



## Application Note/Nota de Aplicación

# Determinación de aceite esencial de lavandina y geraniol en un collar antiparásitos, mediante la técnica de extracción sucesivas en espacio en cabeza, acoplado a cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas (MHE-HS-GC/MS).

Luis Bartolomé\*

<sup>10</sup> \*Servicio Central de Analisis de Bizkaia (SCAB). Servicios Generales de Investigación (SGIker), UPV/EHU.

### ABSTRACT

<sup>15</sup> The determination of volatile organic compounds was always an analytical challenge. The classic extraction methodologies and subsequent treatments of the extracts (clean-up, evaporation under nitrogen stream, solvent changes) cause poor recoveries and high uncertainty. In this study a quantification method for two volatile essential oils present in a pet collar was carried out by means of multiple headspace extraction coupled to gas chromatography mass spectrometry. The method used was a fast, easy and automated alternative with good accuracy and precision for the proposed objectives.

<sup>20</sup>

### RESUMEN

<sup>25</sup> La determinación de compuestos volátiles en matrices sólidas ha sido siempre un reto. Los métodos de extracción clásicos sólido-líquido y los tratamientos posteriores de los extractos (limpiezas, evaporación bajo corriente de nitrógeno, cambios de disolvente) provocan recuperaciones insuficientes e incertidumbres altas. En este estudio se ha puesto a punto un método para la cuantificación de dos aceites esenciales volátiles en un collar antiparásitos para animales de compañía, mediante la técnica de extracción sucesiva en espacio de cabeza y posterior análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El método desarrollado ha demostrado ser una alternativa rápida, sencilla, completamente automatizada y con resultados de exactitud y precisión óptimos para los objetivos propuestos.

<sup>30</sup>

## 1. INTRODUCCIÓN

En el mercado cada vez es más recurrente encontrar diferentes artículos para el cuidado de mascotas. No hay que olvidar que los datos indican que solo en España existen registradas más de 15 millones de mascotas en el año 2019 según registros veterinarios. Además, estos datos apuntan que son las grandes ciudades donde más mascotas se concentran. Uno de los problemas más habituales de las mascotas es su infestación por insectos y plagas de piojos, garrapatas o pulgas. No hay que olvidar que este tipo de plagas pueden ser peligrosas, no sólo para las mascotas, sino también para los humanos como posibles transmisores de enfermedades. Por esa razón muchos de los productos comerciales para el cuidado de mascotas son

repelentes o productos antiparásitos.

Existe una gran variedad de este tipo de productos tanto en su disposición (geles, champús, collares) como en su composición (pesticidas, insecticidas o aceites esenciales). Los collares antiparásitos con aceites esenciales se han instalado en el mercado como uno de los accesorios más útiles debido a que su efecto es prolongado en el tiempo, no requiere de la atención del dueño y, además, su composición es completamente natural e inocua tanto para las mascotas como para sus dueños. Algunos de los aceites esenciales más habituales en los collares es el aceite esencial de lavandina y el geraniol.

<sup>60</sup> El aceite esencial de lavandina se obtiene por destilación al vapor de una planta aromática (lavandula híbrida) y es un excelente agente antimicrobiano y

repelente de insectos. Se consideran una alternativa a los pesticidas químicos sintéticos convencionales, debido a su riesgo para la salud reducido y su biodegradabilidad [1]. Estos aceites esenciales muestran acciones insecticidas de control contra una serie de plagas de insectos, ácaros y hongos vegetales patógenos, que ocasionan pérdidas económicamente importantes [1,2].

Los componentes principales, en porcentaje en peso del aceite de lavandina son linalol (33%), acetato de linalilo (29%), alcanfor (7,1%), 1,8-cineol (7,6%) y terpinen-4-ol (3,3%) [3]. Entre estos componentes, se han encontrado también varios monoterpenos (terpineol, terpinen-4-ol y pinene) [4], linalool [5] y 1-8-cineol [6]. La presencia de estos últimos aumenta sus propiedades antiparásitas. Estos aceites esenciales se deben incorporar en la cantidad adecuada en los dispositivos sólidos. Una cantidad insuficiente provocaría que los aceites no tuvieran efecto antiparasitario y una cantidad muy alta puede tener efectos tóxicos además de una pérdida económica importante ya que estos aceites son bastante caros.

