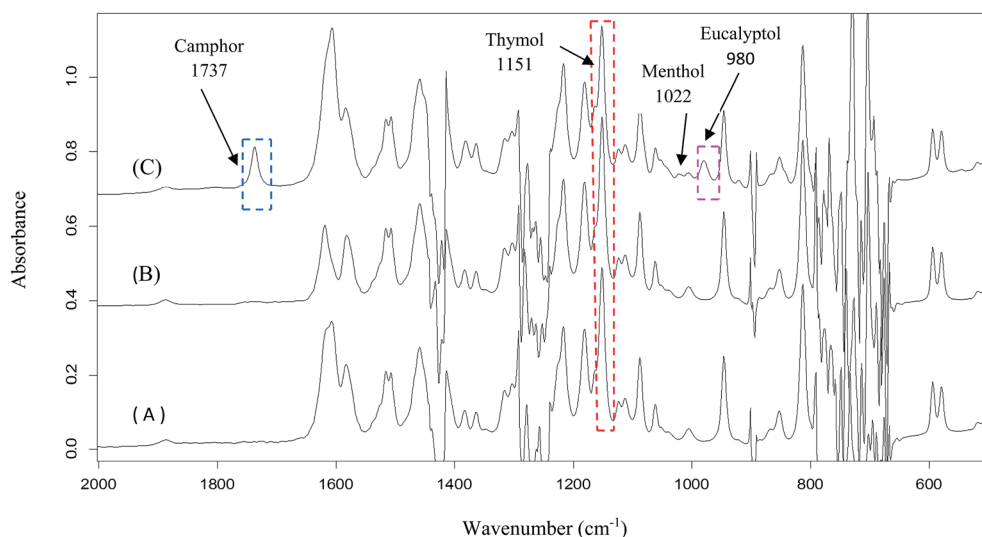


Fig. 2 FT-IR spectra of three different anti-*Varroa* terpene formulations dissolved in dichloromethane. The spectra were obtained by accumulating 25 scans with a spectral resolution of 4 cm^{-1} . Note: the thymol concentration of 5 mg mL^{-1} for formulations A and B, and 5, 1.08, 0.24 and 0.24 mg mL^{-1} for thymol, eucalyptol, camphor and menthol, respectively, in the third one C.

respectively. From the comparison of the spectra presented in Fig. 1 and 2, it can be considered that dissolved commercial formulations present the same characteristic bands as the standards, suggesting that the use of these bands could be adequate for the simultaneous determination of the four terpenes in the samples. However, a strong overlapping of the terpene bands can be observed, except that of carbonyl in camphor. Because of this, univariate methods based on external calibration with pure compounds cannot be powerful enough to do their determination. So, in this study, two mathematical tools were applied to determine the four compounds under study and to reduce the effect of band overlapping between specific bands for each compound: one of these is an univariate strategy, based on the use of proportional equations, obtained at four wavenumbers, together with 16 coefficients determined for each one of the four terpenes at each wavenumber, and the second one is a multiparametric analysis based on partial least squares (PLS) regression.

3.2. Proportional equations data treatment for univariate calibration

The univariate regression for the simultaneous determination of monoterpenes was tested by using individual calibration lines of these compounds, but it caused tremendous errors in the analysis of commercially available formulations. So the use of a proportional equations system for data treatment to overcome the difficulties offered by band overlapping was attempted. In this case, monoterpene solutions, at different concentration levels, were used to obtain calibration lines for each one, and from their slope, a series of 16 proportional coefficients were determined to be suitable to be employed to evaluate the concentration of the four considered terpenes in different mixtures. So, the method is based on the resolution of an equation system with four unknown and four experimental data points corresponding to the measurement of samples at the four selected wavelengths.

Different modes of measurement were studied, including peak area and peak height, with different base-line corrections, in order to obtain the best calibration lines. From the slope of the calibration lines obtained by simple mean square regression, the absorption coefficients of camphor, thymol, menthol and eucalyptol at 1737 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , 1022 cm^{-1} and 980 cm^{-1} (using a 1933 cm^{-1} base-line correction in all cases) were calculated and employed to build the equation system (data shown in Table 1). Fig. 3 also shows the mathematical model built for the simultaneous determination of the four target compounds. The concentrations of synthetic and real samples were calculated from their IR spectra and using the selected equation system.

On looking through the expressions in Fig. 3, it can be seen that absorbance measurements at 1737 cm^{-1} are weakly affected by thymol, menthol and eucalyptol. The same happens at 1151 cm^{-1} for thymol in the presence of the other considered terpenes. However, it is clear that the employed strategy is suitable to minimize errors in the univariate determination of

Table 1 Calibration lines obtained for univariate FT-IR determination of camphor, thymol, menthol and eucalyptol in dichloromethane using selected criteria

Measurement criterion ^a	Camphor		Thymol		Menthol		Eucalyptol	
	Calibration line $A = aC + b$	R	Calibration line $A = aC + b$	R	Calibration line $A = aC + b$	R	Calibration line $A = aC + b$	R
Peak height 1737 cm^{-1}	$A = 0.46301C + 0.04724$	0.9993	$A = 0.00104C + 0.00037$	0.9943	$A = 0.00066C + 0.00009$	0.9775	$A = 0.00084C + 0.00048$	0.9569
Peak height 1151 cm^{-1}	$A = 0.00218C - 0.00157$	0.9941	$A = 0.09106C + 0.00612$	0.9994	$A = 0.00363C + 0.00310$	0.9583	$A = 0.00662C + 0.00099$	0.9977
Peak height 1022 cm^{-1}	$A = 0.02427C + 0.00097$	0.9997	$A = 0.00365C + 0.00003$	0.9982	$A = 0.08691C + 0.00876$	0.9984	$A = 0.00830C + 0.00029$	0.9987
Peak height 980 cm^{-1}	$A = 0.00037C + 0.00003$	0.9876	$A = 0.00260C + 0.00006$	0.9986	$A = 0.01772C + 0.00192$	0.9983	$A = 0.12684C + 0.00674$	0.9998

^a Base-line correction at 1933 cm^{-1} . ^b A: absorbance peak height; C: monoterpene concentration in mg mL^{-1} .

$$\begin{cases} A_{1737} = \varepsilon_C C_C + \varepsilon_T C_T + \varepsilon_M C_M + \varepsilon_E C_E \\ A_{1151} = \varepsilon_C C_C + \varepsilon_T C_T + \varepsilon_M C_M + \varepsilon_E C_E \\ A_{1022} = \varepsilon_C C_C + \varepsilon_T C_T + \varepsilon_M C_M + \varepsilon_E C_E \\ A_{980} = \varepsilon_C C_C + \varepsilon_T C_T + \varepsilon_M C_M + \varepsilon_E C_E \end{cases} \longrightarrow \begin{cases} A_{1737} = 0.46301 C_C + 0.00104 C_T + 0.00066 C_M + 0.00084 C_E \\ A_{1151} = 0.00218 C_C + 0.09106 C_T + 0.00363 C_M + 0.00662 C_E \\ A_{1022} = 0.02427 C_C + 0.00365 C_T + 0.08691 C_M + 0.0083 C_E \\ A_{980} = 0.00037 C_C + 0.00260 C_T + 0.01772 C_M + 0.1268 C_E \end{cases}$$

C_C, C_T, C_M, C_E : concentration of camphor, thymol, menthol and eucalyptol in mg mL^{-1} .
 $\varepsilon_C, \varepsilon_T, \varepsilon_M, \varepsilon_E$: absorption coefficient of camphor, thymol, menthol and eucalyptol.
 Absorbance values in peak height units

Fig. 3 Proportional equations system used for univariate mode sample analysis of anti-*Varroa* terpene formulations.

terpenes in mixtures with large amounts of some of the target analytes.

3.2.1. Analysis of synthetic mixtures and commercial formulations of camphor, thymol, menthol and eucalyptol.

Table 2 summarizes the results obtained using univariate calibration through proportional equations for the analysis of the four synthetic mixtures of camphor, thymol, menthol and eucalyptol prepared in dichloromethane, in order to test the applicability of the developed procedure. The accuracy of the method was evaluated by the relative error between the theoretical and found content of each considered terpene. As can be seen, the relative difference varied between -8.4% and 24.7% for camphor, -7.7% and 2.6% for thymol, -20.3% and 3.6% for menthol and -7.7% and 1.9% for eucalyptol. Commercial formulation samples were prepared as indicated in the experimental part for the determination of the four monoterpenes and, to evaluate the accuracy of the procedure, the samples were spiked with a known concentration of the analytes and analyzed using the proposed mathematical model, and errors were calculated taking into consideration recovery values. The obtained results, as indicated in Table 3, show the accuracy of the determination of camphor, thymol, menthol and eucalyptol in commercial and spiked samples, with relative error values between -13.4% and 14.6% for thymol and between -11.4% and 8.7% for eucalyptol. High relative error values were obtained for menthol and camphor between -36% and 42.1% and between 8.0% and 42.5% , respectively, except for sample C2 for which errors were 53% and 93.9% for menthol and camphor, respectively. This variation is due to the low concentration of these two monoterpenes in commercial formulations.

3.3. PLS data treatment

Partial least squares (PLS) regression models were built for monoterpene determination. However, the lack of a large number of different formulations avoids the possibility to build the calibration models from the commercial samples of the same type compared to those to be analyzed, and thus, it was necessary to perform the calibration based on a 4^2 design of synthetic mixtures of the four compounds at two concentration levels as explained in the Experimental section. Different spectral pre-processing strategies (constant offset elimination, straight line subtraction, first and second derivative, first derivative plus straight line subtraction and mean centering) and different spectral regions were considered in order to build robust enough multivariate models.

Frequently, cross validation has been used to optimize and select the PLS model with the best predictive capabilities.⁴⁷ However, in this study, the root mean square error of prediction (RMSEP) for a separate set of samples, not employed for calibration, was used as the main parameter to select the best models. By combining different preprocessing treatments and wavenumber intervals, taking into consideration the characteristic bands of individual monoterpenes under study, the lowest possible RMSEP was used to select the best model for each compound (see Table 4). The number of factors in this work was also chosen accordingly to minimize RMSEP. As can be seen in Table 4, minimum RMSEP values were found for camphor and thymol models using 3 factors. For menthol and eucalyptol, 5 and 6 factors were selected respectively for model building. The use of a high number of factors did not provide

Table 2 Analysis of synthetic mixtures of camphor, thymol, menthol and eucalyptol by FT-IR using univariate calibration

Mixture	Analyte/Monoterpene											
	Camphor			Thymol			Menthol			Eucalyptol		
	Added ^a (mg mL^{-1})	Found ^b (mg mL^{-1})	Error (%)	Added (mg mL^{-1})	Found (mg mL^{-1})	Error (%)	Added (mg mL^{-1})	Found (mg mL^{-1})	Error (%)	Added (mg mL^{-1})	Found (mg mL^{-1})	Error (%)
01	0.250	0.263	5.1	5.000	4.900	-2.0	0.251	0.235	-6.5	1.002	0.924	-7.7
02	—	—	—	3.000	3.080	2.6	—	—	—	—	—	—
03	0.114	0.142	24.7	2.280	2.320	1.7	0.114	0.118	3.6	0.492	0.470	-4.5
04	0.095	0.087	-8.4	1.900	1.750	-7.7	0.095	0.076	-20.3	0.410	0.418	1.9

^a Considering the content provided by the formulation manufacturer plus the spiked one. ^b Values calculated experimentally.

