

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Ecole Nationale Polytechnique  
Département Génie de l'Environnement  
Laboratoire des Sciences et Techniques de  
l'Environnement (LSTE)

## *Thèse de Doctorat en Sciences en Génie de l'Environnement*

Présentée par :

**Madame BERTOUCHE Sadjia**

Magister en Génie des Procédés de l'USTHB

Intitulé

# **Valorisation de déchets de l'industrie du bois et application du pinène comme solvant vert**

Soutenue publiquement le 21/10/2013 devant le jury composé de :

**Présidente :** Madame K.M. MOUSSAOUI, Professeur, ENP  
**Directrices de thèse :** Madame C. BOUTEKEDJIRET, Professeur, ENP  
Madame A. HELLAL, Professeur, ENP  
**Examineurs :** Madame F. BENTAHAR, Professeur, USTHB  
Madame Z. FERHAT, Professeur, ENSA  
Monsieur K. DAOUD, Professeur, USTHB  
**Invité :** Monsieur F. CHEMAT, Professeur, Université d'Avignon,  
France

**ENP 2013**

## **Remerciements**

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire Sciences et Techniques de l'Environnement(LSTE) de l'Ecole Nationale Polytechnique d'El-Harrach, sous la direction du Professeur **Chahrazed BOUTEKEDJIRET**, et la co-direction du Professeur **Amina HELLAL**.*

*Je tiens à leur exprimer ma profonde reconnaissance. Leur grande expérience et leurs précieux conseils ont permis la réalisation de cette thèse. J'ai été très sensible à leur grande disponibilité, leurs recommandations et à la confiance qu'elles ont bien voulu m'accorder. Qu'elles veuillent bien trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.*

*Je réitère mes chaleureux remerciements à Madame le Professeur **Chahrazed BOUTEKEDJIRET**, ce fut un privilège de travailler à ses côtés et j'ai beaucoup appris avec elle tant du point de vue scientifique que du point de vue humain.*

*Je sais gré à Madame **Khadija MOUSSAOUI**, Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'El Harrach, pour l'honneur qu'elle me fait d'avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

*Que Madame **Fatiha BENTAHAR**, Professeur à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Monsieur **Kamel DAOUD** Professeur à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene et Madame **Zoulikha FERHAT** Professeur à l'ENSA, qui ont accepté de participer à ce jury de thèse, trouvent ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail.*

*Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Farid CHEMAT** et Directeur du Groupe de recherche en Eco-Extraction des produits Naturels(GREEN), LSQPOV, UMR 408 de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, qui malgré l'éloignement à suivi de très près l'évolution de ce travail, et d'avoir accepté de m'honorer de sa présence.*

*Que Madame **Valérie TOMAO**, Docteur HDR ainsi que Madame **Karine RUIZ** Assistante-Ingénieur, au sein du Groupe de recherche en Eco-Extraction des produits Naturels(GREEN), LSQPOV, UMR 408 à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance pour leur collaboration dans cette étude.*

*Je remercie vivement Monsieur **Fatah HELLAL** Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'El Harrach, pour la réalisation des observations en microscopie.*

*Que Monsieur **Mohamed BENALIA** (Laboratoire de technologie Alimentaire de l'ENSA ex INA) trouve ici l'expression de ma gratitude pour l'analyse des Huiles essentielles.*

*Je tiens à remercier et à exprimer mon affection et ma reconnaissance à Mademoiselle **Meriem BOUKROUFA**, que j'ai co-encadrée pour son Mémoire de Fin d'Etudes d'Ingénieur, pour sa présence et sa disponibilité, je lui souhaite une grande réussite.*

*Je tiens aussi à remercier tous mes amis et collègues qui m'ont aidé de prêt ou de loin et une petite pensée pour **Dalia** qui m'a donné la chance de réaliser mon rêve.*

*Enfin, je ne saurais terminer sans remercier l'ensemble de ma famille en particulier mes **parents** et ma sœur **Amel** pour leurs encouragements et leur soutien de tous les instants.*

*Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour remercier et dédier ce travail à mon mari **Rabah** pour sa patience, son aide, son réconfort, son soutien et bien plus encore et je tiens à lui faire part de mon profond attachement et l'assurer de tout mon amour.*

# Avant-propos

Une partie des travaux relatés dans cette thèse a donné lieu à la publication de deux articles scientifiques dans des journaux internationaux à comité de lecture. Ces travaux ont également été valorisés scientifiquement par quatre communications par affiche et une soutenance d'un projet de fin d'étude.

- **Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture**

1. **Sadjia Bertouche**, Valérie Tomao, Karine Ruiz, Amina Hellal, Chahrazed Boutekedjiret, Farid Chemat. First approach on moisture determination in food products using  $\alpha$ -pinene as an alternative solvent for Dean–Stark distillation. *Food Chemistry* 134 (2012) 602–605.
2. **Sadjia Bertouche**, Valérie Tomao, Amina Hellal, Chahrazed Boutekedjiret, Farid Chemat. First approach on edible oil determination in oilseeds products using  $\alpha$ -pinene. *The Journal of Essential Oil Research* 25, 6 (2013) 439-443.

- **Communications par affiche**

1. **Sadjia Bertouche**, Meriem boukroufa, Amina Hellal, Chahrazed Boutekedjiret. Instant optimization of a microwave extraction process of vegetable bioactive principle. 2<sup>nd</sup> African congress on biology and health, 10-12 November (2012). Université de Setif, Algérie.
2. Chahrazed Boutekedjiret, **Sadjia Bertouche**, Amina Hellal.  $\alpha$ -Pinene as a Green Solvent: Alternative to Petrochemical Solvents. International Congress on Green Extraction of Natural Products (GENP) - April 16-17 (2013). Avignon. France.
3. **Sadjia Bertouche**, Meriem boukroufa, Amina Hellal, Chahrazed Boutekedjiret. Activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de pin (*Pinus halepensis*) extraite par entraînement à la vapeur d'eau et entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-onde. First Seminar in Engineering, Health and Analysis (SEHA), 05<sup>th</sup> May (2013). Algiers, Algeria.
4. **Sadjia Bertouche**, Valérie Tomao, Amina Hellal, Farid Chemat, Chahrazed Boutekedjiret. Valuation of pine needles (*Pinus halepensis* Miller). 5<sup>ème</sup> Congrès Maghrébin de Génie des Procédés (COMAGEP), 2-4 Juin (2013). Boumerdès, Algérie.

- **Encadrement**

1. *Boukroufa Meriem*: Extraction de composés végétaux à propriétés biocides ; Mémoire de Fin d'Etudes d'Ingénieur, Juin 2012 ; Département de Génie de l'Environnement. Ecole Nationale Polytechnique, Alger

*Table des*  
*matières*

# *Table des matières*

	<i>Page</i>
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
 <i>Introduction générale</i> .....	<b>01</b>
 <b>Chapitre I</b>	
<b><i>Extraction de l'huile essentielle des aiguilles de pin</i></b>	
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>06</b>
<b>I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>06</b>
<b>I.1 La matière végétale : Le pin</b> .....	<b>06</b>
I.1.1. Description botanique.....	06
I.1.2. Habitat et distribution.....	07
I.1.3. Utilisation du pin .....	09
I.1.4. Provenance et destination des déchets du bois.....	10
<b>I.2 L'huile essentielle de pin</b> .....	<b>11</b>
I.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle de pin.....	12
I.2.2. Localisation des huiles essentielles.....	14
I.2.3. Propriétés biologique des huiles essentielles de pin.....	14
<b>I.3. Les procédés d'extraction des huiles essentielles</b> .....	<b>16</b>
I.3.1. L'entraînement à la vapeur d'eau.....	16
I.3.2. L'hydrodistillation.....	16
I.3.3. L'extraction assistée par micro-ondes.....	16
<b>I.4. Activité antioxydante</b> .....	<b>17</b>
I.4.1. Oxydation et antioxydants.....	17
I.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante.....	18
<b>I.5. Activité antimicrobienne</b> .....	<b>18</b>
I.5.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	18
I.5.2. Paramètre de l'activité antimicrobienne.....	20
 <b>II. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>21</b>
<b>II.1. Matière végétale</b> .....	<b>21</b>
<b>II.2. Appareillages et protocoles expérimentaux</b> .....	<b>21</b>
<b>II.3. Méthodes de calcul et de mesure</b> .....	<b>24</b>
II.3.1. Le taux d'humidité.....	24
II.3.2. Rendement en huile essentielle.....	24
II.3.3. Activité antioxydante .....	25
II.3.4. Activité antimicrobienne.....	25
<b>II.4. Analyse de l'huile essentielle</b> .....	<b>27</b>

<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>28</b>
<b>III.1. Influence des paramètres opératoires.....</b>	<b>28</b>
III.1.1. Influence du temps d'extraction.....	28
III.1.2. Influence du débit de vapeur d'eau et de la puissance de chauffe par micro-ondes.....	30
<b>III.2. Impact des procédés d'extraction sur la structure de la matière         végétale.....</b>	<b>32</b>
<b>III.3. Composition de l'huile essentielle de pin.....</b>	<b>35</b>
<b>III.4. Etude comparative des quatre procédés d'extraction.....</b>	<b>39</b>
<b>III.5. Activité antioxydante.....</b>	<b>40</b>
<b>III.6. Activité antimicrobienne.....</b>	<b>40</b>
III.6.1. Détermination de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle.....	40
III.6.2. Détermination de l'activité antifongique de l'huile essentielle.....	44
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>45</b>
 <b><i>Chapitre II</i></b> <b><i>Valorisation des résidus d'extraction</i></b>	
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>47</b>
<b>I. POLYPHENOLS .....</b>	<b>47</b>
<b>II. PROCEDES D'EXTRACTION PAR SOLVANT.....</b>	<b>47</b>
<b>II.1. Extraction par Soxhlet .....</b>	<b>48</b>
<b>II.2. Extraction par Batch .....</b>	<b>48</b>
<b>II.3. Extraction par Ultrasons.....</b>	<b>48</b>
<b>II.4. Extraction assistée par micro-ondes.....</b>	<b>49</b>
<b>II.5. Extraction accélérée par solvants.....</b>	<b>49</b>
<b>II.6. Extraction par des fluides supercritiques .....</b>	<b>49</b>
<b>III. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>49</b>
<b>III.1. Matière végétale.....</b>	<b>49</b>
<b>III.2. Extraction par batch.....</b>	<b>49</b>
<b>III.3. Dosage des phénols totaux.....</b>	<b>50</b>
<b>IV. RESULTATS.....</b>	<b>50</b>
<b>IV.1. Influence de la nature de la plante sur le rendement en extrait..</b>	<b>50</b>
<b>IV.2. Influence du procédé d'extraction.....</b>	<b>51</b>
<b>IV.3. Dosage des polyphénols des extraits éthanoliques.....</b>	<b>52</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>53</b>

## ***Chapitre III***

### ***Les biosolvants***

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>55</b>
<b>I. DEFINITION DES SOLVANTS.....</b>	<b>55</b>
<b>II. DOMAINE D'APPLICATIONS.....</b>	<b>55</b>
<b>III. REGLEMENTATION SUR LES SOLVANTS.....</b>	<b>56</b>
<b>IV. SUBSTITUTION DES SOLVANTS ORGANIQUES PAR DES BIOSOLVANTS.....</b>	<b>59</b>
<b>V. SELECTION D'UN BIOSOLVANT.....</b>	<b>65</b>
<b>V.1. Démarche de substitution.....</b>	<b>65</b>
<b>V.2. Critère de sélection d'un solvant.....</b>	<b>66</b>

## ***Chapitre IV***

### ***L'α-pinène solvant de substitution aux solvants pétrochimiques***

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>69</b>
<b>I. LES ACIDES GRAS .....</b>	<b>71</b>
<b>II. LES CAROTENOÏDES.....</b>	<b>73</b>
<b>III. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>76</b>
<b>III.1. Extraction des acides gras.....</b>	<b>76</b>
III.1.1. Matière végétale.....	76
III.1.2. Solvant.....	76
III.1.3. Protocole expérimental.....	76
III.1.4. Analyses chromatographiques.....	78
III.1.5. Analyses statistiques.....	79
<b>III.2. Détermination de la teneur en eau par la méthode de Dean- Stark.....</b>	<b>79</b>
III.2.1. Matière végétale .....	79
III.2.2. Solvant.....	79
III.2.3. Protocole expérimental .....	80
III.2.4. Analyse par CG et CG/SM.....	80
<b>III.3 Extraction du β-carotène .....</b>	<b>81</b>
III.3.1. Matière végétale.....	81
III.3.2. Solvant.....	81
III.3.3. Protocole expérimental .....	81
III.3.4. Méthodologie des plans d'expériences.....	82

<b>IV. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>83</b>
<b>IV.1. Extraction des acides gras.....</b>	<b>83</b>
IV.1.1. Analyse quantitative et qualitative.....	83
IV.1.2. Analyse statistique.....	86
<b>IV.2. Détermination de la teneur en eau par la méthode de Dean-Stark.....</b>	<b>88</b>
IV.2.1. Cinétique de la distillation azéotrope.....	88
IV.2.2. Généralisation de la méthode.....	89
IV.2.3. Recyclage du $\alpha$ -pinène .....	91
<b>IV.3. Extraction du <math>\beta</math>-carotène .....</b>	<b>91</b>
IV.3.1. Résultats de l'optimisation par plan d'expériences.....	91
IV.3.2. Etude comparative.....	97
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>97</b>

## *Chapitre V*

### *Compréhension des phénomènes de solubilité*

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>99</b>
<b>I. PARAMETRES DE SOLUBILITE.....</b>	<b>99</b>
<b>I.1. Description de la théorie.....</b>	<b>99</b>
<b>I.2. Description des paramètres de Hansen.....</b>	<b>102</b>
<b>I.3. Méthodes de détermination des paramètres de solubilité de Hansen.....</b>	<b>102</b>
<b>I.4. Les cartes de solubilité.....</b>	<b>105</b>
<b>I.5. Les sphères de solubilité.....</b>	<b>107</b>
<b>II. DETERMINATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES COMPOSES ETUDIES.....</b>	<b>108</b>
<b>III. DETERMINATION DES PARAMETRES DE SOLUBILITE DE HANSEN DES COMPOSES ETUDIES.....</b>	<b>111</b>
<b>III.1. Calcul des paramètres de solubilité.....</b>	<b>111</b>
<b>III.2. Analyse des diagrammes de solubilité .....</b>	<b>114</b>
<b>III.3. Sphère de solubilité.....</b>	<b>118</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>118</b>
<b><i>Conclusion générale.....</i></b>	<b>119</b>
<b><i>Bibliographie.....</i></b>	<b>123</b>

<b>ANNEXE A.....</b>	<b>141</b>
Répartition géographique du pin d'Alep	
<b>ANNEXE B.....</b>	<b>148</b>
Liste des phrases Répartition de risque	

## *Liste des abréviations*

**AA** : Activité antioxydante  
**AFNOR** : Association Française de NORmalisation  
**ANOVA**: ANalysis Of Variance  
**BHA** : Butyl hydroxyanisole  
**BHT** : Butyl hydroxytoluène  
**CG** : Chromatographie en phase gazeuse  
**CMB** : concentration minimale bactéricide  
**CMI** : concentration minimale inhibitrice  
**COV** : composés organiques volatils  
**D** : Diamètre  
**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl  
**EV** : Entraînement à la vapeur d'eau  
**EVB** : Résidu Entraînement à la vapeur Broyé  
**EVE** : Résidu Entraînement à la vapeur Entier  
**EVMO** : Entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes  
**EVMOB** : Résidu Entraînement à la vapeur assistée par micro-ondes Broyé  
**EVMOE** : Résidu Entraînement à la vapeur assistée par micro-ondes Entier  
**H** : Taux d'humidité de la matière végétale  
**h**: n-hexane  
**HD** : Hydrodistillation  
**HDMO** : Hydrodistillation assistée par micro-ondes  
**HDMOB** : Résidu Hydrodistillation assistée par micro-ondes Broyé  
**HDMOE** : Résidu Hydrodistillation assistée par micro-ondes Entier  
**HDPB** : Résidu Hydrodistillation Plante Broyée  
**HDPE** : Résidu Hydrodistillation Plante Entière  
**HE** : Huile Essentielle  
**IR réf.** : Indice de rétention de référence  
**M** : Masse  
**MUFAs** : Acides gras mono-insaturés  
**P** : Puissance  
**p**:  $\alpha$ -pinène  
**PFB** : Plante fraîche Broyée  
**PFE** : Plante fraîche Entière  
**PUFAs** : Acides gras poly-insaturés  
**Q** : Débit  
**R<sup>2</sup>**: Coefficient de corrélation  
**REACH**: *Registration, Evaluation and Autorisation of Chemicals*  
**RHE** : Rendement en huile essentielle  
**SFAs** : Acides gras saturés  
 **$\delta_d$**  : forces de dispersive (molécule apolaire)  
 **$\delta_h$**  : forces de liaisons hydrogène  
 **$\delta_p$** : forces d'attraction (molécule polaire)

## *Liste des tableaux*

	<i>Page</i>
<b>Tableau I.1</b> : Répartition des espèces de pin en Algérie.....	<b>08</b>
<b>Tableau I.2</b> : Composition de l'huile essentielle de quelques espèces de pin.....	<b>12</b>
<b>Tableau I.3</b> : Domaine de variation des paramètres opératoires.....	<b>24</b>
<b>Tableau I.4</b> : Souches bactériennes et fongiques utilisées.....	<b>25</b>
<b>Tableau I.5</b> : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pinus halepensis</i> extraite par EV et EVMO .....	<b>38</b>
<b>Tableau I.6</b> : Rendement, durée d'extraction et constante de vitesse de l'extraction de l'HE de pin par EV, EVMO, HD et HDMO.....	<b>39</b>
<b>Tableau I.7</b> : Antibiogramme : sensibilité des souches bactériennes utilisées vis à vis de quelques <i>antibiotiques</i> .....	<b>41</b>
<b>Tableau I.8</b> : Paramètres de l'activité antibactérienne des huiles essentielles testées	<b>44</b>
<b>Tableau III.1</b> : Exemple de solvants pétrochimiques usuels.....	<b>57</b>
<b>Tableau III.2</b> : Solvants verts existant sur le marché.....	<b>60</b>
<b>Tableau III.3</b> : Secteurs d'applications cibles pour les agro-solvants.....	<b>64</b>
<b>Tableau III.4</b> : Secteurs d'applications difficilement envisageables pour les agro- solvants.....	<b>64</b>
<b>Tableau III.5</b> : Critères de sélection d'un solvant.....	<b>66</b>
<b>Tableau IV.1</b> : Principales plantes oléagineuses.....	<b>72</b>
<b>Tableau IV.2</b> : Propriétés physico-chimique du n-Hexane et du $\alpha$ -Pinène.....	<b>76</b>
<b>Tableau IV.3</b> : Caractéristiques du toluène et de l' $\alpha$ -pinène.....	<b>80</b>
<b>Tableau IV.4</b> : Tableau récapitulatif des expériences du plan d'expériences.....	<b>83</b>
<b>Tableau IV.5</b> : Teneur en eau des différentes matrices obtenues par distillation avec le toluène, l' $\alpha$ -pinène et le d-limonène.....	<b>84</b>
<b>Tableau IV.6</b> : Comparaison de la composition en acide gras et du rendement des huiles extraites par les deux solvants utilisés.....	<b>85</b>
<b>Tableau IV.7</b> : Répétabilité et étude statistique .....	<b>87</b>
<b>Tableau IV.8</b> : Détermination de la teneur en eau de matrices alimentaires en fonction du solvant de distillation.....	<b>89</b>
<b>Tableau IV.9</b> : Teneur en eau de matrices alimentaires obtenues par distillation avec le toluène, l' $\alpha$ -pinène et le d-limonène.....	<b>91</b>

---

<b>Tableau IV.10</b> : Tableau récapitulatif des expériences des résultats du plan d'expériences.....	<b>92</b>
<b>Tableau IV.11</b> : Analyse de la variance des effets des paramètres opératoires.....	<b>93</b>
<b>Tableau IV.12</b> : Coefficients du modèle.....	<b>95</b>
<b>Tableau IV.13</b> : Influence du solvant sur le rendement en $\beta$ -carotène.....	<b>97</b>
<b>Tableau V.1</b> : Paramètres physico-chimiques .....	<b>109</b>
<b>Tableau V.2</b> : Paramètres de solubilité de HANSEN déterminés par les trois méthodes : Van Krevlen, Stefanis Panayiotou et Yamamoto .....	<b>112</b>

## *Liste des figures*

	<i>Page</i>
<b>Figure I.1</b> : Le Pin d'Alep : <i>Pinus halepensis</i> .....	06
<b>Figure I.2</b> : Canal résinifère d'une feuille de Pin d'Alep coupé en travers X 450 .....	14
<b>Figure I.3</b> : Aromatogramme sur boîte de Pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.....	19
<b>Figure I.4</b> : Diffusion radiale dans une boîte de Pétri d'un puits creusé dans la gélose et rempli d'huile essentielle.....	20
<b>Figure I.5</b> : Entraînement à la vapeur d'eau (EV).....	21
<b>Figure I.6</b> : Hydrodistillation (HD).....	22
<b>Figure I.7</b> : Entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes (EVMO).....	23
<b>Figure I.8</b> : Hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO).....	23
<b>Figure I.9</b> : Evolution du rendement en huile essentielle en fonction du temps.....	29
<b>Figure I.10</b> : Evolution de $-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right]$ en fonction du temps.....	30
<b>Figure I.11</b> : Evolution du rendement en fonction du débit de vapeur et de la puissance de chauffe.....	31
<b>Figure I.12</b> : Coupe transversale d'une aiguille de pin d'Alep observée au Microscope X100.....	32
<b>Figure I.13</b> : Coupe transversale d'aiguilles de pin d'Alep observée au Microscope X650 avant, pendant et après extraction par les quatre procédés.....	34
<b>Figure I.14</b> : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Pinus halepensis</i> obtenue par entraînement à la vapeur d'eau.....	36
<b>Figure I.15</b> : Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Pinus halepensis</i> obtenue par entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes.....	37
<b>Figure I.16</b> : Activité antioxydante des HE de pin extraites par EVMO et EV.....	40
<b>Figure I.17</b> : Sensibilités de quelques souches bactériennes aux antibiotiques testés « Antibiogramme ».....	42
<b>Figure I.18</b> : Diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes en fonction des huiles essentielles étudiées.....	42

<b>Figure I.19:</b> Evolution de la croissance de <i>Salmonella typhimurium</i> en fonction de la concentration en huile essentielle.....	<b>44</b>
<b>Figure II.1 :</b> Extraction par solvant (Batch) et récupération de l'extrait.....	<b>50</b>
<b>Figure II.2 :</b> Rendement en extrait éthanolique en fonction de l'état de la plante.....	<b>51</b>
<b>Figure II.3 :</b> Rendement en extrait éthanolique en fonction de l'état de la plante et du procédé d'extraction.....	<b>51</b>
<b>Figure II.4 :</b> Teneur en phénols totaux des extraits éthanoliques de la plante fraîche et des résidus de distillation.....	<b>52</b>
<b>Figure III.1 :</b> Répartition du marché des solvants pétrochimiques en 2000 en Europe ...	<b>56</b>
<b>Figure III.2 :</b> Eléments moteurs pour le changement.....	<b>62</b>
<b>Figure III.3 :</b> Principales étapes de la démarche de substitution .....	<b>65</b>
<b>Figure IV.1 :</b> Structure chimique du $\alpha$ -pinène .....	<b>70</b>
<b>Figure IV.2.</b> Synthèse de divers alcools à odeur de santal à partir de l' $\alpha$ -pinène.....	<b>71</b>
<b>Figure IV.3 :</b> A- $\alpha$ -carotène, B- $\beta$ -carotène.....	<b>73</b>
<b>Figure IV.4 :</b> Procédure utilisée en fonction du solvant d'extraction (a. extraction par Soxhlet, b. évaporateur rotatif, c. distillation par Clevenger).....	<b>77</b>
<b>Figure IV.5:</b> Représentation de la procédure d'extraction par l' $\alpha$ -Pinène et l'hexane...	<b>78</b>
<b>Figure IV.6.</b> Extraction par Batch du $\beta$ -carotène.....	<b>81</b>
<b>Figure IV.7 :</b> Représentation du plan d'expériences sous forme de carré.....	<b>82</b>
<b>Figure IV.8 :</b> Cinétique de distillation azéotropique des graines de coriandre en fonction du solvant.....	<b>88</b>
<b>Figure IV.9 :</b> Cinétique de distillation azéotropique des feuilles d'origan en fonction du solvant.....	<b>89</b>
<b>Figure IV.10 :</b> Cinétique de distillation azéotropique des graines de carvi en fonction du solvant.....	<b>90</b>
<b>Figure IV.11 :</b> Cinétique de distillation azéotropique des carottes en fonction du solvant.....	<b>90</b>
<b>Figure IV.12 :</b> Diagramme de Pareto présentant l'influence standardisée de chaque effet.....	<b>93</b>
<b>Figure IV.13 :</b> Effet simple des paramètres.....	<b>94</b>
<b>Figure IV.14 :</b> Effets d'interaction des paramètres.....	<b>95</b>
<b>Figure IV.15 :</b> Surface de réponse .....	<b>96</b>
<b>Figure V.1.</b> Représentation tridimensionnelle des paramètres de solubilité de Hansen...	<b>101</b>

---

<b>Figure V.2.</b> Représentation de quelques solvants de référence dans l'espace bidimensionnel $\delta_p$ vs $\delta_h$ .....	<b>106</b>
<b>Figure V.3 :</b> Représentation de la sphère de solubilité de Hansen pour un polymère P...	<b>107</b>
<b>Figure V.4 :</b> Groupement fonctionnels identifiés dans la molécule de l'acide Stéarique C18:0 par les trois méthodes de contribution de groupes.....	<b>111</b>
<b>Figure V.5 :</b> Représentation des paramètres de solubilité de Hansen par la méthode de Van Krevlen dans l'espace bidimensionnel $\delta_p$ vs $\delta_h$ .....	<b>115</b>
<b>Figure V.6 :</b> Représentation des paramètres de solubilité de Hansen par la méthode de Stefanis Panayiotou dans l'espace bidimensionnel $\delta_p$ vs $\delta_h$ .....	<b>116</b>
<b>Figure V.7 :</b> Représentation des paramètres de solubilité de Hansen par la méthode de Yamamoto dans l'espace bidimensionnel $\delta_p$ vs $\delta_h$ .....	<b>117</b>
<b>Figure V.8 :</b> Sphère des paramètres de solubilité de Hansen par la méthode de Yamamoto dans l'espace tridimensionnel $\delta_p$ vs $\delta_h$ vs $\delta_d$ .....	<b>118</b>

# *Introduction*

# *générale*

## *Introduction générale*

Alors que la chimie traditionnelle utilisait surtout des matériaux renouvelables (bois, fibres végétales, huiles, suif...), la chimie moderne, née au XIXe siècle avec l'exploitation à grande échelle du charbon et du pétrole, les a délaissés. On observe aujourd'hui un regain d'intérêt pour la chimie verte du fait de la raréfaction des ressources fossiles. Néanmoins, le pétrole n'est pas exclu de ces recherches, puisque la chimie verte peut également mettre au point des procédés visant à extraire le pétrole en l'économisant. Ce regain d'intérêt s'explique également par la recherche permanente d'une diminution de la pollution de l'environnement, des émissions de CO<sub>2</sub> et par la volonté de diminuer toujours plus les risques pour les travailleurs.

La recherche incessante de l'Homme qui, observant la nature et les effets de ses propres expériences, a depuis longtemps découvert que le *monde végétal* est porteur d'une multitude de solutions aux problèmes de santé qui affligent les humains à cause des produits pétrochimiques.

Ces dernières années, grâce au bouleversement des mentalités et au développement de l'esprit bio pour le respect de la Terre, l'être humain s'est intéressé aux bienfaits suscités par les plantes dans de plus vastes usages que jadis.

Parmi les secteurs que touche l'esprit bio, vient se classer le secteur des solvants, constituants liquides, volatils indispensables dans divers domaines industriels, tels que les peintures et revêtements, les produits pharmaceutiques, les encres d'imprimerie, les cosmétiques, les détergents, les produits phytosanitaires, etc.

Les solvants utilisés actuellement sont, pour la majorité, issus de l'industrie pétrochimique, mais pour des raisons économiques (prix du baril), pour des raisons de diminution des réserves de pétrole ainsi que pour le respect des nouvelles réglementations (Critères de REACH, lois Européennes), le développement des biosolvants connaît un essor considérable.

Deux ordres de préoccupation se rencontrent dans cette thèse et lui donnent sa substance.

Le premier a trait au pin, plus particulièrement à la valorisation des aiguilles de pin par l'extraction dans un premier temps de l'huile essentielle et de composés bioactifs dans un second temps, à partir des résidus d'extraction.

L'industrie du bois exploite massivement l'univers végétal de la forêt, y laissant comme *résidu* une proportion majeure de biomasse coupée sans qu'on se soit assuré que ces résidus - que l'on perçoit d'emblée comme un problème - fassent plutôt partie de l'ordre des solutions.

Les produits forestiers non ligneux sont définis comme étant des produits d'origine biologique autres que le bois et provenant de forêts ou d'autres terrains boisés (Turgeon, 2003). Ils se subdivisent en quatre principaux types: les produits de l'alimentation (fruits sauvages, champignons, produits de l'érable, etc.), les produits ornementaux (arbres de Noël), les produits pharmaceutiques et nutraceutiques (extraits du l'if du Canada, le ginseng et la gomme de sapin,

etc.) ainsi que les produits manufacturés et les matériaux (huiles essentielles, résines, alcools, etc.). Bien moins imposante que l'industrie de la matière ligneuse, l'exploitation des produits forestiers non ligneux est en plein essor.

L'un des composés de l'essence de pin est l' $\alpha$ -pinène qui se trouve être notre deuxième préoccupation. Il s'agira de proposer son utilisation pour la première fois comme solvant vert pour remplacer les solvants pétrochimiques dans divers domaines, à savoir, l'extraction des acides gras de graines oléagineuses, la détermination de la teneur en eau de produits alimentaires ainsi que l'extraction du  $\beta$ -carotène, composé très recherché pour ses propriétés antioxydantes.

Reliant ces deux préoccupations, notre manuscrit s'articulera autour de cinq chapitres selon le plan suivant :

Le **chapitre I** dédié aux huiles essentielles, rappellera dans un premier temps quelques généralités sur les pins, leurs utilisations ainsi que leurs déchets. Puis nous nous intéresserons aux huiles essentielles et aux différents procédés utilisés pour leur extraction.

Ce même chapitre s'intéressera d'une part à l'extraction de l'huile essentielle des aiguilles de pins par quatre procédés ; deux conventionnels : l'entraînement à la vapeur d'eau (**EV**) et l'hydrodistillation (**HD**), et deux procédés innovants à savoir l'entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes (**EVMO**), et l'Hydrodistillation assistée par micro-ondes (**HDMO**), et d'autre part, à la détermination des différentes activités microbiologiques des huiles récupérées.

Le **chapitre II** portera sur la valorisation des déchets des extractions. Pour ce faire, une extraction par solvant des résidus sera effectuée afin de quantifier la teneur des polyphénols totaux des extraits récupérés.

Le **chapitre III** sera consacré à une revue bibliographique sur les solvants pétrochimiques et leur substitution par des biosolvants.

Le **chapitre IV** portera sur la substitution pour la première fois d'un biosolvant « L' $\alpha$ -pinène » à des solvants pétrochimiques et se décomposera en trois parties :

La première sur l'extraction par Soxhlet des acides gras de matrices alimentaires en utilisant l' $\alpha$ -pinène comme solvant vert en substitution au n-hexane.

La deuxième sur la détermination du taux d'humidité par distillation au Dean-Starck en remplaçant le toluène par l' $\alpha$ -pinène.

Et enfin, la troisième et dernière partie de ce chapitre, portera sur l'extraction du  $\beta$ -carotène, en utilisant l' $\alpha$ -pinène comme biosolvant, et ceci, en optimisant les paramètres opératoires par une étude par plan d'expériences.

Dans le **chapitre V**, nous nous intéresserons aux paramètres de solubilité de Hansen et aux différentes méthodes de déterminations de ces derniers. Nous présenterons les différentes molécules concernées par cette étude, leur structure moléculaire, leur température d'ébullition et plusieurs autres grandeurs physiques liées à ces molécules.

Ce chapitre sera ensuite axé sur la détermination du pouvoir solvant de quelques pétro et agro-solvants sur les acides gras et le bêta-carotène, en utilisant la méthode prédictive des paramètres de solubilité de Hansen, déterminés par trois méthodes, à savoir, la méthode de Van Krevelen, la méthode de Stefanis et Panayiotou et la plus récente, la méthode de Yamamoto.

# *Chapitre I*



## *Extraction de l'huile essentielle des aiguilles de pin*



## Chapitre I

# Extraction de l'huile essentielle des aiguilles de pin

## INTRODUCTION

Ce premier chapitre a pour objectifs de rappeler un certain nombre de généralités concernant le pin, les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction.

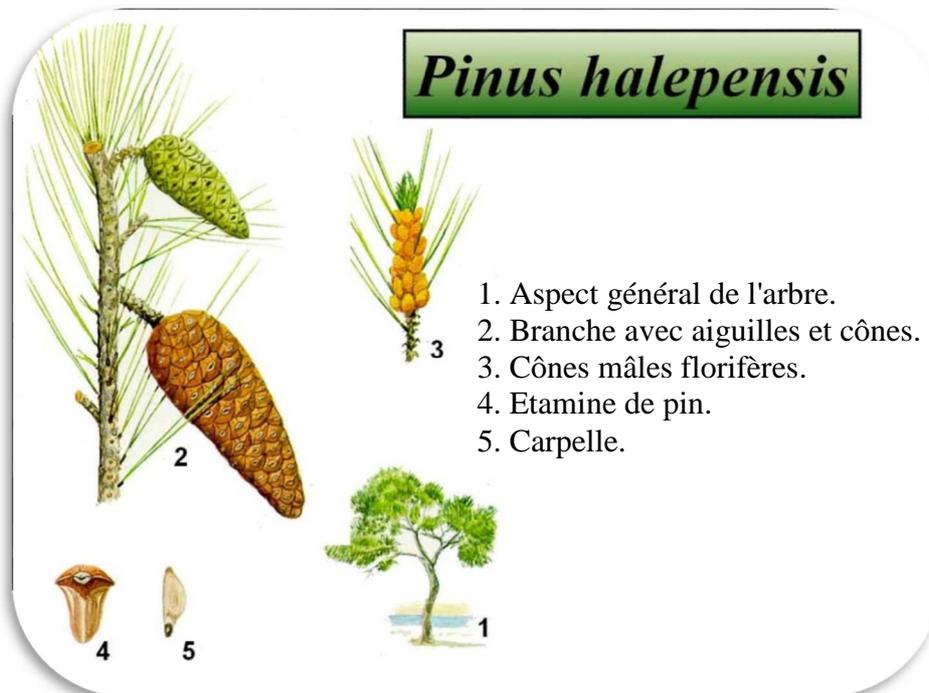
Nous présenterons aussi les résultats de l'extraction de l'huile essentielle de pin par les quatre procédés étudiés : entraînement à la vapeur d'eau (**EV**), Entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes (**EVMO**), Hydrodistillation (**HD**) et Hydrodistillation assistée par micro-ondes (**HDMO**) et de ses activités antioxydantes et antimicrobiennes.

## I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.1 La matière végétale : Le pin

#### I.1.1 Description botanique

Le pin est un conifère de la famille des *Pinacées*. Dans le genre résineux, le Pin blanc de l'espèce *Circum Méditerranéen* (figure I.1) appelé communément « Pin d'Alep », *Pinus halepensis* et en arabe "Snouber" » est très répandu en Algérie. En matière de ligneux sur pied, les forêts de Pin d'Alep représentent la plus grande proportion que compte le couvert forestier national, avec une surface qui avoisine 800 000 hectares.



**Figure I.1** : Le Pin d'Alep : *Pinus halepensis*  
(Universidad politecnica de valencia [En ligne])

La hauteur du pin d'Alep est très variable, de 6 à 20 mètres dans les conditions de milieux les plus diversifiées. L'écorce des jeunes sujets est lisse, de couleur gris argenté ; celle des arbres adultes est épaisse, profondément crevassée, de couleur noirâtre à rougeâtre. Les aiguilles sont fines, longues de 5 à 10 cm, réunies par deux dans une même gaine, larges de 1 mm au plus, d'un vert clair ou foncé.

Les cônes persistent indéfiniment sur l'arbre après avoir perdu leurs graines. Le cône est long de 8 à 12 cm, large de 3,5 à 4,5 cm, d'abord vert, puis devient rouge violacé, finalement arrivé à maturité brun rougeâtre à jaunâtre (**Kadik, 1987**). Le pin fut décrit pour la première fois par DUHAMEL, en 1755, sous le nom de *Pinoshiero, soliviitana*. MILLER l'a redécrit plus tard, en 1768, sous le nom de *Pinus halepensis* (**Annales de l'école nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences, 1962**). Il affectionne plus particulièrement les substrats marneux ou calcaire-marneux dans lesquels son enracinement profond peut s'étendre. Il se rencontre aussi sur des substrats schisteux ou mica schisteux (**Bneder, 1984**).

### I.1.2 Habitat et distribution

Le pin d'Alep est très fréquent sur tous les massifs montagneux du Tell littoral à 2000 mètres d'altitude dans l'Atlas Saharien, comme on peut le rencontrer dans tous les étages bioclimatiques depuis l'humide jusqu'à l'aride supérieur (**Vennetier, 1999**). Mais la grande forêt de pin d'Alep se trouve principalement dans la zone semi-aride caractérisée par une tranche pluviométrique de 300 à 600 mm/an (**Bneder, 1984**).

Cette espèce est caractérisée par un enracinement puissant qui lui permet de pousser dans des endroits très difficiles comme les roches, où les racines arrivent à s'infiltrer même dans les fissures. Cette puissance d'enracinement lui donne une fixation solide. Son enracinement est adapté aux différents types de sols, même superficiels, ce qui fait de lui l'une des rares espèces ne craignant pas les calcaires marneux. (**Quezel, 1986**).

En Algérie, il se cantonne essentiellement à l'Est et à l'Ouest du pays. Les zones du pin d'Alep sont: (**Carmantraud, 1940 ; Louni, 1994**).

- **Les forêts du littoral** : la zone du Sahel étant la transition entre les subéraies (forêt de chêne-liège) et les zones à pin d'Alep. Les littoraux algérois et oranais renferment là une faible étendue de pin d'Alep.
- **Les forêts du Tell** : Les forêts de pin d'Alep se retrouvent au niveau de trois blocs:
  - \* Les forêts des Monts de Tlemcen : les pinèdes se situent essentiellement au niveau du Tell Méridional et les Monts de Slissen.
  - Les forêts des Monts de Daïa : région fortement boisée, où le pin d'Alep est roi et constituant un ensemble jusqu'à Sidi Bel Abbés.
  - Les forêts de Saïda et de Tiaret forment un mélange de pin d'Alep et de Chêne vert.
  - \*Le Tell algérois : Au niveau de l'Ouarsenis, les forêts sont constituées en majorité de pin d'Alep et des taillis de chêne vert, le Thuya et le genévrier de Phénicie accompagnent ces deux espèces. Les forêts des Bibans (Bordj Bou Arreridj) en sont riches.
  - \*Le Tell constantinois ne comporte pas de massifs étendus.

- **L'Atlas saharien:** Les plus importantes pinèdes se trouvent au niveau des Oued Naïls. Les montagnes de Djelfa sont boisées des plus beaux peuplements de cette espèce.
- **Les Aurès Nememcha :** Dans le Hodna, un mélange pin d'Alep-chêne vert s'observe. Dans les Aurès, les versants sud sont boisés de pin d'Alep. Les peuplements se situent entre 1000 et 1400 m d'altitude.

Le tableau I.1 montre la répartition des pins en Algérie

**Tableau I.1** Répartition des espèces de pin en Algérie (**Direction des forêts et de la ceinture verte de la wilaya d'Alger, 2012; INRF, 2012**).

Région	Forêts	Espèces
Algérois et alentours	Forêt de Lakhdaria	Pin d'Alep Pin Maritime
	Forêt de Bainem	Pin d'Alep Pin Maritime Thuya
	Forêt du parc Zoologique de Ben Aknoun	Pin Maritime Pin d'Alep Pin pignon Thuya
	Forêt de Bouchaoui	Pin d'Alep Pin pignon Thuya Pin des canaris
	Forêt de Maktaa Kheira	Pin d'Alep Thuya
	Forêt de Sidi-Fredj	Pin d'Alep Pin Maritime
Est algérien	Forêts des Bibans	Thuya
Ouest algérien	Forêts de Saïda et de Tiaret	Pin d'Alep
	Forêts des Monts de Slissen	Pin d'Alep
	Forêts des Monts de Daïa	Pin d'Alep
Atlas saharien	Montagnes de Djelfa	Pin d'Alep
Aurès	Hodna	Pin d'Alep

Cet arbre est spontané sur les bords de la Méditerranée : assez commun en Afrique du Nord, Espagne, France et Italie. On le trouve aussi à l'Est : Jordanie, Liban, Syrie, Turquie, Grèce, Albanie, Croatie, Ukraine etc., et a été introduit en Californie et en Australie.

Les figures en Annexe A illustrent la répartition géographique du pin d'Alep en Algérie et dans le monde.

### I.1.3 Utilisation du pin

Les propriétés antibactériennes et antifongiques des pins, attribuables à la présence d'un grand nombre de phytoalexins, suscitent beaucoup d'attention dans la littérature scientifique.

En médecine traditionnelle, la résine de pin est utilisée dans le traitement des ulcères ; en cataplasme. Les raclures du pin sont préconisées pour le traitement des colopathies sanglantes ; et la fumigation d'écorce de pin est employée dans les affections gynécologiques.

Les bourgeons considérés comme balsamiques, béchiques, émollients et sédatifs de la toux, sont diurétiques ; alors que les aiguilles sont utilisées en balnéothérapie et l'huile comme liniment. La partie interne de l'écorce de pin permettait de faire une espèce de pain pendant les périodes de disette (**Heratchian, 2007**).

Autres que ces activités biologiques, le pin fait l'objet de nombreuses recherches. **Sasipawan et al. (2012)**, ont effectué une étude sur les effets des extraits de *Pinus kesiya* contre la leucémie chez l'être humain. **Nuno et al. (2011)**, ont étudié les aiguilles de pin comme bio-échantillonneurs passifs pour la détermination des polybromodiphényléthers dans l'atmosphère.

La principale utilisation commerciale du pin est la transformation en bois de construction. Il est surtout utilisé comme :

- bois de charpente,
- poteaux pour les fils électriques,
- poutres pour la construction de chemins de fer ou de chalets,
- bois pour les papetières.

La térébenthine extraite à partir des pins contient une essence riche en carbures terpéniques : l' $\alpha$ -pinène, le bêta-pinène et des acides résiniques. La térébenthine est utilisée en médecine comme expectorant, balsamique (qui agit comme un baume), antiseptique urinaire et pulmonaire (en association avec l'eucalyptus et le benjoin) et révulsif en usage externe dans la recherche biomédicale.

Elle a aussi été utilisée comme carburant de fusées, notamment pour le premier étage du lanceur Diamant A, vecteur du premier satellite français, Astérix.

Liquide incolore à odeur caractéristique de pin, l'essence de térébenthine est un très bon solvant des graisses, des huiles et des cires. On l'utilise dans de nombreux produits : peintures, vernis, cirage, insecticides et même parfums ou produits pharmaceutiques tels que les onguents topiques. L'essence de térébenthine contient 60 % de pinène.

L'essence de térébenthine est également conseillée pour l'élimination de la moisissure sur les cuirs (vestes, fauteuils, chaussures) et supprimer des taches de graisse sur un textile. Elle est également très efficace pour laver les écrans d'appareils électroniques, notamment les écrans tactiles qui sont très sensibles (Nintendo DS, iPod Touch, etc.)

En Algérie, le bois du pin d'Alep est surtout employé dans le domaine de la petite charpente, la menuiserie ordinaire, la caisserie et l'emballage. Les entreprises papetières algériennes utilisent comme matière première pour la fabrication de leur papier, les végétaux annuels ou encore les fibres de récupération sous forme de vieux papiers. Pour le papier de grande résistance, la matière de base (pâte de bois) est importée de l'étranger alors que nos ressources forestières pourraient probablement être facilement utilisées et partiellement exploitées par l'industrie papetière (**Messaoud-Bouregha et Zerizer, 2006**).

#### I.1.4. Provenance et destination des déchets du bois

Les **déchets de bois** proviennent :

- de l'**exploitation forestière** : houppiers, branchages, écorces, souches, sciures
- des **industries de première transformation** (scieries) qui produisent des dosses et délignures, des écorces, des sciures, des copeaux et des chutes courtes
- des **industries de deuxième transformation** (menuiseries, fabriques de meubles, de parquets, de charpentes...) qui produisent des sciures, des chutes, des copeaux d'usinage, des poussières de ponçage
- des **objets mis au rebut** : bois de chantier et de démolition, caissettes, palettes, bois de coffrage, charpentes, meubles, traverses de chemin de fer, bois de veine...

Les déchets de bois sont classés en trois catégories :

- la **biomasse** : bois exempt de toute contamination
- les **bois faiblement adjuvants** : palettes, panneaux, bois d'ameublement
- les **bois traités** à la créosote, aux CCA (cuivre, chrome et arsenic) et les bois **ignifugés**.

Les bois de rebut souillés ou traités sont, en fonction de leur teneur en substances dangereuses, considérés comme des déchets dangereux. Ils doivent donc être éliminés par les filières de traitement adaptées.

Selon leur origine, les déchets de bois peuvent être soit :

- **utilisés comme matières premières** (panneaux de particules, pâte à papier...),
- consommés comme **combustible** dans des chaudières,
- **réemployés** après avoir été réparés (meubles, palettes multi-rotations...).

La valorisation des déchets du bois peut se faire de différentes manières : valorisation matière et valorisation énergétique.

##### ➤ Valorisation matière

Les **industries de la trituration** utilisent les déchets de bois comme matière première dans :

- la fabrication de la **pâte à papier** qui écoule en majeure partie les sous-produits des scieries,
- la fabrication des **panneaux de particules** ou de produits composites qui emploie les dosses et délignures, les sciures et les chutes diverses.

L'approvisionnement des industries de la trituration se fait par des unités centralisées qui se chargent de la collecte, du stockage et du broyage des déchets. Les déchets sont répartis en fonction de critères de qualité et font l'objet d'un conditionnement spécifique (souillures, mélange de matériaux, dimension, essences...).

La **valorisation matière des déchets de bois** peut prendre également les formes suivantes:

- nettoyage des sols,
- fumage des viandes et poissons,
- dégraissage des pièces métalliques,
- fabrication d'objets moulés ou de produits composites,
- fabrication de compost (à partir d'écorces et autres sous-produits broyés),
- paillage en horticulture (écorces),
- litières animales (sciures et copeaux),
- fabrication de charbon de bois.

Comme exemple, nous pouvons citer les travaux d'une équipe de chercheurs de Novossibirsk qui a conçu à partir du bois, ou plus exactement de déchets de conifères (aiguilles, brindilles, petites branches), sans adjonction d'aucune substance liante, un matériau original, appelé (provisoirement) **écovite**. Dans les exploitations forestières, ces "déchets" n'étaient jusqu'à présent pas utilisés. Or, leur quantité se mesure en Russie en millions de tonnes. Les matériaux obtenus sont qualifiés de plastiques de bois.

#### ➤ Valorisation énergétique

On utilise les déchets de bois comme **combustible** :

- dans l'**industrie** : les entreprises utilisent leurs déchets pour satisfaire leurs propres besoins énergétiques : chauffage, énergie de "process",
- dans les **bâtiments à usage collectif** (piscines, lycées, hôpitaux, habitats collectifs).

Les déchets de bois employés comme combustible sont utilisés à l'état brut ou conditionnés sous forme de granulés ou de briquettes. Le conditionnement consiste à compacter des déchets hétérogènes pour obtenir un combustible sec, dense, inerte qui tend à se rapprocher de la forme du charbon. En plus de la granulométrie, le taux d'humidité est un paramètre important (les bois dits "humides" contiennent plus de 25% d'humidité).

#### ➤ Bois et environnement

L'utilisation de 4 m<sup>3</sup> de bois-énergie permet d'économiser 1 tonne équivalent pétrole (tep) et d'éviter en moyenne l'émission de 2,5 t de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère.

Les déchets de l'industrie du bois en Algérie ne sont, malheureusement, pas ou trop peu exploités. Un arbre de pin bien rentabilisé, pourrait produire du bois, du papier, de la térébenthine, des huiles essentielles et par conséquent des biosolvants et des biocarburants.

## I.2 L'huile essentielle de pin

Le terme «Huile essentielle» est un terme générique qui désigne les composants liquides et hautement volatils des plantes, marqués par une odeur forte et caractéristique. Elles sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages.

La norme AFNOR NFT 75-006, de Février 1986, a défini l'huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques pour les deux premiers modes d'obtention. Elle peut subir des traitements physiques, par exemple, redistillation, aération ..., n'entraînant pas de changements significatifs de sa composition.

### I.2.1. Composition chimique de l'huile essentielle de pin

La composition des huiles essentielles diffère en fonction de plusieurs paramètres tels que le lieu géographique, la saison de cueillette, les données climatiques, le procédé d'extraction, l'espèce et la partie de la plante utilisée.

Le tableau I.2 résume la composition chimique de quelques espèces de pins.

**Tableau  
I.2**

Composition de l'huile essentielle de quelques espèces de pin

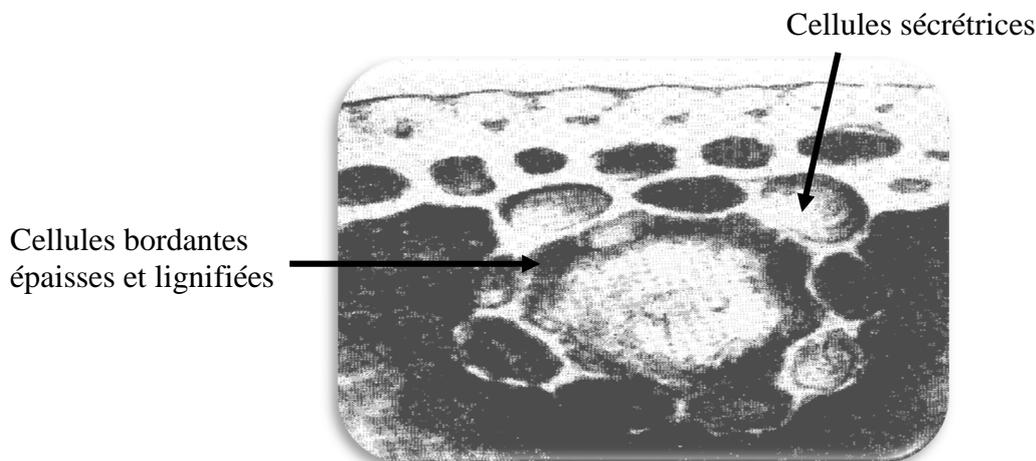
Espèce	Pays	Composés majoritaires (%)	Référence
<i>Pinus halepensis</i>	Algérie (Alger)	$\alpha$ -pinène (1,23) Sabinène (1,23) (Z)- $\beta$ -Caryophyllène (40,31) $\alpha$ -Humullène (7,92)	Dob et al. (2005)
	Algérie (Tissemsilet)	$\alpha$ -pinène (6,66) Sabinène (6,95) Myrcène (8,65) (Z)- $\beta$ -Caryophyllène (7,07) Phényl éthyle-isovalérate (7,37)	Tazerouti et al. (1993)
	Algérie (Djelfa)	$\alpha$ -pinène (17,56) Phényl ethyl 2-methyl -butyrate (10,29) Phényl éthyl-isovalérate (8,38)	Tazerouti et al. (1993)
	Grèce	$\alpha$ -pinène (13,4) Myrcène (6,62) $\delta$ -3-Carène (6,87) Limonène (5,03) (Z)- $\beta$ -Caryophyllène (19,05) Cembrène (7,62)	Roussis et al. (1995)
	Italie	$\alpha$ -pinène (18,1) Sabinène (9,4) Myrcène (27,9) $\alpha$ -Terpinolène (9,9) $\beta$ -Caryophyllène (19,05)	Macchioni et al. (2003)
	Italie	$\alpha$ -pinène (8,54) Sabinène (6,13) Myrcène (12,48) <i>p</i> -Cymène (11,41) $\beta$ -Caryophyllène (16,4)	Vidrich et al. (1988)

	Maroc	$\alpha$ -pinène (23,3) Myrcène (16,3) $\alpha$ -Terpinolène (10,1) $\beta$ -Caryophyllène (14,2)	Hmamouchi et al. (2001)
<i>Pinus pinaster</i>	Maroc (Région de Rabat)	$\beta$ -Caryophyllène (22,2) $\alpha$ -pinène (21,4) $\gamma$ -Muuroolène (7,0)	Hmamouchi et al. (2001)
	Italie (Montemarcello) (La Spezia)	$\beta$ -Caryophyllène (13,2) $\alpha$ -pinène (29) $\beta$ -pinène (22)	Macchioni et al. (2003)
	Grèce	$\beta$ -caryophyllène (15) $\alpha$ -pinène (21) Germacrène-D (19,2)	Petrakis et al. (2001)
	France	$\beta$ -caryophyllène (6,4-13,0) $\alpha$ -pinène (43,4) $\beta$ -pinène (25,1-16,0) Germacrène-D (11,5)	Chalchat et al. (1989)
	Portugal	$\alpha$ -pinène (27,3) $\beta$ -pinène (20,2) Limonène (7,6)	Carmo et al. (1986)
	Allemagne	$\alpha$ -pinène (44,1) $\beta$ -pinène (29,5) Myrcène (4,7)	Kubeczka et al. (1987)
	Algérie	$\beta$ -caryophyllène (26,6) allo-aromadendrène (12,5) $\gamma$ -Humulène (4,3)	Dob et al. (2005)
	<i>Pinus Caribaea</i>	Venezuela	$\beta$ -phéllandrène (39,70) $\beta$ -caryophyllène (15,70) Germacrène-D (14,15) $\alpha$ -pinène (8,25)
<i>Pinus radiata</i>	Equateur	$\beta$ -pinène (35,21) Aromadendrène (4,01) $\alpha$ -terpinéol (3,01)	Sacchetti et al. (2005)
<i>Pinus strobus</i>	Pologne (Gdansk)	$\alpha$ -pinène (17,7) Germacrène-D (12,2) $\beta$ -pinène (7,9)	Krauze-Baranowska et al. (2002)
<i>Pinus ponderosa</i>	Pologne (Gdansk)	$\alpha$ -pinène (10,2) $\beta$ -pinène (45,7) 3-carène (8,4)	
<i>Pinus resinosa</i>	Pologne (Varsovie)	$\alpha$ -pinène (23,3) $\beta$ -pinène (42,4) Myrcène (14,5)	

### I.2.2. Localisation des huiles essentielles

Dans la plante, les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, eucalyptus), écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vétiver), rhizomes (acore), fruits (badiane) ou graines (carvi). La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles, classées parmi les métabolites secondaires, se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante (**Bruneton, 1987**).

