

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

Université SAAD DAHLEB BLIDA-1

Faculté Des Sciences

Département de Chimie



En vue de l'obtention du diplôme de Master en Chimie

Spécialité : Chimie Des Produits Naturels

Mémoire Présenté Par

HELLOU Imed

SELMY Yacine



***PREPARATION D'UNE NANOEMULSION A BASE DE
L'HUILE ESSENTIELLE DE CITRUS AURANTIFOLIA***

***ANALYSE PHYSICOCHEMIQUE ET ACTIVITE
ANTIOXYDANTE***

Soutenu le 16/09/2021

MEMBRES DU JURY :

Dr. ZIANE Rania	Université Blida 1	Président
Dr. SABOUR Smain	Université Blida1	Examineur
Dr. ZAHY Mohamed Reda	Université Blida1	Promoteur

Promotion 2020/2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمد لله الذي
بنعمته تتم
الصالحات
الحمد لله الذي
هدانا لهذا وما
كنا
لنهدى لولا
أن هدانا الله



Remerciements

On remercie notre créateur dieu tout puissant de nous
avoir béni de sa bonté et sa miséricorde.

Nos parents pour leur soutien inconditionné.

On tient à exprimer aussi notre reconnaissance, et nos
sincères remerciements à notre encadreur Monsieur

ZAHI Mohamed Reda pour nous avoir dirigé

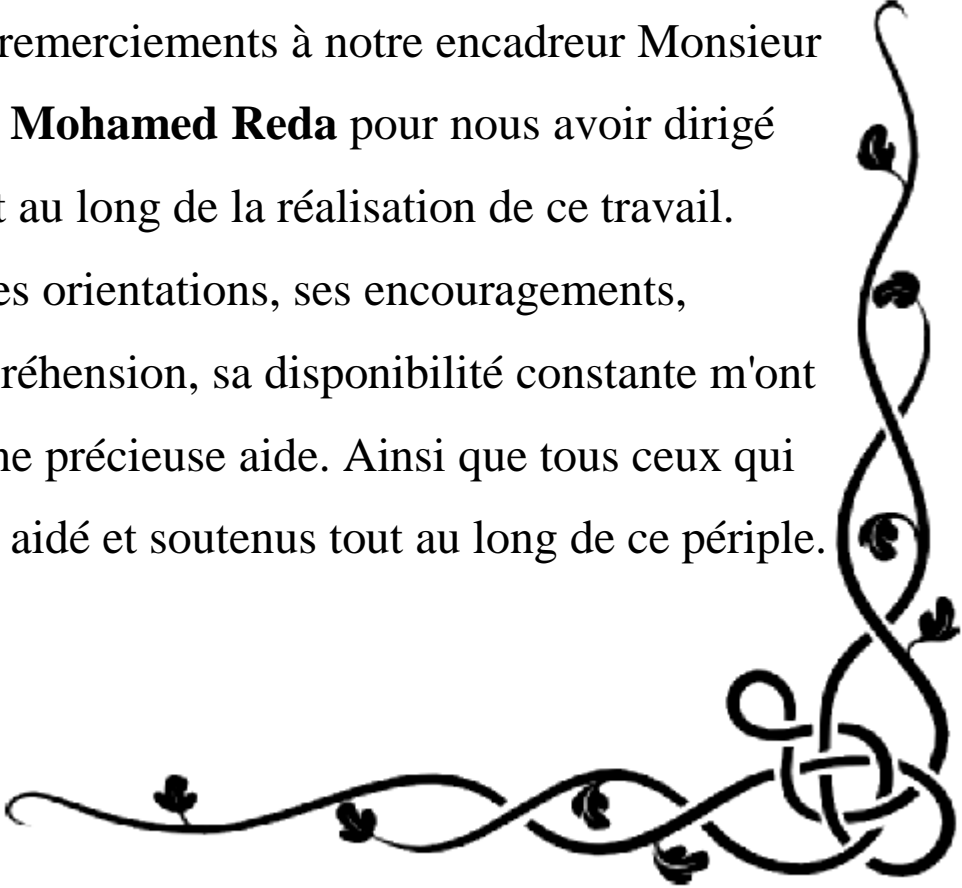
Tout au long de la réalisation de ce travail.

Ses orientations, ses encouragements,

Sa compréhension, sa disponibilité constante m'ont

Été d'une précieuse aide. Ainsi que tous ceux qui

Nous ont aidé et soutenus tout au long de ce périple.





Dédicace

On dédie ce modeste travail à
nos parents, nos proches et nos
amis pour leurs présences à nos
côtés durant les moments de
besoins

Résumé

Cette étude porte sur la détermination des caractéristiques physicochimiques (densité, pouvoir rotatoire, indice de réfraction ..., indice d'acide, indice d'iode, indice de peroxyde ...) et l'activité antioxydante par le biais du test de DPPH de l'huile essentielle de *Citrus Aurantifolia*. Ainsi que l'optimisation des conditions opératoires comme la concentration du tensioactif, le type de Co-tensioactif et les méthodes de préparation à savoir méthode d'émulsiification spontanée (ES) et celle de la Phase inverse (PI) pour la préparation d'une nanoémulsion à base de cette huile essentielle ayant une bonne stabilité.

D'après les résultats des analyses des propriétés physico-chimiques, nous avons constaté que certaines valeurs obtenues étaient conformes aux normes de commercialisation des huiles essentielles, contrairement à d'autres qui ne correspondent pas aux critères établies par les différentes pharmacopées est proches de certains travaux antérieurs.

Les résultats de l'optimisation opératoire des nanoémulsions ont montré que la nanoémulsion avec 10% tween 80 + PG est la plus stable car elle a la plus faible absorbance.

Les résultats de l'activité antioxydante obtenus montrent que la Nanoémulsion avec 10% tween 80 + PG a une activité antioxydante très importante (IC₅₀ = 4.86 mg/ml) par rapport à celle de l'huile essentielle *Citrus Aurantifolia* (IC₅₀= 12.55 mg/ml) et les autres nanoémulsions.

Sommaire

Table des matières

Résumé	5
Liste des Figures	8
Liste des tableaux.....	9
Abréviations	10
Introduction générale	12
Chapitre 01 : Synthèse Bibliographique.....	13
1.1 Généralité Sur Les Huiles Essentielles	16
1.1.1 Méthodes d'extraction des Huiles essentielles	16
1.1.2 Propriétés Physico-Chimiques des Huiles Essentielles	18
1.2 Généralités sur la famille des citrus	18
1.2.1 Le genre citrus	18
1.2.2 Le Citron vert.....	19
1.2.2.1 Classification du citron vert	19
1.2.2.2 Particularités de culture	19
1.2.2.3 Valeur Nutritive du Citron	20
1.2.2.4 L'huile essentielle du citron vert	20
1.2.2.5 Composition chimique d'huile essentielle de citrus	21
1.3 Généralités sur Les Nanoémulsions	21
1.3.1 Nanoémulsions.....	21
1.3.2 Préparation des Nanoémulsions	22
1.3.2.1 Méthodes d'émulsification à haute énergie.....	22
1.3.2.2 Méthodes d'émulsification à faible intensité d'énergie	24
1.3.2.3 Agents émulsionnants utilisés pour la formulation des Nanoémulsions	26
1.3.2.4 Caractérisation des Nanoémulsions	27
1.3.2.5 Mécanismes de déstabilisation	27
1.3.2.6 Modes de stabilisation des Nanoémulsions	30
1.4 Généralités sur les activités anti-oxydantes	30
1.4.1 Un radical libre	30
1.4.1.1 Production de radicaux libres.....	31
1.4.2 Le stress oxydatif.....	31
1.4.3 Les espèces réactives oxygénées (ERO).....	32

1.4.3.1 Les radicaux ioniques	32
1.4.3.2 Les radicaux non ioniques	32
1.4.4 Les antioxydants.....	33
1.4.4.1 Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant.....	33
1.4.4.2 Les antioxydants endogènes	33
1.4.4.3 Les antioxydants exogènes.....	33
1.4.4.4 Mécanisme d'action des antioxydants	35
1.4.4.5 Evaluation de l'activité antioxydante	35
1.4.4.6 Test DPPH.....	36
Chapitre 02 : Les caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle et la préparation des Nanoémulsions	37
2.1 Matériels et produits.....	38
2.2 Huile essentielle du citron vert.....	39
2.3 Analyse physico-chimique de l'huile essentielle du citrus Aurantifolia	39
2.3.1 Mesure des indices physiques.....	39
2.3.1.1 Densité relative	39
2.3.1.2 Indice de réfraction	40
2.3.1.3 Mesure du pH.....	40
2.3.1.4 Pouvoir Rotatoire	40
2.3.1.5 Miscibilité à l'éthanol	41
2.3.2 Mesure des indices chimiques	41
2.3.2.1 Indice d'acide	41
2.3.2.2 Indice d'ester.....	41
2.3.2.3 Détermination de l'indice de saponification.....	42
2.3.2.4 Indice d'iode.....	43
2.3.2.5 Indice de peroxyde	44
2.4 Préparation des Nanoémulsions	45
2.4.1 Nanoémulsions Par émulsification spontanée	45
2.4.2 Les Nanoémulsions par Phase inverse.....	45
2.5 Résultats et discussions.....	46
Chapitre 03 : L'évaluation de l'activité antioxydant de l'huile essentielle et la nanoemulsion	55
3 Tests d'activité anti oxydante.....	56
3.1 Préparation de la solution de DPPH	56
3.2 Préparation de la solution mère.....	56
3.3 Préparation des solutions filles	56
3.4 L'ajout du DPPH.....	57

3.5 Résultats et discussions.....	59
Conclusion Générale	63
Références	64
Annexes.....	69

Liste des Figures

Figure 1.1 : Poche sécrétrice dans le Citrus. Coupe transversale x 25 Sous le microscope photonique	16
Figure 1.2 : Photo d'arbres, de feuilles et de fleur de citron vert	19
Figure 1.3 : Valeur nutritive du citron vert	20
Figure 1.4 : Poche sécrétrice schizolysigènes des Citrus Aurantifolia	20
Figure 1.5: Principe de fonctionnement de l'homogénéisation à haute pression	22
Figure 1.6 : processus de micro-fluidisation	23
Figure 1.7 : les composants d'un ultrason	24
Figure 1.8 : Illustration du phénomène d'émulsification spontanée d'après Mc Clements2011	24
Figure 1.9: Les méthodes à faible énergie impliquent la décomposition de macroémulsions	25
Figure 1.10 : illustration par méthode inversion de phases par la composition.	26
Figure 1.11: Illustration du mûrissement d'Ostwald	28
Figure 1.12: Illustration du phénomène de la coalescence entre deux gouttelettes	29
Figure 1.13: les différentes sources d'oxydations	32
Figure 1.14 : structure d'acide ascorbique	34
Figure 1.15 : structure de la vitamine E	34
Figure 2.1: pycnomètre rempli d'huile essentielle (Citrus Aurantifolia)	46
Figure 2.2: La mesure de PH d'huile essentielle (Citrus Aurantifolia)	48
Figure 2.3: la solution d'HE après le titrage (couleur rose clair)	49
Figure 2.4: La disparition de la couleur rose après le titrage avec HCl	50
Figure 2.5: Indice d'iode, le mélange (HE+CCl4+I2+KI+H2O) après le dosage.....	50
Figure 2.6: l'émulsion de 2% à 12%	51
Figure 2.7 : les absorbances des nanoémulsions.....	52
Figure 2.8: l'émulsion 10 % de Tween le tube gauche (L'éthylène glycol), le tube droite (propylène glycol)	53
Figure 2.9: Les nanoémulsions de la phase inverse	54
Figure 3.1: préparation de la solution mère	56
Figure 3.2: Préparation des solutions filles	57
Figure 3.3: Préparation d'activités antioxydantes	57
Figure 3.4: pourcentage d'inhibition de fonction de la concentration	61
Figure 3.5 : les différentes ic50 pour différente échantillons	61

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Classification botanique	19
Tableau1. 2 : les composants de base d'huile essentielle de citrus.....	21
Tableau 1. 3 : les Principales sources de production des radicaux libres	31
Tableau1. 4 : les pathologies liées au stress oxydatif	32
Tableau 2.1: les matériels et les produits.....	38
Tableau 2.2: fiche technique de l'huile essentielle de zeste de citron vert "VieBio"	39
Tableau 2.3 : Propriétés organoleptiques d'huile essentielle de citron vert	46
Tableau 3.1: Les résultats de l'absorbance et l'inhibition	59

Abréviations

A : Absorbance

AFNOR : L'Association française de normalisation

C : Concentration

ACC : Activité antioxydante cellulaire

CCl₄ : Tétrachlorure de carbone

CUPRAC : Antioxydant réducteur d'ions cuivriques

D : Coefficient de diffusion

DCFH-DA : Diacétate de dichloro-dihydro-fluorescéine

DLS : Diffusion dynamique de la lumière.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

E.G : Ethylène glycol

E/H : Eau dans l'huile

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ES : Emulsifications Spontanées

FOX : Oxydation ferreuse

FRAP : Redistribution de fluorescence après photo-blanchiment

g : Gramme

H/E : Huile dans l'eau

H⁺ : Proton

HCL : Chlorure d'hydrogène (acide chlorhydrique)

I₂ : diiode

IC₅₀ : La concentration inhibitrice médiane

I_p : Indice de peroxyde

I_R : Indice de réfraction

kg : Kilogramme

KI : Iodure de potassium

KOH : L'hydroxyde de potassium

LBL : stabilisation couche par couche

LDL : lipoprotéines de faible densité

m : Mètre.

m² : Mètre carré.

m³ : Mètre cube.

mEq : Le milliéquivalent

mg : Milligramme.

MHz : Megahertz.

ml : Millilitre

N.m⁻¹ : Newton/Mètre

NO: Monoxyde d'azote

O₂ : Dioxygène

O²⁻ : Radical super-oxyde

OH: Radical hydroxyle

ONOOH : Le nitroperoxyde

ORAC : capacité d'absorption des radicaux oxygénés

P.G : le propylène glycol

PEO : le poly (oxyéthylène).

PIC : Inversion de phases par la composition.

PIT : Température d'inversion de phase.

PVP : le poly (vinylpyrrolidone).

PI : Phase inverse.

r : Rayon de la goutte

S : Seconde

SAXS : Diffusion des rayons X aux petits angles.

SOD : super-oxyde dismutase

T : temps

Tween 80 : (polysorbate80) tensioactif non ionique surfactant les aliments et les cosmétiques et émulsifiant souvent utilisée avec M=1310g/mol, densité =1.102g/mL , ébullition >100°C et un solubilité dans l'eau égale à 100mL/L

UV-vis : ultraviolet-visible

V : Volume

α: Pouvoir rotatoire

γ : Tension interfaciale

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

Introduction générale

Depuis la nuit des temps, l'homme s'est toujours soigné par les plantes, de manière empirique, guidé par la tradition ou les coutumes. Les vertus thérapeutiques des plantes ont été expérimentées depuis lors et leurs précieuses caractéristiques se sont transmises oralement de génération en génération ou consignés dans les vieux écrits. Les remèdes de bonne réputation ont prévalu malgré le développement de la médecine moderne qui est venue marginaliser le recours aux techniques médicales naturelles [1].

Depuis longtemps, les gens recherchent un moyen de séparer les produits aromatiques. Ils ont réussi en soumettant la matière à la chaleur. Les substances aromatiques sont transformées en vapeur, il suffit de les collecter et de les refroidir à l'état liquide. Les Chinois et les Indiens le connaissent depuis le VII^e siècle avant JC. Les Egyptiens et les Arabes ont prévalu dans les propriétés médicinales et aromatiques des plantes : la conservation des momies, l'aromatisation des lotions de bain, la désinfection des plaies avec des onguents et des parfums, et la production de boissons aromatiques [1].