Table 3 Analysis of camphor, thymol, menthol and eucalyptol by univariate calibration through the use of a mathematical model based on the equation system

		Analyte/Monoterpene											
		Camphor			Thymol			Menthol			Eucalyptol		
Commercial formulations	Sample	Added ^a (mg mL ⁻¹)	Found ^b (mg mL ⁻¹)	Error (%)	Added (mg mL ⁻¹)	Found (mg mL ⁻¹)	Error (%)	Added (mg mL ⁻¹)	Found (mg mL ⁻¹)	Error (%)	Added (mg mL ⁻¹)	Found (mg mL ⁻¹)	Error (%)
Sample A	A1	—	—	—	2.000	1.979	-1.1	—	—	—	—	—	—
	01 spiked	0.100	0.122	22	3.750	3.937	5.0	0.150	0.096	-36	0.600	0.544	-9.3
	A2	—	—	—	0.500	0.433	-13.4	—	—	—	—	—	—
	02 spiked	0.080	0.114	42.5	0.700	0.686	-2.0	0.200	0.168	-16.0	0.900	0.929	3.2
Sample B	02 spiked	0.200	0.247	23.5	1.500	1.523	1.5	0.180	0.155	-13.9	0.700	0.732	4.6
	B1	—	—	—	2.000	1.924	-3.8	—	—	—	—	—	—
	03 spiked	0.150	0.162	8.0	3.500	3.580	2.3	0.100	0.081	-19.0	0.400	0.384	-4.0
	B2	—	—	—	3.000	3.322	10.7	—	—	—	—	—	—
Sample C	04 spiked	0.170	0.196	15.3	4.500	5.123	13.8	0.080	0.064	-20	0.150	0.161	7.3
	04 spiked	0.070	0.091	30.0	4.000	4.510	12.8	0.130	0.120	-7.7	0.550	0.598	8.7
	C1	0.114	0.162	42.1	2.280	2.287	0.3	0.114	0.162	42.1	0.492	0.436	-11.4
	05 spiked	0.214	0.268	25.2	3.530	3.595	1.8	0.264	0.313	18.6	0.792	0.747	-5.7
Sample C	C2	0.049	0.095	93.9	1.000	1.033	3.3	0.049	0.075	53.1	0.215	0.195	-9.3
	06 spiked	0.129	0.151	17.1	1.750	2.005	14.6	0.230	0.258	12.2	0.315	0.303	-3.8
	06 spiked	0.225	0.300	33.3	2.740	2.875	4.9	0.160	0.193	20.6	0.835	0.856	-2.5

^a Considering the content provided by the formulation manufacturer plus the spiked one. ^b Values calculated experimentally.

Table 4 Summary of the most important parameters of the best PLS models for FT-IR determination of monoterpenes in anti-*Varroa* formulations^a

Analyte	Spectral ranges (cm ⁻¹)	Pre-processing	Factors	RMSEC (mg mL ⁻¹)	RMSECV (mg mL ⁻¹)	RMSEP (mg mL ⁻¹)	R ² Cal	R ² CV	R ² Pred
Camphor	1793.8–1685.8	Constant offset elimination	3	0.011	0.014	0.013	0.9904	0.9836	0.9726
	883.4–804.3	Mean centering							
Thymol	1228.7–912.3	Straight line subtraction	3	0.034	0.039	0.320	0.9998	0.9997	0.9306
	653.9–470.6	Mean centering							
Menthol	1793.8–1685.8	Straight line subtraction	5	0.014	0.020	0.023	0.9858	0.9689	0.9278
	1228.7–912.3	Mean centering							
Eucalyptol	1793.8–1685.8	Constant offset elimination	6	0.018	0.026	0.030	0.9986	0.9966	0.9912
	1228.7–912.3								
	883.4–804.3	Mean centering							

^a Coefficient of determination for calibration (R² Cal), cross-validation (R² CV) and prediction (R² Pred). Root mean square error of calibration (RMSEC), cross validation (RMSECV) and prediction (RMSEP).

a significant improvement in the prediction capacity of the model and could easily lead to overfitting. The coefficient of determination for calibration (R² Cal) and cross validation (R² CV) and root mean square error of calibration (RMSEC) and cross validation (RMSECV) are indicated in Table 4 and can be used to evaluate the calibration performance of the selected PLS models.

3.4. Accuracy and precision of the PLS calibration

In the present study, a short number of commercially available samples and spiked ones were used to calculate the RMSEP. To assess the performance of the PLS models and to validate the accuracy of the method, a series of recovery studies were carried out. Commercial formulations were spiked with camphor,

thymol, menthol and eucalyptol at different concentration levels. From the FT-IR spectra of the spiked samples, terpene concentrations were predicted by PLS and the results obtained for these compounds were used to calculate the recovery level of each one, as an indicator of the accuracy of the proposed method. The evaluation of the recovery percentage of the method was also considered as a second criterion to select the best model. The average recovery levels of the four monoterpenes ranged between 91% and 98.7% for camphor, 105.5% and 116.9% for thymol, 95% and 108.2% for menthol and 100.1% and 107.1% for eucalyptol. The precision of the method, measured as the relative standard deviation of three independent replicate analyses, was also calculated for camphor, thymol, menthol and eucalyptol determination in

Table 5 Analysis of camphor, thymol, menthol and eucalyptol by FT-IR using PLS calibration

		Analytes											
		Camphor			Thymol			Menthol			Eucalyptol		
Commercial formulations	Sample	Added ^a (mg mL ⁻¹)	Found ^b (mg mL ⁻¹)	Error (%)	Added (mg mL ⁻¹)	Found (mg mL ⁻¹)	Error (%)	Added (mg mL ⁻¹)	Found (mg mL ⁻¹)	Error (%)	Added (mg mL ⁻¹)	Found (mg mL ⁻¹)	Error (%)
Sample A	A1	—	—	—	2.000	2142	7.1	—	—	—	—	—	—
	01 spiked	0.100	0.088	-12.0	3.750	4.090	9.1	0.150	0.161	7.3	0.600	0.586	-2.3
	A2	—	—	—	0.500	0.515	3.0	—	—	—	—	—	—
	02 spiked	0.080	0.089	11.3	0.700	0.716	2.3	0.200	0.192	-4.0	0.900	0.903	0.3
	02 spiked	0.200	0.192	-4.0	1.500	1.585	5.7	0.180	0.183	1.7	0.700	0.721	3.0
Sample B	B1	—	—	—	2.000	2.016	0.8	—	—	—	—	—	—
	03 spiked	0.150	0.127	-15.3	3.500	3.686	5.3	0.100	0.096	-4.0	0.400	0.418	4.5
	B2	—	—	—	3.000	3.456	15.2	—	—	—	—	—	—
	04 spiked	0.170	0.156	-8.2	4.500	5.271	-17.1	0.080	0.084	5.0	0.150	0.152	1.3
	04 spiked	0.070	0.075	-7.1	4.000	4.639	16.0	0.130	0.108	-16.9	0.550	0.522	-5.1
Sample C	C1	0.114	0.125	9.6	2.280	2.292	0.5	0.114	0.139	21.9	0.492	0.450	-8.5
	05 spiked	0.214	0.212	0.9	3.530	3.600	2.0	0.264	0.309	17.1	0.792	0.793	0.1
	C2	0.049	0.075	53.1	1.000	1.060	6.0	0.049	0.034	-30.6	0.215	0.207	-3.7
	06 spiked	0.129	0.115	-10.9	1.750	2.039	16.5	0.230	0.221	-3.9	0.315	0.304	-3.5
	06 spiked	0.225	0.242	7.6	2.740	2.910	6.2	0.160	0.188	17.5	0.835	0.889	6.5

^a Considering the reference content reported by the formulation plus the spiked one. ^b Values calculated experimentally.

commercial formulations and spiked samples. The values of 7.8%, 7.2%, 10.3%, 4.1% correspond to the average precision levels of the independent determinations of camphor, thymol, menthol and eucalyptol, respectively.

As can be seen in Table 5, the accuracy found from the comparison of the predicted values with those declared by the producer and from the recovery of spiked monoterpenes provided lower errors using multivariate calibration than those found when applying univariate calibration, especially for camphor and menthol.

3.5. Evaluation of the method sustainability

The use of PLS-FTIR for the determination of terpenes in anti-*Varroa* commercial formulations involves the use of a total amount of 215 mL of CH₂Cl₂ for sample dilution and calibration standards preparation including also terpene stock solutions, thus involving 3.2 and 4.4 penalty points due to the consumption of reagents and generation of waste according to the correction proposed⁴⁸ for the evaluation of the eco-scale⁴⁹ to

classify a method in the so-called green certificate (see Fig. 4). So, it can be concluded that the proposed method, with 92.4 points, is a sustainable alternative to the use of chromatography approaches. Additionally, the amount of CH₂Cl₂ can be reduced and method sustainability can be improved through the use of on-line recycling of the solvent.⁵⁰

4. Conclusions

This study has evidenced the potential of transmission MIR spectroscopy for a fast and simple direct determination of monoterpenes in commercial formulations used for *Varroa* treatment without the need for any previous separation. The results obtained showed that the developed PLS-FTIR method, using a simple experimental design of 4² mixtures of terpene standards for calibration, provides better accuracy and precision than the use of univariate calibration. In addition, the PLS-FT-IR procedure requires less time to obtain the results than the univariate method based on the use of proportional equations, and the available software simplifies the calculations.

On the other hand, the use of a flow IR cell reduces sample handling for measurements, and requires a low volume of solution to record the IR spectra, with a good control of the generated waste. So, the PLS FTIR proposed approach can be considered as an adequate methodology for quality control during the production of a terpene-based commercial formulation for *Varroa* treatment.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest to declare.

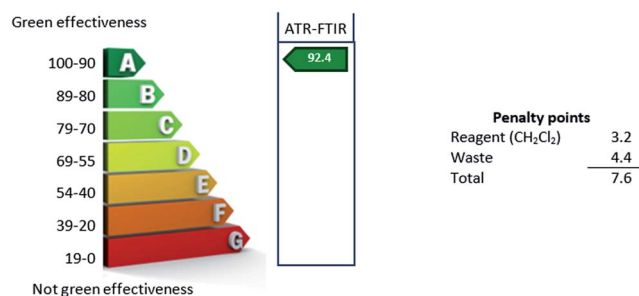


Fig. 4 Green certificate of the method developed for ATR-FTIR determination of terpenes in *Varroa* treatment formulations.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the National Research Foundation (DGRSDT) – Algéria, the Generalitat Valenciana (Project PROMETEO II 2014/077) and the Ministerio de Economía y Competitividad-Feder (Project CTQ 2014-52841-P).