L'huile est souvent localisée sur ou à proximité de la surface de la plante, par exemple, pour la famille des *Lamiacées*, elle se situe dans les poils sécréteurs. Chez les *Myrtacées* ou les *Rutacées* au niveau des poches sécrétrices ou encore des canaux sécréteurs pour les *Astéracées*, les *Apiacées* ainsi que pour les aiguilles des *Pinacées* comme indiqué sur la figure I.2 (**Bruneton, 1993**).



**Figure I.1 :** Canal résinifère d'une feuille de pin d'Alep coupé en travers X 450 (**Selik et Bono, 1960**).

### I.2.3. Propriétés biologiques des huiles essentielles de pin

L'huile essentielle présente des propriétés antimicrobiennes et expectorantes et induit une hyperémie locale.

Les monoterpènes, sesquiterpènes et esters de l'huile essentielle sont antiseptiques des voies respiratoires dans les gripes et les bronchites et décongestionnants des voies respiratoires hautes (sinusites). L'huile essentielle stimule la circulation périphérique, elle est sécrétolytique et corticostimulante. Elle exerce également une activité génotoxique *in vitro* sur des lymphocytes humains (**Billerbeck, 2007**).

#### a) Activité antioxydante

**Sacchetti et al. (2005)**, ont montré que l'huile essentielle du *Pinus nigra* possède une activité antioxydante relativement faible avec une inhibition moyenne inférieure à 25% en comparaison avec l'activité antioxydante de *Thymus vulgaris*.

D'autres auteurs tels que **Hsu et al. (2005)**, ont montré que l'extrait des aiguilles de pin avait la meilleure activité antioxydante lors d'une étude sur la capacité de piégeage des radicaux libres de différentes parties de *Pinus morrisonicola* (aiguille, écorce et cône). Néanmoins, cette activité peut être variable en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve comme le montrent **Pukacka et al. (2000)**.

En effet, ces auteurs ont remarqué une augmentation de l'activité antioxydante en fonction du degré de pollution suite à l'étude de l'activité antioxydante de 3 échantillons de pin sylvestre prélevés à proximité de trois sites industriels. Ils ont conclu que cette augmentation était un moyen de défense de la plante contre la présence de polluants dans l'environnement.

**Grassmann et al. (2003)** ont montré, par leurs études sur la capacité antioxydante des huiles essentielles du pin Mugo dans plusieurs systèmes biochimiques, que l'huile présente une faible activité lorsqu'elle est testée dans un environnement aqueux. En revanche elle présente une très forte activité antioxydante lorsqu'elle est testée sur un environnement lipophile.

**Vuorela et al. (2005)**, ont évalué l'activité d'extraits phénoliques du pin sylvestre pour sa propriété antioxydante, et ont montré que les composés phénoliques de l'écorce du pin étaient de très bons agents contre l'oxydation de la membrane phosphatidylcholine (liposomes).

Les études de **Packer et al. (1999)**, ont mis en évidence l'activité antiradicalaire du pycnogenol sur les dérivés réactives de l'oxygène (espèces chimiques oxygénées rendues chimiquement très réactives par la présence d'électrons de valence non appariés) et les espèces azotées ainsi que sa participation dans le réseau antioxydant cellulaire par sa capacité à régénérer le radical ascorbyle et de protéger ainsi la vitamine E et le glutathion endogène contre le stress oxydatif.

#### b) Activité antimicrobienne

Plusieurs études ont été menées sur différentes parties du pin. Les bourgeons sont considérés comme balsamiques, béchiques, émoullients et sédatifs de la toux ; ils sont diurétiques ; alors que les aiguilles sont utilisées en balnéothérapie et l'huile comme liniment. L'huile essentielle est responsable d'activités antimicrobiennes et expectorantes et induit une hyperémie locale.

Les propriétés antibactériennes et antifongiques des pins suscitent beaucoup d'attention dans la littérature scientifique. Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de pin contre les bactéries à Gram négatif tel qu'*Escherichia coli* et les bactéries à Gram positif tel que *Staphylococcus aureus* a été démontré par plusieurs auteurs. (**Abi-Ayada, 2011; Loizzo, 2008; Smith, 2005**).

Les résultats de ces études ont tous convergé vers une sensibilité plus ou moins importante de ces bactéries.

En effet, **Monica et al. (2008)** ont montré par la méthode de diffusion des disques que l'huile essentielle extraite des cônes de *P. brutia* présente une inhibition des agents pathogènes à Gram négatif, tels que *Escherichia coli* (zone d'inhibition supérieure à 52 mm) et à Gram positif tel que *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 10 mm) ainsi que *Bacillus subtilis* (zone d'inhibition de 12 mm).

**Smith et al. (2005)**, quant à eux, ont montré grâce à une étude sur les extraits de jeunes arbres de *Pinus nigra*, qu'ils possédaient une activité antibactérienne sur deux types de staphylocoques résistants aux antibiotiques avec une concentration minimale d'inhibition de 32 à 64 µL/mL.

Les composés responsables de l'activité antibactérienne (le pinosylvin et le pinosylvinmonométhyl) des extraits de la résine de différents pins (*P. sylvestris*, *P. resinosa*, *P. contorta*, *P. banksiana*) ont été découverts par **Lindberg et al. (2004)** suite à des tests antibactériens sur des souches pouvant poser problèmes dans l'industrie papetière (*Bacillus coagulans*, *Burkholderia multivorans*, *Alcaligenes xylosoxydans*). Ils en ont conclu que ces extraits avaient un fort potentiel pour une utilisation comme biocide naturel.

### I.3. Les procédés d'extraction des huiles essentielles

Comment obtient-on les huiles essentielles ? Plusieurs procédés sont utilisés pour extraire les huiles essentielles ; les plus utilisés sont les procédés conventionnels tels que l'entraînement à la vapeur ou l'hydrodistillation de la plante fraîche ou sèche, mais de nouveaux procédés ont vu le jour : ce sont les procédés assistés par micro-ondes.

#### I.3.1. L'entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur est la méthode d'extraction permettant d'obtenir une huile essentielle à partir d'un végétal. De la vapeur d'eau est injectée au bas de la charge végétale. Chargée en molécules volatiles, elle est récupérée au sommet de la charge, et est ensuite condensée. Par décantation, une fraction hydrophobe se sépare de la phase aqueuse : il s'agit de l'huile essentielle (**Anizon, 2003**).

#### I.3.2. L'hydrodistillation

L'échantillon à extraire est dispersé dans de l'eau et placé dans un ballon qui est chauffé directement. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau, qui est ensuite condensée. L'huile essentielle est collectée par simple décantation.

Ces techniques sont généralement utilisées pour l'extraction des huiles essentielles et des arômes de végétaux, en particulier des plantes aromatiques et des épices (**Chemat, 2006**).

#### I.3.3. L'extraction assistée par micro-ondes

Le procédé d'extraction par micro-ondes consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes contrairement au chauffage classique par conduction ou convection. Les micro-ondes agissent sur certaines molécules, telles que l'eau, qui absorbent l'onde, et convertit son énergie en chaleur ; le dégagement de chaleur a lieu dans la masse.

Ainsi, dans une plante, les micro-ondes sont absorbées par les parties les plus riches en eau (les vacuoles, véritables réservoirs liquides des cellules), puis converties en chaleur. Il en résulte une soudaine augmentation de la température à l'intérieur de la plante, jusqu'à ce que la pression interne dépasse la capacité d'expansion des parois cellulaires entraînant la destruction de la structure des cellules végétales. Les substances situées à l'intérieur des cellules peuvent alors s'écouler librement à l'extérieur du tissu biologique, et l'huile essentielle est entraînée par la vapeur d'eau.

Dans le cas des plantes à huile essentielle superficielle, les micro-ondes permettent d'obtenir un éclatement des glandes à huile essentielle. Si la plante est suffisamment riche en eau, les micro-ondes permettent de chauffer la matière première et d'extraire l'huile essentielle en utilisant seulement l'eau de constitution du végétal.

Dans le cas des plantes à huile essentielle non superficielle, l'utilisation des micro-ondes permet d'obtenir un gradient thermique inversé par rapport à celui obtenu par injection de vapeur. Ce gradient thermique inversé accélère la diffusion des molécules d'huile essentielle et leur extraction.

Quel que soit le mécanisme impliqué, l'extraction sous micro-ondes est caractérisée par des vitesses d'extraction supérieures à celles de l'extraction traditionnelle et qui peuvent, dans certains cas, s'accompagner d'une modification de la sélectivité de l'extraction (**Anizon 2003**). **Chemat et al. (2006)**, ont prouvé que l'extraction par hydrodistillation assistée par micro-ondes de l'huile essentielle de lavande est meilleure en termes d'économie d'énergie, de rapidité (10 min au lieu de 90 min), de rendement, et de qualité des huiles obtenues comparée à l'extraction par hydrodistillation conventionnelle.

Dans deux autres études sur les fleurs de lavande et les écorces d'oranges, **Sahraoui et al. (2008, 2011)**, ont montré que l'entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes était plus performant que l'entraînement à la vapeur d'eau conventionnel avec des durées d'extraction nettement plus faibles : 6 minutes contre 30 minutes pour la lavande et 120 minutes pour l'orange.

#### **I.4. Activité antioxydante**

Les réactions d'oxydation dans divers produits gras (agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, lubrifiants, etc.) nuisent fréquemment aux qualités de ces derniers, alors dépréciés. Sous les effets de certains facteurs tels que l'oxygène atmosphérique et la température, ces produits s'oxydent en devenant notamment rances, visqueux, de couleur foncée et donc impropres quant à leurs usages.

La préservation des corps gras contre l'oxydation repose habituellement sur l'usage d'additifs antioxydants synthétiques ou naturels, lesquels limitent et/ou retardent la détérioration oxydative résultant de la formation de nombreux radicaux libres dans des réactions radicalaires en chaînes avec le dioxygène. Ces antioxydants sont généralement des composés phénoliques d'origine pétrochimique comme le butyl hydroxytoluène (BHT), le butyl hydroxyanisole (BHA) ou encore les gallates (Sel ou ester de l'acide gallique) (**Johnson et Gu, 1988 ; Zhang, 2004**).

Les huiles essentielles dont l'activité antioxydante est connue de façon empirique depuis des siècles peuvent être une bonne alternative aux antioxydants de synthèse.

En effet, de nombreux travaux, sont venus renforcer ces observations empiriques et expliquer leurs modes d'actions et de leurs composants.

##### **I.4.1. Oxydation et antioxydants**

L'oxydation des lipides représente un problème important pour certaines industries, puisqu'elle est responsable de la baisse de qualité et de la diminution de la durée de conservation des produits cosmétiques et alimentaires. Ce phénomène conduit à l'odeur rance des nourritures en putréfaction.

L'addition des antioxydants permet de limiter l'oxydation de ces derniers selon deux mécanismes :

- 1- Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers.
- 2- Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres.

#### **I.4.2. Evaluation de l'activité antioxydante**

Toutes les méthodes de mesure du pouvoir antioxydant d'un principe actif repose sur la provocation d'une oxydation sur une matrice sensible, et mesurer par la suite le ralentissement de la dégradation de cette matrice protégée par l'antioxydant par rapport à un témoin sans protection (**Rolland, 2004**).

Les tests de mesure de l'activité antioxydante peuvent être classés principalement en deux groupes :

- les tests relatifs à l'évaluation de la peroxydation des lipides dans lesquels le substrat est un lipide ou lipoprotéine placé dans des conditions standards et où l'inhibition est mesurée;
- les tests permettant de mesurer le pouvoir de piégeage des radicaux libres (Scavenging of free radical).

#### **I.5. Activité antimicrobienne**

Un antimicrobien est une famille de substances qui tuent (bactéricide) ou inhibent (bactériostatique) la croissance des microbes tels les bactéries (activité antibactérienne), les mycètes (activité antimycosique), les virus (activité antivirale), ou les parasites (activité antiparasitaire).

Les antibiotiques sont une classe d'antimicrobiens, qui peuvent potentiellement être utilisés comme médicaments en médecine pour traiter les infections à cause de leur basse toxicité pour l'Homme et pour l'animal. Dans la crainte d'un mauvais usage des antibiotiques, une alternative à leur utilisation s'imposa. Des études expérimentales ont été entreprises en France, dès 1885, sur les huiles essentielles et leur pouvoir antimicrobien.

Depuis, de nombreux travaux, sont venus renforcer ces résultats et expliquer les modes d'actions de certaines huiles essentielles et de leurs composants.

##### **I.5.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne**

Il existe plusieurs méthodes pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Le choix d'une méthode ou d'une autre est conditionné par l'insolubilité des huiles essentielles dans les milieux aqueux, leur volatilité, et la nécessité de les tester à de faibles concentrations.

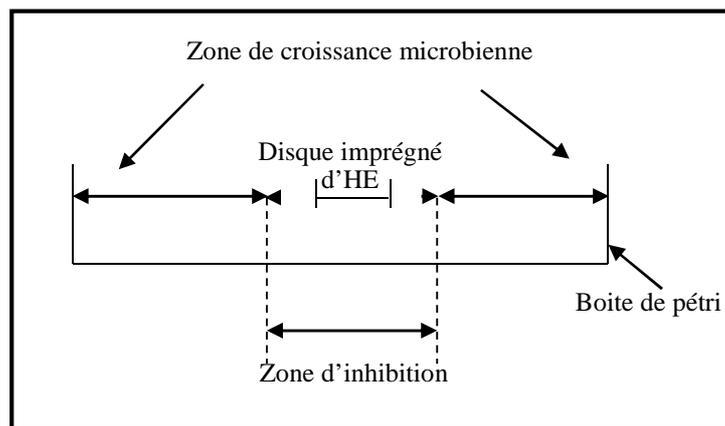
L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale : antibiogramme ou méthode de diffusion en milieu gélosé.

### - Technique des disques

Ce test est effectué par dépôt sur un milieu gélosé, préalablement ensemencé en surface avec une culture microbienne, d'un disque stérile de cellulose de 6 mm de diamètre (Whatman N°1) imprégné d'une quantité de solution d'huile essentielle.

L'huile essentielle diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. Après incubation, chaque disque apparaît entouré d'un halo clair représentant la zone d'inhibition de la croissance (Figure I.3). La lecture des résultats se fait par mesure des diamètres en millimètres de ces zones. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits. Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité (**De Billerbek, 2007**) :

- Résistant :  $D = 6 \text{ mm}$ ;
- Intermédiaire :  $6 \text{ mm} \leq D \leq 13 \text{ mm}$ ;
- Sensible :  $D > 13 \text{ mm}$ .



**Figure I.3** : Aromatoگرامme sur boîte de Pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.

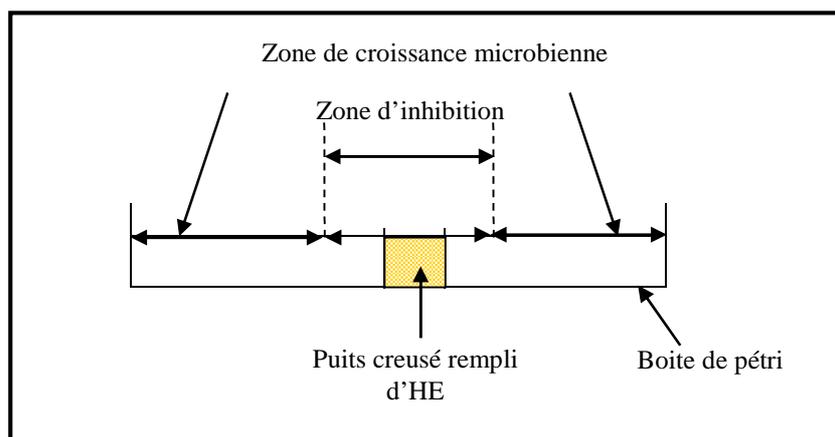
### - Technique des puits

La méthode de diffusion en puits a été proposée pour la première fois par **Cooper et Woodman en 1946** et a été reprise par **Shroeder et Messing en 1949**. Elle assure une diffusion radiale de l'huile essentielle à partir d'un puits en donnant une zone d'inhibition claire facilement mesurable.

La méthode consiste à découper un puits circulaire de 6 mm de diamètre dans la gélose et y verser 25  $\mu\text{L}$  d'une solution d'huile essentielle de concentration connue (Figure I.4). L'huile essentielle diffuse de façon radiale en donnant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec une suspension bactérienne.

L'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur une échelle qui classe le pouvoir antimicrobien en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 4 classes (Fauchere et Avril, 2002 ; Meena et Sethi, 1994) :

- Fortement inhibitrice :  $D > 28$  mm ;
- Modérément inhibitrice :  $16 < D < 28$  mm ;
- Légèrement inhibitrice :  $10 < D < 16$  mm ;
- Non inhibitrice :  $D < 10$  mm



**Figure I.4 :** Diffusion radiale dans une boîte de Pétri d'un puits creusé dans la gélose et rempli d'huile essentielle

### I.5.2. Paramètre de l'activité antimicrobienne

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) caractérisent l'activité antimicrobienne. Le rapport CMB/CMI permet de déduire l'effet (microbicide ou microbiostatique) de l'huile essentielle étudié sur une souche microbienne donnée.

#### - Concentration Minimale Inhibitrice CMI

La CMI est la concentration d'huile essentielle la plus faible ne laissant pas de culture microbienne visible (pas de croissance de la population) (Meena et Sethi, 1994).

#### - Concentration Minimale Bactéricide CMB

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Elle représente la concentration de l'huile essentielle induisant l'effet bactéricide (Courvalin, 2006).

#### - Rapport CMB / CMI

Ce rapport peut être utilisé pour distinguer les huiles essentielles bactéricides ( $CMB/CMI \leq 2$ ), des huiles essentielles bactériostatiques (CMB très éloignée de la CMI). Il définit également la tolérance d'une souche ; cette dernière est dite tolérante quand  $CMB/CMI \geq 32$  (Schroeder et Messing, 1949).

## II. MATERIELS ET METHODES

### II.1. Matière végétale

La matière végétale utilisée pour l'extraction de l'huile essentielle des aiguilles de pin a été cueillie au niveau de la forêt de Bainem située à 15 km à l'Ouest d'Alger dans le massif forestier de Bouzaréah. La plante a été identifiée au niveau de l'ENSA (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie) et l'INRF (Institut National de Recherche Forestière) comme étant du pin d'Alep : *Pinus halepensis* Mill. Elle a été séchée à l'air libre et à l'abri du soleil.

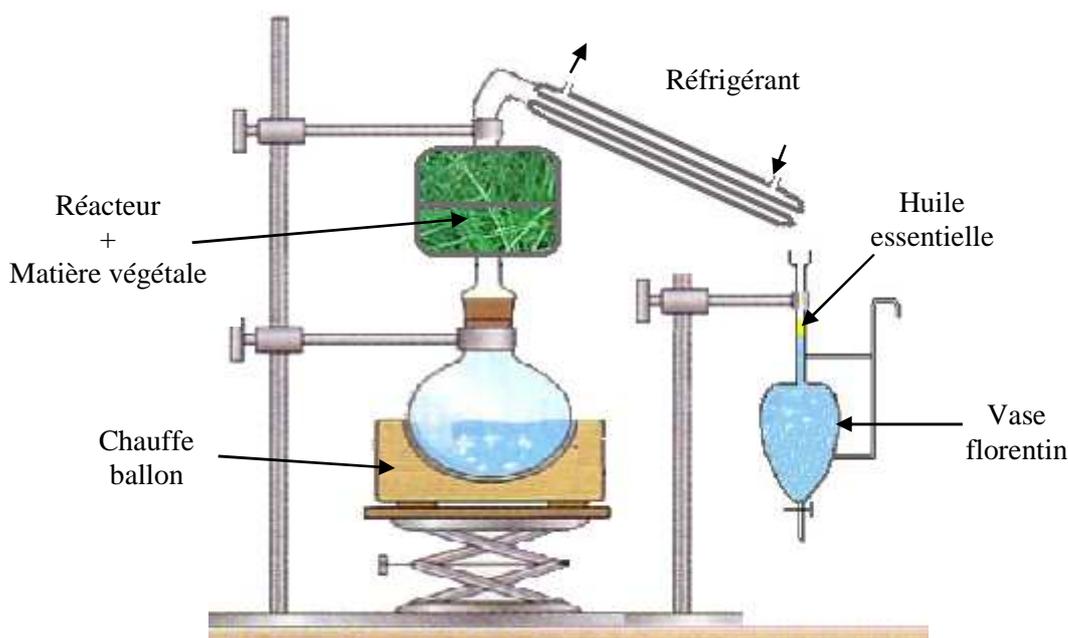
Pour tous les essais, la matière végétale utilisée a été échantillonnée selon la méthode de quartage. Cette méthode est très ancienne et facile à réaliser. Il suffit d'étaler le lot de plante sur une surface plane en forme de carré qui sera par la suite divisé par des diagonales en quatre lots triangulaires. Les triangles opposés seront retenus pour former le nouvel échantillon. Ce dernier sera étalé et partagé comme précédemment et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de plusieurs échantillons homogènes.

### II.2. Appareillages et protocoles expérimentaux

L'étude expérimentale sur l'extraction de l'huile essentielle portera sur quatre procédés d'extraction dans le but d'effectuer une étude comparative entre ces procédés à savoir :

- L'entraînement à la vapeur d'eau (**EV**),
- L'hydrodistillation (**HD**),
- L'entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes (**EVMO**),
- L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (**HDMO**).

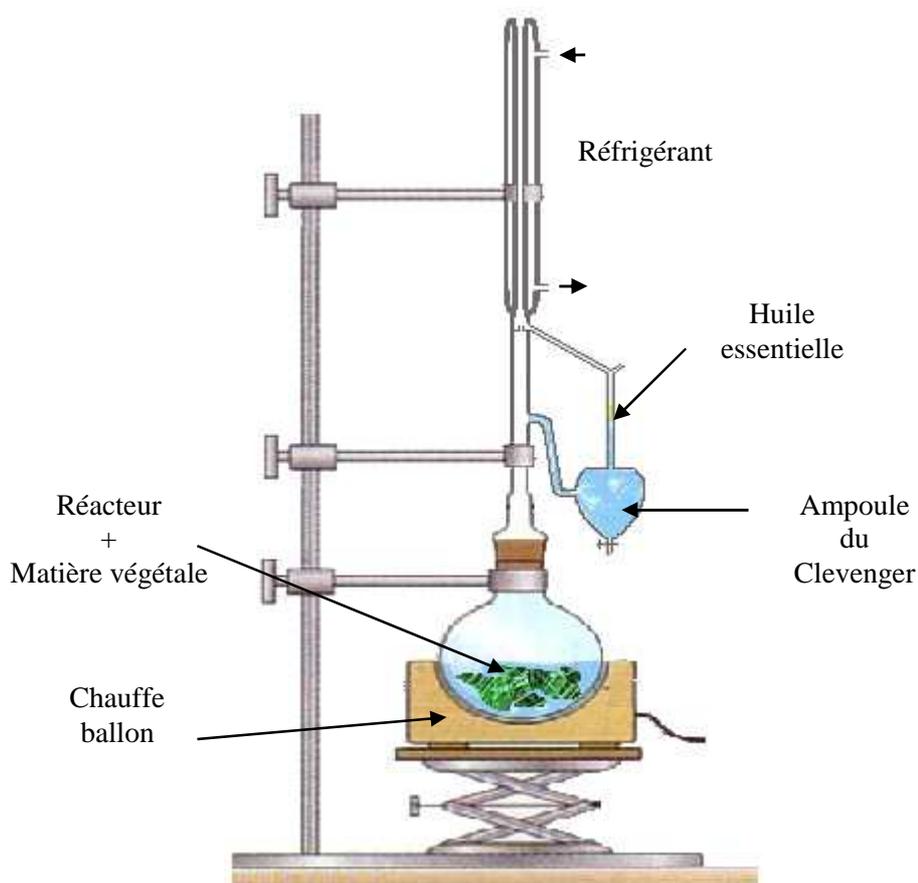
Les extractions ont été réalisées à l'aide de dispositifs expérimentaux schématisés par les figures I.5 à I.8 :



**Figure I. 5 :** Dispositif de l'entraînement à la vapeur d'eau (**EV**)

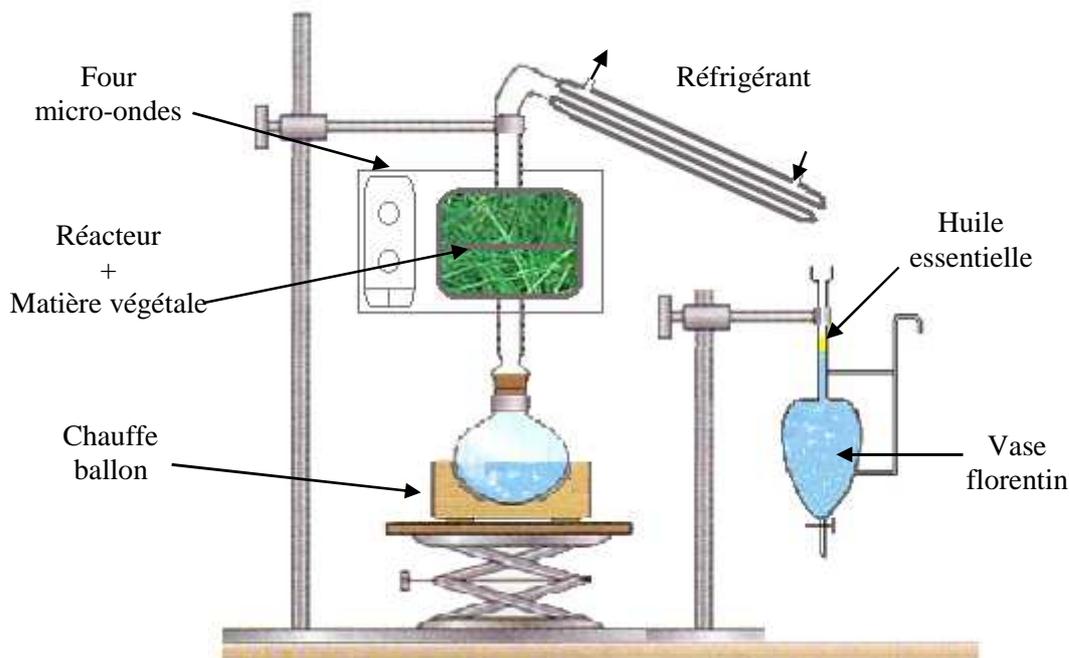
Le dispositif expérimental utilisé pour l'**entraînement à la vapeur d'eau** est représenté sur la figure I.5. Il comprend un chauffe ballon, un ballon de deux litres servant à produire de la vapeur d'eau surmonté d'un réacteur. Celui-ci est rempli de matière végétale et relié à un réfrigérant servant à condenser le mélange vapeur d'eau-huile essentielle. La vapeur formée dans le ballon passe dans le réacteur contenant la plante et entraîne l'huile essentielle. Un vase florentin est utilisé pour la récupération du distillat. L'huile essentielle est récupérée après décantation.

A l'échelle du laboratoire, le dispositif expérimental utilisé pour l'**hydrodistillation** est représenté sur la figure I.6 et comprend : un chauffe ballon et un ballon de deux litres contenant l'eau et la matière végétale. Le ballon est relié à un Clevenger lui-même relié à un réfrigérant pour la condensation du mélange vapeur d'eau-huile essentielle. Le distillat est récupéré dans l'ampoule du Clevenger. L'huile essentielle est récupérée après décantation.



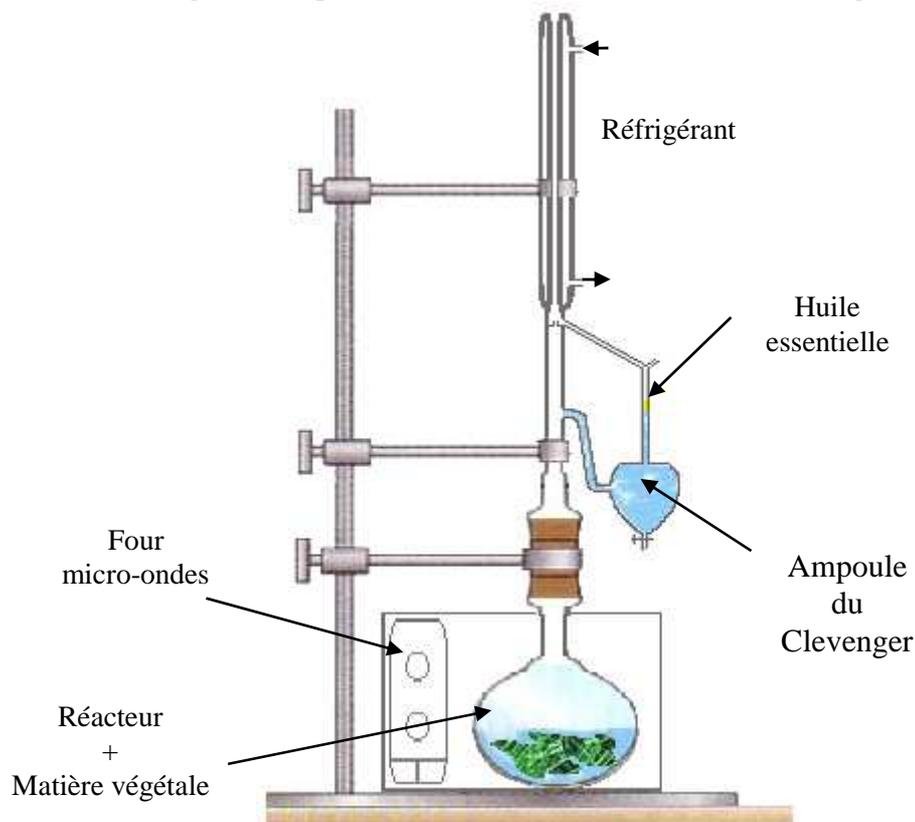
**Figure I.6 :** Dispositif de l'hydrodistillation (HD)

Le dispositif expérimental utilisé pour l'**entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes** représenté sur la figure I.7 est le même que celui utilisé pour l'entraînement à la vapeur conventionnel, la seule différence est que dans ce cas le réacteur contenant la matière végétale est placé à l'intérieur du four micro-ondes.



**Figure I.7 :** Dispositif de l'entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes (EVMO)

Le même dispositif expérimental utilisé pour l'hydrodistillation conventionnelle est utilisé pour l'**hydrodistillation assistée par micro-ondes** ; dans ce cas, le ballon contenant l'eau et la matière végétale est placé à l'intérieur du four micro-ondes (figure I.8).



**Figure I.8 :** Dispositif de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO)

Afin d'aboutir au meilleur rendement en huile essentielle, une optimisation des paramètres opératoires est impérative ; pour cela une étude paramétrique a été effectuée pour les procédés étudiés.

L'étude paramétrique a porté sur l'optimisation du temps d'extraction, du débit de vapeur d'eau et de la puissance de chauffe par micro-ondes. Les domaines de variation de ces paramètres sont résumés dans le tableau I.3.

**Tableau  
I.3**

Domaines de variation des paramètres opératoires

Procédés	Débit Q (g/min)	Puissance P (W)	Masse M(g)
Entraînement à la vapeur d'eau	2 – 4 – 6 – 8 - 10	-	100
Hydrodistillation	2 – 4 – 6 – 8	-	50
Entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes	16	300 – 400 -500 – 700	100
Hydrodistillation assistée par micro-ondes	-	300 – 400 -500 – 700	50

## II.3. Méthodes de calcul et de mesure

### II.3.1. Le taux d'humidité

Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé selon la norme officielle AOCS (1993) et calculé selon la formule suivante :

$$H = \frac{V_e}{M_H} \rho_e 100 \quad (\text{I-1})$$

H : Le taux d'humidité de la matière végétale (g eau/ g M<sub>H</sub>), ou en (%)

V<sub>e</sub> : Le volume d'eau dans le tube en (mL)

M<sub>H</sub> : La masse humide de la matière végétale en (g)

ρ<sub>e</sub> : La masse volumique de l'eau à 20°C (0,998 g.mL<sup>-1</sup>)

Les valeurs obtenues pour les trois échantillons de plante utilisés pour l'étude sont de 28,94 %, 22,95 % et 10 %.

### II.3.2. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de matière végétale sèche utilisée. Il est calculé par la relation suivante :

$$R_{HE} (\%) = \frac{M_{HE}}{M_S} \times 100 \quad (I.2)$$

$R_{HE}$  : Rendement en huile essentielle (%)

$M_{HE}$  : La masse d'huile essentielle (g)

$M_S$  : La masse de la matière végétale sèche (g)

$$M_S = (1 - H)M_H \quad (I-3)$$

$H$  : Le taux d'humidité de la plante (%)

$M_H$  : La masse humide de plante (g)

### II.3.3. Activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée pour les huiles essentielles extraites par EV et EVMO. Pour les deux autres procédés HD et HDMO, les quantités d'huiles étaient insuffisantes pour les tests.

L'étude a été réalisée selon la méthode de piégeage des radicaux libres à l'aide du radical DPPH\* décrite par Mimica- Dukic et al. (2004).

Un volume de 25  $\mu$ L de la solution à tester est mélangé avec 975  $\mu$ L de la solution de DPPH. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 10 secondes. Une lecture de l'absorbance au spectrophotomètre est ensuite effectuée à une longueur d'onde de 517 nm. Les écarts-types ont été calculés à partir de trois séries d'expériences.

### II.3.4. Activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne a été effectuée sur les souches bactériennes et fongiques suivantes (Tableau I.4):

Tableau I4	Souches bactériennes et fongiques utilisées
Bactéries Gram +	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.</li> <li>▪ <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 1533.</li> <li>▪ <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</li> <li>▪ <i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 478</li> </ul>
Bactéries Gram –	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</li> <li>▪ <i>Escherichia coli</i> ALA</li> <li>▪ <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.</li> <li>▪ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.</li> <li>▪ <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603.</li> <li>▪ <i>Aeromonas</i> ALA</li> </ul>
Levure	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> LSTE1.</li> </ul>
Moisissures	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <i>Aspergillus niger</i> LSTE 22.</li> <li>▪ <i>Rhizopus stolonifer</i> LSTE 15.</li> </ul>

---

Les souches ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Alger sauf pour *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* (souches fournies par le laboratoire de Sciences et Techniques de l'Environnement de l'ENP). Elles ont été conservées au réfrigérateur à une température de 4°C sur gélose inclinée de conservation.

### a. Préparation des huiles

Les huiles essentielles n'étant pas miscibles avec l'eau, elles sont diluées dans de l'éthanol.

### b. Préparation de l'inoculum

#### ➤ Préparation des bactéries

Avant la réalisation des tests antibactériens, un repiquage des souches est effectué. Ce repiquage est effectué sur milieu solide (gélose inclinée) puis incubé à 37°C. Après 24 h d'incubation, ces tubes sont conservés au réfrigérateur à une température de 4°C.

À partir de cette culture bactérienne fraîche, quelques colonies sont prélevées et ensemencées dans 10 mL de bouillon nutritif stérile. L'incubation dure 24h à 37°C.

#### ➤ Préparation des moisissures

Les moisissures sont revivifiées par suspension de quelques spores sur milieu liquide YM (Yeast Malt) suivie d'une incubation à 30°C durant 72h.

#### ➤ Préparation des levures

Une petite quantité de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) est diluée dans 10 mL de bouillon YM puis incubée à 30°C pendant 24 à 48h.

### c. Détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux huiles essentielles du pin

Les surfaces des géloses nutritives (Bactéries), YMA (Levures et Moisissures) ont été ensemencées en surface avec 0,1 mL de l'inoculum. Après 15 min, la surface des géloses devient sèche ce qui permet de creuser, au centre de chaque boîte et au moyen d'une pipette Pasteur, des puits de 6 mm de diamètre ; ces derniers sont remplis avec 25µL de la solution d'huile essentielle diluée dans l'éthanol.

Pour chaque souche, une culture témoin est réalisée en remplissant les puits avec 25 µL d'éthanol. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve, pour les bactéries à 37°C et pour les champignons à 30°C pendant 48h.

A titre comparatif, des antibiotiques sont testés dans les mêmes conditions avec les mêmes suspensions par la méthode des disques.

L'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur une échelle de mesure qui classe le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne. La mesure des diamètres tient compte du diamètre du puits ou du disque qui est de 6 mm (Joffin et Leyral, 2006).

---

#### **d. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)**

La détermination de la CMI et de la CMB est réalisée suivant un protocole utilisé par la pharmacopée Française pour l'étude de l'activité des antibiotiques. Ce protocole a été adapté pour permettre l'étude des huiles essentielles (**Courvalin, 2006**).

- ***Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI***

Une série de tubes à hémolyse secs et stériles sont remplis avec 5 mL de bouillon nutritif auxquels on ajoute 50  $\mu$ L de suspension bactérienne et 50  $\mu$ L de chaque dilution de l'huile essentielle. Pour le tube témoin, au lieu de la solution d'huile essentielle on ajoute 50  $\mu$ L d'éthanol ; les tubes sont ensuite agités au Vortex et mis à incuber 24 h à 37°C.

La gamme d'huile essentielle est préparée en réalisant une série de dilution allant de 1/2 jusqu'à 1/256. Les tubes secs et stériles sont remplis avec 50  $\mu$ L d'éthanol.

On ajoute pour le premier tube 50  $\mu$ L d'huile essentielle de la solution mère pour obtenir la dilution 1/2, puis 50 $\mu$ L sont prélevés du premier tube et ajouté dans 2<sup>ème</sup> tube pour obtenir la dilution 1/4 à partir de laquelle on prélève aussi 50  $\mu$ L et on les dépose dans le 3<sup>ème</sup> tube on obtient ainsi la dilution 1/8 et ainsi de suite jusqu'à la dilution 1/ 256.

- ***Détermination de la CMB***

Après la détermination de la CMI, prélever à l'anse de platine à partir de tous les tubes où aucune culture ne s'est développée (tubes restés limpides de concentration > CMI) et ensemercer en surface sur des boîtes Pétrie, puis incuber 24h à 37°C.

La CMB est définie par la concentration ne laissant persister au plus que 0,1 % de survivants (**Courvalin, 2006**).

#### **II.4. Analyse de l'huile essentielle**

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Chrompack CP 9002, équipé d'une colonne capillaire en Silice fondue de type DB5 de 30m de longueur, 0,25mm de diamètre et 0,25 $\mu$ m d'épaisseur de film, d'un détecteur à ionisation de flamme réglé à 280°C et alimenté par un mélange de gaz H<sub>2</sub>/Air et d'un injecteur splitsplitless réglé à 250°C. Le gaz vecteur est l'azote à 1 mL/min. Le mode d'injection est split (rapport de fuite de 1/50).

La température de la colonne est programmée de 50°C (3 min) à 250°C à raison de 2°C/min, puis maintenue à 250°C pendant 10 min.

L'identification des constituants de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* est faite par comparaison des indices de rétention I<sub>P</sub> introduit par KOVATS en 1958 et de leurs spectres de masse à ceux cités dans la littérature (**Adams, 1995**).

Par définition, l'indice de rétention d'un alcane linéaire est égal à 100 fois son nombre d'atomes de carbone.

### III. RESULTATS

#### III.1. Influence des paramètres opératoires

L'étude effectuée pour l'extraction de l'huile essentielle de pin par les quatre procédés a porté sur l'évaluation de l'influence sur le rendement en huile essentielle du temps d'extraction, ainsi que du débit de vapeur d'eau et de la puissance des micro-ondes.

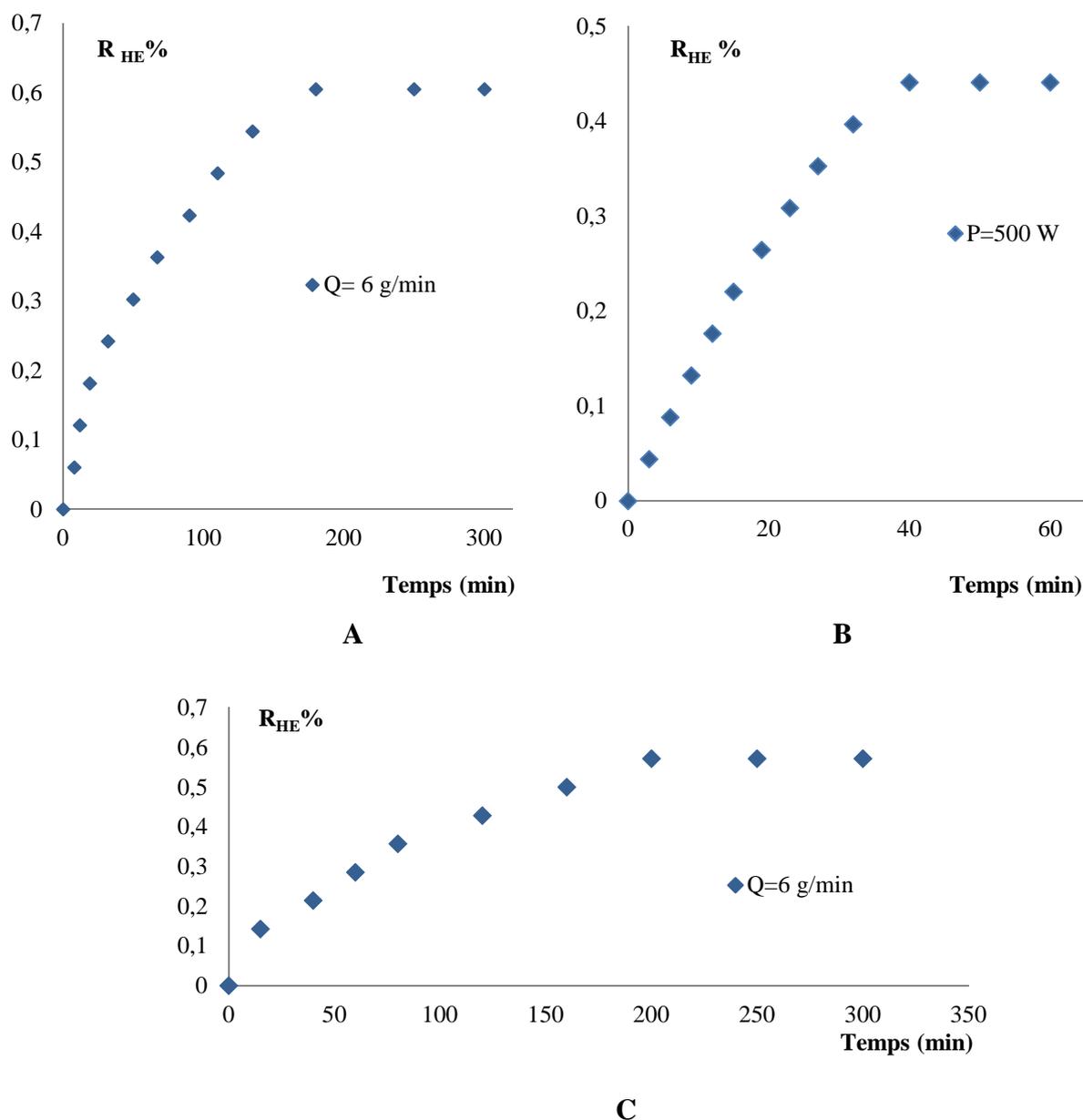
##### III.1.1. Influence du temps d'extraction

La représentation des variations du rendement en huile essentielle en fonction du temps, nous permet de remarquer que pour l'**entraînement à la vapeur d'eau** (figure I.9.A) le rendement augmente rapidement durant les 15 premières minutes, son évolution est plus lente par la suite pour se stabiliser au bout de 3 heures. La durée d'extraction a donc été fixée à 3 heures pour tous les essais.

La figure I.9.B représentant l'extraction par **entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes** montre que le rendement augmente rapidement et que la totalité de l'huile est récupérée au bout de 40 minutes. Cette durée a été fixée pour tous les essais réalisés par ce procédé.

Les variations du rendement en huile essentielle en fonction du temps des extractions par **hydrodistillation** (figure I.9.C) montre que le rendement augmente graduellement et est stable après trois heures d'extraction.

Les quantités d'huile obtenues pour l'extraction par **hydrodistillation assistée par micro-ondes** étant très faible il n'a pas été possible de suivre la cinétique d'extraction. Par conséquent la durée d'extraction a été fixée à 90 min, durée à partir de laquelle nous n'avons plus observé d'huile dans le distillat.



**Figure I.9 :** Evolution du rendement en huile essentielle en fonction du temps  
 A : Entraînement à la vapeur d'eau, B : Entraînement assisté par micro-ondes, C : Hydrodistillation

Afin de déterminer l'ordre de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle, nous avons supposé que cette dernière suit une loi du premier ordre où la vitesse d'extraction s'écrit comme suit :

$$-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right] = k_E t$$

Où :

$k_E$  : la constante de vitesse d'extraction ( $\text{min}^{-1}$ ),

$R_{HE\infty}$  : le rendement en huile essentielle au temps infini (%),

$R_{HE}$  : le rendement en huile essentielle au temps  $t$  (%).

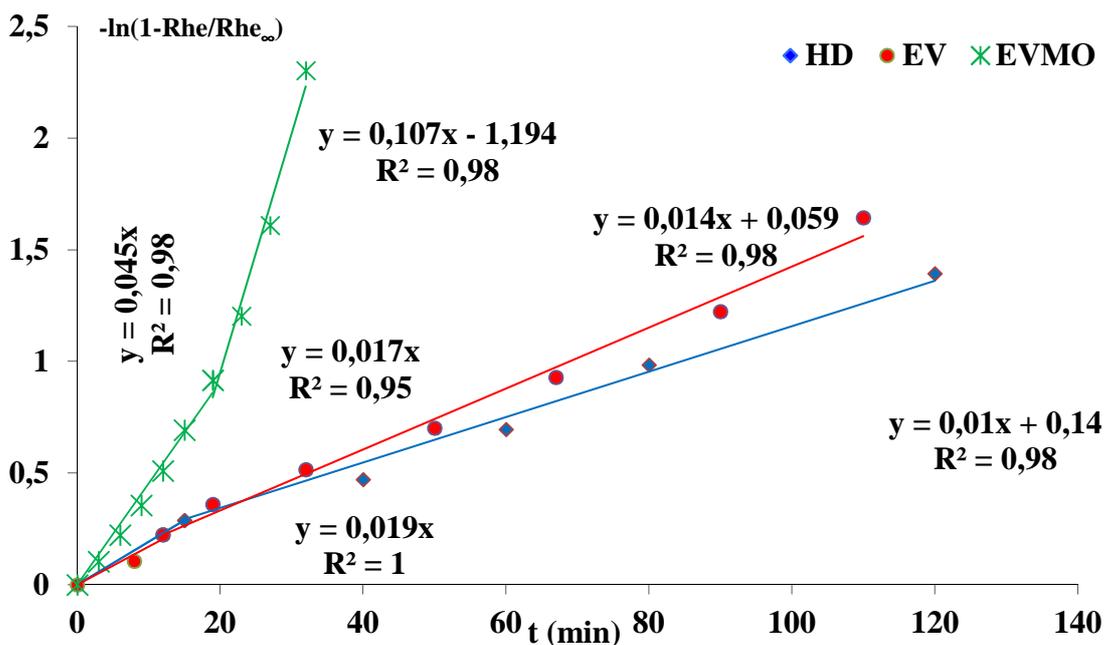


Figure I.10 : Evolution de  $-\ln\left[1 - \frac{R_{HE}}{R_{HE\infty}}\right]$  en fonction du temps

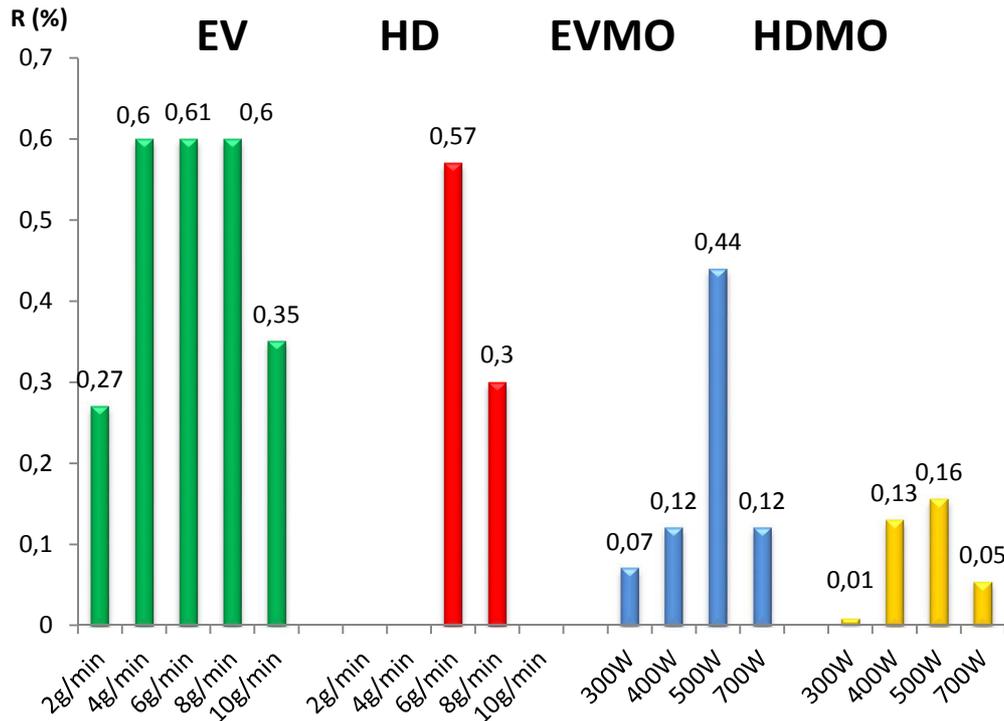
La figure I.10 met en évidence deux droites pour chacun des procédés, ce qui nous permet de conclure que les trois procédés EVMO, EV et HD se font en deux étapes distinctes et que les cinétiques d'extraction suivent une loi du 1<sup>er</sup> ordre.

Les sites d'huile essentielle étant endogènes, la première étape, correspondrait à la mise en chauffe de la matière végétale. Cette étape est plus rapide dans le cas de l'EVMO avec une constante de vitesse 2,5 fois plus importante que pour les deux autres procédés. Ceci serait dû à l'action des micro-ondes, qui provoqueraient l'expansion puis l'éclatement des sites d'huile essentielle. Celle-ci étant plus accessible à la vapeur d'eau, la cinétique d'extraction est alors plus rapide pour la seconde étape.

Concernant l'EV et l'HD conventionnels les constantes de vitesses sont comparables pour les deux étapes d'un même procédé et pour les deux procédés entre eux. Ceci peut s'expliquer par le fait que pour ces deux procédés, la vapeur doit diffuser à travers la structure cellulaire pour atteindre les sites d'huile essentielle. Ces derniers étant endogènes et la structure cellulaire n'étant pas expansée, l'accès à l'huile est plus difficile, la cinétique d'extraction est donc plus lente. Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature pour l'extraction de l'huile essentielle d'orange (Bousbia, 2009 ; Farhat, 2011; Sahraoui, 2011) et de carvi (Farhat, 2010).

### III.1.2. Influence du débit de vapeur d'eau et de la puissance de chauffe par micro-ondes

Les résultats de l'influence du débit de vapeur d'eau et de la puissance de chauffe par micro-ondes sont illustrés par la figure I.11.



**Figure I.11 :** Evolution du rendement en fonction du débit de vapeur et de la puissance de chauffe

Pour l'**EV**, nous pouvons remarquer que le maximum d'huile essentielle extraite (0,61%) est obtenu pour un débit de 6 g/min. Des rendements proches de ce dernier sont observés pour les débits de vapeurs égaux à 4 g/min et 8 g/min (0,60%).

