

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab Blida 1
Faculté de Science Technologique
Département de Chimie Industrielle



Mémoire de Fin d'étude de Master Professionnel
en Génie des Procédés
Spécialité : Pharmacie Industrielle

Etude électrocinétique et rhéologique des interactions bio-polymères (protéines / polysaccharides).

Réalisé par :

DJENAINIA ASMA

MENDIL IMANE

Devant les jurées :

<i>Hadj. Ziane</i>	Université de Blida	Présidente
<i>Zeddami</i>	Université de Blida	Examinatrice
<i>Chikh</i>	Université de Blida	Examinatrice
<i>Ayachi</i>	Université de Blida	Directrice de mémoire

Promotion 2014/2015

DÉDICACE

Avec un énorme plaisir, d'un cœur ouvert et une immense joie que je dédie mon travail à mes parents en particulier et ma grand-mère et toutes la famille,

Ma sœur SOUMIA et ainsi que mon fiancé ZAKARIA et ma belle sœur RAHIMA

Mes amies intimes : MOUNIA, NAZIHA, ASMA, NAZIM

Et aussi mes collègues et mes amies de la promotion 2014 et 2015 de l'université Saad Dahlab Blida.



DÉDICACE

*J'adresse ma dédicace aux plus importantes personnes dans
ma vie, mes parents*

À mes sœurs : Bouchra et Chaïma

À mes frères : Zakaria et Ahmed

À ma famille : Djenainia et Khelfi

Une spéciale dédicace à mon oncle Mohamed

Et Abd el Djalile

*À tous mes collègues de travail soit de laboratoire ou
de la pharmacie.*

*Je n'oublierai pas mes proches amies :
Asma, Amina, Hadjer, Lamia, Saïda , Waffa,*

À ma chère binôme Imane .M

À Asma .Z ; Kawthar .A et a Imy.B

A ma puce Sabrina

*Finalement à mes collègues et mes amis de la promotion 2015
de l'université Saad Dahlab Blida ,spécialité pharmacie
industrielle.*

À tous mes enseignants qui m'ont formée durant mon

Cycle d'études.



REMERCIEMENTS

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله رب العالمين و الصلاة و السلام على سيد المرسلين نبينا و حبيبنا محمد صلى الله عليه و سلم و على آله و صحبه أجمعين

Avant tout un Grand hommage à Allah tout puissant qui nous a donné la force ; la patience et avoir offert le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

Il nous a éclairé nos lanternes, nos sentiers sombres et difficiles tout au long des années de nos études.

*On tient à saisir cette occasion et adresser notre sincère remerciement à notre promotrice **Ayachi Nabila** pour sa patience, et sa compréhension et ses conseils bénéfiques.*

Un grand remerciement aux parents qui nous ont soutenus dans les dures épreuves.

*On tient remercier notre chef de master madame **Hadj Ziane** et on lui dit merci pour votre aide et pour votre intérêt pour notre cursus.*

Nous remercions tous nos amies qui nous ont encouragées à la ténacité et la persévérance.

Nous remercions ceux qui nous ont aidés de loin ou de près pour réaliser ce travail.

Résumé :

L'objectif de notre travail est d'étudier les mélanges de protéines polysaccharides de type gélatine-alginate, et ce à fin d'étudier les interactions entre ces deux polymères et préciser les conditions de formation du complexe. L'étude effectuée à des ratios différents (2 :1 ; 3 :1 ; 4 :1 ; 5 :1) et à des valeurs de pH (2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4) a mis en évidence des mélanges différents par leur nature (solubilité, séparation de phase, complexe insoluble) qui ont été caractérisés sur le plan rhéologique, granulométrique ; zétamétrie et turbidité .

Mots clé :

Interaction ; complexe ; rhéologie ; alginate ; gélatine ; protéines ; polysaccharides ; coacervation.

Abstract:

The objective of our work is to study mixtures of polysaccharide protein (gelatin-alginate) and at end of study the interactions between these two polymers and clarify the complex formation conditions. The study carried out at different ratios (2: 1; 3: 1; 4: 1; 5: 1) and pH values (2; 2,5; 3; 3,5; 4) showed different mixtures by their natures (solubility, phase separation, insoluble complex) that were characterized rheologically, zetametry and turbidity.

Key words:

Interaction; complex;coacervation; rheology; alginate; gelatin;polysaccharides; proteins.

الملخص:

الهدف من عملنا هو دراسة خليط من البروتين ومعدد السكريات من صنف الجينات والجيلاتين وذلك من أجل دراسة التفاعلات بين هذه البوليمرات اثنين وتوضيح شروط تشكيل المعقدة. أجريت الدراسة على نسب مختلفة (2: 1؛ 3: 1؛ 4: 1؛ 5: 1)، وقيم الرقم الهيدروجيني (2؛ 2.5؛ 3؛ 3.5؛ 4) أظهرت مخاليط مختلفة طبيعتها . الشحنات.(الذوبان،مرحلة الانفصال، مجمع غير قابلة للذوبان) هذه الدراسة تم فيها دراسة الخصائص الريولوجية والتعكر وحجم

الكلمات المفتاحية:

السكريات. البروتينات التفاعل. مجمع. تغليف. الريولوجيا. الجينات. الجيلاتين

Sommaire

Résumer	
Remerciement	
Dédicace	
Liste de tableaux	
Liste de figures	
Introduction général	Erreur ! Signet non défini.
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE:	
II .La microencapsulation	3
II.1. Historique	3
II.2. Définition.....	3
II.2.1. Les microparticules.....	4
II.2.2. Les nanoparticules	4
II.2.3. Les liposomes	5
II.3. les avantages de la micro-encapsulation.....	5
II.3.1. La microencapsulation garantit une bonne protection de la substance encapsulée	6
II.3.2. La microencapsulation permet de contrôler la libération de la substance encapsulée.....	6
II.3.3. La micro-encapsulation facilite l'utilisation des produits d'origine liquide.....	6
II.3.4. Masquage du goût ou libération du goût.....	7
II.4. Les différentes applications	7
II.4.1. La cosmétologie.....	7
II.4.2. La pharmacie	7
II.4.3. L'agroalimentaire.....	7
II.4.4. La détergence.....	7
II.4.5. La micro-encapsulation dans le domaine pharmaceutique	8
II.5. Procédés de micro-encapsulation.....	8
II.5.1. Procédés physico-chimiques.....	9
II.5.1.1. Coacervation.....	10
II.5.1.1.1. Coacervation simple	10
II.5.1.1.1. Coacervation complexe.....	10
II.5.1.2. Procédés d'évaporation et d'extraction de solvant.....	11

II.5.1.2. Micro-encapsulation par gélification thermique.....	12
II.5.2. Procédés chimiques.....	13
II.5.2.1. Polycondensation interfaciale.....	14
II.5.2.2. Polymérisation interfaciale.....	14
II.5.3. Procédés mécaniques.....	15
II.5.3.1. Procédés de nébulisation/séchage.....	15
II.5.3.2. Procédés d'enrobage en lit fluidisé.....	15
II.5.3.3. Congélation de gouttes(spray-congealing).....	18
II.5.3.4. Extrusion-sphéronisation.....	18
II.6. Principaux matériaux d'encapsulation.....	19
I. Les interactions protéines /polysaccharides.....	21
I.1. Incompatibilité thermodynamique.....	22
I.2. Compatibilité thermodynamique.....	22
I.2.1. Co-solubilité.....	22
I.2.2. Séparation de phases associative.....	23
I.3. Facteurs influençant la formation de complexes.....	24
I.3.1. Facteurs intrinsèques.....	25
I.3.1.1. Charge et densité de charge.....	25
I.3.1.2. Conformation et poids moléculaires.....	26
I.3.2. Facteurs environnementaux.....	26
I.3.2.1. Ratio protéine – polysaccharide.....	26
I.3.2.2. Concentration en solides totaux.....	27
I.3.2.3. Force ionique.....	27
I.3.2.4. Le pH.....	28
I.3.2.5. Température.....	30
I.3.2.6. Agitation et temps d'agitation.....	31
I.4. Interaction gélatine alginate.....	32
I.4.1. Alginate.....	32
I.4.2. Gélatine.....	32

PARTIE EXPERIMENTALE:

III. Méthodes et matériels	35
III.1.Introduction	35
III.2.Problématique.....	35
III .3.Objectif.....	36
III.4.Matériels.....	36
III.4.1.Matières premières	36
III .4.2.Les réactifs	40
III.4.3.Équipements	40
III.4.3.1. Les équipements de préparations	40
III.4.3.2. Les équipements de contrôles.....	41
III.5.Méthodes.....	41
III.5.1.Méthode de préparation.....	41
III.5.1.1. Matrice d'essai	42
III.5.1.2. Étapes de préparation.....	43
III.5.1.3. Ajustement de pH.....	44
III.5.2.Méthode de contrôle.....	44
III.5.2.1. Mesure de la turbidité.....	44
III.5.2.2. La microscopie.....	45
III.5.2.2. La rhéologie	45
III.5.2.3. Observation microscopique	47
III.5.2.4.L'analyse granulométrique.....	48
III.5.2.5. La zétamétrie.....	49
IV. Résultats et discussion	50
IV.1. Aspect macroscopique et microscopique	50
IV .1. pH =2.....	50
IV.2. pH=2.5.....	50
IV.3.pH= 3.....	51
IV.4.pH=3.5.....	52
IV.5.pH=4.....	53
IV.2.La zétamérie	54
IV.3. La turbidité.....	56
IV .4. La rhéologie	58

IV.5.La granulométrie	59
IV.5.1. pH=2.....	59
IV.5.2.pH=2.5.....	60
IV.5.3.pH=3.....	60
IV.5.4.pH=3.5.....	61
IV.5.5.pH=4.....	61
Discussion globale.....	62
Conclusion générale	65
Référence bibliographiques
Annexes

Liste de tableau :