References

- 1 D. Wilkinson and G. C. Smith, *Ecol. Modell.*, 2002, **148**, 263–275.
- 2 A. Papachristoforou, C. Papaefthimiou, G. Zafeiridou, V. Goundy, M. Watkins and G. Theophilidis, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2011, **101**, 109–117.
- 3 D. Annoscia, F. del Piccolo and F. Nazzi, *J. Insect Physiol.*, 2012, **58**, 1548–1555.
- 4 H. Boncristiani, R. Underwood, J. D. Evans, J. Pettis and D. V. Engelsdorp, *J. Insect Physiol.*, 2012, **58**, 613–620.
- 5 P. M. Garrido, K. Antúnez, M. Martin, M. P. Porrini, P. Zunino and M. J. Eguaras, *J. Insect Physiol.*, 2013, **59**, 113–119.
- 6 A. L. Beaurepaire, K. J. Krieger and R. F. A. Moritz, *Infect., Genet. Evol.*, 2017, **50**, 49–54.
- 7 A. Gregorc and J. Poklucar, *Vet. Parasitol.*, 2003, **111**, 351–360.
- 8 A. Giacobino, A. Molineri, N. B. Cagnolo, J. Merke, E. Orellano, E. Bertozzi, G. Masciangelo, H. Pietronave, A. Pacini, C. Salto and M. Signorini, *Prev. Vet. Med.*, 2016, **131**, 95–102.
- 9 Y. Kang, K. Blanco, T. Davis, Y. Wang and G. DeGrandi-Hoffman, *Math. Biosci.*, 2016, **275**, 71–92.
- 10 A. Giacobino, A. Pacini, A. Molineri, N. B. Cagnolo, J. Merke, E. Orellano, E. Bertozzi, G. Masciangelo, H. Pietronave and M. Signorini, *Res. Vet. Sci.*, 2017, **112**, 1–6.
- 11 M. M. Hamiduzzaman, E. Guzman-Novoa, P. H. Goodwin, M. Reyes-Quitana, G. Koleoglu, A. Correa-Benitez and T. Petukhova, *J. Invertebr. Pathol.*, 2015, **126**, 12–20.
- 12 F. D. Rinkevich, R. G. Danka and K. B. Healy, *Insects*, 2017, **8**–9.
- 13 P. Rosenkranz, P. Aumeier and B. Ziegelmann, *J. Invertebr. Pathol.*, 2010, **103**, S96–S119.
- 14 A. J. McMenamin and E. Genersch, *Curr. Opin. Insect Sci.*, 2015, **8**, 121–129.
- 15 Regulation (EC) NO 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC., O.J.E. U.L., 2005, **70**, P.1.
- 16 Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in food stuffs of animal origin, O.J. E. U.L., 2010, **15**, P.1.
- 17 M. Juan-Borrás, E. Domenech and I. Escriche, *Food Control*, 2016, **67**, 127–134.
- 18 M. I. González-Martin, I. Revilla, A. M. Vivar-Quintana and E. V. Betances Salcedo, *Talanta*, 2017, **165**, 533–539.
- 19 M. J. Nozal, J. L. Bernal, J. J. Jiménez, M. J. González and M. Higes, *J. Chromatogr. A*, 2002, **954**, 207–215.
- 20 S. Bogdanov, A. Imdorf and V. Kilchenmann, *Apidologie*, 1998, **29**, 513–524.
- 21 N. Tonello, M. B. Moressi, S. N. Robledo, F. D'Eramo and J. M. Marioli, *Talanta*, 2016, **158**, 306–314.
- 22 A. C. Martel and S. Zeggane, *J. Chromatogr. A*, 2002, **954**, 173–180.
- 23 Ž. Barganska, M. Ślebioda and J. Namieśnik, *Food Control*, 2013, **31**, 196–201.
- 24 S. R. Rissato, M. S. Galhiane, M. V. deAlmeida, M. Gerenutti and B. M. Apon, *Food Chem.*, 2017, **101**, 1719–1726.
- 25 E. Korta, A. Bakkali, L. A. Berrueta, B. Gallo and F. Vicente, *J. Chromatogr. A*, 2001, **930**, 21–29.
- 26 E. Korta, A. Bakkali, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente and S. Bogdanov, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **475**, 97–103.
- 27 S. Adamczyk, R. Lázaro, C. Pérez-Arquillué and A. Herrera, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **581**, 95–101.
- 28 R. Rial-Otero, E. M. Gaspar, I. Moura and J. L. Capelo, *Talanta*, 2007, **71**, 1906–1914.
- 29 S. R. Rissato, M. S. Galhiane, F. R. N. Knoll, M. Gerenutti and B. M. Apon, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1048**, 153–159.
- 30 A. H. Shendy, M. A. Al-Ghobashy, M. N. Mohammed, S. A. Gad Alla and H. M. Lotfy, *J. Chromatogr. A*, 2016, **1427**, 142–160.
- 31 D. Gallart-Mateu, S. Rodriguez-Sojo and M. de la Guardia, *Anal. Methods*, 2016, **8**, 4576–4583.
- 32 J. Cai, P. X. Zhu and Q. Su, *Food Chem.*, 2006, **99**, 401–407.
- 33 Y.-Q. Li, D.-X. Kong and H. Wu, *Ind. Crops Prod.*, 2013, **41**, 269–278.
- 34 E. Alissandrakis, D. Daferera, P. A. Tarantilis, M. Polissiou and P. C. Harizanis, *Food Chem.*, 2003, **82**, 575–582.
- 35 J. I. Cacho and N. Campillo, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1399**, 18–24.
- 36 P. Viñas, M. J. Soler-Romera and M. Hernández-Córdoba, *Talanta*, 2006, **69**, 1063–1067.
- 37 S. Armenta, G. Quintás, S. Garrigues and M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **524**, 257–264.
- 38 M. Plonka, S. Walorczyk and M. M. Miszczyk, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2016, **85**, 67–80.
- 39 H. Karasali, H. Anagnostopoulos, H. Ekonomopoulou and A. Hourdakis, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2004, **84**, 55–63.
- 40 J. Siebers, A. Besinger-Riedel and C. Vinke, *J. Verbraucherschutz Lebensmittelsicherh.*, 2014, **9**, 137–144.
- 41 G. Balayanmis, H. Karasali and A. Ambrus, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2014, **93**, 775–780.
- 42 S. Armenta, S. Garrigues and M. de la Guardia, *Vib. Spectrosc.*, 2007, **44**, 273–278.
- 43 D. Gallart-Mateu, S. Armenta and M. de la Guardia, *Talanta*, 2014, **119**, 312–319.
- 44 S. Armenta, G. Quintás, S. Garrigues and M. de la Guardia, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 772–781.
- 45 G. Quintás, A. Morales-Noé, S. Garrigues and M. de la Guardia, *Vib. Spectrosc.*, 2003, **31**, 63–69.
- 46 R. M. Peña, J. Barciela, C. Herrero and S. Garcia-Martin, *Talanta*, 2005, **67**, 129–135.

- 47 R. J. Harris, *A Primer of Multivariate Statistics*, Academic Press, Orlando, FL, 2nd edn, 1985.
- 48 S. Armenta, M. de la Guardia and J. Namiésnik, Green Microextraction, in *Analytical Microextraction Techniques*, ed. R. L. M. Valcárcel and S. Cárdenas, Bentham Science, 2017.
- 49 A. Galuszka, P. Konieczka, Z. M. Migaszewski and J. Namiésnik, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2012, **37**, 61–72.
- 50 Z. Bouhsain, S. Garrigues and M. de la Guardia, *Analyst*, 1997, **122**, 441–445.



Essential oil counterfeit identification through middle infrared spectroscopy

K. Bounaas^a, N. Bouzidi^a, Y. Daghbouche^{a,*}, S. Garrigues^b, M. de la Guardia^b, M. El Hattab^a

^a Laboratory of Natural Products Chemistry and of Biomolecules, University of Blida 1, P.O. Box 270, Blida 09000, Algeria

^b Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Research building, 50 Dr. Moliner Street, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2017

Received in revised form 2 March 2018

Accepted 2 March 2018

Available online 3 March 2018

Keywords:

Essential oils

Authentication

Fourier transform infrared spectroscopy

Direct characterization

ABSTRACT

Infrared spectroscopy (FTIR) has been employed for a fast quality control of commercial essential oils from different plant species. 47 samples were obtained from Algerian and Spanish market and directly measured, without any previous treatment, by attenuated total reflectance Fourier transform Infrared spectroscopy (ATR-FTIR), in the wavenumber region between 4000 and 550 cm^{-1} . Pure essential oils were obtained by hydro- and steam-distillation extraction methods and their ATR spectra obtained. Results found evidenced the presence of solvents in some commercial formulations and permitted a rapid authentication of pure essential oils correctly extracted from those diluted. The proposed method offers a fast and environmentally friendly methodology which can be used as an alternative to the commonly employed chromatography methods to evidence the quality of commercial essential oils.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Essential oils are natural, volatile, complex mixtures of compounds with strong odor. These oily liquids, are produced by different aromatic plant as secondary metabolites from their buds, flowers, leaves, stems, twigs, seeds, fruits, roots, wood or bark, and are stored in secretory cells [1]. Essential oils are obtained from aromatic plants mainly localized in temperate countries like Mediterranean, where these plants represent a major category, and also in tropical countries [2,3].

Essential oils are extracted by several methods including, expression, enfleurage, solvent extraction, supercritical carbon dioxide extraction, microwave or ultrasound [4] assisted treatments being hydro- and steam-distillation the most frequently used procedures. Essential oil compositional analysis is mainly achieved by gas chromatography [5].

Essential oils are unstable and fragile complex mixtures of volatile compounds. Monoterpenes represent more than 80% of essential oil composition, together with sesquiterpenes and oxygenated derivatives of these two chemical groups [4]. There are more than 60 compounds, at different concentrations, in an extracted oil with one, two or three major components at high concentration [2]. So major compounds of citrus essential oils are Limonene with (79%) in *C. limon* L. (lemon) [6], (93%) in *C. reticulata* L. (mandarin) and (97%) in *C. sinensis* L. (orange) [7]. Carvone (54%) and limonene (46%) are the major compounds of the *C. carvi* L. (caraway) seeds essential oil [8] and for *C. longa* L. (Turmeric) rhizomes essential oil, ar-turmerone (13%), α -turmerone (43%)

and β -turmerone (16%) are the principal compounds [9]. Other components are present only at trace levels [5].

The chemical composition which determines the biological properties of essential oils, can be influenced by various factors mainly, the species, geographic location, the part of the plant collected and the system employed for oil extraction [10,11].

Essential oils have been largely used as food flavours and for their bactericide, fungicide and insecticide properties, and recently for therapeutics in human medicine; being reported, as an example, that *R. officinalis* (rosemary) and *M. piperita* (pepper mint) have a positive effect on the human memory [12].

The interest in essential oils and their compounds is increasing due to their high acceptance by consumers [13]. An estimated number of 3000 essential oils are known, 300 of which are commercially important especially for the pharmaceutical, agronomy, food, sanitary, cosmetic and perfume industries [2,5]. The market of essential oils is rapidly expanding and generates several billions of dollars every year, and unfortunately has resulted in adulteration for dishonest profits [14,15].

Different factors can cause an essential oil adulteration due to the use of diluted solutions of natural oils or the addition of cheaper synthetic material and cheap volatile compounds from other natural products. These adulteration methods can degrade the quality of the oil and provide deleterious effects on its consumers. So the authentication of essential oils is an important subject for consumer protection and also for the quality control of their production [15].

Several techniques have been used for the determination of adulteration of essential oils, including physical, chemical, chromatography and spectroscopy techniques [16]. The quality of the essential oil can be

* Corresponding author.

E-mail address: ydaghbouche@yahoo.fr (Y. Daghbouche).

Table 1
Plant essential oils evaluated in this study together with their main components (in % w/w) as reported in the literature.