Nous remarquons aussi que pour un débit de 2 g/min, le rendement en huile essentielle est le plus faible (0,27 %) ; cela pourrait être expliqué par le fait que pour un faible débit, la vapeur d'eau n'est pas suffisante pour entraîner l'huile essentielle. La diminution du rendement pour le plus fort débit (10 g/min) pourrait s'expliquer par la création de chemins préférentiels. Une partie de la matière végétale n'est pas en contact avec la vapeur et l'huile n'est donc pas extraite.

Concernant l'extraction par **HD**, les débits 2 et 4 g/min, n'ont donné aucun résultat. Il semble que la quantité de vapeur soit insuffisante.

Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, le meilleur rendement est obtenu pour un débit de 6 g/min. La diminution du rendement pour 8 g/min pourrait s'expliquer par une solubilisation partielle de l'huile essentielle dans l'eau pendant l'hydrodistillation.

L'examen de la figure I.11, montre que la quantité maximale d'huile essentielle extraite par **EVMO** est obtenue pour une puissance de 500 W. Les rendements en huile essentielle obtenus pour les puissances de 300W et de 400 W sont beaucoup moins importants.

Ceci peut s'expliquer par le fait que la chaleur générée par ces puissances n'est pas suffisante pour faire éclater les cellules sécrétrices d'huile essentielle, et donc une partie de cette dernière n'est pas extraite.

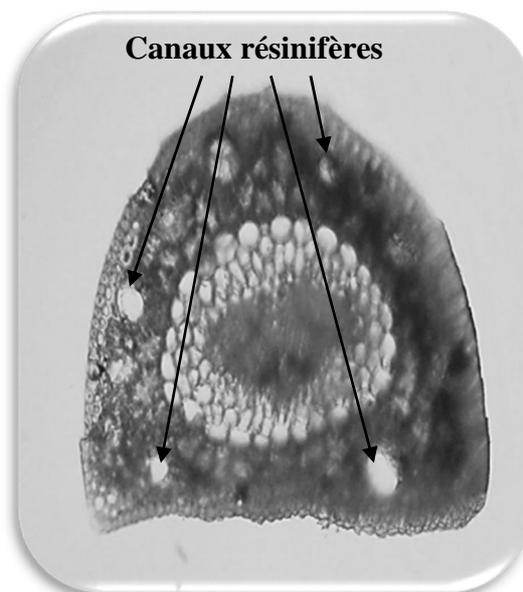
En revanche, pour une puissance de 700 W, nous observons une diminution du rendement. La chaleur générée par cette puissance étant très importante, une partie de l'huile est probablement détruite par les micro-ondes ; en effet nous avons remarqué que la matière végétale commençait à brûler.

Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, nous avons évalué l'influence de la puissance de chauffe par micro-ondes sur le rendement en huile essentielle pour les extractions par **HDMO**. Nous remarquons que le rendement optimal est obtenu pour une puissance de 500 W. Pour une puissance de 300 W, le rendement en huile essentielle est pratiquement nul. Cette puissance serait insuffisante pour récupérer l'huile de la plante. Par contre pour 700 W, la faible valeur du rendement serait due au fait qu'une partie de l'huile essentielle s'est solubilisée dans l'eau d'hydrodistillation en plus du fait qu'une partie des micro-ondes est absorbée par l'eau.

### III.2. Impact des procédés d'extraction sur la structure de la matière végétale

Afin de mettre en évidence l'impact des procédés d'extraction étudiés sur la structure des aiguilles de pin et de confirmer les hypothèses émises pour l'explication des cinétiques d'extraction, des observations microscopiques ont été réalisées sur la matière végétale avant, pendant et après extraction.

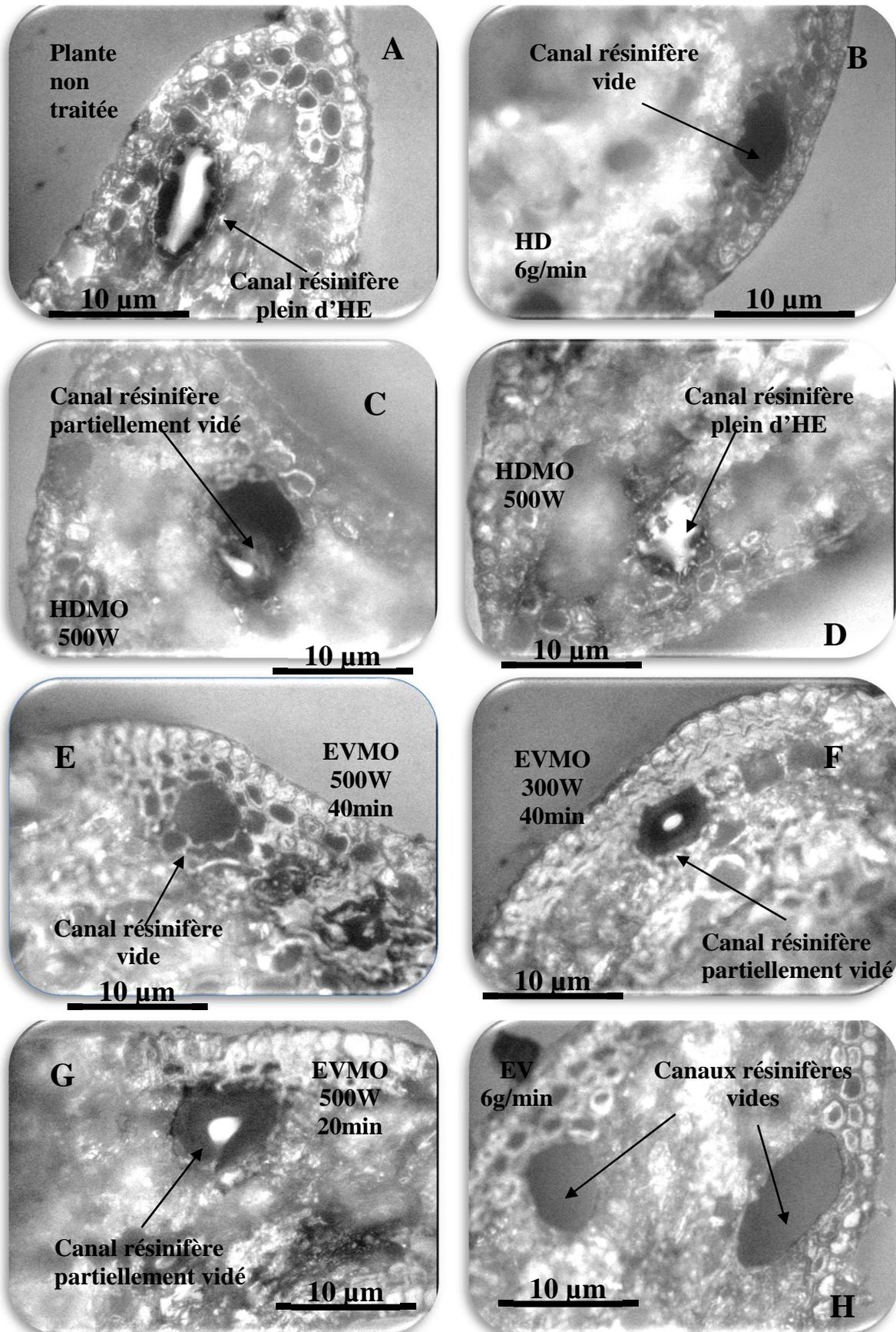
La figure I.12 illustrant la coupe transversale d'une aiguille de pin non traitée montre que les canaux résinifères servant à emmagasiner l'huile essentielle sont endogènes ce qui explique les durées d'extraction relativement longues observées, particulièrement pour les procédés conventionnels (3 heures).



**Figure I.12:** Coupe transversale d'une aiguille de pin d'Alep observée au Microscope (x100)

Nous pouvons constater des coupes de la figure I.13 ce qui suit :

- Les canaux résinifères sont pleins d'huile essentielle pour la plante non traitée (figure I.13.A), vides pour les aiguilles de pin traitées par EVMO (500 W, 40 min) et EV (figures I.13. E et H), et partiellement vidés pour celles soumises à l'EVMO et l'HDMO (figure I.13. C, F et G). De plus des différences sont observées dans les structures cellulaires. En effet, les aiguilles traitées par EVMO et EV sont expansées, particulièrement pour l'EVMO, ce qui explique la diminution de la durée d'extraction pour ce procédé. L'augmentation brutale de la température provoquée par les micro-ondes à l'intérieur des cellules riches en eau, engendre une pression interne ayant pour conséquence l'expansion des tissus. Les canaux résinifères endogènes sont alors plus accessibles à la vapeur qui peut entraîner plus facilement l'huile.
- Les aiguilles traitées par HD et HDMO (figures I.13. B, C et D), présentent une structure assez compacte, probablement due au contact prolongé avec l'eau chaude. L'accès à l'huile est plus difficile, ce qui explique la durée d'extraction plus longue de l'HDMO (90 min), comparée à celle de l'EVMO (40 min).
- Les coupes I.13. E et F, permettent d'expliquer l'impact de la puissance micro-ondes pour l'EVMO et les différences de rendements observés. Pour une puissance de 500 W, les poches d'huile sont vides et la structure cellulaire est bien aérée, alors que pour une puissance de 300 W, il reste de l'huile dans les canaux résinifères et la structure est partiellement expansée. Cette puissance est donc insuffisante pour récupérer la totalité de l'huile essentielle.
- Enfin, la coupe d'une aiguille réalisée après 20 minutes de traitement par EVMO à 500W (figure I.13.G), et qui correspond à la première étape de la cinétique d'extraction, montre que les canaux résinifères contiennent encore de l'huile essentielle et que la structure cellulaire n'est pas assez expansée. L'huile n'est pas facilement accessible de ce fait la cinétique d'extraction est faible. L'action prolongée des micro-ondes entraîne une expansion des tissus, ce qui facilite l'accès à l'huile ayant pour conséquence l'augmentation rapide du rendement observée pendant la seconde étape de la cinétique d'extraction.



**Figure I.13:** Coupes transversales d'aiguilles de pin d'Alep observées au Microscope (x 650) avant (A), pendant (G) et après extraction (B, C, D, E, F, H)

### III.3. Composition de l'huile essentielle de pin

L'identification des constituants de l'huile essentielle de pin d'Alep récupérée par entraînement à la vapeur d'eau et entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-onde a été réalisée suite à des analyses par chromatographie en phase gazeuse (CG). 40 constituants représentant 84,9% de l'huile essentielle extraite par **EV** ont été identifiés, ainsi que 39 constituants représentant 75,5% de l'huile essentielle extraite par **EVMO**. Les chromatogrammes des huiles essentielles sont représentés par les figures I.14 et I.15. Les résultats de l'identification des composés sont regroupés dans le tableau I.5.

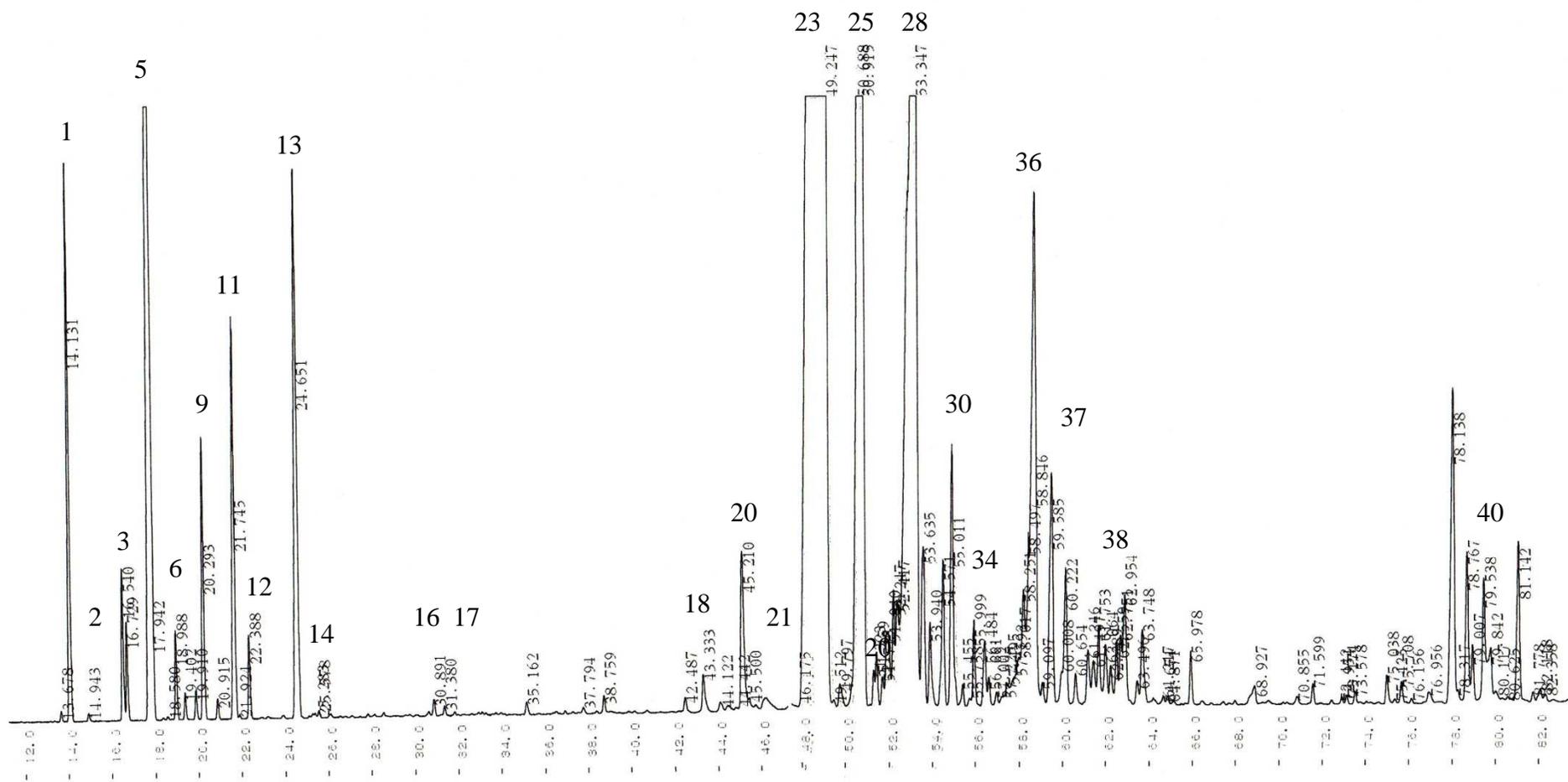


Figure I.14 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* obtenue par entraînement à la vapeur d'eau

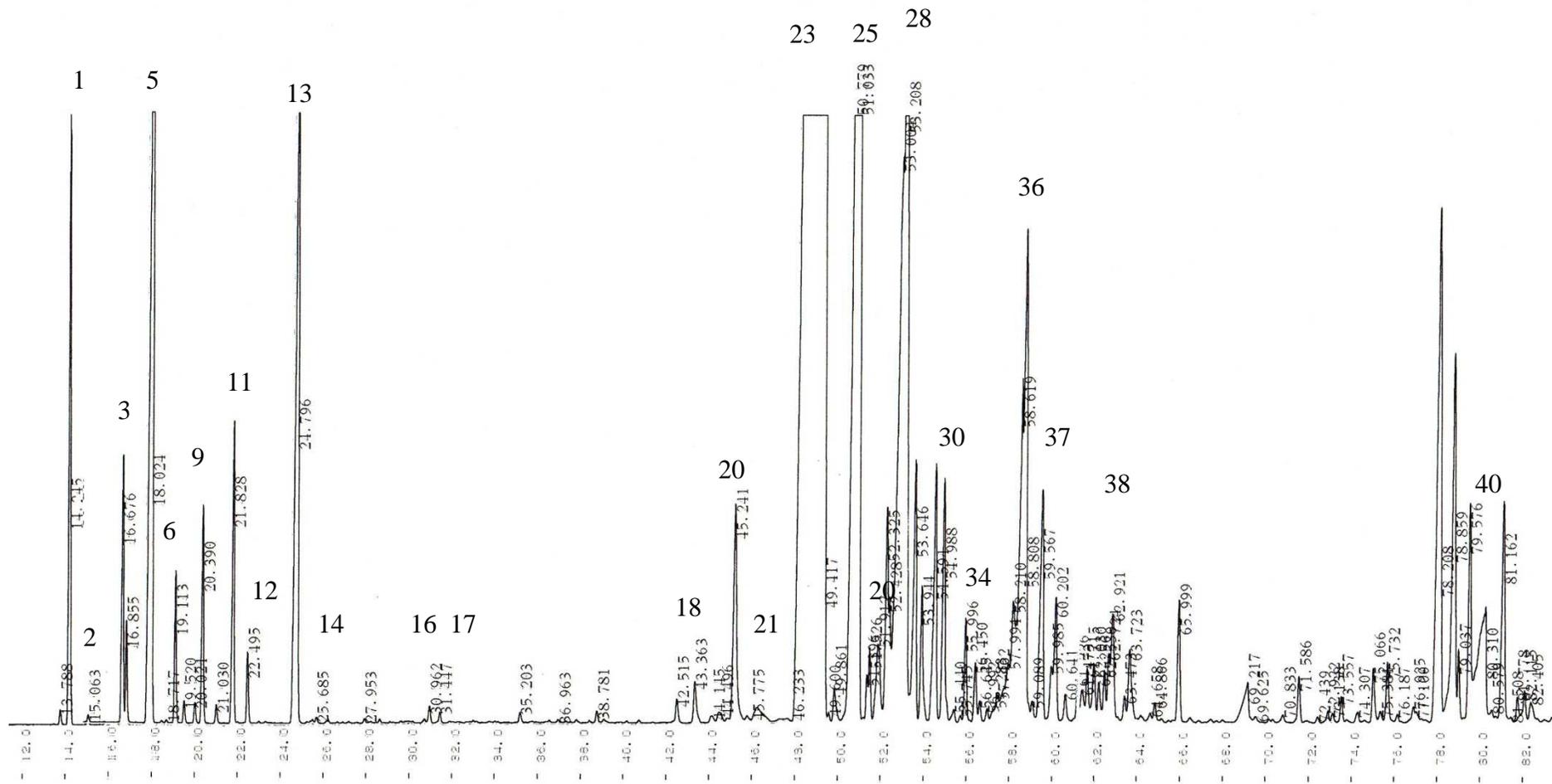


Figure I.15 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* obtenue par entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes

**Tableau  
15**

Composition chimique de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* extraite par EV et EVMO

N°	Constituant	IR réf.	EV		EVMO		Méthode d'identification
			IR <sub>EV</sub>	teneur relative (%)	IR <sub>EVMO</sub>	teneur relative (%)	
1	α-pinène	939	926	1,27	928	1,04	A,B
2	Camphène	953	939	tr	941	tr	A,B
3	Sabinène	972	966	0,36	968	0,48	A
4	β-pinène	981	969	0,21	971	0,16	A,B
5	Myrcène	991	989	<b>4,81</b>	990	<b>3,02</b>	A
6	α-Phellandrène	1005	999	tr	1001	tr	A
7	Hexyle Acétate	1008	1005	0,20	1007	0,25	A
8	δ-3-Carène	1011	1011	0,14	1013	0,08	A,B
9	α-Terpinène	1018	1024	0,72	1025	0,39	A
10	Limonène	1031	1033	tr	1034	tr	A
11	β-Ocimène	1040	1044	1,14	1046	0,59	A
12	γ-Terpinène	1062	1053	0,20	1055	0,13	A
13	α-Terpinolène	1088	1086	1,99	1088	2,09	A
14	α-Pinène Oxyde	1095	1095	tr	nd	nd	A
15	Linalool	1098	1099	tr	1100	tr	A,B
16	Bornéol	1165	1171	tr	1172	tr	A,B
17	Terpin-4-ol	1177	1177	tr	1178	tr	A,B
18	α-Cubénène	1351	1344	0,14	1344	0,12	A
19	Citonéllyl Acétate	1354	1356	tr	1356	tr	A
20	α-Yalangène	1372	1372	0,68	1372	0,74	A
21	α-Copaène	1376	1376	tr	1380	tr	A
22	Géranyl Acétate	1383	1386	0,24	1387	0,17	A
23	β-Caryophyllène	1428	1432	<b>41,96</b>	1435	<b>41,62</b>	A,B
24	Aromadendrène	1439	1440	3,18	1441	3,21	A
25	α-Humulène	1454	1457	<b>4,87</b>	1459	<b>4,56</b>	A
26	Allo-Aromadendrène	1461	1463	0,35	1464	0,25	A
27	γ-Muuroène	1475	1477	1,23	1478	1,16	A
28	Germacrène -D	1487	1493	<b>10,90</b>	1488	<b>2,81</b>	A
29	Bicyclogermacrène	1494	1497	<b>0,71</b>	1491	<b>3,87</b>	A
30	Bétabisabolène	1509	1502	0,30	1502	0,35	A
31	γ-Cadinène	1513	1512	0,54	1512	0,77	A
32	δ-Cadinène	1524	1519	0,98	1518	0,65	A
33	Bétabisabolène	1524	1525	0,07	1525	tr	A
34	Z-Nérolidol	1534	1534	0,25	1534	0,23	A,B
35	Elémol	1547	1544	0,32	1544	0,20	A
36	Caryophyllène-Oxyde	1581	1579	<b>4,68</b>	1582	<b>3,69</b>	A
37	Guaiol	1589	1590	1,07	1590	0,77	A
38	δ-Cadinol	1622	1620	0,23	1619	0,13	A
39	γ-Eudesmol	1630	1629	0,27	1628	0,13	A
40	Monoyl Oxyde	1989	1994	0,60	1995	0,68	A

Hydrocarbures monoterpéniques	10,94	8,01
Monoterpènes oxygénés	0,09	0,06
Sesquiterpènes	65,95	60,17
Sesquiterpènes oxygénés	6,81	5,15
Autres composés	1,09	1,12

tr : traces &lt; 0,05%

nd : non identifié

A : Identification par CG

B : Identification par substances de références

L'examen du tableau I.5 montre que l'huile essentielle présente un seul composé majoritaire : le bêta-caryophyllène avec plus de 41% pour les deux huiles et révèle l'existence du germacrène-D avec une teneur qui passe de 10,9% pour l'EV à 2,8% pour l'EVMO et du bicyclgermacrène avec une teneur de 0,71 pour l'EV et de 3,87 pour l'EVMO. Trois autres composés caractérisent également ces deux huiles avec des teneurs avoisinant les 3 à 4 %, un monoterpène : le myrcène, un sesquiterpène :  $\alpha$ -Humulène et un sesquiterpène oxygéné : le Caryophyllène-Oxyde.

Cette composition est en accord avec la littérature ; les teneurs sont très proches de celles identifiées par **Dob et al. (2005)**, avec 40,31% de  $\beta$ -caryophyllène, 7,92% de  $\alpha$ -Humulène et 1,23% de  $\alpha$ -pinène.

La composition chimique par famille de l'huile essentielle de *Pinus halepensis* (tableau I.5) nous révèle que :

- Les teneurs des hydrocarbures monoterpéniques sont du même ordre de grandeur.
- Les teneurs des hydrocarbures monoterpéniques oxygénés sont infimes.
- Les deux huiles sont caractérisées par de fortes teneurs en sesquiterpène.
- Les huiles extraites par les deux procédés présentent de faibles teneurs en sesquiterpènes oxygénés.

### III.4. Etude comparative des quatre procédés d'extraction

Les résultats obtenus par les quatre procédés étudiés sont résumés dans le tableau I.6.

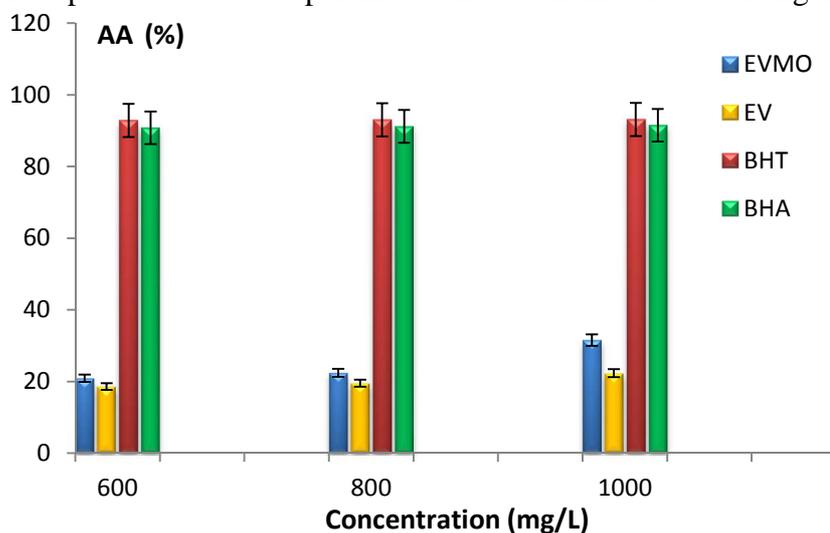
Procédé	EV	EVMO	HD	HDMO
	<b>Rendement</b> <b>R<sub>HE</sub> (%)</b>	0,61	0,44	0,57
<b>Durée</b> <b>d'extraction [min]</b>	180	40	180	90
<b>Constante de</b> <b>vitesse (min<sup>-1</sup>)</b>	k <sub>1</sub> = 0,017 k <sub>2</sub> = 0,014	k <sub>1</sub> = 0,045 k <sub>2</sub> = 0,1077	k <sub>1</sub> = 0,019 k <sub>2</sub> = 0,010	-

L'examen de ce tableau nous permet de tirer les conclusions suivantes :

- Les rendements obtenus par les procédés conventionnels (**EV** et **HD**) sont du même ordre de grandeur et plus importants que ceux obtenus par les procédés assistés par micro-ondes. Cependant, il faut noter que ces derniers n'ont pas été optimisés, vu que la valeur maximale de débit délivré par l'installation utilisée était limitée à  $16 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ . Cette valeur est insuffisante pour extraire la totalité de l'huile de la plante.
- Les durées d'extraction relatives aux procédés assistés par micro-ondes sont nettement plus courtes, ce qui est en accord avec la littérature. Ceci est confirmé par les constantes de vitesse qui sont plus importantes pour ces procédés. Les durées d'extraction pourraient encore être réduites une fois le débit de vapeur optimisé.

### III.5. Activité antioxydante

Les résultats obtenus pour l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau et entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes sont illustrés sur la figure I.16.



**Figure I.16 :** Activité antioxydante des HE de pin extraites par EVMO et EV

Nous pouvons constater que l'activité antioxydante de l'huile essentielle de pin extraite par les deux procédés considérés est relativement faible en comparaison avec les huiles essentielles extraite d'autres plantes telle que le thym (**Bertouche, 2012 a ; Bounatirou, 2007 ; Sokmen, 2004; Tepe, 2005**) qui peut atteindre une activité de 90% pour une concentration de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Nous remarquons aussi qu'on obtient une meilleure activité pour l'huile essentielle extraite par micro-ondes ce qui est en accord avec la littérature (**Ramdani, 2010 a**). Cette différence d'activité est certainement liée à la composition chimique des deux huiles.

### III.6. Activité antimicrobienne

#### III.6.1. Détermination de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

L'étude de l'activité antibactérienne a porté sur l'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis de l'huile essentielle de pin extraite par entraînement à la vapeur d'eau et entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes.

Afin de comparer les propriétés antimicrobiennes des huiles étudiées, la sensibilité et la résistance aux antibiotiques des souches testées, un antibiogramme a été réalisé en utilisant la technique des disques. Les diamètres des zones d'inhibitions sont portés sur le tableau I.7:

**Tableau I.7**

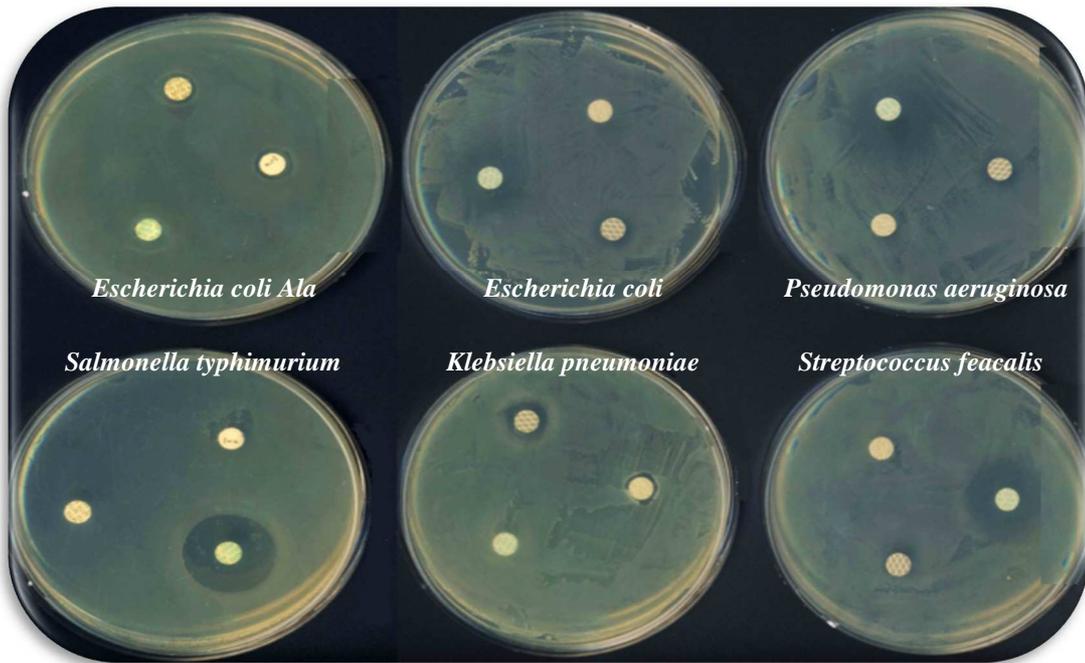
Antibiogramme : sensibilité des souches bactériennes utilisées vis à vis de quelques antibiotiques

Souche bactérienne	Diamètres moyen d'inhibition (mm)						
	P <sup>1</sup>	AMX <sup>2</sup>	MTR <sup>3</sup>	S <sup>4</sup>	AM <sup>5</sup>	Cs <sup>6</sup>	
Bactéries Gram +	<i>Enterococcus faecalis</i>	15,33±0,57	29±1	6±0	10±0	25±3	6±0
	<i>Staphylococcus aureus</i>	20±0	25,33±1,52	6±0	8,33±0,57	6±0	6±0
	<i>Micrococcus luteus</i>	22,66±3,21	27±1,73	6±0	7±0	23±1	6±0
	<i>Streptococcus faecalis</i>	12,33±0,57	19,33±1,54	6±0	8,66±0,57	21,66±0,57	6±0
Bactéries Gram -	<i>Salmonella typhimurium</i>	11,33±0,57	23±1	6±0	9,33±0,57	19,66±0,57	8±0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6±0	6±0	6±0	18±1	6±0	6±0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23,33±0,57	22,66±3,21	6±0	10±0	25±1	6±0
	<i>Escherichia coli</i>	13,66±0,57	15,66±0,57	6±0	10,6±0,57	19,33±1,15	7±0
	<i>Escherichia coli Ala</i>	9±0	6±0	9±0	7±0	6±0	7±0

<sup>1</sup>Pénicilline, <sup>2</sup>Amoxicilline, <sup>3</sup>Metronidazole, <sup>4</sup>Streptomycine, <sup>5</sup>Ampicilline, <sup>6</sup>Colistine

Ces résultats montrent que les souches bactériennes étudiées sont sensibles aux antibiotiques tests.

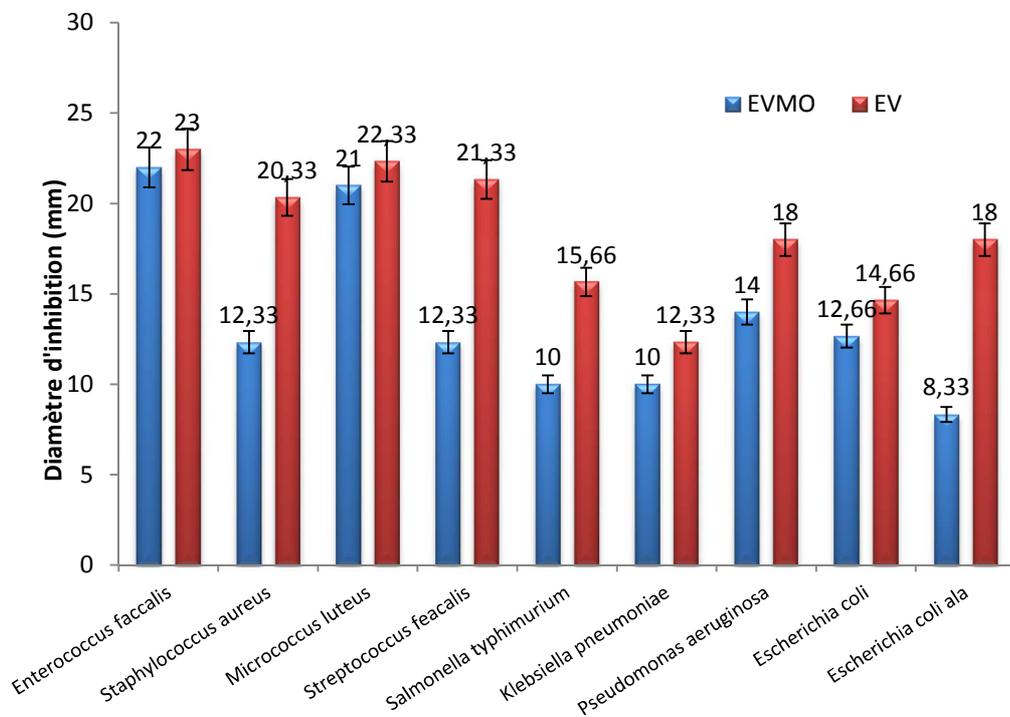
La figure I.17 illustre les diamètres d'inhibition obtenus pour l'antibiogramme



**Figure I.17:** Sensibilités de quelques souches bactériennes aux antibiotiques testés  
« Antibiogramme »

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de pin a été étudiée par la méthode des puits.

Les mesures des diamètres des zones d'inhibitions sont représentées sur la figure I.18.



**Figure I.18 :** Diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes en fonction des huiles essentielles étudiées

A partir de la figure nous remarquons que pratiquement toutes les souches bactériennes étudiées ont une sensibilité avérée vis-à-vis des deux huiles essentielles testées. La comparaison de ces résultats à ceux de l'antibiogramme (tableau I.7), révèle que les huiles testées ont pratiquement le même diamètre inhibiteur que les antibiotiques testés, cependant, le diamètre inhibiteur de l'huile essentielle extraite par EV sur la souche *Escherichia coli* Ala est le double pour l'huile essentielle en comparaison avec la pénicilline ou le metronidazole.

Pour l'huile extraite par un même procédé ; les souches bactériennes à Gram positif possèdent un diamètre d'inhibition moyen plus important que ceux des bactéries à Gram négatif ; ceci confirme les résultats des études antérieures.

En effet, comme l'ont démontrés **Loizzo et al. (2008)**, l'huile essentielle extraite des cônes de *P. brutia* présente une inhibition des agents pathogènes à Gram positif tel que *Staphylococcus aureus* (zone d'inhibition de 10 mm) tandis que nos résultats montrent que le diamètre d'inhibition est deux fois plus important pour l'extraction à la vapeur d'eau conventionnelle. **Hong et al. (2004)**, ont confirmé que les huiles essentielles à partir des aiguilles de ces espèces avaient des effets antibactériens avec un diamètre d'inhibition de 14 mm contre une souche de *Staphylococcus aureus*.

Pour les bactéries à Gram négatif, **Monica et al. (2008)** ont montré que l'huile essentielle extraite des cônes de *P. brutia* présente une inhibition des agents pathogènes à Gram négatif, tels que *Escherichia coli* (zone d'inhibition supérieure à 52 mm).

Pour les huiles essentielles extraites par le procédé d'entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes, nous distinguons des zones d'inhibitions inférieures à celles trouvées pour les huiles extraites par le procédé classique comme l'ont démontré **Fadel et al. (2011)** et **Ramdani et al. (2010 b, c)** sur l'huile essentielle de romarin et d'eucalyptus.

Ceci pourrait être dû à l'action des micro-ondes sur certains composés bioactifs de l'huile essentielle qui perdent leurs propriétés biologiques suite à un changement de composition des huiles. D'après les résultats de l'identification des composés des deux huiles essentielles, nous pouvons constater que la teneur relative en Germacrène D, composé connu pour ses propriétés antibactériennes (**Tabanca, 2001 ; Vagionas, 2007**), est de 10,9% pour l'EV alors qu'elle est de 2,8% pour l'EVMO. Cette faible teneur serait probablement liée à la diminution de l'activité de l'huile essentielle extraite par EVMO.

### Détermination des paramètres de l'activité antibactérienne

La méthode utilisée pour la détermination des paramètres de l'activité antibactérienne a porté sur la détermination de la CMI et la CMB. Cette étude a concerné les souches bactériennes les plus sensibles: *Salmonella typhimurium* et *Micrococcus luteus*. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I.8.

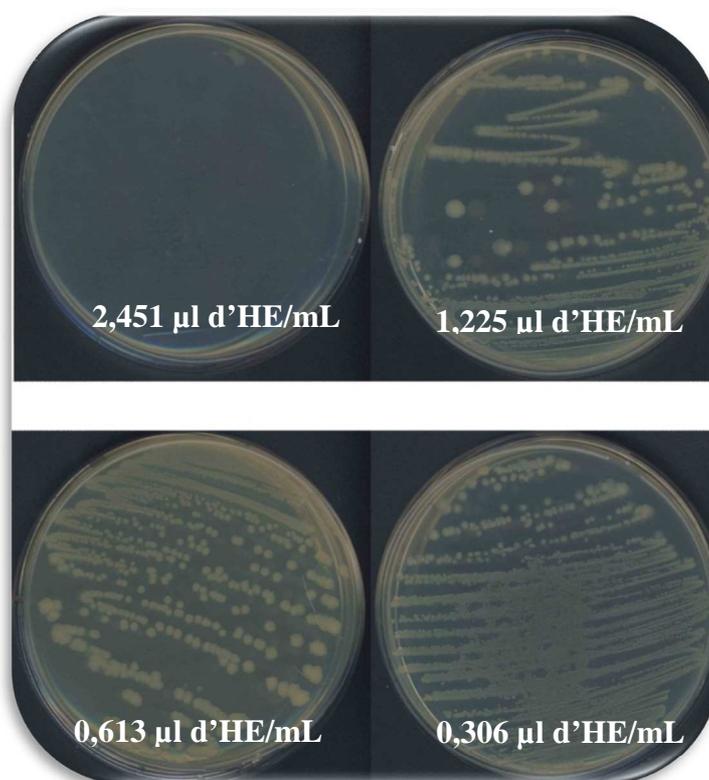
Tableau  
I8

Paramètres de l'activité antibactérienne des huiles essentielles testées

Souche bactérienne	EV			EVMO		
	CMI ( $\mu\text{L d'HE/mL}$ )	CMB ( $\mu\text{L d'HE/mL}$ )	$CMB/CMI$	CMI ( $\mu\text{L d'HE/mL}$ )	CMB ( $\mu\text{L d'HE/mL}$ )	$CMB/CMI$
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,306	2,451	8	0,306	2,451	8
<i>Micrococcus luteus</i>	0,306	2,451	8	0,306	2,451	8

Nous constatons que les concentrations minimales inhibitrices ainsi que les concentrations minimales bactéricides sont les mêmes, avec un rapport CMB/CMI égale à 8 impliquant un effet bactériostatique pour les deux huiles testées (Schroeder et Messing, 1949).

La figure I.19 illustre l'évolution de la croissance de la souche bactérienne *Salmonella typhimurium* en fonction de la concentration en huile essentielle.



**Figure I.19:** Evolution de la croissance de *Salmonella typhimurium* en fonction de la concentration en huile essentielle.

### III.6.2. Détermination de l'activité antifongique de l'huile essentielle

L'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle de pin a été réalisée par la méthode des puits sur *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* et *Saccharomyces cerevisiae*. Les souches fongiques étudiées ne présentent aucune sensibilité aux huiles essentielles de pin testées (absence de zone d'inhibition).

Ceci est dû à la composition de l'huile essentielle. En effet, les principaux composés fongiques sont généralement le thymol et le carvacrol, ce qui a été prouvé par **Rasooli et al. (2006)** en étudiant l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus parasiticus* exposé aux huiles essentielles extraites de deux variétés de thym : *Thymus eriocalyx* et *Thymus x-porloc*. Le résultat de cette étude a montré que *Thymus eriocalyx* contenant 64,3% de thymol présente une activité antifongique et un pouvoir inhibiteur plus important que *Thymus x-porloc* qui contient 30,7% de thymol. L'huile essentielle de pin ne contenant pas ces composés, elle ne présente pas d'activité envers les souches étudiées.

Les propriétés antifongiques de l'huile essentielle de pin rapportées dans la littérature seraient liées au chimiotype de la plante et/ou aux espèces fongiques considérées. Les résultats de **Abi-Ayad et al. (2011)** montrent que l'huile essentielle de *Pinus halepensis* possède une activité antifongique contre *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, et peut donc être utilisé comme un traitement naturel pour les infections fongiques, ainsi que conservateur naturel dans les aliments.

## CONCLUSION

Les rendements obtenus par les procédés conventionnels sont comparables (0,61% pour l'EV et 0,57 % pour l'HD) et supérieurs à ceux des procédés assistés par micro-ondes (0,44% pour l'EVMO et 0,16 % pour l'HDMO). La durée d'extraction a été nettement diminuée avec un gain de temps de plus de 77 % pour l'EVMO et 50 % pour l'HDMO.

L'huile essentielle obtenue à partir des aiguilles de pin (*Pinus halepensis*) a révélé une activité antioxydante moyenne (32% pour EVMO et 22% pour EV).

Quant à l'activité antimicrobienne, il semblerait que les micro-ondes agissent sur les composés bioactifs de l'huile essentielle puisque la sensibilité des souches est plus accentuée dans le cas de l'extraction par simple entraînement à la vapeur.

Les travaux effectués confirment que l'activité antibactérienne et antioxydante dépend directement de la technique d'extraction utilisée.

# ***Chapitre II***



## ***Valorisation des résidus d'extraction***



## *Chapitre II*

### *Valorisation des résidus d'extraction*

#### **INTRODUCTION**

Afin de mettre en valeur les résidus d'extraction des huiles essentielles, des extractions par solvant des résidus ont été effectuées pour déterminer la teneur en phénols totaux de ces derniers.

#### **I. POLYPHENOLS**

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique leur nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits du métabolisme secondaire des plantes. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (**Stanley, 2003**). En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (**Chen, 2004**), des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neuro dégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

Les polyphénols sont présents dans diverses substances naturelles : sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges, sous forme de proanthocyanidines dans le chocolat, d'acides caféoylquinique et féruloylquinique dans le café, de flavonoïdes dans les agrumes, les pépins de raisin et l'écorce de pin, et sous forme de catéchines comme l'epigallocatechin-3-gallate dans le thé vert, de quercétine dans les pommes, les oignons, etc.

#### **II. PROCÉDES D'EXTRACTION PAR SOLVANT**

L'extraction par solvant est utilisée pour l'extraction des concrètes ou oléorésines, de résinoïdes et d'absolues de mousse d'arbre, quand une partie de l'arôme ou du parfum n'est pas volatile ou peu entraînable par la vapeur d'eau. Son principe consiste à épuiser la matière végétale de ses constituants odorant généralement à température ambiante par un solvant volatil (éthanol, hexane) et qui ne se mélange pas avec l'eau. Le solvant extrait les molécules grâce à sa forte affinité avec elles. On élimine ensuite le solvant par distillation.

La solubilisation de la matière grasse se réalise par diffusion de la phase concentrée vers la phase moins concentrée. La diffusion moléculaire de l'intérieur vers l'extérieur, la surface des flocons en contact avec le solvant et la diffusion laminaire de la surface vers le solvant en mouvement sont les facteurs les plus importants. La vitesse d'extraction est limitée par la diffusion de l'intérieur vers l'extérieur et dépend directement de la structure interne des cellules, en particulier du degré de destruction des parois (**Debruyne, 2001**).

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces techniques peuvent être dites *conventionnelles* (utilisées depuis longtemps) et *nouvelles* (développées plus récemment) (**Luque de Castro et Garcia-Ayuso, 1998**).

Parmi les techniques conventionnelles, on trouve l'extraction par Soxhlet (**Grigonis, 2005 ; Reighard et Olesik, 2006**) et l'extraction en mode batch (**Herodez, 2003 ; Liu, 2006**).

Dans la catégorie « techniques nouvelles » on peut citer l'extraction assistée par ultrason (**Caniova et Brandsteterova, 2001 ; Wang, 2004**), l'extraction assistée par micro-ondes (Microwave Assisted Extraction) (**Viro, 2007**), l'extraction accélérée par solvants (Accelerated Solvent Extraction) (**Wang et Waller, 2006**), et l'extraction avec des fluides supercritiques (**Grigonis, 2005**).

### **II.1. Extraction par Soxhlet**

C'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant pur, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction et peut être utilisée quel que soit la matrice végétale.

Ses inconvénients les plus significatifs sont la durée importante d'extraction et la grande quantité de solvant consommée (devant être ultérieurement évaporé), ce qui limite sa rentabilité économique et la rend peu écologique. Il n'y a pas de possibilité de travailler à froid, ce qui peut être gênant avec des substances sensibles à la chaleur. Cette technique est limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable.

### **II.2. Extraction par Batch**

Son avantage majeur par rapport à l'extraction par Soxhlet est la possibilité de travailler facilement avec des mélanges de solvants (ex: différents ratios alcool-eau) et de contrôler la température d'extraction pour éviter le risque de destruction des composés thermolabiles. C'est une méthode simple et efficace mais qui exige des procédures ultérieures de filtration et de concentration relativement longues.

### **II.3. Extraction par Ultrasons**

Méthode simple, efficace et peu coûteuse. Par rapport à une extraction classique, elle offre une augmentation du rendement d'extraction et une accélération de la cinétique. Elle permet de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Elle est facile à mettre en œuvre. Comme le Soxhlet, l'extraction par sonication permet d'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels. Cependant, l'effet de l'extraction par ultrasons sur le rendement et la cinétique d'extraction est lié à la nature de la matrice végétale. La présence d'une phase dispersée mène à l'atténuation des ondes ultrasonores et les zones actives dans l'extracteur restent à proximité de l'émetteur d'ultrasons. Cette méthode ne permet pas de renouveler le solvant pendant le processus. L'étape limitante est la filtration et le rinçage après l'extraction.

#### **II.4. Extraction assistée par micro-ondes** (Microwave Assisted Extraction)

Elle utilise de plus petites quantités de solvant, n'est pas coûteuse et est considérablement rapide. Cependant, la température opératoire de cette technique est relativement haute (100 – 150 °C), ce qui pose des problèmes quand il s'agit de l'extraction d'antioxydants. Les autres inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part le besoin de l'étape postérieure de filtration ou de centrifugation pour éliminer le résidu solide de l'extrait.

#### **II.5. Extraction accélérée par solvants** (Accelerated Solvent Extraction)

Technique brevetée de la société DIONEX qui utilise les solvants conventionnels à des températures (50 – 200 °C) et des pressions (100 – 150 bar) élevées. La pression exercée est assez élevée pour maintenir le solvant à l'état liquide à température élevée. Pendant l'ASE®, le solvant reste toujours en dessous de ses conditions critiques. Ses avantages par rapport aux techniques conventionnelles (Soxhlet et batch avec agitation) sont : la consommation de plus petites quantités de solvant et la prévention des échauffements locaux. Ses inconvénients sont liés à son coût élevé et surtout à sa non sélectivité, ce qui impose des procédures supplémentaires de nettoyage des extraits. Les températures opératoires élevées peuvent aussi mener à une dégradation des solutés thermolabiles.

#### **II.6. Extraction par des fluides supercritiques**

Cette technologie considérée « verte » est très attractive et performante. Ses avantages sont : une durée d'extraction plus courte, une sélectivité élevée et la facilité d'éliminer le solvant après l'extraction par simple décompression.

Exemples d'applications : Extraction de molécules actives : décaféination du café, délipidation d'aliments, extraction/traitement d'arômes, épices, colorants, agents de texture, extraction de principes actifs à partir de plantes médicinales, purification de principes actifs, élimination de solvants résiduels, ...

### **III. MATERIELS ET METHODES**

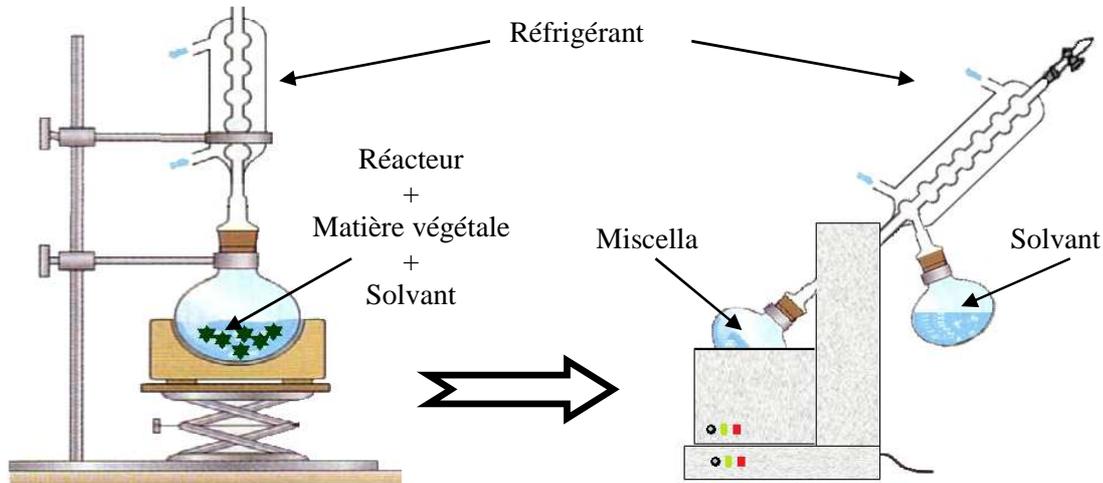
#### **III.1. Matière végétale**

Les matières végétales utilisées dans cette étude sont la plante fraîche (avant extraction de l'huile essentielle), ainsi que les résidus d'extraction des huiles essentielles, par les différents procédés : **EV**, **EVMO**, **HD** et **HDMO**. Les essais ont porté sur 20 g de plante entière ou broyée. Les taux d'humidités sont : 23% pour la plante fraîche, 50% pour l'**EV**, 15% pour l'**HDMO**, 8% pour l'**EVMO** et 20% pour l'**HD**.

#### **III.2. Extraction par batch**

Afin d'évaluer la teneur en phénols totaux des aiguilles de pins, la plante fraîche et les résidus de plante obtenus après extraction de l'huile essentielle par les quatre procédés étudiés ont subi une extraction dans 400 mL d'éthanol pendant 3 heures à température ambiante.

L'extraction se fait en batch (macération) et le mélange solvant-extrait, appelé miscella est ensuite séparé du solvant par évaporation sous vide, afin d'éviter la dégradation thermique des molécules odorantes (figure II.1). Le calcul du rendement se fait selon l'équation I.2, de la même manière que pour l'extraction de l'huile essentielle.



**Figure II.1 :** Extraction par solvant (Batch) et récupération de l'extrait

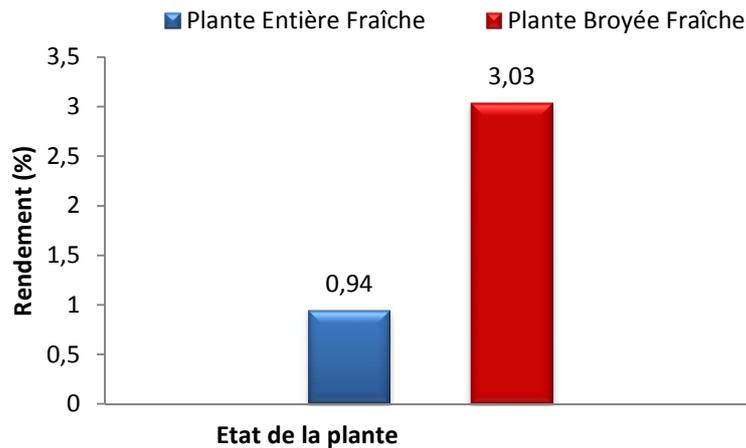
### III.3. Dosage des phénols totaux

L'évaluation de l'activité antioxydante pour les extraits par solvant a été réalisée par la méthode de dosage des phénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés. La mesure de cette dernière se fait au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm et rapportée à une courbe d'étalonnage donnant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en acide gallique.