Tableau	Nom de tableau	Page
Tableau II.1	Polymères d'origine naturelle	19
Tableau II.2	Polymères cellulosiques.	19
Tableau II.3	Polymères de synthèse.	20
Tableau II.4	Lipides et cires minérales	20
Tableau III.1	Propriétés physico-chimiques de la gélatine	39
Tableau III.2	Propriétés physico-chimiques des réactifs.	40
Tableau III.3	Équipements de préparation utilisés.	40
Tableau III.4	Équipements de contrôle utilisés.	41
Tableau III.5	Matrice des essais.	42
Tableau III.6	Valeurs des paramètres caractéristiques des différents modèles.	45
Tableau IV.1	Résultats des mesures du potentiel zêta aux différents pH pour divers ratios (2 :1 ; 3 :1 ; 4 :1 ; 5 :1).	55
Tableau IV .2	L'absorbance des échantillons à des différents pH et ratios.	56
Tableau IV.3	Viscosité de Carreau.	58
Tableau IV.4	Distribution granulométrique en volume ;en concentration ;en densité ;des déférents ratios à pH 2.	59
Tableau IV.5	Distribution granulométrique en volume ;en concentration ;en densité ;des déférents ratios à pH 2.5.	60
Tableau IV .6	Distribution granulométrique en volume ;en concentration ;en densité ;des déférents ratios à pH 3.	60
Tableau IV.7	Distribution granulométrique en volume ;en concentration ;en densité ;des déférents ratios à pH 3.5.	61
Tableau IV.8	Distribution granulométrique en volume ;en concentration ;en densité ;des déférents ratios à pH 4.	62

Introduction générale

Les propriétés fonctionnelles des protéines et des polysaccharides apportent une diversité de qualités organoleptiques. Le comportement de ces macromolécules est grandement influencé par la présence d'autres constituants. Ceci s'illustre, entre autres, par les interactions entre les protéines et les polysaccharides présentes lorsque certaines conditions sont rencontrées. L'intensité et la nature des interactions varient selon la nature ; la concentration des bio-polymères et les conditions du milieu telles que le pH ; la force ionique et la température, etc...

Deux types d'interactions sont rencontrés, les interactions répulsives lorsque les charges entre protéines et polysaccharides sont de même signe, ce qui va conduire à des séparations de phases ; les interactions attractives dans le cas opposé, ce qui va conduire à la formation de complexes de natures et de tailles diverses.

Dans le contexte où s'inscrit notre travail, nous avons tenté d'atteindre l'objectif qui est l'étude des interactions protéines polysaccharides et les paramètres physicochimiques (ratio polymérique, pH) qui permettent la formation du complexe ainsi que la caractérisation rhéologique, électrocinétique et granulométrique des complexes formés.

En effet, La caractérisation et la compréhension des interactions entre les protéines et les polysaccharides permettront d'optimiser leurs utilisations dans des domaines aussi variés que l'alimentation, la chimie des bio-polymères et le biomédical. L'objectif général de cette recherche est de caractériser les interactions entre les protéines et les polysaccharides à l'aide du modèle **gélatine/ alginate**. La plupart des études sur les interactions gélatine / alginate sont portées sur des systèmes gélifiés ou concentrés où la nature des interactions n'était souvent que l'objet des spéculations.

La présente étude porte sur la caractérisation des conditions propices à la complexation entre gélatine/ alginate.

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire est organisé en deux parties:

1. La première partie consiste en une étude bibliographique consacrée d'une part des généralités sur la micro-encapsulation et d'autre part aux interactions protéines polysaccharides.
2. La deuxième partie consiste en une étude expérimentale qui est organisée en deux chapitres :
 - Le premier regroupe les méthodes et les matériaux utilisés.
 - Le deuxième regroupe les différents résultats expérimentaux et discussions.

Enfin une conclusion générale et des perspectives achèveront l'étude.

I. La micro-encapsulation

II.1. Historique

Les premières publications sur la micro-encapsulation et ses applications possibles dans le domaine pharmaceutique remontent à 1931 lorsque Green et son équipe (Unité State Américain) ont établi un processus de micro-encapsulation basé sur l'utilisation d'une enveloppe de gélatine (coacervation) (**Anonyme 8**). [1]

Depuis lors, l'industrie pharmaceutique a développé plusieurs autres matériaux de revêtement et beaucoup d'autres méthodes d'encapsulation. Dans les 30 dernières années, plusieurs brevets ont été enregistrés au sujet de l'encapsulation des principes actifs, médicaux et non médicaux, comme des antibiotiques, vitamines, probiotiques et autres. [1]

D'autres industries ont été intéressées, et le sont toujours, par cette technique : l'industrie alimentaire, l'industrie photographique, l'industrie des engrais, l'industrie des pesticides, etc. En outre, l'industrie chimique avait développé de nouveaux polymères avec des applications potentielles dans la micro-encapsulation. [1]

I.2. Définition

La micro-encapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active : [2]

- Les matériaux enrobants sont des polymères d'origine naturelle, synthétique ou des lipides.
- Les matières actives sont d'origines très variées: principes actifs pharmaceutiques, actifs cosmétiques, additifs alimentaires, produits phytosanitaires, essences parfumées, microorganismes, cellules, ou encore catalyseurs de réactions chimiques ...etc.

Les particules obtenues se divisent en 3 groupes: [2]

- microparticules,
- nanoparticules,
- liposomes.

I.2.1. Les microparticules

Les microparticules présentent une taille comprise entre environ 1 μm et 1 mm et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active. [2]

Les microparticules obtenues présentent deux types de morphologies. [3]

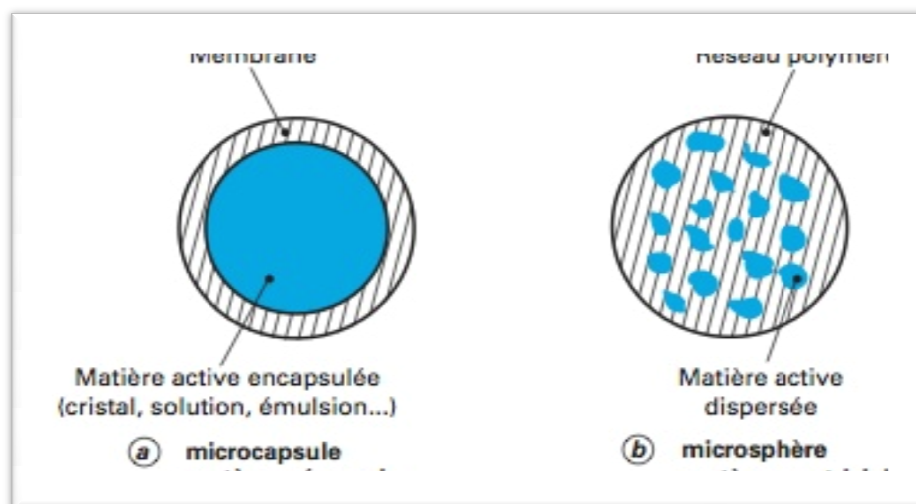


Figure I.1 : *Les microparticules.*

I.2.2. Les nanoparticules

Une nanoparticule est un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes, formants un objet dont au moins une dimension est comprise entre 1 et 100 nm. Cette définition exclue donc les objets dont la plus petite dimension est comprise entre 100 et 1000 nm (fig.I.2). [4]

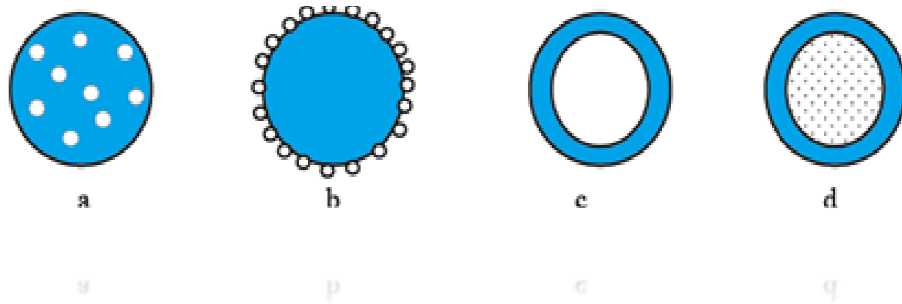


Figure I.2: les nanoparticules.

I.2.3. Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques dont la paroi est constituée par une double couche de molécules de phospholipides et de lécithines par exemple.

Le centre est rempli d'eau ou de solution aqueuse. Les liposomes peuvent véhiculer des substances hydrophiles dans la cavité et des substances lipophiles au niveau des chaînes lipophiles à la périphérie. La paroi des liposomes a une structure proche des membranes biologiques (fig.I.3).[5]

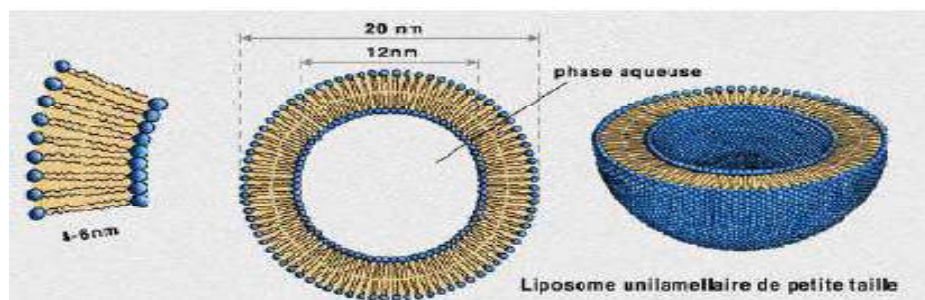


Figure I.3: Représentation schématique des liposomes.