Saber la cantidad que se libera del dispositivo no es tan sencillo. Normalmente los procesos de inclusión de estos aceites en el material sólido (polímeros, cápsulas..) conlleva un proceso térmico que provoca que parte de los componentes iniciales mezclados no sean los que se incluyen finalmente en el dispositivo. Esta razón exige a las empresas realizar analíticas directamente a los productos para saber cuánta cantidad efectiva de aceite esencial ha sido incluido en el dispositivo.

La extracción y el análisis cuantitativo de estos compuestos volátiles y semivolátiles en matrices sólidas o complejas es un desafío analítico. Diferentes técnicas de extracción sólido-líquido son utilizadas, tales como extracción de soxhlet, extracción asistida por microondas (MAE), extracción con fluidos supercríticos (SFE) y técnicas de extracción mediante ultrasonidos.. Sin embargo, estas técnicas son caras, requieren mucho tiempo y trabajo y/o el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos, algunos de ellos clorados. A esto, hay que añadir que también es difícil realizar una extracción sólido-líquido con alta recuperación en el caso de sustancias volátiles.

Si se utilizan técnicas de extracción en espacio de cabeza, la partición de los compuestos se reduce debido principalmente a la interacción con la matriz [7]. Debido fundamentalmente a este problema, las técnicas de calibración interna y externa rara vez producen resultados aceptables debido a los efectos de la matriz, que provocan modificaciones en las constantes de reparto. En 1977 Kolb y Pospisil presentó una técnica llamada extracción discontinua de gas. El método se renombró más tarde como extracción de espacio

superior múltiple (MHE) [8]. El método elimina los efectos de la matriz y permite por lo tanto, la determinación cuantitativa directa de analitos en matrices sólidas por técnicas de espacio de cabeza.

El método calcula teóricamente la cantidad total de analito presente en la matriz sólida a partir de unas pocas extracciones sucesivas. La teoría de este método fue presentada hace 40 años por Kolb y Pospisil [8].

Cuando una porción se elimina del espacio en cabeza en la primera extracción, el equilibrio es perturbado. A medida que se permite reequilibrar la muestra, el analito vuelve a retomar el equilibrio y migra del sólido al espacio de cabeza. En ese momento, las concentraciones en las dos fases serán más pequeñas que durante la primera extracción, pero la relación entre la concentración de analito en las dos fases será la misma.

La segunda extracción y análisis, la señal será más pequeña (Figura 1). Si se lleva a cabo hasta el infinito, las diferentes áreas de pico pueden sumarse para obtener el área de señal total, que corresponde a la cantidad total del analito en la muestra. La influencia de la muestra la matriz se elimina así mediante la extracción exhaustiva.

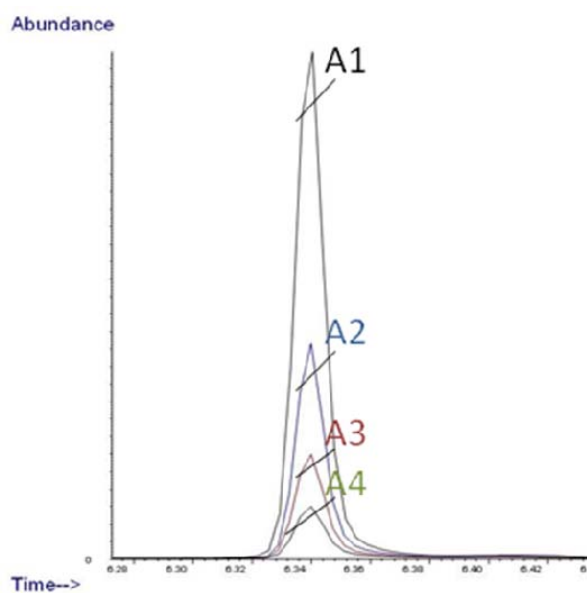


Figura 1. Superposición de áreas (A) en una extracción sucesiva.

Como el procedimiento MHE sigue una función logarítmica, no es necesario realizar extracciones hasta eliminar totalmente el analito de la matriz de muestras. Los logaritmos de las distintas áreas de los análisis consecutivos se representan frente a los números de análisis en una escala lineal y el valor del área total es obtenido por medio del cálculo de la regresión de las áreas obtenidas solo en unos pocos pasos de extracción [9].