## IV. RESULTATS

### IV.1. Influence de la nature de la plante sur le rendement en extrait

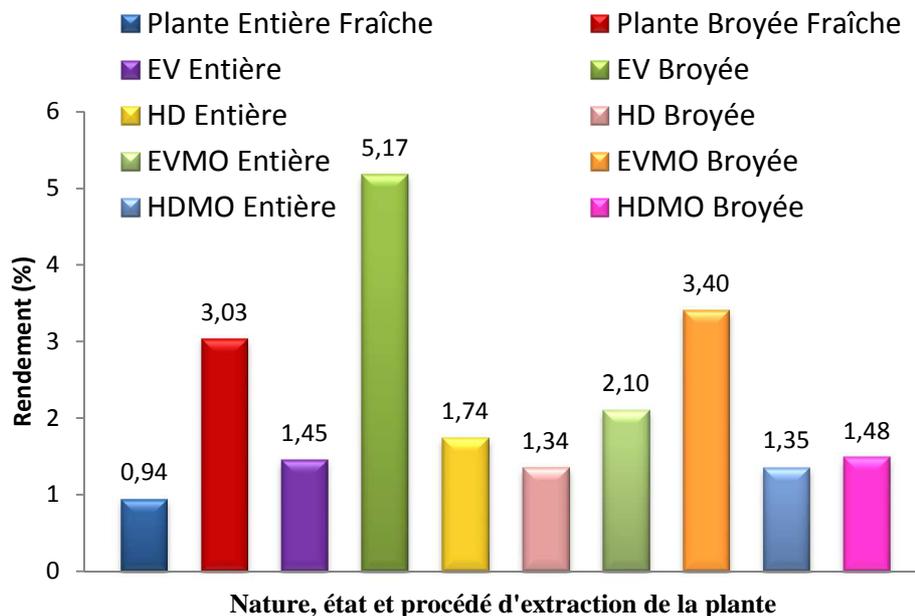
Les rendements en extrait obtenus après évaporation de l'éthanol sont illustrés sur la figure II.2.



**Figure II.2 :** Rendement en extrait éthanolique en fonction de l'état de la plante

L'examen de cette figure nous permet de conclure que la plante broyée donne de meilleurs rendements que la plante entière. Ceci est expliqué par le fait que le broyage augmente la surface d'échange entre le solide (plante) et le solvant et donc le transfert de l'extrait du solide vers le solvant est amélioré.

#### IV.2. Influence du procédé d'extraction



**Figure II.3 :** Rendement en extrait éthanolique en fonction de l'état de la plante et du procédé d'extraction

L'examen de cette figure nous permet de tirer plusieurs conclusions :

- A l'exception du résidu de l'HD et l'HDMO où les résultats sont comparables, la plante broyée donne de meilleurs rendements que la plante entière pour tous les autres cas.

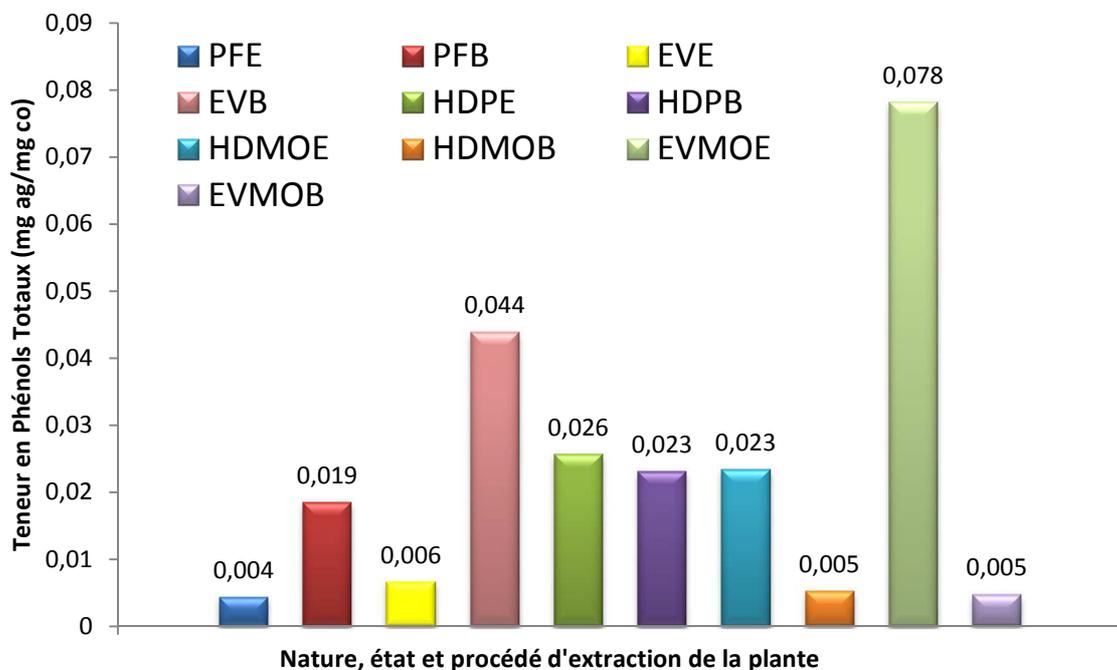
Concernant l'hydrodistillation, il est possible qu'une partie de ces extraits se soient déjà solubilisés dans l'eau lors de l'extraction de l'huile essentielle, ce qui explique également les faibles rendements en extraits éthanoliques par rapport à ceux obtenus pour les autres échantillons.

- Les rendements en extraits des résidus de l'EV et l'EVMO sont supérieurs à ceux de la plante fraîche (n'ayant pas subi d'extraction de l'huile essentielle). Il est possible que les composés solubles dans l'éthanol soient présents sous une forme liée (glycosides) dans la plante fraîche et ne sont donc pas extraits sous cette forme par l'éthanol. L'intervention de la vapeur lors de l'extraction de l'huile essentielle libère ces composés qui sont alors facilement extraits par l'éthanol.
- Le rendement en extrait du résidu de l'EVMO plus faible que celui obtenu pour le résidu de l'EV pourrait être dû à une perte de composés suite à l'action des micro-ondes.

Il est à noter que l'analyse des extraits pour déterminer leurs compositions chimiques reste le seul moyen qui puisse nous permettre de confirmer ou d'infirmer toutes les suppositions émises pour expliquer ces résultats.

### IV.3. Dosage des polyphénols des extraits éthanoliques

Afin d'avoir une première estimation qualitative de la nature des extraits éthanoliques récupérés, nous avons procédé au dosage de leur teneur en phénols totaux. Nous avons donc mesuré l'absorbance en fin d'extraction, puis calculé la concentration correspondante en acide gallique (à l'aide d'une courbe d'étalonnage) par gramme de concrète (co) utilisée et reporté ces valeurs sur la figure II.4.



**Figure II.4 :** Teneur en phénols totaux des extraits éthanoliques de la plante fraîche et des résidus de distillation

D'après la figure II.4, nous constatons que pour les résidus des procédés conventionnels ainsi que pour la plante fraîche la quantité de polyphénols extraite est supérieure quand la plante est broyée ce qui confirme que les sites sont plus accessibles. Par contre pour les procédés assistés par micro-ondes on observe le phénomène inverse.

En effet, les concentrations en polyphénols sont beaucoup plus importantes pour la plante entière. L'hypothèse émise est que la matière végétale soumise à l'action des micro-ondes lors de l'extraction de l'huile essentielle subie des modifications et sa structure est expansée. Bien qu'elle soit entière, les sites contenant les extraits sont facilement accessibles au solvant, par conséquent les rendements sont élevés. Le broyage de la plante expansée entraîne une perte de composés ayant pour conséquence une diminution des rendements en extrait.

Pour confirmer ces hypothèses d'autres essais ainsi que des coupes histologiques des résidus doivent être entrepris.

## **CONCLUSION**

Afin de valoriser au maximum les aiguilles de pin utilisées pour l'extraction de l'huile essentielle, une extraction par solvant reste un procédé très intéressant pour l'extraction des polyphénols des résidus.

En effet, les résultats de la teneur totale en composés phénoliques des extraits éthanoliques de résidus sont très intéressants, surtout pour le résidu entier d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes, où le rendement est de l'ordre de 0,08 mg d'acide gallique / mg de concrète.

# ***Chapitre III***



## ***Les biosolvants***



# Chapitre III

## Les biosolvants



### INTRODUCTION

Ce chapitre englobera des généralités sur les solvants pétrochimiques et biologiques, leurs origines et leurs devenir ainsi que leurs facteurs de sélectivité déterminés par les paramètres de Hansen.

### I. DEFINITION DES SOLVANTS

Un solvant est "un liquide qui a la propriété de dissoudre, de diluer ou d'extraire d'autres substances sans provoquer de modification chimique de ces substances et sans lui-même se modifier. Les solvants permettent de mettre en œuvre, d'appliquer, de nettoyer ou de séparer des produits."(INRS. Les Solvants [En Ligne])

Les solvants ont des propriétés intéressantes ; la plupart sont liquides et volatiles à température ambiante, ils ont la particularité d'être lipophiles, c'est-à-dire qu'ils sont attirés par les graisses et les substances huileuses. Certains solvants ont l'avantage d'être lipophiles et hydrophiles : ils ont une affinité à la fois pour les produits gras et pour les produits aqueux.

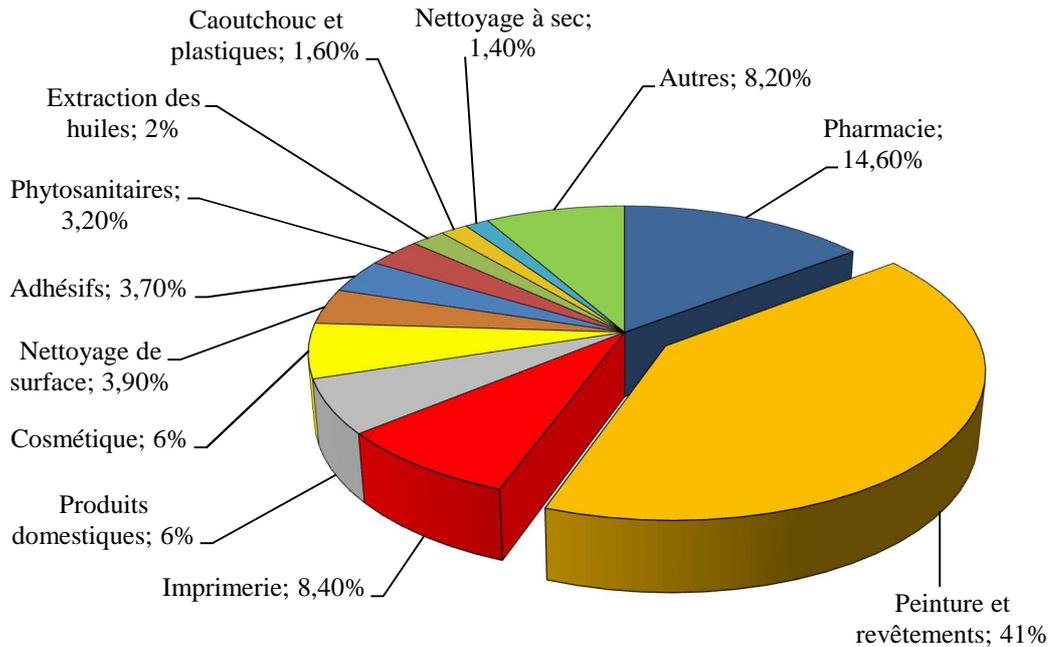
Les solvants existent sous différentes familles ; on peut en distinguer 9 principaux groupes :

- Hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène, xylènes, cumène...).
- Solvants pétroliers (hors aromatiques : alcanes, alcènes...).
- Alcools (méthanol, éthanol, glycols...)
- Cétones (acétone, méthyéthylcétone...).
- Esters (acétates, agrosolvants...).
- Éthers (éther éthylique, THF, dioxane...).
- Éthers de glycol.
- Hydrocarbures halogénés (chlorés, bromés ou fluorés).
- Solvants particuliers (amines, amides, terpènes...).

### II. DOMAINE D'APPLICATIONS

En fonction de leurs propriétés, les solvants peuvent être utilisés comme diluants et adjuvants dans le domaine des revêtements (peintures, vernis, encres), des produits phytosanitaires (pesticides) et des adhésifs. Ils trouvent également des applications comme agents de nettoyage (dégraissage, décapage, nettoyage à sec), comme solvants d'extraction (parfums, médicaments) ou comme solvants de synthèse dans les industries chimiques et pharmaceutiques

En 2002, une étude a été menée par l'ALCIMED sur les domaines d'applications des solvants en Europe. La figure III.1 résume les résultats obtenus.



**Figure III.1 :** Répartition du marché des solvants pétrochimiques en 2000 en Europe (ALCIMED, 2002 ; ALCIMED, 2007 ; Bewa, 2002)

Nous pouvons remarquer que la plus grande utilisation des solvants émane de l'industrie des peintures et revêtements avec 41%, suivie des produits pharmaceutiques (plus de 14%), viennent ensuite les encres d'imprimerie (8%) et puis des secteurs très variés tels que les produits domestiques et cosmétiques (6%), les produits de nettoyages, etc.

Selon une étude menée en mai 2006, la production des déchets de solvants organiques en Algérie s'est élevée à 267 tonnes/an (**Profil national pour l'évaluation des capacités de gestion rationnelle des produits chimiques en Algérie, mai 2006**).

### III. REGLEMENTATION SUR LES SOLVANTS

Les solvants traditionnels sont généralement des composés organiques volatils, nocifs pour la santé et pour l'environnement. En effet, ils contribuent à la formation d'ozone troposphérique et à la contamination des eaux et des sols. Les solvants représentent 29% des composés organiques volatils émis dans l'atmosphère. C'est pourquoi les réglementations environnementales contraignent les entreprises à utiliser des solvants de substitution. Dans ce contexte sont apparus sur le marché les biosolvants, issus de matières premières renouvelables et en particulier de la biomasse (**Johnson et Lusas, 1983**). Ils présentent l'avantage d'offrir, d'une part, une alternative aux anciennes ressources et, d'autre part, un bilan environnemental positif (réduction des composés organiques volatils **COV**, biodégradables et non-toxiques pour la plupart d'entre eux).

Il existe quelques milliers de solvants pétrochimiques, dont une centaine sont couramment utilisés. Quelques exemples sont illustrés dans le tableau III.1.

Tableau  
III.1

Exemple de solvants pétrochimiques usuels (Pôle de compétitivité Industries et Agro-Ressources (IAR), FICHE n°2 AGROSOLVANTS)

	Nom	Formule	T. éb (°C/760mmHg)	Point éclair (°C)	Etiquetage
<b>Ethers</b>	Acétone		56	-20	R11 ,36 ,66
	Ether diéthylique		36	-45	R12 ,19 ,22,66 ,67
	Diméthoxyméthane		42	-32	R11 ,36/37
	Méthyl-ter-butyl éther MTBE		55	-28	R11 ,38
	Ether diisopropylique		69	-28	R11 ,19 ,66 ,67
	Tetrahydrofurane THF		65	-15	R11 ,19
1,4-dioxane			12	R11 ,19 ,40 ,36/37 ,66	
<b>Alcools</b>	Méthanol		64	12	R39/23/24/25, R11
	n-Propanol		97	25	R11 ,41 ,67
	Isopropanol		82	15	R11 ,36 ,67
	Isobutanol		108	30	R10 ,37/38 ,41 ,67
<b>Hydrocarbures</b>	Hexane		68	-22	R11 ,62 ,65 ,48 ,38 ,67 ,51 ,53
	Heptane		98	-2	R11 ,65 ,38 ,67 ,50/53
	Cyclohexane		81	-20	R11 ,65 ,36 ,67 ,50/53
	Toluène		110	4	R11 ,20
	White Spirit	Mélange d'hydrocarbures			
<b>Hydrocarbures halogénés</b>	Trichloroéthylène		87	>55	R45 ,36/38 ,52/53 ,67
	Tetrachloroéthylène		121	>55	R40 ,51/53
	Dichlorométhane		39	>55	R40
	Chlorobenzène		132	23	R10 ,20 ,51/53
	Trichlorométhane		61	>55	R40 ,22 ,38 ,48/20/22
	n-Bromopropane		71	>55	R10 ,20



F- Facilement inflammable



T- Toxique



Xi- Irritant



Xn- Nocif



N- Dangereux pour l'environnement

R nombre : Phrase de risque (voir Annexe B)

Aucun solvant n'est inoffensif. Ils ont tous des effets sur la santé, variables selon les produits et la nature de l'exposition professionnelle. Ils peuvent être locaux (picotements, irritations) ou généraux ou encore systémiques (vertiges, états ébriés, intoxications aiguës, coma...). Des contacts répétés avec des solvants peuvent en outre avoir des effets sur le **système nerveux**, le **sang** (hématotoxicité, cancer), le **foie** ou les **reins** (insuffisances rénales ou hépatiques, cancers) et la fonction de **reproduction (fertilité, grossesse)**. Ces effets toxiques ou ces pathologies apparaissent parfois plusieurs années après l'exposition.

Les solvants présentent par ailleurs :

- des risques d'**incendie** et d'**explosion** (la majorité des solvants étant volatils et inflammables, leurs vapeurs peuvent former des mélanges explosifs en présence d'une source d'inflammation),
- des risques de réactions dangereuses notamment en cas de mélange de produits, de mauvaises conditions de stockage ou de transport,
- des risques pour l'environnement (déversement accidentel, rejets de composés organiques volatils)

Bien que très dangereuse, l'utilisation des solvants pétrochimiques a toujours été acceptée, pour des raisons d'efficacité et de moindre coût. Ces dernières années, les mentalités ont changé, des directives et des lois ont été établies dans le but de réglementer leurs utilisations.

Dans ce contexte sont apparus quatre directives Européennes relatives aux émissions de COV, qui visent à réduire leurs émissions en fixant notamment des valeurs limites d'émission (VLE).

- La directive COV de mars 1999 (**1999/13/CE**) fixe, d'une part, des valeurs limites spécifiques à chaque composé présentant des phases de risque, et d'autre part, des valeurs limites d'émission (VLE).
- La directive **2001/81/CE** vise à limiter les émissions des polluants acidifiants, eutrophisants et précurseurs de l'ozone troposphérique. Elle fixe des plafonds nationaux d'émissions pour quatre types de polluants atmosphériques : NO<sub>x</sub> , SO<sub>2</sub> , NH<sub>3</sub> et COV.
- La directive **2004/42/CE** est complémentaire de la directive 1999/13/CE car elle a comme objectif la réduction des émissions de COV pour des applications qui ne sont pas réalisées sur sites industriels, comme la mise en peinture de bâtiments et la retouche automobile.
- Enfin, la directive **2004/73/CE** fixe la liste des substances dangereuses et donne leur classification. Elle concerne donc également les solvants (**De Caro et Thiebaud Roux, 2008**).

Au niveau sanitaire et environnemental, des mesures préventives ont également été prises pour supprimer l'usage des produits dangereux CMR (Cancérogènes-Mutagènes-Reprotoxiques). Le règlement (CE) 2037/2000, relatif aux substances qui appauvrissent la couche d'ozone, a abouti à l'interdiction de produire, d'importer et d'utiliser certains solvants halogénés (**Pôle de compétitivité Industries et Agro-Ressources (IAR), FICHE n°2 AGROSOLVANTS**).

Depuis le 1<sup>er</sup> juin 2007 est apparue la réglementation REACH (*Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals*). Cette réglementation européenne, approuvée le 18 Décembre 2006, a pour objectifs de gouverner la fabrication, l'importation, l'utilisation et la commercialisation de certaines catégories de substances chimiques. Elles sont, pour la plupart, considérées comme dangereuses pour l'environnement et/ou la santé, qu'elles soient utilisées telles quelles ou qu'elles entrent dans la composition d'une préparation ou d'un article. Au sens de la réglementation REACH, une préparation est une solution composée de deux ou plusieurs substances et un article est un objet dont la forme et la fonction prévalent sur la composition chimique (par exemple un téléphone est un article).

Ce règlement a été convenu dans un but de protection environnementale et sanitaire mais sans cacher une volonté de relancer l'innovation et la compétitivité industrielle européenne. Ainsi, dans une optique écologique et économique, la loi REACH propose quatre points de contrôle : l'Enregistrement, l'Évaluation, l'Autorisation et la Restriction des substances chimiques.

Le passage des solvants polluants aux solvants écologiques a donc été fortement impulsé par la réglementation REACH, mais est-ce le seul facteur ?

Une fois le risque identifié, la prévention des risques liés aux solvants passe en priorité par :

- la **suppression** ou la **substitution** des solvants dangereux par un produit ou procédé moins dangereux (suppression d'une étape de travail, développement de produits aqueux, choix d'un solvant moins dangereux, mise en place de fontaines de biodégradation pour le dégraissage, méthode physique de décapage...). Cette étape est une obligation réglementaire pour les solvants classés comme CMR avérés (sauf en cas d'impossibilité technique).
- la mise en place de mesures de **protection collective** : travail en système clos, systèmes d'encoffrement, **captage** des polluants au plus près de leur source d'émission, ventilation générale, transfert de solvant par pompe plutôt que transvasement manuel des fûts, entretien régulier et contrôle de l'efficacité des mesures de protection collective...

#### IV. SUBSTITUTION DES SOLVANTS ORGANIQUES PAR DES BIOSOLVANTS

Suite à toutes les directives et réglementations, certaines substances chimiques sont interdites ou déconseillées comme le *trichloroéthylène*. Pour faire face à cela, une des alternatives possibles est donc l'utilisation des solvants d'origine végétale. Dans ce contexte sont apparus sur le marché les biosolvants, issus de matières premières renouvelables et en particulier de la biomasse (**Clark, 2006**).

Les agroressources, issues de l'agriculture et de la forêt, fournissent les trois grandes familles chimiques des molécules carbonées : les carbohydrates, les lipides (acides gras) et à un moindre degré les protéines (**Colonna, 2006**).

Les agro-solvants se caractérisent par leur : Haut pouvoir solvant ; Haut pouvoir d'ébullition ; Haut point d'éclair ; Ininflammabilité ; Faible pression de vapeur ; Faible viscosité ; Non irritabilité ; Biodégradabilité ; Non toxicité.

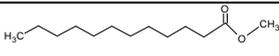
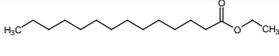
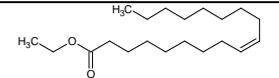
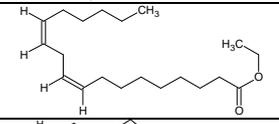
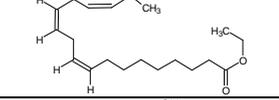
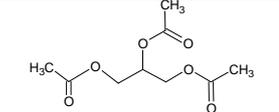
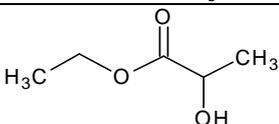
Ces biosolvants issus de sources renouvelables, viennent « des plantes oléagineuses (colza, tournesol), sucrières (betterave), amylacées (pomme de terre, blé, orge) » (**Garrier, [En Ligne]**), ou du bois. Ils sont renouvelables et bien moins polluants que les hydrocarbures. Comme le pétrole, les biosolvants contiennent des molécules carbonées. Il est alors possible de reproduire les mêmes molécules chimiques avec des ressources naturelles, comme l'éthanol par exemple.

On distingue trois types d'agro-solvants :

- les esters d'huiles végétales : ils proviennent de l'huile de colza, de tournesol et de soja. Ce sont des solvants oxygénés qui donnent des esters méthyliques et éthyliques. Ils ont la particularité d'être biodégradables et sont très utilisés : 55 % du marché des oxygénés.
- les esters d'acides organiques fermentaires : biodégradables également, ce sont des solvants polaires oxygénés. C'est grâce à l'estérification d'un alcool par des acides organiques (acide acétique, gluconique,...) qu'on les obtient.
- l'éthanol et les terpènes : l'éthanol est obtenu par la fermentation de sucres de betterave ou de céréales. Ils représentent 45 % du marché. Quant aux terpènes, ce sont des hydrocarbures cycliques inflammables et nocifs provenant du pin ou d'agrumes (**Quelenis, 2007**).

Le tableau III.2 présente les biosolvants existants sur le marché.

**Tableau III.2** Solvants verts existants sur le marché (**Pôle de compétitivité Industries et Agro-Ressources (IAR), FICHE n°2 AGROSOLVANTS**)

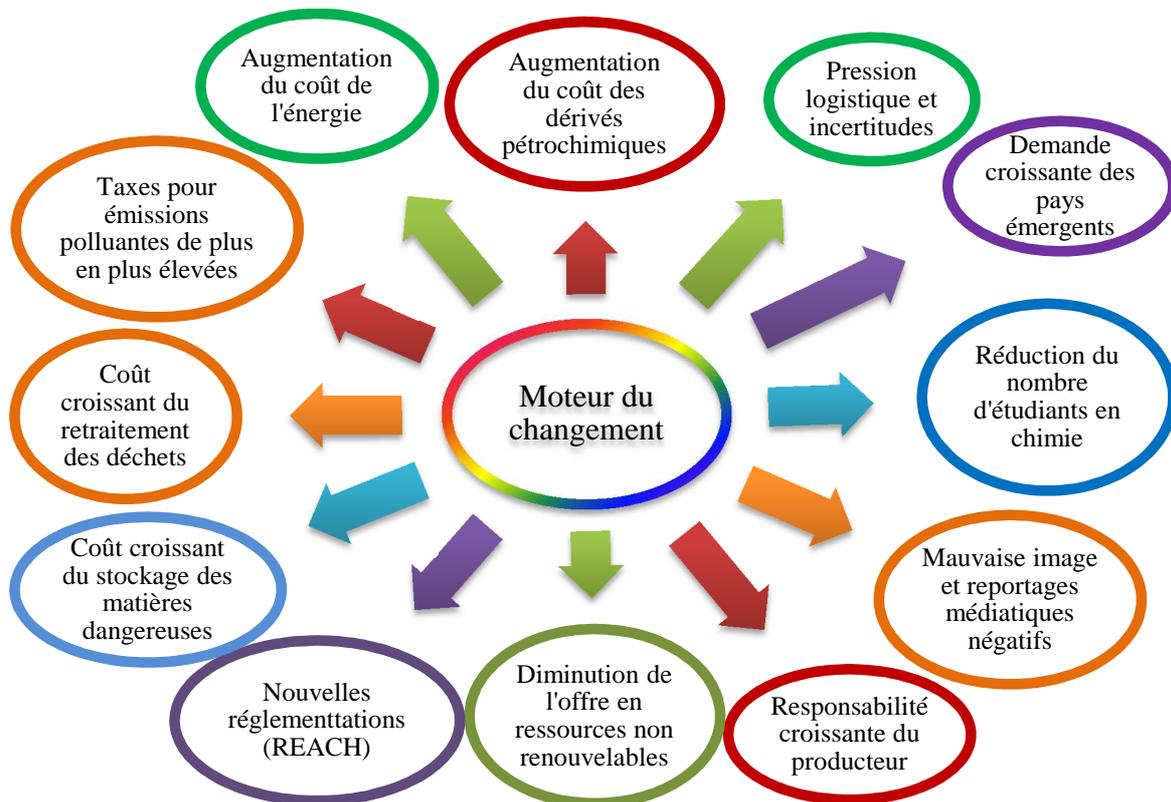
	Nom	Formule	T. éb (°C/mmH g)	Point éclair (°C)	Etiquetage
<b>Esters</b>	Laurate de méthyle		262/760	>110	✗
	Myristate d'éthyle		180/12	>110	✗
	Oléate d'éthyle		218/20	>110	✗
	Linoléate d'éthyle		224/17	>110	-
	Linoléate d'éthyle		167/1	>110	-
	Triacétate de glycérol		259/760	138	-
	Lactate d'éthyle		154/760	48	✗ R10 ,37 ,41

	Adipate de diméthyle DMA		225/760	107	-	
	Glutarate de diméthyle DMG		214/760	107	-	
	Succinate de diéthyle DMS		217/760	90	-	
	Acétate de méthyle		57/760	-16	R11 ,36 ,66	
	Acétate d'éthyle		77/760	-3	R11 ,36 ,66 ,67	
	Acétate de n-propyle		101/760	13	R11 ,36 ,66 ,67	
	Acétate d'isopropyle		88/760	7	R11 ,36 ,66 ,67	
	Acétate de n-butyle		126/760	28	R10 ,66 ,67	
	Acétate d'isobutyle		117/760	21	R11 ,66	
<b>Alcools</b>	Ethanol		78/760	12	R11	
	Butanol		118/760	35	R10 ,22 ,37 ,38 ,41 ,67	
	Alcool isoamylique		137/760	48	R10 ,20	
	Ethylène glycol		197/760	>110	R22	
	Propylène glycol ou propanediol-1,2		187/760	107	-	
	Propanediol-1,3		214/760	129	-	
	Alcool furfurylique		170/760	75	R20/21/22	
	Carbonate de glycerol		351/760	>200	-	
	<b>Terpènes</b>	α-pinène		156/760	32	R10 ,20 ,21 ,22 ,36 ,37 ,38
		β-pinène		167/760	32	R10 ,20 ,21 ,22 ,36 ,37 ,38
d-Limonène			175/760	48	R10 ,38 ,43 ,50/53	

 F- Facilement inflammable  
  T- Toxique  
  Xi- Irritant  
  Xn- Nocif  
 N- Dangereux pour l'environnement  
 R nombre : Phrase de risque (voir Annexe B)

Aujourd'hui, les solvants verts représentent 7% des solvants dans le monde, et sont en expansion sur le marché industriel depuis la promulgation de la loi REACH avec un objectif de 20% pour l'année 2020. La chimie entre aujourd'hui dans une ère où les réglementations deviennent probablement un moteur du changement aussi important que l'économie elle-même (Figure III.2). La pression sociale résultant de la mauvaise image de la chimie auprès du grand public et des craintes non fondées des produits chimiques favorise le développement de la chimie verte.

Élément indispensable au développement durable, cette chimie du 3<sup>ème</sup> millénaire repose sur trois piliers : l'économie, l'environnement et le bénéfice social. Les problèmes environnementaux et les législations, couplés avec la perspective d'un avantage concurrentiel, poussent les industries chimiques à développer des procédés plus propres. La «chimie verte», par le développement de réactions respectueuses de l'environnement, apporte des outils pour réduire l'impact environnemental à la source.



**Figure III.2 :** Eléments moteurs pour le changement

C'est en 1988 que naît véritablement la chimie verte avec la publication de ses 12 principes dans « Green Chemistry : Theory and Practice » (**Anastas et Warner, 1988**), mais ce n'est que depuis 1990 à l'initiative de l'EPA (Environmental Protection Agency) Parlement du Royaume-Uni qu'elle s'est développée.

## Les douze principes de la chimie verte

1. **Réduire les déchets.** L'amélioration du procédé chimique consiste, entre autre, à produire moins de déchets plutôt que de les retraiter ou les recycler.
2. **Concevoir des produits non toxiques.** Les produits chimiques synthétisés doivent être efficaces, et peu ou pas nocifs.
3. **Utiliser des voies synthèses moins nocives.** Les synthèses doivent être conçues pour mettre en jeu et produire des substances peu ou pas toxiques ou nocives pour l'Homme et sans conséquence sur l'environnement.
4. **Utiliser des ressources renouvelables.** L'utilisation de matières premières renouvelables doit être privilégiée. Ces ressources peuvent être issues de l'agriculture ou de déchets d'autres procédés agro-industriels, contrairement aux énergies fossiles (pétrole, gaz naturel, charbon) ou minières qui sont des ressources non renouvelables.
5. **Utiliser des catalyseurs, à la place de réactifs en proportions stœchiométriques.** L'emploi de catalyseurs permet de réduire la production de déchets. Ils sont utilisés en faible quantité et peuvent être recyclés plusieurs fois.
6. **Minimiser les dérivés chimiques.** L'utilisation de groupements bloqueurs ou protecteurs, ou toute transformation temporaire est à éviter. Ces dérivés nécessitent l'emploi de réactifs supplémentaires et génèrent des déchets.
7. **Respecter l'économie d'atomes.** Les synthèses développées doivent aboutir à un produit incorporant un maximum d'atomes issus des réactifs. Il faut éviter la formation de coproduits.
8. **Utiliser des conditions opératoires et des solvants à impact sanitaire réduit.** L'utilisation de solvants, d'agents de séparation ou de tout autre auxiliaire chimique est à proscrire. Si ces produits sont nécessaires, privilégier l'emploi de substances non nocives.
9. **Améliorer le rendement énergétique.** Les besoins énergétiques des procédés chimiques doivent être minimisés car ils ont des répercussions sur l'économie et l'environnement. Dans la mise au point des méthodes de synthèse, il est important de privilégier des conditions de température et de pression ambiantes.
10. **Concevoir des produits biodégradables.** Les produits chimiques doivent être conçus de façon à pouvoir se dissocier en produits de dégradation non nocifs à la fin de leur durée d'utilisation, cela dans le but d'éviter leur persistance dans l'environnement.
11. **Analyser les émissions en temps réel pour lutter contre la pollution.** Il s'agit d'élaborer des méthodologies analytiques pour permettre un contrôle en temps réel et en cours de production.
12. **Minimiser les risques d'accidents.** La nature et l'état des substances (solide, liquide, gaz) des substances utilisées dans un procédé chimique doivent être choisis de façon à minimiser les risques d'accidents chimiques, liés aux rejets, aux explosions et aux incendies.

Comme le montre le tableau III.3, les biosolvants gardent les mêmes secteurs d'applications que les solvants pétrochimiques.

Tableau III.3

Secteurs d'applications cibles pour les agro-solvants

Secteurs	Applications industrielles	Applications en développement	Applications opportunistes
Encres	Encres offset quickset		
Phytoprotecteurs	Adjuvant phytosanitaire	Solvant phytosanitaire	
Nettoyage de surface	Nettoyage grossier, nettoyage d'imprimerie	Nettoyage des façades, décapage	
Peintures		Solvant réactif dans la peinture	
Détergence			Détergence

De nos jours, certains secteurs d'applications des biosolvants restent difficiles à atteindre ; c'est pour cette raison que le couplage de biosolvants avec les bioprocédés reste le meilleur moyen. Le tableau III.4 met en évidence quelques secteurs d'activités difficilement envisageables pour l'utilisation des agro-solvants.

Tableau III.4

Secteurs d'applications difficilement envisageables pour les agro-solvants (Gérin et Bégin, 2001)

Secteurs	Procédés	Traitement des rejets	Nouvelle technologie
Caoutchouc	Transformation du caoutchouc	Incinération	Sans solvant
Nettoyage à sec	Nettoyage en machine	Machines fermées	
Tourteaux végétaux	Extraction des huiles	Désolvantiseurs	CO <sub>2</sub> supercritique
Colles et adhésif	Colles et adhésifs		Colles aqueuses, réactives et thermofusibles
Nettoyage de surface	Industriel en machine Manuel à évaporation rapide	Machines fermées étanches	Systèmes lessiviels en bains et machines
Imprimerie	Flexographie Héliographie	Adsorption sur charbon actif ; incinération	Encres aqueuses / encres UV
Pharmacie	Adjuvant -Excipient	Régénération des solvants	
Peintures	Décoratives grand public Décoratives bâtiment Industrielles	Incinération dans des fours, adsorption sur charbon actif	Peintures aqueuses, peintures à haut extrait sec

## V. SELECTION D'UN BIOSOLVANT

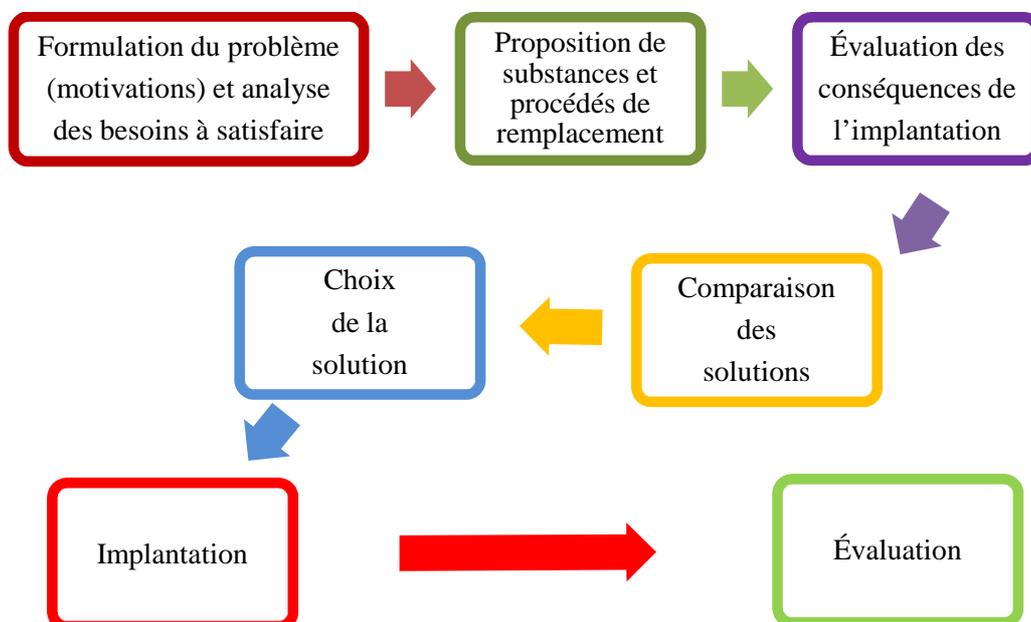
### V.1. Démarche de substitution

De manière générale, la substitution est une méthode de prévention consistant à éliminer l'utilisation d'une substance dangereuse pour l'Homme et l'environnement en la remplaçant par une substance moins nocive, en modifiant ou non le procédé qui la met en œuvre.

L'élimination d'une substance dangereuse ne signifie pas nécessairement la suppression de tout danger. En effet, à une nouvelle substance et/ou à un nouveau procédé sont généralement associés de nouveaux risques ; c'est pourquoi, lors de la sélection d'une alternative, puis au cours de la mise en œuvre de la solution choisie, il faut procéder à une analyse comparative des situations avant et après substitution. Dans de nombreux cas, il est nécessaire d'adopter des compromis conduisant fréquemment à échanger un danger contre un autre (moindre) et à devoir investir dans de nouvelles mesures de prévention (**Morrison et Wolf, 1985**).

Dans tous les cas, des précautions doivent être prises lors de la sélection d'un biosolvant. En effet, certains effets toxiques ne sont découverts qu'après usage. Cela a été le cas de certains éthers de glycol (introduits notamment dans de nombreuses formulations aqueuses) ou de la N-méthylpyrrolidone (NMP) dont la reprotoxicité s'avère aujourd'hui un problème majeur. Cela renforce la notion d'exigence en ce qui concerne les tests toxicologiques que doivent subir les nouvelles substances avant d'être introduites dans le milieu du travail ou dans l'environnement.

La démarche de substitution peut se décomposer en sept étapes schématisées sur la figure III.3. Cette approche est utilisée en entreprise comme dans les laboratoires de recherche.



**Figure III.3 :** Principales étapes de la démarche de substitution  
(Gérin et Bégin, 2001)

## V.2. Critère de sélection d'un solvant

Afin de permettre la substitution d'un solvant pétrochimique par un biosolvant, l'étape 2 de la figure III.3 est très importante. Elle permet de déterminer les critères de sélection d'un solvant qui répondent à des préoccupations techniques, environnementales, sanitaires et économiques, et qui sont rassemblés dans le tableau III.5:

Critères	Mesures associées	Impact
Pouvoir solvant	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Paramètre de solubilité de Hansen</li> <li>– Indice de Kauri-butanol</li> <li>– Point d'aniline</li> <li>– Coefficient de partage octanol/eau</li> </ul>	Technique
Biodégradabilité/ Écotoxicité/Toxicité	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Taux de biodégradation</li> <li>– Dose létale ou concentration efficace</li> <li>– Contact cutané, inhalation</li> </ul>	Environnemental/ sanitaire
Volatilité	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Pression de vapeur</li> <li>– Température d'ébullition</li> <li>– Indice d'évaporation</li> </ul>	Technique/ environnemental
Inflammabilité	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Point éclair</li> </ul>	Technique/ sécurité
Matières premières	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Origine</li> <li>– Disponibilité</li> <li>– Coût</li> </ul>	Économique/ environnemental
Transformation chimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Indicateurs de chimie verte</li> <li>– Coût</li> </ul>	Économique/ environnemental

Le pouvoir solvant caractérise la miscibilité du soluté et du solvant. Cette notion recouvre à la fois deux types d'utilisation : la mise en solution d'un produit solide ou l'abaissement de viscosité par dilution d'un produit liquide trop visqueux. Le pouvoir solvant doit être le plus grand possible. Cependant, un solvant utilisé pour réaliser une extraction doit aussi être sélectif, c'est-à-dire extraire préférentiellement certains constituants de la charge traitée (**Wauquier, 1994**).

Le pouvoir solvant peut être mesuré par quatre techniques : les paramètres de solubilité de Hansen, l'indice de Kauri-butanol, le point d'aniline ou le coefficient de partage octanol/eau.

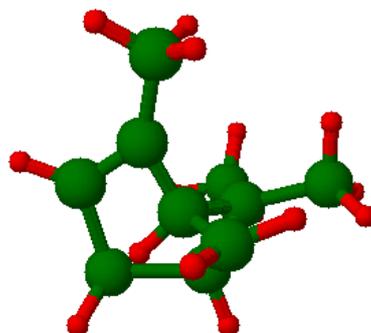
La méthode de l'indice Kauri-butanol (norme ASTM D 1133) est une méthode représentative uniquement pour les salissures de type gommes, caoutchouc, résines... L'indice Kauri-butanol est une échelle de solubilité empirique basée sur la quantité de solvant additionnable à une solution saturée de résine de Kauri (une résine naturelle extraite d'un arbre tropical) dans du butanol. C'est une mesure indirecte du pouvoir solvant d'un composé. Plus l'indice est important, plus le pouvoir solvant est fort (**Roire, 1989 ; Kiehl, 1927**).

Le point d'aniline (norme ASTM D 611) est une méthode particulièrement adaptée au choix des solvants hydrocarbonés, convenant à la majorité des cas du travail des métaux. Le point d'aniline correspond à la température minimale à laquelle un solvant et l'aniline sont miscibles lorsqu'ils sont mélangés dans des proportions volumiques égales. Sur cette échelle, plus le point d'aniline est bas, plus le pouvoir solvant est fort (**Roire, 1989 ; Dallemagne, 2003**).

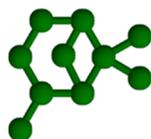
Le coefficient de partage n-octanol / eau d'un composé organique est le rapport entre la concentration à l'équilibre d'une substance chimique dans l'octanol et la concentration en cette même substance dans l'eau. Ce coefficient est utilisé pour estimer, de façon indirecte, la sorption d'une substance organique dans un sol ou le facteur de bioconcentration. En effet, de nombreuses études ont montré que les composés peu biodégradables (très stables) et faiblement hydrosolubles (fortement liposolubles) sont susceptibles de donner lieu à d'importants phénomènes de bioamplification. En résumé, ils pénètrent et se stockent facilement dans les graisses des organismes du fait de leur liposolubilité.

Pour la détermination du pouvoir solvants, nous nous sommes plus intéressés aux paramètres de solubilité de Hildebrand et Hansen que nous développerons dans le chapitre V.

# *Chapitre IV*



*L' $\alpha$ -pinène solvant de  
substitution aux  
solvants pétrochimiques*



## *Chapitre IV*

### *L' $\alpha$ -pinène solvant de substitution aux solvants pétrochimiques*

#### INTRODUCTION

Ces dernières années, la recherche dans le domaine des solvants verts s'est orientée sur la recherche d'agro-solvants pour réduire l'utilisation de solvants pétroliers occasionnant des dommages environnementaux (Nelson, 2003). Plusieurs innovations vers les solvants verts ont été développées : la technologie d'extraction sans solvant (Huma, 2009 ; Michel, 2011), l'utilisation de l'eau comme solvant alternatif (Kronholm, 2007), l'utilisation de liquides ioniques qui ont une faible pression de vapeur et moins d'émissions de composés organiques volatiles COV (Leveque et Cravotto, 2006; Scammells, 2005).

Bio- ou agro-solvants sont une alternative qui présente moins de risques et de danger sur l'impact environnemental que les solvants pétroliers. Les terpènes, considérés comme solvant, sont renouvelables, une alternative intéressante aux solvants typiques. On les trouve dans les huiles essentielles et oléorésines de plantes fruitières et aromatiques. Le terpène le plus couramment utilisé comme solvant est probablement le d-limonène qui représente un important sous-produit de l'industrie des agrumes (Njoroge, 2005; Mira, 1999). Ses propriétés physiques ont été comparées à celles de l'hexane pour extraire les graisses et les huiles à partir de graines oléagineuses (Virot, a-b 2008) ou de l'huile de son de riz (Mamidipally et Liu, 2004 et 2005). Le limonène a également été comparé au toluène pour la détermination de la teneur en eau par la méthode de Dean-Stark (Veillet, 2010). En outre, le d-limonène a récemment été utilisé comme solvant vert pour l'extraction des caroténoïdes, en particulier le lycopène en tant que substitut du dichlorométhane (Chemat-Djenni, 2010).

Un autre monoterpène susceptible d'être une alternative intéressante est l' $\alpha$ -pinène. Il représente le constituant principal des huiles de térébenthine de la plupart des conifères et une composante des huiles de bois, de feuilles et d'écorce de bois d'une grande variété d'autres plantes comme le romarin, le persil, le basilic, la menthe, la lavande, la sauge et le gingembre (Fernandez, 2012).

La térébenthine est un sous-produit de l'industrie du bois et du papier ; sa production mondiale annuelle a été de plus de 330 000 tonnes en 1995, ce qui en fait un produit abondant et bon marché (Swift, 2004). Elle constitue 30 % de la résine des pins et est la source la plus importante en volume de composés organiques volatils. Sa composition est généralement riche en pinènes, notamment 60 % d' $\alpha$ -pinène et son isomère le  $\beta$ -pinène, leurs proportions respectives varient selon l'origine géographique des pins.

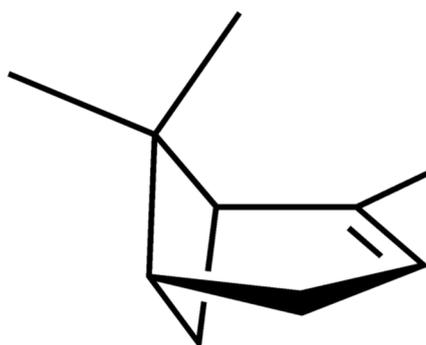
Une fois l'essence de térébenthine extraite, elle est ensuite distillée pour donner en «tête» des composés volatils sans valeur commerciale et du  $\alpha$  - et  $\beta$ -pinène. Parmi ceux-ci, le  $\beta$ -pinène est vendu tel quel ainsi qu'une partie du  $\alpha$ -pinène, l'autre partie étant ensuite traitée pour faire l'huile de pin en la faisant réagir avec de l'acide phosphorique. L'essence de pin est utilisée en tant que solvant, désinfectant et désodorisant.

Le bêta-pinène est utilisé pour produire le camphre et les insecticides. Le dipentène est aussi produit en tant que sous-produit de ce processus.

L' $\alpha$ -pinène est utilisé comme insecticides, solvants et bases à parfums ainsi que pour la synthèse du camphre.

Une équipe de chercheurs du Centre de Neurosciences et Biologie cellulaire (CNC) de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Coimbra (UC) ont découvert des propriétés anti-ostéoarthrose (maladie également connue comme rhumatisme et arthrose) chez l' $\alpha$ -pinène (Neves, 2010).

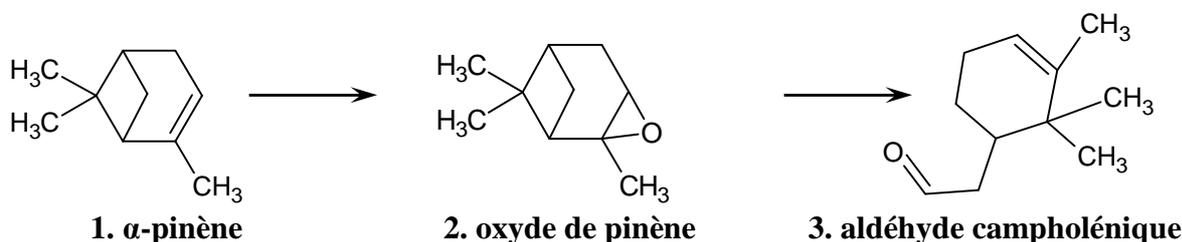
L' $\alpha$ -pinène a deux atomes de carbone asymétriques et ne présente pas de plan de symétrie (figure IV.1). Il est chiral et se présente donc sous la forme de deux paires d'énantiomères, diastéréoisomères entre elles.

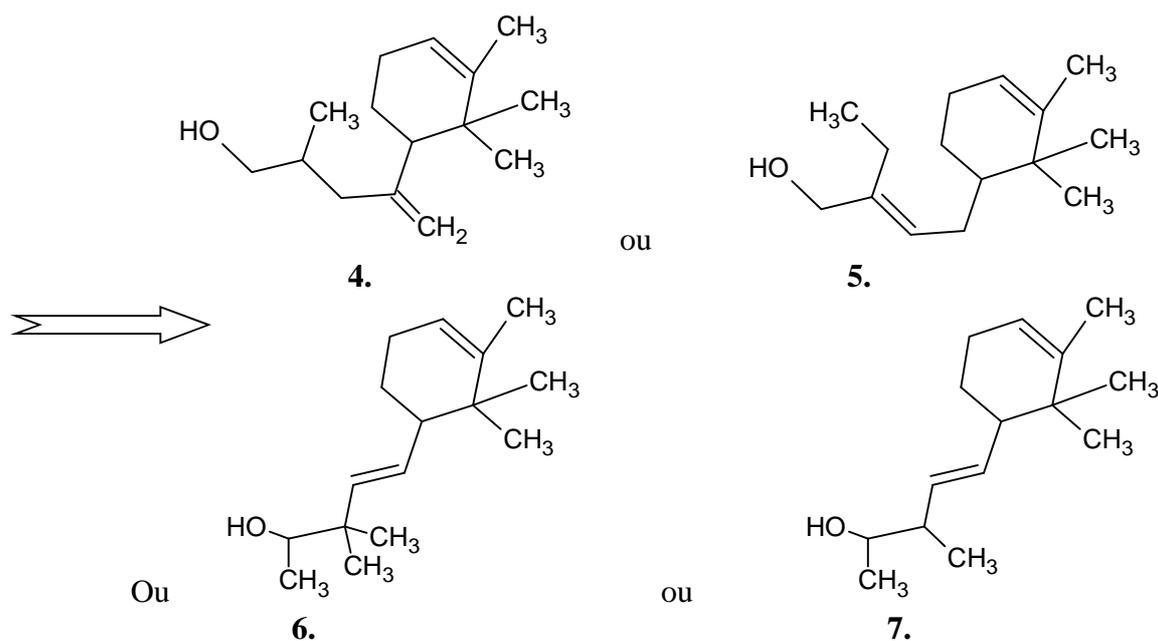


**Figure IV.1** : Structure chimique du  $\alpha$ -pinène  
(ou 2,6,6-Triméthylbicyclo[3.1.1]hept-2-ène)

La réaction de l' $\alpha$ -pinène ( $C_{10}H_{16}$ ) avec l'iode est exothermique et permet de provoquer la sublimation de l'iode. Cette réaction a été découverte par le vétérinaire James Herriot.

L' $\alpha$ -pinène peut être converti en oxyde de pinène par époxydation de la double liaison, lui-même converti ensuite en aldéhyde campholénique, dont la principale application est la synthèse d'odorants synthétiques à odeur de bois de santal tel que les alcools 4-7 représentés sur la figure IV.2. (Saudan, 2007).





**Figure IV.2.** Synthèse de divers alcools à odeur de santal à partir de l' $\alpha$ -pinène.

## I. LES ACIDES GRAS

En chimie, un acide gras est un acide carboxylique à chaîne aliphatique. Les acides gras naturels possèdent une chaîne carbonée de 4 à 36 atomes de carbone (rarement au-delà de 28) et typiquement en nombre pair, car la biosynthèse des acides gras repose sur l'acétyl-coenzyme A, une coenzyme porteuse d'un groupe acétyle qui contient deux atomes de carbone. Par extension, le terme est parfois utilisé pour désigner tous les acides carboxyliques à chaîne hydrocarbonée non-cyclique. On parle d'acides gras à longue chaîne pour une longueur de 14 à 24 atomes de carbone et à très longue chaîne s'il y a plus de 24 atomes de carbone. Les acides gras sont présents dans les graisses animales et les graisses végétales, les huiles végétales ou les cires, sous forme d'esters.

En biochimie, les acides gras sont une catégorie de lipides qui comprend notamment les acides carboxyliques aliphatiques et leurs dérivés (acides gras méthylés, hydroxylés, hydroperoxylés, etc.) et les eicosanoïdes. Ces derniers dérivent de l'acide eicosapentaénoïque (oméga-3) ou de l'acide arachidonique (oméga-6) et ont souvent un rôle d'hormones. Les acides gras jouent un rôle structurel fondamental dans toutes les formes de vies connues à travers divers types de lipides (phosphoglycérides, sphingolipides, ...) qui, en milieu aqueux, s'organisent en réseaux bidimensionnels structurant toutes les membranes biologiques (membrane cellulaire, plasmique, mitochondriale, du réticulum endoplasmique, des thylacoïdes, etc.).

De nos jours le n-hexane est le solvant le plus utilisé pour l'extraction des acides gras (Go-Woon, 2011 ; Hunchak, 1987 ; Luque-García, 2003 ; Viro, 2007, 2008 ; Eikani, 2012 ; Priego-Capote, 2005 ; Subramanian, 2011 ; Wang, 2007 ; Wang, 2010). Il est également classé comme solvant très dangereux.