L'extraction des huiles essentielles de manière générale, se compose de deux étapes : l'extraction et l'analyse. Alors que l'étape analytique requiert en général quelques minutes, l'étape d'extraction nécessite plusieurs heures. C'est le cas de la méthode de Clevenger, inventée en 1928 [2], qui est la procédure de distillation de référence. Cette technique est basée sur l'immersion d'un échantillon solide dans l'eau portée à ébullition. Bien qu'elle soit très efficace et largement acceptée par la communauté scientifique, la distillation par le Clevenger présente néanmoins plusieurs inconvénients. Les plus significatifs sont les longues heures d'extraction requises et les grands volumes d'eau consommés. Depuis l'observation de la barre chocolatée qui avait fondu dans la poche de Percy Spencer en 1946 pendant ses travaux sur les radars, les effets thermiques potentiels des micro-ondes ont été largement caractérisés et validés par la communauté scientifique [2]. En effet, l'énergie électromagnétique a été très exploitée dans de nombreux domaines pour son chauffage rapide et sélectif : synthèse organique, traitement des déchets radioactifs, procédés de transformation et de conservation agro-alimentaires, vulcanisation, désinsectisation... Rapidement, les micro-ondes ont été utilisées comme source

d'énergie pour l'extraction de molécules d'intérêt. Différents procédés d'extraction assistés par micro-ondes ont été développés dans le but de contrarier les limites des techniques d'extraction conventionnelles [3].

Selon Webber et al. (1967) Les agrumes ont une longue histoire en raison de la découverte progressive de l'application de leurs huiles essentielles dans les soins de santé. [4], La plupart des types d'agrumes proviennent des grandes régions à climat tempéré autour de l'Himalaya et de l'Asie du Sud-Est. La première trace écrite d'agrumes a été trouvée dans la littérature sanskrite vers 800 av. La culture des agrumes a commencé en Chine vers 500 avant JC. Le pamplemousse a été le premier agrume introduit par Theophrastus en Europe en 310 avant JC. Suite à la conquête d'Alexandre le Grand, les botanistes grecs ont découvert des pamplemousses en Perse et les ont baptisés de «pommes de midi». Le cédrat fut d'abord été utilisé comme parfum et insecticide. Après ça, s'il est préparé correctement, il est considéré comme comestible. Les Romains importaient des oranges et des citrons de leur province comme produits de luxe coûteux pour les banquets. Les plantes qu'ils ont plantées à Rome ont survécu, mais sans grand succès [4].

Il existe plusieurs types d'agrumes qui sont largement consommés et utilisés dans le monde. Les plus importants sont [5,6] :

Parmi eux, on cite particulièrement le citron, c'est le fruit du citronnier ; son nom scientifique est *Citrus limon*. Certains prétendent que ce fruit serait né d'un croisement entre le pamplemousse, le cédrat et la lime (citron vert). Le citron était peut-être cultivé par les Grecs et les Romains, voire par les Égyptiens, mais on ne trouve guère de traces de cette culture, sinon sur des mosaïques de l'époque. Il pourrait d'ailleurs s'agir du *cédrat (Citrus medica)*, son ancêtre probable, connu de longue date, tant à l'est qu'à l'ouest, pour ses propriétés médicinales. Au fil des invasions et des fluctuations climatiques, il se peut que le citron ait disparu du sud de l'Europe à quelques reprises pour y être réintroduit plus tard. Après les invasions barbares (350 à 400 de notre ère), ce sont les Arabes qui reprennent les rênes du commerce. Ils diffuseront le citron, l'introduisant en Afrique du Nord, en Afrique et en Espagne, de même que dans tout le bassin méditerranéen, à l'exception des côtes italiennes et françaises.

Introduction Générale

Enfin, lors des Croisades au Proche-Orient, les Européens de l'ouest, de l'est et du nord découvriront les agrumes et développeront un goût pour ces fruits acides et juteux qu'ils rapporteront dans leur pays respectif [5].

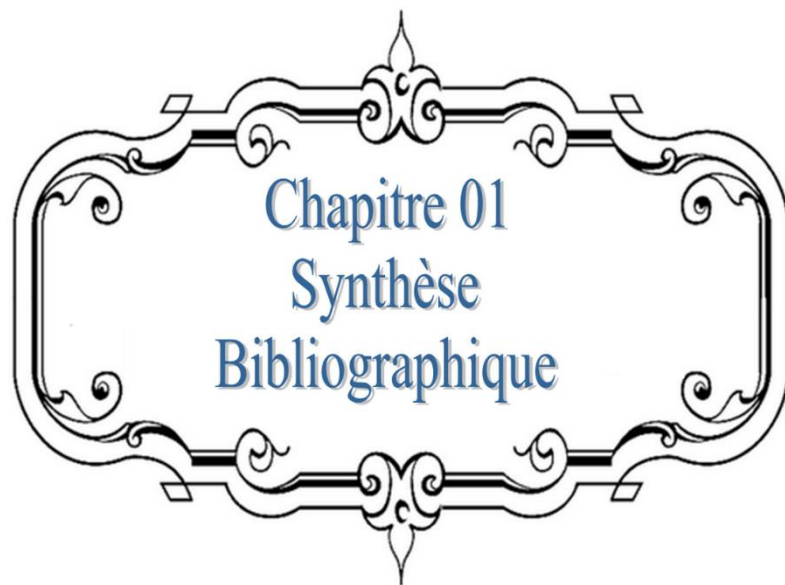
L'huile essentielle du *citrus Aurantifolia* possède de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elle est utilisée pour ses propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanalaire ou au niveau de la *microflore* vaginale et d'origine fongique contre les dermatophytes. Cependant, elle possède également, des propriétés cytotoxiques qui l'ont rapproché donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. Dans les domaines phytosanitaires, l'huile essentielle du *citrus Aurantifolia* ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et en agroalimentaire, contre les microorganismes contaminant les denrées alimentaires [6].

Ce mémoire est subdivisé en trois chapitres :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique.

Le deuxième chapitre tourne au tour du Les caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle et la préparation de la Nanoémulsions.

Le troisième chapitre traite l'évaluation d'activité antioxydant de l'huile essentielle et la Nanoémulsions.



Chapitre 01
Synthèse
Bibliographique

1.1 Généralité Sur Les Huiles Essentielles

Les huiles essentielles sont un ensemble de molécules complexes volatiles hydrophobes odorantes obtenues à partir de matières végétales de la plante (à partir des racines, de l'écorce, des feuilles, des fleurs ou des tubercules). Une goutte d'huile essentielle contient en moyenne 150 molécules différentes en particulier les terpènes (hydrocarbures non aromatiques), qui sont dérivés de l'isoprène au lieu de Benzène et composés oxygénés (alcool, aldéhydes, cétones, esters) [7].

Elles sont bio-synthétisées par des plantes odorantes dites aromatiques comme métabolites secondaires. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures sécrétrices bien spécialisées telles que les poils sécréteurs (*Lamiaceae*), les poches sécrétrices (*Myrtaceae*) et les canaux sécréteurs (*Apiaceae*). Ces structures sont impliquées dans le stockage des huiles et ils sont également dotées d'un caractère physiologique sécrétoire bien défini, qui diffère selon l'organe végétal en question [8].

Les huiles essentielles sont élaborées et stockées dans des poches chizolysigènes (Figure 1.1).

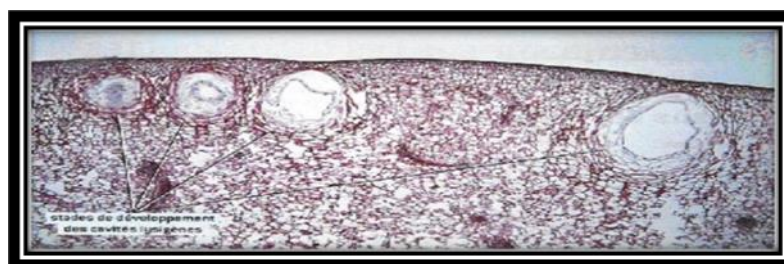


Figure 1.1 : Poche sécrétrice dans le Citrus. Coupe transversale x 25. Sous le microscope photonique [2]

1.1.1 Méthodes d'extraction des Huiles essentielles

❖ L'hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à distiller un composé par entraînement à la vapeur d'eau. C'est une méthode très utilisée dans l'extraction des huiles essentielles [2].

Chapitre 01 : Synthèses Bibliographiques

❖ Distillation par Entraînement à la Vapeur d'Eau

C'est l'une des méthodes officielles d'obtention des huiles essentielles. Contrairement à l'hydrodistillation, cette technologie ne permet pas à l'eau de rentrer en contact direct avec la matière végétale à traiter. La vapeur de la chaudière traverse la matière végétale au-dessus d'une grille [9].

❖ Hydro-Diffusion

Elle consiste à faire passer du haut vers le bas, et à pression réduite la vapeur d'eau au travers la matière végétale. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange (vapeur d'eau-HE) dispersé dans la matière végétale. [2].

❖ Expression à Froid

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid, qui est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères, cette essence est ensuite entraînée par un courant d'eau froide [10].

❖ Enfleurage

L'enfleurage est l'un des plus anciens procédés. Il est basé sur l'affinité des parfums pour les graisses du à leur composition chimique (hydrophobe). Dans ce système d'extraction, on distingue deux méthodes selon la résistance de la plante à la chaleur : l'enfleurage à froid et l'enfleurage à chaud [10].

❖ Autres méthodes d'extraction

La distillation par entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation sont les méthodes les plus importantes aujourd'hui pour l'obtention des huiles essentielles à partir des plantes. Néanmoins, d'autres techniques ont été développées [11] :

- ✓ **Extraction par les fluides supercritiques.**
- ✓ **Extraction assistée par micro-ondes.**
- ✓ **Extraction par ultrasons.**

1.1.2 Propriétés Physico-Chimique Des Huiles Essentielles

A ce jour, les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, solubilité dans l'alcool, indice d'acide, d'ester...) sont exigées pour leurs évaluation commerciales. Ces huiles sont connues par leur forte odeur aromatique liée à leur volatilité et sont généralement incolore ou faiblement colorée (jaune pâle). Cependant, on rencontre quelques-unes d'entre elles qui sont respectivement colorées en rouge, vert et bleu (camomille) [8].

La plus part ont des indices de réfraction élevés et elles sont le plus souvent optiquement actives car elles contiennent des molécules asymétriques. Ces substances sont solubles dans les solvants organiques usuels et les huiles grasses. Elles sont liposolubles et très peu soluble dans l'eau à laquelle toutefois elles communiquent leur odeur, on parle alors d'eau aromatique [8].

1.2 Généralité sur la famille des citrus

1.2.1 Le genre citrus

Le Citrus est un genre de plantes des pays chauds de la famille des *Rutacées*, regroupant des arbres et arbustes, dont plusieurs espèces sont cultivées pour leurs fruits. Parmi les espèces de ce genre, nous trouvons le citronnier, le lime, l'oranger amer, le mandarinier, le clémentinier, le pamplemoussier, etc... [8].

❖ La famille des Rutacées

Les Rutacées sont des plantes dicotylédones, ligneuses et rarement herbacées des régions tempérées à tropicales, qui comprennent 140 genres et de 1300 à 1600 espèces. Elles présentent des glandes oléifères qui apparaissent par transparence comme des points translucides contenant des huiles essentielles. Les fleurs sont généralement régulières et hermaphrodites, Les carpelles sont soudés en un gynécée (en botanique c'est le pistil) à ovaire pluriloculaire supère (en parlant d'un organe qui n'est pas soudé à un autre), parfois infère (synonyme d'adhère, se dit de l'ovaire d'une plante soudé de sa longueur avec le calice). Les fruits sont des baies, des drupes, des capsules ou des follicules [8].

1.2.2 Le Citron vert

Le citron vert lime, ou *Citrus Aurantifolia*, est un petit agrume facile à cultiver en pot sous nos climats. Peu rustique (-2°C à -4°C), sa réussite en pleine terre reste aléatoire. Comme il s'adapte facilement en pot, le citronnier vert lime décore de sa floraison odorante et de ses nombreux fruits, balcons, terrasses, serres et vérandas, et peut même être cultivé à l'intérieur [8].



Figure 1.2 : Photo d'arbres, de feuilles et de fleur de citron vert [13].

1.3.2.1 Classification du citron vert

Tableau 1.1 : Classification botanique [14]

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Rutaceae</i>
Genre	<i>Citrus</i>

1.2.2.2 Particularités de culture

Résistance au froid : - 5 à - 6 °C. Culture en intérieur : à interdire. Il craint particulièrement la sécheresse des appartements chauffés. Très vigoureux en pleine terre, il faut le tailler fréquemment. En pot également la taille de formation est impérative les premières années [22].

1.2.2.3 Valeur Nutritive Du Citron

Comme tous les agrumes, le citron est un fruit très juteux renfermant 90 % d'eau, fortement acide (pH inférieur à 3). L'acidité est essentiellement due à la présence de l'acide citrique, accompagné de faibles quantités d'acides malique, caféique et férulique. Le fruit a une haute teneur en vitamine C (40 à 50 mg/100g) et d'un large éventail de vitamines du groupe B avec des quantités considérables de flavonoïdes [16].



Figure 1.3 : Valeur nutritive du citron vert

1.2.2.4 L'huile essentielle du citron vert

L'huile essentielle du citrus *Aurantifolia* est un agent naturel conservateur et aromatique, elle est obtenue par expression à froid de l'écorce ou le zeste. Ce dernier contient des poches schizolysigènes, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices [17] (figure 1.4). L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Bien qu'une huile essentielle puisse contenir un grand nombre d'éléments biochimiques, les molécules les plus fréquemment rencontrées sont : les terpènes, les alcools, les cétones, les aldéhydes, les esters et les éthers [17].

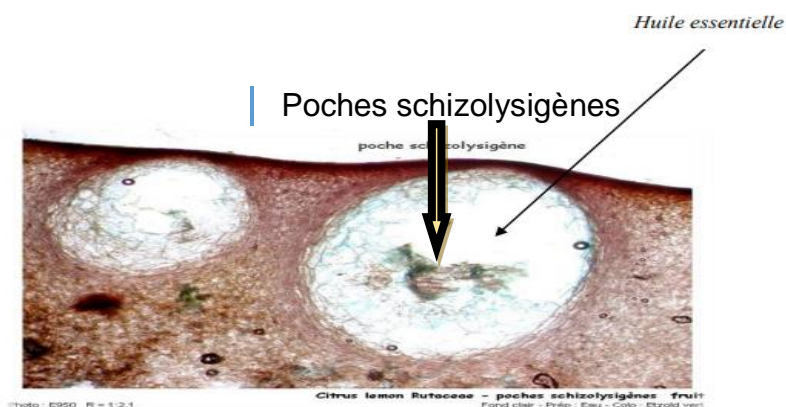


Figure 1. 4 : Poche sécrétrice schizolysigènes des Citrus Aurantifolia [17].

1.2.2.5 Composition chimique d'huile essentielle de citrus

Le développement de la technologie analytique moderne a permis de détecter plus de 341 composés volatils dans l'huile de citron [7]. Généralement, on peut dire qu'il est composé principalement de (Tableau1.2) [18] :

Tableau1. 2 : les composant de base d'huile essentielle de citrus[18]

Composants	Pourcentage de Présence
Terpènes (d-limonène)	92%
Alcools libres (Linalol, Terpinéol)	0,37%
Aldéhydes (nonylique, décyclique, dodécyclique)	0,78%
Esters (acétate de linalyle 1%)	2,10%
Phénols	0,09%
Sesquiterpènes (non identifiés)	0,03%
Acides libres (formique, acétique, cinnamique)	0,05%
Le citral	1 à 5%
Le β -pinène	4 à 9%
Le γ -terpinène	9 à 12%

1.3 Généralités sur Les Nanoémulsions

1.3.1 Nanoémulsions

Les Nanoémulsions sont définies comme un type d'émulsion contenant deux phases liquides non miscibles avec de très petites gouttelettes à l'échelle nanométrique (20-500 nm). En raison de leurs tailles caractéristiques, elles sont transparentes ou translucides et restent extrêmement stables aux précipitations par rapport aux émulsions. De plus, les Nanoémulsions sont thermodynamiquement instables, mais elles présentent une stabilité dynamique élevée. La viscosité finale de la dispersion est similaire à celle de l'eau. Dans la littérature, elles sont souvent appelées émulsions submicroniques, émulsions ultrafines ou encore mini-émulsions [19].

