

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique

Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'environnement

Mémoire de master en génie de l'environnement.

Thème

Identification de certains composés phénoliques
dans les extraits de margine et du grignon d'olive
par HPLC.

Présenté par :

M. ZIGHED Mohammed

Dirigé par :

Pr. GRIB Hocine.

Dr : FERGUANE Amel.

Soutenue le 16 Juin 2015 devant le jury composé de:

Pr. MAMERI NabilPrésident.
Pr. ABDI NadiaExamineur.
Pr. GRIB Hocine.....Promoteur.

Promotion : Juin 2015

Dédicaces

À mes chers parents

À mes neveux Louai Abderrahmane, Asma, Adem, Rokaia et Bayane

À mes sœurs et à leur tête Saida

À toute ma famille

À mes amis et mes collègues

À mon ami Tarik Chibane

À tous ceux qui aiment la Science

Remerciement

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mr Grib Hocine, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseil et la confiance qu'il m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr Mameri Nabil, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique et membre de l'académie scientifique d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à Mme Abdi Nadia, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Aux personnels de l'Unité de Recherche en Ingénierie et Environnement (URIE) pour leur aide, en particulier Mlle L. Bensadallah, Mme R. Chemlal et Mr M. Hariti pour leur aide.

Aux personnels du Laboratoire BEKER, en particulier Mr Hakim Z.

À tous les étudiants de la promotion du Génie de l'Environnement 2015.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

À tous mes amis.

ملخص:

عملنا الحالي يتمثل في اجراء تقييم كمي لبعض المركبات الفينولية(حمض الغال والفينول المتواجدة في مستخلصات ثفل الزيتون و مستخلصات مياه عصر الزيتون باستعمال طريقة كروماتوغرافية

الكلمات الأساسية: ثفل الزيتون, الزيببار, حمض الغال, الفينول, الكروماتوغرافيا

Résumé :

Notre présent travail consiste à effectuer une évaluation quantitative par HPLC de certains composés phénoliques (acide gallique et phénol) contenus dans les extraits issus des rejets d'huilerie (grignon d'olive et margine).

Mots clés : Grignon d'olive, margine, HPLC, acide gallique, phénol.

Summary:

Our present work is to carry out a quantitative evaluation by HPLC of some phenolic compounds (gallic acid and phenol) contained in the extracts from the discharges in oil (olive pomace and vegetable water).

Keywords: olive pomace, vegetable water, HPLC, gallic acid, phenol.

Sommaire :

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre I : synthèse bibliographique

I	Sous-produits de la production oléicole :.....	2
I.2	Le grignon d'olive :	2
I.3	Techniques de traitement des margines:.....	2
I.3.1	Traitement des margines par électrocoagulation et biométhanisation	2
I.3.2	Elimination par lagunage :	2
I.3.3	Procédés membranaire :	3
I.4	Traitement des grignons et valorisation :	3
I.5	Impact environnemental des grignons d'olives :.....	4
I.6	Impact des margines sur l'environnement :.....	4
II	Les composés phénoliques:.....	5
II.1	Définition :.....	6
II.2	Importance des composés phénoliques:	6
II.2.1	Sur la santé humaine:	7
II.2.2	En cosmétologie:	7
II.2.3	Rôle des polyphénols dans les aliments et les végétaux :	7
II.3	Acide gallique :.....	8
II.4	Phénol :	8

Chapitre II : Matériels et méthodes.

I	Identification et quantification par HPLC :.....	9
I.1	Principe [24] :	11
I.2	Appareillage :	11
I.3	Développement d'une méthode chromatographique pour le dosage des polyphénols .	12

I.3.1	Les conditions chromatographiques :.....	13
-------	--	----

Chapitre III : Résultats et discussion.

I	Méthode instrumentale (<i>HPLC</i>) :.....	15
I.1	Profil phénolique des étalons :.....	15
I.2	Analyse des échantillons extraits :.....	16
I.2.1	Grignon d'olive :.....	16
I.2.2	Margine :.....	18

Conclusion générale.....	22
--------------------------	----

Références bibliographiques

Annexes

Introduction générale

Ce présent travail expérimental est composé de trois chapitres :

Le premier chapitre porte sur :

Le traitement et valorisation des sous-produits oléicoles ainsi que leurs impact sur l'environnement, dans ce chapitre on va parler de l'importance des polyphénols ce qui rend l'extraction de ces composés à haute valeur ajoutée une voie de valorisation très prometteuse.

Le deuxième chapitre de ce travail consiste à :

Définir les moyens matériels mis en œuvre pour effectuer la quantification de certains polyphénols présents dans nos extraits par une méthode instrumentale (analyse par HPLC) ainsi que les conditions chromatographique de la méthode développée pour l'analyse de ces composés phénoliques.

Le troisième chapitre sera consacré aux résultats expérimentaux (les cinétiques d'extraction de l'acide gallique et du phénol par distillation), une discussion des résultats obtenus et une conclusion.

Chapitre I :
Synthèse
bibliographique

I Sous-produits de la production oléicole :

L'industrie oléicole en plus de sa production principale qui est l'huile, laisse deux sous-produits, l'un liquide appelé margine et l'autre solide appelé grignon.

I.1 Margines ou eaux de végétation:

Le procédé d'extraction de l'huile d'olive engendre la production d'effluents liquides, nommés margines ou parfois eaux de végétation. Le pressage de 1 tonne d'olives produit en moyenne 1,5 tonnes de margines avec les modes de production modernes. Les variations constatées dépendent des processus d'extraction : lavage préalable ou non des olives, humidification des pâtes durant le pressage [1].

I.2 Le grignon d'olive :

Les grignons sont les résidus solides issus de la première pression ou centrifugation et sont formés des pulpes et noyaux d'olives. Ce produit peut être transformé en un produit destiné à l'alimentation animale ou en huile dite de grignons d'olive après extraction chimique [1].

I.3 Techniques de traitement des margines:**I.3.1 Traitement des margines par électrocoagulation et biométhanisation [1] :**

Pour répondre aux besoins des industries productrices d'huiles des pays méditerranéens, un procédé de traitement des margines par électrocoagulation et biométhanisation a été développé. Le couplage de ces deux procédés représente une solution adaptée au problème de l'élimination des margines.

La biométhanisation permet la transformation de la matière organique en substances chimiques diverses en condition d'anaérobiose et sous l'action de bactéries présentes dans le milieu. Ce procédé permet la formation de biogaz. Seulement l'action des bactéries est dans le cas des margines fortement ralentie par la présence des polyphénols, substances toxiques, contenus dans ces eaux. Un prétraitement des margines est donc nécessaire et se fait par électrocoagulation.

L'électrocoagulation est un procédé d'électrolyse qui permet la séparation des margines en

boues et en liquides biodégradables. Par ailleurs, les polyphénols et certains autres produits toxiques (métaux lourds) sont éliminés. Les boues sont extraites et vont au compostage. Les liquides sont acheminés vers le biométhaniseur.

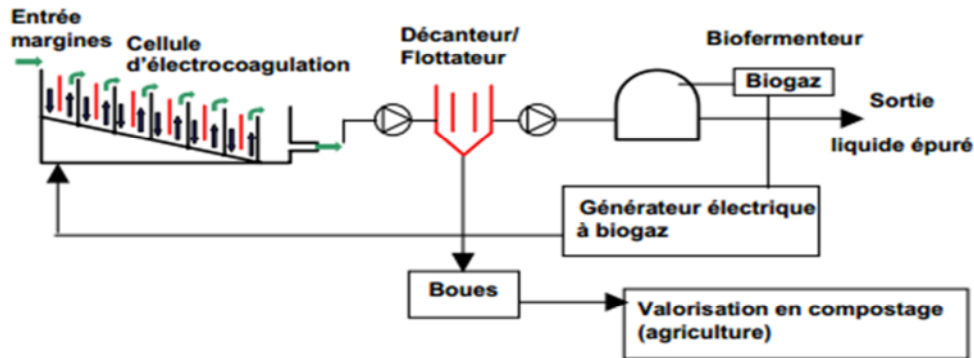


Figure I.1 : Schéma général de principe de l'électrocoagulation et biométhanisation pour le traitement des margines.

I.3.2 Élimination par lagunage [1] :

Le principe est basé sur la biodégradation des composés contenus dans les margines par lagunage. Les effluents sont collectés temporairement dans un bassin situé en aval des sites polluants. Un milieu riche en matières organiques est créé dans le bassin et des conditions anaérobies s'y développent. Les matières organiques sont ainsi dégradées sous l'action de micro-organismes et l'on peut aussi obtenir une dénitrification des eaux.

En aval, l'eau obtenue est de qualité physicochimique acceptable et peut être rejetée dans le milieu naturel. Ce mode de régénération des eaux nécessite par contre des grandes surfaces car les bassins de rétention doivent avoir une faible profondeur.