Family	Plant species	Common name	Main components	Ref.
Apiaceae	<i>Pimpinella anisum</i> L.	Anise	<i>trans</i> Anethole (88.49%), γ himachalene (3.13%)	[20]
			<i>trans</i> Anethole (81.33%), γ himachalene (12.32%)	[21]
	<i>Apium graveolens</i> L.	Celery	Limonene (63.90%), β selinene (16.40%)	[22]
			β Selinene (37.40%), phellandral (17.20%), limonene (16.00%)	[23]
	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Fennel	<i>trans</i> Anethole (59.970%, 63.23%), fenchone (21.42%, 25.04%), estragole (3.76%, 4.75%), limonene (2.68%, 2.99%).	[24]
			<i>trans</i> Anethole (81.60%, 79.0%), fenchone (8.70%, 10.90%), estragole (4.00%, 4.20%), limonene (3.50%, 3.2%).	[25]
			<i>trans</i> Anethole (72.86%), fenchone (12.93%), estragole (3.41%), limonene (6.37%).	[26]
Asteraceae	<i>Carum carvi</i> L.	Caraway	Carvone (76.37%), limonene (19.52%)	[13]
			Carvone (77.35%), limonene (16.15%)	[8]
			Carvone (61.58%), limonene (29.11%)	[27]
	<i>Cuminum cyminum</i> L.	Cumin	Carvone (53.60%), limonene (45.59%)	[28]
			γ Terpinene (24.30%), cumin aldehyde (21.07%), <i>p</i> cymene (16.56%), β pinene (13.74%), safranal (12.95%)	[27]
			γ Terpinene (12.62%), cumin aldehyde (38.50%), <i>o</i> cymene (10.98%), β pinene (11.50%)	[28]
Asteraceae	<i>Artemisia herba-alba</i>	White wormwood	γ Terpinene (16.30%), cumin aldehyde (32.80%), <i>o</i> cymene (9.74%), β pinene (10.30%)	[2]
			α and β Thujone (57.00%), camphre (24.00%)	[29]
			β Thujone (25.10%), α thujone (22.90%), 1,8 cineole (20.10%), camphre (10.50%)	[30]
			1,8 Cineole (25.80%), <i>p</i> cymene (15.50%), α pinene (11.30%)	[30]
Geraniaceae	<i>Matricaria chamomilla</i> L.	Chamomile	1,8 Cineole (41.10%), <i>p</i> cymene (12.70%), α pinene (8.20%)	[31]
			1,8 Cineole (8.6%), <i>p</i> cymene (19.9%), α pinene (17.20%), myrcene (10.90%)	[31]
			Spathulenol (12.50%), (E) β farnesene (10.4%), α bisabolol oxide B (6.50%)	[32]
Cupressaceae	<i>Pelargonium graveolens</i>	Geranium	Spathulenol (7.300%), (E) β farnesene (6.00%), α bisabolol oxide B (11.40%)	[33]
	<i>Cupressus sempervirens</i>	Cypress	Spathulenol (6.70%), (E) β farnesene (6.00%), α bisabolol oxide B (20.00%), α bisabolol oxide A (11.90%)	[34]
Cupressaceae	<i>Juniperus communis</i> L.	Juniper	α -Bisabolol oxide A (48.22%), α bisabolol oxide B (23.31%), α bisabolol (12.10%).	[35]
			Citronellol (30.20%), citronellyl formate (9.30%), geraniol (7.60%), guai 6,9 diene (5.40%)	[36]
			β Citronellol (24.14%), citronellyl formate (11.75%), geraniol (16.45%), linalool (7.99%)	[37]
Lamiaceae	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lavender	α Pinene (48.10%), δ 3 carene (24.40%)	[25]
	<i>Mentha piperita</i>	Piper mint	Sabinene (14.80), terpinen 4 ol (11.40), α pinene (9.90%), δ 3 carene (4.20%)	[38]
Lamiaceae	<i>Mentha spicata</i> L.	Spear mint	Sabinene (48.40%), limonene (20.00%), α pinene (16.50%)	[39]
	<i>Mentha spicata</i> L.	Spear mint	α Pinene (80.00%), sabinene (02.00%), limonene (1.00%)	[40]
Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i>	Melissa	α Pinene (34.00%), sabinene (22.00%), limonene (5.00%)	[41]
			α Pinene (57.00%), limonene (12.00%), sabinene (3.00%)	[42]
			Sabinene (39.00%), α pinene (20.00%), limonene (5.00%)	[43]
			α Pinene (40.00%), sabinene (18.00%)	[44]
	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lavender	α Pinene (40.00%), sabinene (18.00%)	[45]
			1,8 Cineole (33.0%, 44.4%), camphor (23.10%, 25.10%), α bisabolol (14.10%, 6.50%)	[46]
	<i>Mentha piperita</i>	Piper mint	Linalool (25.31%), linalyl anthranilate (18.35%), lavandulyl acetate (11.14%)	[25]
			Menthol (26.53%), menthone (25.83%)	[39]
			Menthol (59%), menthone (19%)	[2]
			Carvone (65.40–46.70%), menthol (8.70–2.00%), menthone (6.90–1.50%), pulegone (7.90–1.40%)	[40]
Lamiaceae	<i>Mentha spicata</i> L.	Spear mint	Carvone (76.65%), limonene (9.57%)	[41]
	<i>Melissa officinalis</i>	Melissa	Citronellal (31.10%), citronellol (18.3%), E citral (11.20%), β caryophyllene (12.00%)	[42]
Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosemary	Citronellal (10.20%), Z citral (19.60%), β caryophyllene (13.20%)	[43]
			Citronellal (14.40%), geraniol acetate (10.20%), caryophyllene oxide (11.00%)	[44]
			<i>p</i> Mentha-1, 2, 3 triol (13.10%), <i>p</i> menth 3 en 8 ol (8.80%), pulegone (8.80%)	[45]
			1,8 Cineole (55.90%), camphor (10.58%), α -pinene (9.38%)	[46]
			Camphor (52.12%), 1,8 cineole (9.65%), camphene (7.55%), α -pinene (6.05%)	[25]
			α Pinene (28.20%, 21.9%), verbenone (11.60%, 12.70%), camphor (7.90%, 9.90%), 1,8 cineole (7.40%, 9.40%)	[25]
	<i>Salvia officinalis</i>	Sage	1,8 Cineole (33.27%), β thujone (18.40%), α thujone (13.45%)	[47]
			α Thujone (20.10%), camphor (16%), 1,8 cineole (7.00%), β thujone (5.00%)	[48]
			β Thujone (16.40%), α thujone (15.80%), 1,8 cineole (2.70%)	[49]
			Camphor (21.30%), α thujone (15.40%), 1,8 cineole (9.50%), β thujone (3.70%)	[49]
Lauraceae	<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	Camphor (23.80%, 37.30%), 1,8 cineole (13.70%, 17.90%)	[19]
			Thymol (40.97%), <i>p</i> cymene (13.11%), γ terpinene (10.96%), carvacrol (8.35%)	[49]
			Thymol (47%), <i>p</i> cymene (34%)	[50]
			<i>o</i> Thymol (38.71%), furan, tetrahydro 3 methyl (12.19%), <i>p</i> cymene (2.77%)	[10]
	<i>Laurus nobilis</i> L.	Laurel	1,8 Cineole (38.76%), α -terpinyl acetate (13.35%), α pinene (10.17%), linalool (10.03%)	[51]
			1,8 Cineole (24.55%), linalool (17.67%), eugenyl methyl ether (12.40%)	[52]
Myrtaceae	<i>Cinnamomum cassia</i>	Cinnamum	1,8 Cineole (34.62%), linalool (12.57%)	[53]
			1,8 Cineole (38.86%), linalool (9.45%), isovaleraldehyde (10.47%)	[54]
			<i>trans</i> Cinnamaldehyde (84.4%), cinnamyl acetate (2.50%)	[55]
			<i>trans</i> Cinnamaldehyde (79.6%), β caryophyllene (3.60%)	[56]
Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus	<i>trans</i> Cinnamaldehyde (30.36%), 3-methoxy-1,2-propanediol (29.30), <i>o</i> -methoxy-cinnamaldehyde (25.39%)	[57]
			1,8 Cineole (55.29%), spathulenol (7.44%), α -terpineol (5.46%)	[55]
			1,8 Cineole (63.81%), α pinene (16.06%)	[56]
Myrtaceae	<i>Myrtus communis</i> L.	Myrtle	Myrtenyl acetate (23.70–39.00%), 1,8 cineole (12.7–19.6%), α pinene (10.10–11.60%), linalool (7.00–15.80%)	[57]
			1,8 Cineole (29.60%), α pinene (24.71%), myrtenyl acetate (10.60%)	[3]
			1,8 Cineole (21.90%), α pinene (50.90%), linalool (2.70%)	[58]
			1,8 Cineole (13.30%), α pinene (33.60%), linalool (14.80%)	[58]
Pinaceae	<i>Syzygium aromaticum</i> L.	Clove	Eugenol (81.60, 79.00%), eugenol acetate (6.40%), caryophyllene (5.10%, 24.80%)	[25]
			Eugenol (57.17%), eugenol acetate (5.93%), caryophyllene (29.94%)	[59]
			Eugenol (63.64%), eugenol acetate (4.61%), caryophyllene (23.20%)	[59]
Pinaceae	<i>Pinus halepensis</i>	Aleppo pine	Eugenol (54.97%), eugenol acetate (2.45%), caryophyllene (31.46%)	[60]
			<i>z</i> β Caryophyllene (24.40–25.90%), α pinene (10.90–13.70%), myrcene (20.20–24.10%), <i>p</i> cymene (10.50–11.90%), caryophyllene oxide (10.50–12.50%)	[60]
			<i>z</i> β Caryophyllene (15.60–16.70%), α pinene (6.70–8.50%), myrcene (16.70–17.10%), <i>p</i> cymene (13.70–14.60%)	[60]

Table 1 (continued)

Family	Plant species	Common name	Main components	Ref.
Piperaceae	<i>Piper nigrum</i> L.	Black pepper	z β Caryophyllene (20.30–22.50%), α pinene (17.20–22.30%)	[61]
			Myrcene (10.50–13.90%) p cymene (8.70–11.20%)	
Anacardiaceae	<i>Pistacia lentiscus</i> L.	Mastic	E β Caryophyllene (10.90%), α pinene (16.80%), myrcene (25.20%), terpinolene (8.30%)	[62]
			D Limonene (12.20–20.10%), caryophyllene (8.60–25.80%), 3 carene (15.60–28.60%)	
Rutaceae	<i>Citrus limon</i> L.	Lemon	Limonene (14.95, 15.64%), β caryophyllene (18.64, 25.38%), 3 carene (8.56, 9.34%), sabinene (13.19, 13.63%)	[63]
			α Pinene (9.40–24.90%), limonene (9.00–17.80%)	
Rutaceae	<i>Citrus reticulata</i>	Mandarine	α Pinene (9.90%), limonene (8.50%), germacrene D (11.90%)	[64]
			Limonene (78.84%), ocimene (3.85%), valencene (3.34%)	
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	Orange	Limonene (53.90%), β pinene (13.10%), γ terpinene (12.20%)	[6]
			Limonene (80.20%), myrcene (6.70%), linalool (3.70%)	
Zingibéraceae	<i>Curcuma longa</i> L.	Turmeric	Limonene (92.60%), α pinene (1.55%)	[7]
			Limonene (88.21%), α pinene (6.37%), citral (3.00%)	
			Limonene (96.00–97.30%), α pinene (1.45–1.82%), ar Turmerone (11.81%), zingiberene (8.62%)	
			ar Turmerone (12.90%), α turmerone (42.60%), β turmerone (16.00%)	
			ar Turmerone (49.8%), α turmerone (9.1%), β turmerone (7.9%)	[67]
				[9]
				[68]

performed by simple techniques, as sensory analysis through the control of organoleptic properties or by measuring ester, acid or carbonyl index, the refraction index, density, optical rotation and freezing or boiling point, as a general test [15]. The powerful separation analytical techniques like gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC), thin layer chromatography (TLC) or high-performance thin layer chromatography (HPTLC) can be used to determine the presence of adulterants in essential oils [15,17].

On the other hand, infrared spectroscopy (MIR) is considered a rapid, reproducible, accurate and non-destructive methodology. The low cost of the available instrumentation made it an alternative to the use of mass spectrometry, chromatography, or nuclear magnetic resonance techniques for the authentication and quality analysis of a variety of agro-food and industrial products [18,19].

Due to the aforementioned reasons, the present study proposes the use of direct attenuated total reflection (ATR) MIR measurements as a direct methodology and simple approach suitable to be employed by small control laboratories for the detection of essential oils adulteration.

2. Experimental part

2.1. Materials

Different plant species selected in this study are representative from the most used by consumers and the most available in the Algerian and Spanish markets.

Essential oils from twenty nine plant species, which included stems, leaves, seeds, flowers, rhizomes, and citrus from twelve different families (Anacardiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Cupressaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae and Zingiberaceae) were evaluated in this study as it is indicate in Table 1. *P. anisum* L. (Anise), *A. graveolens* L. (Celery), *F. vulgare* Mill. (Fennel), *C. carvi* L. (Caraway), *C. cyminum* L. (Cumin), *C. cassia* (Cinnamum), *A. herba-alba* (White wormwood), *T. vulgaris* (Thyme), *M. officinalis* (Melissa), *S. aromaticum* L. (Clove), *P. nigrum* L. (Black pepper), and *C. longa* L. (Turmeric) plants were purchased from the local market (Blida, Algeria). The other plant species as *M. chamomilla* L. (Chamomile), *L. nobilis* L. (Laurel), *P. graveolens* (Geranium), *C. sempervirens* L. (Cypress), *J. communis* L. (Juniper), *L. angustifolia* Mill. (Lavender), *M. piperita* (Piper mint), *M. spicata* L. (Spear mint), *R. officinalis* (Rosemary), *S. officinalis* (Sage), *E. globules* (Eucalyptus), *M. communis* L. (Myrtle), *P. halepensis* (Aleppo pine), *P. lentiscus* L. (Mastic), *C. limon* (Lemon), *C. reticulata* (Mandarine), and *C. sinensis* (Orange), were collected from different places of Algeria.

Forty seven commercial essential oil samples of the twenty nine plant species studied were purchased from local market in (Blida, Algeria) and (Valencia, Spain).

Vegetable oil (sunflower oil) was purchased from a local market (Valencia, Spain) and vaseline oil was obtained from PanReac (Barcelona, Spain).

2.2. Pure essential oils extraction

Two different extraction methods were used in this work to experimentally isolate pure essential oils, due to the type of plant and some experimental and technical reasons to select the most appropriate extraction method which included the difficulty to obtain a quantity of certain species of aromatic plants in the case of steam distillation and the low extraction yield for some plants for hydro-distillation.

P. anisum L., *A. graveolens* L., *F. vulgare* Mill., *C. carvi* L., *C. cyminum* L., *P. nigrum* L., *C. longa* L., *A. herba-alba*, *T. vulgaris*, *L. nobilis* L., *M. spicata* L., *M. officinalis*, and *M. chamomilla* L. plants were submitted to hydro-distillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus, except *S. aromaticum* L. and *C. cassia* oils which were isolated using conventional hydro-distillation. Samples of *P. graveolens* L., *E. globulus*, *C. sempervirens*, *J. communis* L., *L. angustifolia* Mill., *M. piperita*, *R. officinalis*, *S. officinalis*, *C. limon* L., *C. sinensis* L., *C. reticulata* L., *M. communis* L., *P. halepensis*, and *P. lentiscus* L., were extracted by industrial steam-distillation extraction in “Extral Bio” essential oil company (Blida, Algeria).