La cantidad total de un analito volátil en una muestra puede ser calculado resumiendo todas las áreas de pico

individuales ( $A_i$ ), donde  $i$  es el número de la extracción.

$$A_T = \sum A_i = A_1 / (1 - e^{-q}) \quad (\text{Ec. 1})$$

La suma de todas las áreas de señal puede, calcularse a partir de dos valores: el área de la señal obtenida en la primera extracción,  $A_1$  y el exponente  $q$ , que describe la disminución exponencial de la áreas de señal durante el procedimiento de MHE.  $A_1$  es un valor concreto medido y el exponente  $q$  se obtiene de la lineal análisis de regresión:

$$\ln A_i = -q(i - 1) + \ln A_1 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde el valor  $q$  es igual a la pendiente de la regresión y  $\ln A_1$  viene dada por la intersección en  $y$ .

Por lo tanto, en este estudio se pretende cuantificar la cantidad de lavandina y geraniol incluidos en un dispositivo antiparásitos para mascotas, mediante un análisis directo del collar mediante la técnica MHE-GC/MS.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Muestreo.

Los collares se recibieron en bolsas envasadas al vacío (figura 2). Para realizar un análisis lo más homogéneo posible se tomaron con un escalpelo 5-10 muestras del collar en distintas partes. Con un peso total entre 1 y 10 mg La suma total de toda la muestra siempre superó los 10 mg y nunca estuvo por encima de los 20 mg. En algunas pruebas de repetitividad se probaron a analizar trozos individuales con el peso total seleccionado (10-20 mg). Todas las muestras se introdujeron en un vial de extracción de 20 mL. Los collares se conservaron en bolsas envasadas al vacío en refrigeración.



Figura 2. Imagen de la recepción de uno de los collares analizados.

### 2.2. Caracterización de los aceites esenciales.

En primer lugar, se caracterizaron los estándares de lavandina y de geraniol, que fueron usados en la preparación del collar antiparásito, mediante la técnica de cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas (GC/MS).

Como se ha comentado previamente, estos aceites esenciales son mezclas complejas de muchos compuestos volátiles y semivolátiles. La cuantificación por separado de cada uno de los componentes para obtener posteriormente la suma total, es un proceso muy complejo y costoso. Otra forma de cuantificación es la elección de los compuestos más característicos de los aceites esenciales como patrones, y hacer la cuantificación del aceite esencial sólo a partir de estos compuestos característicos pero a partir del aceite esencial correspondiente. Es una cuantificación similar a la que se lleva a cabo para hidrocarburos lineales en muestras complejas de combustibles y aceites [10].

Para ello se realizaron dos disoluciones de 1000 ppm de concentración, una de cada uno de los aceites esenciales por separado en metanol y otra disolución multicomponente. En la siguiente tabla se recogen las condiciones de análisis para la caracterización de los aceites esenciales. No se realizó una optimización del programa de temperaturas porque el objetivo final es la cuantificación del aceite esencial y no la caracterización del aceite esencial.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos de los análisis realizados

Cromatógrafo de gases (GC)
Inyección: Líquida
Modo de inyección: split (1:200)
Temperatura de inyección: 300° C
Temperatura de línea de transferencia: 315° C
Columna cromatográfica: HP 5 (30 mx25 mmx0.25 µm)
Gas portador: Helio 1.2 mL min <sup>-1</sup>
Rampa de temperaturas:
T inicial: 50° C
de 50° C a 320° C a 10° C min <sup>-1</sup>
T final: 300° C. durante 2 min
Detector de masas (MS)
Modo SCAN (33-350 m/z)
Modo SIM (71, 81, 95, 69)

### 2.3. Cuantificación de los aceites esenciales en el collar antiparasitario.

En primer lugar, para poner a punto el método de cuantificación de los dos aceites esenciales seleccionados, se calculó las densidades de cada aceite. Para ello se pesaron 10 mL en una balanza analítica. Posteriormente, se realizaron extracciones sucesivas de los aceites puros para poder observar si se podía obtener una buena linealidad. Para ello, se tomó la mínima cantidad de aceite esencial de lavandina y geraniol (0.1  $\mu$ L) con una jeringa de cromatografía. El método cromatográfico usado fue el descrito en la tabla 1 pero utilizando inyección en espacio en cabeza con un split (1:20) en modo SIM.