1.3.2 Préparation des Nanoémulsions

Les Nanoémulsions peuvent être préparées par différentes méthodes classées dans deux grandes catégories : les méthodes à haute énergie et les méthodes à basse énergie [19].

1.3.2.1 Méthodes d'émulsification à haute énergie

❖ Méthode d'homogénéisation de la vanne haute pression

C'est une technique basée sur l'utilisation d'un homogénéisateur à valve haute pression pour produire des gouttelettes ultrafines. Cette méthode est actuellement la plus répandue pour l'obtention d'émulsions fines à l'échelle industrielle [20].

L'homogénéisateur est équipé d'une pompe qui amène l'émulsion primaire dans une chambre au-dessus de l'appareil, puis la force à traverser une valve étroite à l'extrémité de cette chambre. L'émulsion subit alors une combinaison de forces disruptives intenses (Figure 1.5). La turbulence, qui est le mécanisme prédominant de l'émulsification, conduit à la rupture des grosses gouttes en gouttelettes plus petites [20].

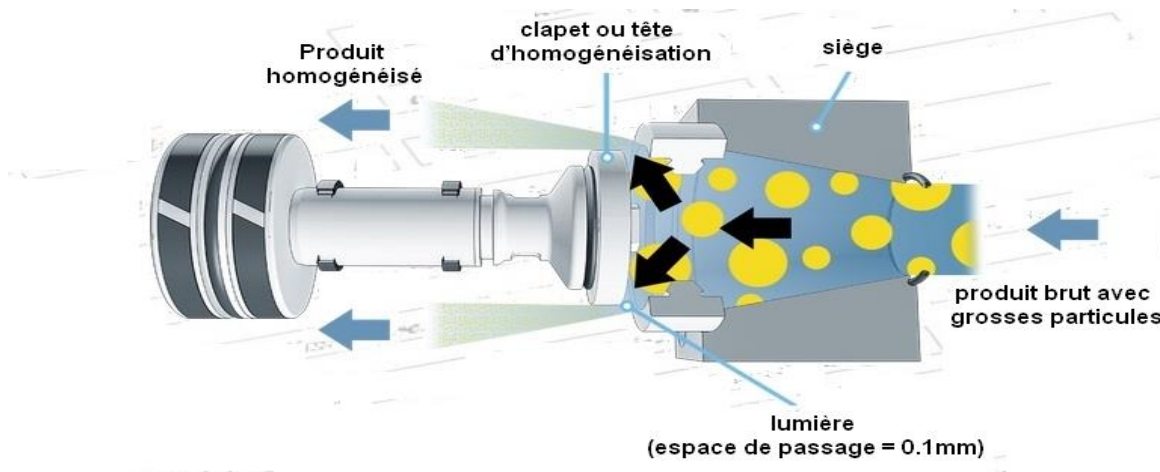


Figure 1. 5: Principe de fonctionnement de l'homogénéisation à haute pression [21].

❖ Méthode de micro-fluidisation

Dans cette technique, on utilise un appareil « microfluidiseur » équipé d'une pompe volumétrique à haute pression qui force le produit à passer dans la chambre d'interaction qui contient des canaux très fins, dits "micro-canaux". Ces derniers sont conçus de manière à ce que les deux courants de l'émulsion s'impactent à haute vitesse dans la chambre d'interaction, permettant d'obtenir

des gouttelettes très fines submicroniques lors de l'émulsification par cette méthode, les deux phases sont combinées et traitées dans un homogénéisateur en ligne pour obtenir une émulsion primaire. Ensuite, cette dernière est introduite dans la chambre d'interaction plusieurs fois jusqu'à obtenir la taille souhaitée (Figure 1.6). Enfin, la Nanoémulsion obtenue est filtrée pour éliminer les grosses gouttes et obtenir une Nanoémulsion homogène mono dispersée [22].

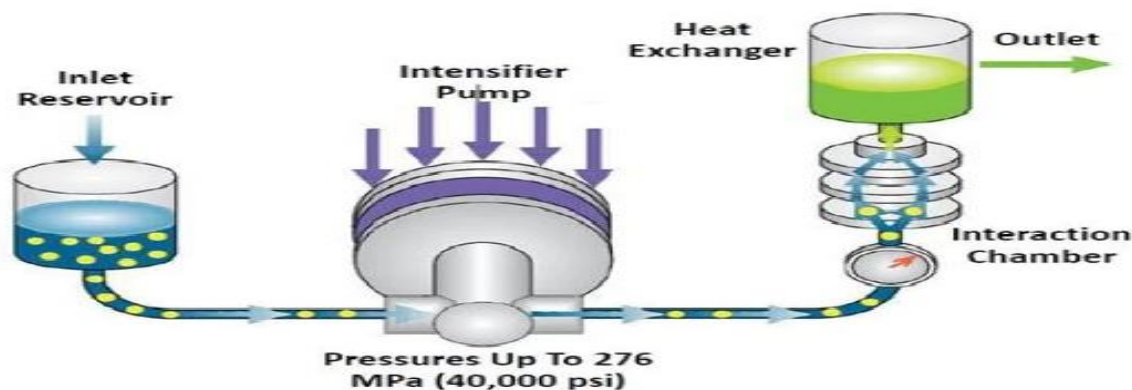


Figure 1. 6 : processus de micro-fluidisation [22].

❖ Méthode d'ultrasonication

La méthode de sonication est la méthode préférée avec les huiles de faible viscosité. Elle utilise des ondes ultrasoniques à des fréquences élevées (> 20 MHz) pour former des émulsions très fines. Il est possible par cette méthode de réduire la taille d'une émulsion préalablement préparée ou de produire directement des Nanoémulsions à partir de deux phases séparées (figure 1.7). L'apport d'énergie dans cette méthode est relativement faible comparé à celui de l'homogénéisation ou de la microfluidisation. De plus, le dépôt d'énergie ultrasonore est limité à un petit volume (1 cm³ dans la plupart des cas). Pour cette raison, l'utilisation de l'émulsification par ultrasons est limitée à l'échelle du laboratoire [23].

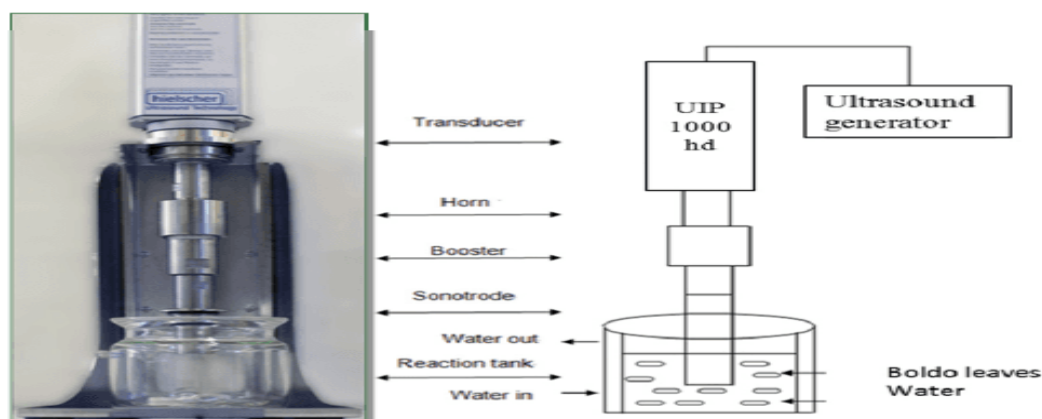


Figure 1. 7 : les composants d'un ultrason [23].

1.3.2.2 Méthodes d'émulsification à faible intensité d'énergie

❖ Emulsification spontanée

Le procédé est basé sur un système huile/tensioactif simple, réglé à une température constante où le tensioactif a la meilleure affinité pour la phase huileuse. Lorsque les deux phases sont mélangées, les tensioactifs et autres composés miscibles à l'eau se déplaceront vers la phase aqueuse (Figure 1.8), ce qui provoquera de fortes perturbations et augmentera la surface à l'interface des deux phases. Ce phénomène peut entraîner un effet de bourgeonnement, ce qui conduit à la formation de gouttelettes d'huile. Plus la diffusion est rapide, plus la perturbation est importante, qui augmente avec l'augmentation de la vitesse de diffusion, ce qui facilite la formation de gouttelettes de taille nanométrique [22].

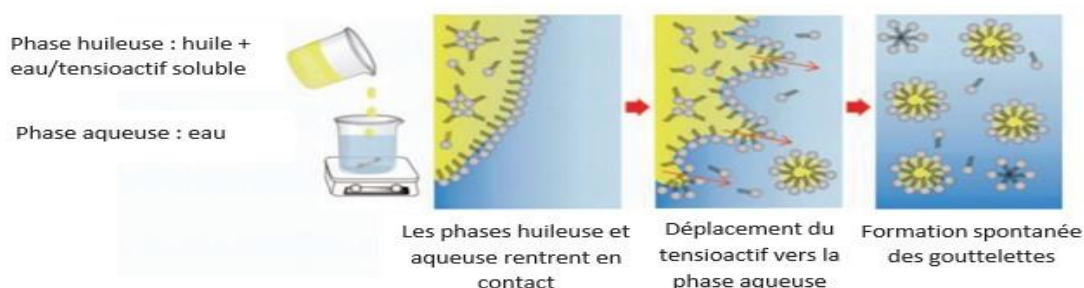


Figure 1. 8 : Illustration du phénomène d'émulsification spontanée d'après Mc Clements2011 [22]

❖ Température d'inversion de phase (PIT)

Le principe de la méthode de température d'inversion de phase est d'induire une inversion de phase (de E/H à H/E ou vice versa) à travers une sorte de

mésophase appelée inversion de phase. Le « double continu » est obtenu grâce aux changements de température. La force motrice derrière cette inversion de phase est liée avec le changement des propriétés physiques et chimiques du tensioactif avec la température (Figure 1.9). C'est le cas des tensioactifs non ioniques, l'hydrophilie de ce tensioactif est déterminée par l'interaction de Van der Waals entre le pôle hydrophile du tensioactif et la phase aqueuse, ce qui lui confère une solubilité dans l'eau. Lorsque la température augmente, le tensioactif devient plus difficile à dissoudre dans l'eau. En effet, l'agitation thermique est prédominante dans l'interaction entre la phase hydrophile et la phase aqueuse, de sorte que le tensioactif passe de la phase aqueuse à la zone d'interface, générant ainsi une extension de surface [24].

L'inversion de phase peut aussi être due à un changement de la géométrie de la molécule de tensioactif qui est décrite par le paramètre d'empilement.

$$p = \frac{v}{L\alpha_0} \quad \text{Équation (1)}$$

Où V et L sont respectivement le volume (m^3) et la longueur (m) de la chaîne hydrophobe et α_0 est l'aire de section transversale de la tête hydrophile (m^2).

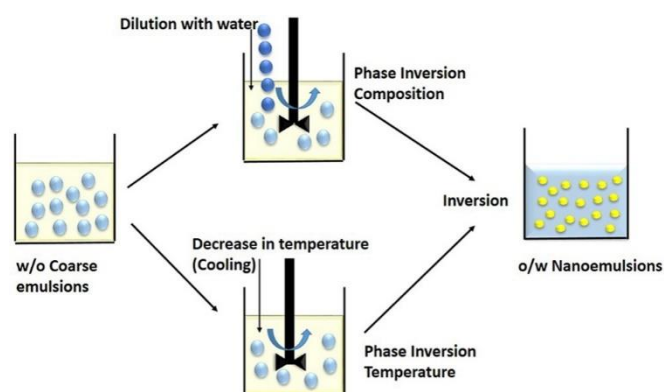


Figure 1. 9: Les méthodes à faible énergie impliquent la décomposition de macroémulsions [24].

❖ Inversion de phases par la composition (PIC)

Le procédé consiste à ajouter un composant (eau ou huile) à un mélange des deux autres composants à température constante (tensioactif huileux ou tensioactif aqueux). Cette transformation est irréversible. L'augmentation de la teneur en eau dans le système conduit à une augmentation de l'hydratation de la

chaîne du tensioactif polyoxyéthylène, ce qui fait passer la courbure spontanée du tensioactif d'une valeur négative à zéro [25].

A ce moment, l'hydrophilie et la lipophilie ont atteint un équilibre, et de l'eau supplémentaire est ajoutée pour faire passer la courbure du tensioactif de zéro à positive, et en même temps, la microémulsion H/E est convertie en une Nanoémulsion H/E (Figure 1.10). Grâce à la fusion de gouttelettes d'eau, une phase continue est formée et la phase huileuse est divisée en gouttelettes à l'échelle nanométrique [25].

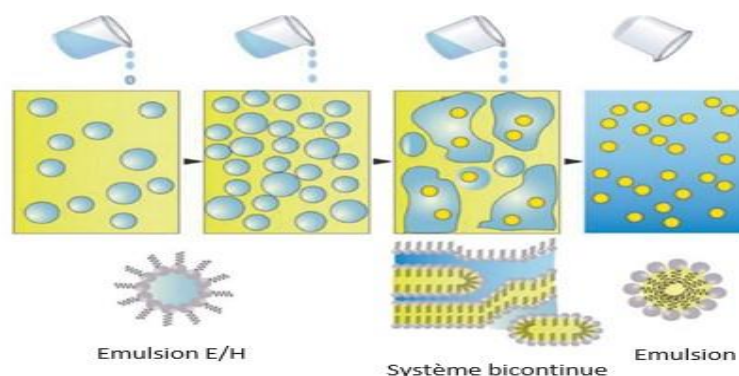


Figure 1. 10 : illustration par méthode PIC [25].

1.3.2.3 Agents émulsionnants utilisés pour la formulation des Nanoémulsions

Les émulsifiants sont des molécules amphiphiles. Ils ont une activité d'interface liquide-liquide et peuvent réduire la tension interfaciale, il est donc possible d'obtenir et de stabiliser des émulsions. Généralement sont divisés en deux catégories : les tensioactifs de bas poids moléculaire et les émulsifiants macromoléculaires (ou polymères) [26].

❖ Tensioactifs de faible masse molaire

Les tensioactifs de ce groupe sont constitués de têtes hydrophiles (polaires) et de chaînes hydrophobes ou lipophiles (non polaires). Par conséquent, ces molécules rechercheront des milieux hydrophiles et lipophiles. Par conséquent, ils seront adsorbés sur la surface libre ou l'interface et réduiront la tension interfaciale. Les tensioactifs sont classés selon la nature de la tête polaire. Il existe deux groupes différents : les tensioactifs ioniques (anioniques, cationiques ou

amphotères) et les tensioactifs non ioniques, tels que les tensioactifs éthoxylés. Tensioactif utilisé pour stabiliser le médicament NEs [26].

❖ *Agents émulsionnants macromoléculaires*

Les polymères utilisés dans ce domaine, parfois appelés polymères tensioactifs, sont généralement divisés en deux catégories :

- Les homopolymères, tels que le poly (oxyéthylène)
- PEO et le poly (vinylpyrrolidone) PVP [27].

1.3.2.4 Caractérisation des Nanoémulsions

Les propriétés physiques de base des nanoémulsions sont : la taille des particules lipidiques, la distribution de la taille des particules, la charge et la cristallinité. La structure des particules et la distribution granulométrique des Nanoémulsions sont mesurées par des techniques non invasives de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).

Les propriétés rhéologiques des nanoémulsions sont affectées par le tensioactif utilisé, la forme et la densité des gouttelettes, et l'interaction entre les gouttelettes constitutives. Il a été démontré que l'utilisation de Co-tensioactifs affaiblit l'interaction entre les émulsifiants et les tensioactifs anioniques, entraînant une diminution de la viscosité [28].