2.3. Essential oil characterization

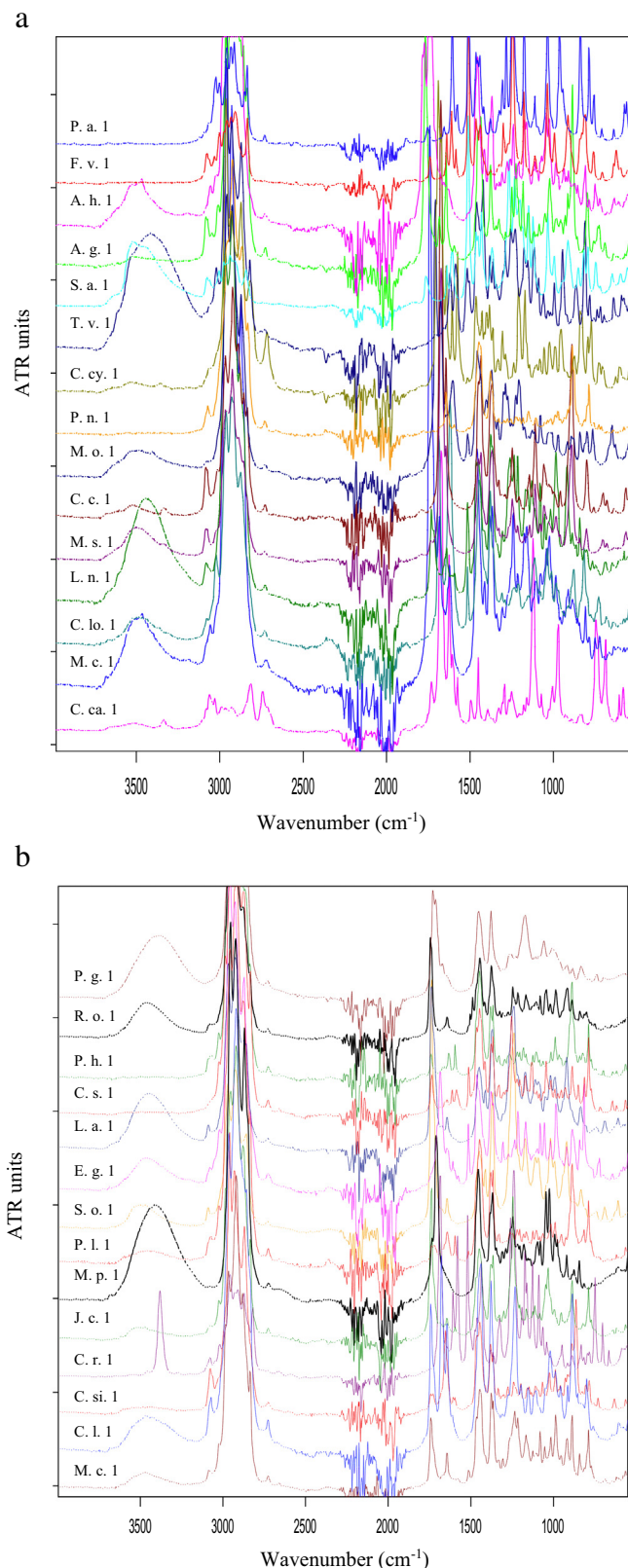
ATR-FTIR spectra of pure and commercial oil samples were acquired using a Bruker (Bremen, Germany) Tensor 27 FTIR spectrometer equipped with temperature-stabilized deuterated lanthanum triglycine sulphate detector and an ATR DuraSampleIR accessory with nine reflection diamond/ZnSe DuraDisc from Smiths Detection Inc. (Warrington, UK). The Opus software, version 6.5, from Bruker was employed for spectra acquisition.

Ten microliters of each sample were deposited in the ATR crystal cell and covered using a glass cover to avoid sample evaporation, and the ATR-FTIR spectra were obtained in the range between 4000 and 550 cm^{-1} , with a resolution of 4 cm^{-1} , averaging 50 scans per spectrum. Background spectrum of the empty ATR cell was obtained under the same instrumental conditions after cleaning the ATR crystal and before to acquire the spectrum of each sample.

3. Results and discussion

3.1. ATR-FTIR spectra of pure essential oils

Fig. 1A and B show the ATR-FTIR spectra of the pure extracted essential oils obtained by hydro- and steam-distillation, respectively. It can be



seen in these figures the presence of the characteristic vibration bands of the main components of each essential oil, which seem appropriate for their identification based on the presence of major and minor compounds. Some of these intense bands were associated to carbonyl group (C=O) present in esters aldehydes or ketones. It can be seen this functional group in *C. carvi* L. (caraway) and *C. cyminum* L. (cumin) essential oils at 1679 and 1741 cm^{-1} for carvone and cumin aldehyde as major compounds, respectively. Other important bands correspond to the aromatic ring vibrations at the wavenumber around 1500 cm^{-1} observed in *P. anisum* L. (anis), *T. vulgaris* (thyme), and *S. aromaticum* L. (clove) essential oil spectra. It can be also observed the absorbance of alkene functional group (C=C) around 1600 cm^{-1} . The absorptions around 3400 cm^{-1} are due to the vibrations of hydroxyl group (OH) which is present in some essential oil spectra such as *M. piperita* (Piper mint) and *T. vulgaris* (thyme). All spectra show intense bands in the region between 2935 and 2850 cm^{-1} which correspond to $-\text{CH}_2$ and $-\text{CH}_3$ groups.

3.2. ATR-FTIR spectra of commercial oils

Fig. 2A, B and C show the ATR-FTIR spectra of commercial samples of essential oils of the plant species selected for this study, obtained in the same conditions as pure water-assisted extracted ones. It can be observed similarities between most of the spectra corresponding to different plant species. These spectra were classified in three main types. One concerning those commercially samples which present the most intense bands for ATR-FTIR at 2854 and 2924 cm^{-1} corresponding to symmetric and antisymmetric C—H stretching alkane bands. A strong band was also observed at 1747 cm^{-1} corresponding to the carbonyl C=O stretching vibration. Strong band overlapping was observed in the region between 1335 and 970 cm^{-1} , with maximum absorbance at 1161 cm^{-1} . In this case it can be concluded that all these samples could have a common solvent and thus, the ATR-FTIR spectra of a sunflower oil was obtained in the aforementioned conditions (see inset in Fig. 2A). So, on comparing all the spectra collected in this figure it seems clear that these commercial samples are not at all pure extracts obtained through the use of water but solutions of essential oils in vegetable oil.

On the other hand, Fig. 2B shows a second spectra group of commercial essential oil samples which do not have the ester bands which were the common signals of spectra in Fig. 2A. In these cases, the most intense bands in this series were located at 2952, 2921 and 2852 cm^{-1} , associated to symmetric CH_3 , antisymmetric CH_2 and symmetric CH_2 stretching respectively. The band observed at 1460 cm^{-1} corresponds to the bending vibrations of CH_2 and CH_3 of aliphatic groups. Other bands appear at 1377 and 721 cm^{-1} related to CH_2 and CH_3 bending vibrations.

As can be seen in the inset of Fig. 2B the aforementioned bands could be attributed to the presence of an alkane as common solvent and thus, the vaseline spectrum could be the best candidate to support the fact that the commercial oils indicated in this figure are really solutions in vaseline of pure ones.

Regarding the spectra of samples *T. vulgaris* (Thyme), *P. graveolens* (geranium), *M. piperita* (piper mint), *E. globulus* (eucalyptus) summarized in Fig. 2C, the typical bands of sunflower oil nor vaseline are

Fig. 1. A: ATR-FTIR spectra of pure essential oils extracted by hydrodistillation: (P. a. 1) *P. anisum*; (F. v. 1) *F. vulgare*; (A. h. 1) *A. herba-alba*; (A. g. 1) *A. graveolens* L.; (S. a. 1) *S. aromaticum* L.; (T. v. 1) *T. vulgaris*; (C. cy. 1) *C. cyminum* L.; (P. n. 1) *P. nigrum* L.; (M. o. 1) *M. officinalis*; (C. c. 1) *C. carvi* L.; (M. s. 1) *M. spicata* L.; (L. n. 1) *L. nobilis* L.; (C. lo. 1) *C. longa*; (M. c. 1) *M. chamomilla* L.; and (C. ca. 1) *C. cassia*. Note: Spectra were shift on the Y axes to clear discriminate the different oils considered. B: ATR-FTIR spectra of pure essential oils extracted by steam distillation: (P. g. 1) *P. graveolens*; (R. o. 1) *R. officinalis*; (P. h. 1) *P. halepensis*; (C. s. 1) *C. sempervirens*; (M. p. 1) *M. piperita*; (L. a. 1) *L. angustifolia*; (E. g. 1) *E. globulus*; (S. o. 1) *S. officinalis*; (P. l. 1) *P. lentiscus* L.; (J. c. 1) *J. communis* L.; (C. r. 1) *C. reticulata* L.; (C. si. 1) *C. sinensis* L.; (C. l. 1) *C. limon* L.; (M. c. 1) *M. communis* L. Note: Spectra were shift on the Y axes to clear discriminate the different oils considered.

present and it can be seen that thyme and piper mint commercial oil spectra are close similar to those reported for the same plants pure oils extracted by hydro-distillation (see Fig. 1A) and also it can be appreciated that spectra of commercial samples of geranium and eucalyptus present some of the characteristic bands of the spectra reported for Fig. 1B for pure oils extracted by steam-distillation. So, it can be concluded that solvents are absent in the aforementioned commercial samples.

3.3. Evaluation of commercial oils based on the comparison of their IR spectra with those of pure essentials oils

Essential oils strongly depend on the nature and origin of specific plants used for their obtention and thus, in many cases, oils from different plant parts or geographical origin are not identical in their composition nor in their ATR-FTIR spectra. However, from the comparison of spectra reported in Fig. 1A and B with those indicated in Fig. 2A and B