I.3.3 Procédés membranaire :

➤ Ultrafiltration :

Ce procédé repose sur la filtration à travers une membrane, permettant ainsi la rétention des macromolécules de masse moléculaire supérieure à 500 g/mole. La séparation se fait sous l'effet d'un gradient de pression de 3 à 10 bars. Les tests d'ultrafiltration ont donné un liquide limpide, une réduction de la DCO et des solides en suspension présents dans les eaux [2].

Récemment Dhaouadi et Marrot (2008) ont utilisé un bioréacteur équipé d'une membrane d'ultrafiltration, pour le traitement des margines diluées. Ces auteurs ont proposé d'utiliser ce type de traitement en stade de prétraitement pour éliminer les composés phénoliques avant le traitement biologique conventionnel [3].

➤ Osmose inverse :

L'osmose inverse permet de séparer une solution en deux phases : l'une concentrée et l'autre diluée sous une pression allant jusqu'à 80 bars. Des essais de traitement des margines ont été réalisés par cette technique, les résultats obtenus ont montré que celles-ci étaient limpide et incolores [4].

Ces deux procédés (ultrafiltration et osmose inverse) permettent d'éliminer 100% de la DCO initiale. En revanche ils nécessitent un prétraitement, une demande énergétique élevée, et une altération rapide des membranes utilisées [5].

I.4 Traitement des grignons et valorisation :

Après la récupération des huiles résiduelles par extraction au solvant, les grignons issus du procédé traditionnel peuvent se trouver valables pour l'utilisation en alimentation animale ou comme combustibles alternatifs et dans la préparation du composte [6]. L'utilisation des grignons comme combustible représente dans la majorité des pays, l'application la plus courante.

Ce sous-produit de l'huilerie, mis à part son utilisation comme combustible est peu valorisé. L'extraction des huiles de grignon permet de donner une certaine valeur ajoutée à la production d'huile d'olive mais aussi et surtout d'éliminer les importantes quantités de grignons produites qui ne feraient que polluer l'environnement à chaque campagne oléicole [7].

Plusieurs méthodes d'élimination ont été proposées pour ce déchet, tels que le traitement physicochimique (décantation avec ou sans oxydation chimique et l'osmose inverse) agronomique (aquaculture, épandage), méthodes d'élevage des animaux (utilisation directe comme aliments ou après enrichissement protéique), et les méthodes biotechnologiques (fermentation, traitements biologiques) [6].

I.5 Impact environnemental des grignons d'olives :

Les grignons sont un facteur de pollution liée à l'activité des huileries. Cette matière organique imprégnée d'huile lampante représente dans le cas de son rejet aux abords des oueds, une réelle menace pour la nappe phréatique. L'industrie oléicole algérienne rejette annuellement des grandes quantités de grignons dans la nature

I.6 Impact des margines sur l'environnement :

L'élimination et le traitement des margines sont les principaux problèmes de l'industrie de l'huile d'olive en raison de leurs fortes charges organiques et leur teneur en substances phénoliques phytotoxiques et antimicrobiennes qui résistent à la dégradation biologique [8].

La toxicité des effluents a été attribuée à leurs constituants phénoliques, qui constituent 1.5 à 8 g/l. Les margines deviennent de plus en plus noires durant le stockage, à cause de l'auto-oxydation et de la polymérisation ultérieure des tannins, donnant une couleur sombre aux composés phénoliques. Les études de toxicité et de la biodégradabilité des margines, dans des conditions anaérobiques montrent que les composés phénoliques avec haut poids moléculaires sont responsables de la couleur noire des margines, ne sont pas facilement biodégradables, et présentent une faible toxicité. En revanche, les simples composés phénoliques et les tannins sont hautement toxiques mais biodégradables [9] [10].

L'absence des méthodes de traitement adaptées poussent les propriétaires des moulins à huiles à rejeter les margines dans la nature sans aucun contrôle, ce qui peut causer [8]:

➤ La pollution des eaux :

Elles sont le plus souvent rejetées dans des récepteurs naturels, des cours d'eau, sans aucun traitement préalable et nuisent fortement à la qualité de ces eaux de surfaces. La très forte charge en matière organique empêche ces eaux de s'auto-épurer et la pollution peut s'étendre sur de très longues distances.

➤ La pollution des sols :

De nombreux auteurs ont observé les effets négatifs sur les propriétés des plantes et du sol quand les margines sont utilisées directement comme un engrais organique. Les substances toxiques contenues dans ces eaux se fixent dans les sols. Certaines de ces substances telles

que les phénols peuvent inhiber l'activité microbienne du sol, d'autres, des résidus de pesticides notamment, sont nocifs aux plantes.

Les acides, les éléments minéraux et les substances organiques aboutissent à une destruction de la capacité d'échange cationique du sol (CEC), par suite, une réduction de la fertilité.

➤ La pollution de l'air :

Les mauvaises odeurs posent des problèmes de pollution de l'air par le taux élevé d'ammoniaque et d'autres gaz produits lors du traitement de ces effluents. La pollution atmosphérique considérable serait induite en raison de la fermentation anaérobique et de la production de gaz (méthane).

II Les composés phénoliques:

II.1 Définition :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux .Ils correspondent à une large série de structures chimiques, leur élément structurel de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique.

Ces composés proviennent de l'hydrolyse enzymatique des glucides et des esters de la pulpe d'olive. Leur solubilisation dans l'huile est cependant inférieur à celle qui se produit dans les margines. Les polyphénols sont dix fois plus abondant dans la margine que dans l'huile.

La teneur en polyphénols des margines dépend essentiellement de la variété et du degré de maturité de l'olive, des conditions climatiques et les techniques d'extraction utilisées [11].Elle dépend aussi du temps de conservation (durée de stockage avant l'extraction).

L'olivier est très riche en composés phénoliques, mais uniquement 2% de la teneur en phénols totaux du fruit passent dans la phase huileuse, tandis que la quantité restante est perdue dans les margines (~ 53%) et dans les grignons (~ 45%) [12].

II.2 Importance des composés phénoliques:

II.2.1 Sur la santé humaine:

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain .Les réactions biochimiques qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres qui initient des réactions d'oxydation en chaine destructrices .Les antioxydants peuvent neutraliser ces radicaux libres et empêcher les réactions en chaine initialisées par ces derniers.

Les polyphénols préviennent le développement des maladies cancérigènes dans l'organisme en inhibant les réactions oxydatives et empêchent la formation d'ADN anormal [13].

Les polyphénols améliorent le tonus veineux et les drainages lymphatiques, favorisant la circulation capillaire en diminuant le processus inflammatoire et accélèrent la cicatrisation des ulcères veineux.

Des médicaments à base des biflavonoides comme l'héspéridine sont utilisés dans le traitement des insuffisances veineuses chroniques et la prévention des thromboses post opératoire.

L'acide caféique, l'acide férulique ainsi que l'hydroxytyrosol sont impliqués dans la protection contre les maladies cardiovasculaires [14].

II.2.2 En cosmétologie:

L'intérêt des composés phénoliques en cosmetologie est lié aux propriétés suivantes :Propriété antioxydantes, capacité de chélater les métaux, pouvoir anti-inflammatoire, effet anti microbien et l'intervention sur l'activité de nombreuses enzymes .Ils permettent de lutter contre le vieillissement cutané en tant que molécule anti radicalaire et en tant que protecteur des protéines de la peau comme l'élastine et le collagène .Le seul frein de l'utilisation des polyphénols en cosmétologie est leur forte réactivité à l'oxydation et leurs instabilité dans les formulations cosmétiques conduisant ainsi à la variation possible de l'odeur et la couleur [15].

II.2.3 Rôle des polyphénols dans les aliments et les végétaux :

Les polyphénols ont la capacité d'influencer l'aspect des aliments et notamment leurs couleurs . Ils peuvent provoquer leur brunissement car leur auto-oxydation conduit à une coloration .Ils améliorent le goût et la conservation des produits grâce à leurs propriétés anti-oxydantes [16].

Dans les végétaux , ils jouent un rôle dans la coloration des fleurs et des fruits qu'ils rendent attractifs à l'insecte qui assure la fécondation et la protection des végétaux contre le stress environnemental tout en luttant contre les micro-organismes ,les bactéries et les champignons[16].

II.3 Acide gallique :

L'acide gallique est un acide organique, également connu sous le nom d'acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque,L'AG est couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Il est utilisé comme une norme pour la détermination de la teneur en phénol des analytes différents par le dosage calteau Folin-Cio; les résultats sont présentés en équivalents acide gallique. L'AG peut également être utilisé comme matériau de départ dans la synthèse de l'alcaloïde hallucinogène mescaline [17].