Plusieurs recherches ont été effectuées sur le remplacement du n-hexane par un biosolvant ; c'est le cas des travaux de **Liu et al. (2005)** et **Mamidipally et al. (2004)** qui ont utilisé le d-limonène pour l'extraction de l'huile de son de riz, ainsi que **Virot et al. (2008)** qui ont aussi exploité le pouvoir solvant du d-limonène sur l'extraction des acides gras des olives en comparaison au n-hexane. Toutes ces recherches ont démontré que le d-limonène est un très bon substituant au n-hexane.

Les **oléagineux** sont des plantes cultivées spécifiquement pour leurs graines ou leurs fruits riches en matières grasses, dont on extrait de l'huile à usage alimentaire, énergétique ou industriel. La qualité et la quantité d'huile dépend du taux de matière grasse contenue dans ces graines qui détermine son prix. Les résidus de l'extraction constituent les tourteaux généralement recyclés dans l'alimentation animale.

On distingue :

- les graines oléagineuses, issues de plantes cultivées spécifiquement pour la production d'huile : colza, tournesol, arachide, soja, sésame, noix, amande, ou pour leurs pépins et dont l'huile est un produit accessoire : cotonnier, lin ;
- les fruits oléagineux produits par des arbres : palmier à huile, olivier, cocotier (coprah), noyer, noisetier, amandier.

On peut extraire de l'huile de pratiquement toutes les graines, mais cette extraction est souvent d'une importance limitée. Exemples : huile de pépins de raisin, huile de pépins de courge, etc. Le tableau IV.1 résume l'utilisation des principales plantes oléagineuses.

Plante	Nom scientifique	Famille	Organe	Matière grasse	Utilisation
Arachide	<i>Arachis hypogaea L.</i>	<i>Fabaceae</i>	Graine	Huile d'arachide	Huile de table, margarine, savonnerie, tourteaux
Cacaoyer	<i>Theobroma cacao</i>	<i>Sterculiaceae</i>	Graine	Beurre de cacao	Chocolat, pharmacie, cosmétiques
Cotonnier	<i>Gossypium barbadens</i>	<i>Malvaceae</i>	Graine	Huile de coton	Divers, tourteaux
Olivier	<i>Olea europaea</i>	<i>Oleaceae</i>	Fruit	Huile d'olive	Huile de table, savonnerie
Ricin	<i>Ricinus communis</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Graine	Huile de ricin	Pharmacie, lubrifiant, huile siccative, industrie chimique
Soja	<i>Glycine max</i>	<i>Fabaceae</i>	Graine	Huile de soja	Huile de table, parfumerie, savonnerie, tourteaux
Tournesol	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Asteraceae</i>	Graine	Huile de tournesol	Huile de table, huile siccative, tourteaux
Palmier à huile	<i>Elais guineensis</i>	<i>Arecaceae</i>	Fruit	Huile de palme	Margarine, savonnerie, biocarburant, tourteaux
Lin	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Linaceae</i>	Graine	Huile de lin	Savonnerie, peinture

## II. LES CAROTENOÏDES

Les caroténoïdes sont des pigments plutôt orange et jaunes répandus chez de très nombreux organismes vivants. Liposolubles, ils sont en général facilement assimilables par les organismes. Ils appartiennent à la famille chimique des terpénoïdes, formés à partir de la polymérisation d'unités isoprènes à structure aliphatique ou alicyclique. Il est généralement admis qu'ils suivent des voies métaboliques similaires à celles des lipides. Ils sont synthétisés par toutes les algues, toutes les plantes vertes et par de nombreux champignons et bactéries (dont les cyanobactéries). Les caroténoïdes représentent un groupe important de composés phytochimiques qui peuvent contribuer à la prévention de la santé et de la maladie (De Nardo, 2009; El-Sohemy, 2002).

Le **carotène** est un terpène découvert en 1881 par Wachenroder. C'est un pigment de couleur orange, dimère de la vitamine A. Il est important pour la photosynthèse. Il se présente majoritairement sous les formes α et β-carotène (figure IV.3, A et B) et plus minoritairement sous les formes ε, γ, δ ou ζ-carotène.

Par extension, on appelle **carotènes** l'ensemble des caroténoïdes qui ne sont pas oxygénés (comme le lycopène et le phytoène) : ce sont des tétraterpènes ; ils comportent quarante atomes de carbone.

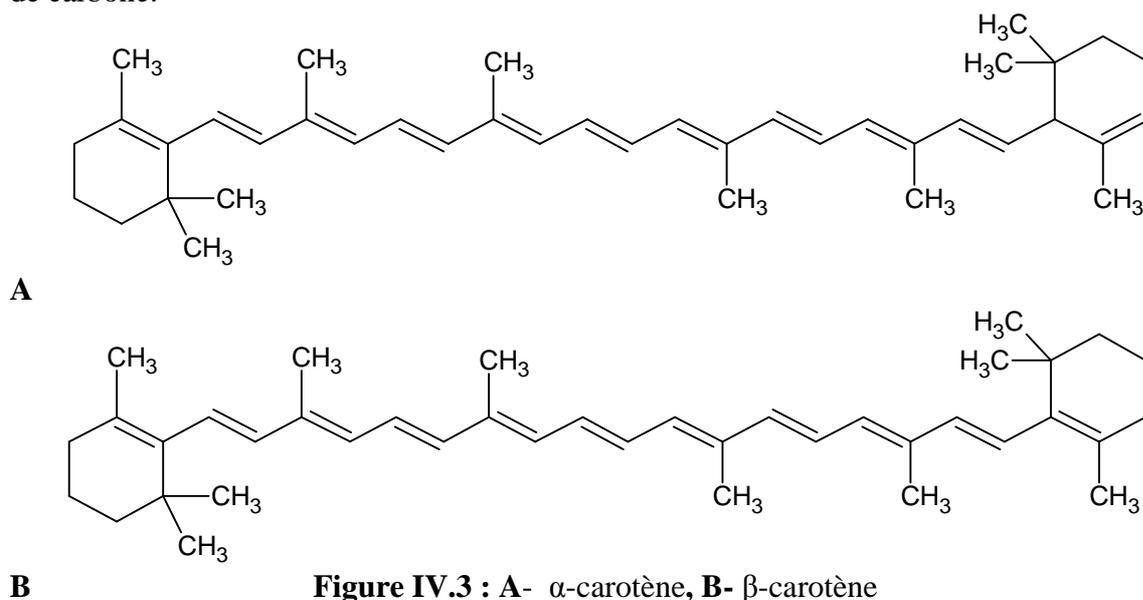


Figure IV.3 : A- α-carotène, B- β-carotène

On peut obtenir par clivage d'un **α-carotène** une seule molécule de vitamine A.

Le **β-carotène** se trouve dans certains fruits et végétaux : poivron, carotte, épinard, laitue, tomate, patate douce, brocoli, cantaloup, courge, abricot. Le taux record est cependant détenu par une algue, la spiruline (*Arthrospira platensis*), puisque son contenu en β-carotène est dix à quinze fois supérieur à celui de la carotte. En première approximation, plus le fruit (ou la feuille) est coloré, plus il y a de β-carotène.

Le carotène ne contribue pas activement à la photosynthèse mais absorbe le trop plein d'énergie de la chlorophylle afin d'éviter la formation d'espèces réactives oxygénées (superoxyde  $O_2^{\cdot -}$ , oxygène singulet  $\cdot O-O\cdot$ , hydroxyle  $HO\cdot$ ) qui détruiraient la feuille. À l'automne, la chlorophylle contenue dans les feuilles des arbres est l'un des premiers éléments à se dégrader.

Il ne reste alors que les carotènes et autres caroténoïdes, ce qui explique la couleur rouge des feuilles, phénomène particulièrement visible chez les érables et les chênes rouges d'Amérique.

La molécule de β-carotène C<sub>40</sub>H<sub>56</sub> est une chaîne constituée de huit unités isopréniques (**2-méthyle buta-1,3-diène**), avec une série de onze doubles liaisons conjuguées. Elle peut absorber une lumière bleu-indigo et donc apparaître orange comme dans la carotte.

Le β-carotène peut être obtenu soit par extraction, soit par synthèse, soit par voie biotechnologique. Le β-carotène naturel provient principalement de l'huile de palme rouge et de la luzerne et également de l'huile de carotte. Le procédé d'extraction est délicat car le β-carotène est sensible à la chaleur et à l'oxydation. De plus, l'extraction donne un produit qui contient des impuretés, à savoir des isomères alpha, gamma et delta du carotène. La synthèse est complexe et s'effectue en six étapes à partir de l'acétone *via* la β-ionone, elle-même résultat d'une synthèse en dix étapes de l'acétone.

Les α et β-carotènes peuvent être stockés dans le foie, et à la différence de la vitamine A, un excès de carotène n'est pas toxique et peut également être converti en vitamine A si nécessaire. Une consommation excessive peut donner un léger jaunissement. D'ailleurs, la prise de carotène est un diagnostic différentiel de l'ictère (la jaunisse).

Le β-carotène est utilisé comme colorant alimentaire (E160a) pour la préparation de la margarine, pour les produits de boulangerie, les boissons gazeuses et les sucreries. Il peut être utilisé comme provitamine A en tant que complément vitaminé. C'est un antioxydant qui a un effet bénéfique dans la lutte contre les radicaux libres. Néanmoins son utilité comme complément alimentaire est débattue (**Mathews-Roth, 1986 ; Olson, 1986 ; Temple, 1988**).

En alimentation animale, il est utilisé pour les aliments du poisson et du bétail. Dans l'alimentation des poules et des poulets, le β-carotène améliore la couleur des jaunes d'œufs et l'apparence de la chair.

Dans le domaine pharmaceutique, il est incorporé à certaines crèmes solaires en raison de ses propriétés d'agent filtrant contre le soleil et anti-cancéreuses. Pris en tant que complément alimentaire pendant une durée prolongée, il pourrait avoir un effet bénéfique sur les performances cognitives (**Grodstein, 2007**). Un taux sanguin bas de α-carotène semble corrélé avec une mortalité augmentée, en particulier par maladies cardio-vasculaires et cancers (**Li, 2011 ; Kritchevsky, 1999 ; Palozza, 1998 ; Mayne, 1996 ; Clinton, 1998 ; Rao, 1999**).

L'intérêt porté au β-carotène ne cesse de s'accroître ; dans ce contexte plusieurs études ont été réalisées.

Les résultats des études menées par **Kajadphai et al. (1998)** ont montré que l'extraction avec deux solvants à faible risque, l'éthanol biologique et l'hexane, peut être utilisée avec succès pour l'analyse des caroténoïdes dans les fruits et les légumes.

La méthode est également applicable à différents types de matrice, c'est à dire le jus de tomates en conserve, les carottes et les épinards.

Dans le cadre de la technologie de la production de concentré de caroténoïdes à partir de carottes, **Fikselova et al. (2008)**, ont étudié l'extraction de carotènes à partir de carottes dans des conditions différentes de température, de traitement des échantillons et des solvants différents (éthanol, propan-2-ol). Les carottes (*Daucus carota* L. et Nevis F1) ont été testées à des températures de 20°C, 40°C et 60°C, les échantillons ayant été traités après la récolte, après stockage au froid (5°C), et après la congélation (-18°C). Il a été constaté que la solubilité et le rendement de carotène dépendent de la température, du temps d'extraction ainsi que du traitement de l'échantillon. Le meilleur rendement d'extraction a été obtenu avec des échantillons congelés en réalisant l'extraction à 60°C pendant 2 à 4 heures. Des températures plus élevées ont provoqué une augmentation des concentrations de caroténoïdes. La carotte de variété Nevis F1 et l'extraction à 60°C ont été utilisés pour la production de concentré de caroténoïdes.

**Li et al. (2013)**, ont mis au point une méthode verte, peu coûteuse et facile à utiliser pour l'extraction assistée par ultrasons des caroténoïdes à partir de carottes fraîches. L'huile de tournesol a été utilisée comme un substitut aux solvants organiques. L'extraction par ultrasons (UAE) a été comparée à l'extraction par solvant conventionnelle (ESC) en utilisant de l'hexane comme solvant. Les résultats ont montré que l'extraction assistée par ultrasons à l'aide de l'huile de tournesol comme solvant a donné un rendement plus élevé en β-carotène (334,75 mg / l) en 20 min seulement, alors que l'extraction par solvant conventionnelle utilisant de l'hexane comme solvant a donné un rendement légèrement inférieur (321,35 mg / l) en 60 min.

**Chemat-Djenni et al. (2010)** ont décrit un procédé utile et vert pour l'extraction du lycopène en utilisant le d-limonène (bio-solvant), un substitut du dichlorométhane (solvant pétrolier). La méthode décrite a été réalisée en deux étapes : dans un premier temps, le d-limonène a été obtenu à partir de peaux d'orange par une distillation à la vapeur suivie par un procédé de déterpénation. Dans la deuxième étape, le lycopène a été extrait en utilisant le d-limonène, au lieu du dichlorométhane solvant pétrolier. Le rendement en lycopène extrait de la tomate par les deux solvants, a été comparé en termes de détermination qualitative et quantitative. Aucune différence significative n'a été obtenue entre chaque extrait qui a permis de conclure que le solvant proposé est efficace et utile.

En nous basant sur ce qui est rapporté dans la littérature sur la nouvelle approche sur les biosolvants, nous nous sommes proposés d'étudier l'aptitude du α-pinène à remplacer les solvants pétrochimiques pour l'extraction de composés d'origine végétale. Pour ce faire, trois types d'applications vont être développés :

- a) L'extraction des acides gras de graines oléagineuses ;
- b) La détermination de la teneur en eau de matrices végétale ;
- c) L'extraction du β-carotène composé très recherché pour ses propriétés antioxydantes.

### III. MATERIELS ET METHODES

#### III.1. Extraction des acides gras



Afin de comparer la composition qualitative et quantitative des acides gras de quatre huiles (arachide, soja, tournesol et olive *chemlal*), des extractions par Soxhlet ont été réalisées ; et ceci en utilisant deux solvants, le premier pétrochimique : le n-hexane et le second biosolvant : l' $\alpha$ -pinène.

##### III.1.1. Matière végétale



Les graines oléagineuses utilisées (grains d'arachide, soja et tournesol) ont été achetées sur le marché local en janvier 2011. Les olives (*chemlal*) ont été récoltées à Ighil Ali (Bejaia, Algérie) en janvier 2011.

##### III.1.2. Solvant



Les solvants utilisés pour l'étude sont l' $\alpha$ -pinène et le n-hexane. L' $\alpha$ -pinène est complètement miscible avec les huiles et insoluble dans l'eau, sa polarité est supérieure à celle du n-hexane comme indiqué dans le tableau IV.2

Tableau  
IV2

Propriétés physico-chimique du n-hexane et du  $\alpha$ -pinène  
(Braddock, 1999; Clarà, 2009 ; Riddick, 1986).



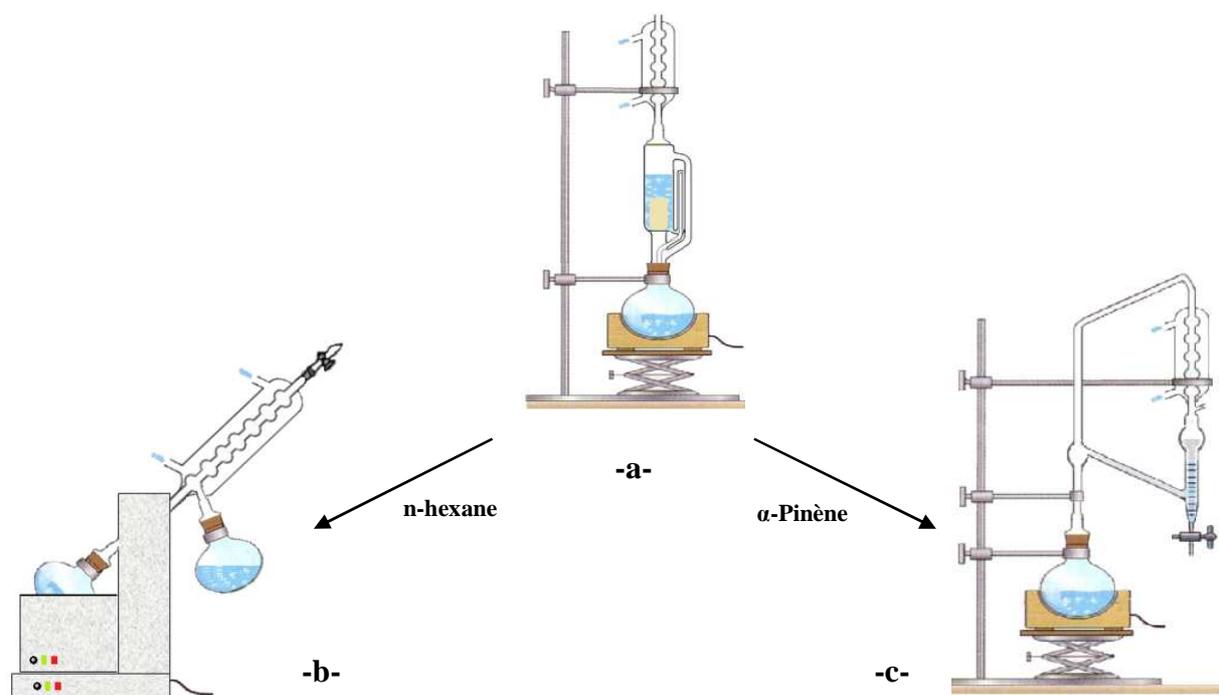
Propriétés	n-Hexane	$\alpha$ -Pinène
Structure Chimique		
Masse Moléculaire, (g/mol)	86,17	136,26
Densité (25°C)	0,65	0,874
Viscosité, (cP, 25°C)	0,32	1,293
Point d'ébullition, (°C)	68,74	156-158
Indice de réfraction	1,3723	1,4636
Solubilité dans l'eau, (wt%, 25°C)	0,00123	Insoluble
Constante diélectrique, 20°C	1,89	2,76
Point d'éclair, °C	23	32
Tension superficielle, dyne/cm (25°C)	18,4	25,3 $\pm$ 3,0
Odeur	Pétrole	Résine de térébenthine
Impact environnemental	Haut	Bas
Recyclabilité	Non	Oui
Toxicité	Oui	Non

##### III.1.3. Protocole expérimental

L'extraction au Soxhlet des huiles à l'aide du n-hexane et du  $\alpha$ -pinène a été effectuée selon la procédure normalisée (ISO 659-1998). Des échantillons de 10 g ont été dépourvus de tout corps étrangers et placés dans une étuve à 80°C. Ils sont ensuite refroidis à température ambiante dans un dessiccateur avant d'être pesés.

Cette procédure est répétée chaque 2 heures jusqu'à ce que le rapport m /m (%) soit inférieur à 10%. Les échantillons ont été broyés au moins ½ h avant l'extraction. Après les 8 h d'extraction au n-hexane, le distillat récupéré a été concentré à sec dans un évaporateur rotatif sous vide. Le ballon est ensuite refroidi à température ambiante dans un dessiccateur et pesé au milligramme près.

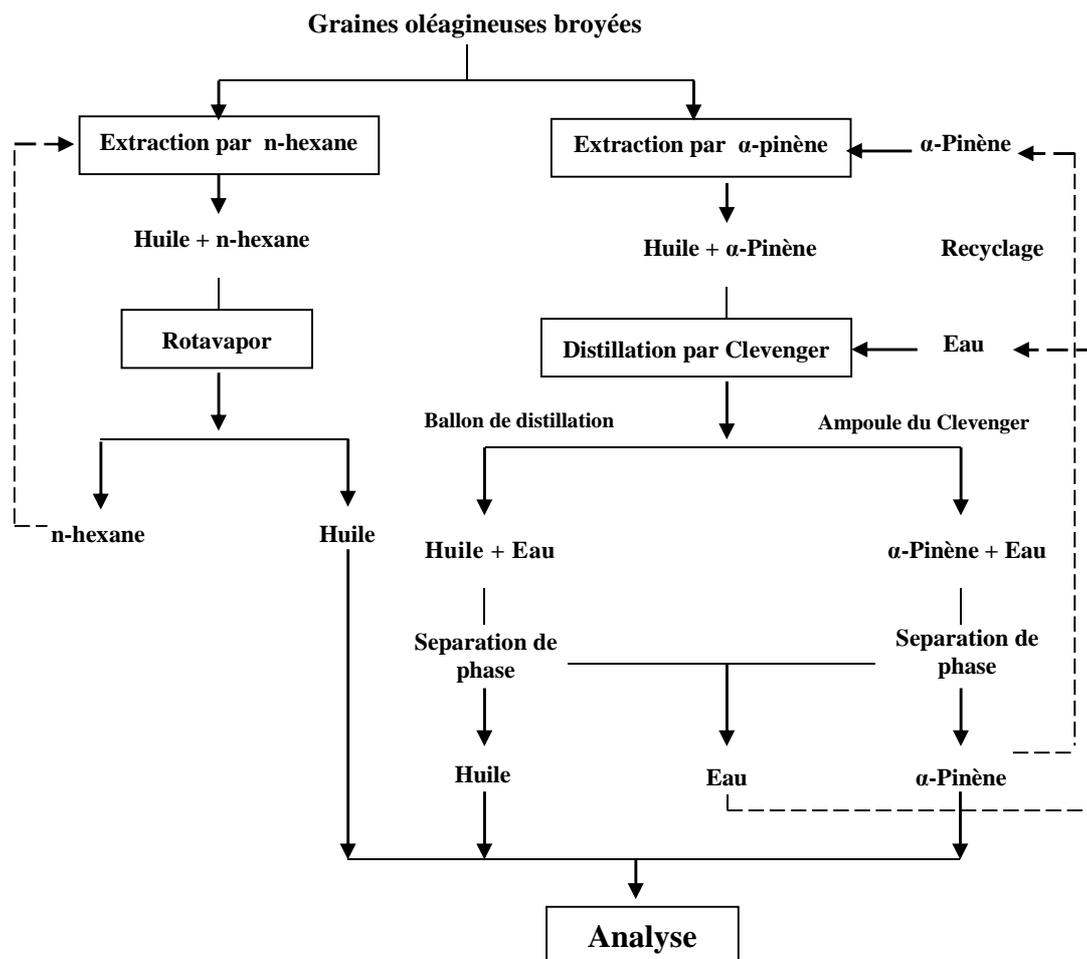
La température d'ébullition du  $\alpha$ -pinène étant élevée (156-158°C) son élimination au rotavapor nécessite un vide poussé ce qui pourrait dégrader les extraits récupérés.



**Figure IV.4.** Procédure utilisée en fonction du solvant d'extraction (a. extraction par Soxhlet, b. évaporateur rotatif, c. distillation par Clevenger)

Pour éviter ce problème et récupérer l' $\alpha$ -pinène, une procédure utilisant une distillation au Clevenger du mélange  $\alpha$ -pinène-huile a été proposée figure IV.4 (Viro, 2008). Pour ce faire, de l'eau distillée (environ 150 mL) a été ajoutée au mélange (huile -  $\alpha$ -pinène) dans un ballon. Ce dernier est ensuite relié à un Clevenger ; ce dernier est à son tour relié à un condenseur. A la fin de la distillation, deux mélanges binaires ont été obtenus : le premier dans le ballon de distillation, constitué de deux phases non miscibles eau - huile et le second dans l'ampoule du Clevenger composé d'eau et de  $\alpha$ -pinène. La récupération des différents constituants a été effectuée par simple décantation.

L' $\alpha$ -pinène et l'eau peuvent être réutilisés pour d'autres essais. La figure IV.5 illustre les différentes étapes du processus d'extraction des acides gras.



**Figure IV.5:** Représentation de la procédure d'extraction par l'α-Pinène et l'hexane

### III.1.4. Analyses chromatographiques

Les analyses par CG sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent (Kyoto, Japan) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La température de ce dernier est de 300°C. Toutes les autres conditions opératoires d'analyses sont identiques à celles utilisées pour les analyses par CG/SM.

Le pourcentage des composants est calculé à partir de la chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC-FID). Les composés ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention de Kovats ( $I_x$ ), déterminés par référence à une série de n-alcanes ( $C_5$ - $C_{28}$ ) et avec ceux de la littérature. L'identification a été confirmée par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux stockés dans la base de données SM (Institut National des Standards et de la technologie et des bibliothèques Wiley) et avec les données de la littérature (Adams, 1995; AFNOR, 2000; Arctander, 1994).

Les analyses par CG/SM sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à une détection par spectrométrie de masse de type Shimadzu QP2010 (Kyoto, Japan) équipé d'un passeur automatique, d'un injecteur split-splitless thermostaté à 250°C et d'une colonne capillaire CP-Wax (52 CB) (30 m x 0,32 mm x 0,5 μm) (Varian, Walnut creek, CA, USA).

L'hélium est utilisé comme gaz vecteur avec une vitesse de 47 cm/s et le volume injecté est de 2 µL en mode split (un ratio de 1:15). La température du four est initialement réglée à 60°C pendant 1 min puis elle augmente de 60 à 180°C avec un gradient de 20°C/min, ensuite de 180 à 230°C à une vitesse de 4°C/min pour être maintenue à 230°C pendant 15 min.

Le débit est maintenu à 1,69 mL/min. Les spectres de masses sont enregistrés avec une fréquence de 3 scans/s de 50 à 400 a.m.u. Le mode d'ionisation est réalisé par impact électronique à 70 eV. L'identification des constituants des échantillons analysés est réalisée grâce aux bases de données NIST'98 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA) et Wiley. Les analyses sont réalisées trois fois et la moyenne des résultats est reportée.

### III.1.5. Analyse statistique

L'étude de l'analyse statistique est faite sur la base de 10 essais répétitifs, selon la méthode de comparaison d'échantillons des tests de variances de Fisher-Snedecor et des espérances de Student avec  $\alpha = 0,05$ .

## III.2. Détermination de la teneur en eau par la méthode de Dean-Stark



La distillation au Dean & Stark est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour déterminer la teneur en eau dans les produits alimentaires. Le toluène est le solvant recommandé pour cette méthode, mais il est également classé en haut de la liste des solvants dangereux, à cause de son souci de sécurité, d'environnement et de santé sur le système nerveux et auditif (Lammers, 2005 ; McWilliams, 2000 ; Hass, 1999).

L'objectif de la présente étude est la valorisation de l'α-pinène comme solvant vert pour remplacer le toluène dans la distillation au Dean-Stark pour la détermination de la teneur en eau de matrices alimentaires.

### III.2.1. Matière végétale



Les produits alimentaires utilisés dans notre étude sont : des graines de carvi, de coriandre, des feuilles d'origan et des carottes. Ils ont été achetés sur le marché local en mai 2011.

### III.2.2. Solvant

Les caractéristiques des solvants utilisés sont regroupées dans le tableau IV.3.

Tableau  
IV3

Caractéristiques du toluène et de l'α-pinène

Caractéristiques	Toluène	α-pinène
Point d'ébullition, (°C)	111	156-158
Densité (g/cm <sup>3</sup> )	0,867	0,858
Impact environnemental	Haut	Bas
Recyclabilité	Non	Oui
Toxicité	Oui	Non

### III.2.3. Protocole expérimental

L'humidité a été déterminée selon la procédure standardisée **AOCS Ja 2a-46 (1993)**. Le dispositif est constitué d'un ballon de 500 mL avec un dispositif de chauffage électrique, d'un récepteur gradué de Dean-Stark et d'un réfrigérant. Selon l'étude de **Harel et Talmi (1957)**, le poids frais de l'échantillon utilisé est fixé de manière à obtenir une quantité suffisante d'eau dans le récipient, ne dépassant pas 10 mL qui est sa contenance maximale (20g pour les graines de carvi et de coriandre, 10g pour l'origan et 5 g pour les carottes). 100 mL de toluène ou de pinène sont utilisés comme solvant de distillation.

Au début de l'expérience, le chauffage électrique est maximisé jusqu'à la collecte des premières gouttelettes dans le récepteur de Dean-Stark. Ensuite, le chauffage est adapté à un taux de distillation de 100 gouttes/min.

Lorsque la plus grande partie de l'eau a distillé, le chauffage est augmenté à un taux de distillation de 200 gouttes/min jusqu'à ce que le niveau d'eau dans le récepteur n'augmente pas de plus de 0,1 mL en 30 min, la distillation est alors arrêtée.

Le collecteur de Dean-Stark est ensuite laissé à température ambiante pendant quelques minutes jusqu'à ce que la couche de toluène devienne limpide. La quantité d'eau contenue dans le récepteur de Dean-Stark est lue et la teneur en eau de l'échantillon est calculée comme suit:

$$H (\%) = \frac{V_{eau}}{M_H} \rho_{eau} 100 \quad (IV.1)$$

H : Taux d'humidité (%)

V<sub>eau</sub> : Volume d'eau (mL)

M<sub>H</sub> : Masse humide de la matière végétale (g)

ρ<sub>eau</sub> : Masse volumique de l'eau à 20°C (0,998 g.mL<sup>-1</sup>).

### III.2.4. Analyse par CG et CG/SM

Dans ce cas, nous avons également vérifié si l'α-pinène subit des dégradations pendant la distillation. Pour ce faire, des analyses dans les mêmes conditions que pour l'extraction des acides gras ont été réalisées.

### III.3 Extraction du $\beta$ -carotène

L'extraction du  $\beta$ -carotène a fait l'objet de plusieurs recherches. Différents paramètres ont été étudiés, tel que : le mode d'extraction, le solvant utilisé, le temps d'extraction, la température de chauffe etc.



Afin de solutionner le problème des entreprises, qui utilise des solvants nocifs pour l'extraction du  $\beta$ -carotène, ce qui leur implique l'utilisation de techniques de purification souvent très coûteuses, l'utilisation d'un biosolvant tel que l' $\alpha$ -pinène est proposé pour son extraction par macération (en Batch).

#### III.3.1. Matière végétale

La matière végétale utilisée dans cette étude est de la carotte séchée à l'aire et découpée en morceaux.

#### III.3.2. Solvant

Les solvants utilisés pour cette étude sont l' $\alpha$ -pinène et le n-hexane. Leurs propriétés sont regroupées dans le tableau IV.2.

#### III.3.3. Protocole expérimental

Le procédé d'extraction du  $\beta$ -carotène adopté dans cette étude est l'extraction par Batch (figure IV.6). 25g de carotte sont mis à macérer dans un volume de solvant pendant 3h. Les paramètres opératoires choisis sont : le rapport (Solide/Solvant) et la température d'extraction.

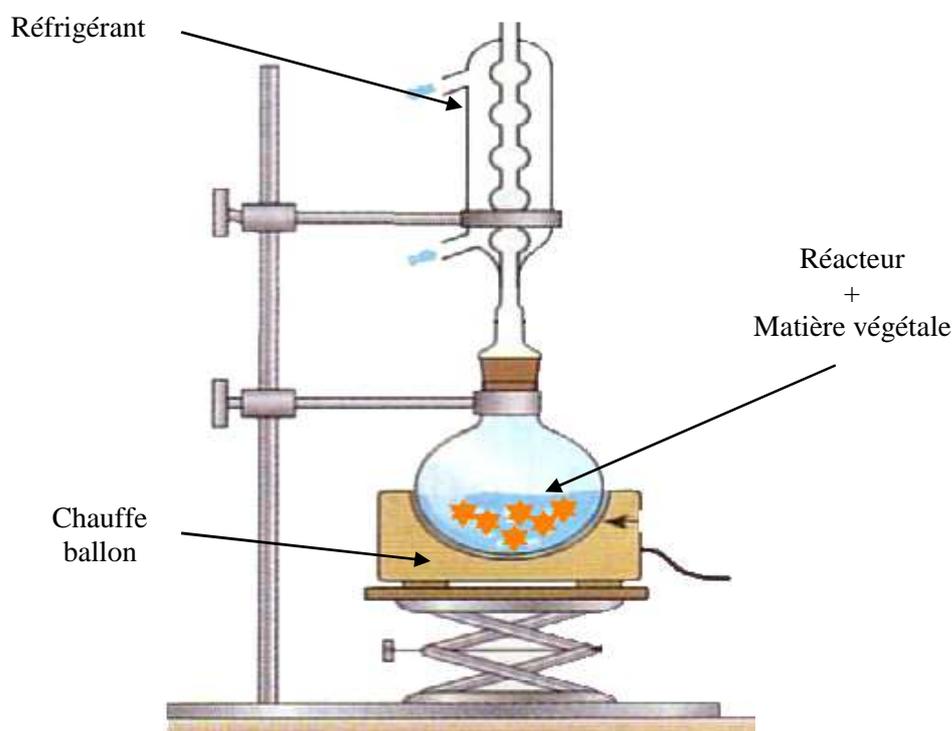


Figure IV.6. Extraction par Batch du  $\beta$ -carotène

### III.3.4. Méthodologie des plans d'expériences

La plupart des ingénieurs et techniciens améliorent leurs produits ou leurs processus de production à partir d'essais. Malheureusement, les stratégies couramment utilisées pour mener ces expériences sont souvent informelles et peu performantes. Elles conduisent à de nombreux essais difficiles à exploiter. La méthode des plans d'expériences permet d'adopter une démarche formelle pour réaliser des essais qui évitent les coûteux inconvénients d'une stratégie de tâtonnement.

La méthode des plans d'expériences n'est pas une technique nouvelle ; elle date en fait du début du siècle avec les travaux de Fisher en 1925 (**Pillet, 1997**). Les premiers utilisateurs de ces méthodes furent les agronomes qui ont vite compris l'intérêt des plans d'expériences et notamment la réduction du nombre d'essais lorsqu'on étudie de nombreux paramètres. Les plans d'expériences ont pris un essor considérable avec le développement de l'informatique et la puissance de calcul qui l'accompagne (**Duret et Pillet, 2005**).

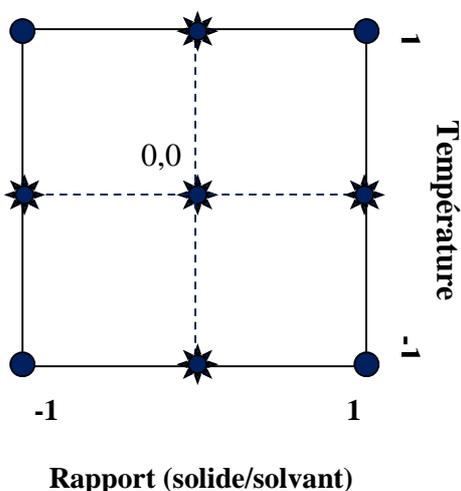
Aujourd'hui, de nombreux auteurs traitent de l'utilisation de plans d'expériences dans des domaines divers et variés dans le but d'étudier, d'optimiser, de comparer ou d'estimer divers critères (**Wang et Wan, 2009 ; Tiwari, 2009 ; Chen, 2008 ; Sharma, 2009 ; Tan, 2009 ; Cuoco, 2009, Bertouche, 2012a**).

Afin d'optimiser les conditions d'extraction tout en réalisant un nombre rationnel d'expériences, une planification par plan d'expériences a été réalisée. Le plan d'expériences choisi est le plan composite centré à deux paramètres schématisés sur le carré de la figure IV.7, avec  $\alpha = \pm 1$ . Les paramètres opératoires sont étudiés simultanément, dans notre cas : le rapport (solide/solvant) et la température.

Une étude préliminaire a été menée pour la détermination des bornes des paramètres du plan d'expériences. La durée d'extraction a été fixée à 3h, le rapport (solide/solvant) varie entre 10 et 30% et la température entre 20 et 40 °C, au-delà de cette température il y a risque de détérioration de la molécule de  $\beta$ -carotène.

Les angles du carré représentent les bornes des paramètres. Dans ce type de plan, 12 manipulations doivent être programmées :

- 4 au centre du carré
- 4 aux extrémités du carré
- 4 aux centres des côtés du carré



**Figure IV.7 :** Représentation du plan d'expériences sous forme de carré

L'ordre des manipulations est donné de manière aléatoire par le logiciel **Statgraphics** (tableau IV.4). La variable analysée est le rendement en β-carotène. Afin de déterminer cette dernière, des mesures d'absorbance à 457nm en fin d'extraction ont été effectuées, puis à l'aide d'une courbe d'étalonnages, les rendements en β-carotène ont pu être déterminés.

Tableau récapitulatif des expériences du plan d'expériences				
Variables Codées		Variable réels		
N°	Rapport (solide/solvant)	Température	Rapport (solide/solvant) (%)	Température (°C)
1	-1	1	10	40
2	1	0	30	30
3	0	0	20	30
4	-1	0	10	30
5	0	1	20	40
6	1	1	30	40
7	0	-1	20	20
8	0	0	20	30
9	1	-1	30	20
10	0	0	20	30
11	0	0	20	30
12	-1	-1	10	20

## IV. RESULTATS ET DISCUSSION

### IV.1. Extraction des Acides gras

Le traitement des résultats a porté aussi bien sur l'aspect qualitatif que quantitatif (**Bertouche et al., 2013**).

#### IV.1.1. Analyses quantitative et qualitative

Les résultats des extractions des différentes matrices sont représentés dans le tableau IV.5. Les rendements en huile des extractions au α-pinène sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par le n-hexane. Cette différence, soulignée également par **Liu et al. (2005)** et **Virost et al. (2008)**, est certainement due à la nature légèrement plus polaire du α-pinène par rapport au n-hexane qui provoquerait un pouvoir de solubilisation plus important pour les triglycérides. De plus, la diffusion est améliorée grâce à la température d'ébullition plus élevée du α-pinène, ce qui diminue la viscosité de l'huile.

**Tableau IV.5** Teneur en huile des différentes matrices obtenue par extraction au Soxhlet avec le n-hexane, l' $\alpha$ -pinène.

Matrice alimentaire	Solvant	
	n-hexane (%)	$\alpha$ -pinène (%)
Arachide	39,5 $\pm$ 0,23	42,3 $\pm$ 0,29
Soja	19,5 $\pm$ 0,29	21,1 $\pm$ 0,20
Tournesol	52,6 $\pm$ 0,20	67,2 $\pm$ 0,21
Olive <i>Chemlal</i>	22,6 $\pm$ 0,16	24,5 $\pm$ 0,24

Les acides gras contenus dans les huiles ont été convertis sous forme de dérivés d'esters méthyliques d'acides (FAME) selon la norme **AOCS Official Method Ce 2-66. (1989)** et analysés par CG-SM. Les résultats regroupés dans le Tableau IV.6, nous permettent de souligner que les acides gras sont équivalents pour les deux solvants en matière de composés identifiés et en proportion relative. De plus cette composition est comparable avec celle citée dans la bibliographie.

Tableau  
IV.6

Comparaison de la composition en acides gras et du rendement des huiles extraites par les deux solvants utilisés.

Solvant	Arachide(%)		Soja (%)		Tournesol (%)		Olive (%)	
	n-Hexane	$\alpha$ -pinène	Hexane	$\alpha$ -pinène	Hexane	$\alpha$ -pinène	Hexane	$\alpha$ -pinène
<b>Acides Gras</b>								
<b>SFAs</b>								
Palmitique C16:0	7,98±0,04	8,27±0,03	11,45±0,31	12,17±0,05	7,31±0,04	7,29±0,05	13,77±0,1	13,31±0,14
Margarique C17:0	0,11±0,02	0,10±0,01	tr	tr	tr	tr	tr	0,14±0,01
Stéarique C18:0	3,79±0,10	3,51±0,08	4,90±0,01	5,20±0,02	5,81±0,01	5,50±0,03	4,49±0,01	3,88±0,02
Eicosanoïque C20:0	1,08±0,03	1,07±0,01	0,28±0,03	0,31±0,02	0,25±0,01	0,28±0,01	0,29±0,02	0,29±0,02
Béhénique C22:0	2,15±0,41	2,36±0,08	0,28±0,18	0,33±0,15	0,57±0,21	0,64±0,03	nd	nd
<b>MUFAs</b>								
Palmitoléique C16:1	tr	tr	0,14±0,01	0,17±0,02	0,12±0,01	0,10±0,01	1,43±0,01	1,37±0,05
Oléique C18:1	<b>63,25±0,23</b>	<b>63,56±0,17</b>	24,13±0,10	25,30±0,25	28,39±0,27	29,30±0,22	<b>62,95±0,42</b>	<b>63,05±0,31</b>
Oléique C18:1 n-7	1,18±0,26	tr	1,87±0,01	1,97±0,12	1,38±0,07	1,19±0,10	4,30±0,14	5,07±0,11
Gadoléique C20:1	0,12±0,01	0,18±0,02	0,15±0,01	0,18±0,01	0,10±0,01	0,13±0,01	0,18±0,02	0,18±0,02
Hénicosanoïque C22:1	0,15±0,01	0,28±0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>PUFAs</b>								
Linoléique C18:2	20,03±0,39	19,54±0,24	<b>50,61±0,36</b>	<b>48,77±0,14</b>	<b>55,95±0,13</b>	<b>55,40±0,24</b>	12,02±0,18	12,25±0,11
Linoléique C18:3	tr	tr	6,10±0,16	5,53±0,14	tr	tr	0,53±0,02	0,48±0,10
$\Sigma$ SFAs	15,10	15,30	17,00	18,10	14,00	13,80	18,60	17,60
$\Sigma$ MUFAs	<b>64,80</b>	<b>65,10</b>	26,30	27,60	30,00	30,70	<b>68,90</b>	<b>69,70</b>
$\Sigma$ PUFAs	20,10	19,60	<b>56,70</b>	<b>54,30</b>	<b>56,00</b>	<b>55,50</b>	12,60	12,70
Rendements (%)	39,50±0,23	42,30±0,29	19,50±0,29	21,10±0,2	52,60±0,2	67,20±0,21	22,60±0,16	24,50±0,24

SFAs : Acides gras saturés, MUFAs : Acides gras mono-insaturés, PUFAs : Acides gras poly-insaturés,  
tr : trace <0,1%, nd : non détectés

Pour les arachides et les olives, l'acide majoritaire extrait par les deux solvants est l'acide Oléique (C18:1). Quant aux graines de soja et de tournesol, l'acide majoritaire est l'acide Linoléique (C18:2).

La somme des teneurs en acides Palmitique (C16:0), Stéarique (C18:0), Oléique (C18:1), Linoléique (C18:2), Eicosanoïque (C20:0) et Béhénique (C22:0) représentent plus de 94% de la composition totale en acide gras quel que soit la matrice ou le solvant utilisé.

L'huile d'arachide contient une majorité d'acides gras mono-insaturés (64,8% par n-Hexane contre 65,1% par  $\alpha$ -pinène), de même que les olives (68,9% par n-Hexane contre 69,7% par  $\alpha$ -pinène), contrairement aux huiles de tournesol et de soja qui présentent une majorité d'acides gras poly-insaturés (PUFAs).

De faibles quantités d'acide margarique (C17:0) ont été notées pour toutes les matrices. Par contre, l'acide béhénique (C22:0) n'a pas été identifié dans l'huile d'olive. L'acide hénéicosanoïque (C22:1) n'a pu être identifié que dans l'huile d'arachide.

La capacité de recyclage de chacun des deux solvants a également été mesurée. Le taux de recyclage de l' $\alpha$ -pinène de l'ordre de 90% est nettement supérieur à celui du n-hexane qui atteint les 50%. Ce qui constitue un autre avantage pour l'utilisation de l' $\alpha$ -pinène comme solvant pour l'extraction des acides gras.

#### IV.1.2. Analyse statistique

Les résultats de la répétabilité et la fiabilité de l'extraction des acides gras obtenus pour les arachides sont résumés dans le tableau IV.7. Nous pouvons voir que les valeurs moyennes obtenues avec l' $\alpha$ -pinène sont comparables à celles obtenues avec l'hexane pour les différents acides gras. Les différences observées dans les teneurs de C16, C18:1 n-7 et C18:2 pourraient être dues à une dégradation de ces trois acides au cours de l'évaporation du solvant d'extraction. Nous pouvons toutefois noter un rendement plus élevé en huile pour l'arachide par distillation au pinène,  $43,4 \pm 0,62\%$  contre  $39,5 \pm 0,30\%$  avec l'hexane. En outre, les valeurs des écarts-types relatifs sont relativement faibles ce qui signifie que les résultats sont très peu dispersés autour de la valeur moyenne. Les tests de Fisher et de Student effectués afin de comparer la variabilité des résultats, n'ont montré, d'un point de vue statistique, aucune différence significative pour la dispersion des résultats dans les deux groupes d'échantillons.

Tableau IV.7

Répétabilité et étude statistique

Expérience	C16		C16:1		C17		C18		C18:1		C18:1 n-7		C18:2		C18:3		C20		C20:1		C22		C22:1		Rend.		
	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	
1	5,5	7,7	0,1	0,0	0,1	0,1	4,9	3,2	75,8	61,7	2,7	1,8	7,2	20,2	0,1	0,1	1,2	1,1	0,4	1,8	2,0	2,2	0,1	0,1	42,06	39,65	
2	7,9	8,0	0,1	0,1	0,1	0,1	5,1	3,6	62,4	62,2	2,4	0,8	17,1	20,1	0,0	0,1	1,2	1,1	1,5	1,8	2,0	2,1	0,1	0,1	42,46	39,33	
3	8,3	6,1	0,2	0,1	0,1	0,1	4,1	4,0	59,5	74,2	2,4	0,8	20,6	9,9	0,1	0,1	1,0	1,1	1,5	1,9	2,0	1,6	0,1	0,1	43,68	39,74	
4	5,9	6,0	0,1	0,1	0,1	0,1	3,4	3,9	76,6	75,0	2,3	1,0	8,1	8,7	0,1	0,1	1,1	1,1	0,2	2,0	2,1	1,9	0,2	0,2	43,94	39,08	
5	10,0	8,9	0,1	0,1	0,1	0,1	5,4	4,7	78,1	78,8	1,5	1,1	0,4	0,2	0,1	0,1	1,5	1,3	0,2	2,1	2,6	2,4	0,1	0,1	43,67	39,88	
6	6,2	9,7	0,1	0,1	0,1	0,1	3,6	5,1	77,5	76,5	0,8	1,1	8,1	0,3	0,1	0,1	1,1	1,4	0,2	2,1	2,1	3,0	0,1	0,4	42,82	39,09	
7	6,1	5,9	0,1	0,1	0,1	0,1	3,9	4,0	74,8	75,2	2,5	0,9	9,1	8,7	0,1	0,1	1,1	1,1	0,2	1,9	2,0	1,8	0,1	0,1	43,21	39,40	
8	5,8	7,4	0,1	0,0	0,1	0,1	3,5	3,4	75,2	63,6	2,2	2,3	8,4	18,4	0,0	0,1	1,0	1,1	1,8	1,6	1,8	2,1	0,1	0,0	43,27	39,85	
9	7,5	5,7	0,1	0,1	0,1	0,1	3,6	4,2	67,4	77,1	0,9	0,9	16,7	8,4	0,1	0,1	1,1	1,1	0,2	0,2	2,2	1,9	0,1	0,3	42,95	39,19	
10	7,7	5,7	0,0	0,1	0,1	0,1	3,2	3,5	63,4	76,3	2,3	1,8	18,0	7,8	0,1	0,1	1,1	1,0	1,7	1,9	2,3	1,7	0,1	0,1	42,37	39,58	
Moyenne	7,1	7,1	0,1	0,1	0,1	0,1	4,1	4,0	71,1	72,1	2,0	1,3	11,4	10,3	0,1	0,1	1,1	1,1	0,8	1,7	2,1	2,1	0,1	0,2	43,0	39,5	
S <sup>2</sup>	2,08	2,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,61	0,37	50,68	45,31	0,46	0,29	40,63	52,94	0,00	0,00	0,02	0,02	0,54	0,33	0,04	0,15	0,00	0,01	0,39	0,09	
SD	1,44	1,45	0,04	0,02	0,01	0,02	0,78	0,61	7,12	6,73	0,68	0,54	6,37	7,28	0,03	0,01	0,13	0,14	0,74	0,57	0,21	0,39	0,03	0,12	0,62	0,30	
RSD	20,33	20,34	48,62	26,52	15,67	17,00	19,23	15,33	10,01	9,34	34,02	42,94	56,01	70,82	40,90	13,71	11,73	12,70	94,87	33,26	9,85	19,14	20,53	68,39	1,45	0,77	
Fcal	0,99		3,72		0,72		1,65		1,12		1,58		0,77		6,60		0,86		1,65		0,28		0,05		4,24		F <sub>Tab</sub> 3,18
Tcal	0,03		0,27		1,10		0,28		0,30		2,56		0,34		1,10		0,10		3,04		0,39		1,14		15,42		T <sub>TAB</sub> 2,10

h: n-hexane

p: α-pinène

S<sup>2</sup>: Variance

SD : ECAR-TYPE

RSD : ECAR-TYPE relatif

Fcal: Valeur calculée du test Fisher-Snedecor

F<sub>Tab</sub>: Valeur tabulée pour α= 0.05 et 9 degrés de liberté

Tcal: Valeur calculée du test de Student

T<sub>TAB</sub>: Valeur tabulée pour α= 0.05 et 18 degrés de liberté

## IV.2. Détermination de la teneur en eau par la méthode de Dean-Stark

L'étude a porté sur la comparaison de la cinétique de distillation et les teneurs en eau déterminées.

### IV.2.1. Cinétique de la distillation azéotrope

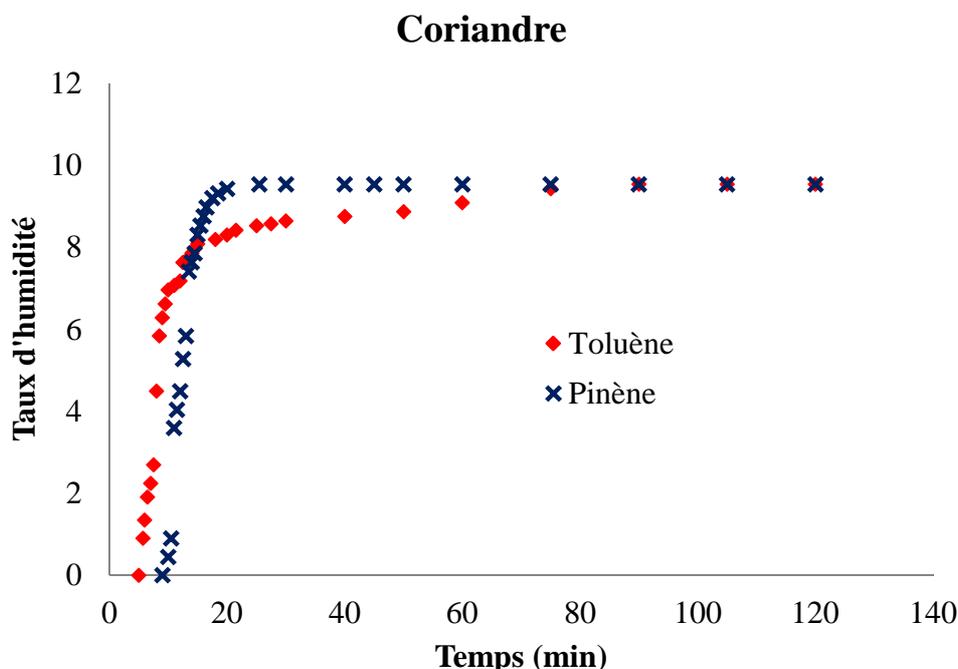
La procédure de Dean-Stark est une distillation azéotrope d'un mélange de solvants non miscibles : eau avec du toluène ou de l' $\alpha$ -pinène. En raison de la différence de leurs points d'ébullition (tableau IV.2), il est prévisible que ces solvants aient des cinétiques de distillation différentes.

Pour vérifier cela, nous avons suivi la cinétique de distillation à la fois pour le toluène et le pinène pour la détermination de l'humidité des graines de coriandre.

La figure IV.8 représentant les cinétiques de la distillation azéotrope pour les deux solvants montre des allures de courbe très semblables, cependant certaines différences peuvent être observées.

En effet, le point d'ébullition de l' $\alpha$ -pinène (156 °C) étant plus élevé que celui du toluène (111 °C), celui du mélange pinène-eau (97-98°C) est également plus élevé que celui du mélange toluène-eau (84°C), le début de la récupération de l'eau est retardé de 3 à 4 min dans le cas de la distillation avec l' $\alpha$ -pinène.

Toutefois, lorsque la distillation a commencé la récupération de l'eau est plus rapide lors de l'utilisation de l' $\alpha$ -pinène. En effet, nous pouvons remarquer que la même quantité récupérée après 30 minutes de distillation à l' $\alpha$ -pinène, n'est obtenue qu'après 105 min avec du toluène. Cette réduction du temps de traitement représente un gain de plus de 70% en terme de temps et donc de consommation d'énergie.