1.3.2.5 Mécanismes de déstabilisation

❖ Mûrissement d'Ostwald

La maturation d'Ostwald est l'augmentation de la taille des gouttelettes au fil du temps. L'origine de ce phénomène provient de la taille des gouttelettes et de la poly-dispersity de la pression de Laplace [29]. Pour les gouttelettes sphériques, la pression de Laplace (ΔP , Pa) est définie comme la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur de la goutte, qui est donnée par l'équation de Laplace (équation 2).

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad \text{Équation 2}$$

Où γ est la tension interfaciale H/E (N.m^{-1}) et r est le rayon de la goutte (m). L'équation montre que plus la goutte est petite, plus la pression de Laplace est élevée. Cela signifie que le potentiel chimique des petites gouttelettes est supérieur à celui des grosses gouttelettes. Par conséquent, la solubilité de la phase dispersée dans les petites gouttelettes est supérieure à celle dans les grosses gouttelettes. Les petites gouttelettes s'agglomèrent en grosses gouttelettes jusqu'à ce que la plus petites des gouttelettes disparaisse complètement, revenant ainsi à l'équilibre thermodynamique [30].

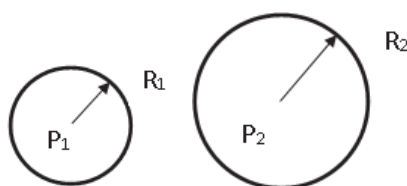


Figure 1. 11: Illustration du mûrissement d'Ostwald [32].

$$P_1 \gg P_2$$

Une fois les conditions d'état d'équilibre sont atteintes, le taux de maturation d'Ostwald (ω , $\text{m}^3.\text{s}^{-1}$), Peut-être prédit à l'aide des équations suivantes [30] :

$$r^3 = r_0^3 + \omega t \quad \text{Équation 3}$$

$$\omega = \frac{4\alpha(\infty)D}{gh} \quad \text{Équation 4}$$

Où r est le rayon moyen des gouttelettes (m) au temps t (s), r_0 est le rayon moyen des gouttelettes (m) à $t = 0$ (rayon initial), et D est le coefficient de diffusion en translation de l'huile à travers la phase continue ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)

Il existe plusieurs moyens d'éviter le mûrissement d'Ostwald, comme l'utilisation de phases huileuses peu solubles dans l'eau, ou l'ajout d'inhibiteurs de mûrissement ou l'utilisation de polymères tensioactifs [30].

❖ Coalescence

La coalescence est le processus inverse de l'étape de dispersion. Les gouttelettes fusionneront pour former des gouttelettes plus grosses après la rupture du film de phase continue entre elles, et atteindront finalement le

déphasage total (Figure1.12). Tous les phénomènes qui favorisent l'agrégation des gouttelettes placent le système dans des a priori propices à la coalescence [31].

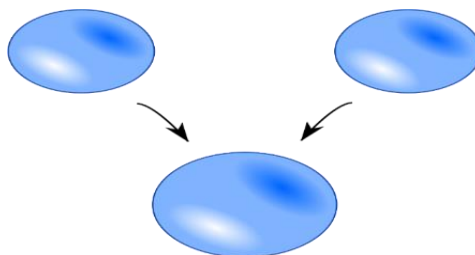


Figure1. 12: Illustration du phénomène de la coalescence entre deux gouttelettes [33].

❖ **Floculation**

La floculation est un processus physique et chimique dans lequel les gouttelettes de l'émulsion se rassemblent pour former de plus gros amas de "flocons". L'origine du phénomène de floculation est la compétition entre le brassage thermique et la force d'interaction entre gouttelettes. Les gouttelettes de la phase dispersée sont activées par le mouvement brownien provoqué par l'impact avec les molécules de solvant, et provoquent l'impact entre les gouttelettes elles-mêmes [32].

❖ **Sédimentation ou crémage**

La sédimentation observée de l'émulsion E/H et l'émulsion H/E sont le résultat du même phénomène, et la force motrice est la gravité. Les gouttelettes de la phase dispersée sont entraînées par un mouvement brownien aléatoire. La même goutte est également affectée par le champ gravitationnel de la Terre. Si la goutte est plus dense que la phase continue, elle a tendance à se déplacer vers le bas (sédimentation), sinon elle se déplace vers le haut (crémage). Cette compétition entre agitation brownienne et pesanteur aboutit à une inhomogénéité de l'émulsion laissée au repos [33].

1.3.2.6 Modes de stabilisation des Nanoémulsions

❖ Stabilisation rhéologique

La stabilisation rhéologique est la stratégie qui va consister à ajouter des agents de viscosité, tels que des polymères viscosifiants ou certains tensioactifs, permettant d'augmenter la viscosité de la phase continue rendant alors les gouttelettes moins mobiles et la probabilité de choc plus faible.

Ce type de stabilisation permet notamment de limiter les mécanismes de floculation, et/ou les phénomènes de séparation gravitationnelle [34].

❖ La stabilisation électrostatique

Elle se fait *par* des anions et des cations adsorbés à la surface [34].

❖ La stabilisation stérique

Elle se réalise grâce à l'addition de macromolécules de type non ionique, qui s'adsorbent à l'interface des gouttelettes, tels que les polymères amphiphiles. Ces couches macromoléculaires agissent en créant une barrière physique qui augmente la distance entre les gouttes [33].

La stabilisation électrostatique

Elle combine l'espace et les effets électrostatiques. C'est une autre option pour utiliser des tensioactifs ioniques ou des tensioactifs non ioniques. Ces molécules ont des groupes polaires qui produisent une répulsion électrostatique et de longues chaînes latérales lipophiles qui produisent une stabilité stérique [34].

❖ Stabilisation LBL

Layer by layer stabilisation (LBL) ou stabilisation couche par couche représente une organisation successive de couches de tensioactifs chargés et de polymères [34].

1.4 Généralités sur les activités anti-oxydantes

1.4.1 Un radical libre

Par définition, un radical libre est un composé possédant un électron célibataire. Dans une molécule les doublets électroniques sont localisés dans des orbitales. Par conséquent, l'orbitale d'un électron célibataire peut, de même, être liante, non liante ou anti-liante, et ceci a des conséquences sur les propriétés chimiques et structurales du radical libre. Un radical libre est le plus souvent instable, donc réactif et sa durée de vie est très courte. Les radicaux libres et leurs

dérivés, regroupés sous l'expression d'espèces oxygénées réactives (ERO) sont continuellement produits dans les cellules, considérés comme agents potentiellement toxiques car ils ont la capacité d'endommager différents constituants cellulaires vitaux, conduisant ainsi à la mort des cellules [35].

1.4.1.1 Production de radicaux libres

La production de ces espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie (à l'air, c'est-à-dire avec oxygène), l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions de respirations oxydatives. Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés. Les autres sources de production sont représentées dans (Tableau 1.3). Elles sont classées en deux catégories [36] :

Tableau 1. 3 : les Principales sources de production des radicaux libres [36].

Sources endogènes	Production de radicaux libres lors des respirations oxydatives (mitochondries) Cellules phagocytaires Métabolisme de l'acide arachidonique Système xanthine/Xanthine oxydase
Sources exogènes	Rayonnement électromagnétique Métaux de transition Pesticides Médicaments...

1.4.2 Le stress oxydatif

De manière générale, le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les espèces oxydantes et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule [37]. Déterminer le statut de stress oxydant d'un individu devient actuellement un sujet prioritaire en termes de prévention de maladies. Les radicaux libres sont des molécules instables et fortement réactifs, ils sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à doses

raisonnables (Figure 1.13). Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, dans les circonstances normales. Le stress oxydatif désigne un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants au niveau cellulaire ou individuel, conduisant à une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et / ou des dommages moléculaires [38].

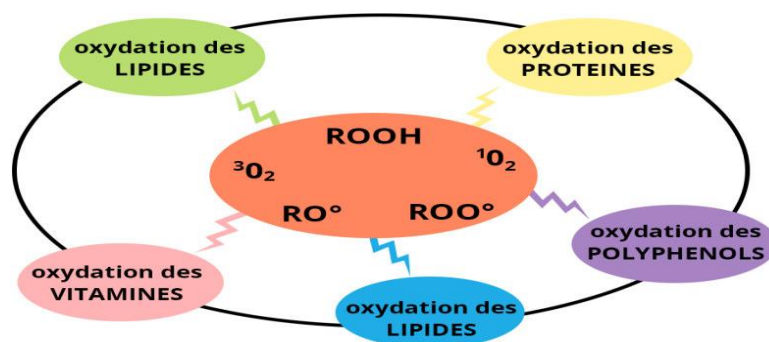


Figure1. 13: les différentes sources d'oxydations [39].

Les Pathologies liées au stress oxydatif sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau1. 4 : les pathologies liées au stress oxydatif [40].

Maladies ou le stress oxydatif est la cause primordiale	Maladies ou le stress oxydatif est le facteur déclencheur	Maladies entraînant un stress oxydatif secondaire
Cancers, Auto-immunité, Cataracte. Maladies	Maladie d'Alzheimer, Sterilité masculine, Rhumatismes, atheromes, asthmes	Diabète, Insuffisance rénale, Maladie de Parkinson

1.4.3 Les espèces réactives oxygénées (ERO)

1.4.3.1 Les radicaux ioniques

- Radical super-oxyde ($O_2^{\cdot-}$)
- Radical hydroxyle (OH^{\cdot})
- Monoxyde d'azote (NO)

1.4.3.2 Les radicaux non ioniques

- L'oxygène singulet (O_2)
- Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
- Le nitroperoxyde (ONOOH)

1.4.4 Les antioxydants

Les antioxydants sont définis comme toute substance qui est capable de ralentir ou inhiber l'oxydation du substrat oxydable. Ils sont des substances qui prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires en les protégeant des altérations provoquées par l'oxydation. Les antioxydants sont capables de limiter les réactions d'oxydation, radicalaires pour la plupart. De nombreux antioxydants exogènes sont également présents dans l'alimentation apportant un soutien significatif dans la lutte antioxydante. Nous les trouvons dans les fruits, les légumes, les boissons ainsi que dans les épices, le cacao ou encore les céréales. Ces antioxydants sont surtout connus pour leur capacité à réagir directement avec les radicaux libres en les << neutralisants >> par réaction de réduction [42].

1.4.4.1 Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altère de la cellule appelé stress oxydatif. Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) [41].

1.4.4.2 Les antioxydants endogènes

Il y a plusieurs systèmes d'enzymes qui catalysent des réactions pour neutraliser des radicaux libres et des espèces réactives de l'oxygène. Ces mécanismes impliquent principalement des enzymes spécifiques (super-oxyde dismutase ou SOD, catalase, glutathion peroxydase ou Gpx [43].

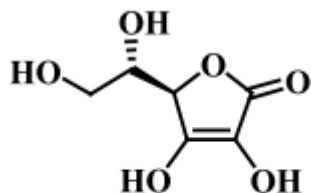


1.4.4.3 Les antioxydants exogènes

❖ La vitamine C

C'est la vitamine la plus connue mais elle est aussi un antioxydant de premier plan qui intervient pour retarder, voire empêcher certaines maladies liées au vieillissement. C'est aussi la première vitamine à réagir avec les radicaux libres et à les neutraliser pour éviter les effets toxiques. On peut la trouver dans la

plupart des fruits. Dans certains cas (personnes âgées, fumeurs, sportifs ou femmes enceintes) l'alimentation n'apporte pas assez de vitamine C (Figure1.14) il faut donc augmenter sa consommation ou tout simplement prendre des suppléments [44].



Acide ascorbique AscHH

Figure1. 14 : structure d'acide ascorbique [46].

❖ La vitamine E

Elle joue un rôle essentiel dans la protection de la membrane de toutes les cellules de l'organisme. De plus, elle empêche ou réduit l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL). Cette oxydation des LDL est associée à l'apparition de l'athérosclérose et donc aux maladies cardiovasculaires [45].

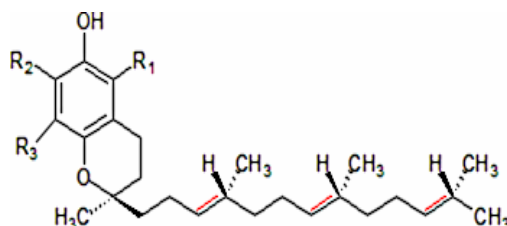


Figure1. 15 : structure de la vitamine E [47].

❖ Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont une grande famille qui regroupe plus de 600 molécules. Le plus important et le plus connu des caroténoïdes est le β -carotène. Il a longtemps été étudié pour son activité de provitamine A. Cependant, tous les caroténoïdes ne peuvent pas être convertis en vitamine A. Ils intéressent de plus en plus les chercheurs pour leur pouvoir antioxydant que n'a pas la vitamine A. Leur fonction dans l'organisme leur est propre et est indépendante de cette conversion [36].

1.4.4.4 Mécanisme d'action des antioxydants

Les antioxydants peuvent agir de trois manières différentes :

- ✓ En inhibant la formation des radicaux libres, sous forme « Antioxydant vrai ».
- ✓ En fixant directement l'oxygène préférentiellement dans la phase de propagation.
- ✓ En chélatant les métaux catalyseurs d'oxydation « d'Antioxydant Secondaire ».

D'autres substances dites synergistes peuvent régénérer de véritables antioxydants phénoliques sous leur forme active. Les antioxydants (HA) les plus courants empêchent l'auto-oxydation des lipides en donnant des atomes d'hydrogène aux radicaux lipidiques (RO°) et (ROO°) selon les équations suivantes :



Pour que l'antioxydant (AH) soit très actif, le radical libre qui en dérive (A°) doit être plus stable que le radical libre lipidique (RO° ou ROO°), ou se transformer facilement en un produit stable.

Par conséquent, les antioxydants les plus actifs sont essentiellement les phénols. En effet, une fois délocalisés, les électrons isolés des noyaux aromatiques correspondants, ils produisent des radicaux libres très stables.

En ce qui concerne les antioxydants secondaires, agissent en chélatant les métaux ou en capturant l'oxygène. Par conséquent, la chélation des ions métalliques réduit l'effet de pro-oxydation de ces ions et augmente l'énergie d'activation pour initier la réaction, empêchant ainsi les réactions d'oxydation radicalaire [48].

1.4.4.5 Evaluation de l'activité antioxydante

Il existe une variété de méthodes physiques et chimiques pour évaluer l'activité Anti-oxydante des extraits naturels. Les méthodes les plus utilisées par exemple [49] :

❖ Les méthodes chimiques

- ✓ Méthodes spectrophotométriques, fluorimétriques
(ORAC, DPPH, FRAP, CUPRAC, DCFH-DA, FOX)

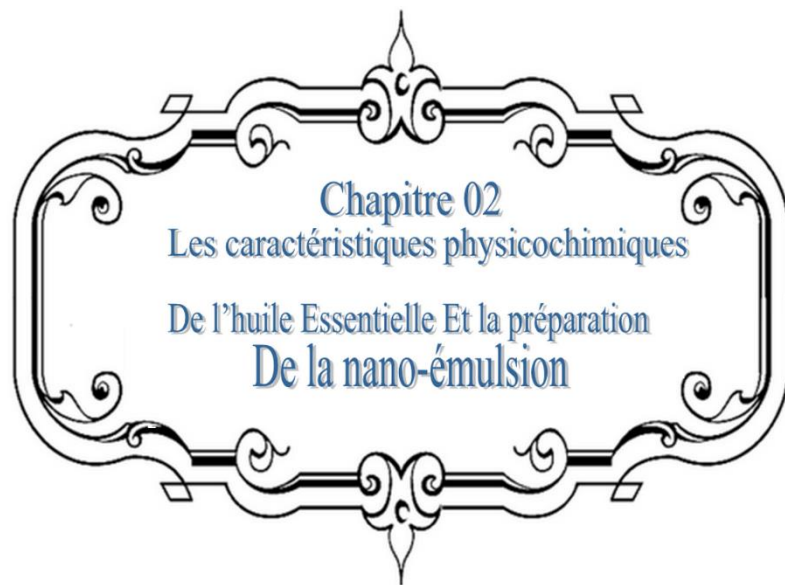
- ✓ Méthodes par chimioluminescence (SANS AMPLIFICATEUR, AVEC AMPLIFICATEUR)

❖ Les méthodes basées sur l'utilisation de cellules

- ✓ CAA : cellulaire activité antioxydant.
- ✓ Expression d'enzymes antioxydants vers inhibition des enzymes pro oxydantes.
- ✓ Activation vers répression de facteurs redox de transcription.