L'acide gallique semble avoir des propriétés anti-fongiques et anti-virale, actes acide gallique comme un antioxydant et aide à protéger nos cellules contre les dommages oxydatifs. L'acide gallique a été trouvé pour montrer cytotoxicité contre les cellules cancéreuses, sans toucher aux cellules saines. L'AG est utilisé comme un astringent à distance en cas d'hémorragie interne. L'acide gallique est également utilisé pour traiter l'albuminurie et le diabète. De la pommade pour traiter le psoriasis et les hémorroïdes externes contiennent de l'acide gallique [17].

➤ Source :

L'acide gallique est largement distribué dans diverses plantes, fruits et aliments, ou il est présent sous forme libre ou, plus communément, comme ingrédient de tanins, à savoir les

gallotannins [18]. Les noix de galle, le sumac, l'écorce de chêne, le thé vert, raisins, fraises, ananas, citron, vin rouge et l'épluchure de pomme sont connus pour être riche en AG [19].

➤ Structure :

L'AG ou acide 3,4,5-trihydroxy-benzoïque ($C_6H_2(OH)_3COOH$)(figure I.2).

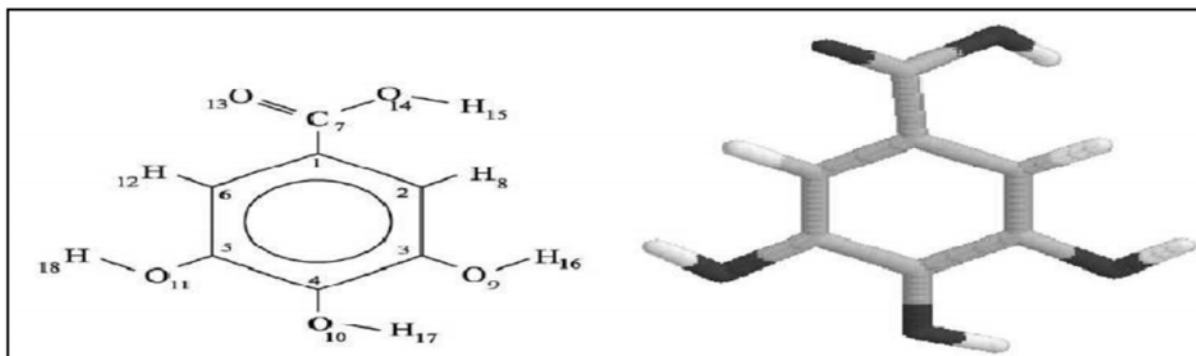


Figure I.2 : Structure de l'acide gallique.

➤ Propriétés de l'acide gallique [20] :

Les principales propriétés sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

Tableau I.1 : Principales propriétés de l'acide gallique.

apparence	blanc-jaunâtre.
Masse molaire	170.12 g/mol
densité	1.7 g/cm ³
Point de fusion	250 °C, 523 K, 482 °F
Solubilité dans l'eau	1.1 g/100 ml eau à 20° C

II.4 Phénol :

Les phénols de formule générale Ar-OH sont des composés comportant un ou plusieurs groupes hydroxyles OH liés à un groupe aromatique Ar. Le plus simple des phénols est le phénol dérivé monohydroxylé du benzène C'est un composé organique aromatique de formule C_6H_5OH , appelé aussi acide phénique, hydroxybenzène ou encore acide carbonique. Composé d'un cycle aromatique benzénique et d'une fonction hydroxyle [21].



Figure I.3 : structure du phénol.

➤ Origine du phénol :

Dès le début du XIXe siècle, les chimistes avaient réussi à isoler le phénol des huiles moyennes du goudron de houille. En raison de la nature du procédé d'extraction, on considérait ce composé comme un acide phénique. *Gerhardt* [22] proposa de l'appeler «phénol», nom qui a, peu à peu, détrôné celui d'acide phénique. Toutefois la production du phénol à partir de goudrons, des eaux de cokerie et des eaux résiduelles de craquage va en diminuant par rapport à la production du phénol par synthèse [23].

➤ Caractéristique [21] :

Les principales propriétés sont regroupées dans le tableau suivant.

Tableau I.2 : Principales propriétés physique et chimique du phénol.

Masse molaire (g/mol)	94,11
Point d'ébullition (°C)	181,8
Point de fusion (°C)	41
Densité/eau	1,071
Solubilité dans l'eau (g/L)	84 à 20 °C

Chapitre II :

Matériels et méthodes

Ce complément de master va porter sur l'identification et la quantification de certains polyphénols présents dans nos extraits issus de la margine et du grignon d'olive.

Dans ce chapitre on va présenter le principe de fonctionnement de HPLC ainsi que les conditions chromatographiques de la méthode développée.

I Identification et quantification par HPLC :

I.1 Principe [24] :

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Le schéma suivant représente une installation de base en HPLC.

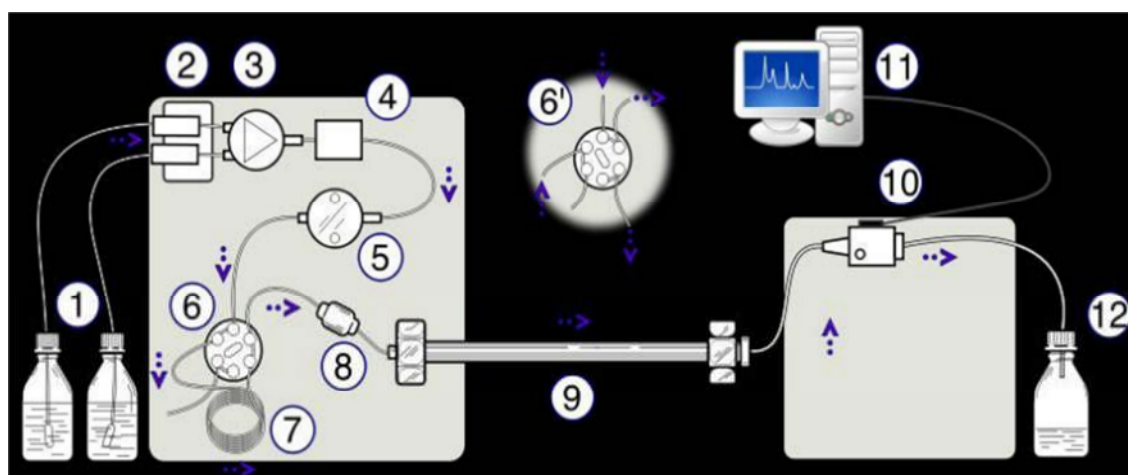


Figure II.5 : Schéma principal de la chromatographie en phase liquide à haute performance [24].

I.2 Appareillage :

Dans notre étude, nous avons réussi à réaliser une analyse qualitative et quantitative de certains composés phénoliques se trouvant dans nos différents extraits en utilisant HPLC série Agilent 1100, cette analyse a été effectuée au laboratoire privé **BEKER** de Dar-El-Beida. Les différentes parties constituant l' HPLC sont décrites ci-dessous:

➤ Un réservoir de solvant (éluant) :

Il contient la phase mobile en quantité suffisante. Plusieurs flacons d'éluants (solvants de polarités différentes) sont disponibles pour pouvoir réaliser des gradients d'élution (mélange de plusieurs solvants à des concentrations variables) à l'aide de la pompe doseuse.

➤ La pompe :

Elle est munie d'un système de gradient permettant d'effectuer une programmation de la nature du solvant. Elle permet de travailler :

- en mode isocratique, c'est-à-dire avec 100% d'un même éluant tout au long de l'analyse.
- en mode gradient, c'est-à-dire avec une variation de la concentration des constituants du mélange d'éluants.

➤ Vanne d'injection :

C'est un injecteur à boucles d'échantillonnage. Il existe des boucles de différents volumes, nous utiliserons une boucle de 5 μ l. Le choix du volume de la boucle se fait en fonction de la taille de la colonne et de la concentration supposée des produits à analyser. Le système de la boucle d'injection permet d'avoir un volume injecté constant, ce qui est important pour l'analyse quantitative.

➤ La colonne :

Une colonne est un tube construit dans un matériau le plus possible inerte aux produits chimiques, souvent en inox ou en verre. Sa section est constante, de diamètre compris entre 4 et 20 mm pour des longueurs généralement de 15 à 30 cm. Au-delà, les importantes pertes de charges exigeraient des pressions de liquide beaucoup trop élevées.

➤ La phase stationnaire :

- La phase normale:

La phase normale est constituée de gel de silice. Ce matériau est très polaire. Il faut donc utiliser un éluant apolaire. Ainsi lors de l'injection d'une solution, les produits polaires sont retenus dans la colonne, contrairement aux produits apolaire qui sortent en tête. L'inconvénient d'une telle phase, c'est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.

- La phase inverse :

La phase inverse est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C 8 et C18). Cette phase est apolaire et nécessite donc un éluant polaire (ACN, MeOH, H₂O). Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui seront élués en premier. Contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

➤ Détecteur :

Un détecteur à barrettes de diodes(DAD) permet de mesurer directement l'absorbance sur plusieurs longueurs d'onde à la fois, on évite ainsi le balayage, et donc un mécanisme compliqué et précis.