I.3. les avantages de la micro-encapsulation

Parmi les majeurs avantages de cette technique on trouve : [3]

I.3.1. La micro-encapsulation garantit une bonne protection de la substance encapsulée

La micro-encapsulation est un procédé de fabrication de particules fermées dans lesquelles le contenu a été enveloppé à l'intérieur d'un film. La micro-encapsulation permet non seulement d'éviter la pollution secondaire du contenu encapsulé, mais permet aussi une fonction d'isolation de matériaux fonctionnels sensibles à la lumière ou à l'oxygène d'un environnement extérieur, ce qui maintient le contenu encapsulé stable pour une durée de vie plus longue. [6]

I.3.2. La micro-encapsulation permet de contrôler la libération de la substance encapsulée

La micro-encapsulation permet le transfert de masse entre l'intérieur et l'extérieur d'une capsule via le contrôle des propriétés physiques et chimiques de la membrane. Normalement, il y a deux types de processus pour atteindre ce but : soit la diffusion à travers la membrane, soit l'éclatement de la membrane. Au niveau de la diffusion, le contrôle de la taille des pores de la membrane, l'épaisseur de la membrane et le gradient de concentration des molécules spécifiques permettent de contrôler la délivrance continue des principes encapsulés. Par exemple, un arôme encapsulé fonctionne beaucoup plus longtemps qu'un arôme libre du fait d'une diffusion lente et continue. Au niveau de l'éclatement de la membrane, toute la matière encapsulée est libérée en même temps. [6]

I.3.3. La micro-encapsulation facilite l'utilisation des produits d'origine liquide

La micro-encapsulation permet de conditionner des produits liquides sous une forme solide. Ce processus facilite le transport des produits d'origine liquide, qui peuvent fuir ou s'évaporer du récipient. Pour chaque capsule, le dosage est contrôlé par le volume de la capsule. Les capsules pourront donc être apportées séparément selon le dosage dont on a besoin. [6]

I.3.4. Masquage du goût ou libération du goût

La micro-encapsulation permet de masquer le goût amer de principe actif destiné à être administré dans la cavité buccale.

I.4. Les différentes applications [7]

I.4.1. La cosmétologie

- Libération contrôlée de principes actifs
- Protection de pigment/colorant vis-à-vis de la lumière

I.4.2. La pharmacie

- Libération contrôlée de principes actifs

I.4.3. L'agroalimentaire

- Masquage du goût : alimentation animale et complément alimentaire
- Protection d'arôme : chewing-gum, conserves
- Transformation de liquide en poudre (graisse)

I.4.4. La détergence :

- Parfum encapsulé pour adoucissant ou lessive (SOUPLINE de COLGATE)

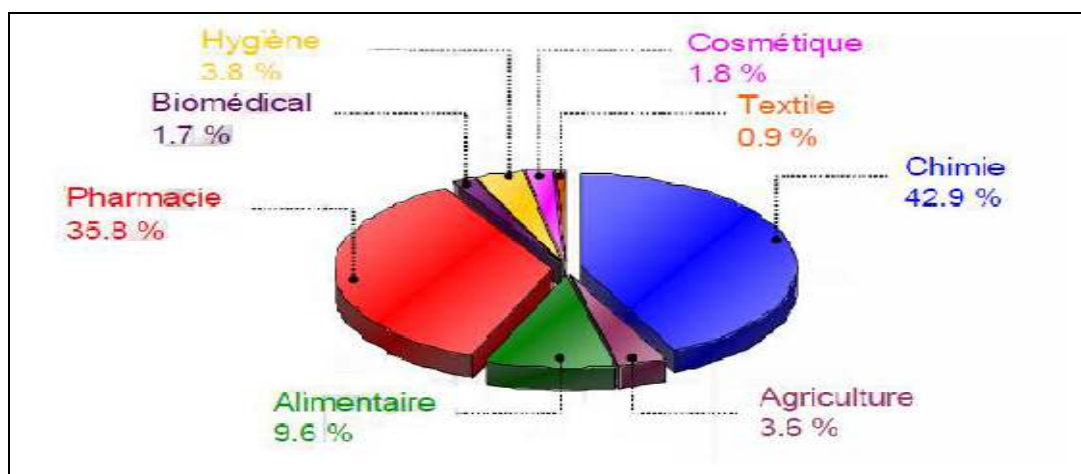


Figure I.4 : Domaines d'application de la micro-encapsulation.

I.4.5. La micro-encapsulation dans le domaine pharmaceutique

Dans le domaine pharmaceutique, des microcapsules contenant des médicaments sont utilisées par voie orale ou par injection interne dans le muscle. Les microcapsules sont principalement conçues pour contrôler la durée de la libération du principe actif. Les microcapsules sont véhiculées dans le corps, puis par la dispersion et l'infiltration du médicament vers l'endroit ciblé ; une concentration propre et une durée spécifique de la libération permettent de donner pleinement les effets du médicament. [3]

I.5. Procédés de micro-encapsulation [8]

Avant de procéder à une préparation d'une micro-encapsulation, il faut tenir compte :

- ✓ De la taille moyenne et de la largeur de la distribution granulométrique.
- ✓ De la teneur en matière active ou taux d'encapsulation.
- ✓ De la forme finale: dispersion de microparticules en phase aqueuse ou en phase solvante, poudre sèche.
- ✓ Des contraintes de stabilité au cours du stockage et au cours de la mise en œuvre ; à la durée de conservation sans libération de matière active, ainsi que du milieu dans lequel les particules seront conservées.
- ✓ Des conditions de libération et de la cinétique de libération. Si l'on souhaite une libération déclenchée, il devra en particulier être précisé quel est le paramètre de déclenchement: pression ou cisaillement mécanique, variation de température, variation de pH, dégradation enzymatique. Pour une libération prolongée, la durée souhaitée de la période de libération sera une des données du problème.
- ✓ Des contraintes réglementaires liées au domaine d'application et au mode d'administration qui sont prescrites dans les réglementations nationales et internationales (Pharmacopée Européenne ou USP par exemple, pour le domaine de la pharmacie).
- ✓ Des choix du procédé et de la formulation déterminant les caractéristiques finales des microparticules.

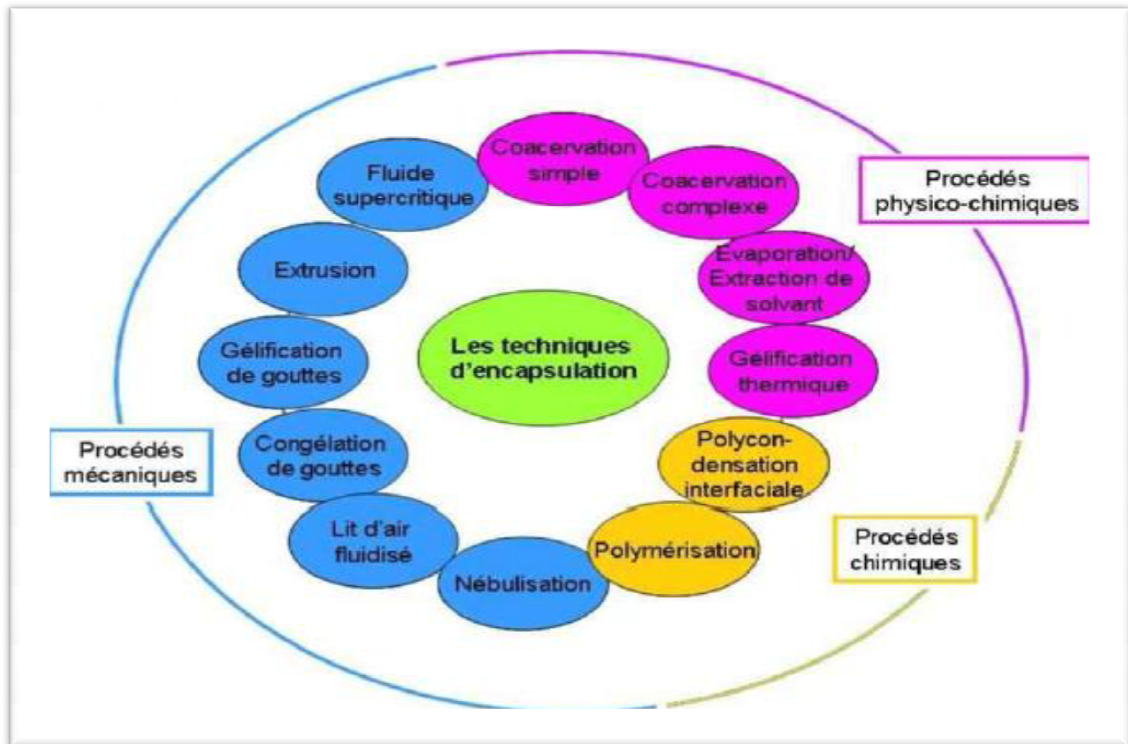


Figure I.5: *les différentes techniques d'encapsulation.*

I.5.1. Procédés physico-chimiques

Les procédés physico-chimiques sont basés sur la maîtrise:

- Des variations de solubilité et des conditions de précipitation des agents enrobants. Il s'agit, par exemple, de la précipitation contrôlée d'un polymère en solution, par ajout d'un non-solvant ou d'un polymère incompatible (coacervation simple), ou encore par variation de température et de pH de la solution (coacervation complexe).
- Des changements d'état (fusion et solidification) des agents enrobants (gélification thermique d'émulsion). [2]

I.5.1.1. Coacervation

Le processus de coacervation s'opère dans des conditions douces (pas de solvant agressif, milieu organique,...) ; par conséquent; ces méthodes sont un bon potentiel pour la micro-encapsulation de cellules vivantes et de molécules labiles, lesquelles ne peuvent pas résister aux conditions dures (chaleur, solvants organiques) qui accompagnent les autres procédés de micro-encapsulation. [8]

I.5.1.1.1. Coacervation simple

Le procédé de coacervation consiste à abaisser la solubilité d'un polymère (coacervation simple) initialement solubilisé dans un solvant organique ou en milieu aqueux, en variant la température ou par ajout d'un électrolyte, d'un non-solvant ou d'un 2^{ème} polymère (agent de coacervation). Il se formera deux phases liquides : l'une riche en polymère (coacervat) et l'autre pauvre en polymère .[2]

I.5.1.1.2. Coacervation complexe

En effet, la structure du coacervat est « complexe » puisqu'elle comprend deux polymères, par opposition à la coacervation simple qui génère des gouttelettes de coacervat constitué d'un seul polymère. La réticulation des microcapsules obtenues se fait par ajout de glutaraldéhyde ou d'acide tannique, ce qui permet de solidifier les particules. [5]