1.4.4.6 Test DPPH

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution lorsqu'il est piégé par les antioxydants est change du couleur rapidement en virant au jaune lorsqu'il se réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire (un donneur de proton H⁺). Cependant l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu « comme le cas des huiles essentielles » à inhiber le radical libre 1,1-diphényle-2-picrylhydrazyle (DPPH) par la donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons [50].



Chapitre 02
Les caractéristiques physicochimiques
De l'huile Essentielle Et la préparation
De la nano-émulsion

2.1 Matériels et produits

Tableau 2.1 : les matériels et les produits

Appareillages et équipements	Verreries
<ul style="list-style-type: none"> • Réfractomètre • Plaque chauffante • Chauffe ballon • Agitateur magnétique • Polarimètre 	<ul style="list-style-type: none"> • Fioles de : 50 ml, 100 ml • Pycnomètre 10 ml • Burette 20 ml • Erlenmeyers • Bêchers • Ballon 150 ml • Spatules • Micropipette 1ml. • Montage à reflux
Matériel végétal et produits	
<ul style="list-style-type: none"> • HE citron vert • Ethanol • Hydroxyde de potassium (KOH) • Phénophtaléine • L'acide chlorhydrique (HCL) • Acétone • Acétate d'éthyle • Tétrachlorure de carbone (CCl₄) • Iode I₂ • Éthylène glycol • Propylène glycol 	<ul style="list-style-type: none"> • Eau distillée • Iodure de potassium (KI) • Chloroforme (• Chlorure de sodium (NaCl) • Cyclohexane • Thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃) • Amidon • Acide acétique • Tween 80 (C₆₄H₁₂₄O₂₆) • DPPH

2.2 Huile essentielle du citron vert

Le manque cruelle du temps pour l'extraction de l'huile essentielle nous avons été contraints d'acheter une huile préparée portant la fiche technique suivante :

Tableau 2.2 : fiche technique de l'huile essentielle de zeste de citron vert "VieBio"

Nom latin	<i>Citrus Aurantifolia</i>
Famille botanique	<i>Rutacées</i>
Origine géographique	Blida/Algérie
Mode de culture	Cultivé
La partie de la plante distillée	Zeste des fruits frais (partie externe de l'écorce du fruit)
Le mode d'extraction	Expression à froid
La date d'extraction	Février 2020
La date d'expiration	Février 2023
La qualité	100% Naturel 100% Pur

2.3 Analyse physico-chimique de l'huile essentielle du *Citrus Aurantifolia*

Les propriétés physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire) et chimiques (solubilité dans l'alcool, indice d'acide, d'ester...), sont exigées pour l'évaluation commerciale des huiles essentielles.

2.3.1 Mesure des indices physiques

2.3.1.1 Densité relative

Nous avons mesuré la densité de l'HE À l'aide d'un pycnomètre à partir de la formule suivante [53] :

$$D_{20} = \frac{A_2 - A_0}{A_1 - A_0} \quad \text{Équation 5}$$

Dans laquelle :

A_0 : la masse en gramme du pycnomètre vide

A_1 : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée

A_2 : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile

2.3.1.2 Indice de réfraction

Nous avons effectué la mesure de l'indice de réfraction de l'HE à l'aide d'un réfractomètre classique de marque Réfractomètre Abbe RMT. Cet indice est donné par lecture directe sur le réfractomètre à une température fixée à 20°C. Pour cela, on a opéré comme suit [52] :

- ✓ Etalonner l'appareil à l'aide d'eau distillée d'indice de réfraction connu à la température fixée à 20°C.
- ✓ Nettoyer des prismes et déposer quelques gouttes d'HE entre les deux faces des prismes.
- ✓ Regarder dans l'oculaire et tourner le bouton de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule.
- ✓ Supprimer les irisations pour obtenir une ligne nette entre les deux zones.
- ✓ Noter la valeur de l'indice par l'échelle de lecture.

2.3.1.3 Mesure du pH

Pour cette mesure, quelques gouttes d'HE sur un bout de papier pH, après le changement de la couleur du papier sont déposés avec une gamme de couleurs qui varient selon le pH et obtenir la zone de pH

2.3.1.4 Pouvoir Rotatoire

Nous avons mesuré l'angle de rotation de l'essence de citron vert à l'aide d'un appareil Polarimètre de Laurent Novex muni d'une cellule de 2.07 dm de longueur et 22 ml de volume.

Nous avons préparé une Solution éthanolique à partir de 1g d'HE dans 25 ml d'éthanol [53].

L'angle de rotation observé est lu directement sur l'appareil; ce qui nous a permis de déterminer la valeur du pouvoir rotatoire de L'HE à l'aide de l'équation(6)

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{L.C}$$

Équation 6

2.3.1.5 Miscibilité à l'éthanol

À l'aide d'une burette de 20mL, en versant l'éthanol à 70% par fraction de 0,2 ml dans un Erlenmeyer contenant 1 ml d'HE, en agitant après chaque ajout. Lorsqu'une solution limpide est obtenue on note le volume d'alcool ajouté.

2.3.2 Mesure des indices chimiques

2.3.2.1 Indice d'acide

A l'aide d'un erlenmeyer on introduit 1g d'HE, 5mL d'éthanol à 96% et environ 5 gouttes d'indicateur coloré (phénophtaléine). Le mélange ainsi formé est titré par une solution alcoolique de potasse (KOH) 0,1N jusqu'à ce que la solution vire au rose [54].

L'indice d'acide I_a est déterminé par la formule (c) [55] :

$$I_a = V.C. \frac{56.11}{m}$$

Équation 7

Dans laquelle :

V : volume en ml de la solution de KOH utilisée pour le titrage.

C : concentration en mol/L de la solution de KOH

m : masse en g de la prise d'essai

2.3.2.2 Indice d'ester

Dans un ballon de 100mL, on introduit 1g d'HE et 25 ml d'une solution alcoolique de potasse (KOH) 0,5 M à l'aide d'une burette, ainsi que quelques fragments de pierre ponce. On adapte au ballon un réfrigérant et on porte le mélange au chauffage à reflux pendant une 1 heure.

Après refroidissement de la solution, on ajoute 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénophtaléine. Puis, l'excès de KOH est titré avec une solution

d'acide chlorhydrique (HCl) 0,5N jusqu'à la disparition de la couleur rose.

Parallèlement, une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant les mêmes réactifs [56].

L'indice d'ester (I_e) est calculé à l'aide de l'équation(8) [57]. :

$$I_e = \frac{28,05}{m} (V_0 - V_1) - I_a$$

Équation 8

Dans laquelle :

V_0 : Volume en ml de la solution d'HCl (0,5N) mesuré pour l'essai à blanc.

V_1 : Volume en ml de la solution d'HCl (0,5N) mesuré pour le calcul de I_e .

m : Masse en g de la prise d'essai.

I_a : Valeur d'indice d'acide.

2.3.2.3 Détermination de l'indice de saponification

Les huiles étant insolubles dans l'eau, il faut les dissoudre dans un solvant organique donc on a commencé par peser une masse connue de 0.5 g d'HE dans un bécher, on a ajouté à l'aide d'une pipette graduée 10 ml d'éthanol et on a agité pour dissoudre l'huile [58].

- Dans un bécher, on a introduit 10 ml de solution huileuse et on a ajouté 10 mL de solution de potasse alcoolique de concentration 0,1 mol.l⁻¹.
- On a ajouté 10ml d'éthanol pour éviter l'évaporation d'éthanol de la solution huileuse puis le mélange a été porté à l'ébullition pendant 30 minutes ensuite, on a laissé refroidir à température ambiante pendant 10 minutes ensuite on a divisé le volume de la solution obtenue en 5 volumes, on a ajouté 4 gouttes de phénolphtaléine dans chaque solution.
- L'excès de potasse a été dosé par l'acide chlorhydrique (37%) de concentration 0,5 mol.l⁻¹ en agitant constamment jusqu'au virage de la couleur de la phénolphtaléine.

Chapitre 02 : Les caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle et la préparation de Nanoémulsions

- Comme la concentration de la potasse alcoolique n'est pas exactement connue, il est nécessaire de la déterminer par un témoin.
- On a introduit dans un bécher 10 ml de potasse alcoolique et 10 ml d'éthanol et on a traité le témoin dans les mêmes conditions opératoires que les essais.
- Ensuite on a ajouté 4 gouttes de phénolphthaléine et on a dosé jusqu'au virage à l'incolore de la phénolphthaléine.

Équation de la réaction :



Calcul de l'indice de saponification :

$$I_s = \frac{(VT - VE) \times C_{HCl} \times M_{KOH}}{m} \quad \text{Équation 9}$$

D'où :

I_s : indice de saponification

VT : volume versé au témoin (en ml)

VE : volume versé à l'essai (en ml)

C_{HCl} : concentration de la solution titrée d'acide chlorhydrique (en mol/L)

M_{KOH} : masse molaire de KOH (g/mol)

m : masse de corps gras analysée (en g).

2.3.2.4 Indice d'iode

On introduit 1g d'HE, 20mL de tétrachlorure de carbone (CCl_4) et 25mL d'une solution d'iode (1N) dans un erlenmeyer. Ensuite, la solution est laissée à l'abri de la lumière pendant 2 heures. Après ce temps, 20 ml d'une solution d'iodure de potassium (KI) à 50% et 20mL d'eau distillée sont ajoutés.

Ensuite, l'excès d'iode est titré par une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1N en présence d'empois d'amidon comme indicateur coloré. Un essai à blanc a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment.

L'indice d'iode est calculé par l'équation (10) :

$$I_i = N_T + \frac{(V_0 - V_1)}{m}$$

Équation 10

Dans laquelle :

N_T : Normalité de la solution de thiosulfate de sodium.

V_0 : Volume en ml de la solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilisée pour l'essai à blanc.

V_1 : Volume en ml de la solution de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilisée pour la détermination d'indice d'iode

m : Masse en g de la prise d'essai.

2.3.2.5 Indice de peroxyde

On pèse 2g d'huile dans un flacon de 100 mL, puis 10 ml de chloroforme sont ajoutés. On agite pour dissoudre et on ajoute ensuite au mélange 15 mL d'acide acétique pur et 1 mL d'une solution d'iodure de potassium saturée.

Après avoir fermé le flacon, on laisse reposer 5 min à l'obscurité et on ajoute 75 ml d'eau distillée et quelques gouttes d'empois d'amidon.

L'iode libéré est titré par la suite avec une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0, 01N. Parallèlement, un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions.

L'indice de peroxyde est donné par l'équation (11) :

$$I_p = \frac{V_0 - V}{P} \times 10 \text{ (mécq. O}_2 \text{ /kg d'H.E)}$$

Équation 11

Dans laquelle :

V : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai

V_0 : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc

P : prise d'essai en gramme

2.4 Préparation des Nanoémulsions

2.4.1 Nanoémulsions Par émulsification spontanée

La préparation de Nanoémulsions à base d'huile essentielle de *Citrus Aurantifolia* a été réalisée par une procédure d'émulsification spontanée (ES) qui est une méthode à faible énergie.

Notre première manipulation avait pour objectif de préparer des Nanoémulsions selon le protocole suivant :

Nous avons mélangé la solution aqueuse avec le Tensioactif (Tween 80) (différentes concentrations de Tween 80 ont été utilisées), Ensuite, Les deux solutions ont été mélangées à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 15 minutes, puis en ajoutant l'huile essentielle à la phase aqueuse goutte à goutte à l'aide d'une seringue, et en la laissant sous agitation pendant 12 heures, La Nanoémulsion a été conservée à température ambiante (25 ± 1 °C).

Des nanoémulsions avec l'ajout des Co-tensioactifs telle que L'éthylène glycol ou le propylène glycol ont étaient aussi préparées afin d'obtenir des formulations les plus stables possible.

2.4.2 Les Nanoémulsions par Phase inverse

Les nanoémulsions ont été préparées à partir d'un mélange d'une solution huileuse et de Tween 80, on les a laissés sous agitation pendant 15 min, on a préparé une phase aqueuse qui contient du propylène glycol.

Ensuite on ajoute goutte à goutte respectivement la phase aqueuse sur la phase huileuse, puis on la laisse sous agitation pendant 12 heures.

2.6 Résultats et discussions

2.6.1 Propriétés organoleptiques

Tableau 2.3 : Propriétés organoleptiques d'huile essentielle de citron vert

H.E	Odeur	Aspect	La couleur
<i>Citrus Aurantifolia</i>	Piquante	Liquide visqueux	Jaune claire

2.6.2 Détermination des indices physico-chimiques

❖ Les indices physiques

➤ La densité

D'après la valeur théorique d'AFNOR 2000[66-67], La densité relative est entre 0.845 et 0.858. La densité relative de notre huile essentielle est de 0.76, Ce paramètre est lié à la composition chimique et la pureté de cette huile qui est affectée par un grand nombre de facteurs tels que, le moment de la cueillette, le type de région, la méthode de conservation, le procédé et les conditions d'extraction [66-67]



Figure 2.1 : pycnomètre rempli d'huile essentielle (*Citrus Aurantifolia*)

➤ **Indice de réfraction (n_D)**

D'après le résultat d'analyse de l'indice de réfraction de l'HE on constate que le résultat obtenu est dans l'intervalle de la valeur théorique :

$$1.470 < \underline{1.475} < 1.480$$

L'indice de réfraction mesuré est de : 1.475. Cet indice dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides, de leurs degrés d'insaturation et de la température, il varie essentiellement avec la teneur en monoterpène et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpène donnera un indice élevé.

Un faible indice de réfraction de l'HE ($n_D < 2$) indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques. Les résultats indiquent que les paramètres physico-chimiques des échantillons analysés se retrouvent dans les fourchettes des références établies par les normes.

➤ **Pouvoir rotatoire [α]**

La gamme des valeurs théoriques de l'HE du citron vert se situe entre (+55° et +75°)

Pour notre analyse $\alpha = 60.38^\circ$, on remarque bien que cette valeur est dans la gamme des valeurs théoriques. Cette déviation est due à la présence d'un carbone asymétrique dans les molécules suivantes :

D-Limonène, alpha-Terpinéol, 1.8-terpine, 1.8-cineole, beta-Terpinéol, Terpinolène, Terpinène-4-ol, 1.4-terpine, 1.4-cineole, gamma-terpinène, alpha-terpinène.

➤ **Miscibilité à l'éthanol**

La miscibilité à l'éthanol est de 78 fractions de 0.2ml (v1 / 15.6) v d 'Et OH), cette faible miscibilité est due à la différence de la composition, Le d-limonène représente 92% de la composition de l'huile essentielle Citrus Aurantifolia ce qui le rend très apolaire par contre pour l'éthanol groupe hydroxyle le rend polaire.

➤ **Mesure de pH**

D'après le papier pH on a trouvé une valeur égale à 4 (Figure 2.2). Cette valeur indique que le milieu est très acide. Cette valeur est reliée à la présence des acides libres, des phénols et des alcools libres dans la composition chimique d'huile essentielle du *citrus Aurantifolia* comme :

- ❖ Les Acides libre :
 - formique, acétique, cinnamique 0,05%
- ❖ Phénols
 - 0,09% avec un pouvoir acide faible pKa de 9,9
- ❖ Alcools libres
 - (Linalol, Terpinéol) 0,37% une acidité très faible

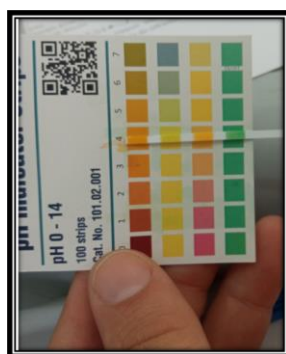


Figure 2.2 : La mesure de PH d'huile essentielle (Citrus Aurantifolia)

❖ **Indices chimiques**

➤ **Indice d'acide I_a**

D'après le test effectué (Figure2.3) le résultat trouvé est de 3.93, généralement les HEs ont un indice d'acide égale à 4.