Una vez realizado el ensayo con los aceites esenciales puros, se repite el proceso con las réplicas del collar analizadas en el mismo día y en varios días. Se observaron los coeficientes de regresión obtenidos y la reproducibilidad del método. No se hallaron límites de cuantificación y detección (LOQ, LOD) ya que las concentraciones a determinar no estaban a niveles traza. Por esa razón se ajustaron las medidas de inyección división split para no saturar el detector. No analizan menor cantidad de collar ya que, debido al propio proceso industrial, se sospecha una distribución no homogénea de los aceites esenciales. Menos de 1 mg provocaría una falta de representatividad de la muestra analizada con respecto al collar.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Caracterización del aceite esencial de lavandina

En la figura 3 se puede observar el cromatograma de los componentes principales del aceite esencial de lavandina realizado en inyección líquida mediante GC/MS. La librería de espectros (NIST17) resalta: Eucalyptol ( $t_R$ : 7.61 min), 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl- ( $t_R$ : 8.69 min) y 2- Bormanone ( $t_R$ : 9.51 min) (figura 3). Estos tres compuestos fueron elegidos como representativos del aceite esencial por los siguientes motivos:

- Un análisis semicuantitativo nos indica que aunque no son los mayoritarios dentro de la composición del aceite esencial, su concentración supera en todos los casos 5% en peso del total de concentración del aceite esencial por lo que son sencillos de detectar si hay presencia de aceite de lavandina.
- Todos ellos comparten un ion  $m/z$  común (71) que facilita el análisis en modo SIM aunque

cada uno de ellos tuvo un ion fragmento cuantificador distinto.

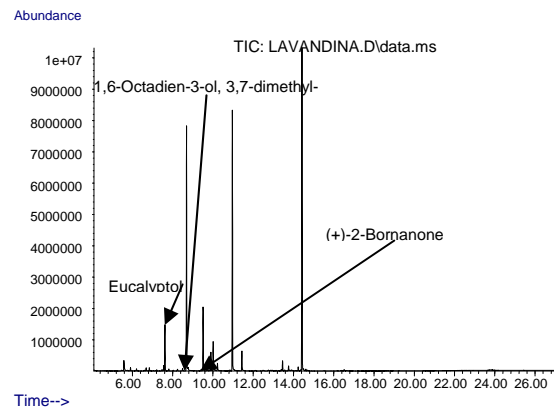


Figura 3. Cromatograma en modo SCAN de un aceite esencial de lavandina.

Para comprobar la posibilidad de cuantificar en modo SIM, se analizó mediante MHE-GC/MS el patrón del aceite esencial. Como se puede observar en la Figura 4 se puede observar el aumento del área de la señal cromatográfica de uno de los componentes seleccionados, el 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-  $t_R$ : 8.69 min, siguiendo únicamente el fragmento  $m/z$  71.

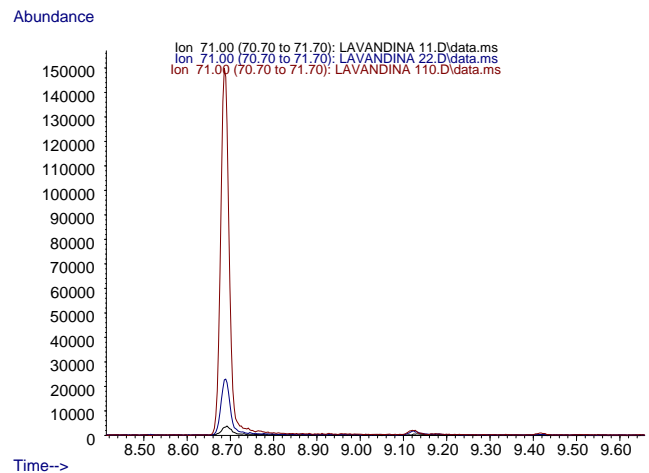


Figura 4. Cromatogramas de extracciones sucesivas en modo SIM de un aceite esencial de lavandina.

### 3.2. Caracterización del aceite esencial de geraniol

El aceite esencial de geraniol es menos complejo teniendo como componente principal el geraniol (>60% en peso del total de componentes). El fragmento característico  $m/z$  de este compuesto fue el 69. El tiempo de retención en el programa de temperaturas seleccionado fue  $t_R$ : 11.00 min.

### 3.3. Optimización de la técnica MHE\_GC/MES

#### 3.3.1. Selectividad

Se comprobó que los compuestos seleccionados para la cuantificación de cada uno de los aceites esenciales no interferían entre ellos. Para ello, se analizó una mezcla mixta de los dos aceites esenciales. Tal y como se puede apreciar en la figura 5, no hubo interferencia entre los componentes de cada uno de los aceites esenciales) seleccionados para la cuantificación, ni en tiempo de retención ni en fragmentos m/z seleccionados.