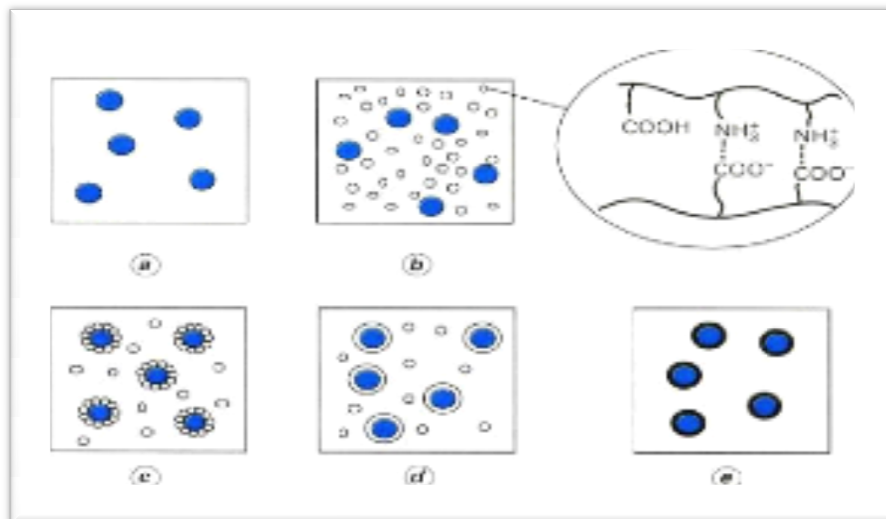


Figure I.6: *Réticulation interfaciale des microcapsules par coacervation complexe.*

I.5.1.2. Procédés d'évaporation et d'extraction de solvant

La méthode de micro-encapsulation par évaporation de solvant repose sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion sous agitation. Les étapes sont résumées comme suit:

Initialement, le matériau d'enrobage, généralement un polymère hydrophobe, est dissous dans un solvant organique volatil. La molécule active à encapsuler est alors soit dissoute, soit dispersée dans la solution organique.

La phase organique est émulsionnée sous agitation dans une phase aqueuse, contenant un agent tensioactif. Une fois l'émulsion établie, le solvant organique diffusé progressivement dans la phase continue sous agitation pour s'évaporer, laissant le polymère précipiter sous forme de microsphères. [2]

Ce procédé permet la fabrication de microsphères de taille entre 0,5 et 200 μm . Le rendement de production peut aisément s'approcher de 100 %.

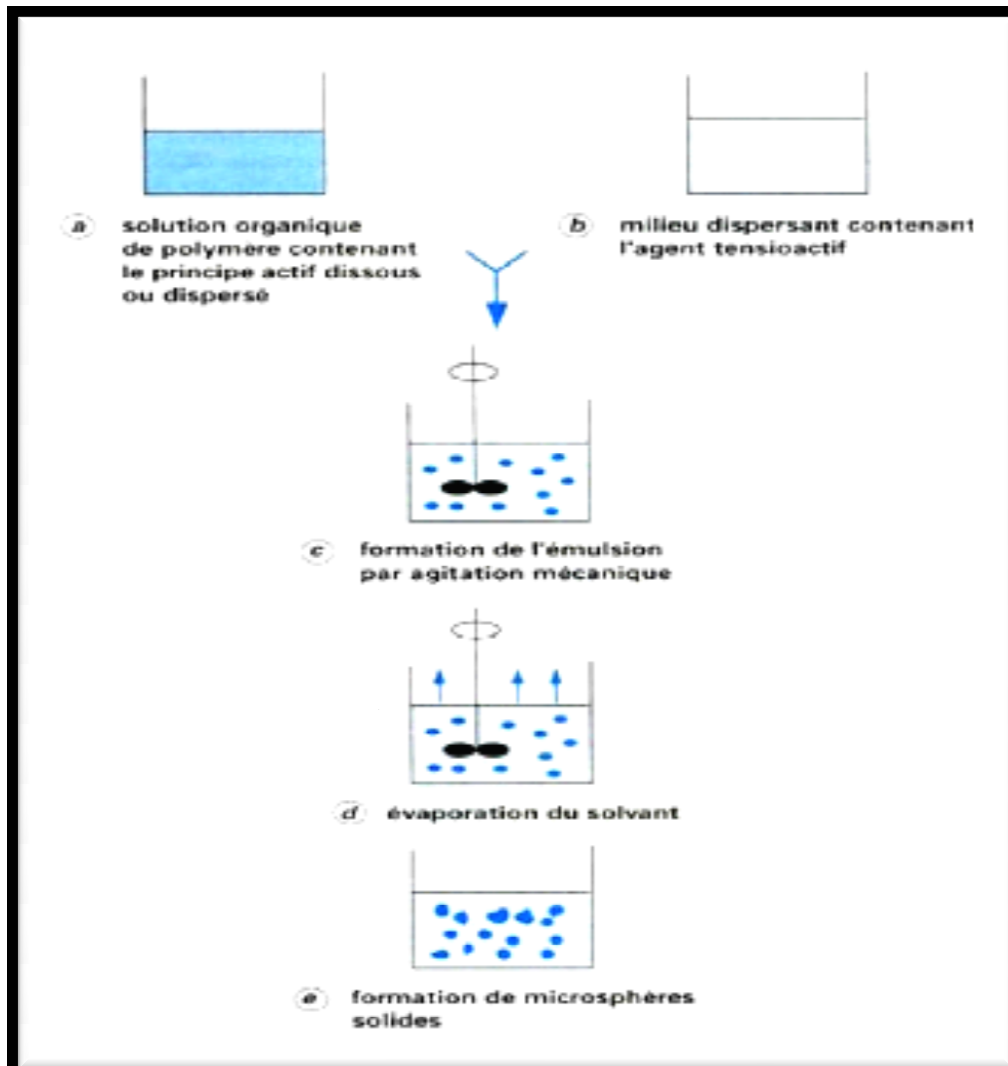


Figure I.7: Schéma de principe du procédé de micro-encapsulation par évaporation de solvant.

I.5.1.3. Micro-encapsulation par gélification thermique

Ce procédé, encore appelé *hot melt*, repose sur la fusion du matériau d'enrobage. La matière active à encapsuler est dissoute ou dispersée dans ce matériau fondu.

L'ensemble est émulsionné dans une phase dispersante, dont la température est maintenue supérieure à la (T_f) de l'enrobage et pour laquelle la matière active n'a aucune affinité: il s'agit d'eau distillée lorsque la substance à encapsuler est lipophile, et d'huile de silicone, par exemple, lorsqu'elle est hydrosoluble. La solidification des globules dispersées est obtenue en refroidissant brutalement le milieu. [2]

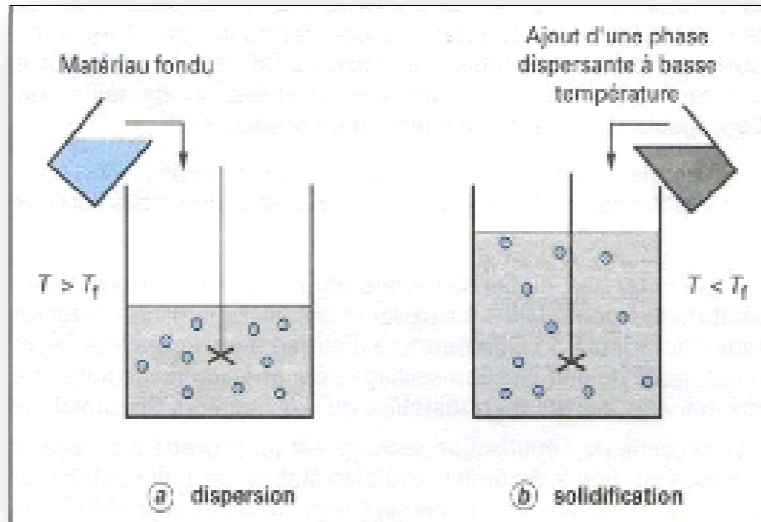


Figure I.8 : Schéma de principe du procédé d'encapsulation par gélification thermique (hot melt).

Comme de nombreuses substances actives sont thermolabiles, les matériaux supports généralement utilisés dans ce procédé de micro-encapsulation sont des lipides de bas point de fusion. Les particules obtenues sont ici des microsphères d'une taille pouvant aller généralement de 30 à 300 μm . La teneur en matière active est de l'ordre de 20 %.

I.5.2. Procédés chimiques

Contrairement aux deux autres classes de techniques qui utilisent des agents enrobants préformés tels que des polymères ou des lipides, les procédés d'encapsulation chimiques reposent sur la formation du matériau enrobant. Les composés de base sont des Monomères. [9]

I.5.2.1. Polycondensation interfaciale

La polycondensation interfaciale met en jeu deux monomères ayant des groupes fonctionnels complémentaires (A et B) chacun soluble dans une des phases d'un système diphasique. L'encapsulation de principes actifs peut être réalisée par cette méthode via un protocole en deux étapes. Dans un premier temps, une émulsion est préparée, la phase dispersée contenant l'espèce à encapsuler ainsi qu'un monomère. Puis cette émulsion est diluée afin d'apporter le second monomère en phase continue. La réaction démarre alors à l'interface des gouttelettes. On obtient, en fin de réaction, une membrane à l'interface des gouttelettes qui renferment l'espèce à encapsulé. [9]

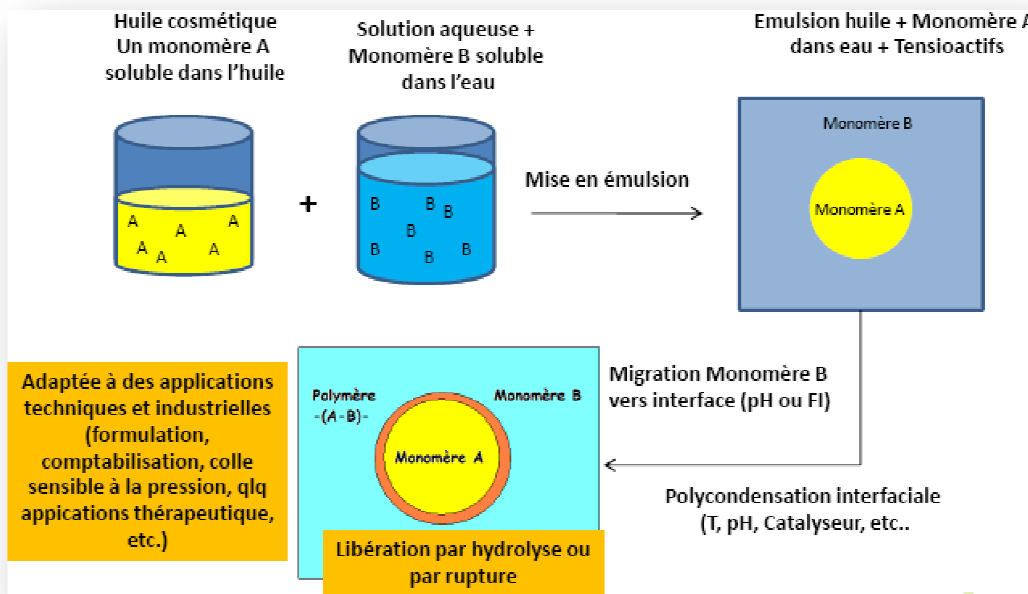


Figure I.9: Mécanisme de la polycondensation interfaciale.