**Figure IV.8 :** Cinétique de distillation azéotrope des graines de coriandre en fonction du solvant

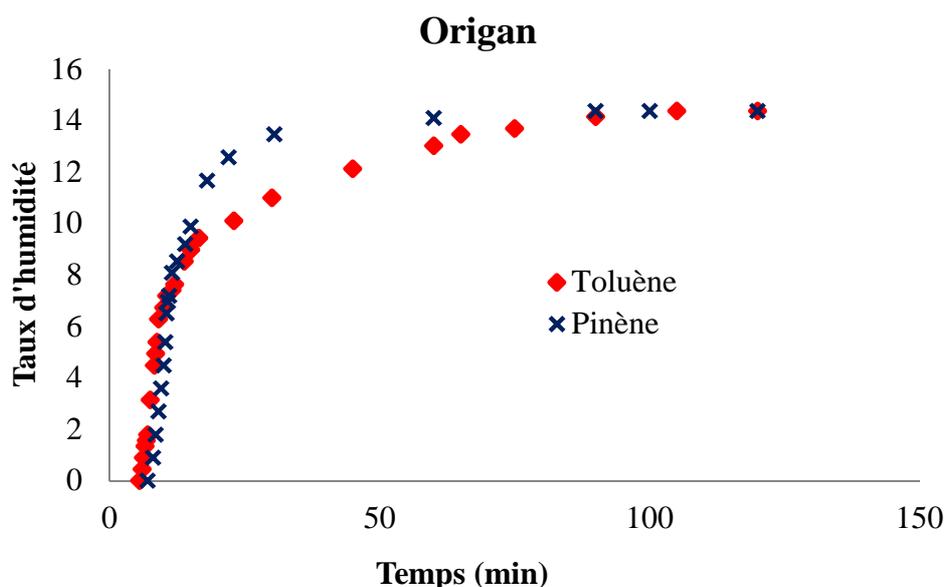
### IV.2.2. Généralisation de la méthode

Dans le but d'évaluer l'efficacité de la méthode proposée (distillation au pinène), des essais ont été effectués sur d'autres matrices. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus par la méthode conventionnelle de distillation au toluène. Les matrices choisies sont : les graines de carvi, les feuilles d'origan et les carottes. Trois essais ont été réalisés pour chaque expérience aussi bien avec l' $\alpha$ -pinène qu'avec le toluène.

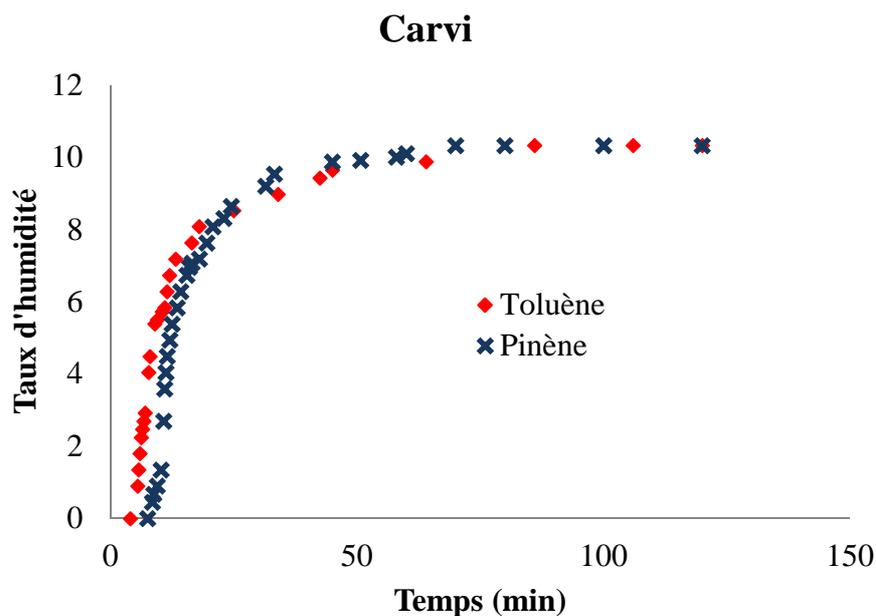
Les résultats de la généralisation de la distillation par  $\alpha$ -pinène à d'autres produits sont donnés dans le tableau IV.8. Nous pouvons observer que les valeurs obtenues pour les teneurs en eau sont comparables pour les deux solvants. Les résultats donnés par l' $\alpha$ -pinène ne sont pas statistiquement différents de ceux obtenus par le toluène. Cette nouvelle méthode pourrait donc être une alternative écologique à la distillation au toluène pour la détermination du taux d'humidité de matrices alimentaires.

Matrice alimentaire	Teneur en eau (%)	
	Toluène	$\alpha$ -pinène
Carvi	10,3 $\pm$ 0,2	10,3 $\pm$ 0,1
Origan	14,3 $\pm$ 0,5	14,4 $\pm$ 0,1
Coriandre	9,5 $\pm$ 0,2	9,6 $\pm$ 0,1
Carotte	95,1 $\pm$ 0,4	95,05 $\pm$ 0,1

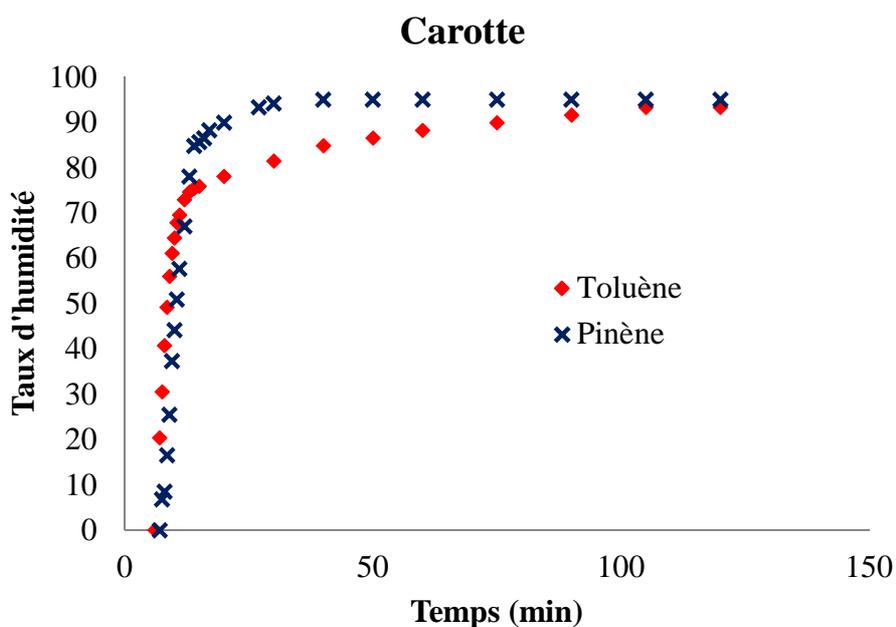
Toutes les cinétiques de distillation ont la même allure que celle de la coriandre (figure IV.9-11).



**Figure IV.9** : Cinétique de distillation azéotropique des feuilles d'origan en fonction du solvant



**Figure IV.10** : Cinétique de distillation azéotrope des graines de carvi en fonction du solvant



**Figure IV.11** : Cinétique de distillation azéotrope des carottes en fonction du solvant

Une étude complémentaire a été menée sur d'autres matrices à savoir : l'oignon et l'ail, les olives, les poireaux et la viande hachée (**Bertouche, 2012**). La comparaison des résultats obtenus avec ceux cités dans la littérature pour le limonène (**Veillet, 2010**), montre que les valeurs sont comparables (tableau IV.9) du point de vue de la teneur en humidité, de la reproductibilité des résultats et de la cinétique de distillation. Ainsi, nous pouvons conclure que l' $\alpha$ -pinène est aussi efficace que le limonène et peut être utilisé comme solvant vert pour la détermination de la teneur en eau de produits alimentaires afin de remplacer le toluène.

Tableau  
IV.9

Teneur en eau de matrices alimentaires obtenue par distillation avec le toluène, l' $\alpha$ -pinène et le d-limonène.

Matrice alimentaire	Teneur en eau (%)		
	Toluène <sup>a</sup>	$\alpha$ -pinène <sup>a</sup>	d-limonène <sup>b</sup>
Coriandre	9,5± 0,2	9,6± 0,1	
Carvi	10,3± 0,2	10,3± 0,1	
Oignon	87,8± 1,4	87,3± 2,4	89,4 ± 1,4
Ail	70,8± 0,6	70,3± 0,8	68,6 ± 1,9
Carotte	95,1±0,4	95,05±0,1	89,5 ± 0,7
Poireau	89,0 ±2,1	86,3± 0,6	88,0 ± 1,0
Olive	47,3± 0,8	49,1 ±0,9	
Origan	14,3 ±0,2	14,4± 0,1	
Viande hachée	59,3 ±2,0	57,1± 0,7	64,0 ± 0,3

a : Bertouche et al, 2012

b : Veillet, et al, 2010

### IV.2.3. Recyclage du $\alpha$ -pinène

Pour vérifier si l' $\alpha$ -pinène s'est dégradé au cours de la distillation au Dean-Stark, un échantillon récupéré après distillation a été analysé par chromatographie en phase gazeuse (CG) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM).

Ces analyses ont mis en évidence la présence d' $\alpha$ -phelendrène, de camphène, de bêta-pinène ainsi que du  $\alpha$ -pinène oxyde mais avec des teneurs inférieures à 0,1%. La teneur en  $\alpha$ -pinène reste supérieure à 98%, ce qui implique que l' $\alpha$ -pinène récupéré n'a pas été dégradé au cours de la distillation, et peut être réutilisé comme solvant pour une distillation ultérieure.

## IV.3 Extraction du $\beta$ -carotène

L'objectif de cette étude est l'optimisation par plan d'expériences de deux paramètres à savoir : la température d'extraction et le rapport solide/solvant de l'extraction par Batch du  $\beta$ -carotène par l' $\alpha$ -pinène.

### IV.3.1. Résultat de l'optimisation par plan d'expérience

Les résultats obtenus après extraction du  $\beta$ -carotène par l' $\alpha$ -pinène sont regroupés dans le tableau IV.10.

Tableau  
IV.10

Tableau récapitulatif des expériences et des résultats du plan d'expériences

N°	Variables Codées		Variable réels		
	Rapport (solide/solvant)	Température	Rapport (solide/solvant) (%)	Température (°C)	Rendement en β-carotène (%)
1	-1	1	10	40	8,31
2	1	0	30	30	2,92
3	0	0	20	30	3,29
4	-1	0	10	30	0,16
5	0	1	20	40	7,13
6	1	1	30	40	<b>8,67</b>
7	0	-1	20	20	2,43
8	0	0	20	30	2,98
9	1	-1	30	20	2,14
10	0	0	20	30	2,9
11	0	0	20	30	3,13
12	-1	-1	10	20	0,47

Les résultats de ce tableau nous permettent de constater que :

- Le passage de la température de son niveau inférieur à son niveau supérieur alors que le rapport Solide/Solvant est à son niveau inférieur ou supérieur améliore le rendement en β-carotène. Les mêmes constatations sont observées pour le rapport Solide/Solvant.
- Les essais aux centres donnent des rendements comparables, ce qui permet de conclure que la reproductibilité des résultats est bonne, l'erreur maximale ne dépassant pas 7%.

#### a. Résultat de l'analyse par le logiciel STATGRAPHICS®

Le traitement des résultats a été effectué par le logiciel **STATGRAPHICS®** Centurion IV version 15.1.02. Cette méthode permet de modéliser les réponses obtenues et de déterminer l'optimum des paramètres opératoires permettant d'obtenir le meilleur rendement en β-carotène et la détermination des différents effets de chaque paramètre quels qu'ils soient : simple, quadratique ou d'interaction ainsi que l'élaboration du modèle qui décrit le comportement du système.

#### ➤ Analyse de la variance

L'analyse de la variance est une technique importante pour analyser l'effet de facteurs qualitatifs sur une réponse. Une ANOVA (ANalysis Of VARIance) décompose la variabilité de la réponse en fonction des différents facteurs. En fonction du type d'analyse, il peut être important de déterminer les facteurs significatifs qui ont un effet sur la réponse et/ou la part de la variabilité de la réponse qui peut être attribuée à chacun des facteurs.

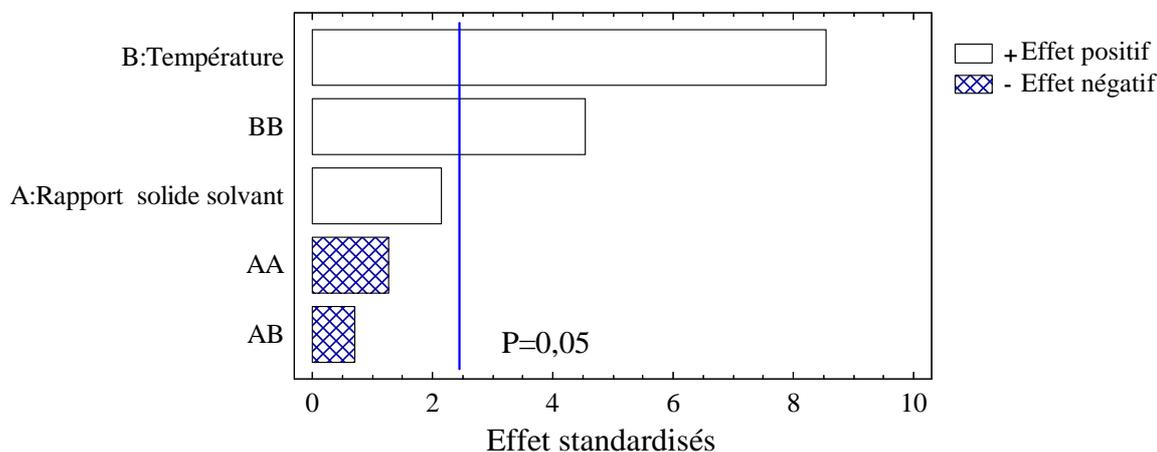
La détermination des facteurs significatifs se fait à l'aide de l'hypothèse nulle notée  $H_0$  qui suppose que l'effet du paramètre est égal à zéro. La probabilité d'accepter cette hypothèse est notée Val-P.

- Si Val-P < 5%, l'hypothèse  $H_0$  est rejetée et le paramètre est significatif.
- Si Val-P > 5%, l'hypothèse  $H_0$  est retenue et le paramètre est non significatif.

Les résultats de l'analyse de la variance sont donnés dans le tableau IV.11. Nous pouvons remarquer que seuls les effets simple et quadratique de la température sont significatifs.

Analyse de la variance des effets des paramètres opératoires	
Source	Val-P
A:Rapport solide solvant	0,0755
B:Température	<b>0,0001</b>
AA	0,2511
AB	0,4993
BB	<b>0,0040</b>

Ces résultats sont schématisés par le diagramme de Pareto, représenté sur la figure IV.12, qui montre que les paramètres ont un effet significatif s'ils dépassent la valeur symbolisée par le trait vertical avec un risque d'erreur de 5%. Nous pouvons remarquer sur ce diagramme que l'effet linéaire de la température est la variable quantitative présentant l'influence la plus importante, suivie de l'effet quadratique de cette dernière.

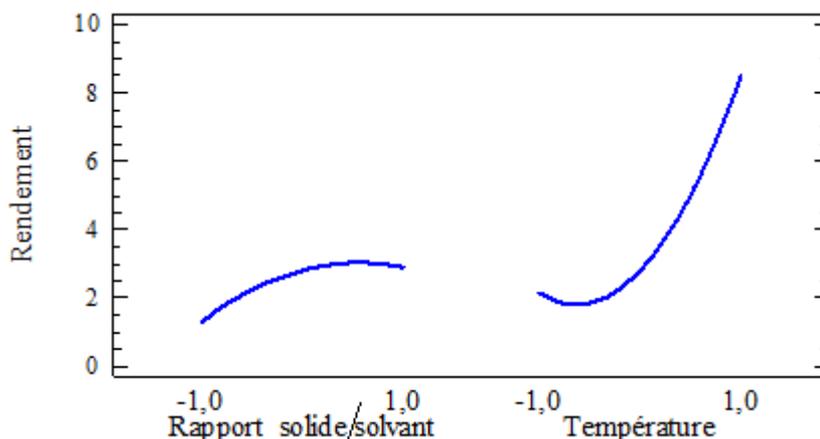


**Figure IV.12** : Diagramme de Pareto présentant l'influence standardisée de chaque effet

### ➤ Les effets simples

Les effets simples des paramètres représentent le passage d'un paramètre de son niveau inférieur à son niveau supérieur, lorsque les autres paramètres sont à leurs niveaux centraux (niveau zéro).

La figure IV.13 représente les effets simples du rapport solide/solvant et de la température sur le rendement. Nous pouvons remarquer que le rendement augmente proportionnellement avec le rapport solide/solvant mettant ainsi en évidence un maximum dans l'intervalle codé [0,+1]. Toutefois, l'influence de cet effet reste faible sur le rendement et confirme les observations soulignées par le diagramme de Pareto. En revanche, l'effet simple de la température est plus important. Lorsque la variable passe de son niveau bas à son niveau haut, le rendement passe de 2,15% à 8,51% avec un minimum situé dans l'intervalle [-1,0], plus précisément au voisinage de -1.



**Figure IV.13** : Effet simple des paramètres

#### ➤ Les effets d'interactions

Afin d'illustrer l'influence d'un paramètre sur un autre, nous le faisons varier lorsque ce dernier est à son niveau inférieur puis supérieur. Graphiquement, ces effets sont significatifs lorsque les courbes ne varient pas dans le même sens aux deux niveaux inférieur et supérieur.

La figure IV.14 représentant l'effet d'interaction des paramètres montre qu'il n'existe aucune interaction entre la température et le rapport (solide/solvant), ce qui confirme les résultats obtenus par l'analyse de la variance (ANOVA) et schématisés par le diagramme de Pareto.

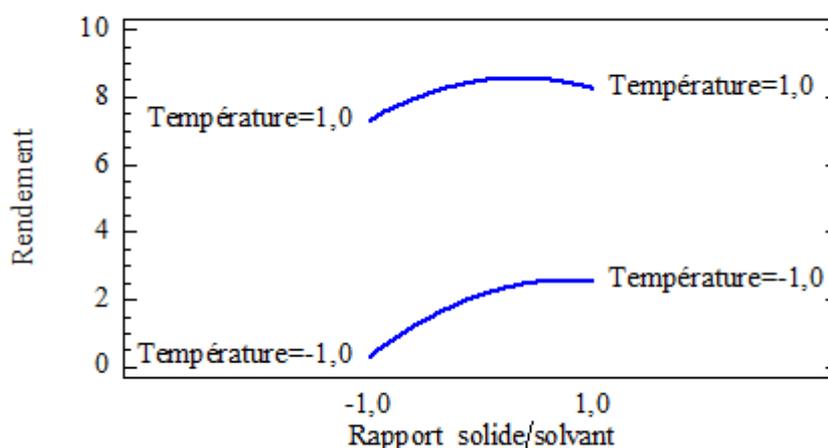


Figure IV.14 : Effets d'interaction des paramètres

### b. Coefficient de corrélation du modèle : $R^2$

Le  $R^2$  coefficient de corrélation ou de détermination mesure la qualité de l'ajustement des estimations de l'équation de régression. Il permet d'avoir une idée globale de l'ajustement du modèle. Il varie entre 0 et 1 et s'exprime souvent en pourcentage.

Il est important de préciser que pour faire des prévisions, il est souhaitable que la valeur du coefficient de détermination soit élevée, car plus la valeur de  $R^2$  est élevée, plus celle de la variation inexpliquée est petite.

Dans le cadre de cette étude, la valeur du coefficient de détermination  $R^2$  est égale à **94,27** % ce qui signifie un bon ajustement du modèle dans le domaine expérimental étudié.

### c. Détermination des coefficients du modèle

Les coefficients du modèle sont donnés dans le tableau IV.12 :

Paramètre	Coefficients du modèle	
	Valeur des coefficients codés	Valeur des coefficients réels
constante	2,79958	9,649174
A:Rapport solide/solvant	0,798333	0,4615833
B:Température	3,17833	- 1,135417
AA	-0,70875	- 0,0070875
AB	-0,3275	- 0,003275
BB	2,53125	0,0253125

Le modèle en variables codées s'écrit alors :

$$\text{Rendement (\%)} = 2,79958 + 0,798333 A + 3,17833 B - 0,70875 AA - 0,3275 AB + 2,53125 BB$$

Où : A:variable réduite relative au Rapport solide/solvant

B: variable réduite relative à la Température d'extraction

Le modèle en variables réelles s'écrit alors :

$$\text{Rendement (\%)} = 9,649174 + 0,4615833 R - 1,135417 T - 0,0070875 RR - 0,003275 RT + 0,0253125 TT$$

Où : R:Correspond au Rapport solide/solvant

T: Correspond à la Température d'extraction

Le rendement optimal calculé par le logiciel est égal à **8,59%**. Il est obtenu pour les valeurs optimales des paramètres opératoires données par :

En variable codées : **A** = +0,33 ; **B** = +1 ;

En variable réelles : **R** = 23,32 % ; **T** = 40 °C ;

Nous remarquons que l'optimum calculé ne correspond pas à l'optimum expérimental qui est : R=30% et T=40°C. Pour le paramètre rapport solide/solvant la valeur expérimentale étant supérieure, elle a donc été surévaluée. Ce résultat est intéressant dans la mesure où il permet d'utiliser moins de solvant.

#### d. La surface de réponse

Les surfaces de réponse sont représentées dans un espace en trois dimensions montrant l'évolution de la réponse en fonction de deux paramètres. Elles permettent de détecter les zones expérimentales pour une réponse optimale.

La surface de réponse correspondant au couple Rapport-Température, illustrée par la figure IV.15, montre que le rendement est optimal lorsque la température est à son niveau supérieur et pour un rapport (solide/solvant) supérieur à 0,3 (23%).

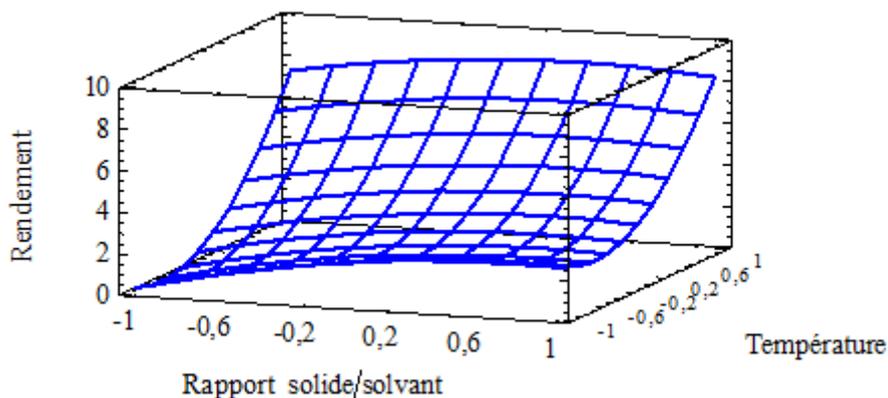


Figure IV.15 : Surface de réponse

### IV.3.1. Etude comparative

Afin de comparer le rendement obtenu par l'extraction à l' $\alpha$ -pinène à celui obtenu par le n-hexane, une extraction dans les conditions optimales du plan d'expériences est effectuée. Les résultats sont regroupés dans le tableau IV.13.

**Tableau IV.13** Influence du solvant sur le rendement en  $\beta$ -carotène.

Solvant	Variables Codés		Variable réels		
	Rapport (solide/solvant)	Température	Rapport (solide/solvant) (%)	Température (°C)	Rendement (%)
$\alpha$ -pinène	1	1	30	40	<b>8,67</b>
n-hexane	1	1	30	40	8,21

Nous pouvons remarquer que les rendements sont du même ordre de grandeur avec une légère supériorité pour l'extraction à l' $\alpha$ -pinène. Ce qui implique que l'utilisation du  $\alpha$ -pinène est adéquate et conseillée pour l'extraction du  $\beta$ -carotène.

## CONCLUSION

L'étude menée pour la détermination des huiles et matières grasses dans les graines oléagineuses montre que les résultats obtenus avec les deux solvants sont comparables permettant de conclure que l' $\alpha$ -pinène, est efficace et valable et peut substituer le n-hexane. Le fait que le taux de recyclage du  $\alpha$ -pinène est quasi-total (90% contre 50% pour l'hexane), fait de lui une alternative plus fiable et plus sûre pour l'environnement, malgré sa température d'ébullition plus élevée que celle du n-hexane (surplus d'énergie nécessaire).

Les résultats de l'utilisation de l' $\alpha$ -pinène pour la détermination du taux d'humidité des produits alimentaires sont comparables en termes de teneur en eau avec ceux obtenus par le toluène comme solvant de distillation, en utilisant la procédure de Dean-Stark. L'utilisation du pinène est 3,5 fois plus rapide que celle du toluène (30 min vs 105 min) et par conséquent permet une économie d'énergie.

L'étude menée sur l'extraction du  $\beta$ -carotène nous a aussi permis de conclure que l' $\alpha$ -pinène peut être une alternative intéressante pour l'extraction du  $\beta$ -carotène. Cette étude a montré que seule la température influe de manière significative. Un modèle mathématique a été proposé avec un coefficient de corrélation de plus de 94% ce qui permet de conclure que ce modèle décrit bien le comportement du système dans le domaine expérimental choisi. Les résultats donnés par le plan d'expériences montrent que nous n'avons pas utilisé des domaines de variation assez larges pour pouvoir observer les variations du rendement pour des températures supérieures à 40°C.

# ***Chapitre V***



## ***Compréhension des phénomènes de solubilité***



# Chapitre V

## Compréhension des phénomènes de solubilité

### INTRODUCTION

Ce chapitre comporte deux objectifs : le premier est la détermination des propriétés physico-chimiques des composés étudiés dans notre étude. Le second est de connaître leur pouvoir solvant. Pour ce faire, la méthode des paramètres de solubilité de Hansen a été utilisée.

### I. PARAMETRES DE SOLUBILITE

Dans l'industrie, la théorie de Hansen est utilisée pour prédire la solubilité ou la miscibilité entre deux composés, et pour trouver les bonnes combinaisons de solvants dans des formulations de revêtements, peintures, cosmétiques, encres d'imprimerie, solvant de nettoyage...

#### I.1. Description de la théorie

Les forces non-covalentes jouent un rôle important dans les interactions soluté/solvant. Elles sont décrites dans la littérature selon différents modèles faisant intervenir des paramètres de solubilité. Il existe au sein des molécules quatre types de forces de cohésion : les trois forces de Van der Waals (interactions de London, de Keesom et de Debye) et la force de liaison hydrogène. Ces forces permettent à un solvant de rester à l'état liquide, en s'opposant efficacement à l'agitation thermique. En 1916, Hildebrand a proposé une théorie basée sur le lien entre la solubilité et l'énergie interne du solvant et du soluté. Pour cela, il préconise d'utiliser un paramètre de solubilité ( $\delta$ ) où la polarité de la molécule et les interactions spécifiques ne sont pas prises en compte. Cette théorie stipule que les forces d'interactions sont les plus élevées lorsque les molécules sont soumises à la même énergie interne, pour une chaleur de mélange qui tend vers zéro (**Hildebrand et Scott, 1950, Roire, 1989**).

Le rapport énergie interne/volume molaire noté  $E/V$  [ $\text{cal}/\text{cm}^3$ ] correspond à la densité d'énergie de cohésion (DEC). Par définition, le paramètre de solubilité de Hildebrand est égal à la racine carrée de la valeur de la DEC (Équation V.1).

$$\delta = \sqrt{DEC} = \left[ \frac{\Delta E}{V} \right]^{\frac{1}{2}} = \sqrt{\frac{\Delta H - RT}{V}} \quad (\text{V.1})$$

Avec :

$\delta$  : Paramètre de solubilité de Hildebrand ( $\text{cal}/\text{cm}^3$ )<sup>1/2</sup>

T : Température absolue (K)

R : Constante universelle des gaz parfaits ( $\text{cal}/\text{mol K}$ )

V : volume molaire ( $\text{cm}^3/\text{mol}$ )

H : enthalpie de vaporisation ( $\text{cal}/\text{mol}$ )

E : énergie de vaporisation ( $\text{cal}/\text{mol}$ )

La DEC est définie comme l'énergie qui assure la cohésion de l'ensemble des molécules pour une unité de volume de liquide ou de solide. Elle s'exprime en calories par unité de volume ou bien en MPa. Le paramètre de solubilité de Hildebrand  $\delta$  est en  $\text{cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$  sachant que  $1 \text{ cal}^{1/2}/\text{cm}^{3/2} = 2.05 \text{ MPa}^{1/2}$ .

Dans le cadre de la théorie des solutions régulières de substances non-électrolytes, développée par Hildebrand et Scott (**Hildebrand et Scott, 1950**), l'expression de l'enthalpie de mélange  $\Delta H_M$  de deux composés fait apparaître leurs paramètres de solubilité :

$$\Delta H_M = V_M (\delta_1 - \delta_2)^2 \rho_1 \cdot \rho_2 \quad (\text{V.2})$$

où  $V_M$  est le volume total du mélange,  
 $\rho_i$  la fraction volumique du composé  $i$  dans le mélange,  
 $\delta_i$  le paramètre de solubilité du composé  $i$ .

Or, pour que la dissolution entre deux espèces intervienne spontanément à pression et température constantes, l'enthalpie libre de mélange  $\Delta G_M$  doit satisfaire la condition :

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T \cdot \Delta S_M < 0 \quad (\text{V.3})$$

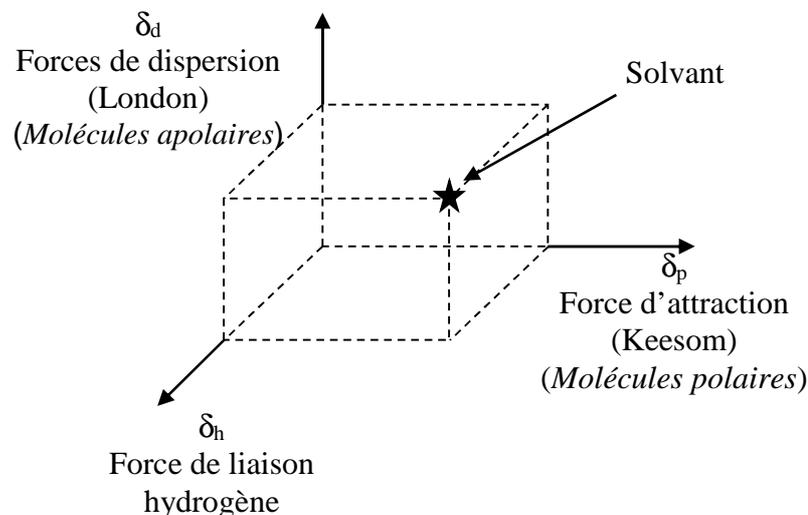
L'entropie de mélange  $\Delta S_M$  étant généralement positive, et  $\Delta H_M$  prenant seulement des valeurs positives dans le cadre de cette théorie, l'inégalité se vérifie donc d'autant mieux que  $\Delta H_M$  est la plus petite possible ; c'est-à-dire, en fait, lorsque les paramètres de solubilité sont identiques  $\delta_1 = \delta_2$ . Cela signifie donc que deux substances seront miscibles si leurs paramètres de solubilité sont très proches ou égaux.

Cette théorie semble adaptée pour expliquer et prédire les interactions entre liquides. Cependant, les expériences ont montré que l'utilisation de ce seul paramètre de solubilité était peu précise dans un certain nombre de cas. Cela peut s'expliquer car l'approche initiale d'Hildebrand et Scott ne s'applique pas aux composés développant des associations de type polaire ou des liaisons hydrogène.

L'exploitation du seul paramètre global de Hildebrand apparaît donc comme insuffisante pour expliquer l'ensemble des phénomènes de solubilité liés aux non-électrolytes.

Dans les années 1960, Hansen (**Hansen, 1969, 1967a, 1967b, 1967c**) propose de scinder ce paramètre  $\delta$  en trois de ses composantes principales : la première composante  $\delta_d$  est relative aux forces dites de « dispersion » de London (interactions non polaires), la seconde  $\delta_p$  est liée aux forces de polarité de Keesom (entre dipôles permanents), enfin la dernière  $\delta_h$  représente les forces de liaisons hydrogène et plus généralement les interactions mettant en jeu des échanges électroniques. Les forces de Debye (entre dipôles induits) sont généralement faibles en valeur absolue et sont négligées.

Hansen obtient ainsi un espace à trois dimensions (figure V.1) dans lequel toutes les substances liquides ou solides peuvent être localisées.



**Figure V.1.** Représentation tridimensionnelle des paramètres de solubilité de Hansen

En supposant que l'énergie totale de cohésion des dites substances est la somme géométrique des énergies intermoléculaires définies plus haut (Équation V.4). Un point représente la combinaison des interactions qui assure la cohésion de la substance.

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (\text{V.4})$$

Pour qu'une substance solide quelconque soit soluble dans un liquide, ou que deux liquides soient miscibles, il faut que leur situation dans l'espace soit voisine c'est-à-dire que leurs paramètres de solubilité soient proches. Ainsi, les composés qui ont des paramètres de Hansen similaires ont une grande affinité.

Dans cette configuration, la condition de dissolution précédemment décrite est étendue à l'ensemble des trois paramètres. Le facteur à minimiser devient alors :

$$A^2 = 4(\delta_{d1} - \delta_{d2})^2 + (\delta_{p1} - \delta_{p2})^2 + (\delta_{h1} - \delta_{h2})^2 \quad (\text{V.5})$$

A : distance entre les composés 1 et 2 en termes de solubilité.

La présence du facteur 4 devant les paramètres de dispersion est motivée par le souci de rendre le système plus symétrique, les valeurs de dispersion étant généralement très faibles (**Barton, 1991**).

En d'autres termes, pour que deux substances soient miscibles, il est nécessaire que leurs trois paramètres de solubilité soient identiques ou très proches.

## I.2. Description des paramètres de Hansen

Les interactions non polaires, qui correspondent à la composante  $\delta_d$ , concernent l'ensemble des molécules puisqu'elles sont imputables aux atomes qui les constituent. En effet, une molécule non polaire possède aussi des électrons qui peuvent causer un déséquilibre momentané de la distribution des charges dans les molécules avoisinantes, induisant ainsi un moment dipolaire temporaire.

Même s'ils changent constamment, ces dipôles induits génèrent des forces d'attraction d'autant plus grandes que la masse moléculaire est élevée (nombre d'électrons élevés). Pour les hydrocarbures aliphatiques saturés, par exemple, les interactions de London constituent la seule interaction attractive, ce qui se traduit par une énergie de vaporisation équivalente à l'énergie de cohésion.

Le second paramètre de solubilité partiel  $\delta_p$  est lié aux interactions polaires, hors liaison hydrogène. Il existe entre les molécules polaires des forces d'attraction électrostatique, le pôle positif de l'une attirant le pôle négatif d'une autre. Les interactions liées à des forces d'orientation entre dipôles permanents sont appelées forces de Keesom (**Hansen, 2000**).

Le troisième paramètre de solubilité partiel  $\delta_h$  est lié aux interactions mettant en jeu une liaison hydrogène entre un atome d'hydrogène doté d'une charge partielle positive et un atome fortement électronégatif.

Toutes ces forces d'attraction peuvent être classées en fonction de leur intensité :

*Force des liaisons hydrogènes > Force de London > Force de Keesom.*

## I.3. Méthodes de détermination des paramètres de solubilité de Hansen

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer les paramètres de Hansen. La première est expérimentale. Elle consiste à utiliser des paramètres de Hansen déjà connus pour un groupe de solvants. La deuxième méthode dite théorique consiste à calculer les paramètres de solubilité de Hansen du composé grâce à la contribution des groupements fonctionnels qui composent la structure chimique de la molécule (**Beerbower, 1973 ; Hansen et Beerbower, 1971 ; Hansen, 2004**)

A l'origine, Hansen a mis en place une méthode empirique pour diviser le paramètre de Hildebrand en trois paramètres. Elle consiste, dans un premier temps, à déterminer la composante dispersive  $\delta_d$  d'une molécule en s'appuyant sur le principe de similarité ou homomorphisme (rapprochement de molécules semblables en termes de structure et de taille). Pour cela, il convient de connaître le volume molaire du composé étudié et la nature de sa structure moléculaire : aliphatique, cycloaliphatique ou aromatique. Ensuite, grâce à des graphiques représentant l'énergie de cohésion dispersive en fonction du volume molaire, établis pour chacune des classes de composés citées (**Hansen, 1995**), on peut accéder à la valeur de la composante dispersive de la molécule. Connaissant ainsi le paramètre global  $\delta$  et le paramètre dispersif  $\delta_d$ , on en déduit un terme correspondant à la somme des carrés des deux autres composantes, la composante polaire  $\delta_p$  et celle correspondant aux liaisons hydrogènes  $\delta_h$ .

Pour déterminer les valeurs de ces deux composantes, Hansen a procédé à des tests de solubilité de polymères de natures différentes dans plusieurs solvants. Il a ensuite représenté l'ensemble de ces solvants dans l'espace à trois dimensions et, en s'aidant de l'outil informatique, a tenté d'ajuster les valeurs de  $\delta_p$  et  $\delta_h$  pour faire en sorte que tous les solvants dans lequel un polymère est soluble soient les plus proches possibles dans l'espace et décrivent une sphère de solubilité. Il a ainsi établi les premières valeurs de paramètres de solubilité pour 90 solvants en réalisant des tests de solubilité avec 32 polymères (**Hansen, 1967a-c, 1995, 2007**).

Plus tard, des corrections aux valeurs des composantes  $\delta_p$  ont été apportées en utilisant notamment les moments dipolaires. Le paramètre  $\delta_h$  était alors trouvé par déduction en utilisant l'équation V.4.

Cette procédure originale est maintenant devenue difficile à mettre en œuvre. La méthode est en effet fastidieuse et certains des polymères utilisés dans les années 1960 pour les tests de solubilité ne sont plus disponibles sous leur forme d'origine. C'est pourquoi d'autres méthodes de calcul ont ensuite été mises en place.

A partir des valeurs expérimentales établies pour les 90 solvants originaux, des méthodes de contribution de groupes ont été développées. Elles permettent de calculer des valeurs de paramètres de solubilité directement à partir de structures moléculaires. Leur principe général consiste à considérer que les paramètres de solubilité d'une molécule peuvent être déterminés en faisant la somme des contributions individuelles des groupes chimiques qui la composent. Ces méthodes sont fondées sur des analyses statistiques des résultats expérimentaux de Hansen. Leur utilisation consiste dans un premier temps à fragmenter la structure d'un composé selon les groupements fonctionnels qui la composent. Des tables, établies grâce à des calculs mathématiques, sont accessibles dans la littérature et contiennent des valeurs pour chaque groupement. Il s'agit alors de les dénombrer et d'introduire les valeurs correspondantes dans des équations mathématiques pour accéder aux trois paramètres  $\delta_d$ ,  $\delta_p$  et  $\delta_h$ . Plusieurs auteurs ont développé ces méthodes de contribution de groupes. On peut citer Beerbower, Hoy, Van Krevelen... (**Hansen, 2007 ; Van Krevelen, 1990 ; Barton, 1991**) et plus récemment, Stefanis et Panayiotou (**Stefanis et Panayiotou, 2008**) et Yamamoto (**HSPiP, 2010**).

Cependant, tous ont utilisé des algorithmes différents et il n'est pas rare de rencontrer, dans la littérature actuelle, des valeurs différentes de paramètres de solubilité pour une même substance chimique. Il devient donc important, pour toute nouvelle molécule, de préciser par quelle méthode ses paramètres de Hansen ont été calculés.

#### A. Méthode de Van Krevelen

La méthode mise au point par le néerlandais Van Krevelen est l'une des méthodes de contribution de groupes les plus rencontrées dans la littérature (**Van Krevelen, 1990**). A partir d'analyses statistiques des données expérimentales de Hansen, Van Krevelen a proposé de déterminer chacun des trois paramètres de solubilité à l'aide des équations suivantes :

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{\sum V_i} \quad \delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{\sum V_i} \quad \delta_h = \frac{\sqrt{\sum F_{hi}}}{\sum V_i} \quad (\text{V.5})$$

$i$  correspond à un groupement,  
 $F_d$  est la composante dispersive,  
 $F_p$  la composante polaire  
 $F_h$  la contribution des forces de liaisons hydrogène,  
 $V$  volume molaire.

Les tables de contribution de groupes pour chaque composante sont disponibles dans la littérature (**Van Krevelen, 1990 ; Barton, 1991**). Cependant, Van Krevelen lui-même a reconnu que cet algorithme ne permet pas de donner des valeurs de paramètres de solubilité très précises, notamment en raison du faible nombre de groupements chimiques considérés dans cette approche qui appauvrit la description des structures moléculaires (**HSPiP, 2010**).

#### *B. Méthode de Stefanis et Panayiotou*

La méthode mise au point par les grecs Stefanis et Panayiotou est très récente (**Stefanis et Panayiotou, 2008**). Ces auteurs ont utilisé des méthodes de statistique modernes pour traiter les données de Hansen et ont développé trois équations linéaires, à partir d'une régression linéaire en deux étapes, pour calculer chacun des paramètres de solubilité :

$$Y = \sum_i N_i C_i + W \sum_j M_j D_j \quad (V.6)$$

$C_i$  correspond aux contributions du premier ordre d'un groupement  $i$  apparaissant  $N$  fois dans une molécule.

$D_j$  correspond aux éventuelles contributions du second ordre d'un groupement  $j$  apparaissant  $M$  fois dans une molécule.

$W$  est égal à 1 ou 0, respectivement si le composé étudié possède ou non des contributions du second ordre.

$Y$  est une fonction linéaire qui peut correspondre à  $\delta_d$ ,  $\delta_p$  ou  $\delta_h$ .

C'est une méthode simple mais pourtant assez précise pour prédire les propriétés des composés organiques d'intérêt environnemental et nutraceutique. Il s'agit d'une extension d'un précédent succès du groupe **Constantinou et al. (1994)**. Cette nouvelle méthode utilise deux types de groupes : les groupes de premier ordre qui décrivent la structure moléculaire de base des composés ; ils correspondent aux groupements utilisés dans la méthode UNIFAC et des groupes de second ordre, qui sont fondés sur la théorie de conjugaison et d'améliorer l'exactitude des prévisions.

Vingt-six nouveaux groupes de premier ordre ont été définis, afin de s'assurer que les structures moléculaires de tout composé biochimique, y compris aromatique complexe, à plusieurs noyaux, et des composés hétérocycliques, peuvent être décrites. En outre, 12 nouveaux groupes de second ordre ont été définis pour améliorer la fiabilité des prévisions et l'applicabilité de la méthode. Les trois propriétés qui ont été estimées par la nouvelle méthode sont le coefficient de partage octanol-eau ( $\log K_{ow}$ ), la somme (Hildebrand) des paramètres de solubilité à 25 ° C, et le point d'éclair.

Ces propriétés ont de nombreuses applications dans l'industrie chimique, pharmaceutique et alimentaire, ainsi que dans la protection de l'environnement (**Stefanis, 2004**).

Les valeurs calculées par la méthode de Stefanis-Panayiotou sont en accord avec les valeurs expérimentales de Hansen. Le nombre de groupements fonctionnels utilisé pour décomposer les structures moléculaires est conséquent, ce qui fait que la méthode est reconnue comme l'une des plus précises pour le calcul des trois paramètres de solubilité (**HSPiP, 2010**).

### C. Méthode de Yamamoto

La méthode du japonais Hiroshi Yamamoto est également très récente mais elle est différente dans sa construction de celle de Stefanis-Panayiotou (**HSPiP, 2010**). L'auteur a utilisé l'ensemble des données expérimentales de Hansen, décomposé les molécules en différents groupements fonctionnels, puis a procédé à une analyse en réseau de neurones. Celle-ci est un modèle de calcul dont la conception est très inspirée du fonctionnement des neurones biologiques. Elle permet de faire des classements de données en procédant à des rapprochements logiques selon les connections qui s'établissent entre elles.

Cette méthode permet de calculer directement les paramètres de solubilité à partir de la structure moléculaire des composés mise en format informatique. L'approche de Yamamoto permet également de calculer d'autres paramètres physico-chimiques, comme par exemple la température d'ébullition, avec une bonne précision.

La méthode est en constant développement et montre des résultats plutôt encourageants pour l'avenir, en termes de prédiction des paramètres de solubilité.

## I.4. Les cartes de solubilité

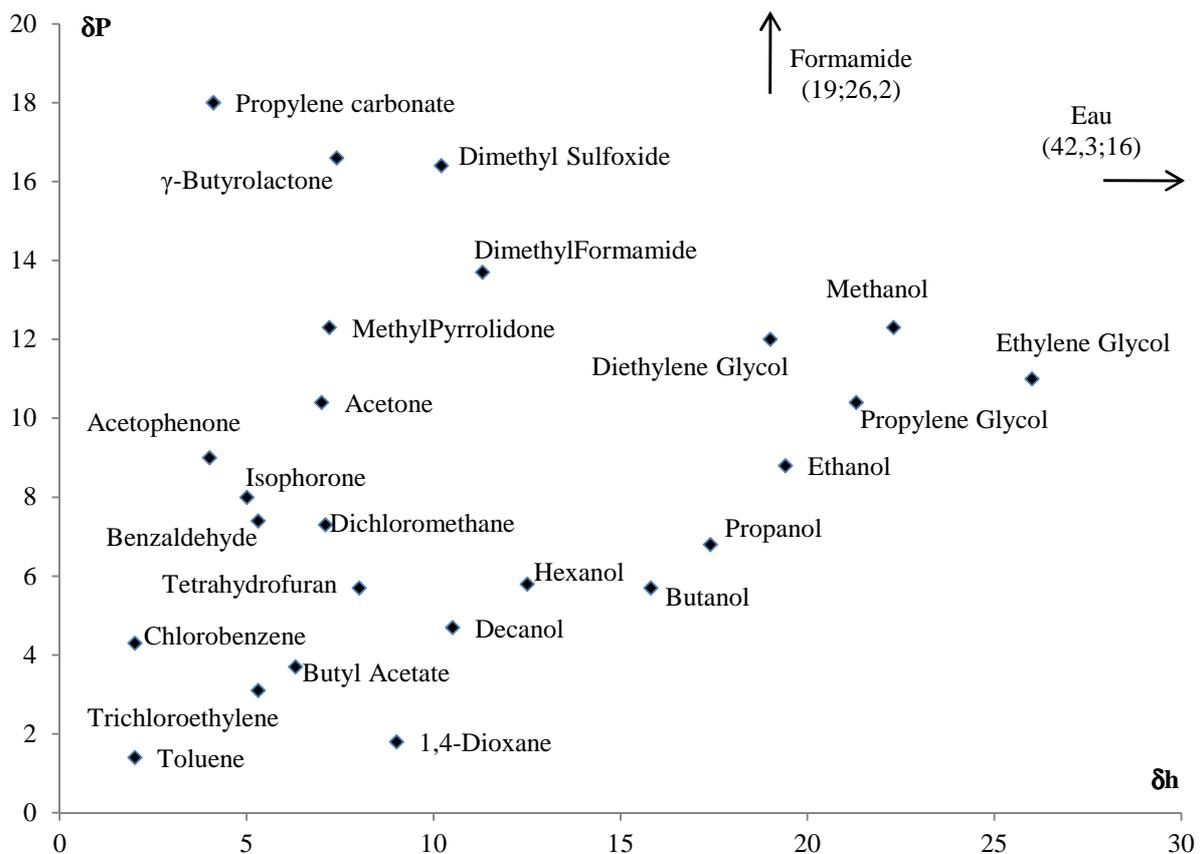
Les méthodes de contribution de groupes sont simples à utiliser lorsque la structure moléculaire d'une substance est clairement identifiée. Cependant, pour un composé dont on ignore la composition exacte (huile, salissure...), ces méthodes ne sont pas applicables. Il convient alors d'utiliser une procédure de détermination expérimentale. Celle-ci s'appuie sur la représentation tridimensionnelle des paramètres de Hansen.

Elle consiste dans un premier temps à choisir une quarantaine de solvants dont les paramètres de solubilité sont connus et bien répartis dans l'espace (**Hansen, 2007**). Une fois la sélection faite, on réalise des tests de solubilité du composé étudié dans les différents solvants, à température et concentration données et on observe visuellement si l'échantillon est soluble ou non. Une fois ces données recueillies, on tente ensuite de tracer une sphère de solubilité qui inclut le maximum de solvants et exclut le maximum de non-solvants. Les coordonnées du centre de la sphère correspondent alors aux paramètres de solubilité du composé étudié.

Des trois paramètres de solubilité, le paramètre  $\delta_d$  est celui qui présente le moins de variations. C'est pourquoi, généralement, pour localiser les composés, on préfère utiliser une représentation bidimensionnelle  $\delta_p$  vs  $\delta_h$ , plus facile à visualiser qu'un espace à trois dimensions. La figure V.2 fait ainsi état de la répartition sur un tel diagramme de quelques solvants de référence, ayant des paramètres de solubilité connus (**Hansen, 2007**). L'espace  $\delta_p$  vs  $\delta_h$  ainsi obtenu constitue la « carte des paramètres de solubilité » ou encore « carte de solubilité ».

A partir de celle-ci, il est alors possible de représenter visuellement l'affinité chimique d'une substance donnée pour plusieurs solvants de polarités diverses. Pour cela, une démarche expérimentale doit être mise en œuvre. Elle consiste, par exemple, dans un premier temps, à réaliser des tests de miscibilité entre le composé étudié et les différents solvants. La miscibilité entre les solvants et l'échantillon est visuellement observée en mélangeant dans des tubes en verre 50 % en volume de chacun des constituants par une agitation de type vortex.

Une fois l'analyse effectuée, l'ensemble des résultats est alors reporté sur le diagramme  $\delta_p$  vs  $\delta_h$ , en repérant visuellement d'une part les solvants miscibles avec le composé et d'autre part les solvants partiellement miscibles ou non miscibles avec le composé. On obtient ainsi la « carte de miscibilité » du composé étudié.



**Figure V.2.** Représentation de quelques solvants de référence dans l'espace bidimensionnel  $\delta_p$  vs  $\delta_h$  (Hansen, 2007).

La construction des cartes de miscibilité peut s'appliquer à toute sorte de produits : polymères, huiles, matières actives ou encore agro-solvants.

Les paramètres de solubilité constituent un outil simple et rapide pour sélectionner des solvants dans le cadre de procédures de substitution de solvants toxiques. Ils permettent d'obtenir des informations importantes sur l'affinité des composés chimiques en un minimum de temps.

Toutefois, il est important de souligner que cette méthode est un guide qualitatif et semi-empirique pour la formulation. C'est-à-dire qu'elle ne permettra d'approcher que de manière prédictive l'affinité potentielle d'un solvant pour une substance.

Néanmoins, l'approche reste efficace pour prévoir rapidement les incompatibilités et permet bien souvent de limiter le nombre d'essais à réaliser.

### I.5. Les sphères de solubilité

Le principe de la théorie de Hansen reste le même que celui des mélanges de Hildebrand : plus les paramètres de solubilité sont proches et plus les composés sont solubles.

En représentant les trois paramètres dans le repère  $(O, \delta_D, \delta_P, \delta_H)$  d'Hansen on obtient une ellipsoïde dite « sphère de solubilité de Hansen ». Le rayon de celle-ci  $R$  représente la limite de solubilité du composé dont les coordonnées sont bien sûr celles du centre de la sphère.

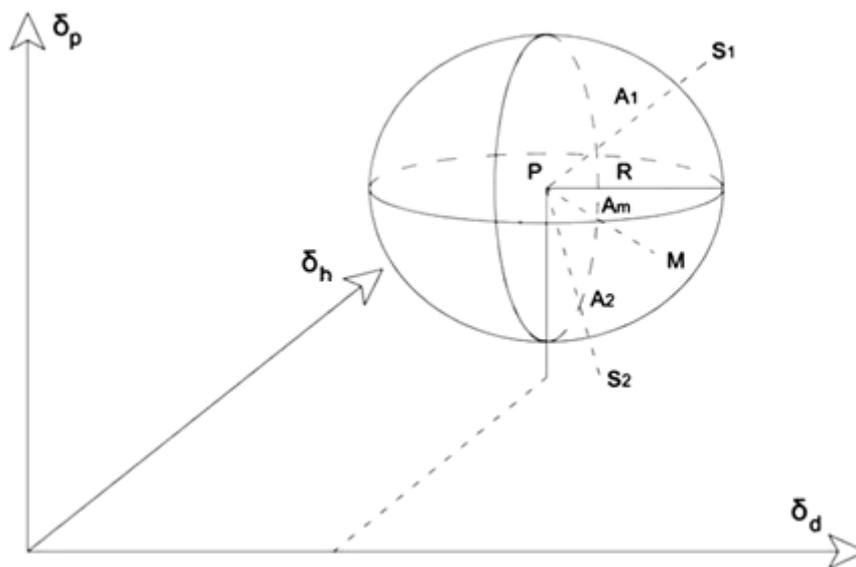


Figure V.3 : Représentation de la sphère de solubilité de Hansen pour un polymère P

Le principe de la sphère de solubilité de Hansen est simple. Tous les solvants dont les coordonnées seront situées à l'intérieur de la sphère seront de bons solvants et tous les solvants qui seront situés à l'extérieur de la sphère seront considérés comme étant des non solvants ou des mauvais solvants. Cependant, les scientifiques ont montré qu'un mélange de solvants pouvait s'avérer plus efficace que chacun des solvants pris séparément (**Perron, 2002**). Dans un cas extrême, un mélange de faibles ou de non solvants peut même être un excellent solvant.

Cette situation est illustrée sur la figure V.3 pour les solvants  $S_1$  et  $S_2$ . Individuellement, ils sont des non solvants pour P, cependant leur mélange M est un solvant pour P.

## II. DETERMINATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIQUES DES COMPOSES ETUDIES

La détermination des propriétés physico-chimique a été réalisée à l'aide de deux logiciels, ACD Labs 7.0 Boiling Point Calculator et ACD Labs 9.0 Solubility dB (ou connu aussi sous le nom de ACD/ChemSketch) qui permettent de construire et de dessiner les structures de toutes les formules chimiques possibles. L'interface de ChemSketch permet de présenter des compositions chimiques claires. Ainsi, ChemSketch calcule aussi des propriétés macroscopiques : formule, masse molaire, composition massique, solubilité dans l'eau, température d'ébullition,...

Les résultats obtenus par ces deux logiciels sont regroupés dans le tableau V.1.