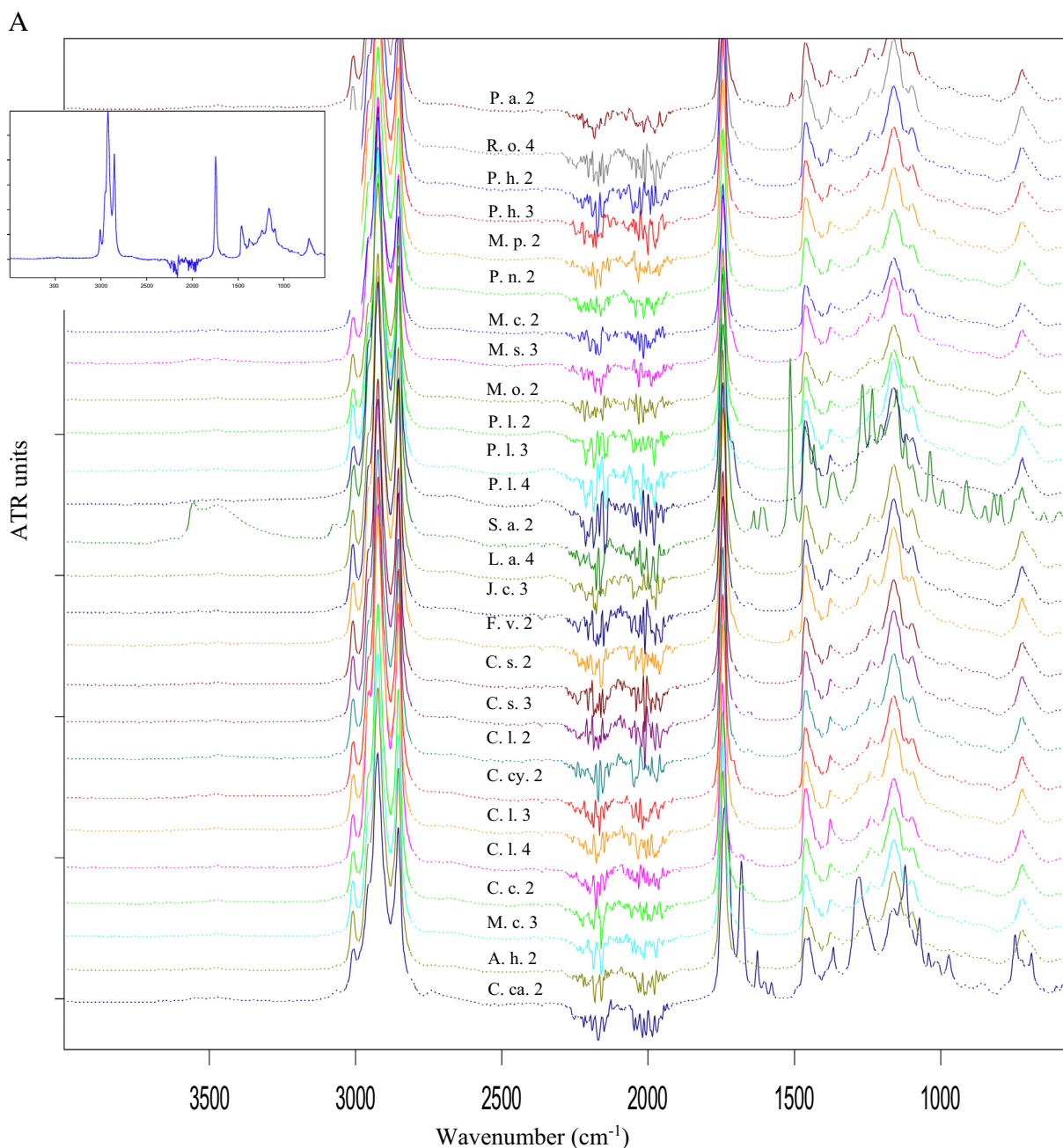


Fig. 2. A. ATR-FTIR spectra of different commercial essential oils with high similarities regarding the bands of fat oils: (P. a. 2) *P. anisum*; (R. o. 4) *R. officinalis*; (P. h. 2) *P. halepensis*; (P. h. 3) *P. halepensis*; (M. p. 2) *M. piperita*; (P. n. 2) *P. nigrum* L.; (M. c. 2) *M. communis* L.; (M. s. 3) *M. spicata* L.; (M. o. 2) *M. officinalis*; (P. l. 2) *P. lentiscus* L.; (P. l. 3) *P. lentiscus* L.; (P. l. 4) *P. lentiscus* L.; (S. a. 2) *S. aromaticum* L.; (L. a. 4) *L. angustifolia* Mill.; (F. v. 2) *F. vulgare*; (J. c. 3) *J. communis* L.; (C. s. 2) *C. sempervivens*; (C. s. 3) *C. sempervivens*; (C. l. 2), *C. longa*; (C. l. 3) *C. limon* L.; (C. l. 4) *C. limon* L.; (C. cy. 2) *C. cyminum* L.; (C. c. 2) *C. carvi* L.; (M. c. 3) *M. chamomilla* L.; (A. h. 2) *A. herba-alba*; and (C. ca. 2) *C. cassia*. Inset: Spectrum of sunflower oil. Note: Spectra were shift on the Y axes to clear discriminate the different oils considered. B. ATR-FTIR spectra of different commercial essential oils with similarity regarding the presence of alkane bands: (M. c. 2) *M. chamomilla* L.; (A. g. 2) *A. graveolens* L.; (E. g. 2) *E. globulus*; (J. c. 2) *J. communis* L.; (L. n. 2) *L. nobilis*; (L. a. 2) *L. angustifolia* Mill.; (L. a. 3) *L. angustifolia* Mill.; (C. l. 2) *C. limon* L.; (C. r. 2) *C. reticulata* L.; (C. si. 2) *C. sinensis* L.; (R. o. 2) *R. officinalis*; (R. o. 3) *R. officinalis*; (S. o. 2) *S. officinalis*; (S. o. 3) *S. officinalis*; (T. v. 2) *T. vulgaris*; and (T. v. 3) *T. vulgaris*. Inset: spectrum of pure Vaseline. Note: Spectra were shift on the Y axes to clear discriminate the different oils considered. C. ATR-FTIR spectra of commercial essential oils without previously indicated bands of those of Fig. 2A and B: (T. v. 4) *T. vulgaris*; (P. g. 2) *P. graveolens*; (M. p. 3) *M. piperita*; and (E. g. 3) *E. globulus*. Note: Spectra were shift on the Y axes to clear discriminate the different oils considered.

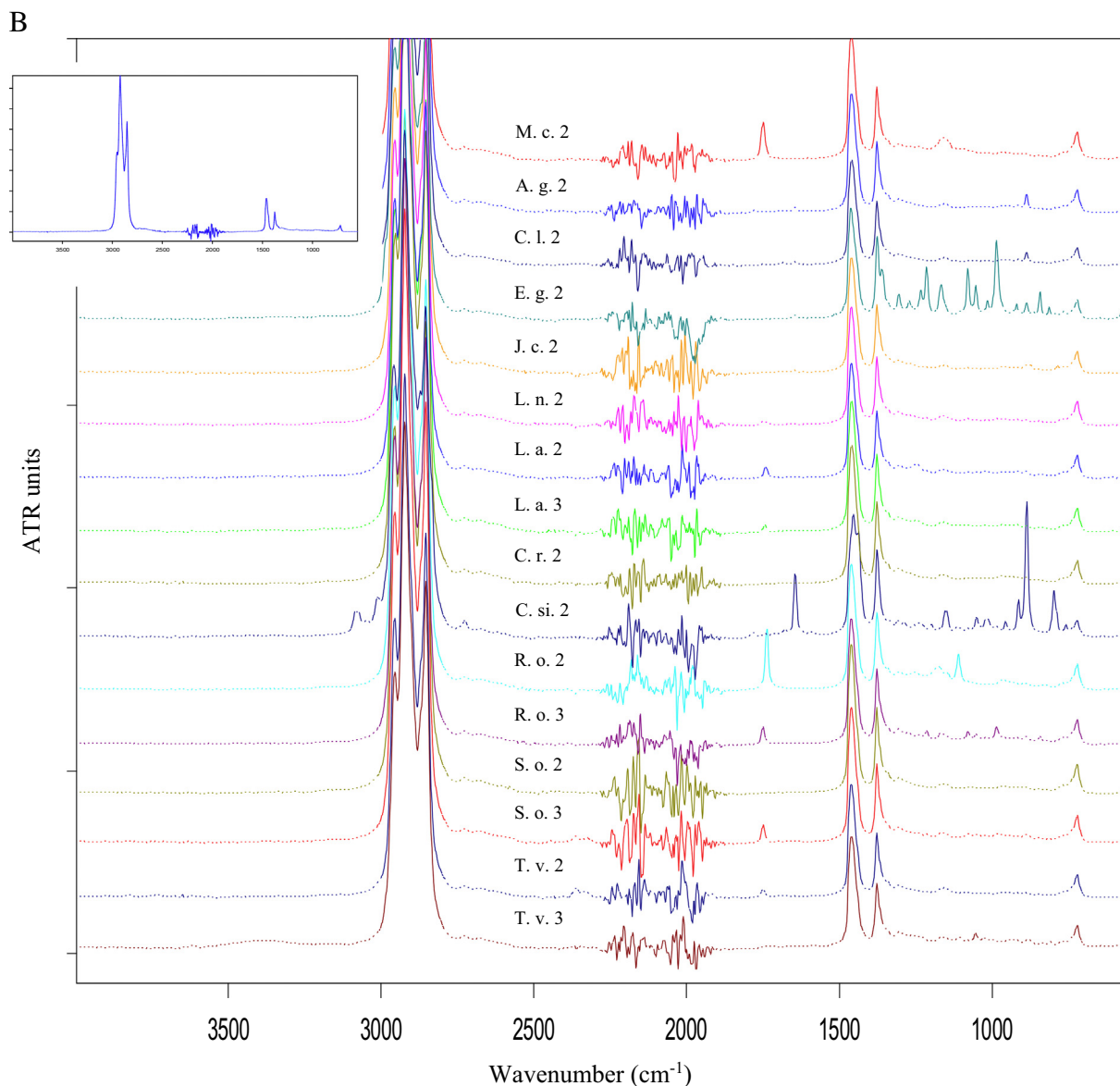


Fig. 2 (continued).

it can be identified the presence of vegetable and mineral oils, respectively, as a part of the samples thus indicating fake in their commercialization.

3.4. Identification of solvents in commercial essential oils

As it has been reported in Section 3.2 vegetable oil or mineral oil bands were identified in the main part of ATR-FTIR spectra of commercial samples evaluated in this study. As an example Fig. 3 compares the four samples of lavender oil employed in this work and it can be observed that the three commercial samples were adulterated by the presence of vegetable or mineral oil and thus these samples correspond to highly diluted solutions of the pure oil or some of the main terpenes present in *L. angustifolia* Mill not being pure essential oil.

Similar conclusions could be done for samples with an important contribution of diluent oil bands (see Fig. 2A and B and compare with Fig. 1A and B).

Fig. 4 shows the ATR-FTIR spectra of *S. aromaticum* L. (clove) commercial essential oil and that of sunflower oil, which could be suggested as the adulterant solvent in this sample.

On making the subtraction of the sunflower oil to that of sample *S. aromaticum* L it can be obtained the subtraction spectrum (see Fig. 4B) which is quite similar to that of pure extract obtained by hydro-distillation. It confirms that commercial sample studied really correspond to a dilution of the essential oil in a matrix similar to sunflower oil.

On comparing the ATR-FTIR spectra of pure essential oils and commercial samples, data summarized in Table 2 evidenced that practically all samples correspond to dilutions with vegetable oil, mineral oil or Vaseline. Only ATR-FTIR spectra of four commercial samples could be attributed to the presence of undiluted essential oil, thus evidencing that the commercialization of diluted essential oils, instead pure ones, is an extended practice in the field which must be noticed on the information regarding these products.

4. Conclusion

Results of the present study showed that ATR-FTIR spectroscopy can be successfully used for the rapid quality control of commercial essential oils without using neither sample preparation nor analyte separation,

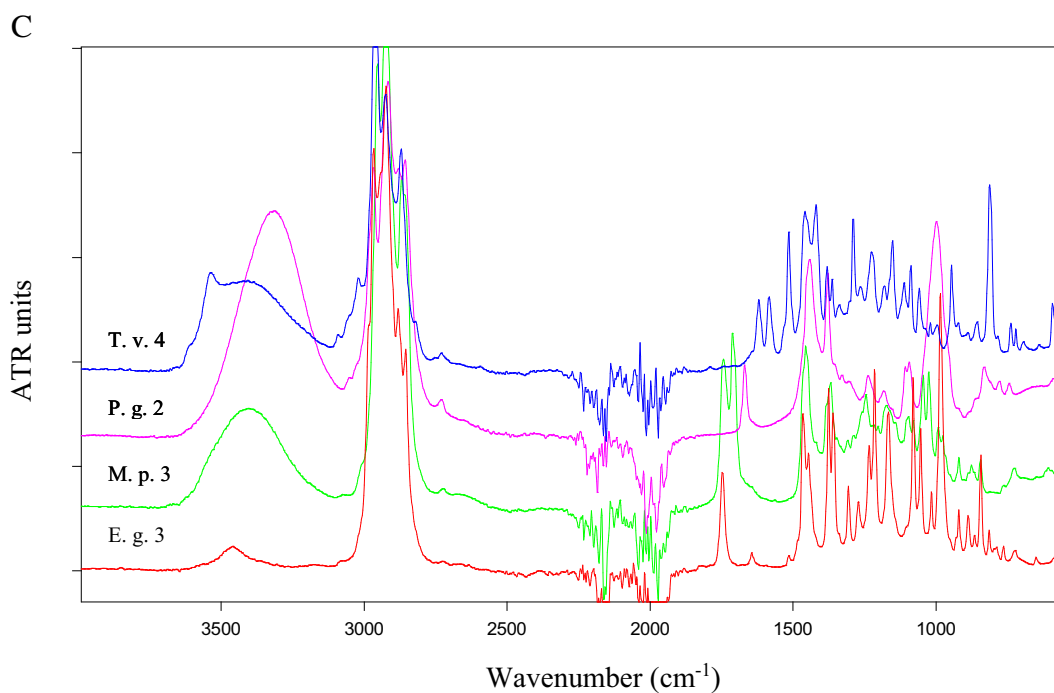


Fig. 2 (continued).

being evidenced that the use of vegetable and mineral oils for dilution of terpenes or pure extracts is an extended bad practice in this field.

The proposed method is fast, uses a relatively low cost instrumentation and provides an environmentally friendly methodology, offering an alternative to the procedures based on the use of chromatography.

Acknowledgments

Authors acknowledge the financial support of National Research Foundation (DGRSDT) and CNEPRU project N° E00420140054–Algéria,

the Generalitat Valenciana (Project PROMETEO II 2014/077) and Ministerio de Economía y Competitividad-Feder (Project CTQ 2014-52841-P).

References

- [1] B. Teixeira, A. Marques, C. Ramos, I. Batista, C. Serrano, O. Matos, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, J.A. Saraiva, M.L. Nunes, European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil, *Ind. Crop. Prod.* 36 (2012) 81–87.