I.5.2.2. Polymérisation interfaciale

Cette technique, combine une émulsion d'eau dans de l'huile (E/H), ou l'huile dans de l'eau (H/E), et une réaction chimique entre deux réactifs à l'interface de la phase dispersée. La phase dispersée contient un solvant, un principe actif et le monomère A. Elle peut être soit aqueuse, soit organique.

La phase continue est constituée d'un solvant et d'un monomère B. Le déroulement d'une polymérisation interfaciale appliquée à la formation de microparticules est schématisé sur la figure N 10. Au départ, l'émulsion se fait en l'absence du monomère B. Ce dernier n'est introduit qu'à partir du moment où l'émulsion est stabilisée. La réaction de polymérisation peut ensuite débuter. [33]

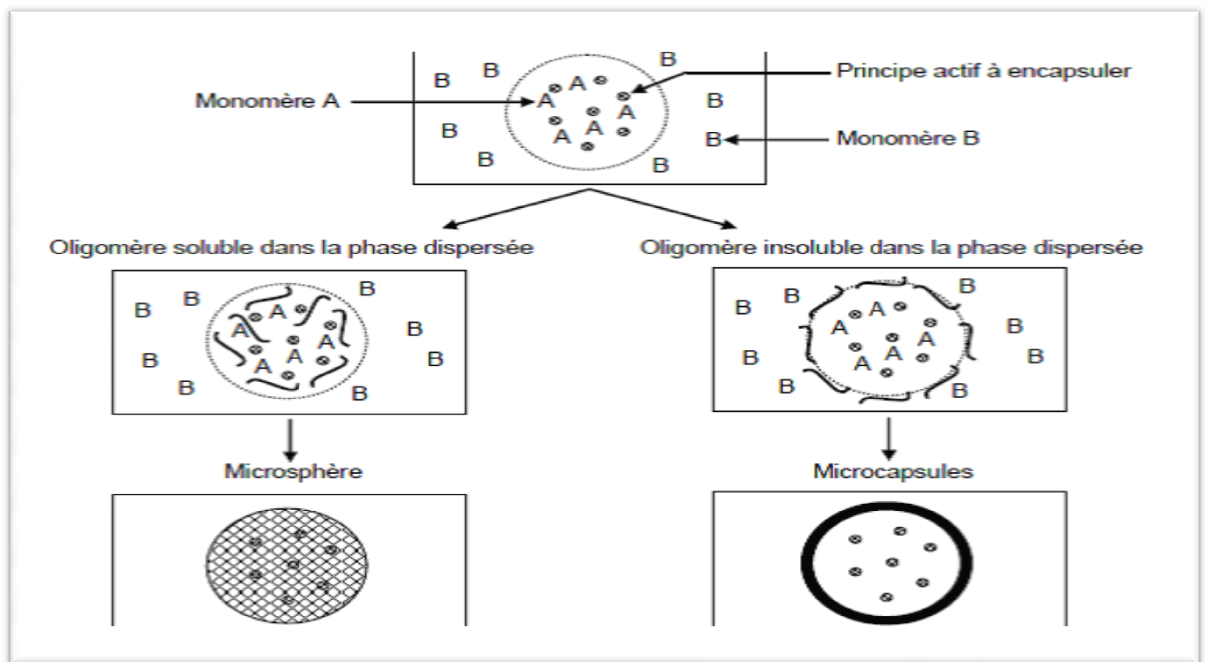


Figure I.10 : Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale.

I.5.3. Procédés mécaniques

I.5.3.1. Procédé de nébulisation/séchage

Le procédé de nébulisation/séchage est un procédé continu en une seule étape qui permet de transformer une formulation liquide initiale en une forme microparticulaire sèche. La formulation liquide initiale peut être constituée : [2]

- Soit d'une solution de matière active et de matériaux enrobants.
- Soit d'une dispersion de particules solides de matière active dans une solution ou une émulsion de matériaux enrobants.
- Soit encore d'une émulsion de matière active dans une solution de matériaux enrobants. Ce procédé comprend les 4 étapes séquentielles suivantes :
 - ✓ Nébulisation de la formulation liquide initiale pour former un aérosol.
 - ✓ Mise en contact de l'aérosol avec un flux d'air, porté à une température contrôlée.
 - ✓ Séchage rapide de l'aérosol pour former des microparticules solides.
 - ✓ Séparation de la poudre de microparticules et de l'air contenant le solvant vaporisé.

Les microparticules obtenues par nébulisation-séchage (Le plus souvent des microsphères) sont d'une taille typiquement comprise entre environ 1 et 50 μm , pour un séchage à cocourant. Le séchage à contre-courant permet d'obtenir des microparticules de taille moyenne plus élevée, comprise entre environ 50 et 200 μm . Le taux d'encapsulation est limité à environ 40 % (en masse).

I.5.3.2. Procédé d'enrobage en lit fluidisé

Le procédé d'enrobage en lit fluidisé s'applique exclusivement à des matières actives constituées de particules solides (granulés, cristaux).

Des matières actives liquides peuvent néanmoins être encapsulées après absorption par des supports particuliers poreux. Le procédé permet de réaliser un enrobage continu de particules qui conduit donc à la production de microcapsules. [10]

Il comprend une séquence cyclique en trois temps :

- Fluidisation de la poudre de particules.
- Pulvérisation des matériaux enrobants sur les particules.
- Séchage et filmification de l'enrobage.

Les formulations liquides qui sont pulvérisées sur les particules en mouvement dans le lit fluidisé sont des solutions ou des dispersions aqueuses ou organiques de polymères.

Quand les gouttelettes de la formulation liquide pulvérisée rencontrent la surface des particules, la formation du film d'enrobage s'effectue en plusieurs étapes successives :

- Contact microparticule-gouttelette.
- Mouillage et étalement de la gouttelette sur la particule.
- Séchage par évaporation du solvant et éventuellement pénétration dans la particule.

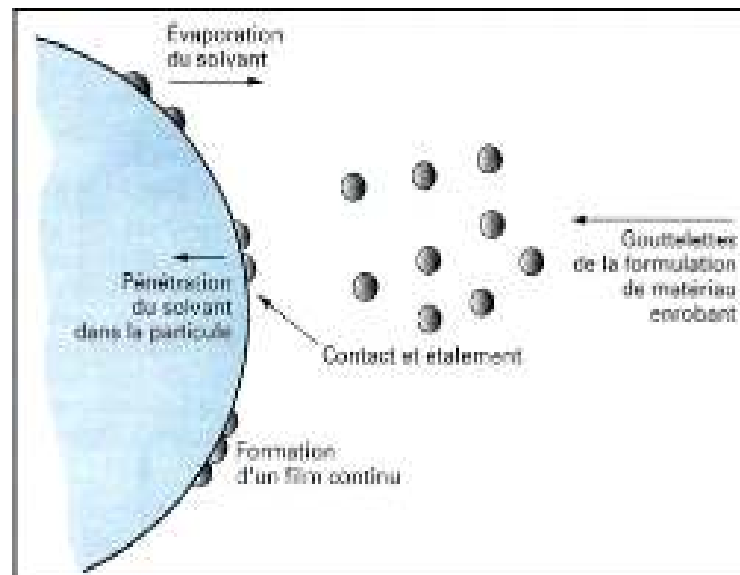


Figure I.11: *Étape de formation d'un film d'enrobage par spraycoating sur des particules solides.*

Les paramètres de procédé, qui doivent être maîtrisés et ajustés pour obtenir un tel enrobage, sont liés soit au séchage du film, soit à la pulvérisation de la formulation liquide. L'épaisseur des films d'enrobage déposés sur des particules en lit fluidisé est généralement comprise entre quelques micromètres et 20 μm . Le film devant être suffisamment épais pour masquer les défauts de surface. Le taux d'encapsulation est généralement élevé, compris entre 60 et 90 % (en masse). [10]

I.5.3.3. Congélation de gouttes (spray-congealing)

Elle fait intervenir un matériel enrobant de type corps gras, glycéride ou cire à point de fusion relativement bas, compris entre 50 °C et 120 °C. Elle consiste à préparer un fondu de ce matériel enrobant dans lequel la matière active est solubilisée ou dispersée soit sous forme particulaire solide, soit sous forme de microgouttelettes d'émulsion inverse (eau dans l'huile). [2]

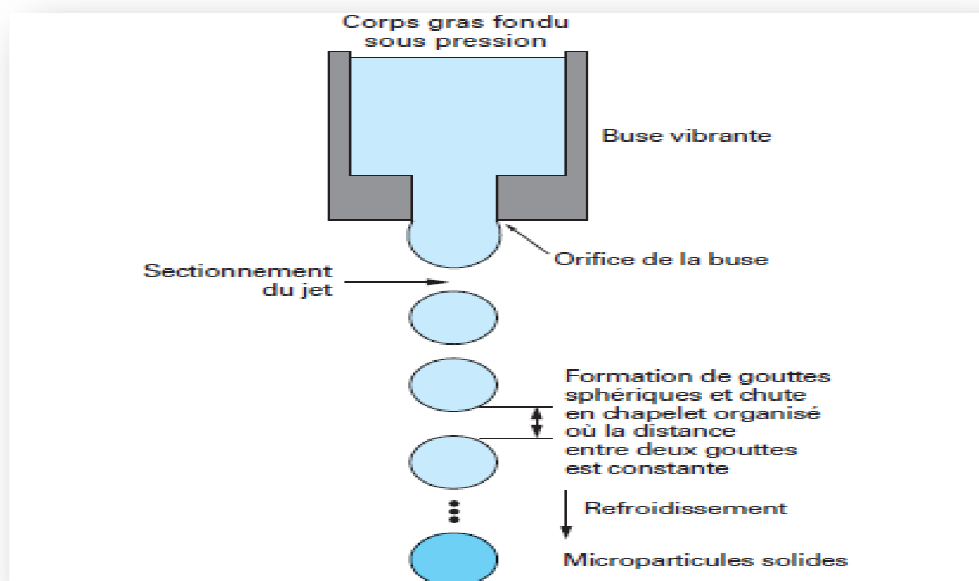


Figure I.12: Schéma de principe de congélation de gouttes.