Nous pouvons remarquer que les monoterpènes sont très peu solubles dans l'eau en comparaison aux solvants pétrochimiques et plus précisément l' $\alpha$ -pinène par rapport au toluène et à l'hexane. Ce qui peut faciliter la séparation de phases.

D'autre part, les monoterpènes oxygénés présentent une bonne solubilité dans l'eau contrairement aux acides gras dont les valeurs de solubilité dans l'eau sont très faibles.

Tableau  
V.1

Paramètres physico-chimiques (Adams, 1995 ;ACD Labs 2005)

Groupes	Nom du Composé	Formule Brute	Adams		ACD			
			Volume molaire (g/mol)	Solubilité H <sub>2</sub> O (mg/mL)	T° éb (°C)	ΔHvap (kJ/mol)	P°v 100°C (mmHg)	P°v 25°C (mmHg)
<b>Monoterpènes</b>	Camphène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	153,07	0,00808	158,6	37,9	124,045	3,38
	Para-cymène	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	155,78	0,0132	173,9	39,34	74,848	1,655
	Limonène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	163,26	0,00421	175,44	39,49	71,173	1,541
	α-pinène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	154,9	0,00793	157,883	37,83	126,88	3,489
	Terpinolène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	159,62	0,00261	182,028	40,11	57,043	1,126
<b>Monoterpènes oxygénés</b>	α-terpinéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	164,98	2,52	217,499	52,78	6,812	0,028
	Bornéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	155,36	4,32	211,999	52,14	8,657	0,04
	Eugénol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	156,28	2,52	254,999	51,24	2,582	0,01
	Linalool	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	176,67	0,67	198,499	50,58	15,462	0,091
	Thymol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	154,21	0,85	232,999	48,88	6,31	0,038
<b>Sesquiterpènes</b>	α-humulène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	249,41	9,11E-07	276,346	49,41	1,823	0,008
	(E)-caryophyllène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	228,45	3,19E-06	268,359	48,6	2,492	0,013
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>	α-bisabolol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	240,93	0,00912	314,477	64,42	0,071	< 0,001
	T-cadinol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	237,22	0,0277	303,393	63,06	0,124	< 0,001
	Béta-carotène	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	570,13	5,53 E-10	654,7	92,93	nd	nd
	Eau	H <sub>2</sub> O	18,05	1000	100	38,15	759,974	24,476

<b>Solvants pétrochimiques</b>	Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	59,06	183,87	72,62	36,61	2031,201	82,819
	Hexane	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	127,58	0,0104	68,536	29,74	1872,138	150,927
	Méthanol	CH <sub>4</sub> O	42,55	240,53	48,093	34,02	4733,362	265,414
	Toluène	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	105,71	0,36	110,602	33,48	554,668	27,712
	Para-xylène	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	121,98	0,13	139,61	36,13	227,527	7,943
<b>Acides gras</b>	Palmitique C16:0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	287,74	8,19 E-3	340,6	61,66	0,051	nd
	Margarique C17:0	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	303,78	4,89 E-3	298,5	59,23	0,252	nd
	Stéarique C18:0	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	320,28	3 E-3	359,4	63,84	0,02	nd
	Eicosanoïque C20:0	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	353,3	1,1 E-3	376,4	65,83	0,009	nd
	Béhénique C22:0	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	386,31	3,7 E-4	391,8	67,66	0,004	nd
	Palmitoléique C16:1	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	280,88	1,39 E-2	363,6	66,96	0,01	nd
	Oléique C18:1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	313,9	4,81 E-3	360	66,53	0,012	nd
	Gadoléique C20:1	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	346,91	1,82 E-3	426,3	74,7	nd	nd
	Linoléique C18:2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	307,51	7,83 E-3	360,6	66,6	0,012	nd
	Linoléinique C18:3	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	301,13	1,45 E-2	443,4	76,85	nd	nd
<b>Cétone</b>	Acétone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	75,18	102,97	46,5	27,83	3424,515	348,445
<b>Esters</b>	Acétate de méthyle	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	81,54	86,39	44	28,81	3956,821	368,35
	Acétate d'éthyle	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	98,04	40,23	73,9	31,52	1670,524	34,218
	Acétate de n-propyle	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	114,55	18,49	101,4	34,06	728,422	35,223
	Acétate de n-butyle	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	131,06	8,44	126,6	36,44	327,893	11,545

**nd** : non défini

### III. DETERMINATION DES PARAMETRES DE SOLUBILITE DE HANSEN DES COMPOSES ETUDIES

La détermination des paramètres de solubilité d'un composé est très intéressante ; ces derniers peuvent faciliter la recherche du solvant adéquat, par le simple fait de connaître ses paramètres de solubilité.

Dans un premier temps, les paramètres de solubilité vont être déterminés par trois méthodes de calcul. Par la suite leur affinité chimique sera déterminée par l'analyse de cartes de miscibilités.

#### III.1. Calcul des paramètres de solubilité

Afin de déterminer la solubilité de nouvelles molécules sans avoir à le faire expérimentalement, plusieurs méthodes de calculs peuvent être utilisées. Les méthodes utilisées dans notre étude sont celles de Van Krevlen, Stefanis Panayiotou et la plus récente, celle de Yamamoto. Ces méthodes utilisent différents algorithmes basés sur la décomposition des molécules en groupe de contributions.

En nous basant sur les structures moléculaires des molécules étudiées, nous avons pu calculer les trois paramètres de solubilités  $\delta_d$ ,  $\delta_p$  et  $\delta_h$ . Ces trois méthodes sont disponibles dans le logiciel « Hansen Solubility Parameters in Practice » (**HSPiP, 2010**). Les résultats obtenus ne sont pas toujours identiques ; nous pouvons trouver dans la littérature qu'un groupe soit utilisé dans une méthode de contribution et qu'il ne le soit pas dans une autre. C'est ce que nous pourrions observer dans la suite de notre étude.

Afin de calculer les paramètres de solubilités, la décomposition de la molécule étudiée en groupes fonctionnels prime. A titre d'exemple, la figure V.4 illustre la décomposition de l'acide stéarique.

Van Krevlen	Stefanis Panayiotou	Yamamoto
1 CH <sub>3</sub>	1 CH <sub>3</sub> -	1 CH <sub>2</sub>
16 CH <sub>2</sub>	16 -CH <sub>2</sub> -	1 Bu
1 COOH	1 COOH-	1 COOH
		3 CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>

**Figure V.4 :** Groupements fonctionnels identifiés dans la molécule de l'acide Stéarique C18:0 par les trois méthodes de contribution de groupes

Les paramètres de solubilité calculés par le logiciel HSPiP sont présentés dans le tableau V.2.

**Tableau  
V.2**

Paramètres de solubilité de HANSEN déterminés par les trois méthodes :  
Van Krevlen, Stefanis Panayiotou et Yamamoto (**HSPiP, 2010**)

Paramètres de solubilité de HANSEN

Groupes	Nom du Composé	Base de données de HANSEN			Méthode de Van Krevlen			Méthode de Stefanis Panayiotou			Méthode de Yamamoto		
		$\delta d$	$\delta p$	$\delta h$	$\delta d$	$\delta p$	$\delta h$	$\delta d$	$\delta p$	$\delta h$	$\delta d$	$\delta p$	$\delta h$
<b>Monoterpènes</b>	Camphène	16,4	1,8	3,1	16,5	0	0	17,3	5,7	3,9	16,9	1,6	1,8
	Para-cymène	-	-	-	16,8	0,7	0	16,1	1,4	3,6	18,5	2,6	1,9
	Limonène	17,2	1,8	4,3	16,3	0	0	15,9	2	2,4	16,7	2,2	4,9
	$\alpha$ -pinène	16,9	1,8	3,1	16,4	0	0	16,9	1,9	2	17	1,3	2
	Terpinolène	-	-	-	16,3	0,7	0	15,1	1,6	0,6	16,7	2,2	4,9
<b>Monoterpènes oxygénés</b>	$\alpha$ -terpineol	-	-	-	16,7	3	11	16,4	4,3	9,7	17	3,8	10
	Bornéol	-	-	-	17,3	3,2	11,3	16,5	6	11,2	17	5,3	9,7
	Eugénol	19	7,5	13	19,1	3,3	11,3	18,2	7,7	13,6	18,5	6,4	12,4
	Linalool	-	-	-	15,9	2,8	10,6	13,6	0	9,2	16,2	3,7	10,8
	Thymol	19	4,5	10,8	19,1	3,3	11,3	16,4	3	11	18	4,6	9,6
<b>Sesquiterpènes</b>	$\alpha$ -Humulène	-	-	-	15,3	0	0	15,8	-0,9	-0,4	16,7	1,6	3,2
	(E)-caryophyllène	-	-	-	15,4	0	0	16,9	2,3	0,7	16,9	1,4	2,2
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>	$\alpha$ -bisabolol	-	-	-	15,3	2,1	9,1	16	1	6,5	16,5	3,3	4,9
	T-cadinol	-	-	-	13,9	2,1	9,2	17,3	4,5	8,4	17,5	2,4	8,1
<b>Solvants pétrochimiques</b>	Ethanol	15,8	8,8	19,4	15,2	8,5	18,4	15,9	6,7	13,9	15,4	9,2	19,6
	Hexane	14,9	0	0	15	0	0	15,2	3,1	4,7	15,2	0,8	2
	Méthanol	14,7	12,3	22,3	14,8	11,8	21,7	15,8	7	14,3	15,3	10,9	26,2
	Toluène	18	1,4	2	17,5	1	0	18,2	4,1	4,8	18,6	1,5	2,1
	Para-xylène	17,8	1	3,1	17,3	0,9	0	18,2	4,1	4	18,6	3,8	1,6

<b>Acides gras</b>	Palmitique C16:0	-	-	-	16,4	1,5	5,9	15,8	2,3	5,4	16,4	2,8	5,8
	Margarique C17:0	-	-	-	16,5	1,4	5,7	15,9	2	5	16,5	2,6	5,4
	Stéarique C18:0	16,3	3,3	5,5	16,5	1,3	5,6	15,9	1,7	4,6	16,5	2,5	5,3
	Eicosanoïque C20:0	-	-	-	16,4	1,2	5,3	15,9	1	3,8	16,5	2,5	5,3
	Béhénique C22:0	-	-	-	16,4	1,1	5,1	15,9	0,4	3	16,6	2,2	5
	Palmitoléique C16:1	-	-	-	16,3	1,5	6	16,3	1,9	5,9	16,3	2,9	5,5
	Oléique C18:1	16	2,8	6,2	16,3	1,3	5,6	16,3	1,3	5,1	16,3	3,1	5,3
	Gadoléique C20:1	-	-	-	16,3	1,2	5,4	16,3	0,7	4,3	16,3	2,9	5,5
	Linoléique C18:2	-	-	-	16,2	1,4	5,7	16,7	0,9	5,6	16,2	3	5,1
Linoléénique C18:3	-	-	-	16,1	1,4	5,8	17,2	0,5	6,2	16,3	3,5	5,5	
<b>Esters</b>	Acétate de méthyle	15,6	6,1	8,1	15,1	6	9,3	15,7	5,4	8,7	15,6	6,1	8,1
	Acétate d'éthyle	15,8	5,3	7,2	15,3	5	8,4	15,7	5	8,3	15,6	6	7,2
	Acétate de n-propyle	15,3	4,3	7,6	15,5	4,3	7,8	15,7	4,7	7,9	15,7	4,8	6,6
	Acétate de n-butyle	15,8	3,7	6,3	15,6	3,7	7,3	15,7	4,4	7,5	15,8	5,1	6,5
<b>Cétone</b>	Acétone	15,5	10,4	7	15	10,2	5,2	15,8	8,5	6,2	15,8	10,1	5
	β-carotène	-	-	-	16,5	0	0	-	-	-	19,6	2,5	3,9
	Eau	15,5	16	42,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Après observation du tableau V.2, nous pouvons remarquer que les trois méthodes de contributions de groupes ne donnent pas des résultats similaires pour chacune des molécules étudiées. Néanmoins, les résultats obtenus par la méthode de Yamamoto se rapproche le plus des paramètres de la base de donnée de Hansen.

Ces paramètres permettent de faire des prévisions sur le pouvoir solvant d'une molécule sur une autre si leurs paramètres de solubilité sont rapprochés. Afin de comparer plus aisément les valeurs obtenues par les trois algorithmes, des diagrammes représentant  $\delta_p$  en fonction de  $\delta_h$  ont été analysés.

### III.2. Analyse des diagrammes de solubilité

Les diagrammes  $\delta_p$  en fonction de  $\delta_h$  ont été élaborés à partir des valeurs des paramètres de solubilité déterminée empiriquement par **Hansen (2007)** ou par l'une des méthodes de contribution de groupes résumées dans le tableau V.2. Ces diagrammes ont été utilisés afin de localiser les agrosolvants capables de solubiliser les acides gras et le  $\beta$ -carotène dont l'extraction a été étudiée dans le chapitre IV.

Pour chaque méthode de contribution de groupes, une carte de solubilité différente a été tracée (figures V.5 à V.7). Quelques différences ont été notées suite à la répartition des acides gras sur ces trois diagrammes, notamment au niveau du paramètre  $\delta_p$  qui présente ici le plus de variations entre les trois méthodes de contribution de groupes utilisées. Cependant, nous pouvons remarquer que pour les trois diagrammes, le groupe des acides gras ainsi que celui des monoterpènes se localisent dans la même région.

Selon la méthode de Van Krevelen (figure V.5), les acides gras sont localisés dans une zone assez étroite comprise entre 1 et 3  $\text{Mpa}^{1/2}$  pour la force d'attraction  $\delta_p$  et entre 5 et 6  $\text{Mpa}^{1/2}$  pour la force de liaison hydrogène  $\delta_h$ . Les acides gras sont proches du  $\alpha$ -pinène et du camphène et très proche du limonène, ce qui devrait en faire un meilleur solvant que le para-xylène, le toluène et l'hexane qui sont plus loin.

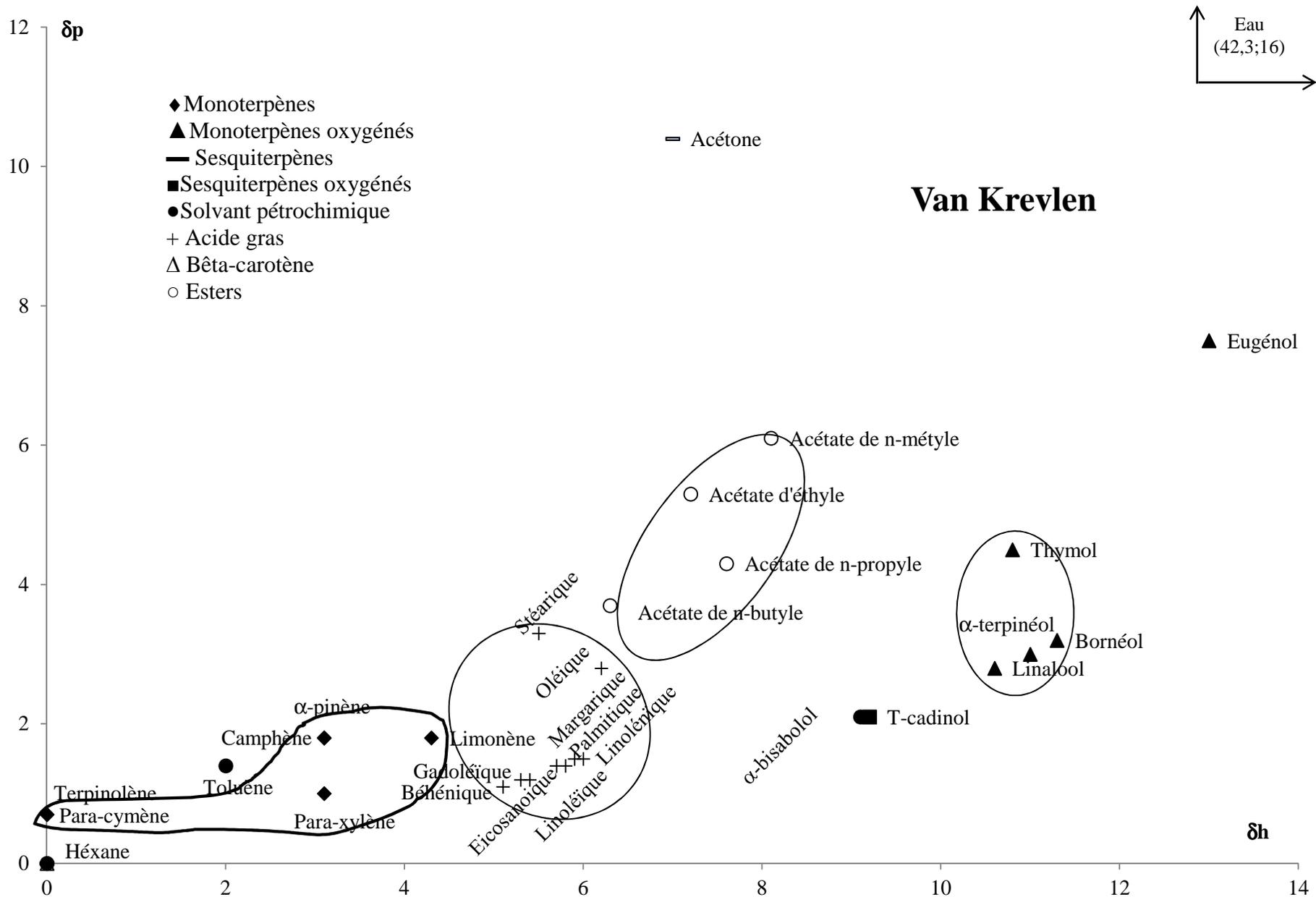
Selon la méthode de Stefanis Panayiotou (figure V.6) les acides gras se répartissent de manière plus dispersée sur le diagramme et couvrent une zone plus importante comprise entre 0 et 3  $\text{Mpa}^{1/2}$  pour la force d'attraction  $\delta_p$  et entre 3 et 7  $\text{Mpa}^{1/2}$  pour la force de liaison hydrogène  $\delta_h$ . Ils sont situés à proximité des monoterpènes, plus particulièrement le limonène et le paracyène. L'hexane est assez éloigné.

Enfin, selon la méthode de Yamamoto (figure V.7), les acides gras sont localisés dans une zone très compacte formant une ellipse comprise entre 2 et 3  $\text{Mpa}^{1/2}$  pour la force  $\delta_p$  et entre 5 et 6  $\text{Mpa}^{1/2}$  pour la force  $\delta_h$ .

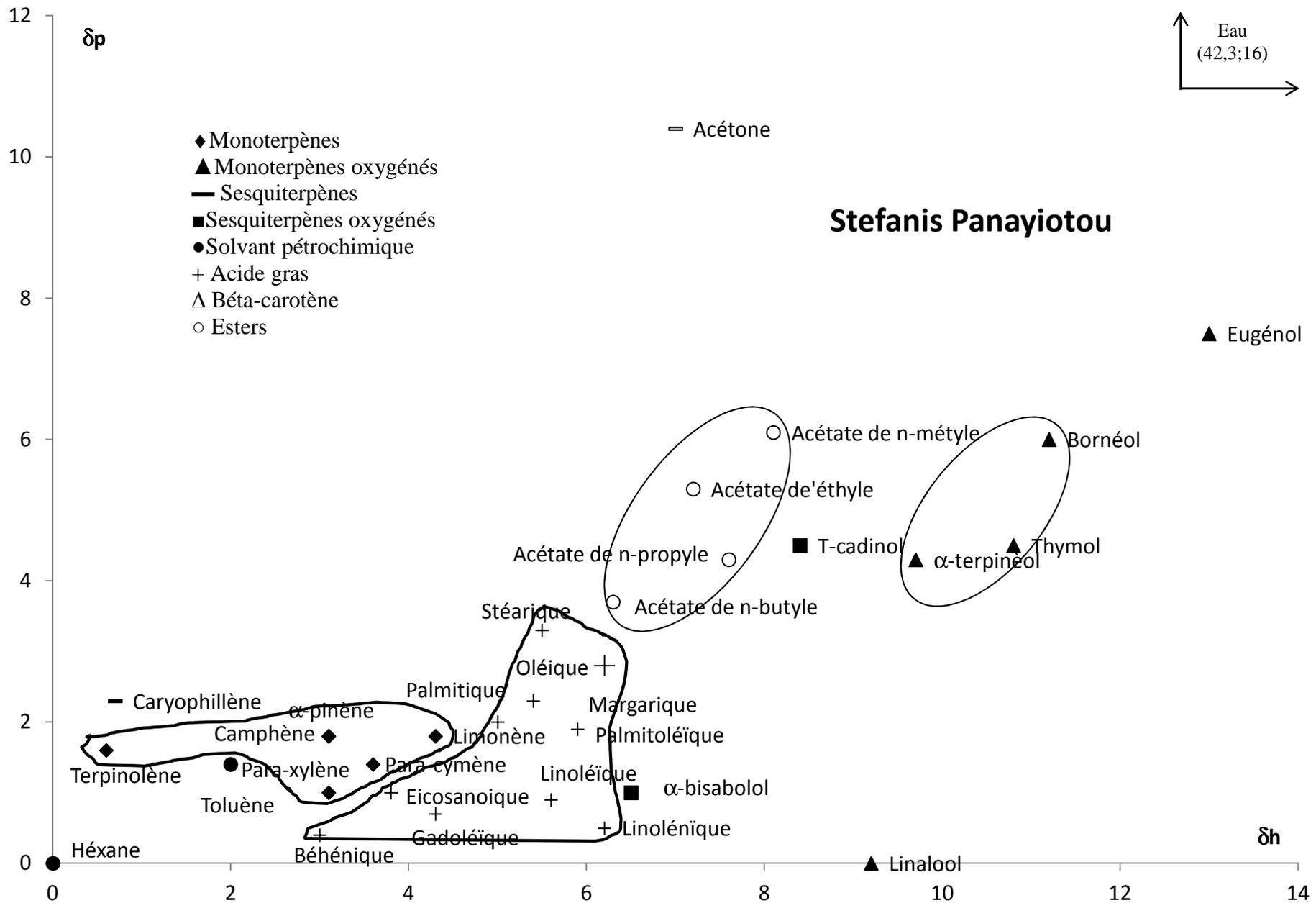
Le  $\beta$ -carotène se situe à proximité des acides gras et du groupe des monoterpènes et plus précisément du  $\alpha$ -pinène et du limonène.

A travers les diagrammes, nous pouvons constater que les monoterpènes et particulièrement le limonène, peuvent être utilisés comme alternative pour remplacer l'hexane, situé dans une zone plus éloignée, pour l'extraction des acides gras et du  $\beta$ -carotène.

Nous pouvons aussi remarquer que les monoterpènes oxygénés ainsi que les esters se regroupent dans deux zones pas très éloignées l'une de l'autre ; ces composés seraient facilement extraits par ces solvants.



**Figure V.5 :** Représentation des paramètres de solubilité de Hansen par la méthode de Van Krevlen dans l'espace bidimensionnel  $\delta_p$  vs  $\delta_h$



**Figure V.6 :** Représentation des paramètres de solubilité de Hansen par la méthode de Stefanis Panayiotou dans l'espace bidimensionnel  $\delta_p$  vs  $\delta_h$

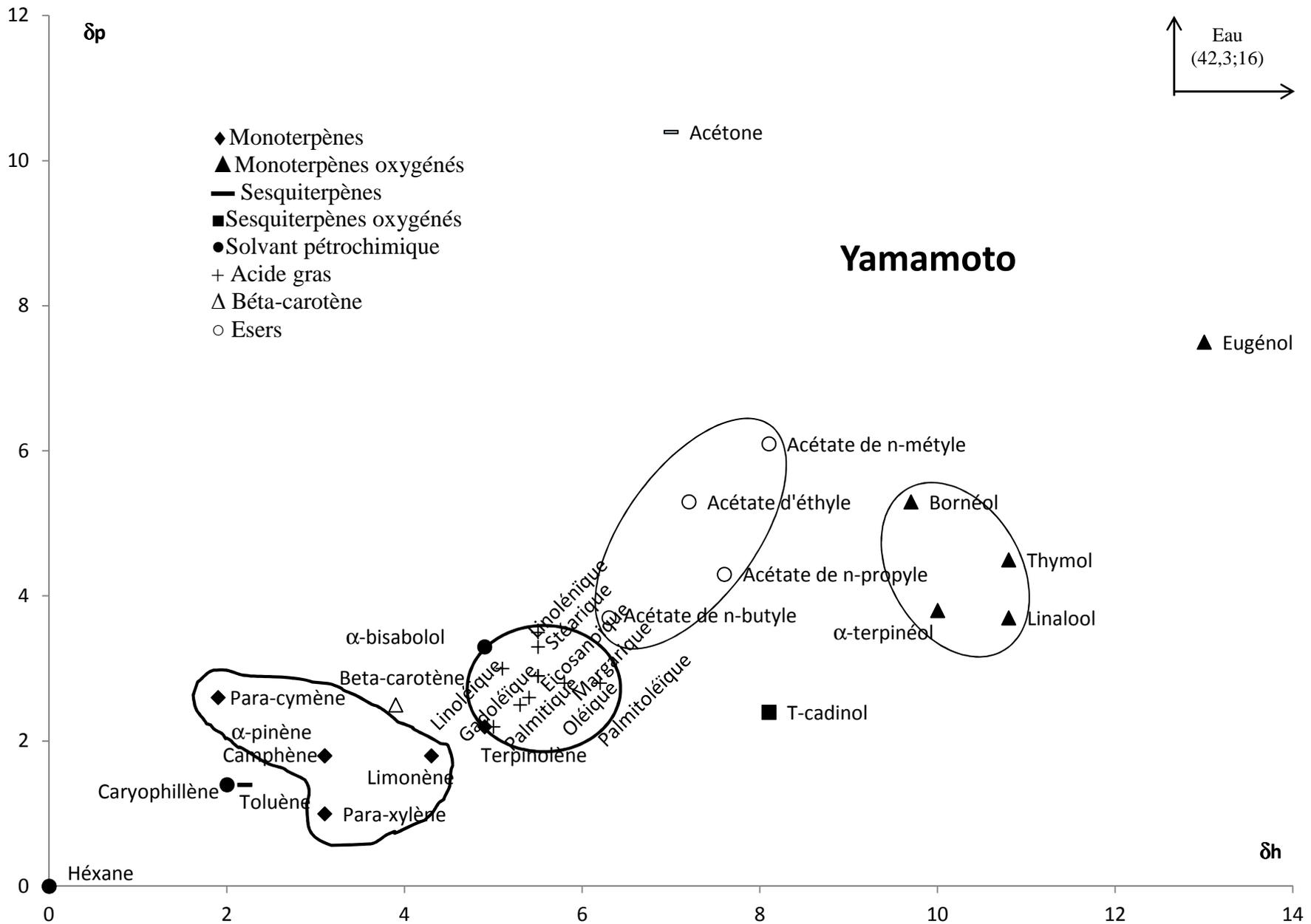
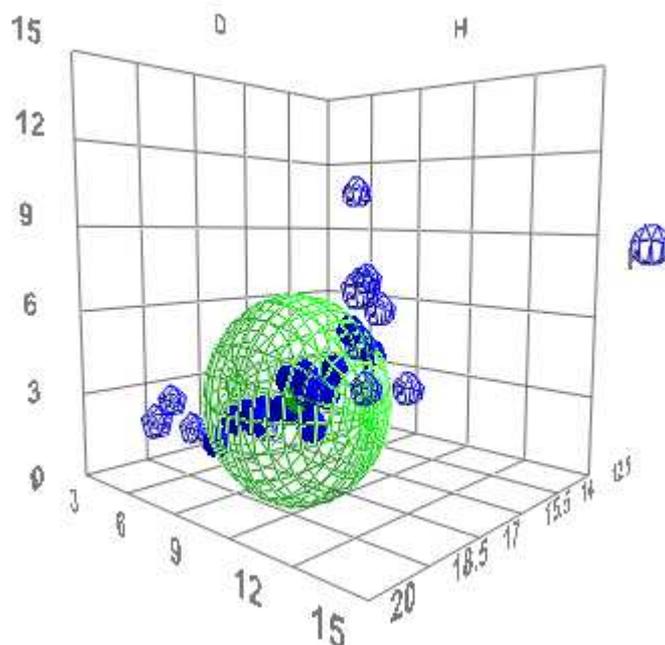


Figure V.7 : Représentation des paramètres de solubilité de Hansen par la méthode de Yamamoto dans l'espace bidimensionnel  $\delta_p$  vs  $\delta_h$

### III.3. Sphère de solubilité

Afin de déterminer le centre de la sphère et le rayon de l'étendu du pouvoir solvant des molécules étudiées sur les acide gras, nous les avons représenté dans un espace à trois dimension  $\delta_p$ ,  $\delta_h$  et  $\delta_d$ , à l'aide du logiciel HSPiP. (Figure V.8)



**Figure V.8 :** Sphère des paramètres de solubilité de Hansen des acides gras par la méthode de Yamamoto dans l'espace tridimensionnel  $\delta_p$  vs  $\delta_h$  vs  $\delta_d$

Les coordonnées du centre de la sphère pour les acides gras sont :

$$\begin{aligned}\delta_p &= 4.69 \text{ Mpa}^{1/2} \\ \delta_h &= 10.32 \text{ Mpa}^{1/2} \\ \delta_d &= 16.96 \text{ Mpa}^{1/2} \\ R &= 9.4\end{aligned}$$

D'après la sphère de solubilité de Hansen par la méthode de Yamamoto, les monoterpènes tels que l' $\alpha$ -pinène, le limonène, le camphène, le cymène et le Terpinolène sont à l'intérieur de la sphère ce qui fait d'eux de bons solvants pour les acides gras.

## CONCLUSION

La comparaison des trois méthodes montre que la méthode de Yamamoto donne des résultats plus intéressants vu que les zones sont plus compactes pour les différents groupes étudiés.

Le calcul des paramètres de Hansen est une bonne approche pour la détermination de la solubilité d'un composé par rapport à un solvant. Les résultats obtenus montrent que l' $\alpha$ -pinène est un solvant adéquat pour l'extraction des acides gras et du  $\beta$ -carotène, ce qui confirme les résultats expérimentaux du chapitre IV.

***Conclusion***  
.....  
***Générale***  
.....

## Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était de valoriser les déchets de l'industrie du bois et l'application du pinène comme solvant vert.

Dans ce but, nous avons en premier lieu étudié l'extraction de l'huile essentielle de pin d'Alep par quatre procédés, deux conventionnels relativement anciens : l'entraînement à la vapeur d'eau **EV** et l'hydrodistillation **HD**; et deux autres beaucoup plus récents : l'entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes **EVMO** et l'hydrodistillation assistée par micro-ondes **HDMO**. L'étude a montré que les rendements obtenus par les procédés conventionnels sont comparables (0,61% pour l'**EV** et 0,57 % pour l'**HD**) et supérieurs à ceux des procédés assistés par micro-ondes (0,44% pour l'**EVMO** et 0,16 % pour l'**HDMO**). Cependant, ces deux derniers procédés n'ont pu être optimisés en raison des limites de notre installation. Néanmoins, un gain de temps de plus de 77 % pour l'**EVMO** et 50 % pour l'**HDMO** a été noté en comparaison aux procédés conventionnels.

L'identification par Chromatographie en phase Gazeuse a permis de déterminer la composition chimique des huiles essentielles, en identifiant 40 constituants. L'examen de ces huiles essentielles montre qu'elles sont comparables qualitativement, néanmoins des différences sont observées dans leurs teneurs. Le constituant majoritaire est le  $\beta$ -Caryophyllène.

Les deux huiles sont caractérisées par des teneurs en monoterpènes avoisinant 10% pour l'**EV** et 8% pour l'**EVMO** et de très faibles teneurs en monoterpènes oxygénés. Le pourcentage en sesquiterpène est très élevé avec un total de 65,95% pour l'entraînement à la vapeur d'eau et 60,17% pour l'entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-onde. Les huiles extraites par les deux procédés présentent de faibles teneurs en sesquiterpènes oxygénés.

L'étude de l'activité antioxydante a révélé une activité moyenne de l'huile essentielle des aiguilles de pin (*Pinus halepensis*), 32% pour **EVMO** et 22% pour **EV**.

Quant à l'activité antibactérienne, les huiles essentielles extraites par l'entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes (**EVMO**), ont montré une activité inhibitrice inférieure à celle trouvée pour l'huile extraite par le procédé classique (**EV**). Il semblerait que les micro-ondes agissent sur les composés bioactifs de l'huile essentielle puisque la sensibilité des souches est plus accentuée dans le cas de l'extraction par simple entraînement à la vapeur.

Les travaux effectués confirment que les activités antioxydante et antibactérienne dépendent directement de la technique d'extraction utilisée.

La valorisation par une extraction par solvant des résidus des aiguilles de pin récupérés après extraction de l'huile essentielle, a montré que la teneur totale en composés phénoliques des extraits éthanoliques des résidus est intéressante, particulièrement pour le résidu entier d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau assisté par micro-ondes, où le rendement est de l'ordre de 0,08 mg d'acide gallique/mg de concrète.

L' $\alpha$ -pinène composé de l'huile essentielle de pin d'Alep a été utilisé pour la première fois comme biosolvant pour remplacer les solvants pétrochimiques dans trois études : le n-hexane pour la détermination des matières grasses dans les graines oléagineuses et l'extraction du  $\beta$ -carotène, et le toluène pour la détermination du taux d'humidité de produits alimentaires.

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents extraits permettant de conclure que le solvant proposé, l' $\alpha$ -pinène, est efficace et valable pour la récupération des huiles et matières grasses dans les graines oléagineuses et peut être une alternative certaine au n-hexane. Même si sa température d'ébullition est supérieure à celle du n-hexane (surplus d'énergie nécessaire pour son chauffage), le fait que le taux de recyclage du  $\alpha$ -pinène est quasi-total (90% contre 50%) le rend plus intéressant, plus fiable et plus sûr pour l'environnement.

Dans cette étude, nous avons également utilisé, pour la première fois, l' $\alpha$ -pinène comme solvant pour la détermination du taux d'humidité de produits alimentaires en utilisant la procédure de Dean-Stark. Les résultats obtenus par cette nouvelle méthode sont comparables en termes de teneur en eau avec ceux obtenus par la procédure conventionnelle en utilisant le toluène comme solvant de distillation. La méthode au pinène permet des économies consistantes en terme de temps d'extraction (30 min vs 105 min) et par conséquent en consommation d'énergie.

L'étude menée sur l'effet de la température et du rapport (solide/solvant) sur le rendement en  $\beta$ -carotène a permis de conclure que l' $\alpha$ -pinène peut être une alternative intéressante pour l'extraction du bêta-carotène. Un modèle mathématique a été proposé avec un coefficient de corrélation supérieur à 94%, ce qui permet de conclure que le modèle proposé présente un bon ajustement dans le domaine expérimental étudié. Les résultats ont montré que seule la température a un effet significatif sur le rendement en  $\beta$ -carotène.

Avec l'évolution des procédés et la diminution du temps d'extraction, les biosolvants permettront de quantifier les gains environnementaux et sanitaires, et ceci à l'échelle laboratoire ou à l'échelle industrielle.

Le dernier chapitre est ensuite venu compléter les travaux menés dans le domaine de la solubilité par la détermination des paramètres de solubilité de Hansen, et conforter les résultats expérimentaux obtenus quant à l'utilisation du  $\alpha$ -pinène pour remplacer l'hexane et le toluène.

Trois méthodes ont été utilisées : la méthode de Van Krevelen, la méthode de Stéfani Panayiotou et la méthode de Yamamoto. La comparaison de ces trois méthodes montre que la méthode de Yamamoto donne des résultats plus intéressants et plus proches des paramètres de la base de données de Hansen. Cependant, pour valider l'une ou l'autre des 3 méthodes de calcul et donc être en mesure d'attribuer aux agro-solvants proposés des valeurs de paramètres de solubilité, une étude complémentaire sur des tests de miscibilités serait nécessaire afin de se rapprocher le plus possible de la réalité expérimentale pour pouvoir délimiter des zones de miscibilité.

Le travail expérimental effectué dans cette thèse montre que le calcul des paramètres de Hansen peut être une bonne approche pour la sélection d'un nouveau solvant pour une molécule donnée, tel que cela a été démontré par les résultats obtenus pour l'extraction des acides gras et du  $\beta$ -carotène, qui font du  $\alpha$ -pinène un solvant approprié pour ces extractions et qui ouvre la possibilité d'une utilisation du camphène, et d'autres monoterpènes pour ces extractions.

Loin d'avoir apporté toutes les réponses aux questions soulevées tout au long de la réalisation de cette thèse, ce travail mériterait d'être poursuivi notamment en investiguant les axes suivants :

- L'optimisation des procédés d'extractions assistés par micro-ondes pour la récupération de l'huile essentielle de pin.
- Elargissement du domaine expérimental pour l'extraction du  $\beta$ -carotène.
- Développement de l'utilisation des biosolvants en se basant sur les données théoriques apportées par le calcul des paramètres des solubilités.

# ***Bibliographie***

## *Bibliographie*



Abi-Ayada, M. Abi-Ayada, F. Z. Lazzounia, H.A, Rebiahib, S.A. (2011). Antibacterial activity of *Pinus halepensis* essential oil from Algeria (Tlemcen), *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 1 (1), 33-36.

ACD Labs Release: 9.04 (2005). Advanced Chemistry Development, Inc (www.acdlabs.com)

Adams, R.P. (1995). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy, Allured Publ., Carol Stream, IL.

AFNOR. Association française de normalisation, recueil de normes françaises “huiles essentielles”, (1986). Paris. AFNOR NFT, 75-06.

AFNOR. Association française de normalisation. (2000). Monographie relative aux huiles essentielles, Paris.

ALCIMED. (Avr. 2002) Analyse des marchés potentiels des agro-solvants. Rapport d'étude.

ALCIMED. (Avr. 2007) Marché actuel des bioproduits industriels et des biocarburants & Évolutions prévisible à échéance 2015/2030. Étude réalisée pour l'ADEME.

Anastas, P., Warner, J. (1988). “Green Chemistry: Theory and Practice”, Oxford University Press.

Anizon J-Y., Lemaire, B., Surbled, M. (2003). Technique De L'ingénieur Référence F3060 | Date De Publication : 10 Mars 2003.

Annales de l'école nationale des eaux et forêts et de la station de recherches et expériences (1962).tome, Nancy, France.

AOCS Official Method Ce 2-66. (1989). Sampling and analysis of commercial fats and oils, Preparation of Methyl esters of long-chain fatty acids, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.

AOCS Official Method Ja 2a-46, (1993). Moisture. American Oil Chemist' Society. Champaign, IL.

Arctander, S. (1994). Perfume and Flavor Chemicals, Allured Publ., Carol Stream, IL.



- Barnola, L., Cedenoi, A., Hasegawa, M. (1997). Intraindividual variations of volatile terpene contents in *Pinus caribaea* needles and its possible relationship to *atta laevigata* herbivory. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 8, 707-716.
- Barton A.F.M. (1991). Handbook of Solubility Parameters and other Cohesion Parameters, Second edition; Boca Raton, FL: CRC Press
- Beerbower, A. (1973). Environmental capability of liquid lubricants; *Esso Research and Engineering Company*, Linden, NJ, USA. 365-431.
- Bertouche S., Sahraoui N., Boutekedjiret C. (2012a) Extraction of Thyme (*Thymus pallecens* de Noé) Essential Oil by Steam-Distillation, Steam-Diffusion and Hydro-Distillation Processes: Optimization of Operating Conditions and Antioxidant Activity. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 15 (2), 336 - 347
- Bertouche, S., Tomao, V., Ruiz, K., Hellal, A., Boutekedjiret, C., Chemat, F. (2012b). First approach on moisture determination in food products using  $\alpha$ -pinene as an alternative solvent for dean–stark distillation, *food chemistry*. 134, 602–605.
- Bertouche, S., Tomao, V., Hellal, A., Boutekedjiret, C., Chemat, F. (2013); First approach on edible oil determination in oilseeds products using  $\alpha$ -pinene, *the journal of essential oil research*. In press.
- Bewa, H., Tavares, M., Gadrat, P. (2002). *Info Chimie Magazine*, 443, 80-83.
- Billerbeck, V.G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques, *Phytothérapie*, 5, 249–253.
- Bneder. (1984). Plan national de développement forestier du M.A.R.A. (Ministère de l'Agriculture et de la Réforme Agraire). Alger. Algérie.
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro, L., Rejeb, M.N., Neffati, M. (2007). Chemical composition. antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*. 105(1), 146-155.
- Bousbia, N., Abert-Vian, M., Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Chemat F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave Hydrodiffusion and Gravity. *Journal of Food Engineering*, 90, 409-413
- Braddock, R. J. (1999). Handbook of Citrus By-Products and Processing Technology. John Wiley and Sons: New York. USA.
- Bruneton, J. (1987). *Eléments de phytochimie et de pharmacognosie*. Ed. Lavoisier, paris, France.

Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. 2ème Ed. Technique & documentation, Lavoisier, paris, France.



Caniova, A., Brandsteterova, E. (2001). HPLC Analysis of Phenolic Acids in *Melissa Officinalis*, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24 (17), 2647 – 2659.

Carmantraud, R. (1940). Le Pin d'Alep dans la région méditerranéenne. *Revue des eaux et forêts*, Algérie, 223-237.

Carmo, M. M., Frazao, S. (1986). The Essential Oil Of Portuguese Pine Needles. In: *Progress In essential oil ressearch*, Walter de Gruyter, Berlin, 169.

Chalchat ,J. C., Ph. Garry ,R., Michet ,A., Bastide ,P., Malhuret ,R. (1989). Corrélation composition chimique - activité antimicrobienne: Comparaison de l'activité d'huiles essentielles naturelles et oxygénées vis-à-vis de 6 souches [*Escherichia coli*]. *Plantes* 4, 305-314.

Chemat, F. (2011). *Eco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs*. Dunod, Paris. ISBN : 978-2-10-056543-6.

Chemat, F., Lucchesi, M.E., Smadja, J., Favretto, L., Colnaghi, G., Visinoni, F. (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: a rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*, 555, 157–160.

Chemat-Djenni, Z., Ferhat, M. A., Tomao, V., & Chemat, F. (2010). Carotenoid extraction from tomato using a green solvent resulting from orange processing waste. *Journal of Essential Oil Bearing Plant*, 13, 139-147.

Chen, D., Daniel, K.G., Kuhn, D.J., Kazi, A., Bhuiyan, M., Li, L., Wang, Z., Wan, S.B., Lam, W.H., Chan, T.H., and Dou, Q.P. (2004). Green tea and tea polyphenols in cancer prevention. *Frontiers in bioscience*, 9, 2618–2631

Chen, Q.-h., Fu, M.-l., Liu, J., Zhang, H.-f., He, G.-q. et Ruan, H. (2008). Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry* doi:10.1016/j.ultsonch.2008.11.009.

Clarà, R.A. Gómez Marigliano, A.C. and Sólamo, H.N. (2009). Density, Viscosity, and refractive Index in the Range (283.15 to 353.15) K and Vapor Pressure of  $\alpha$ -Pinene, d-Limonene, ( $\pm$ )-Linalool, and Citral Over the Pressure Range 1.0 kPa Atmospheric Pressure, *Journal of Chemical & Engineering Data* 54, 1087–1090.

Clark, J. H., (2006). Green chemistry: today (and tomorrow). *Green Chemistry*, 8, (1), 17-21.

Clinton, S.K. (1998). Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease, *Nutrition Reviews* 56, 35–51.

- Colonna, P. (2006) La chimie verte. Paris : Editions Tec & Doc.
- Constantinou L., Gani R. (1994). New Group Contribution Method for Estimating Properties of Pure Compounds, *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 40 (10), 1697-1710,
- Cooper, K. E., Woodman, D. (1946). The diffusion of antiseptics through agar gels, with special reference to the agar cup assay method of estimating the activity of penicillin. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 58, 75.
- Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. (2006). AntibioGramme. Edition ESKA. Paris. France.
- Cuoco, G., Mathe, C., Archier, P., Chemat, F., Vieillescazes, C. (2009). A multivariate study of the performance of an ultrasound assisted madder dyes extraction and characterization by liquid chromatographyphotodiode array detection, *Ultrasonics Sonochemistry* 16, 75-82.



- Dallemagne, G. (2003). Fluides hydrauliques – Méthodes d’analyses, Techniques de l’Ingénieur, BM6017.
- De Billerbek. V.G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* 5. 250, 249-253.
- De Caro P. Thiebaud Roux, S. (Septembre 2008). Biosolvants. Technique De L’ingénieur Référence IN102.
- De Nardo, T., Shiroma-Kian, C., Halim, Y., Francis, D., Rodriguez-Saona, L. E. (2009). Rapid and simultaneous determination of lycopene and beta-carotene contents in tomato juice by infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 57, 1012-1105.
- Debruyne, I. (2001). Technique De L’ingénieur Référence F6030 | Date De Publication : 10 Mars 2001.
- Document de la direction des forêts et de la ceinture verte de la wilaya d’Alger. (2012).
- Dob, T., Berramdane ,T., Chelghoum C. (2005a). Analysis of Essential Oil from the Needles of *Pinus pinaster* Growing in Algeria. *Chemistry of natural compounds*, 41, 545, 547.
- Dob, T., Berramdane, T., Chelgoum , C. (2005b). Chemical composition of essential oil of *Pinus halepensis* miller growing in Algeria. *Chimie* 8, 1939–1945.
- Duret, D., Pillet, M. (2005). Qualité en production: De l’ISO 9000 à Six Sigma. 3<sup>ème</sup> Ed. Eyrolles, Editions d’organisation, Paris, France.



- Eikani, M., H. Fereshteh G., Homami, S. S. (2012). Extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil using superheated hexane, *Food and Bioproducts Processing*, 90, 1, 32–36.
- El-Soheby, A., Baylin, A., Kabagambe, E., Ascherio, A., Spiegelman, D., Campos, H. (2002). Individual carotenoid concentrations in adipose tissue and plasma as biomarkers of dietary intake. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 172-179.
- Fadel, O., Ghazi, K., Mouni, L., Benchat, N., Ramdani, M., Amhamdi, H., Wathélet, J.P., Asehraou, A., Charof, R. (2011). Comparison of Microwave-Assisted Hydrodistillation and Traditional Hydrodistillation Methods for the *Rosmarinus eriocalyx* essential oils from Eastern Morocco. *Journal of materials and environmental science*, 2, (2), 112-117.
- Farhat, A., Fabiano-Tixier, A-S., El Maataoui, M., Maingonnat, J-F., Romdhane, M., Chemat F. (2011). Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Journal of Food Chemistry*, 125, 1, 255–261.
- Farhat, A., Fabiano-Tixier, A-S., Visinoni, F., Romdhane, M., Chemat F. (2010). A surprising method for green extraction of essential oil from dry spices: Microwave dry-diffusion and gravity. *Journal of Chromatography A*, 1217, 47, 7345-7350
- Fauchere, J.-L., Avril, J.-L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Ellipses Editions, Paris. France.
- Fernandez, X., Chemat F. (2012). La chimie des huiles essentielles - Tradition et innovation. Vuibert. ISBN : 978-2-311-01028-2
- Fikselova, M., Šilhar, S., Mareček, J., Frančáková, H. (2008). Extraction of carrot (*Daucus carota* L.) carotenes under different conditions. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 268–274.



- Garrier, E. Les agrosolvants. [En Ligne]. Disponible Sur : <[http://Www.Agrobiobase.Com/Img/Pdf/Fiche\\_2\\_Agrosolvants.Pdf](http://Www.Agrobiobase.Com/Img/Pdf/Fiche_2_Agrosolvants.Pdf)> P. 1. (Consulté Le 24/11/2012).
- Go-Woon J., Hee-Moon K., Byung-Soo C. (2011). Characterization of wheat bran oil obtained by supercritical carbon dioxide and hexane extraction, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18 (1), 360-363

- Grassmann, J., Hippeli, S., Vollmann, R., Wlstner, E. F. (2003). Antioxidative properties of the essential oil from *Pinus mugo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7576-7582.
- Grigonis, D., Venskutonis, P.R., Sivik, B., Sandahl M., Eskilsson, C.S. (2005). Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*), *The Journal of Supercritical Fluids*, 33 (3), 223-233.
- Grodstein F., Kang, J.H., Glynn, R.J., Cook NR., Gaziano JM. (2007). A Randomized Trial of Beta Carotene Supplementation and Cognitive Function in Men: The Physicians' Health Study II, *Archives of Internal Medicine* ,167, 2184-2190.
- Gérin, M., Bégin, D. (2001). Substitution de solvants, étude de cas d'implantation. Département de médecine du travail et hygiène du milieu, Université de Montréal, Faculté de médecine. Rapport R-269.



- Hansen C.M. (1967a) The three dimensional solubility parameter – key to paint component affinities II, *Journal of Paint Technology*, 39 (511), 505-510.
- Hansen C.M. (1967b). The three dimensional solubility parameter – key to paint component affinities I, *Journal of Paint Technology*, 39(505), 104-117
- Hansen C.M., Skaarup, K. (1967c) The three dimensional solubility parameter – key to paint component affinities III, *Journal of Paint Technology*, 39 (511), 511-514
- Hansen, C. M., (1969). Universality of the solubility parameter. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 8, (1), 2-11.
- Hansen, C., Beerbower, A., (1971). Solubility parameters. Kirk-Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, 2nd Ed., Suppl., 889-910.
- Hansen C.M. (1995) Paint Testing Manual, Manual 17, Koleske, J.V., Ed., American Society for Testing and Materials, *Philadelphia*, 389
- Hansen, C. M. (2000). Hansen Solubility Parameters, a User's Handbook, CRC Press LLC ed.; Boca Raton, FL.
- Hansen, C. M. (2004). 50 Years with solubility parameters-past and future. *Progress in Organic Coatings*, 51, (1), 77-84.
- Hansen C.M., (2007), Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, Second Edition; CRC Press, *Taylor & Francis Group*, New York.
- Harel, S., Talmi, A. (1957). Estimation of moisture and water of crystallization by azeotropic distillation. *Analytical Chemistry*. 29, 1694-1697.

- Hass U., Lund S. P., Hougaard K. S., Simonsen L. (1999). Developmental Neurotoxicity After Toluene Inhalation Exposure in Rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 21 (4), 349-357.
- He, J. & Shamsi, S.A. (2009). Multivariate approach for the enantioselective analysis in micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry. I. Simultaneous optimization of binaphthyl derivatives in negative ionmode, *Journal of Chromatography A*, 1216, 845-856.
- Heratchian A. (2007). L'écorce de Pin Maritime, *Phytothérapie, Naturo*, 41, 14-16.
- Herodez, S.S., Hadolinb, M., Skergeta M., Knez, Z. (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *Food Chemistry*, 80, 275 – 282.
- Hildebrand J., Scott R.L. (1950). The solubility of Nonelectrolytes, 3rd ed., Reinhold, New York.
- Hmamouchi M., Hamamouchi, J., Zouhdi, M., Bessière, J.-B., (2001). Chemical and antimicrobial properties of essential oils of five Moroccan *Pinaceae*. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 298-302.
- Hong, E. J., Na, K. J., Choi, I. G., Choi, K. C., Jeung, E. B. (2004) Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 27 (6), 863-866.
- HSPiP (2010) (Hansen Solubility Parameters in Practise) Software, e-book v3.0.
- Hsu, T. Y., Sheu, S. C., Liaw, E. T., Wang, T. C, Lin, C. C. (2005). Anti-oxidant activity and effect of *Pinus morrisonicola* hay, on the survival of leukemia cell line u 937. *Phytomedicine*, 12, 663-669.
- Huma, Z., Abert-Vian, M., Maingonnat, J- F., Chemat, F. (2009). Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5077-5085.
- Hunchak, K., Suffet I.H. (1987). Analysis of acetone-hexane artifacts produced in the soxhlet extraction of solid environmental samples, *Journal of Chromatography A*, 392, 185-198.



- INRF. (2012). Institut National de Recherche Forestière. Alger. Algérie.
- INRS. Les Solvants [En Ligne]. (Modifié Le 14 Avril 2009). Disponible Sur : [http://www.Inrs.Fr/Htm/Les\\_Solvants.Html](http://www.Inrs.Fr/Htm/Les_Solvants.Html) (Consulté Le 24/11/2012).
- ISO 659-1998 (E), (1998). Graines oléagineuses, détermination de la teneur en huile, *International Organization for Standardization (ISO)*, Geneva.
- Joffin, J-N., Leyral G. (2006). Microbiologie technique tome I, dictionnaire des techniques. *Centre régionale de documentation pédagogique d'Aquitaine*, 32. France.

Johnson, D.R., Gu L.C. (1988). in *Autoxidation and Antioxidants*, John Wiley, New York, 433-448.

Johnson, L.A., Lusas, E.W. (1983). Comparison of Alternative Solvents for Oils Extraction, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60, 229-242.



Kadik, B. (1987). Contribution à l'étude du pin d'Alep (*Pinus halepensis* mill.) en Algérie: écologie dendrométrie morphologie, *Office des Publications Universitaires*, Alger, Algérie.

Kajadphai, T. A., Jones, G.P., Wahlqvist, M.L., Briggs, D.R. (1998). Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 63, 4, 577-584.

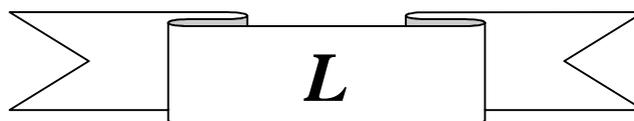
Kiehl S.R. (1927). Evaluation of the Kauri-Butanol Solvency Test, *Scientific Section Circular*, 319, 588.