La connaissance d'indice d'acide d'un corps gras, permet de connaître la présence d'acide gras libre ou lié. Il s'agit d'un critère chimique de pureté, de fraîcheur et de qualité de l'huile. C'est un moyen aussi de renseigner sur l'aspect d'altération, de dégradation et d'oxydation de l'huile dans le temps.

Chapitre 02 : Les caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle et la préparation de la Nanoémulsions

Plus cet indice est grand plus l'huile essentielle est dégradée. Pour l'huile essentielle de citron vert la valeur concorde avec les données de la littérature.

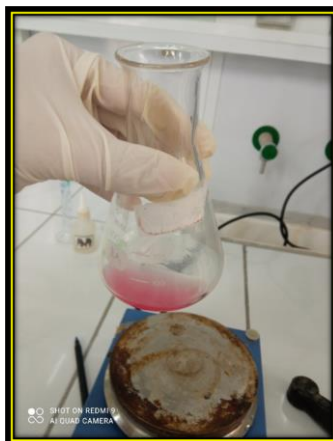


Figure 2.3 : la solution d'HE après le titrage (couleur rose clair)

➤ **Indice d'ester I_e**

L'indice d'ester obtenu est 37,49, cette valeur est très élevée par rapport aux valeurs théoriques d'AFNOR qui sont dans la gamme de 13.5 et 15.9

D'après la valeur théorique d'AFNOR (13.5 à 15.9) l'indice d'ester de l'HE du citron vert (37,49) est très élevé, par contre ce dernier est dans les normes par rapport aux valeurs des HEs commercialisées [66, 67].

Cette valeur représente le nombre de milligramme de potasse nécessaire pour neutraliser les acides libérés par hydrolyse en milieu basique (saponification) des esters contenus dans l'huile essentielle *et* qui justifie le pH

Chapitre 02 : Les caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle et la préparation de la Nanoémulsions



Figure 2.4 : La disparition de la couleur rose après le titrage avec HCl

➤ **Indice de saponification I_s**

D'après les normes l'indice de saponification des HEs commercialisées est (14 à 30) la valeur trouvée (6.25) est faible.

➤ **Indice d'iode I_i**

Le résultat de la détermination de l'indice d'iode de l'HE du citron vert est de 0.61 mg comparé à 1.2 mg commercialisée.

L'indice d'iode est lié à l'état d'insaturation des chaînes carbonées des acides libres présents dans l'HE. D'après nos résultats, notre huile essentielle présente un indice d'iode d'une valeur très faible par rapport aux valeurs minimales et maximales de la norme.



Figure 2.5 : Indice d'iode, le mélange (HE+CCl₄+I₂+KI+H₂O) après le dosage

➤ **Indice de peroxyde I_p**

Les normes du Codex Alimentarius (2003) fixent l'indice de peroxyde pour les huiles raffinées : est inférieur ou égal à 10 mEq/kg et pour les huiles brutes à 15 mEq/kg.

L'huile essentielle de citron vert montre un indice de peroxyde de l'ordre de 12.5 Cette valeur correspond aux normes de la littérature.

2.6.3 Optimisation des conditions de préparation des nanoémulsions

Afin d'étudier l'effet de la concentration du surfactant sur la formation des Nanoémulsions, des concentrations de Tween 80 (2, 4, 6, 8, 10 et 12 pourcentage massique) ont été utilisées, ces concentration ont donnés des Nanoémulsions formulations avec différentes formes (figure 2.6).

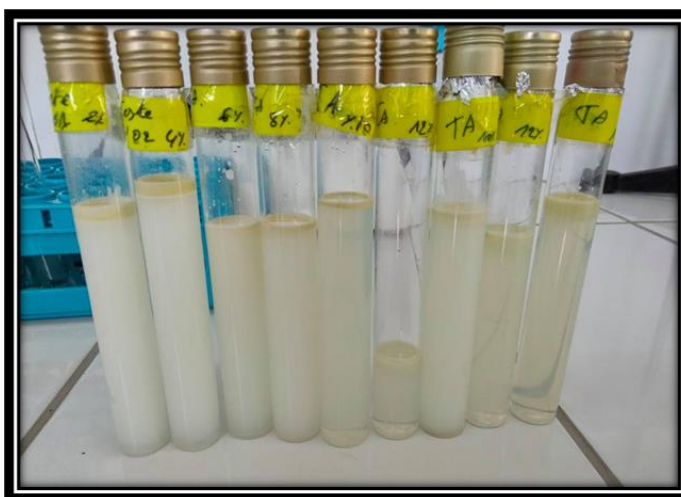


Figure 2.6 : l'émulsion de 2% à 12%

D'après la figure, on constate que la turbidité de la solution décroît nettement avec l'augmentation de teneur du surfactant. Par exemple, la formulation contenant 12% est transparente par rapport à celle de 2% qui a un aspect laiteux. Cette nette différence peut-être expliquée par la différence de la taille des gouttelettes qui devrait être plus grandes dans la formulation à 2% et plus petite dans le cas de 12%. Ce même phénomène a été noté dans beaucoup de travaux sur les nanoemulsions [62, 63,64]

Chapitre 02 : Les caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle et la préparation de la Nanoémulsions

Dans notre investigation, et pour confirmer ce phénomène une détermination de la taille des gouttelettes de chaque formulation est une étape très importante. Malheureusement, on n'a pas pu réaliser cette analyse à cause de la non-disponibilité de l'appareil. Mais puisque la relation entre la turbidité des formulations avec les tailles des gouttelettes est confirmée dans la littérature [65], on a déterminé la turbidité de nos formulations à l'aide d'un spectrophotomètre ultraviolet-visible (UV-vis) à 600 nm. Et on a obtenu les résultats qui sont illustrées sur la figure 2.7 sous forme de bâtonnets.

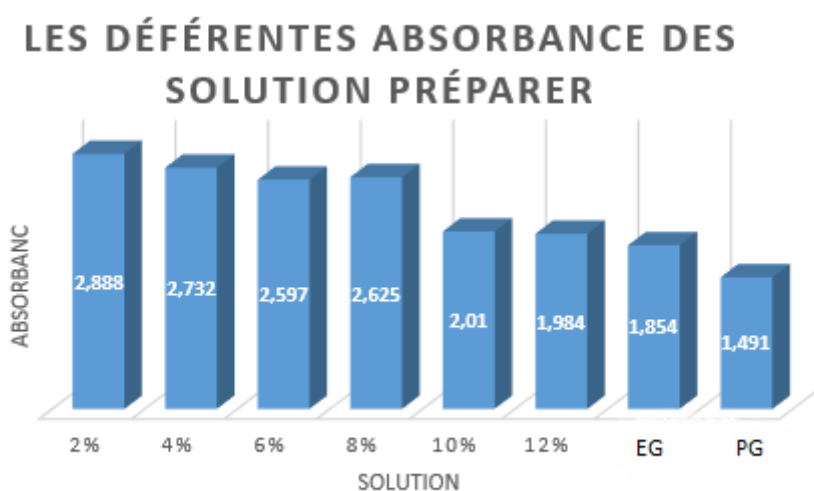


Figure 2.7 : les absorbances des nanoémulsions

D'après les résultats, nous avons remarqué que les nanoémulsions préparés avec le Tween 80 à 2%,4%,6% et 8% ont donnés respectivement des absorbances dans l'ordre de 2.888 ; 2.732 ; 2.597 et 2.425 ces dernières sont, sont plus troubles que les autres émulsions 10% à 12%.

Cela signifie d'une part que la taille des particules des formulations 2% à 8% est plus importante et le risque de séparation par le crémage ou la sédimentation est plus favorable.

D'autre part, la concentration très élevée du tensioactif n'est pas une bonne alternatif dans la formation des nanémulsions surtout sur le plan cout de la

Chapitre 02 : Les caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle et la préparation de la Nanoémulsions

formation, si on veut utiliser ces formulations dans des industries bien précises telle que : l'agroalimentaire et pharmaceutique.

Pour cette raison on a opté de fixer la concentration du tensioactif à 8% et faire d'autres optimisations afin d'essayer d'améliorer la qualité de la nanoémulsion.

Dans ce cadre, on a utilisé deux Co-tensioactif séparément, le propylène glycol et l'éthylène glycol (Figure2 .8).

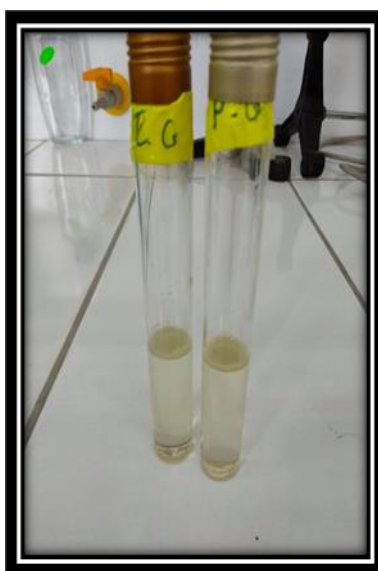


Figure 2.8 : l'émulsion 10 % de Tween le tube gauche (L'éthylène glycol), le tube droite (propylène glycol)

Selon les résultats, nous avons constaté que les deux Co-tensioactif ont abaissé la turbidité inferieure par rapport à la formulation précédente, les absorbance obtenues avec ces formulations sont $A= 1,854$ avec l'éthylène glycol et le $A=1.490$ propylène glycol.

L'ajout du Co-tensioactif a augmenté la viscosité de la phase continue rendant alors les gouttelettes moins mobiles et la probabilité de choc plus faible, Ce qui rend le propylène glycol un bon Co-tensioactif pour améliorer la stabilité de notre nanoémulsions.

La dernière étape de notre investigation a été de faire une étude comparative entre la méthode initiale (formation spontanée) et la méthode de phase inverse en

Chapitre 02 : Les caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle et la préparation de la Nanoémulsions

utilisant les mêmes ingrédients avec des teneurs identiques. Avec cette méthode on a obtenu une formulation très stable et translucide (Figure 2.9),



Figure 2.9 : La nanoémulsions de la phase inverse

D'après notre investigation nous avons trouvé que l'émulsion par phase normal (tween 80 + éthylène glycol) est plus stable par rapport à celle de la phase inverse.



*L'évaluation de l'activité
Antioxydant de l'huile essentielle
Et la nano-émulsion*

3 Tests d'activité anti oxydante

3.1 Préparation de la solution de DPPH

Dans une fiole de 100 ml on dissout 6 mg de DPPH, on ajoute (2/3) d'éthanol et on agite bien jusqu'à dissoudre totalement le DPPH, puis on ajuste la solution jusqu'au trait de jauge, on agite à température ambiante pendant 15 minutes. A l'aide d'un spectrophotomètre on mesure l'absorbance de DPPH, cette dernière doit être entre 0.5 et 0.8 à 517nm

3.2 Préparation de la solution mère

- Dans un tube, on mélange 3ml d'éthanol avec 3ml d'huile essentiel de *citrus Aurantifolia* (50% /50%) [60].

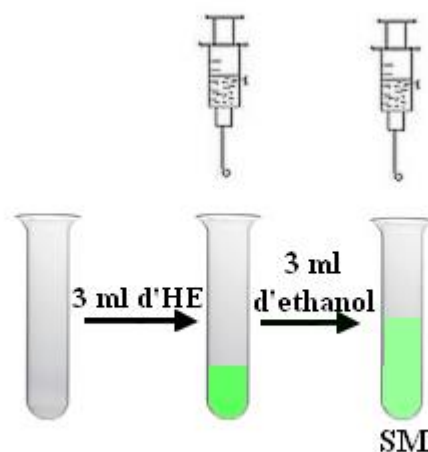


Figure 3.1 : préparation de la solution mère

3.3 Préparation des solutions filles

Pour cela, on a préparé des solutions diluées (filles) à partir de la solution mère à différentes concentrations (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 et 100%) et on complète avec l'éthanol (Figure 3.2) [61].

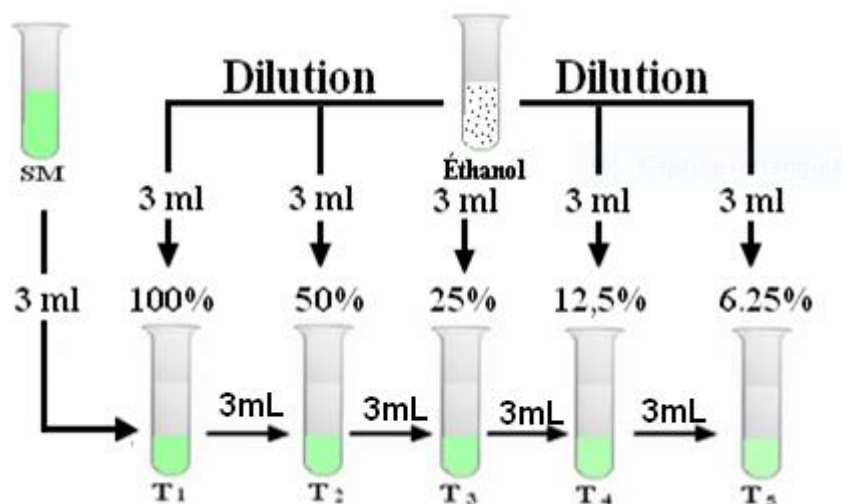


Figure 3.2 : Préparation des solutions filles

3.4 L'ajout du DPPH

A partir des solutions filles préparées, On a pris 0.8 ml de chaque solution et on ajoute 3.2 ml de DPPH (Figure 3.3) [60].

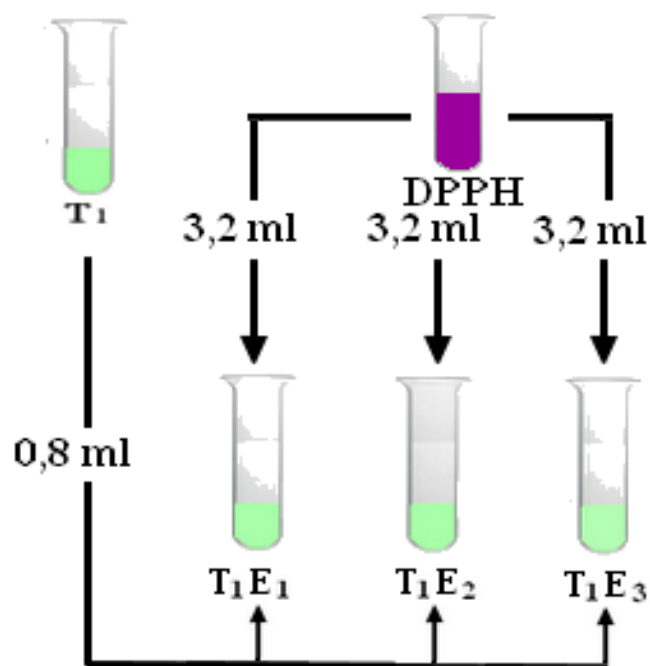


Figure 3.3 : Préparation d'activités antioxydant

Chapitre 03 : L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et la Nanoémulsions

- La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité à température ambiante.
- Un contrôle positif représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique a été utilisé. Son absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Toutes les opérations sont réalisées en duplicata.
- L'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage selon l'équation suivante [61] :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_C - A_E}{A_C} \cdot 100 \quad \text{Équation 12}$$

Où :

A_c : C'est l'absorbance du blanc contenant seulement le DPPH.

A_E : C'est l'absorbance de la solution de DPPH contenant l'extrait.

Le pourcentage d'inhibition est exprimé par la suite par la détermination de l'IC 50, qui est connue comme la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de réduction du DPPH.