I.5.3.4. Extrusion-sphéronisation :

La technique d'extrusion-sphéronisation peut être utilisée pour l'encapsulation de poudres de matières actives dans des polymères thermoplastiques, dont la viscosité à l'état fluide permet de préparer des microcylindres homogènes et réguliers.

I.6.Principaux matériaux d'encapsulation : [3]

Tableau I.1 : Polymères d'origine naturelle.

Matériaux d'encapsulation	Procédé utilisables	Exemples de domaines d'applications
Gélatine	Coacervation simple Coacervation complexe	Arôme, parfum, pharmacie, papeterie
Alginate de sodium	Coacervation complexe Gélification de gouttes	Biomédical, arôme, cosmétique, parfum, pharmacie (libération entérique)...
Chitosane	Coacervation complexe Gélification de gouttes Nébulisation Lit d'air fluidisé	Pharmacie (libération gastrique)
Amidon	Nébulisation Extrusion	Alimentaire

Tableau I.2 : Polymères cellulosiques.

Matériaux d'encapsulation	Procédés utilisables	Exemples de domaines d'applications
Ethylcellulose	Coacervation simple Lit d'air fluidisé Nébulisation Extraction/évaporation de solvant	Pharmacie, biomédical
Hydroxypropylcellulose		
Hydroxypropyl méthylcellulose		
Phtalate d'hydroxypropyl méthylcellulose		

Tableau I.3 : Polymères de synthèse.

Matériaux d'encapsulation	Procédés utilisables	Exemples de domaines d'applications
Copolymères acryliques et méthacryliques	Lit d'air fluidisé Nébulisation Evaporation de solvant	Pharmacie
Polyoléfines	Extrusion	Chimie, biomédical, phytosanitaire
Copolymères (acrylo-) vinyliques	Evaporation de solvant	
Polycaprolactone	Nébulisation	Pharmacie, vétérinaire
(homo-) et (co-) polymères d'acides lactique et glycolique	Lit d'air fluidisé Extraction/évaporation de solvant Coacervation simple	

Tableau I.4 : Lipides et cires minérales.

Matériaux d'encapsulation	Procédés utilisables	Exemples de domaines d'applications
Corps gras solides	Congélation de gouttes	Cosmétique, chimie, pharmacie, vétérinaire, alimentaire, textile...
Glycérides	Hot-melt	
Cires (d'abeille, de carnauba, de candelilla...)	Lit d'air fluidisé	
Cires minérales		

II. Les interactions entre protéines et polysaccharides

Lorsque les protéines et les polysaccharides sont mélangés en solution, ils interagissent de différentes façons selon les conditions du milieu. D'un point de vue thermodynamique, deux types d'interactions peuvent se produire. Il s'agit de l'incompatibilité thermodynamique ou séparation de phases ségrégatives et de la compatibilité thermodynamique qui se subdivise en deux états (Fig.II.1): [11-12,14]

- 1) l'état de co-solubilité qui consiste en un système où les deux polymères forment un mélange homogène stable.
- 2) l'état de séparation de phases associatives où les deux polymères interagissent de façon attractive pour former un système diphasique dans lequel ils se retrouvent associés et concentrés dans une même phase tandis que la deuxième phase est pauvre en polymère. Il en résulte dans le dernier cas la formation de complexes électrostatiques entre les polymères.

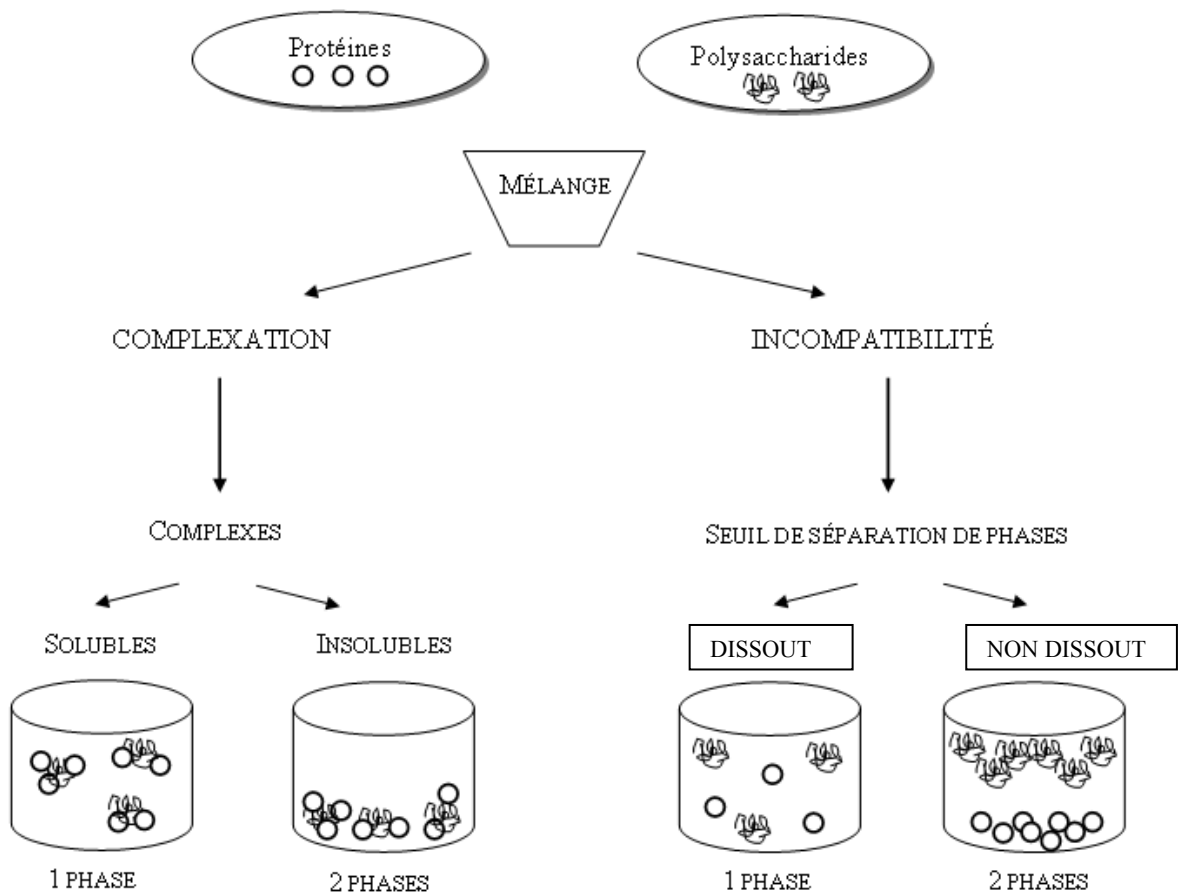


Figure .II.1: Schéma représente les modes possibles de l'interaction protéines et polysaccharides. (Tolstoguzov, 1991.)

II.1. Incompatibilité thermodynamique

Dans l'état d'incompatibilité thermodynamique, il y a formation d'un système biphasique liquide - liquide dans lequel la protéine et le polysaccharide se trouvent séparés, chacun dans l'une des deux phases. L'incompatibilité a lieu lorsque les polymères en solution sont de même nature. Les charges des molécules sont de même signe. [11-12,14]

L'incompatibilité dépend aussi d'autres facteurs tels que, le pH du milieu, la flexibilité des chaînes du polysaccharide, le poids moléculaire des polymères, la concentration en sels ainsi que la concentration en solides totaux. Par exemple, pour des systèmes protéines/polysaccharides anioniques, l'incompatibilité peut survenir à des hautes forces ioniques (supérieures à 0,25 M), à un pH supérieur ou égal au point isoélectrique de la molécule de protéine et à des concentrations en solides totaux supérieures à 4%. [11-12,14]

II.2. Compatibilité thermodynamique

Dans le cas d'une compatibilité thermodynamique, deux situations peuvent se présenter:[11-12,14]

- 1) la formation d'un mélange homogène et stable de polymères représentant l'état de co-solubilité ;
- 2) un système biphasique où les deux polymères se retrouvent principalement dans l'une des deux phases par séparation de phases associatives.

II.2.1. Co-solubilité

Dans le cas de la co-solubilité, le mélange spontané des protéines et des polysaccharides est homogène et stable, permettant aux deux polymères de coexister en équilibre dans la même solution.