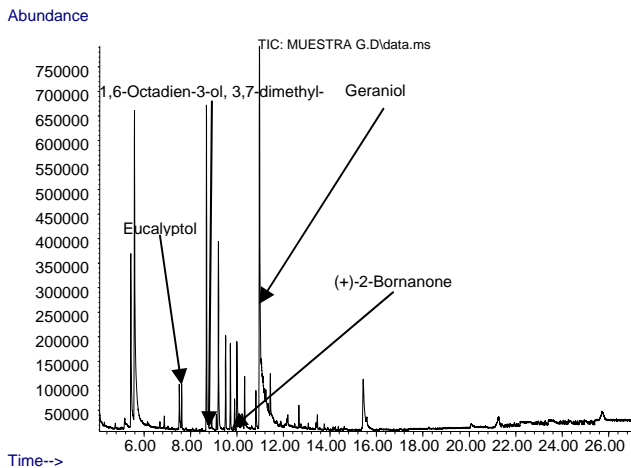


Figura 5. Cromatograma en modo SCAN de un aceite esencial de lavandina y geraniol a concentración 1000 ppm.

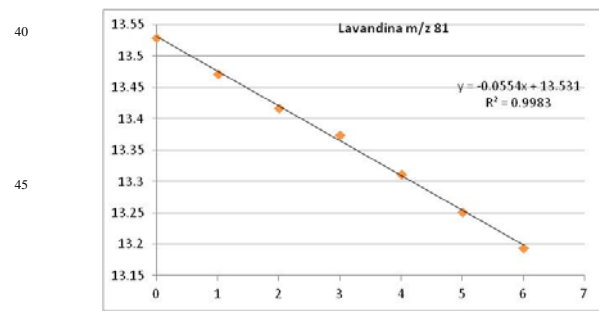
#### 3.3.2. Linealidad

En primer lugar se calcula la regresión obtenida de las extracciones sucesivas de los compuestos elegidos para la cuantificación de los aceites esenciales de los patrones y posteriormente, se estudia el comportamiento de la extracción de los compuestos en el collar antiparasitario.

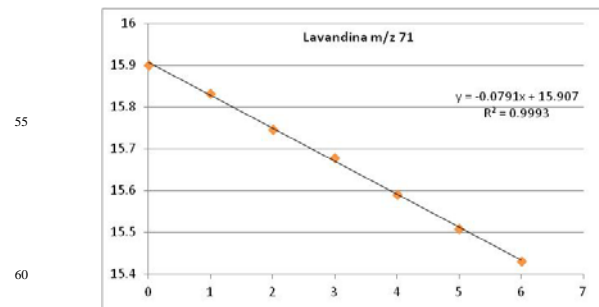
En las figuras 6 y 7 se pueden observar las rectas de regresión obtenidas de 7 extracciones sucesivas del patrón de aceite esencial.

De las regresiones se obtuvieron los valores necesarios de pendiente  $q$  y  $A_1$  necesarios para poder obtener la cantidad de compuesto en el collar analizado.

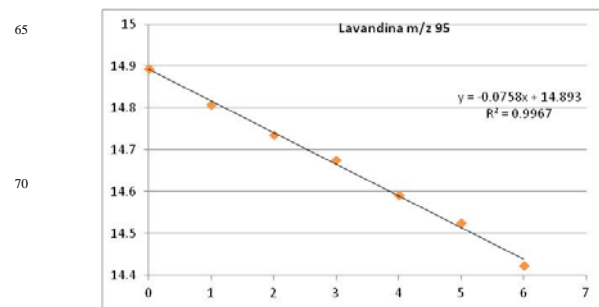
Hay que recordar que para la cuantificación no se utilizaron los compuestos puros seleccionados en el apartado 3.1 sino el propio aceite esencial utilizado para el dopaje de los collares antiparásitos calibrando únicamente los compuestos seleccionados.



(a)



(b)



(c)

Figura 6. Regresión obtenida en las extracciones sucesivas (MHE) del aceite de lavandina para (a) 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl (m/z: 81) (b) Eucalyptol (m/z: 71) y (c) Bornanone (m/z:95) . Se representa log (A) vs (n-1) extracciones.