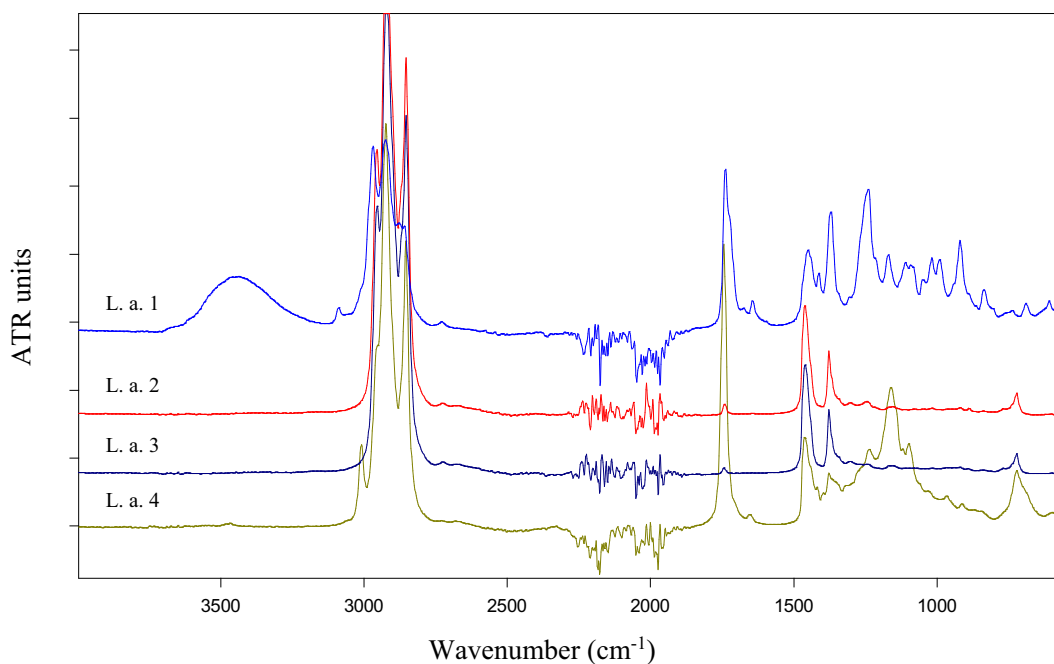


Fig. 3. ATR-FTIR spectra of *L. angustifolia* Mill., pure. (L. a. 1) and commercial essential oils (L. a. 2), (L. a. 3) and (L. a. 4). Note: Spectra were shift on the Y axes to clear discriminate the different oils considered.

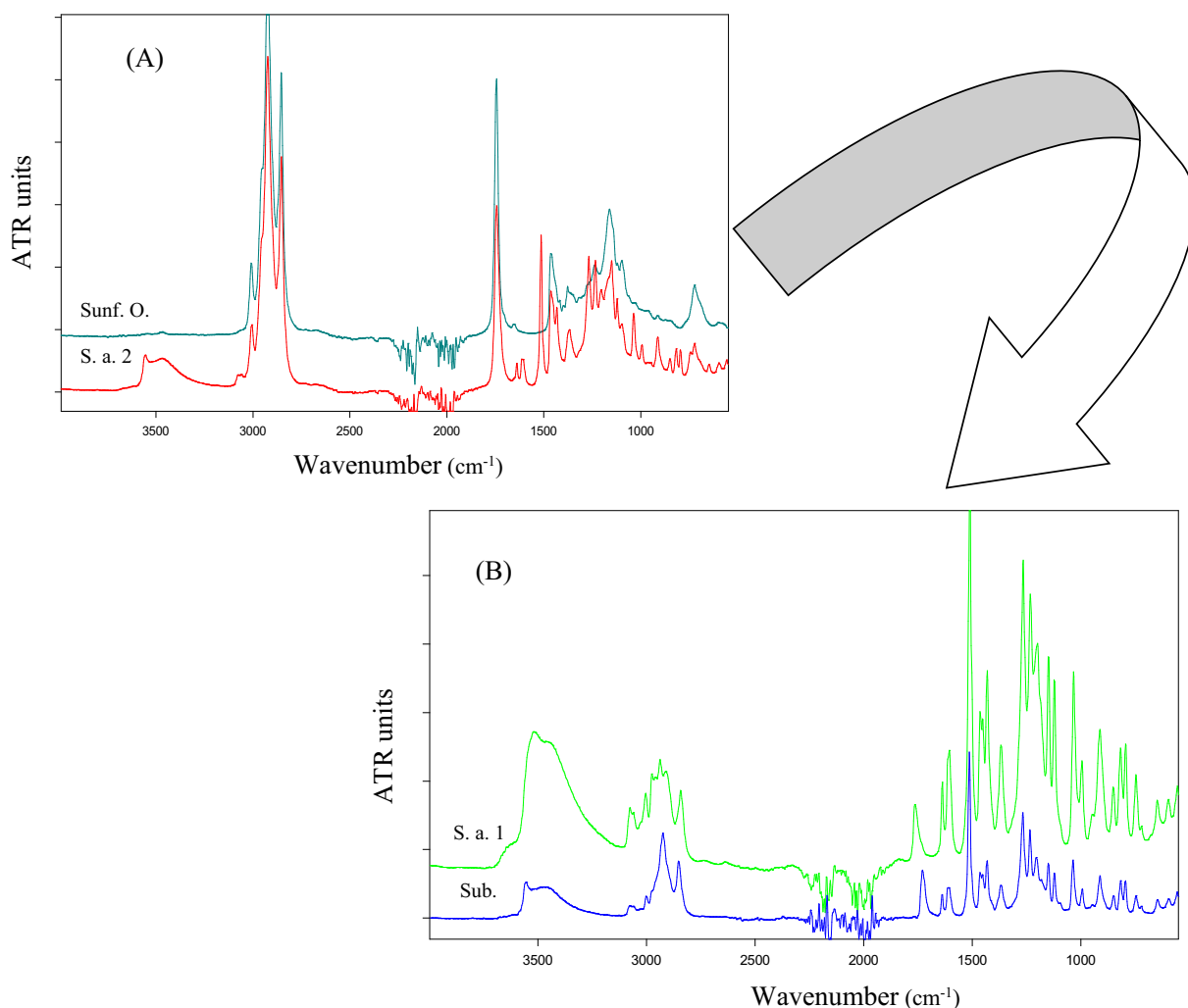


Fig. 4. ATR-FTIR spectra of (A), (Sunf. O.) Sunflower oil and (S. a. 2) *S. aromaticum* L. commercial essential oil.; (B), (S. a. 1) *S. aromaticum* L. pure essential oil and the difference obtained between (S. a. 2) commercial and sunflower oils (Sub.). Note: Spectra were shift on the Y axes to clear discriminate the different oils considered.

- [2] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils - a review, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446–475.
- [3] C.N. Hassiotis, D.M. Lazari, Decomposition process in the Mediterranean region. Chemical compounds and essential oil degradation from *Myrtus communis*, *Int. Biodeter. Biodegr.* 64 (2010) 356–362.
- [4] A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E.H. Ait Addi, H. Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F.N. Renaud, A. Elaissari, Essential oils: from extraction to encapsulation, *Int. J. Pharm.* 483 (2015) 220–243.
- [5] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *Int. J. Food Microbiol.* 94 (2004) 223–253.
- [6] K. Fisher, C. Phillips, Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends Food Sci. Technol.* 19 (2008) 156–164.
- [7] K. Hosni, N. Zahed, R. Chrif, I. Abid, W. Medfei, M. Kallel, N.B. Brahim, H. Sebei, Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: evidence for the genotypic influence, *Food Chem.* 123 (2010) 1098–1104.
- [8] K. Assami, D. Pingret, S. Chemat, B.Y. Meklati, F. Chemat, Ultrasound induced intensification and selective extraction of essential oil from *Carum carvi* L. seeds, *Chem. Eng. Process.* 62 (2012) 99–105.
- [9] G.B. Avanço, F.D. Ferreira, N.S. Bomfim, R.M. Peralta, T. Brugnari, C.A. Mallmann, B.A.D. Abreu Filho, J.M.G. Mikcha, M. Machinski Jr., *Curcuma longa* L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production, *Food Control* 73 (2017) 806–813.
- [10] A.K. Al-Asmari, M.T. Athar, A.A. Al-Faraidy, M.S. Almuhaiza, Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7 (2017) 147–150.
- [11] J.S. Raut, S.M. Karuppaiyil, A status review on the medicinal properties of essential oils, *Ind. Crop. Prod.* 62 (2014) 250–264.
- [12] O.V. Filiptsova, L.V. Gazzavi-Rogozina, I.A. Timoshyna, O.I. Naboka, Y.V. Dyomina, A.V. Ochkur, The essential oil of rosemary and its effect on the human image and numerical short-term memory, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 4 (2017) 107–111.
- [13] B. Laribi, K. Kouki, T. Bettaieb, A. Mougou, B. Marzouk, Essential oils and fatty acids composition of Tunisian, German and Egyptian caraway (*Carum carvi* L.) seed ecotypes: a comparative study, *Ind. Crop. Prod.* 41 (2013) 312–318.
- [14] Y. Fillatre, D. Rondeau, A. Daguin, P.Y. Communal, A workflow for multiclass determination of 256 pesticides in essential oils by liquid chromatography tandem mass spectrometry using evaporation and dilution approaches: application to lavender, lemon and cypress essential oils, *Talanta* 149 (2016) 178–186.
- [15] T.K.T. Do, F. Hadji-Minaglou, S. Antoniotti, X. Fernandez, Authenticity of essential oils, *TrAC Trends Anal. Chem.* 66 (2015) 146–157.
- [16] F. Pellati, G. Orlandini, K.A. van Leeuwen, G. Anesin, D. Bertelli, M. Paolini, S. Benvenuti, F. Camin, Gas chromatography combined with mass spectrometry, flame ionization detection and elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometry for characterizing and detecting the authenticity of commercial essential oils of *Rosa damascena* Mill, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 591–602.
- [17] K.V. Peter (Ed.), *Handbook of Herbs and Spices*, first ed. Cambridge, England, 2001.
- [18] S. Lohumi, S. Lee, H. Lee, B.-K. Cho, A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration, *Trends Food Sci. Technol.* 46 (2015) 85–98.
- [19] F.B. Santana, L.C. Gontijo, H. Mitsutake, S.J. Mazivila, L.M. Souza, W. Borges Neto, Non-destructive fraud detection in rosehip oil by MIR spectroscopy and chemometrics, *Food Chem.* 209 (2016) 228–233.
- [20] I. Samojlik, V. Mijatovic, S. Petkovic, B. Skrbic, B. Bozin, The influence of essential oil of aniseed (*Pimpinella anisum*, L.) on drug effects on the central nervous system, *Fitoterapia* 83 (2012) 1466–1473.
- [21] R. Pavela, Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*, *J. Asia Pac. Entomol.* 17 (2014) 287–293.
- [22] H.B. Sowbhagya, P. Srinivas, N. Krishnamurthy, Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds, *Food Chem.* 120 (2010) 230–234.
- [23] J.M. Alves-Silva, S.M. Dias dos Santos, M.E. Pintado, J.A. Pérez-Álvarez, J. Fernández-López, M. Viuda-Martos, Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal

Table 2
Classification of pure and commercial essential oil samples based on their ATR-FTIR spectra.

Plant species	Samples	Classification
<i>Pimpinella anisum</i>	P. a. 1	Pure
	P. a. 2	Vegetable oil solution
<i>Apium graveolens</i> L.	A. g. 1	Pure
	A. g. 2	Mineral oil solution
<i>Foeniculum vulgare</i>	F. v. 1	Pure
	F. v. 2	Vegetable oil solution
<i>Carum carvi</i> L.	C. c. 1	Pure
	C. c. 2	Vegetable oil solution
<i>Cuminum cyminum</i> L.	C. cy. 1	Pure
	C. cy. 2	Vegetable oil solution
<i>Artemisia herba-alba</i>	A. h. 1	Pure
	A. h. 2	Vegetable oil solution
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	M. c. 1	Pure
	M. c. 2	Mineral oil solution
<i>Pelargonium graveolens</i>	M. c. 3	Vegetable oil solution
	P. g. 1	Pure
<i>Cupressus sempervirens</i>	P. g. 2	Undiluted commercial oil
	C. s. 1	Pure
<i>Juniperus communis</i> L.	C. s. 2	Vegetable oil solution
	C. s. 3	Vegetable oil solution
	J. c. 1	Pure
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	J. c. 2	Vaseline oil solution
	J. c. 3	Vegetable oil solution
	L. a. 1	Pure
	L. a. 2	Mineral oil solution
<i>Mentha piperita</i>	L. a. 3	Vaseline oil solution
	L. a. 4	Vegetable oil solution
	M. p. 1	Pure
	M. p. 2	Vegetable oil solution
<i>Mentha spicata</i> L.	M. p. 3	Undiluted commercial oil
	M. s. 1	Pure
<i>Melissa officinalis</i>	M. s. 2	Mineral oil solution
	M. s. 3	Vegetable oil solution
	M. o. 1	Pure
<i>Rosmarinus officinalis</i>	M. o. 2	Vegetable oil solution
	R. o. 1	Pure
	R. o. 2	Mineral oil solution
	R. o. 3	Mineral oil solution
<i>Salvia officinalis</i>	R. o. 4	Vegetable oil solution
	S. o. 1	Pure
	S. o. 2	Mineral oil solution
	S. o. 3	Mineral oil solution
<i>Thymus vulgaris</i>	T. v. 1	Pure
	T. v. 2	Mineral oil solution
	T. v. 3	Mineral oil solution
	T. v. 4	Undiluted commercial oil
<i>Laurus nobilis</i> L.	L. n. 1	Pure
	L. n. 2	Mineral oil solution
<i>Cinnamomum cassia</i>	C. ca. 1	Pure
	C. ca. 2	Vegetable oil solution
<i>Eucalyptus globulus</i>	E. g. 1	Pure
	E. g. 2	Mineral oil solution
	E. g. 3	Undiluted commercial oil
<i>Myrtus communis</i> L.	M. c. 1	Pure
	M. c. 2	Vegetable oil solution
<i>Syzygium aromaticum</i> L.	S. a. 1	Pure
	S. a. 2	Vegetable oil solution
<i>Pinus halepensis</i>	P. h. 1	Pure
	P. h. 2	Vegetable oil solution
	P. h. 3	Vegetable oil solution
<i>Piper nigrum</i> L.	P. n. 1	Pure
	P. n. 2	Vegetable oil solution
<i>Pistacia lentiscus</i> L.	P. l. 1	Pure
	P. l. 2	Vegetable oil solution
	P. l. 3	Vegetable oil solution
	P. l. 4	Vegetable oil solution
<i>Citrus limon</i> L.	C. l. 1	Pure
	C. l. 2	Mineral oil solution
	C. l. 3	Vegetable oil solution
	C. l. 4	Vegetable oil solution
<i>Citrus reticulata</i> L.	C. r. 1	Pure
	C. r. 2	Mineral oil solution
<i>Citrus sinensis</i> L.	C. si. 1	Pure
	C. si. 2	Mineral oil solution
<i>Curcuma longa</i> L.	C. lo. 1	Pure
	C. lo. 2	Vegetable oil solution