Krauze-Baranowska, M., Mardarowicz, M., Wiwart, M., Poblócka, L., Dynowski, M. (2002). Antifungal Activity of the essential oils from some species of the genus *Pinus*. *Z. Naturforsch*, 57, 478-482.

Kritchevsky, S.B. (1999). Beta-carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease, *Journal of Nutrition*, 129, 5-8.

Kronholm, J., Hartonen, K., & Riekkola, M.L. (2007). Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 396-412

Kubeczka, K. H., Schultze, W. (1987). Biology and chemistry of conifer oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 2, 137-148.



Lammers J. H. C. M., Van Asperen J., de Groota D. & Pels Rijckena W. R. (2005) Behavioural effects and kinetics in brain in response to inhalation of constant or fluctuating toluene concentrations in the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19 (3), 625-634.

Leveque, J., Cravotto, G. (2006). Microwave, Power Ultrasound and Ionic liquids, a new synergy in Green Chemistry. *Chimia*, 8, 313-320.

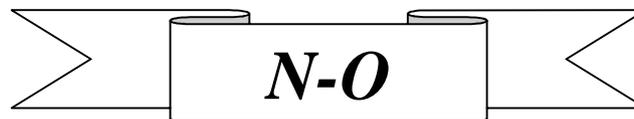
Li C., Ford ES., Zhao G., Balluz LS., Giles WH., Liu S. (2011). Serum  $\alpha$ -Carotene concentrations and risk of death among US adults, The Third National Health and Nutrition Examination Survey Follow-up Study, *Archives of Internal Medicine*, 171, 507-515.

- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Tomao, V., Cravotto, G., Chemat, F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 12–18.
- Lindberg, L. E., Willför, S. M., Holmbom, B. R. (2004). Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31 (3), 137-147.
- Liu, A.-H., Li, L., Xu, M., Lin, Y.-H., Guo, H.-Z., Guo, D.-A. (2006). Simultaneous quantification of six major phenolic acids in the roots of *Salvia miltiorrhiza* and four related traditional Chinese medicinal preparations by HPLC-DAD method, *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 48 – 56.
- Liu, S. X., & Mamidipally, P. K. (2005). Quality comparison of rice bran oil extracted with d-limonene and hexane. *Cereal Chemistry*, 82, 209-215.
- Loizzo, Mr., Saab, Am., Tundis, R., Menichini, F., Bonesi, M., Statti, Ga. , Giancarlo, A., Menichini, F. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Pinus brutia* (calabrian pine) growing in Lebanon. *Chemistry of Natural Compounds*, 44, 6, 784-786.
- Louni, D. (1994). Les forêts algériennes. Forêt méditerranéenne t. XV n°1.
- Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Analytica Chimica Acta*. 369 1-10.
- Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. (2003). Extraction of polychlorinated biphenyls from soils by automated focused microwave-assisted Soxhlet extraction. *Journal of Chromatography A*, 998, 1-2, 21-29.

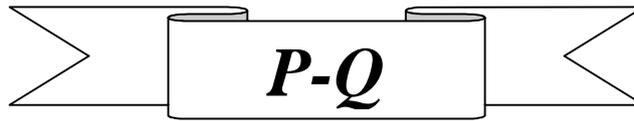


- Macchioni F., Cioni, P.L., Flamini, G., Morelli, I., Maccioni, S., Ansaldi, M. (2003). Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of *Pinus pinea*, *P. halepensis*, *P. pinaster* and *P. nigra* from central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 139-143.
- Mamidipally, P.K., Liu, S.X. (2004). First approach on rice bran oil extraction using limonene, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 122-125.
- Mathews-Roth, M.M., (1986). Beta-carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Biochemie*, 68, 875-884.
- Mayne, S.T. (1996). Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *The Journal the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10, 690–701.
- McWilliams M. L., Chen G. D., Fechter L. D. (2000). Low-Level Toluene Disrupts Auditory Function in Guinea Pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 167 (1), 18–29.

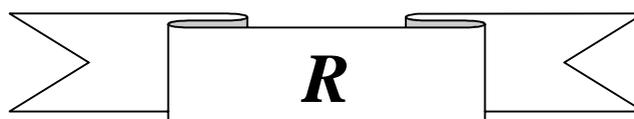
- Meena, M.R., Sethi, V. (1994). Antimicrobial activity of essential oils from species. *Journal of Food Science and Technology*, 31, 68-70.
- Messaoud-Bouregba K., Zerizer A. (2006). Valorisation papetière du Pin d'Alep (*Pinus halepensis mill.*) de la station de Zemmouri. *Materiaux*, 13-17 novembre 2006 – Dijon, France.
- Michel, T., Destandau, E., Elfakir, C. (2011). Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides L.*) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. *Food Chemistry*, 126, 1380-1386.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M. Simin, N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis L. (Lamiaceae)* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 2485–2489.
- Mira, B., Blasco, M., Berna, A., Subirats, S. (1999). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition. *Journal of Supercritical Fluids*, 14, 95-104.
- Monica, R.L., A. Saab, R. Tundis, A. Giancarlo, I. Lampronti, F. Menichini, R. Gambari, J. Cinatl, H. Wilhelm Doerr, (2008). Phytochemical analysis and in vitro evaluation of the biological activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) of *Cedrus libani A. Rich.* *Phytomedicine*, 15, 79–83
- Morrison, P., Wolf, K. (1985). Substitution Analysis: A Case Study of Solvents. *Journal of Hazardous Materials*, 10, 189-204.



- Nelson, W. M. (2003). *Green Solvents for Chemistry: Perspective and Practice*, Oxford University Press: New York.
- Neves, A., Rosa S., Gonçalves, J., Rufino, A., Judas, F., Salgueiro, L., Lopes, M.C., Cavaleiro, C., Mendes A.F. (2010). Screening of five essential oils for identification of potential inhibitors of IL-1-induced Nf-kappa B activation and NO production in human chondrocytes: characterization of the inhibitory activity of  $\alpha$ -pinene. *Planta medica*, 76 (3), 303-308.
- Njoroge, S.M., Koaze, H., Karanja, P.N., Sawamura, M. (2005). Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet oranges (*Citrus sinensis*). *Flavour & Fragrance Journal*. 20, 80-85.
- Nuno, R., Arminda, A., Lúcia, S., Silvia, L. (2011). Pine needles as passive bio-samplers to determine polybrominated diphenyl ethers. *Chemosphere*, 85, 247–252.
- Olson, J.A. (1986). Carotenoids, vitamin A and cancer. *Journal of Nutrition*, 116, 1127-1130.



- Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritim*), pycnogenol. *Free Radical Biology and Médecine*, 27, 704-724.
- Palozza, P. (1998). Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems, *Nutrition Reviews*, 56, 257–265.
- Perron G., Desnoyers J.-E., Lara J. (2002). Permeation of mixtures of organic liquids through polymeric membranes: role of liquid-liquid interactions. *Journal of Applied Polymer Science*, 86, 1, 195-21
- Petrakis, P. V., Tsitsimpikou ,C., Tzakou ,O., Kouladis, M., Vagias ,C., Roussis,V. (2001). Needle volatiles from five *Pinus* species growing in Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 249-252.
- Pillet, M. (1997). Les plans d'expériences par la méthode TAGUCHI. Éd. d'Organisation, Paris, France.
- Pôle de compétitivité Industries et Agro-Ressources (IAR), FICHE n°2 AGROSOLVANTS, France.
- Priego-Capote, F., M.D. Luque de Castro. (2005). Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: a convincing alternative for total fat isolation from bakery products, *Talanta*, 65, 1, 81-86.
- Profil national pour l'évaluation des capacités de gestion rationnelle des produits chimiques en Algérie, mai 2006. Rapport national de l'Algérie .
- Pukacka S., Pukacki P. M. (2000). Seasonal changes in antioxidant level of scots pine (*Pinus sylvestris l.*) Needles exposed to industrial pollution. Ii. Enzymatic scavengers activities. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22, 4, 457-464.
- Quelenis, N. Les Agrosolvants ou biosolvants. [en ligne]. (mars 2007) Disponible sur :<[http://veillestrategique.champagne-ardenne.cci.fr/AutoIndex\\_v1/veilles/fiches-Techniques/Agro-Industrie%20Info/2007/20agrosolvants.pdf](http://veillestrategique.champagne-ardenne.cci.fr/AutoIndex_v1/veilles/fiches-Techniques/Agro-Industrie%20Info/2007/20agrosolvants.pdf)> P. 2. (Consulté le 21/10/2012).
- Quezel, P. (1986) Les pins du groupe ''*halepensis*'' écologie, végétation, écophysologie. Options Méditerranéennes, CIHEAM, Paris, France.



- Ramdani, M., Benchat, N., Amhamdi, H., Wathelet, J.P., Ghazi, Z., Saddik, R., Fadel, O., Mouni, L. (2010 a). Effets du mode d'extraction sur l'efficacité de l'inhibition de la

- corrosion. Journée Scientifique sur les Plantes Médicinales et Aromatiques, Faculté des sciences, 23 Mars, Oujda, Maroc.
- Ramdani, M., Fadel, O., Mouni, L., Amhamdi, H., Wathelet. J.P. (2010 b). Effet de la Puissance Micro-ondes sur la Composition Chimique de l'Huile Essentielle de l'Eucalyptus Globulus. Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales. 14-16 Octobre, Fès, Maroc.
- Ramdani, M., Benchat, N., Fadel, O., Asehraou, A., Wathelet. J-P. (2010 c). Activité antibactérienne et Technique d'extraction. Congrès international sur les Plantes Aromatiques et Médicinales ; 14-16 Octobre, Fès, Maroc.
- Rao, A.V., Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review, *Nutrition Research* 19, 305–323.
- Rasooli, I., Bagher Rezaei, M., Allameh A. (2006). Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-parlock*. *Food control*, 17, 359-364.
- Reighard T. S., Olesik, S. V. (2006). Bridging the Gap Between Supercritical Fluid Extraction and Liquid Extraction Techniques: Alternative Approaches of the Extraction of Solid and Liquid Environmental Matrices, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 26 (2-3), 1-39.
- Riddick, J. A., Bunger, W. B., and Sakano, T. K. (1986). Organic Solvents Physical Properties and Methods of Purification. John Wiley and Sons: New York.
- Roire J. (1989). Les solvants ; Puteaux : Société EREC, (Contribution à la connaissance des peintures et des industries de dispersion / EREC).
- Rolland, Y. (2004). Actualités des lipides en cosmétique : Antioxydants naturels végétaux. *OCL*, 11, 419 – 424.
- Roussis V., Panos, V.P., Antonio, O., Basilis, E.M., (1995). Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*. 39, 357-361.



- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice M., Bruni R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, 621–632.
- Sahraoui, N., Abert Vian, M., Bornard, I., Boutekedjiret, C., Chemat, F. (2008). Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils. Comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A*, 1210, 229–233.

- Sahraoui, N., Abert Vian, M., El Maataoui, M., Boutekedjiret, C., Chemat, F. (2011). Valorization of citrus by-products using microwave steam distillation (MSD). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 163-170.
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec & Doc, Paris.
- Sasipawan, M., Natthida, W., Sahapat, B., Kanjana, T., Waraporn, T. (2012). FTIR microspectroscopy discriminates anticancer action on human leukemic cells by extracts of *Pinus kesiya*; *Cratoxylum formosum* ssp *pruniflorum* and *melphalan*. *Talanta*, 93, 371-382.
- Saudan, L.A. (2007). Hydrogenation Processes in the Synthesis of Perfumery Ingredients, *Accounts of Chemical Research*, 40, 12, 1309-1319.
- Schroeder, M-P., Messing, A-M. (1949). Methods for comparing the antibacterial activity of essential oils and other aqueous insoluble compounds. *Bulletin of the National Formulary Committee*, 17, 213-218.
- Scammells, P., Scott, J., Singer, R. (2005). Ionic liquids: the neglected issues. *Australian Journal of Chemistry*, 58, 155-169.
- Selik, M., Bono, G. (1960) Untersuchungen über den Eiweißabbau in den Samen der auf dem Baum bleibenden Zapfen von *Pinus halepensis* Mill. *Planta*, 54, 4, 404-408.
- Sharma, P., Singh, L., Dilbaghi, N. (2009). Response surface methodological approach for the decolorization of simulated dye effluent using *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Journal of Hazardous Materials*, 161, 1081-1086.
- Smith, E., Williamson, E., Zloh, M., Gibbons, S. (2005). Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and emrsa strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy research*, 19, 538-542.
- Sokmen, A., Gulluce, M., Akpulat, H.A., Daferera, D., Tepe, B., Polissiou, M. (2004). The *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*, 15(8), 627-634.
- Stanley, F., Wainapel, M.D., Avital, M.P.H., Fast, M.D. (2003). Antioxidants and the free radical theory of degenerative disease. In: Hoffman, R.L. (ed.) *Nutritional Therapy in Rehabilitation. Alternative Medicine and Rehabilitation*. Demos Medical Publishing, New York
- Stefanis, E., Constantinou, L., Panayiotou C. (2004). A group-contribution method for predicting pure component properties of biochemical and safety interest. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 43, 6253-6261.
- Stefanis E., Panayiotou C. (2008). Prediction of Hansen solubility parameters with a new group contribution method. *International Journal of Thermophysical Properties*, 29, 568-585

Subramanian, R., Subbramaniyan, P., Noorul Ameen, J., Raj. V. (2011). Double bypasses soxhlet apparatus for extraction of piperine from *Piper nigrum*, *Arabian Journal of Chemistry, In Press, Corrected Proof, Available online 25 June 2011*

Swift, K.A.D. (2004). Catalytic Transformations of the Major Terpene Feedstocks, *Topics in Catalysis*, 27, 1, 143-155.



Tabanca, N., Demirci, F., Ozek, T., Tumen, G., Baser. K. H. C. (2001). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Origanum × dolichosiphon* P. H. Davis. *Chemistry of Natural Compounds*, 37, 3, 238-241

Tan, C.-H., Ghazali, H.M., Kuntom, A., Tan, C.-P. et Ariffin, A.A. (2009). Extraction and physicochemical properties of low free fatty acid crude palm oil, *Food Chemistry*, 113, 645-650.

Tazerouti F., Badjah-Hadj-Ahmed, A.Y., Meklati, B.Y., Favre-Bonvin, J., Bobenrieth, M.J. (1993). Analyse des huiles essentielles des aiguilles de *Pinus halepensis* Mill. par C.G.-S.M. *Plantes Medicinales et Phytothérapie XXVI(3)*, 161-176.

Temple, N.J. & Basu, T.K. (1988). Does Beta-Carotene Prevent Cancer? A Critical Appraisal. *Nutrition Research*, 8, 685-701.

Tepe, B., Sokmen, M., Askin Akpulat, H., Daferera, D., Polissiou, M. and Sokmen, A. (2005). Antioxidative activity of the essential oils of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering*. 66, 447-454.

Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Cullen, P.J. (2009). *Innovative Food Sciences and. Emerging Technologie*. 10, 1, 70-75.

Turgeon, M.; Gouvernement du Québec, Ministère des ressources naturelles, de la faune et des parcs; **2003**, Direction du développement de l'industrie des produits forestiers. Aperçu des Produits forestiers non Ligneux, [en ligne], 11 pages, [http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/entreprises/apercu\\_PFNL.pdf](http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/entreprises/apercu_PFNL.pdf). Consulté le 20 mai 2012.

Universidad politecnica de valencia. Familia Pinaceae (Pináceas). [En ligne]. Disponible sur : < <http://www.euita.upv.es/varios/biologia/Pin%C3%A1ceas.htm> > (Consulté Le 22/03/2013).



Vagionas K, Graikou K, Chinou I. B, Runyoro D, Ngassapa O. (2007). Chemical analysis and antimicrobial activity of essential oils from the aromatic plants *Artemisia afra* Jacq. and

- Leonotis ocymifolia (Burm. F.) Iwarsson var. raineriana (Vision 1 ) Iwarsson growing in Tanzania. *The Journal of essential oil research*, vol. 19, no4, pp. 396-400
- Van Krevelen D.W. (1990). *Properties of Polymers*, Third completely revised edition: Elsevier. Amsterdam. Pays-Bas.
- Veillet, S., Tomao, V., Ruiz, K., Chemat, F. (2010). Green procedure using limonene in the Dean-Stark apparatus for moisture determination in food products. *Analytica Chimica Acta*, 674, 49 - 52.
- Vennetier, M., Ripper, C., Brochiro, F., Chandiooux, O. Du Cemagref. (1999). (division, agriculture et forêt méditerranéenne basée au tholonet) : évolution à court et long terme de la croissance du Pin d'Alep en province. N°XX.
- Vidrich V., Michelozzi, M., Fusi, P., Heimler, D. (1988). Essential oils of vegetables species of the mediterranean and alpine temperate climate areas, in: G. Grassi, B. Delmon, J.F. Molle, H. Zibetta (Eds.), *Biomass for Energy and Industry*, Fourth Conference.
- Virost, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni, F., Chemat. F. (2007). New microwave-integrated Soxhlet extraction: An advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of Chromatography A*, 1174, 1-2, 138-144.
- Virost, M., Tomao, V., Ginies, C., Chemat, F. (2008). Total lipid extraction of food using *d*-limonene as an alternative to *n*-hexane. *Chromatographia*, 68, 311-313.
- Virost, M., Tomao, V., Ginies, C., Visinoni, F., Chemat, F. (2008). Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination Microwave –integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *Journal of Chromatography A*, 1196-1197, 1-2, 147-152.
- Virost, M., (2009). Soxhlet assisté par micro-ondes : Conception et application à l'extraction des matières grasses, Thèse de Doctorat en Sciences, Chimie, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France.
- Vuorela, S., Kreander, K., Karonen, M., Nieminen, R., Hâmâlâinen, M., Galkin, A., Laitinen, L., Salminen, J. P., Moilanen, E., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., Heinonen, M. (2005). Preclinical evaluation of rapeseed, raspberry, and pine bark phenolics for health related effects. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 53, 5922-5931.



- Wang, H., Provan G. J., Helliwell, K. (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC, *Food Chemistry*, 87, 307 – 311.
- Wang L., Waller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Food Science & Technology*, 17, 300 – 312.

- Wang, J., Wan, W. (2009). Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review, *International Journal of Hydrogen Energy* 34, 235-244.
- Wang, Pu, Qinghua Zhang, Yawei Wang, Thanh Wang, Xiaomin Li, Lei Ding, Guibin Jiang. (2010). Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples, *Analytica Chimica Acta*, 663, 1, 43-48.
- Wauquier, J-P. (1994). Le raffinage du pétrole: Pétrole brut, produits pétroliers, schémas de fabrication. Paris: Edition Technip, ISBN : 2-7108-0668-1.
- Wentao Wang, Bingjun Meng, Xiaoxia Lu, Yu Liu, Shu Tao . (2007). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from oils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques, *Analytica Chimica Acta*, 602, 2, 211-222.
- Zhang C.X., Wu H., Weng X.C. (2004). Two novel synthetic antioxidant for deep frying oils. *Food Chemistry*, 84, 219-222.

# *Annexes*

---

# Annexe A

## Répartition géographique du pin d'Alep

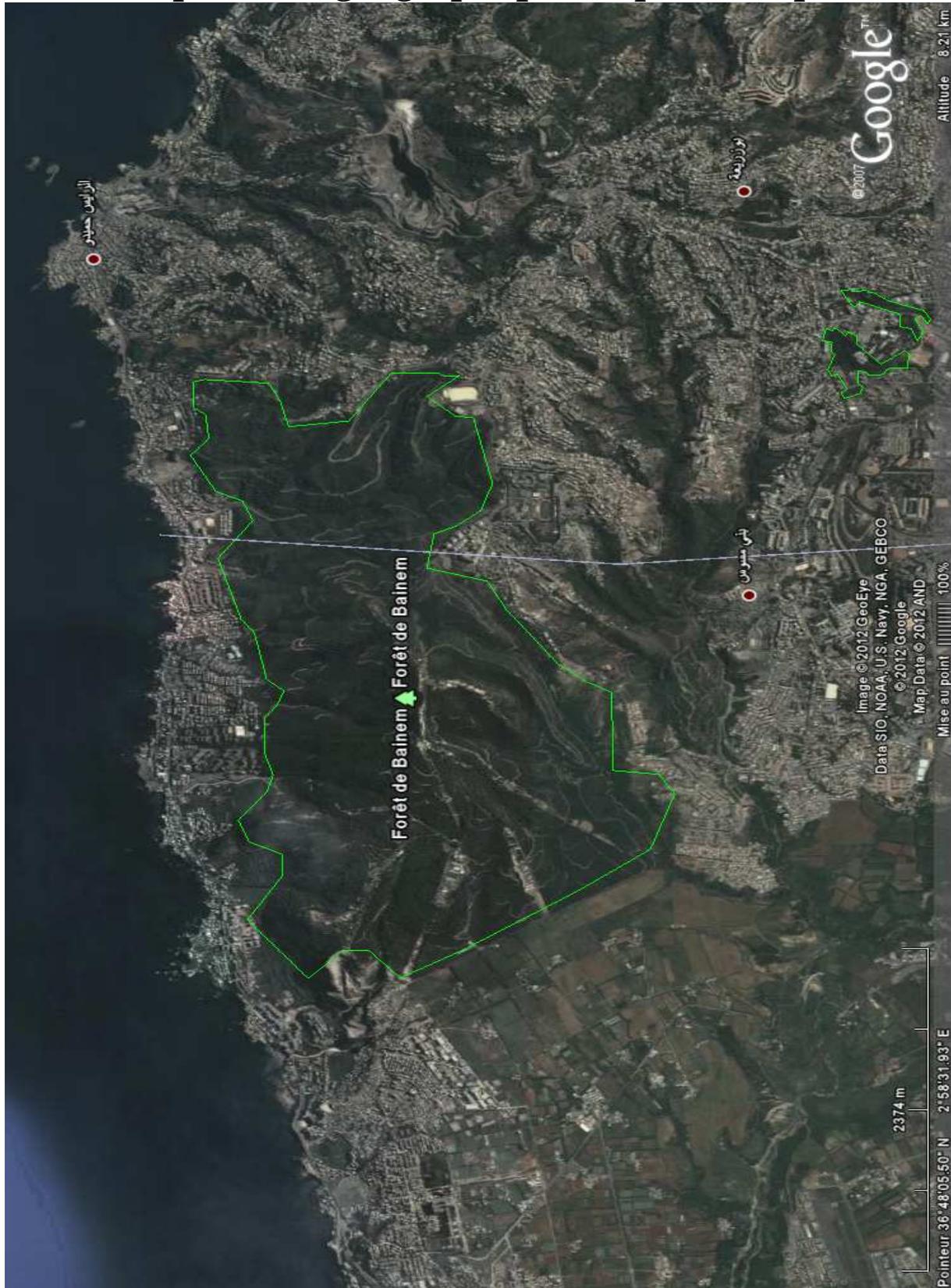
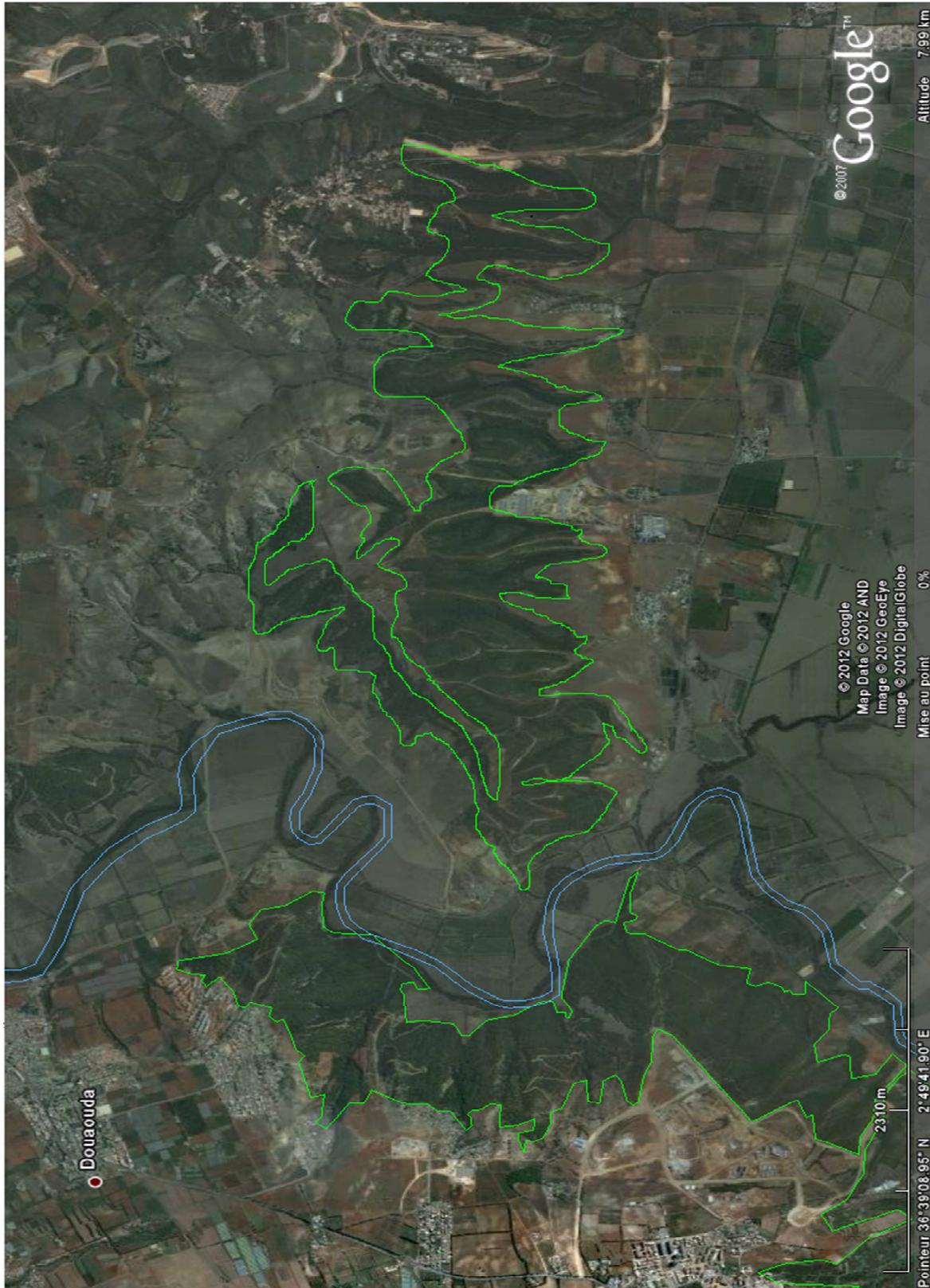


Figure A.1 : Forêt de Bainem



**Figure A.2 :**Forêt de Maktaa Kheira

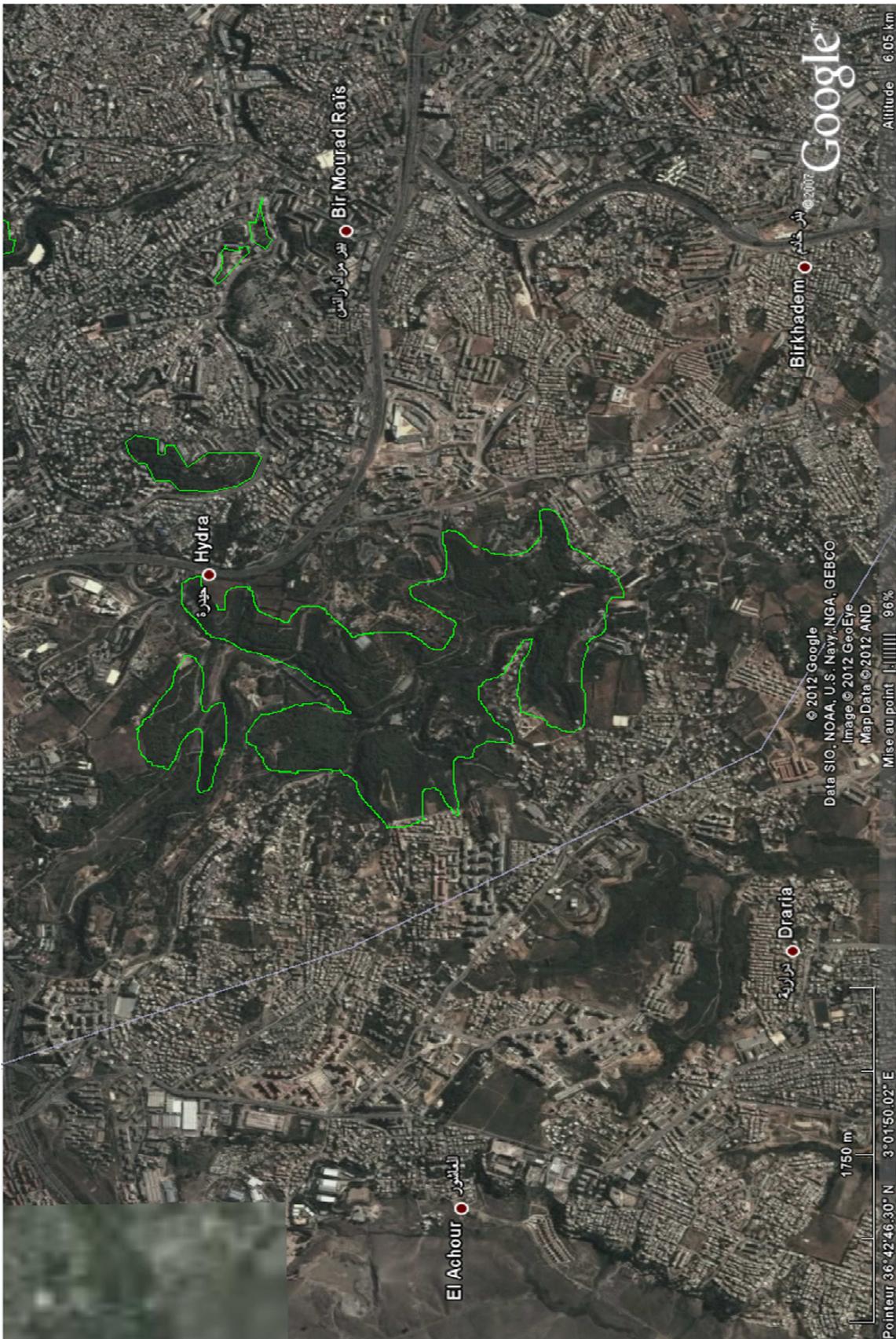


Figure A.3 : Forêt du parc zoologique de Ben Aknoun

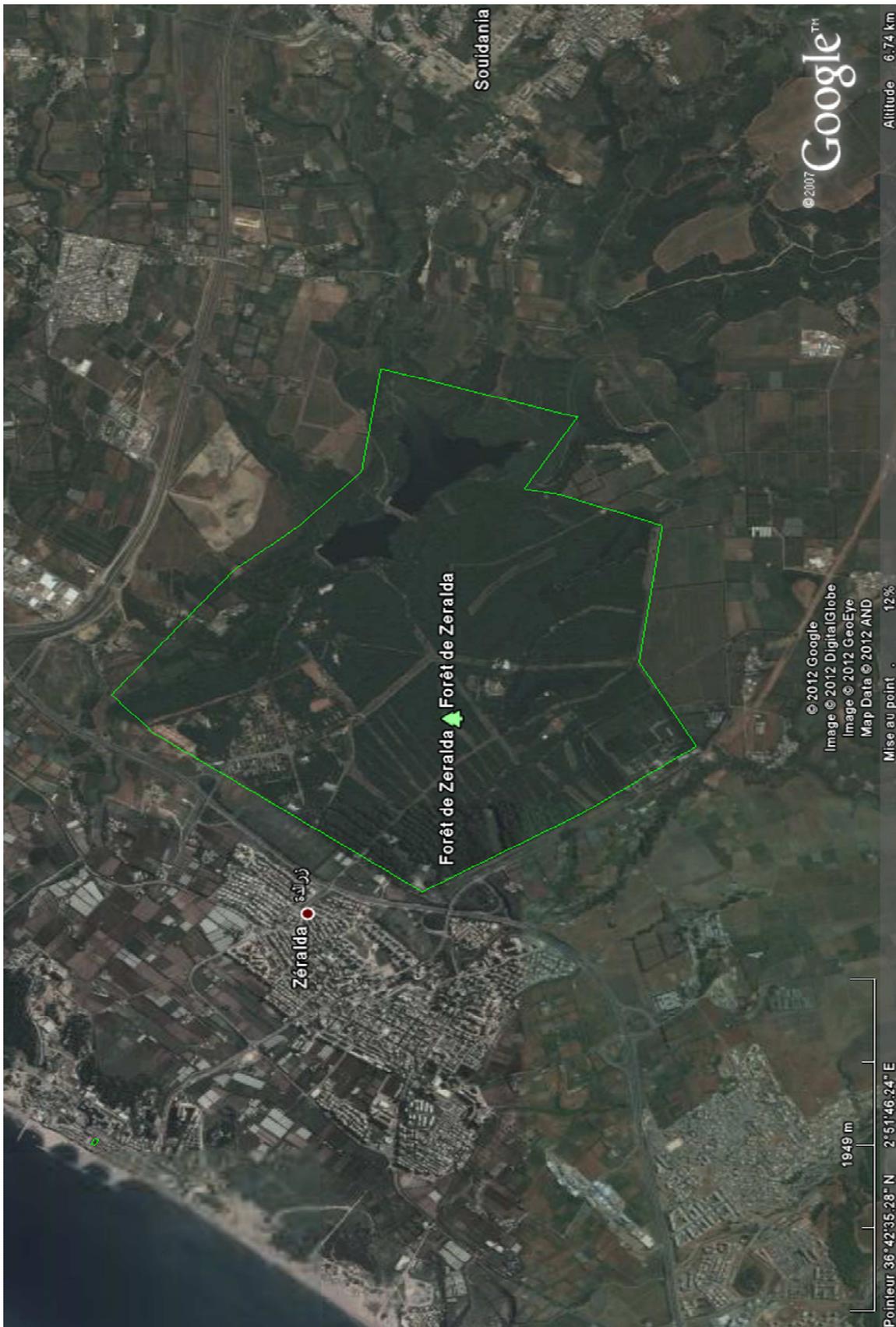
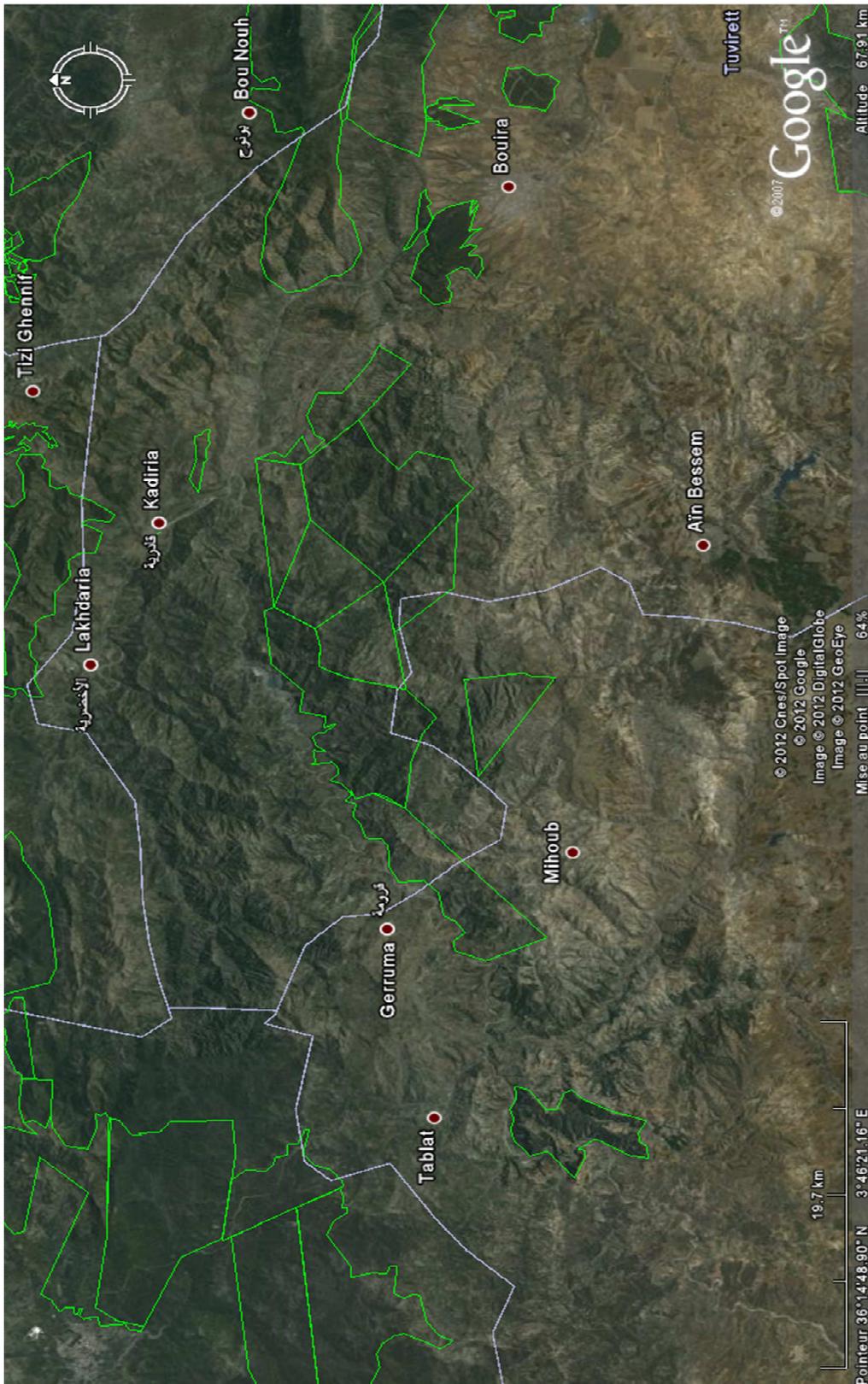


Figure A.4:Forêt de Zéralda



**Figure A.5 :** Forêt de Guerrouma (LAKHDARIA)

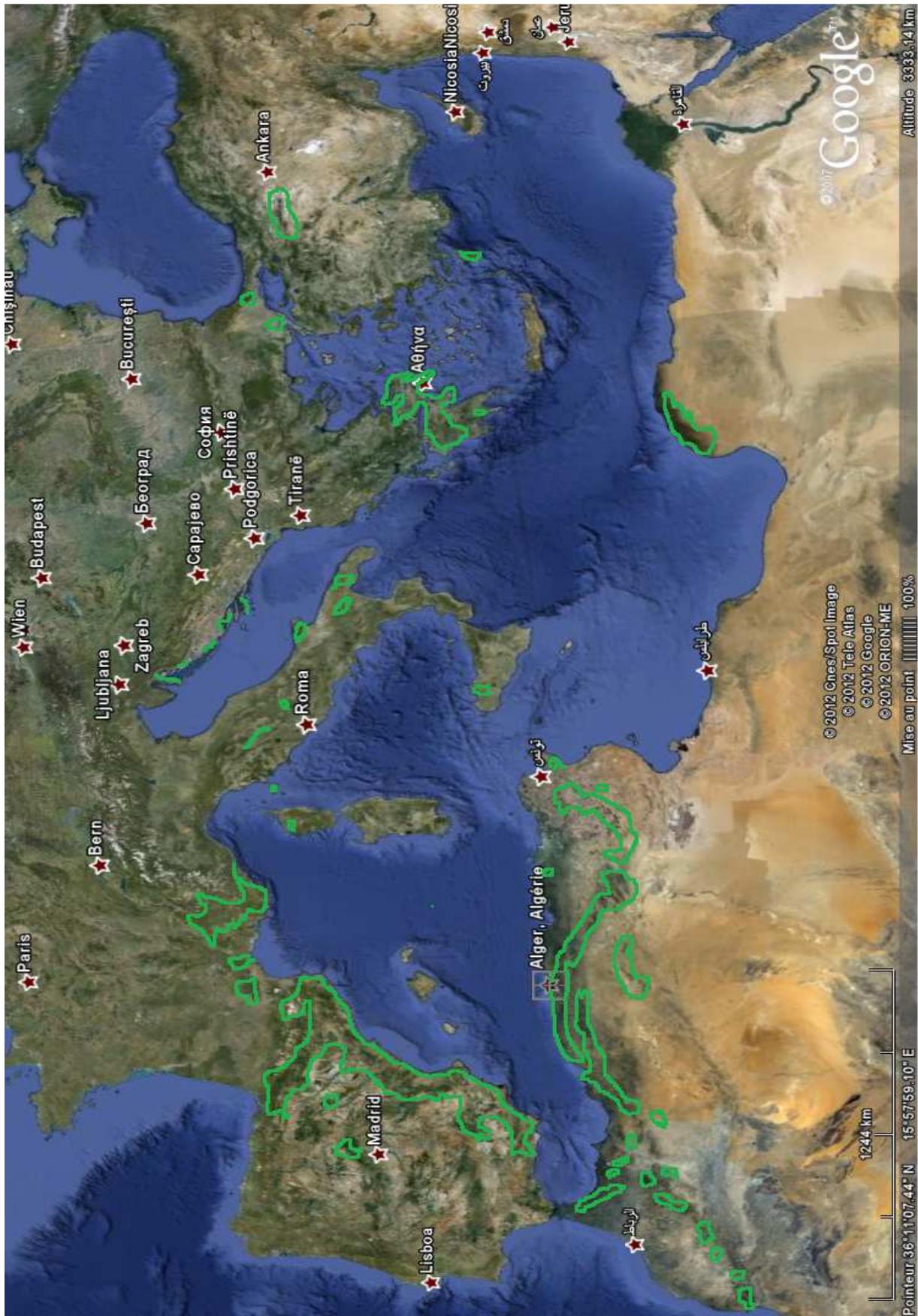


Figure A.6: Dans le bassin méditerranéen

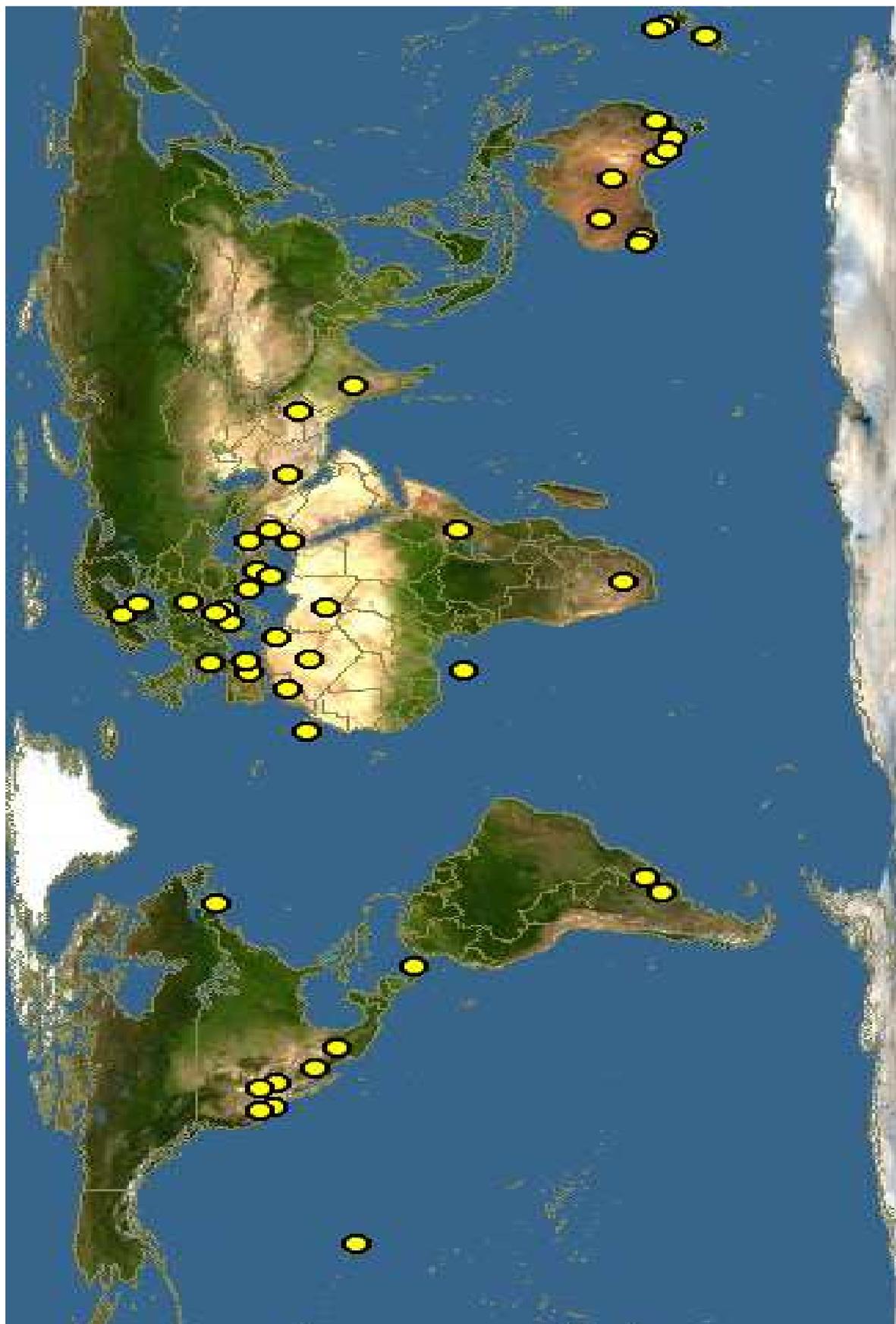


Figure A.7: Dans le monde

---

## *Annexe B*

### *Liste des phrases Répartition de risque*

- R1 : Explosif à l'état sec.
- R2 : Risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition.
- R3 : Grand risque d'explosion par le choc, la friction, le feu ou d'autres sources d'ignition.
- R4 : Forme des composés métalliques explosifs très sensibles
- R5 : Danger d'explosion sous l'action de la chaleur.
- R6 : Danger d'explosion en contact ou sans contact avec l'air
- R7 : Peut provoquer un incendie.
- R8 : Favorise l'inflammation des matières combustibles.
- R9 : Peut exploser en mélange avec des matières combustibles
- R10 : Inflammable.
- R11 : Facilement inflammable.
- R12 : Extrêmement inflammable
- R14 : Réagit violemment au contact de l'eau.
- R15 : Au contact de l'eau, dégage des gaz extrêmement inflammables.
- R16 : Peut exploser en mélange avec des substances comburantes.
- R17 : Spontanément inflammable à l'air.
- R18 : Lors de l'utilisation, formation possible de mélange vapeur/air inflammable/explosif
- R19 : Peut former des peroxydes explosifs
- R20 : Nocif par inhalation
- R21 : Nocif par contact avec la peau
- R22 : Nocif en cas d'ingestion.
- R23 : Toxique par inhalation.
- R24 : Toxique par contact avec la peau.
- R25 : Toxique en cas d'ingestion.
- R26 : Très toxique par inhalation
- R27 : Très toxique par contact avec la peau
- R28 : Très toxique en cas d'ingestion.
- R29 : Au contact de l'eau, dégage des gaz toxiques
- R30 : Peut devenir facilement inflammable pendant l'utilisation
- R31 : Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique.
- R32 : Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique
- R33 : Danger d'effets cumulatifs
- R34 : Provoque des brûlures.
- R35 : Provoque de graves brûlures.
- R36 : Irritant pour les yeux
- R37 : Irritant pour les voies respiratoires
- R38 : Irritant pour la peau
- R39 : Danger d'effets irréversibles très graves
- R40 : Effet cancérigène suspecté: preuves insuffisantes

- 
- R41 : Risque de lésions oculaires graves.
- R42 : Peut entraîner une sensibilisation par inhalation
- R43 : Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau.
- R44 : Risque d'explosion si chauffé en ambiance confinée
- R45 : Peut provoquer le cancer.
- R46 : Peut provoquer des altérations génétiques héréditaires
- R48 : Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée.
- R49 : Peut provoquer le cancer par inhalation
- R50 : Très toxique pour les organismes aquatiques
- R51 : Toxique pour les organismes aquatiques
- R52 : Nocif pour les organismes aquatiques
- R53 : Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique
- R54 : Toxique pour la flore
- R55 : Toxique pour la faune
- R56 : Toxique pour les organismes du sol.
- R57 : Toxique pour les abeilles.
- R58 : Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement.
- R59 : Dangereux pour la couche d'ozone.
- R60 : Peut altérer la fertilité.
- R61 : Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant.
- R62 : Risque possible d'altération de la fertilité.
- R63 : Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant.
- R64 : Risque possible pour les bébés nourris au lait maternel
- R65 : Nocif : peut provoquer une atteinte des poumons en cas d'ingestion.
- R66 : L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau.
- R67 : L'inhalation de vapeurs peut provoquer somnolence et vertiges
- R68 : Possibilité d'effets irréversibles

## الملخص

**العنوان:** تثمين نفايات صناعات الخشب وتطبيق "البينان" كمذيب أخضر.

تتمين نفايات صناعات الخشب تمثلت باستخراج في بداية الأمر الزيوت الأساسية لإبر الصنوبر ، وبعدها مركبات حيوية النشاط وذلك من بقايا الاستخراج. وقد تم استخراج الزيوت الأساسية بأربعة طرق ، اثنتان منهما تقليديتان: التقطير ببخار الماء والتقطير بالماء، والأخرى مبتكرتان : التقطير ببخار الماء بمساعدة الموجات الدقيقة والتقطير بالماء بمساعدة الموجات الدقيقة. المرود الناتج من الطريقتان التقليديتان قابلين للمقارنة فيما بينهما و مرردوهما يفوق مرود الطرق التي تمت بمساعدة الموجة الدقيقة. إلا أن الاختلاف يكمن في ربح الوقت و ذلك بنسبة 77٪ للتقطير ببخار الماء بمساعدة الموجات الدقيقة و 50٪ للتقطير بالماء بمساعدة الموجات الدقيقة و ذلك مقارنة بالطرق التقليدية. أظهرت دراسة الأنشطة البيولوجية للزيوت المستخرجة أنها تتعلق مباشرة بتقنية الاستخراج. تثمين بقايا استخراج الزيوت الأساسية يبين أن محتوى المركبات الفينولية مثيرة للاهتمام. استعمال البينان لأول مرة كمذيب أخضر و بديل للمذيبات البتروكيماوية في مختلف المجالات، لم يظهر أي اختلاف في نتائج الاستخراج، مما يجعلنا نستخلص أن المذيب المقترح "البينان" فعال وصالح كبديل للمذيبات العضوية التي تم مقارنتها.

**الكلمات الرئيسية:** تثمين، الصنوبر، الزيوت الأساسية، مركبات حيوية النشاط، استخراج، البينان، المذيبات الخضراء.

## Résumé

**Intitulé :** Valorisation de déchets de l'industrie du bois et l'application du pinène comme solvant vert

La valorisation de déchets de l'industrie du bois a porté sur l'extraction dans un premier temps de l'huile essentielle des aiguilles de pin et dans un second temps de composés bioactifs, à partir des résidus d'extraction. L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par quatre procédés, deux conventionnels : l'entraînement à la vapeur d'eau (EV) et l'hydrodistillation (HD); et deux autres innovants : l'entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes (EVMO) et l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO). Les rendements obtenus par les procédés conventionnels sont comparables et supérieurs à ceux des procédés assistés par micro-ondes. Néanmoins, Un gain de temps de plus de 77 % pour l'EVMO et 50 % pour l'HDMO a été noté en comparaison aux procédés conventionnels. L'étude des activités biologiques des huiles extraites a montré qu'elles dépendent directement de la technique d'extraction utilisée. La valorisation des résidus des aiguilles de pin récupérés après extraction de l'huile essentielle, a montré que leur teneur en composés phénoliques est intéressante. L'utilisation pour la première fois du pinène comme solvant vert pour remplacer les solvants pétrochimiques dans divers domaines, n'a montré aucune différence significative entre les différents extraits, permettant de conclure que le solvant proposé, l' $\alpha$ -pinène, est efficace et valable pour substituer les solvants organiques auxquels il a été comparé.

**Mots clé :** Valorisation, Pin, Huile essentielle, Composés bioactifs, Extraction, Pinène, Solvant vert

## Summary

**Heading:** Valorization of waste of wood industry, and application of pinene as green solvent

Wood industry's waste valorization was initially related to the extraction of essential oil of pine needles. Later this valorization was associated to the extraction of bio-active compounds from the extraction residues. The extraction of essential oil was performed following four processes. Two conventional processes that are steam distillation (SD) and hydrodistillation (HD), and two innovating processes that are microwave steam distillation (MSD) and microwave hydrodistillation (MHD). The yields obtained by conventional methods are comparable and higher than those obtained by microwaves assisted processes. Nevertheless, compare to conventional processes, the extraction time was significantly reduced by more than 77% for MSD and 50% for MHD. The study relating to biological activities of oils extracted has shown that they are directly dependent on the extraction technique. The residues of pine needles' valorization collected after the extraction of essential oil have shown that their phenolic content is interesting. Also, for the first use of pinene as a green solvent in replacement of petrochemical solvents in various fields, no significant difference has been shown between the various extracts. This results in the efficiency and validity of the proposed solvent, i.e. pinene, to substitute the organic solvents with which it has been compared.

**Key words:** Valorization, Pine, Essential oil, Bio-active compounds, Extraction, Pinene, Green solvent