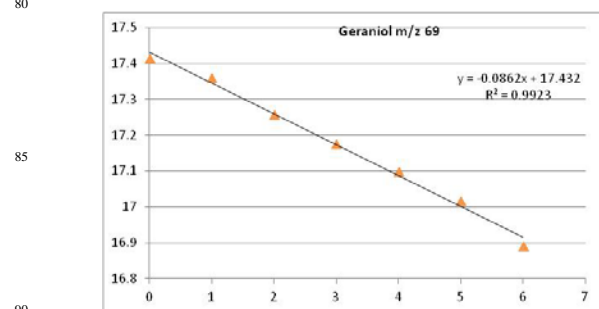
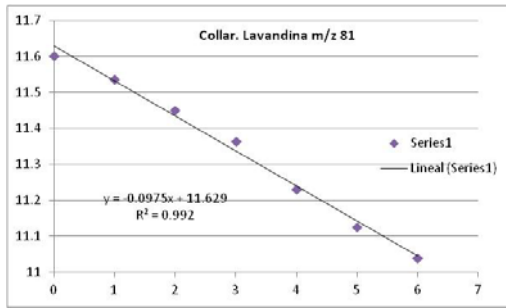


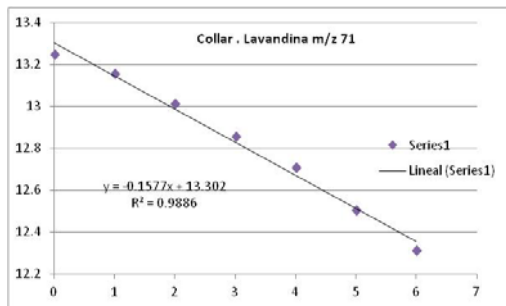
Figura 7. Regresión obtenida en las extracciones sucesivas (MHE) del aceite de geraniol (m/z: 69). Se representa log (A) vs (n-1) extracciones.



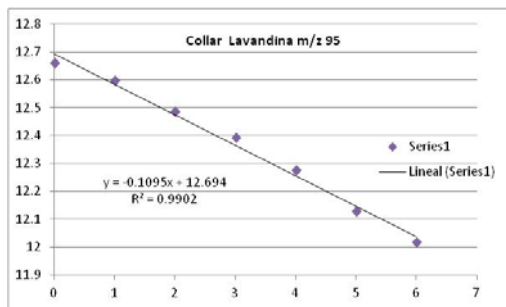
Como se puede observar, los coeficientes de regresión obtenidos aseguran una correcta calibración en las rectas de calibración (>0.99) en todos los casos.



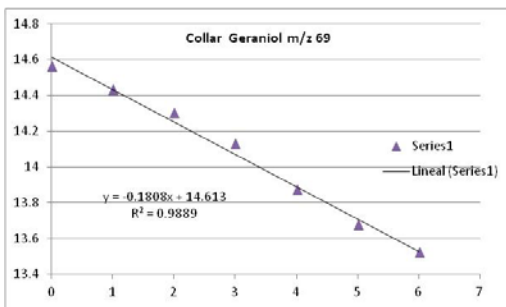
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figura 8.** Regresión obtenida en las extracciones sucesivas (MHE) en la muestra de collar para (a) 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl del aceite de lavandina (m/z: 81) (b) Eucaliptol del aceite de lavandina (m/z: 71), (c) Borneol del aceite de lavandina (m/z:95 ) y (d) Geraniol (m/z:69) del aceite de geraniol.. Se representa log (A) vs (n-1) extracciones.

En la figura 8 se muestran las extracciones sucesivas realizadas en una muestra de collar de 1 mg aproximadamente. Como se puede observar, existe una leve desviación de la linealidad de las rectas ( $r^2 \approx 0.98$ ) debida a la primera y última extracción. Según la bibliografía consultada, estas desviaciones son debidas a efectos de adsorción/absorción del material y desviaciones del equilibrio gas/sólido, ya que la técnica depende del soporte sólido [8,9]. Esto puede deberse a los cambios en la morfología del soporte, ya que se pudo comprobar visualmente como, debido a la exposición al calor del material, este pasaba de un aspecto sólido rígido a un sólido blando. Debido a este hecho, aunque muchos estudios utilizan únicamente 4 extracciones, en nuestro caso se amplió hasta 7 mejorando la linealidad. En algunos casos la primera extracción fue omitida hallándose a partir de la extrapolación y corte con el eje del resto de puntos.