L'ordinateur est muni d'un logiciel spécialisé Agilent ChemStation.

I.3 Développement d'une méthode chromatographique pour le dosage des polyphénols :

Avant de trouver une méthode fiable pour l'identification des polyphénols par HPLC on a essayé plusieurs méthodes en variant à chaque fois un paramètre, à la fin nous avons arrivé à développer une méthode qui assure une bonne séparation chromatographique :

I.3.1 Les conditions chromatographiques :

- Colonne : C18 de 15cm (150 mm x4,6 mm).(KNAUER).
- phase mobile : (MeOH/ H₂O/ ACN (acétonitrile) ; 60%/20%/20% ; V/V/V).
- débit : Q= 1ml/min.

- volume d'injection : $V=5\mu\text{l}$.
- longueur d'onde : $\lambda= 254 \text{ nm}$.
- temps d'injection : $t=20\text{min}$.
- température $T=22^\circ\text{C}$.
- Pression $P=118 \text{ bar}$.

Chapitre III :

Résultats et discussion

Dans ce chapitre nous allons suivre la cinétique d'extraction de certains composés phénolique (acide gallique, phénol) en utilisant une méthode instrumentale (HPLC).

En ce qui concerne l'extraction de ces composés à partir du grignon d'olive nous avons suivi la cinétique d'extraction par éthanol, méthanol et acétate d'éthyle.

Pour la margine nous avons suivi la cinétique d'extraction par éthanol et par acétate d'éthyle.

La quantification des composés phénoliques dans les extraits de margine et du grignon d'olive a été effectuée par la technique chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse développée au laboratoire privé **BEKER** de Dar-El-Beida.

I Méthode instrumentale (HPLC) :

I.1 Profil phénolique des étalons :

Les étalons (Acide gallique et phénol) ont été préparés dans le méthanol avec des concentrations de 0,016 g/l ; les rapports chromatographiques correspondant aux étalons sont regroupés dans l'annexe 1.

Le tableau suivant récapitule les temps de retentions correspondants aux pics des étalons ainsi que leurs surfaces.

Tableau III.1 : données chromatographiques des standards.

Les monomères phénoliques	Temps de rétention (min)	Aire [mAU*s]	Aire %
Acide gallique	1.454	241.40	96.82
Phénol	2.016	102.27	65.64

I.2 Analyse des échantillons extraits :

Les valeurs obtenues pour la cinétique d'extraction de l'acide gallique et du phénol à partir du grignon d'olive et de la margine par plusieurs solvants (eau, éthanol, méthanol, Acétate d'éthyle) sont représenté dans les tableaux III.2-5 et les figures III 1-4.

Les profils phénoliques de certains extraits du grignon d'olive et de la margine issues du procédé d'extraction par distillation sont regroupés dans l'annexe 2.

Le calcul des concentrations a été effectué en se basant sur les surfaces des pics correspondants aux étalons et leurs concentrations tel que :

$$0,016\text{g/l} \longrightarrow S_{\text{Référence.}}$$

$$C_x \longrightarrow S_x$$

Avec : $S_{\text{Référence}}$: surface du pic de l'étalon (la surface majoritaire).

S_x : surface du pic de l'étalon dans l'échantillon

C_x : la concentration.

I.2.1 Grignon d'olive :

I.2.1.1 Acide gallique :

Tableau III.2 : Evaluation de l'acide gallique dans les extraits du grignon d'olive ainsi que le rendement d'extraction.

Acétate d'éthyle										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
Aire	0	0,94842	1,02	1,2026	1,305	1,3196	1,454	1,52	1,567	1,748
C (mg/l)	0	0,06286	0,068	0,0797	0,086	0,0875	0,096	0,101	0,1039	0,116
m (mg)	0	0,01257	0,013	0,0157	0,017	0,0169	0,018	0,019	0,0195	0,022
Ethanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
Aire	0	10,3369	14,98	15,721	16,7	16,768	17,67	17,7	17,72	17,79
C (mg/l)	0	0,68512	0,993	1,0419	1,107	1,1114	1,171	1,173	1,1745	1,179

m (mg)	0	0,13702	0,197	0,2048	0,216	0,2147	0,224	0,223	0,2209	0,221
Méthanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
Aire	0	7,6801	10,82	10,905	11,45	11,486	11,54	12,78	13,896	14,9
C (mg/l)	0	0,50903	0,717	0,7228	0,759	0,7613	0,765	0,847	0,921	0,987
m (mg)	0	0,10181	0,142	0,1421	0,148	0,1471	0,146	0,161	0,1732	0,186

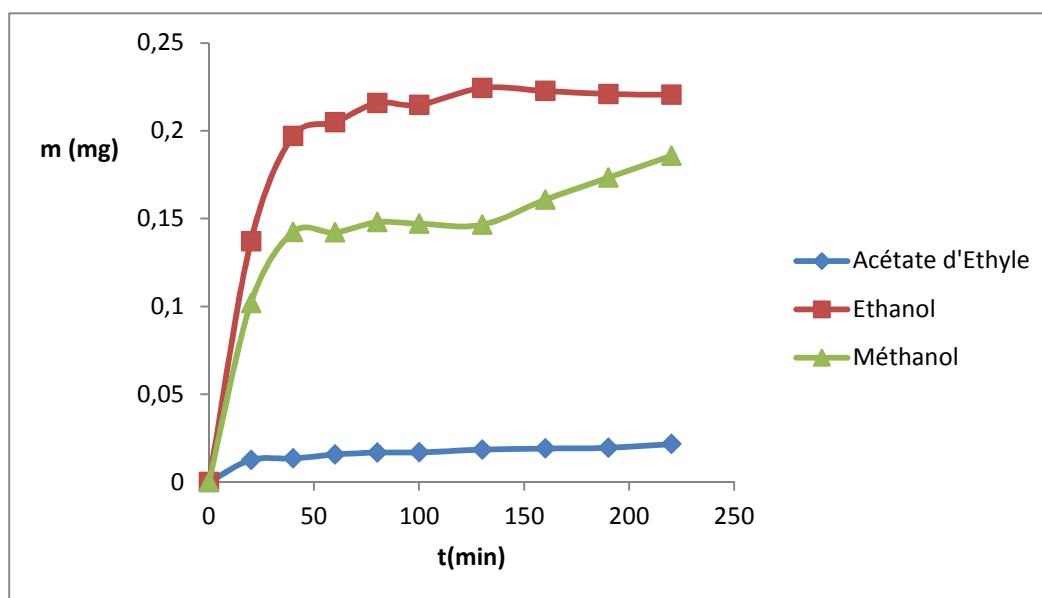


Figure III.1 : évolution de la cinétique d'extraction de l'acide gallique.

I.2.1.2 Phénol :

Tableau III.3 : Evaluation du phénol dans les extraits du grignon d'olive ainsi que le rendement d'extraction.

Acétate d'éthyle										
t(min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
surf pic	0	0,4538	0,75	1,046	1,791	2,142	2,445	3,1	3,21	3,691
C (mg/l)	0	0,071	0,117	0,164	0,28	0,335	0,383	0,5	0,502	0,577
m (mg)	0	0,0142	0,023	0,032	0,055	0,065	0,073	0,1	0,096	0,108
Ethanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
surf pic	0	0,5488	1,803	2,533	2,615	3,077	3,151	3,6	4,331	6,766
C (mg/l)	0	0,0859	0,282	0,396	0,409	0,481	0,493	0,6	0,677	1,059
m (mg)	0	0,0172	0,056	0,078	0,08	0,093	0,094	0,1	0,127	0,198
Méthanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
Aire	0	3,4189	6,131	6,325	6,371	7,44	11,02	12	17,3	17,4
C (mg/l)	0	0,5349	0,959	0,99	0,997	1,164	1,724	1,9	2,706	2,722
m (mg)	0	0,107	0,19	0,195	0,194	0,225	0,33	0,4	0,509	0,509

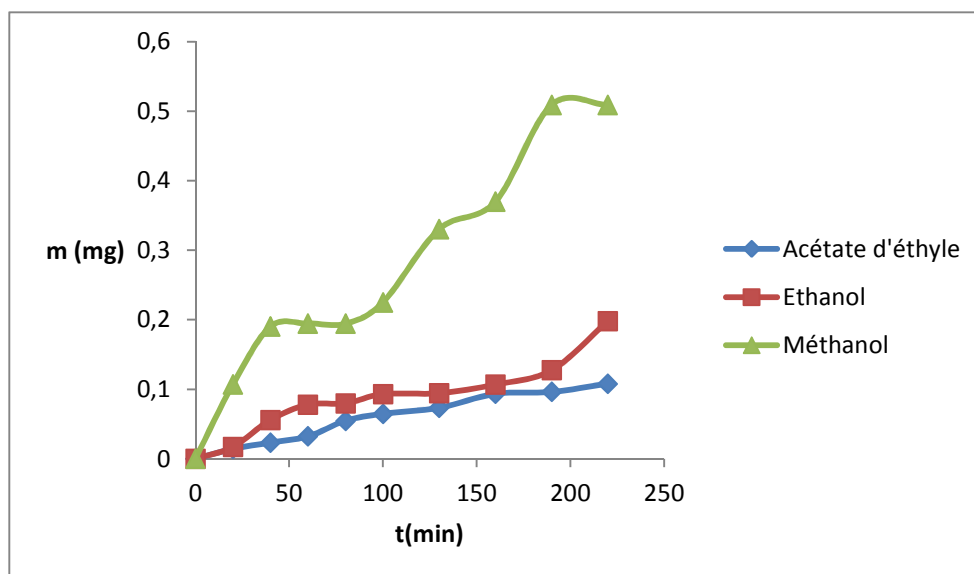


Figure III.2 : Evolution de la cinétique d'extraction du phénol.