Cet état de co-solubilité peut en tout temps basculer en incompatibilité si la différence de poids moléculaire entre les deux polymères augmente. Ceci pourrait déséquilibrer le rapport des forces attractives et répulsives qui stabilisent le système. La formation de ce type de système est favorisée à de faibles ratios protéines - polysaccharides. [11-12,14]

De plus le maintien des deux polymères en état de co-solubilité est assuré par des interactions électrostatiques mais aussi par des liaisons hydrogènes. Cet état de co-solubilité est rarement observé vu la nature différente des polymères ainsi que la grande diversité de leurs groupements fonctionnels qui pourraient conduire à des attractions ou des répulsions. [11-12,14]

II.2.2. Séparation de phases associatives

Dans le cas d'une séparation de phases associatives, un système diphasique liquide-solide se forme et les deux polymères se trouvent essentiellement dans une même phase. Ce système est caractérisé par la formation d'un complexe protéine-polysaccharide, dans certains cas appelé coacervation complexe, par le biais d'interactions électrostatiques entre des polymères de charges opposées (fig.II.2). [11-12,14]

Lors d'une séparation de phases associatives, les interactions électrostatiques favorisent l'association des polymères, sont représentées par des forces attractives électrostatiques entre les groupements carboxyliques du polysaccharide et les résidus chargés positivement de la protéine. [11-12,14]

Il en résulte une formation de précipités qui permet de distinguer une phase riche en complexes de polymères et une phase de solvant presque complètement dépourvue de polymères. Ces complexes sont stabilisés par des liaisons hydrogènes, des forces de van der Waals et des interactions hydrophobes. [11-12,14]

La zone de pH favorable à la formation de ces complexes se retrouve généralement entre le point isoélectrique de la protéine et le pKa des groupements carboxyliques du polysaccharide. Cette formation de complexes est aussi favorisée par la présence de faibles forces ioniques. [11-12,14]

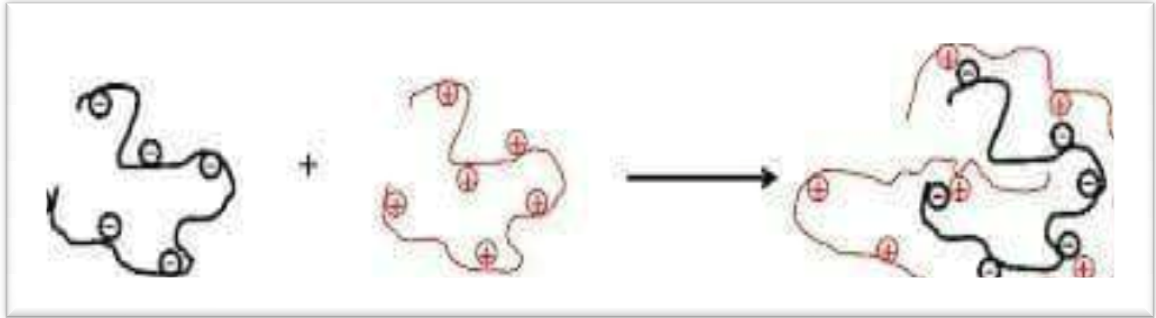


Figure .II.2 : *Comportement d'association de polymère protéine (anionique) et polysaccharide (cationique).* [13]

II.3. Facteurs influençant la formation de complexes

Les facteurs qui influencent la compatibilité entre les protéines et les polysaccharides peuvent être classés en deux groupes : les facteurs intrinsèques et les facteurs environnementaux. Les facteurs intrinsèques sont ceux inhérents aux macromolécules en mélange et incluent notamment la charge totale, la densité de charge, la conformation, la flexibilité des chaînes et le poids moléculaire.

Les facteurs environnementaux sont ceux qui peuvent être contrôlés directement lors du mélange de biopolymères et incluent le ratio protéine – polysaccharide, la concentration en solides totaux, le pH, la force ionique, la température et les forces de cisaillement.[14]

II.3.1. Facteurs intrinsèques

Les plus importants facteurs intrinsèques sont la charge relative et la densité de charges des deux biopolymères, à noter que ces facteurs peuvent être contrôlés en ajustant le pH et la force ionique, alors il faut toujours les considérer conjointement.[14]

II.3.1.1. Charge et densité de charge

Le processus de formation de complexes est principalement influencé par la nature et la densité des charges présentes sur les macromolécules. La densité de charges des bio-polymères peut être définie comme le nombre de charges par unité de longueur. Ce facteur est très important d'autant plus que si la densité de charges est trop faible, l'interaction électrostatique n'intervient pas et la formation de complexes est inhibée. [11-12,14]

De plus, la charge nette des complexes influence la solubilité de ceux-ci dans leur milieu. Par exemple, si un polymère possède un excès de charge par rapport à un deuxième polymère, les complexes formés auront tendance à interagir avec le solvant. Cependant si les charges des deux polymères se neutralisent complètement pendant la formation de complexes, ceux-ci seront insolubles. Ces complexes peuvent être à nouveau solubles par titration acide ou par ajout de sel. [11-12,14]

Un autre facteur important relié à la densité de charges qui est la conformation des polymères. Une molécule de protéine globulaire sera plus limitée dans son interaction avec la molécule de polysaccharide par rapport à une molécule de structure plus désordonnée (gélatine, caséine) qui offre plus de sites chargés, facilitant ainsi les interactions avec la molécule de polysaccharide. [11-12,14]

L'hétérogénéité de la distribution des charges à la surface des molécules globulaires des protéines peut avoir comme conséquence la formation de complexes dans une zone défavorable à la formation de complexes par rapport au point isoélectrique de la protéine. [11-12,14]

II .3.1.2. Conformation et poids moléculaires

Les bio-polymères à haut poids moléculaire ont une plus grande tendance à induire une séparation de phases à cause de leurs volumes élevés et des effets stériques.

Ceci serait dû à une restriction de mouvement qui résulte en la réduction de l'entropie de mélange et favorise donc une séparation de phases. Ainsi, une plus faible concentration est nécessaire pour induire une séparation de phases du fait que le nombre de points d'interactions entre segments d'une chaîne de polymère, est proportionnel à son poids moléculaire et à sa flexibilité. Ce sont alors les polysaccharides flexibles qui seront plus effectifs pour induire une séparation de phases, comparativement aux polysaccharides plus rigides. Les changements qui augmentent le poids moléculaire ou la rigidité des molécules favorisent également leurs incompatibilités. [14]

II.3.2. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux sont ceux qui peuvent être directement contrôlés lors du mélange de bio-polymères et incluent le ratio protéine – polysaccharide, la concentration en solides totaux, le pH, la force ionique, la température et les forces de cisaillement.

II.3.2.1. Ratio protéine – polysaccharide

Le ratio protéine - polysaccharide (P:Ps) a un effet important car l'étendue de la complexation sera différente selon la quantité de bio-polymères disponibles pour interagir. Le ratio optimal d'interaction variera selon le ratio des charges portées par les bio-polymères. Ainsi, les complexes sont neutralisés plus rapidement à de hautes teneurs en protéine du fait que plus de protéines sont disponibles pour interagir. [14]

Alors le ratio (P:Ps) est un facteur influençant la charge nette et les propriétés des complexes obtenus. Il en résulte une influence sur la solubilité des complexes. En effet, à un pH et à une force ionique donnée, le ratio (P:Ps) massique va conditionner la neutralisation des charges entre les deux macromolécules. [11-12,14]

Si la neutralisation des complexes se produit à un ratio (P:Ps) de 1, toute augmentation ou diminution de ce ratio entraînera un gain de solubilité des complexes et par conséquent une diminution des complexes. [11-12,14]

II.3.2.2. Concentration en solides totaux

La concentration totale de bio-polymères est aussi un paramètre non moins important dans la formation de complexes par coacervation. Des études sur 80 systèmes ternaires effectuées par Tolstoguzov en 1986, ont montré qu'à des concentrations de bio-polymères supérieures à 4% l'apparition de complexes est supprimée au profit d'une séparation de phases ségrégative. Cependant en 1964; Phares & Sperandio, en diluant le système déjà concentré en polymères totaux, la formation de complexes devient possible à nouveau. [14]

II.3.2.3. Force ionique

Les principales forces responsables des interactions entre protéines et polysaccharides anioniques sont de nature électrostatique, donc la force ionique à un grand effet sur l'interaction. À des forces ioniques élevées, la complexation est réduite ou inhibée car l'entropie de mélange, qui aurait été gagnée par le relargage des contre-ions, est perdue. La concentration en sel influence aussi les interactions électrostatiques et la compatibilité des molécules puisque les ions peuvent bloquer les sites réactifs des polymères, réduisant leurs densités de charge et favorisant l'association entre protéines, occasionnant une incompatibilité entre les deux polymères. [11-12,14]

Ainsi, les concentrations ioniques relativement faibles favorisent la formation de complexes de bio-polymères, car le nombre de charges sur ces molécules est suffisant pour effectuer des liens électrostatiques entre elles sans être significativement influencés par les ions. Par contre, à de fortes concentrations en ions, il y a un effet inverse, celui de la suppression des complexes, qui se justifierait par l'entrée en compétition des ions avec les macromolécules. [11-12,14]

Mattison et al. (1995) et Schmitt et al. (1998) ont montré que les ions divalents supprimaient la coacervation complexe à des concentrations ioniques plus faibles que les ions monovalents, mais que cette suppression pouvait être levée si la solution des ions divalents était diluée. Ceci démontrera que l'effet ionique des ions divalents est plus fort que celui des ions monovalents. [11-12,14]

II.3.2.4. Le pH

Le pH joue un rôle très important dans le processus de formation de complexes entre les protéines et les polysaccharides. En effet, le pH est responsable de l'ionisation des macromolécules afin que des interactions électrostatiques puissent s'effectuer.

Plus précisément, le pH contrôle l'ionisation des groupements des chaînes latérales, des groupements aminés et carboxyliques des protéines et des groupements carboxyliques des polysaccharides (fig.II.3). [15]

Les complexes formés peuvent être solubles ou insolubles dépendamment du degré de neutralisation des charges opposées. Des polymères fortement chargés, résultant de la variation du pH, auront une conformation modifiée qui les amènera à former des agrégats insolubles au détriment de la formation de complexes solubles. [11-12,14]

En fait, pendant la formation de complexes entre protéine et polysaccharide anionique, la charge nette (négative) des molécules de polysaccharides diminue progressivement, avec la baisse du pH, pendant qu'elles s'attachent aux molécules de protéine chargées positivement.