- and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal, *Food Control* 32 (2013) 371–378.
- [24] R. Pavela, M. Zabka, J. Bednář, J. Trfiska, N. Vrchotová, New knowledge for yield, composition and insecticidal activity of essential oils obtained from the aerial parts or seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), *Ind. Crop. Prod.* 83 (2016) 275–282.
- [25] J. González-Rivera, C. Duce, D. Falconieri, C. Ferrari, L. Ghezzi, A. Piras, M.R. Tine, Co-axial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): chemical composition and thermal analysis, *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 33 (2016) 308–318.
- [26] S. Zoubiri, A. Baaliouamer, N. Seba, N. Chamouni, Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil, *Arab. J. Chem.* 7 (2014) 480–485.
- [27] M. Moghaddam, S.N.K. Miran, A.G. Pirbalouti, L. Mehdizadeh, Y. Ghaderi, Variation in essential oil composition and antioxidant activity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) fruits during stages of maturity, *Ind. Crop. Prod.* 70 (2015) 163–169.
- [28] M.S. Rihawy, E.H. Bakraji, A. Odeh, PIXE and GC-MS investigation for the determination of the chemical composition of Syrian *Cuminum cyminum* L, *Appl. Radiat. Isot.* 86 (2014) 118–125.
- [29] M.S. Abu-Darwish, C. Cabral, M.J. Goncalves, C. Cavaleiro, M.T. Cruz, T. Efferth, L. Salgueiro, Artemisia herba-alba essential oil from Buseirah (South Jordan): chemical characterization and assessment of safe antifungal and anti-inflammatory doses, *J. Ethnopharmacol.* 174 (2015) 153–160.
- [30] S. Salido, L.R. Valenzuela, J. Altarejos, M. Noguera, A. Sánchez, E. Cano, Composition and infraspecific variability of Artemisia herba-alba from southern Spain, *Biochem. Syst. Ecol.* 32 (2004) 265–277.
- [31] C. Formisano, S. Delfino, 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. Crop. Prod.* 63 (2015) 256–263.
- [32] M.H.H. Roby, M.A. Sarhan, K.A.H. Selim, K.I. Khalel, Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), *Ind. Crop. Prod.* 44 (2013) 437–445.
- [33] M.N. Boukhatem, A. Kameli, F. Saïdi, Essential oil of Algerian rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens*): chemical composition and antimicrobial activity against food spoilage pathogens, *Food Control* 34 (2013) 208–213.
- [34] M. Boukhris, M. Ben Nasri-Ayachi, I. Mezghani, M. Bouaziz, M. Boukhris, S. Sayadi, Trichomes morphology, structure and essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Hér. (Geraniaceae), *Ind. Crop. Prod.* 50 (2013) 604–610.
- [35] K. Hosni, I. Hassen, Y. M'Rabet, H. Casabianca, Biochemical response of *Cupressus sempervirens* to cement dust: Yields and chemical composition of its essential oil, *Arab. J. Chem.* (2014) <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.10.042> (ISSN 1878-5352).
- [36] A.L. Tapondjou, C. Adler, D.A. Fontem, H. Bouda, C. Reichmuth, Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val, *J. Stored Prod. Res.* 41 (2005) 91–102.
- [37] G. Vermin, C. Boniface, J. Metzger, C. Ghiglione, A. Hammoud, K. Suon, D. Fraisse, C. Parkanyi, GC-MS-specma bank analysis of *Juniperus communis* needles and berries, *Phytochemistry* 27 (1988) 1061–1106.
- [38] M.M.A. Rashed, Q. Tong, A. Nagi, J. Li, N.U. Khan, L. Chen, A. Rotail, A.M. Bakry, Isolation of essential oil from *Lavandula angustifolia* by using ultrasonic-microwave assisted method preceded by enzymolysis treatment, and assessment of its biological activities, *Ind. Crop. Prod.* 100 (2017) 236–245.
- [39] P. Kumar, S. Mishra, A. Malik, S. Satya, Efficacy of *Mentha × piperita* and *Mentha citrata* essential oils against housefly, *Musca domestica* L, *Ind. Crop. Prod.* 39 (2012) 106–112.
- [40] D. Zhao, Y.W. Xu, G.L. Yang, A.M. Husaini, W. Wu, Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq. and *Mentha spicata* L. from China, *Ind. Crop. Prod.* 42 (2013) 251–260.
- [41] R.S. Chauhan, M.K. Kaul, A.K. Shahi, A. Kumar, G. Ram, A. Tawa, Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession (IIM(J)26) from North-West Himalayan region, India, *Ind. Crop. Prod.* 29 (2009) 654–656.
- [42] S.-u. Rehman, R. Latief, K.A. Bhat, M.A. Khuroo, A.S. Shawl, S. Chandra, Comparative analysis of the aroma chemicals of *Melissa officinalis* using hydrodistillation and HS-SPME techniques, *Arab. J. Chem.* 10 (2017) S2485–S2490.
- [43] Z. Jalal, Y. El Atki, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, Phytochemistry of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Morocco: preventive approach against nosocomial infections, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5 (2015) 458–461.
- [44] Y. El Ouadi, M. Manssouri, A. Bouyanzer, L. Majidi, H. Bendaif, H. Elmsellem, M.A. Shariati, A. Melhaoui, B. Hammouti, Essential oil composition and antifungal activity of *Melissa officinalis* originating from north-Est Morocco, against postharvest phytopathogenic fungi in apples, *Microb. Pathog.* 107 (2017) 321–326.
- [45] 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. Crop. Prod.* 47 (2013) 291–299.
- [46] A. Zermene, O. Larkeche, A.H. Meniai, C. Crampon, E. Badens, Optimization of Algerian rosemary essential oil extraction yield by supercritical CO₂ using response surface methodology, *C. R. Chim.* 19 (2016) 538–543.
- [47] A. Hayouni el, I. Chraïef, M. Abedrabba, M. Bouix, J.Y. Leveau, H. Mohammed, M. Hamdi, Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat, *Int. J. Food Microbiol.* 125 (2008) 242–251.
- [48] A. Russo, C. Formisano, D. Rigano, F. Senatore, S. Delfino, V. Cardile, S. Rosselli, M. Bruno, Chemical composition and anticancer activity of essential oils of

- Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions, *Food Chem. Toxicol.* 55 (2013) 42–47.
- [49] A. Ghasemi Pirbalouti, M. Hashemi, F.T. Ghahfarokhi, Essential oil and chemical compositions of wild and cultivated *Thymus daenensis* Celak and *Thymus vulgaris* L., *Ind. Crop. Prod.* 48 (2013) 43–48.
- [50] C.F. Bagamboula, M. Uyttendaele, J. Debevere, Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*, *Food Microbiol.* 21 (2004) 33–42.
- [51] A. Boulila, I. Hassen, L. Haouari, F. Mejri, I.B. Amor, H. Casabianca, K. Hosni, Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.), *Ind. Crop. Prod.* 74 (2015) 485–493.
- [52] J. Mediouni Ben, N. Tersim Jemâa, K.T. Toudert, M.L. Khouja, Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition, *J. Stored Prod. Res.* 48 (2012) 97–104.
- [53] N. Jeyaratnam, A.H. Nour, R. Kanthasamy, A.H. Nour, A.R. Yuvaraj, J.O. Akindoyo, Essential oil from *Cinnamomum cassia* bark through hydrodistillation and advanced microwave assisted hydrodistillation, *Ind. Crop. Prod.* 92 (2016) 57–66.
- [54] R. Wang, R. Wang, B. Yang, Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions, *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 10 (2009) 289–292.
- [55] L. Harkat-Madouri, B. Asma, K. Madani, Z. Bey-Ould Si, P. Rigou Said, D. Grenier, H. Allalou, H. Remini, A. Adjaoud, L. Boulekbache-Makhlouf, Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria, *Ind. Crop. Prod.* 78 (2015) 148–153.
- [56] Â. Luís, A. Duarte, J. Gominho, F. Domingues, A.P. Duarte, Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils, *Ind. Crop. Prod.* 79 (2016) 274–282.
- [57] C. Gardeli, P. Vassiliki, M. Athanasios, T. Kibouris, M. Komaitis, Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts, *Food Chem.* 107 (2008) 1120–1130.
- [58] A. Bouzabata, C. Cabral, M.J. Goncalves, M.T. Cruz, A. Bighelli, C. Cavaleiro, J. Casanova, F. Tomi, L. Salgueiro, *Myrtus communis* L. as source of a bioactive and safe essential oil, *Food Chem. Toxicol.* 75 (2015) 166–172.
- [59] M.A. Hossain, S.R.A.L. Harbi, A.M. Welî, Q. Al-Riyami, J.N. Al-Sabahi, Comparison of chemical constituents and antimicrobial activities of three essential oils from three different brands' clove samples collected from Gulf region, *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4 (2014) 262–268.
- [60] Z. Djerrad, L. Kadik, A. Djouahri, Chemical variability and antioxidant activities among *Pinus halepensis* Mill. essential oils provenances, depending on geographic variation and environmental conditions, *Ind. Crop. Prod.* 74 (2015) 440–449.
- [61] N. Fekih, H. Allali, S. Merghache, F. Chaib, D. Merghache, M. El Amine, N. Djabou, A. Muselli, B. Tabti, J. Costa, Chemical composition and antibacterial activity of *Pinus halepensis* Miller growing in West Northern of Algeria, *Asian Pac. J. of Trop. Dis.* 4 (2014) 97–103.
- [62] H.H. Jelen, A. Gracka, Analysis of black pepper volatiles by solid phase microextraction-gas chromatography: a comparison of terpenes profiles with hydrodistillation, *J. Chromatogr. A* 1418 (2015) 200–209.
- [63] H. Bagheri, M.Y. Abdul Manap, Z. Solati, Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation, *Talanta* 121 (2014) 220–228.
- [64] O. Aissi, M. Boussaid, C. Messaoud, Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities, *Ind. Crop. Prod.* 91 (2016) 56–65.
- [65] D.L.R. Simas, S.H.B.M. de Amorim, F.R.V. Goulart, C.S. Alviano, D.S. Alviano, A.J.R. da Silva, Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit, *Ind. Crop. Prod.* 98 (2017) 108–115.
- [66] H.A. Fouad, C.A.G. da Camara, Chemical composition and bioactivity of peel oils from *Citrus aurantiifolia* and *Citrus reticulata* and enantiomers of their major constituent against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), *J. Stored Prod. Res.* 73 (2017) 30–36.
- [67] L. Zhang, Z. Yang, J. Wei, P. Su, D. Chen, W. Pan, W. Zhou, K. Zhang, X. Zheng, L. Lin, J. Tang, Z. Du, Contrastive analysis of chemical composition of essential oil from twelve *Curcuma* species distributed in China, *Ind. Crop. Prod.* 108 (2017) 17–25.
- [68] G.R. Angel, N. Menon, B. Vimala, B. Nambisan, Essential oil composition of eight starchy *Curcuma* species, *Ind. Crop. Prod.* 60 (2014) 233–238.