I.2.2 Margine :

I.2.2.1 Acide gallique :

Tableau III.4 : Evaluation de l'acide gallique dans les extraits de margine ainsi que le rendement d'extraction.

Acétate d'éthyle										
t(min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
Aire	0	4,3253	8,5293	13,529	14,031	15,07	19,27	20,48	27,33	35,56
c(mg/l)	0	0,2867	0,5653	0,8967	0,93	0,999	1,277	1,357	1,811	2,357
m (mg)	0	0,0573	0,1121	0,1763	0,1812	0,193	0,245	0,258	0,341	0,441
Ethanol										
t(min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
Aire	0	42,842	43,066	47,281	58,092	64,06	68,53	69,65	80,42	82,47
C (mg/l)	0	2,8395	2,8544	3,1338	3,8502	4,246	4,542	4,616	5,33	5,466
m (mg)	0	0,5679	0,566	0,6161	0,7504	0,82	0,87	0,879	1,003	1,022

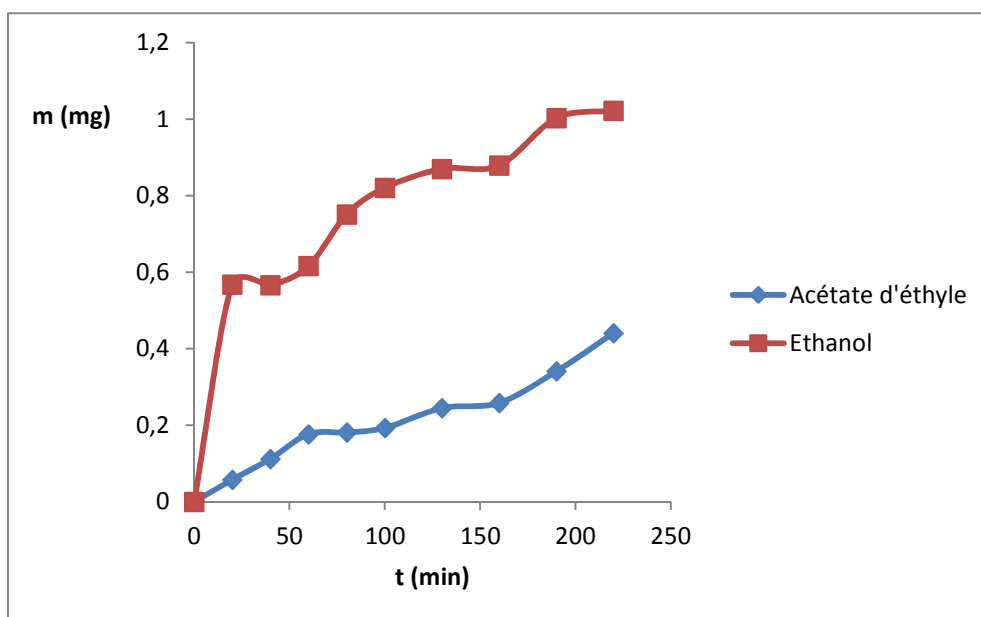


Figure III.3: évolution de la cinétique d'extraction de l'acide gallique.

I.2.2.2 Phénol :

Tableau III.5: Evaluation du phénol dans les extraits de margine ainsi que le rendement d'extraction.

Acétate d'éthyle										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
Aire	0	3,3253	3,529	3,529	4,031	4,071	4,275	8,48	10,33	11,56
C (mg/l)	0	0,5202	0,552	0,552	0,631	0,637	0,669	1,327	1,615	1,808
m (mg)	0	0,104	0,109	0,109	0,123	0,123	0,128	0,253	0,304	0,338
Ethanol										
t (min)	0	20	40	60	80	100	130	160	190	220
Aire	0	19,879	23,56	24,57	27,46	27,66	27,95	28,48	29,87	31,01
C (mg/l)	0	3,1099	3,685	3,844	4,296	4,327	4,373	4,456	4,672	4,851
m (mg)	0	0,622	0,731	0,756	0,837	0,836	0,837	0,848	0,879	0,907

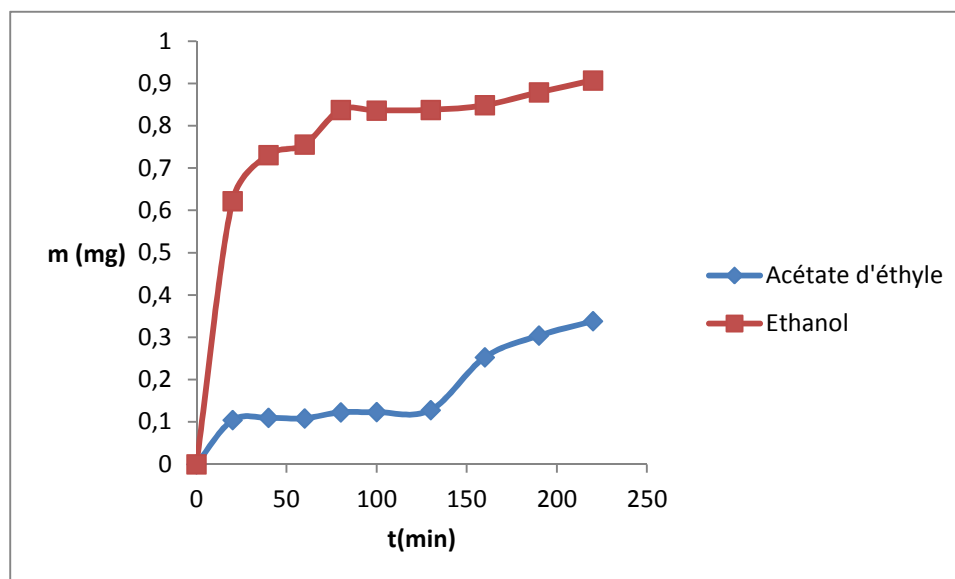


Figure III.4 : évolution de la cinétique d'extraction du phénol.

D'après notre analyse par HPLC on observe une augmentation des teneurs en acide gallique et en phénol dans nos extraits suite à l'augmentation du temps d'extraction.

L'éthanol est pratiquement le meilleur solvant pour l'extraction de l'acide gallique ainsi que pour le phénol. Sachant que l'éthanol est un solvant moyennement polaire qui peut solubiliser partiellement des composés phénoliques polaires comme acide gallique et le phénol.

En ce qui concerne l'éthanol, à la fin du processus d'extraction la quantité d'acide gallique dans l'extrait du grignon d'olive est 0,221 mg, tandis que la quantité du phénol extraite est au voisinage de 0,198 mg.

Pour la margine 1,022 mg est la quantité de l'acide gallique enregistré à la fin de l'extraction par éthanol, tandis que on a pu extraire 0,907 mg du phénol.

Nos résultats montrent que l'acide gallique est plus abondant que le phénol dans nos extraits, bien que l'acide caféique, Tyrosol, Hydroxytyrosol, et l'acide vanillique sont considérés comme les composés phénoliques majeurs dans la margine et le grignon.

Selon De Marco et al. (2007), le composé phénolique le plus abondants dans les extraits de margines est l'hydroxytyrosol, qui est formé de l'hydrolyse de l'oleuropéine durant l'extraction d'huile. Dans ses traveaux Marco et al (2007) a enregistré des valeurs de 1225 mg/l.

Conclusion générale

L'analyse chromatographique par HPLC de l'extrait phénolique de la margine et du grignon d'olive issues du procédé d'extraction par décoction a révélé la présence de nombreux composés phénoliques, parmi lesquels deux composés sont identifiés et quantifiés: Acide gallique et le phénol.

L'analyse par HPLC est quantitative et qualitative avec des résultats très précis ce qui rend cette méthode la plus convenable pour l'évaluation quantitative et l'identification des polyphénols dans nos extraits.