### 3.3.3. Reproducibilidad y repetitividad

Se toma aproximadamente 10 mg de diferentes partes de un collar antiparasitario. Se realizan 2 réplicas (Tabla 2). La concentración se halla mediante las ecuaciones 1 y 2.:

$$\frac{W_{sample}}{\sum A_{sample}} = \frac{W_{standard}}{\sum A_{standard}} \quad (Ec 3)$$

$$W_{sample} = \frac{\sum A_{sample}}{\sum A_{standard}} \times W_{standard} \quad (Ec 4)$$

Donde  $W_{sample}$  es la cantidad en ng del aceite esencial en la muestra,  $W_{standard}$  es la cantidad en ng de aceite esencial puro y  $A_{sample}$  y  $A_{standard}$  el sumatorio de las áreas cromatográficas de las distintas extracciones ( $n=7$ ) realizadas y obtenidas a partir de las Ecuaciones 1 y 2.

**Tabla 2.** Resultados de concentración para aceite de lavandina y geraniol en un collar antiparasitario.

Muestra	Lavandina (% peso)	Geraniol (% peso)
(replica 1)	(1.1 ± 0.2) %	0.24%
(replica 2)	(1.5 ± 0.5) %	0.37%

Como se puede observar, para el caso de la cuantificación del aceite de lavandina, los resultados de las réplicas son comparables (1.1 y 1.5) si se toman los errores de cada una de las medidas. Teniendo en cuenta estos datos tenemos una media para el collar de 1.3%

con una desviación asociada del 15% (0.2%). En el caso del geraniol la concentración es de 0.31% con una desviación asociada del 20% (0.06%). En cualquiera de los dos casos, los errores asociados son aceptables en la medida de este tipo de compuestos.

A continuación, se realizan los ensayos siguientes:

Además, los resultados de los ensayos de trataron de diferente forma para la lavandina, en el primer caso como suma de los compuestos elegidos como representativos y en el segundo eligiendo uno sólo.

1- Estudiar la reproducibilidad del método entre días, almacenando las muestras a 4°C hasta su análisis. (Tabla 3)

En este caso, se puede observar como la repetitividad en este caso para la lavandina es de un 8% mientras que la reproducibilidad es de un 20%. En el caso del geraniol tanto la reproducibilidad como la repetitividad es de un 2%. Existe una diferencia bastante grande entre este resultado y el obtenido anteriormente para el caso del geraniol. Probablemente será debido a que en este caso la concentración era superior y la incertidumbre asociada de la medida fue menor.

**Tabla 3.** Resultados de concentración para aceite de lavandina y geraniol en una muestra de una parte de un collar antiparasitario. Repetitividad y reproducibilidad del método como suma de los compuestos de cada aceite

Muestra	Lavandina (% peso)	Geraniol (% peso)
M1. Día 1	2.04% ± 0.3%	1.22 %
M2. Día 2	1.39% ± 0.8%	1.17 %
M3. Día 3	1.57% ± 0.3%	1.21 %

2- Tomar una única muestra de una parte del collar en vez de diferentes partes (Tabla 4)

Observando los resultados de la Tabla 4, con un sencillo test estadístico se puede ver como la última replica era un resultado anómalo ( $p < 0.05$ ). Este hecho denoto que el propio proceso de producción del collar puede conllevar un reparto no homogéneo de los aceites esenciales a lo largo del collar. Como se puede observar, en la Tabla 3 se obtuvieron medidas de repetitividad y reproducibilidad más altas (15-20%). Por otra parte, en este ensayo ha aparecido una muestra *outlier* aunque, eliminandola, los resultados de repetitividad y

reproducibilidad han sido mejores (3-5%).

**Tabla 4.** Resultados de concentración para lavandina y geraniol en una muestra de collar antiparasitario, tomada como suma de diferentes partes de éste. Repetitividad y reproducibilidad del método tomando un sólo compuesto de cada aceite.

Muestra	Lavandina (% peso)	Geraniol (% peso)
M1	0.39%	0.23%
M2	0.38%	0.22%
M3	0.64%	0.15%

Estos resultados lo demuestran que fue más representativo tomar muestra de distintas partes del collar y juntarlas hasta obtener 10-15 mg. El resultado obtenido haciendo esto tiene una reproducibilidad asociada más alta debida a la heterogeneidad de la muestra pero el resultado de aceite esencial obtenido es más representativo de todo el collar. Por esa razón, para el análisis de las muestras reales se tomó 10-15 mg de muestra de collar tomando al menos 10 pequeñas porciones de distintos sitios del collar.