Dans le but de faire une étude comparative entre l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus Aurantifolia*, avant et après encapsulation, un test d'activité a été réalisé sur la nanoémulsion.

Résultat et Discussions

Dans le but de déterminer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus Aurantifolia* et l'effet de son encapsulation sur l'amélioration et/ou l'abaissement sur cette activité le Test du DPPH a été utilisé et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous

Les résultats de l'absorbance et l'inhibition sont notés sur le tableau suivant :

Tableau 3.1 : Les résultats de l'absorbance et l'inhibition

	Tube	Absorbance (A_{moy})	Pourcentage d'inhibition
acide ascorbique	<i>T</i> ₀	0.0225 ±0.025	97.05
	<i>T</i> ₁	0.039 ±0.008	94.89
	<i>T</i> ₂	0.0495 ±0.0015	93.51
	<i>T</i> ₃	0.0505 ±0.0055	93.38
	<i>T</i> ₄	0.0575 ±0.0015	88.60
	<i>T</i> ₅	0	0
huile essentielle	<i>T</i> ₀	0.1415±0.0166	81.45
	<i>T</i> ₁	0.2100±0.0042	72.48
	<i>T</i> ₂	0.3175±0.0098	58.39
	<i>T</i> ₃	0.3940±0.0181	48.36
	<i>T</i> ₄	0.5075±0.0437	33.49
	<i>T</i> ₅	0	0
Nanoémulsion avec 10% tween 80	<i>T</i> ₀	0.3327±0.0393	56.11
	<i>T</i> ₁	0.3770±0.0275	50.26
	<i>T</i> ₂	0.3960±0.0217	47.76
	<i>T</i> ₃	0.4200±0.0020	44.60
	<i>T</i> ₄	0.4300±0.0026	38.27
	<i>T</i> ₅	0	0

Chapitre 03 : L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et la Nanoémulsions

Nanoemulsion avec 10% tween 80 + PG	T_0	0.2100 ± 0.0060	72.30
	T_1	0.2473 ± 0.0564	64.37
	T_2	0.2737 ± 0.0104	63.90
	T_3	0.3250 ± 0.0185	58.12
	T_4	0.3500 ± 0.0336	52.82
	T_5	0	0
Nanoemulsion avec 10% tween 80 + EG	T_2	0.1717 ± 0.0076	77.35
	T_2	0.2433 ± 0.0065	67.90
	T_2	0.3147 ± 0.0110	58.49
	T_2	0.3563 ± 0.0045	55.60
	T_2	0.3797 ± 0.0025	49.91
	T_2	0	0
Nanoemulsion PI avec 10% tween 80	T_2	0.1240 ± 0.0010	83.64
	T_2	0.1993 ± 0.0025	73.70
	T_2	0.3093 ± 0.0406	59.19
	T_2	0.3407 ± 0.0031	55.06
	T_2	0.4053 ± 0.0279	46.53
	T_2	0	0

Chapitre 03 : L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et la Nanoémulsions

Les résultats présentés dans les Figures (3.4,3.5). Selon la classification de l'efficacité antiradicalaire en valeur IC_{50}

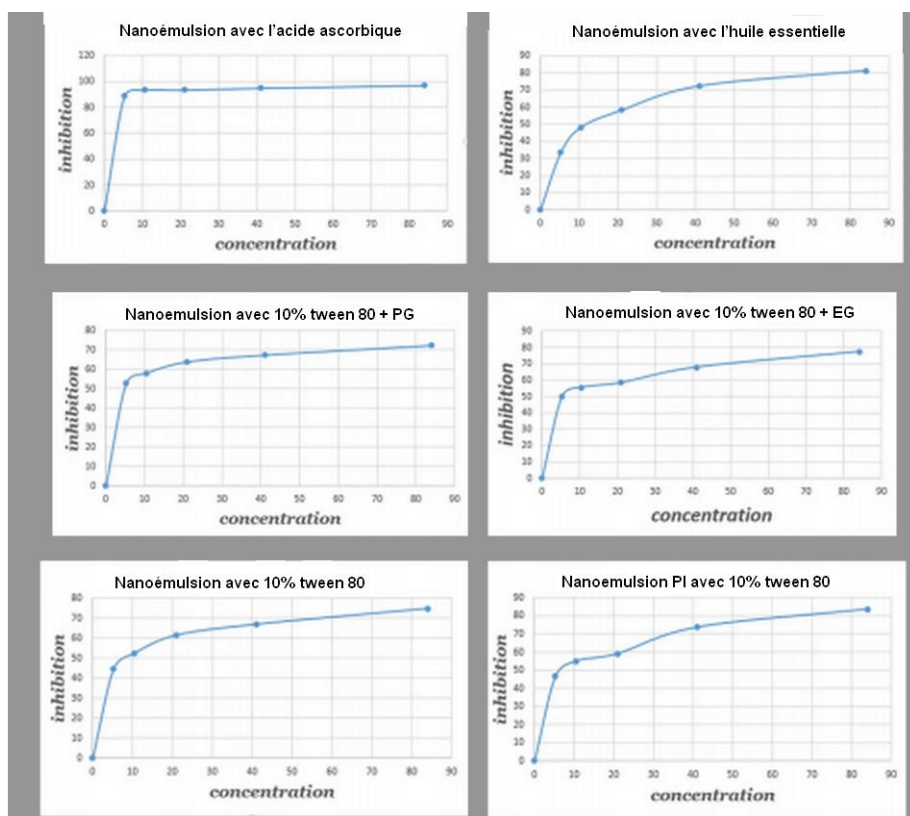


Figure 3.4 : pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration

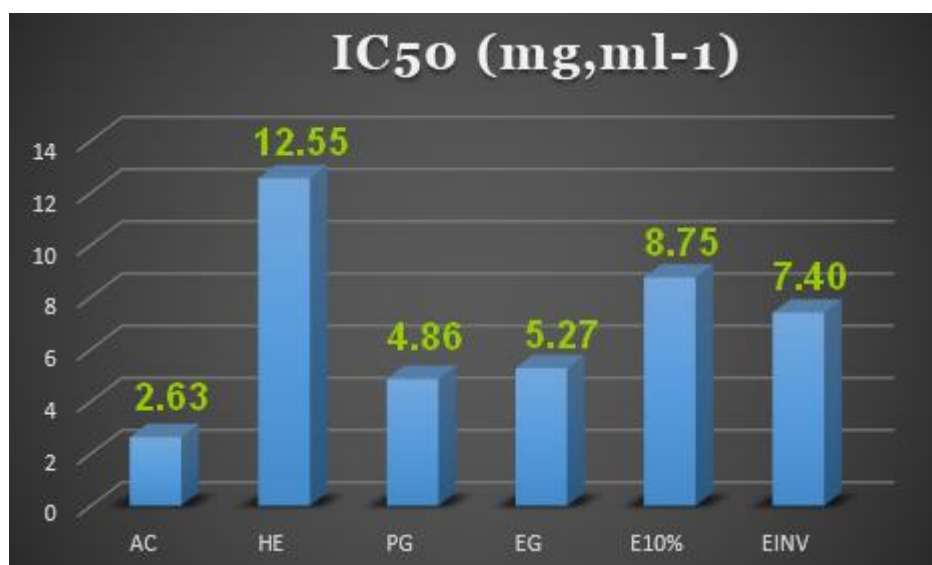


Figure 3.5 : les différentes ic_{50} pour différents échantillons

Chapitre 03 : L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle et la Nanoémulsions

Les valeurs des IC50 sont calculées à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)] en utilisant l'Origine comme logiciel.

L'activité antioxydante des échantillons est exprimée en IC50, qui est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante, et qui exprime la concentration d'antioxydant requise pour diminuer 50% du radical DPPH dans le milieu. La valeur la plus faible de l'IC50 correspond à l'activité anti radicalaire la plus importante. Les résultats montrent que l'huile essentielle de *Citrus Aurantifolia* présentent une faible activité antioxydante avec un IC50 = 12.55 mg/ml par rapport à celle de l'acide ascorbique de IC50= 2.63 qui est une référence pour la comparaison. les valeurs d'efficacité anti radicalaire IC₅₀ des nanoémulsions avec différentes tailles de gouttelettes se sont avérées comprises entre 4.86 mg/ml et 8.75 mg/ml, fait intéressant que l'efficacité anti-radicalaire n'était pas inversement proportionnelle à la taille des gouttelettes dans les nanoémulsions de HE ; une faible capacité antioxydante de 8.75mg/ml avec une taille de gouttelette le plus grande pour nanoémulsion avec 10% tween 80 (A= 2.01) ,puis la nanoémulsion PI avec 10% tween 80 et la nanoémulsion avec 10% tween 80 + EG avec des valeur de 5.27 mg/ml, 7.40 mg/ml successivement. Tandis que la capacité anti-radicalaire a augmenté et atteignait un plateau à environ 4.86 mg/ml avec une taille de gouttelette la plus petite dans le cas de le nanoémulsion avec 10% tween 80 + PG (A=1.490), donc on peut dire que l'activité de piégeage des radicaux DPPH a augmenté avec la diminution de la taille des gouttelettes. Ces résultats sont en accord avec un rapport publié précédemment par L.Lethuaut,et al., (2002) .montrant que les gouttelettes plus petites sont plus sujettes à l'oxydation que les plus grandes gouttelettes [68]. En conséquence les nanoémulsions avec des petites tailles de particule donnent une activité antioxydante élevée qui est associée à la dispersibilité relativement élevée des gouttelettes d'HE dans les nanoémulsions, entraînant une réaction rapide entre les radicaux et les molécules actives qui sont présentent dans l'huile essentielle.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

Cette recherche nous permet de déterminer les principales propriétés chimiques et physiques pour déterminer la qualité de l'huile étudiée.

Nous avons noté que l'indice de saponification ne répond pas aux critères contrairement à l'indice de peroxyde qui est en accord avec ceux cités dans les normes.

Nous constatons que l'indice d'iode de notre échantillon ne correspond pas aux valeurs théoriques, en ce qui concerne l'indice d'acide et l'indice d'ester nous avons trouvé qu'ils répondent aux normes.

La densité relative a démontré que notre échantillon est considéré comme impur bien que l'indice de réfraction, pouvoir rotatoire et le PH sont en accord avec les normes.

L'étude de l'activité anti-radicalaire du DPPH a montré que la nanoémulsion avec le propylène glycol présente un IC50 le plus faible 4.86g/ml, suivi par celui de l'éthylène glycol 5.27 mg/ml, phase inverse 7.40g/ml a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH supérieur à celui enregistré avec la nanoémulsion 8.27 g/ml, puis celle de l'huile essentielle 12.55g/ml.

La comparaison des résultats des IC50 obtenus avec ceux de l'Acide ascorbique, nous a permis de déduire que l'activité antioxydante de la nanoémulsion avec le propylène glycol testé est plus faible par rapport à celle de l'acide ascorbique.

Cette étude confirme l'intérêt des nanoémulsion dans l'amélioration de l'activité antioxydante, des huiles essentielles, donc on peut l'utiliser dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire.

Référence

- [1] K. Möller, La Distillation à l'alambic : un art à la portée de tous, 2008.
- [2] C. J.F, «Apparatus for the determination of volatile oil,» Journal of the American Pharmacists Association, vol. 17, pp. 336-341, 1928.
- [3]«wikipedia,»[Enligne].Available:https://fr.wikipedia.org/wiki/Huile_essentielle#Histoire_et_origine. [Accès le 20 03 2021].
- [4] R. W. e. B. L. WEBBER H.J, The citrus Industry, University of California Press, 1967.
- [5] C. R, Citrus of the World A Citrus directory, France, 2002.
- [6] A. S. A. D. I. M. BAKKALI F, «Biological effects of essential oils,» Food and Chemical Toxicology, vol. 2, n° %146, pp. 446-475, 2008.
- [7] : O. P. DE ROCCA SERRA D., «L'amélioration des agrumes : les ressources génétiques,Fruits,» food and agriculture organization of the united nations, pp. 115-134, 1992.
- [8] : B. y. M. C. Mohamed amine FARHET, citrus d'Algérie les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction, , 2010.
- [9] G. C. COCORIN N., Valorisation chimique du végétal : les agrumes, 2003.
- [10] M. WERNER, Les huiles essentielles : réveil du corps et de l'esprit, Editions Vigot, 2002.
- [11] G. R. R. F. L. e. I. A. S. Baker, « Comparison of oil recovered from tea tree by ethanol extraction and steam distillation,» Journal of Agricultural Food Chemistry, n° %148, pp. 4041- 4043, 2000.
- [12] B. J, Pharcognosie, Photochimie, plantes médicinales, paris: technique et documentation, 1987, p. 585.
- [13]«google,»[https://www.google.com/search?q=citron+vert&rlz=1C1GGRV_frDZ765DZ765&sxsrf=ALeKk03z1FxmJq7n5iqN3y7X0_qeKufi5g:1625495170710&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiTte-xkczxAhW5QEEAHTgICkIQ_AUoAXoECAEQAw&biw=1366&bih=657] [Accès le 20 03 2021].
- [14] Wikipedia:” Key lime” ,https://en.wikipedia.org/wiki/Key_lime (accessed juill,5. 2021)
- [15] B. e. M. BACHÈS, Agrumes- Comment les choisir et les cultiver facilement - Nouvelle édition augmentée, 2011.
- [16] V. J, La santé par les fruits, légumes et les céréales, Ed Vigot. pp: 207-281, 2001.
- [17] A. Goris, Manuel de botanique, Vigot frères, 1 janvier 1967.
- [18] P. J.C., Les agrumes, Maisonneuve G, 1976.