Les prochains travaux doivent s'intéresser à la quantification et l'identification des flavonoïdes dans les rejets d'huilerie à cause de leurs effet antioxydant considérable et l'extraction des composé phénolique majeures dans la margine et le grignon comme Tyrosol et Hydroxytyrosol .

*Références
bibliographiques*

- [1]. Benyahia N et Zein K., (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. *Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) (SBA) à Swiss Environmental Solutions for Emerging Countries (SESEC II)*, 1-8
- [2].Zawlotzki Guivarch E. (2004).Traitement des polluants organiques en milieu aqueux par procédé électrochimique d'oxydation avancée « electron Fenton ».Application à la minéralisation des colorants synthétiques.Thèse de doctorat .Université de Marne-la-Vallée.
- [3]. Dhaoudi et Marrot B.(2008).olive mill wastewater treatment in a membrane bioreactor :process feasibility and performance.Chemical engineering journal .
- [4]. Rnalli A. (1991).the effluent from olive mills :proposals for re-use and purification with reference to Italian legislation. *Olivae*. 38,19-34.
- [5]. Derouiche M,LeMignot V,Lounici H, Belhocine D,Grib H, Pauss A et Mameri N.(2004). A compact process for the treatment of olive mill wastewater by combining OF and UV/H₂O₂ techniques. *Desalination* 169,81-88.
- [6].D'Annibale A., Federici F., Fenice M., Sermanni G. G., Petruccioli M., Vassilev N., (2003). Residues of olive oil extraction process: possible biotechnological approach. *Science and technology*, **85**, 1-4
- [7]. Moussaoui R., (2007). Valorisation des sous produits de l'huilerie d'olive : grignons et margines. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammri, Tizi Ouzou, Algérie, 133 pp
- [8]. Mbourmad S. (2011). extraction des polyphénols à partir des margines et valorisation en tant qu'antioxydant naturel dans les huiles végétales. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magister en sciences agronomiques. Ecole nationale supérieure agronomique elharrach .Alger.
- [9].Hamdi M.,(1992). Toxicity and biodegradability of olive mill wastewaters in batch anaerobic digestion. *Appl Biochem Biotechnol*, **37**, 155.
- [10]. Paixão S. M., Anselmo A. M.,(2002). Effect of olive mill wastewaters on the oxygen consumption by activated sludge microorganisms: An acute toxicity test method. *Journal of Applied Toxicology*, **22**, 173-176.

- [11]. Khoufi S, Aloui F, Sayadi S. (2006). Treatment of olive oil mill waste water by combined process electro-Fenton reaction and anaerobic digestion. *Water research* 40, 2007-2016.
- [12]. Rodis P. S., Karathanos V. T., Mantzavinou A., (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 596-601.
- [13]. Ross R. (1999). Atherosclerosis, an inflammatory disease. *New England journal of Medicine* .340 (2) pp115-126.
- [14]. Viera O, Laranjinha J, Madeira V et Almeida L. (1998). Cholesteryl ester hydroperoxyde formation in myoglobin-catalysed low density lipoprotein oxidation : concerted anti oxidant activity of caffeic and p-coumaric acids with ascorbate. *biochemical Pharmacology* .55 (3) pp 333-340.
- [15]. Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux (Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique). Edition technique et documentation, Lavoisier.
- [16]. BOUDISSA F. Influence des radiations micro-ondes sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive imprègne de margine. Thèse de Magister. Département de chimie. Université de Mouloud Mameri. Tizi ouzou.
- [17]. Site: <http://www.chinaadditives.fr/GallicAcid.htm>.
- [18]. NIEMETZ R, GROOS G.G. (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry*, 66, 2001-2011.
- [19]. WOLFE K., WU X, LIUR.H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of agriculture and food chemistry* ,51, 609-614.
- [20]. POLEWSKI K., KNIAT S, SLAWINSKA D. (2002). Gallic acid, a natural antioxidant, in aqueous and micellar environment: spectroscopic studies. *Current Topics in Biophysics* .26, 217-227.
- [21]. A. Pichard. (2005). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: phénol. INERIS.

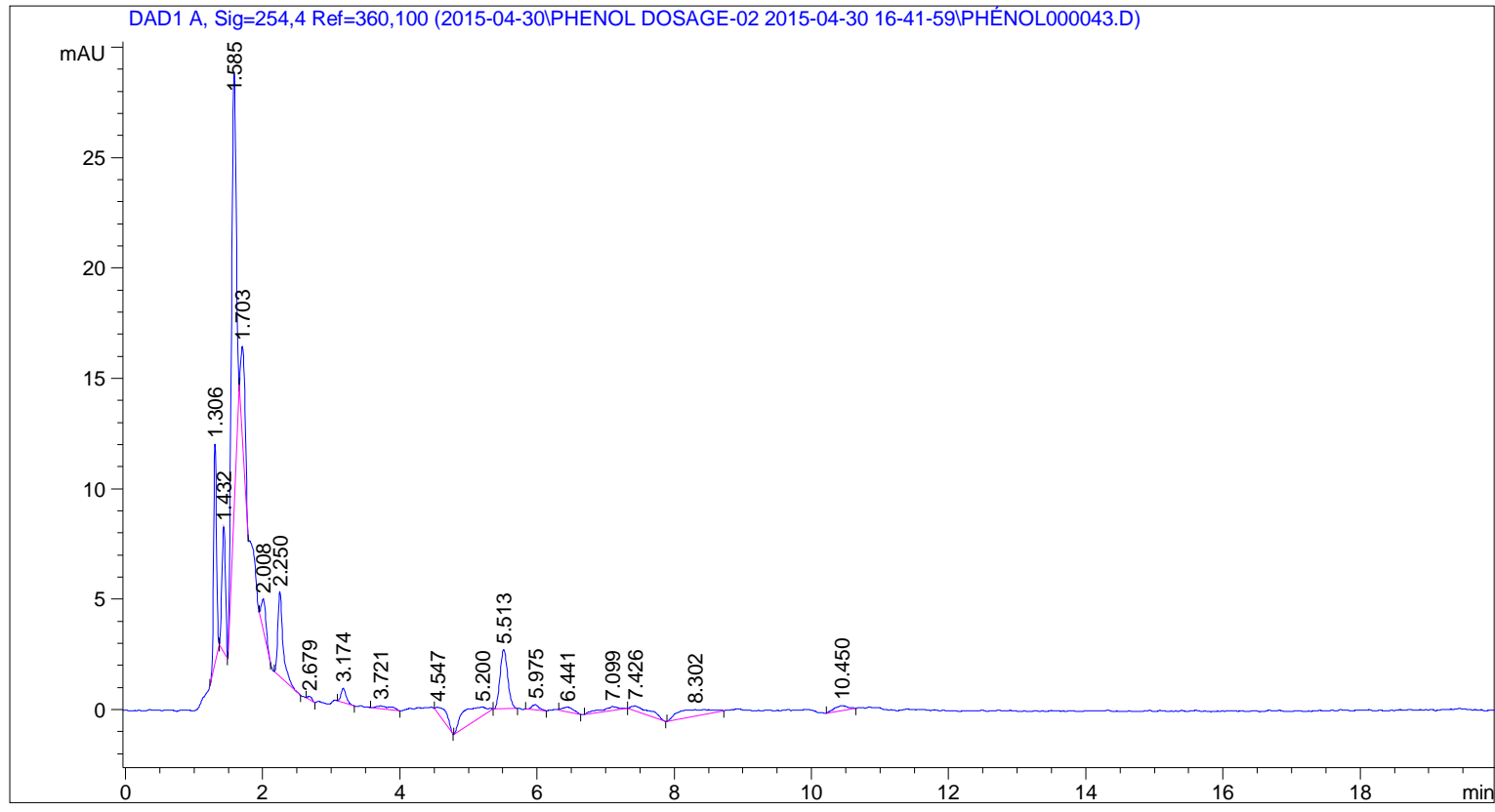
- [22]. J. Metzger, « Phénols », DVD Encyclopédie Universalis version 10 (2004).
- [23]. K.Werisermel, H.J.Arpe, (1981). « Chimie organique industrielle : principaux produits de base et intermédiaire : produits d'oxydation du benzène et leurs dérivés », Masson, pp.320-321
- [24]. F. Rouessac, A. Rouessac,(1992). Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes -. Ed Masson.