### 3.4 Cuantificación de muestras de collares antiparasitarios

Se adjuntan los resultados de dos muestras de collar medidas directamente mediante extracciones sucesivas: MHE-GC/MS. Cada una de las muestras corresponde a varios trozos de un mismo collar que han sumado 10 mg. Los trozos se tomaron de distintas partes del collar. La cuantificación de lavandina se ha realizado mediante el promedio de los tres componentes seleccionados (Tabla 5) usados en las anteriores cuantificaciones y que ha respondido correctamente. Para el caso del geraniol, como se ha indicado anteriormente se ha utilizado el único componente caracterizado.

**Tabla 5.** Resultados de concentración para lavandina y geraniol en la muestra de collar

Muestra	Lavandina (% peso)	Geraniol (% peso)
Collar 1	1.64 %	1.25 %
Collar 2	2.04 %	1.22 %

## CONCLUSIONES

El método puesto a punto permitió la medida de dos aceites esenciales directamente de un sólido (collar antiparásito) mediante la aplicación de la técnica de extracciones sucesivas (MHEGC/MS). Aunque se pudo observar algunas desviaciones de la idealidad en las extracciones ejecutadas sobre los collares debido principalmente a la fusión parcial del componente plástico, el error asociado a los resultados obtenidos esta dentro del margen permitido para este tipo de compuestos mediante metodologías clásicas. A diferencia de éstas, este proceso de cuantificación está completamente automatizado, tiene un tiempo de respuesta mucho más corto, se gastan menos reactivos y es más respetuoso con el medio ambiente ya que no se utiliza ningún tipo de disolvente orgánico en el proceso de extracción.

Con respecto a los resultados obtenidos en el análisis de las muestras reales, se pudo observar que el propio proceso industrial en el que se introducen los aceites esenciales conlleva una gran pérdida de éstos debido a los procesos térmicos que tienen lugar. Además, se observaron grandes diferencias entre las distintas réplicas analizadas de las mismas muestras, lo que sugiere un proceso poco homogéneo de distribución de estos aceites esenciales en el producto final. Por lo tanto, se ha recomendado a la empresa la mejora de los procesos industriales para poder llevar a cabo análisis bajo calidad en la producción de los collares antiparasitarios.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.B. Isman, Plant essential oils for pest and disease management, *Crop Prot.* 19 (2000) 603–608.
- [2] M.A. Abo-El Seoud, et al., Biocides formulation of Essentials oils having antimicrobial activity, *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 38 (2005) 175–184.
- [3] S. Varona, Á. Martín, M.J. Cocero, Formulation of a natural biocide based on lavandina essential oil by emulsification using modified starches, *Chem. Eng. Proc.* 48 (2009) 1121–1128.
- [4] G. Ruberto, M. Baratta, Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems, *Food Chem.* 69 (2000) 167–174.
- [5] F.F. Boyom, V. Ngouana, A.P.H. Zollo, C. Menut, J.M. Bessiere, J. Gut, P Rosenthal, Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants, *Phytochemistry* 64 (2003) (2003) 1269–1275.

- [6] S.G. Griffin, G. Wyllie, J.L. Markham, D.N. Leach, The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity, *Flavour Frag. J.* 14 (1999) 322–332.

- [7] Gröning M, Hakkarainen (2014). M. Multiple headspace solid-phase microextraction of 2-cyclopentyl-cyclopentanone in polyamide 6.6—possibilities and limitations in the headspace analysis of solid hydrogen-bonding matrices. *J Chromatogr A* 1052:61–8.

- [8] Kolb B, Pospisil P, Auer M (1984). Quantitative analysis of residual solvents in food packaging printed films by capillary gas chromatography with multiple headspace extraction. *J Chromatogr A* 204:371–6.

- [9] Kolb B. (1982). Multiple headspace extraction — a procedure for eliminating the influence of the sample matrix in quantitative headspace gas chromatography. *Chromatographia* 15:587–94.

- [10] Wang J.G., Zhan X.H., Liang J.R., Zhou L.X., Lin Y.S. y Wong W.C. (2011). A novel method for the determination of total hydrocarbon in the hydrocarbon mixture-contaminated soil. *J. Biorem. Biodegrad.* 2, 1–6.

## AGRADECIMIENTOS

El autor agradece el apoyo tecnologico de los SGIker de la UPV/EHU y la financiación europea (FEDER y FSE). El autor también agradece a los grupos de investigación de FARMARTEM y LABQUIMAC de los Departamento de Química Analítica y Química Física de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) por la confianza depositada en el SCAB de los SGIker. El autor agradece la revisión profunda del texto realizada por la Dra. Mariluz Alonso.