Référence

- [19] P. Izquierdo, J. Esquena, Th. F. Tadros, C. Dederen, M. J. Garcia, N. Azemar, and C. Solans "Formation and Stability of Nano-Emulsions Prepared Using the Phase Inversion Temperature Method" pp. 26-30, 2002
- [20] Date, Abhijit A Dixit, Rahul Nagarsenker, Mangal " Self-nanoemulsifying drug delivery systems :
formulation insights, applications and advances Review" pp. 1595-1616, 2010
- [21] «gogle image,» [En ligne]. Available: <https://genie-alimentaire.com/spip.php?article296>
- [22] David Julian McClements and Jiajia Rao "Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity" pp.287-330, 2018 [24] «gogle image,» [En ligne]. Available: <http://www.microfluidics.fr/technologie/>
- [23] F. L. M. S. J. F. L. C. G. a. V. F. Chemat, «Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: rapid, clean and environmentally friendly approach,» *Analytica Chimica Acta*, p. 157–160, 2006.
- [24] Anton, Nicolas Vandamme, Thierry F " Nano-emulsions and Micro-emulsions : Clarifications of theCritical Differences" pp.978-985, 2011
- [25] Solans, Conxita Solé, Isabel "Current Opinion in Colloid & Interface Science Nano-emulsions :Formation by low-energy methods", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*,pp.246-254, 2012
- [26] Rosen M. J., Kunjappu, "Characteristic Features of Surfactants. In: *Surfactants and Interfacial Phenomena* (4th ed.) ", pp.616, 2012
- [27] T.Tadros , "Polymeric surfactants in disperse systems", *Advances in Colloid and Interface Science*,pp.281-299, 2009
- [28] M. Fryd and Thomas G. Mason," *Advanced Nanoemulsions*", pp.493-518, 2012
- [29] p.Taylor," *Ostwald ripening in emulsions*",pp.108-160, 1998
- [30] P.Izquierdo ,J.Feng , J. Esquena ,T.Tadros , C. Dederen , M.José Garcia , N.Azemar , C.Solans " The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method", pp.388-394, 2005
- [31] Solans, C Izquierdo, P Nolla, J Azemar " *Nano-emulsions* ", pp.102-110, 2005
- [32] Gupta, Ankur Eral, H Burak Hatton, T Alan Doyle, Patrick S," *Nanoemulsions: formation, properties and applications*", pp-2826-2841, 2016
- [33] Zhang, Zipei Mcclements, David J " *Overview of Nanoemulsion Properties : Stability , Rheology , and Appearance*", pp.21-48, 2018
- [34] Maria Patricia RODRIGUEZ ROJAS, " *Emulsification en Cuve Agitée : Rôle du Protocole Opérateur sur l'Inversion de Phase Catastrophique* ",pp.180, 2007

Référence

- [35] S. Achat, K. Madani, F. Dahmoune, S. Medouni, and S. Tamendjari, "Thème de Myrtus communis L en vue de leur incorporation Remerciements," pp. 2012–2013.
- [36] A. Boudjelal et al., "Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 148, no. 2, pp. 395–402, 2013.
- [37] J.-M. Pelt, *La médecine par les plantes*. Fayard, 2014.
- [38] T. DESMIER, "Les Antioxydants De Nos Jours : Definition Et Applications," p. 85, 2016.
- [39] A. Favier, "Stress oxydant et pathologies humaines," *Ann. Pharm. Fr.*, vol. 64, no. 6, pp. 390–396, 2006.
- [40] B. M. Hybertson, B. Gao, S. K. Bose, and J. M. McCord, "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation," *Mol. Aspects Med.*, vol. 32, no. 4–6, pp. 234–246, 2011.
- [41] J. Du and J. M. Gebicki, "Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, no. 11, pp. 2334–2343, 2004.
- [42] B. M. Hybertson, B. Gao, S. K. Bose, and J. M. McCord, "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation," *Mol. Aspects Med.*, vol. 32, no. 4–6, pp. 234–246, 2011.
- [43] V. Visentin, D. Prévot, L. Marti, and C. Carpéné, "Inhibition of rat fat cell lipolysis by monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 466, no. 3, pp. 235–243, 2003.
- [44] "Rapport Bibliographique, Introduction," pp. 1–133.
- [45] A. Bouzabata, F. Boussaha, J. Casanova, and F. Tomi, "Composition and chemical variability of leaf oil of Myrtus communis from north-eastern Algeria," *Nat. Prod. Commun.*, vol. 5, no. 10, p. 1934578X1000501029, 2010.
- [46] (en) [« Acide ascorbique » \[archive\]](#), sur [ChemIDplus \[archive\]](#), consulté le 9 août 2009.
- [47] <https://www.istockphoto.com/fr/vectoriel/alpha-tocoph%C3%A9rol-formule-chimique-structurelle-de-la-vitamine-e-gm1145490654-308344904>
- [48] A. Favier, "Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique," *Actual. Chim.*, no. 11–12, pp. 108–115, 2003.
- [49] R. Kohen and A. Nyska, "Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification," *Toxicol. Pathol.*, vol. 30, no. 6, pp. 620–650, 2002.
- [50] I. Vouldoukis et al., "Supplementation with gliadin-combined plant superoxide dismutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress," *Phyther. Res.*, vol. 18, no. 12, pp. 957–962, 2004.

Référence

- [51] AFNOR,(2000.)Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse Monographies relatives aux huiles essentielles.
- [52] D. Joulain.(1994) Method for analysing essential oil. modern analysis methodologies: use and abuse, perfum., Flavor, vol. 19, pp. 5–17
- [53] Bruneton J.; « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales » (3ème édition). Paris. Ed. Techniques et documentations, Lavoisier, p 575. 1999.
- [54]
<http://dictionnaire.sensagent.leparisien.fr/D%C3%A9termination%20de%20l'indice%20d'acide/fr-fr/>
- [55] <http://sainte-liberte.over-blog.com/article-determination-de-l-indice-d-acide-des-huiles-essentiel-les-62900014.html>
- [56] <https://www.iso.org/obp/ui/#!iso:std:14479:fr>
- [57] <https://www.iso.org/obp/ui/#!iso:std:3976:fr>
- [58] <http://dictionnaire.sensagent.leparisien.fr/D%C3%A9saponification/fr-fr/>
- [59] A. B. C. B. G. Asma Lekouaghta, «In vitro evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of the hydroalcoholic extract and its fractions from *Leuzea conifera* L. roots,» *South African Journal of Botany*, pp. 103-107, 2020.
- [60] B. Ö. E.-D. ,. M. P. ,. Ö.-U. ,. N. A. İsmail Hamad, «Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Aphanes arvensis* Extracts,» *Plant Foods Hum Nutr*, pp. 44-49, 2010.
- [61] A. F. B. L. Gali, «Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*,» *South African Journal of Botany*, pp. 163-169, 2019
- [62]Rao, J., & McClements, D. J. (2011). Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 5026-5035.
- [63]Qian, C., & McClements, D. J. (2011). Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food hydrocolloids*, 25(5), 1000-1008.
- [64]Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., & Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41(1), 61-68.

Référence

[65] Rao, J., & McClements, D. J. (2011). Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: fabrication from sucrose monopalmitate & lemon oil. *Food hydrocolloids*, 25(6), 1413-1423.

[66]AFNOR, 2000, Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1 Echantillonnage et methodcs d'analyse.

[67] AFNOR, 1986, Recueil des normes francaises « Huiles essentielles, AFNOR. Paris, 57P.

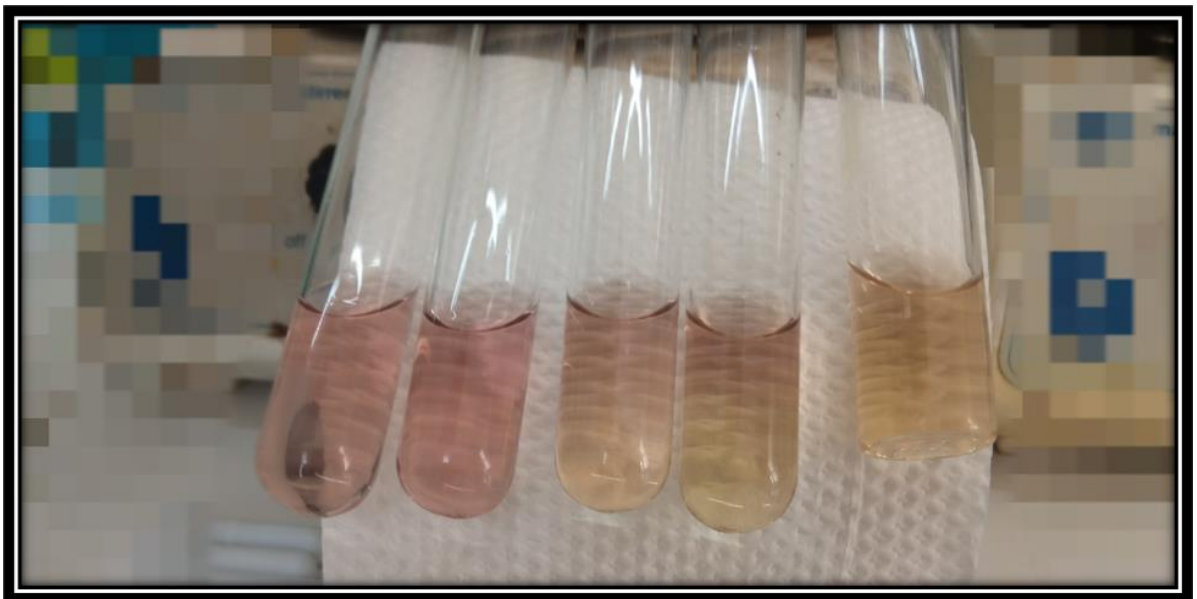
[68] L. Lethuaut, F. Métro, and C. Genot, "Effect of Droplet Size on Lipid Oxidation Rates of Ow Emulsion Stabilized By Protein," vol. 79, no. 5, pp. 425–430, 2002

Annexes

Les planches :

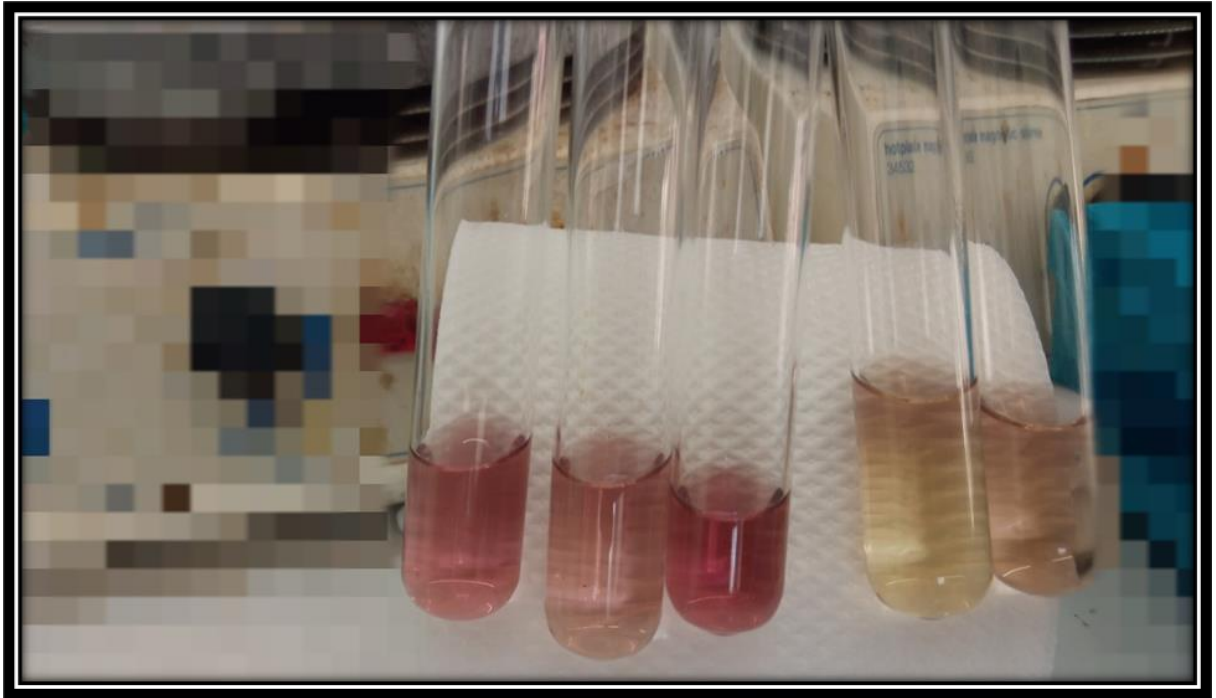


Test du pouvoir réducteur (acide ascorbique)

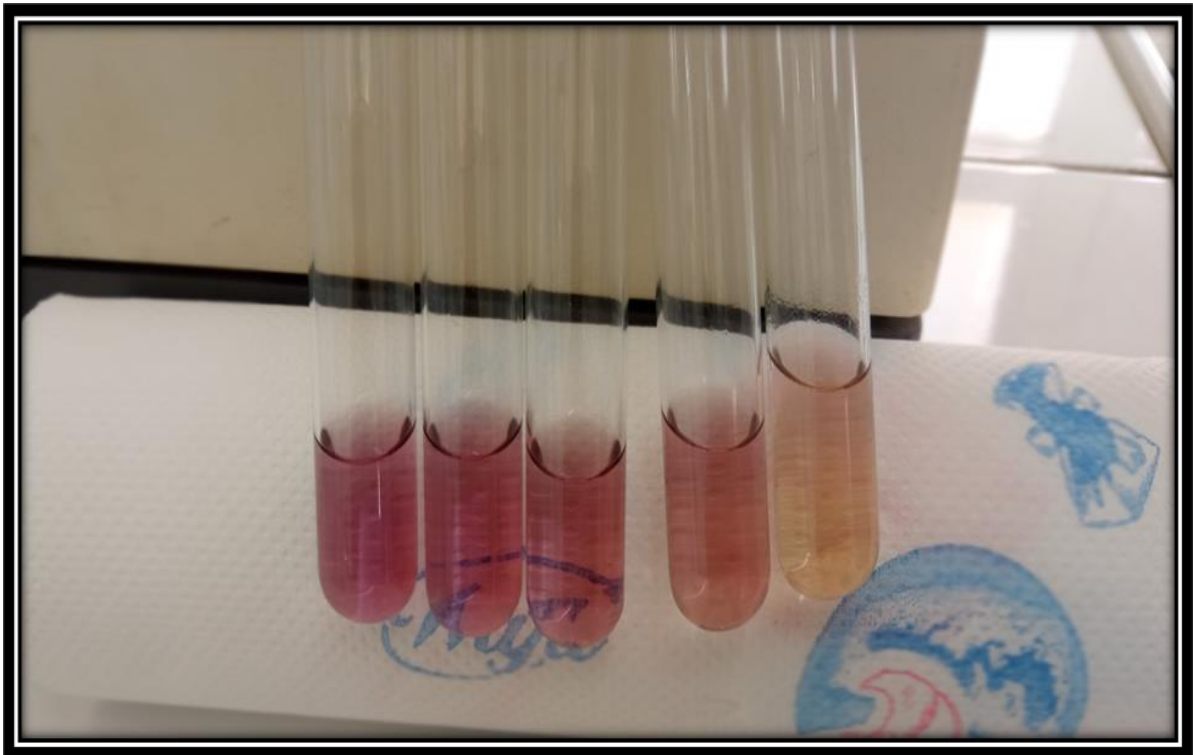


Test du pouvoir réducteur (la nanoémulsion avec 10% tween 80 + PG)

Annexes



Test du pouvoir réducteur (la nanoémulsion avec 10% tween 80+EG)

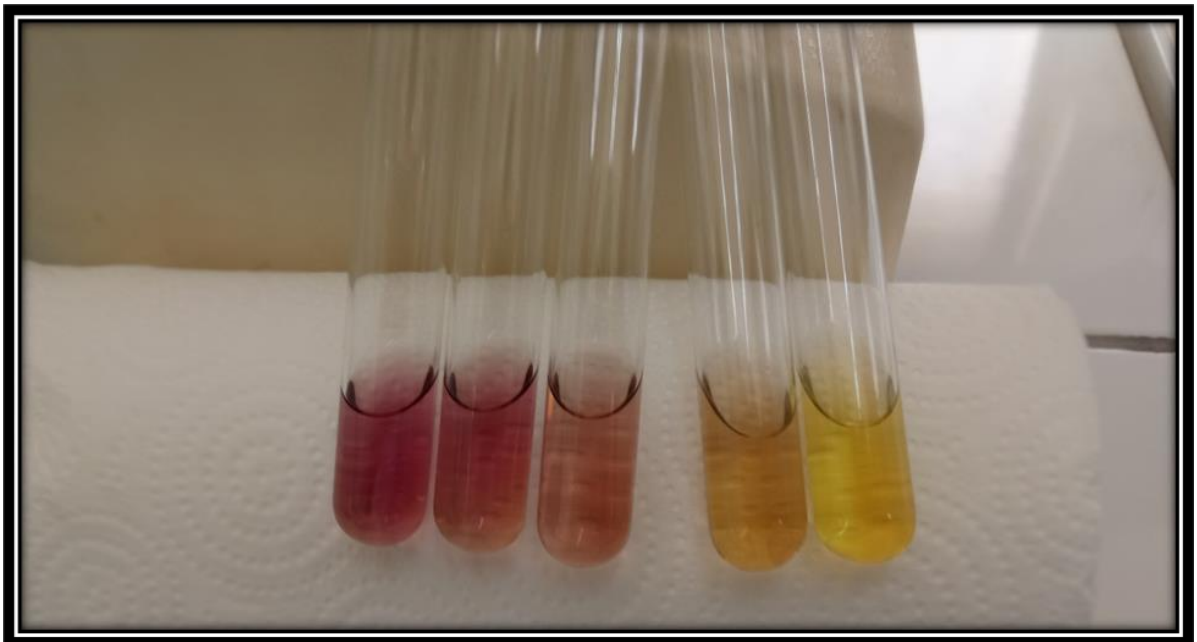


Test du pouvoir réducteur (nanoémulsion avec 10% tween 80)

Annexes



Test du pouvoir réducteur (la phase inverse)



Test du pouvoir réducteur (l'huile essentielle Citrus Aurantifolia)