Annexes

```

=====
Acq. Operator   : DS                               Seq. Line :   43
Acq. Instrument : HPLC07380                       Location  : Vial 43
Injection Date  : 01/05/2015 07:35:58            Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 5.0 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\2015-04-30\PHENOL DOSAGE-02 2015-04-30 16-41-59\POLYPH.M
Last changed   : 30/04/2015 16:19:35 by DS
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\POLYPH.M
Last changed   : 04/05/2015 11:33:24 by DS
                (modified after loading)
  
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.306	BB	0.0478	28.86749	9.95911	10.9662
2	1.432	BB	0.0573	20.05768	5.66714	7.6195
3	1.585	BB	0.0793	92.13171	19.42875	34.9989
4	1.703	BB	0.0806	20.42103	4.20946	7.7575
5	2.008	BB	0.0778	6.76611	1.41359	2.5703
6	2.250	BB	0.0776	20.25709	3.83657	7.6952
7	2.679	BB	0.0707	5.67722e-1	1.36091e-1	0.2157
8	3.174	BB	0.0794	3.32738	6.53876e-1	1.2640

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
9	3.721	BB	0.2037	2.27792	1.37202e-1	0.8653
10	4.547	BB	0.2696	5.39392	2.46170e-1	2.0490
11	5.200	BB	0.4574	15.52223	4.08452e-1	5.8966
12	5.513	BB	0.1204	20.77394	2.68235	7.8916
13	5.975	BB	0.1131	1.70112	2.27791e-1	0.6462
14	6.441	BB	0.1453	2.49526	2.21791e-1	0.9479
15	7.099	BB	0.2340	3.41244	1.79357e-1	1.2963
16	7.426	BB	0.3052	5.79386	2.30574e-1	2.2010
17	8.302	BB	0.4226	10.37204	2.93280e-1	3.9401
18	10.450	BB	0.1883	3.10280	2.17613e-1	1.1787

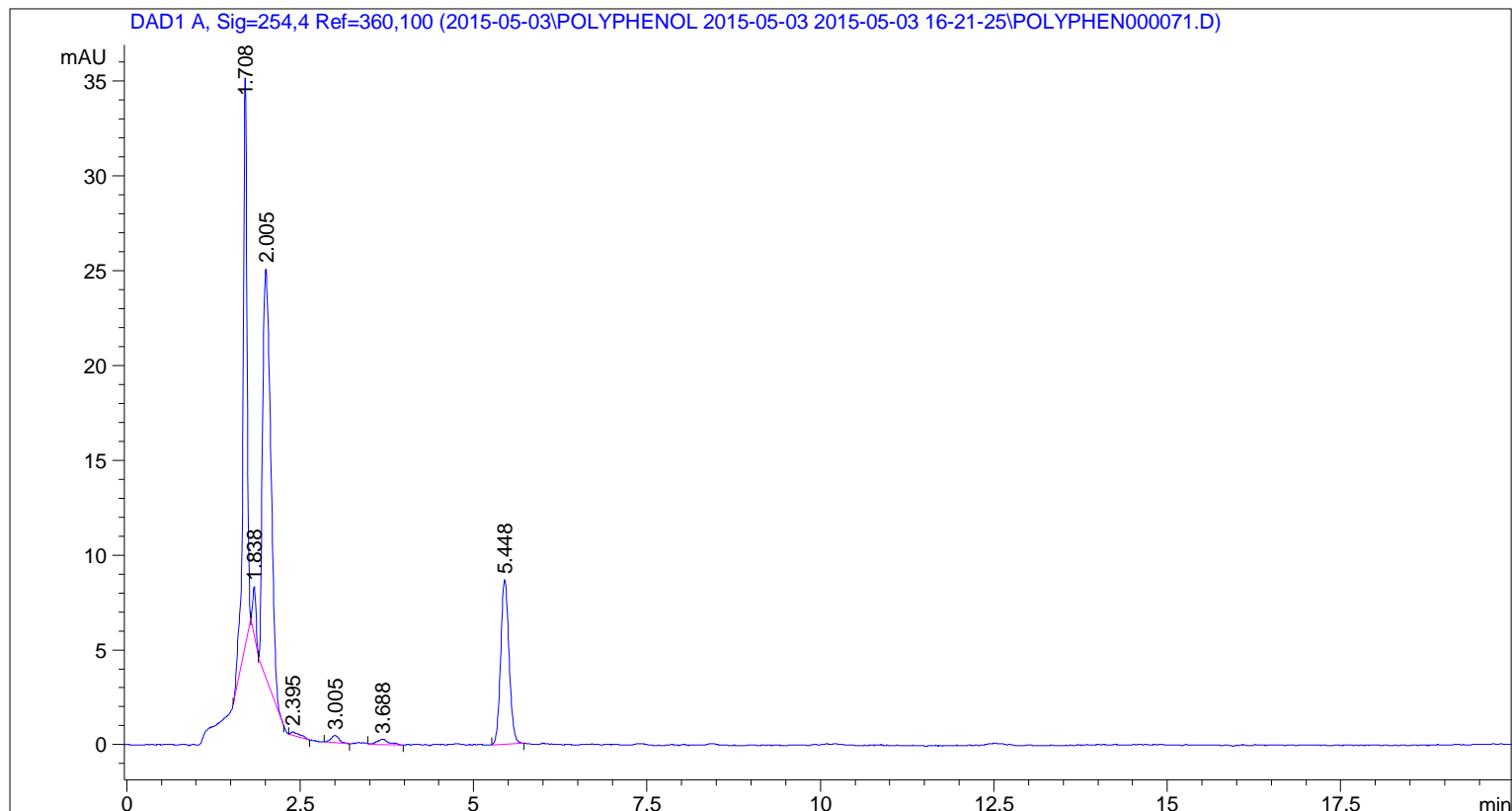
Totals : 263.24174 50.14917

=====
*** End of Report ***


```

=====
Acq. Operator   : DS                               Seq. Line :    8
Acq. Instrument : HPLC07380                       Location  : Vial 71
Injection Date  : 03/05/2015 18:51:37             Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 5.0 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\2015-05-03\POLYPHENOL 2015-05-03 2015-05-03 16-21-25\
                  POLYPH.M
Last changed    : 03/05/2015 16:20:31 by DS
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\POLYPH.M
Last changed    : 04/05/2015 11:02:38 by DS
                  (modified after loading)
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.708	BB	0.0614	121.74117	29.96440	31.4337
2	1.838	BB	0.0543	8.50508	2.59216	2.1960
3	2.005	BB	0.1333	175.82921	21.52558	45.3993
4	2.395	BB	0.1372	1.85131	1.78270e-1	0.4780
5	3.005	BB	0.1333	3.33672	3.92128e-1	0.8615
6	3.688	BB	0.1687	3.40078	2.82022e-1	0.8781
7	5.448	BB	0.1317	72.63085	8.67323	18.7534

Sample Name: DIS MARG ACETATE-1

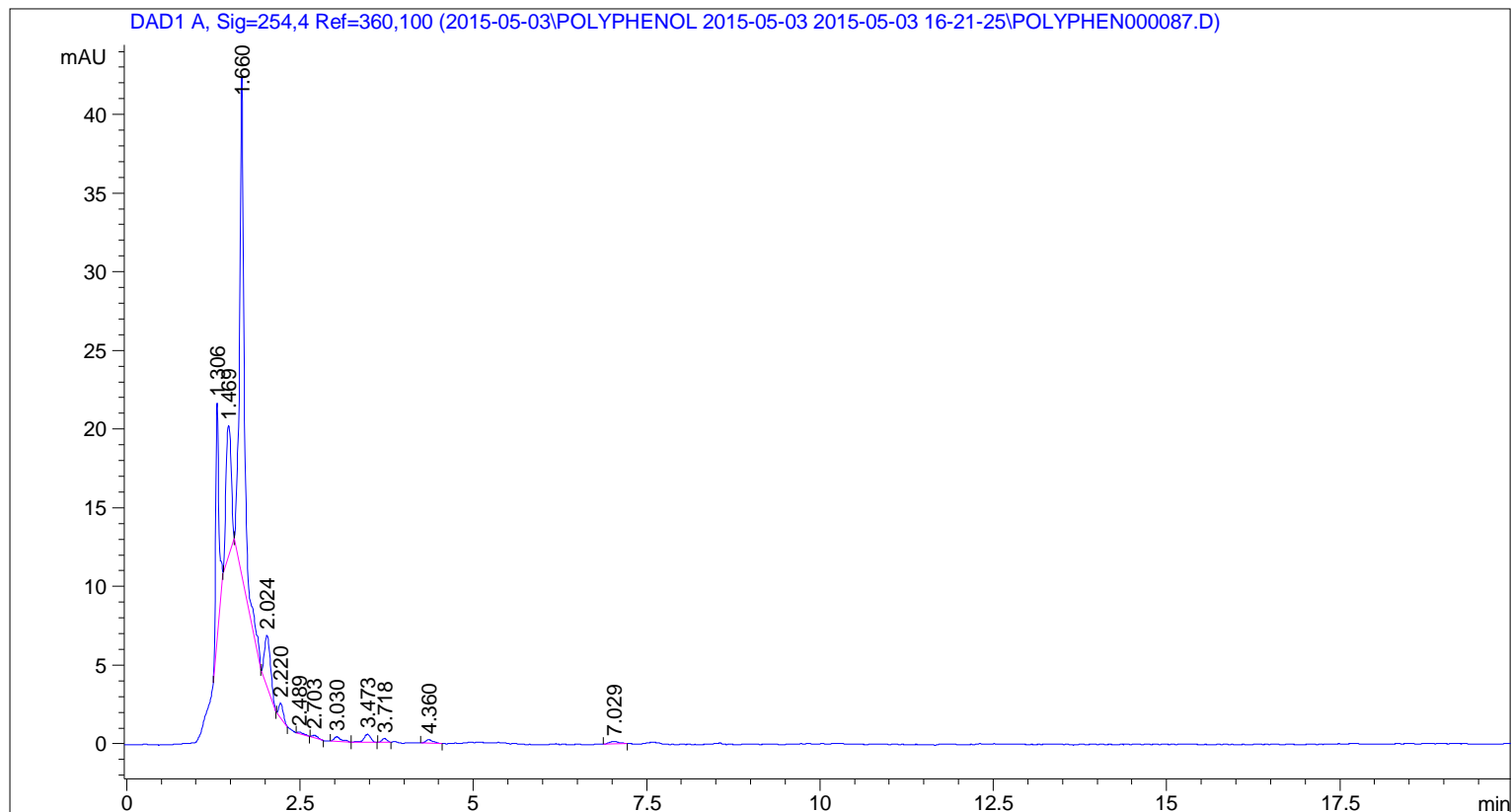
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
Totals :				387.29512	63.60779	

=====
*** End of Report ***

```

=====
Acq. Operator   : DS                               Seq. Line :   24
Acq. Instrument : HPLC07380                       Location  : Vial 87
Injection Date  : 04/05/2015 00:31:48            Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 5.0 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\2015-05-03\POLYPHENOL 2015-05-03 2015-05-03 16-21-25\
                POLYPH.M
Last changed   : 03/05/2015 16:20:31 by DS
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\POLYPH.M
Last changed   : 04/05/2015 11:02:38 by DS
                (modified after loading)
  
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.306	BB	0.0492	47.91092	15.01293	17.2585
2	1.469	BB	0.0885	43.06605	8.30066	15.5133
3	1.660	BB	0.0697	150.93997	31.61851	54.3718
4	2.024	BB	0.0970	19.87874	3.26592	7.1607
5	2.220	BB	0.0701	3.95704	9.21820e-1	1.4254
6	2.489	BB	0.0789	6.06567e-1	1.09019e-1	0.2185
7	2.703	BB	0.0975	8.67414e-1	1.41552e-1	0.3125

Sample Name: DIS MARG ETHOH-1

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
8	3.030	BB	0.1103	2.28915	3.02592e-1	0.8246
9	3.473	BB	0.1077	3.48858	5.10500e-1	1.2567
10	3.718	BB	0.0754	1.24993	2.53860e-1	0.4503
11	4.360	BB	0.1134	1.63046	2.12809e-1	0.5873
12	7.029	BB	0.1506	1.72233	1.66631e-1	0.6204

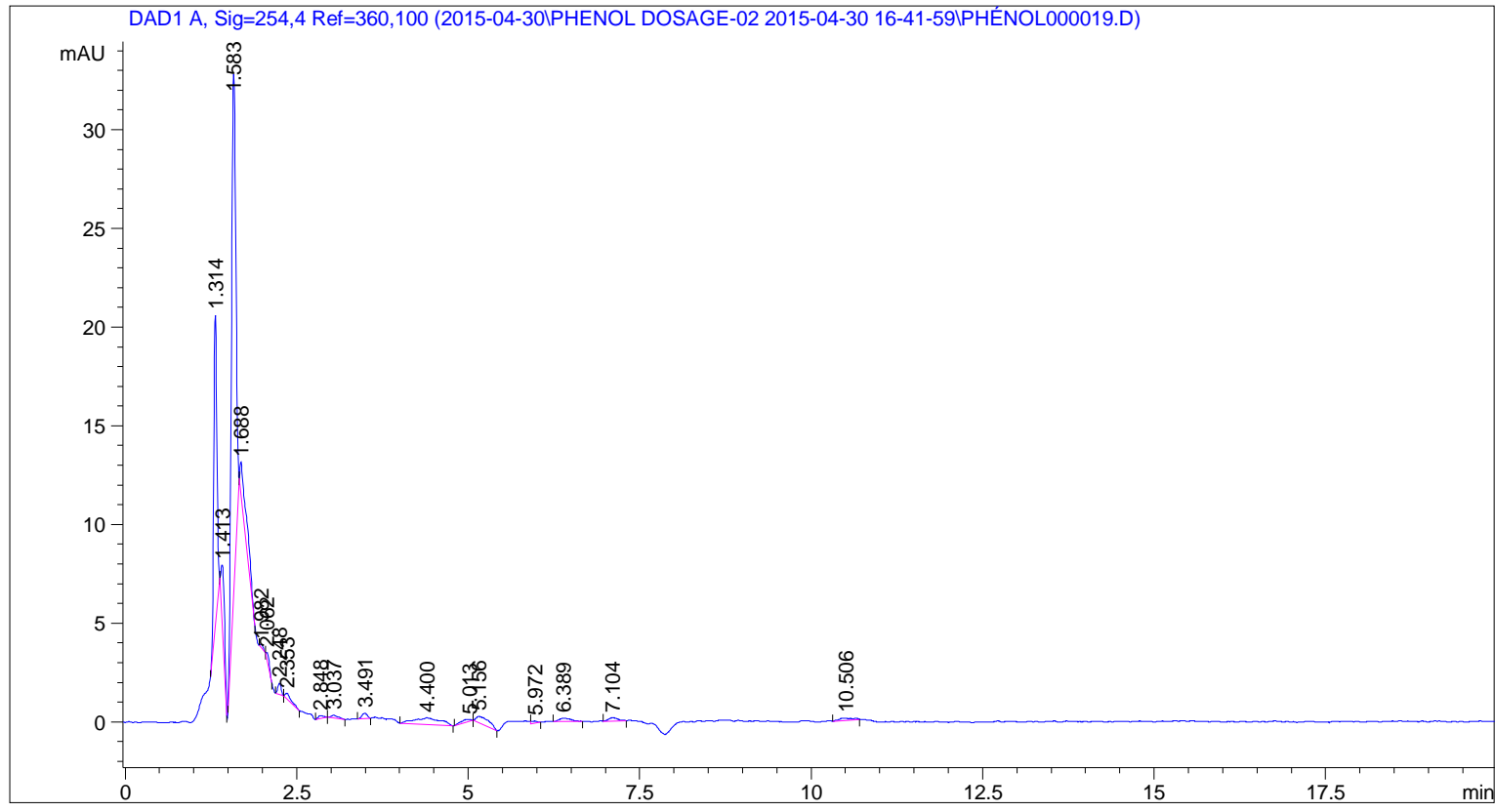
Totals : 277.60715 60.81680

=====
*** End of Report ***

```

=====
Acq. Operator   : DS                               Seq. Line :   19
Acq. Instrument : HPLC07380                       Location  : Vial 19
Injection Date  : 30/04/2015 23:05:51            Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 5.0 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\2015-04-30\PHENOL DOSAGE-02 2015-04-30 16-41-59\POLYPH.M
Last changed   : 30/04/2015 16:19:35 by DS
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\POLYPH.M
Last changed   : 04/05/2015 11:33:24 by DS
                (modified after loading)
  
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.314	BB	0.0489	49.81649	15.75909	22.2942
2	1.413	BB	0.0638	11.48561	2.92727	5.1401
3	1.583	BB	0.0724	117.09283	26.05242	52.4022
4	1.688	BB	0.1136	15.18302	1.70901	6.7948
5	1.982	BB	0.0554	5.64871e-1	1.67270e-1	0.2528
6	2.062	BB	0.0813	1.23356	2.52782e-1	0.5520
7	2.248	BB	0.0517	1.84528	5.71326e-1	0.8258
8	2.353	BB	0.0934	1.75896	2.72167e-1	0.7872

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
9	2.848	BB	0.0789	8.27062e-1	1.58524e-1	0.3701
10	3.037	BB	0.0981	9.65428e-1	1.33982e-1	0.4321
11	3.491	BB	0.0844	1.37887	2.66184e-1	0.6171
12	4.400	BB	0.3327	9.35027	3.42245e-1	4.1845
13	5.013	BB	0.1630	1.36356	1.05375e-1	0.6102
14	5.156	BB	0.1981	4.89235	3.16925e-1	2.1895
15	5.972	BB	0.0813	6.57328e-1	1.10653e-1	0.2942
16	6.389	BB	0.1575	2.02417	1.71735e-1	0.9059
17	7.104	BB	0.1152	1.46230	1.68605e-1	0.6544
18	10.506	BB	0.1796	1.54839	1.06520e-1	0.6929

Totals : 223.45036 49.59208

=====
*** End of Report ***