La conséquence directe qui en découle est la diminution de la solubilité et de l'hygroscopicité de ces polymères et finalement la formation de complexes. Le maximum d'interactions apparaît à un point appelé point d'équivalence électrique (PEE) où la protéine et le polysaccharide possèdent des charges également opposées. [11-12,14]

Selon Weinbreck et al, lors de l'acidification du mélange protéine/polysaccharide, un début de formation de complexes solubles apparaît d'abord à un certain pH baptisé pH_c qui serait dépendant de la force ionique, du point isoélectrique de la protéine et de la densité de charges des polymères. [11-12,14]

En 1988, Versic a montré que la valeur de ce pH pourrait aussi être influencée par :

1. la vitesse d'agitation ;
2. le ratio ingrédients/polymères ;
3. les caractéristiques des polymères ;
4. les caractéristiques des ingrédients (mouillabilité, solubilité) ;
5. la vitesse du refroidissement ;
6. l'ordre d'addition des différents composés.

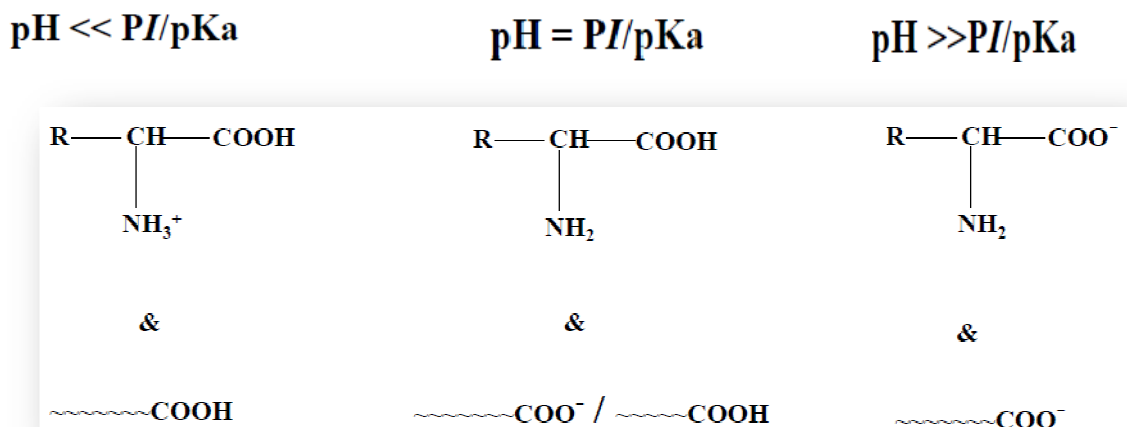


Figure .II.3: Influence du pH sur les interactions entre protéines/polysaccharides. [16]

Avec la baisse du pH, les interactions deviennent de plus en plus fortes, les complexes solubles s'agrègent et la séparation de phases apparaît à un pH désigné pH_{s1} . Si la baisse de pH continue, les complexes se dissocient à un autre pH désigné pH_{s2} (non indiqué). Par ailleurs, le degré d'implication de la charge électrique nette d'un polymère dans les interactions coulombiennes dépend de l'écart de pH entre le point isoélectrique (PI) du polymère et le pH de la solution dans laquelle il se trouve.

Ainsi, la plupart des protéines alimentaires (PI autour de 5) peuvent former des complexes avec les polysaccharides anioniques puisque les deux polymères porteront des charges opposées. Cependant la tendance vers une formation de coacervation complexe insoluble est favorisée par de faibles concentrations de sel et par des valeurs de pH en dessous du PI de la protéine (**Dickinson, 1998**).

Strege et al. (1990) ont dit que la purification des protéines peut être spécifique par simple ajustement du pH, comme c'est le cas en purification sur colonnes échangeuses d'ions.

II.3.2.5. Température

La température influence les interactions non coulombiennes. À titre d'exemple, les liaisons hydrogènes sont favorisées par une diminution de la température alors que les interactions hydrophobes et liaisons covalentes sont favorisées par l'augmentation de la température.

La séparation de phases associatives dans un système protéine/polysaccharide est donc favorisée par une diminution de la température permettant l'établissement de liaisons hydrogènes.

D'après Schmitt et al. (1998), l'augmentation de la température peut aussi être indirectement bénéfique à la séparation de phases associatives dues à l'exposition de sites réactifs lors de la dénaturation des protéines ou au changement de conformation du polysaccharide. [11-12,14]

Ces changements peuvent favoriser les interactions électrostatiques associatives entre protéines et polysaccharides. Des protéines ayant été individuellement dénaturées par la chaleur ont une interaction différente à la surface des gouttelettes d'huile ou avec d'autres macromolécules, comme les polysaccharides, par rapport aux protéines natives non traitées. [11-12,14]

II.3.2.6. Agitation et temps d'agitation

L'effet de l'agitation a pu être mis en évidence dans plusieurs études. Par exemple, le diamètre des complexes obtenus entre l'albumine et la gomme acacia était de 2,2 μm après augmentation de la vitesse d'agitation à 420 rpm alors qu'il était de 3,1 μm à 200 rpm d'après Tirkkonen et al, (1994).

Par contre, dans une étude de Burgess et Singh (1993), aucun effet de l'agitation à 450 et 900 rpm pendant une heure n'est obtenu avec le même système albumine/gomme acacia.

Bien que ces deux études donnent des résultats différents, d'autres (Schmitt et al, 1998) effectuées sur le complexe de bêta-lactoglobuline/gomme acacia, avec un ratio de 4:1 à pH 4 et une concentration totale en polymères de 0,1% p/p, ont montré (par absorbance à 650 nm et par micrographie à contraste de phases) que la taille des coacervats était dépendante du temps d'agitation. Après une courte durée d'agitation (15s), des coacervats de petites tailles étaient obtenues (1 μm) alors que de longues durées d'agitation (60s) permettaient une coalescence des particules (10-25 μm).

Par ailleurs, Lamprecht et al, (2001) ont dit que l'évaluation des paramètres d'encapsulation d'acides gras Q-3 insaturés par des complexes gélatine-gomme arabique a permis de constater qu'une augmentation de l'homogénéisation de l'émulsion huile (acides gras Q-3) dans eau (contenant des complexes gélatine-gomme arabique), par agitation à 9000 rpm, augmentait le taux d'encapsulation .

Cela pourrait s'expliquer par un changement de la structure du matériel encapsulant en une structure de matrice (possible changement de conformation de la protéine) favorisant l'encapsulation. [11-12,14]

II.4. Interaction gélatine /alginate

II.4.1. Alginate

L'alginate est classé comme un hydrocolloïde (un bio-polymère hydrosoluble de nature colloïdale à l'état hydraté). Les premières études scientifiques sur l'extraction des alginates de l'algue brune ont été faites par le chimiste britannique CE Stanford à la fin du 19^{ème} siècle, et la production à grande échelle de l'alginate a été introduite 50 ans plus tard. [17]

L'alginate est l'un des bio-polymères les plus polyvalents et il est utilisé dans une large gamme de produits alimentaires, pharmaceutiques et spécialisé pour les applications : comme un épaississant, stabilisant, gélifiant, filmogène [18]. Il se produit dans les algues comme un mélange de sels de calcium, de magnésium, de sodium et de potassium. [19]

Il est composé de plusieurs unités de construction (typiquement 100 à 3000) reliés entre eux dans une chaîne flexible. Les molécules longues construites à partir de polymères identiques ou presque identiques sont appelées des unités de construction, tandis que les unités de construction elles-mêmes sont appelées monomères. Les polymères d'origine naturelle sont communément appelés bio-polymères. [18]

II.4.2. Gélatine:

La gélatine est définie comme un produit obtenu par hydrolyse partielle du collagène dérivée de la peau, le tissu conjonctif blanc et les os des animaux. Elle est dérivée d'un précurseur traité à l'acide, connu comme la gélatine de type A et d'un processus traité à l'alcali, connu sous le nom de gélatine de type B. [20]

La gélatine est presque insipide et inodore. De couleur jaune pâle vitreuse. Elle contient 8 à 13% d'humidité et a une densité relative de 1/3 à 1/4. Lorsque les granules de gélatine sont trempés dans l'eau froide, elles s'hydratent en particules gonflées discrètes. Après avoir été chauffées à 60 C⁰, ces particules gonflées se dissolvent pour former une solution. Ce procédé de préparation de solutions de gélatine est préférée, en particulier lorsque des concentrations élevées sont souhaitées. Le comportement de solutions de gélatine est influencé par la température, le pH, la teneur en cendres, le procédé de fabrication, le traitement thermique et la concentration. [21]

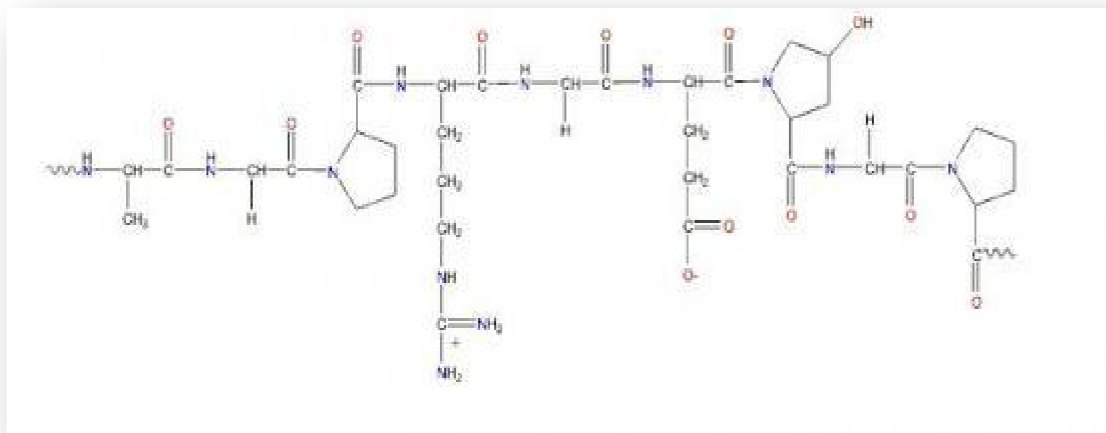


Figure .II.5 : Structure de la molécule de gélatine. [22]

En général, les interactions entre les protéines et les polysaccharides sont assez explorées où un grand nombre de rapport ont été publiés sur la base des interactions entre la gélatine et l'alginate.

Ana Carla K. Satoa et Rosiane L. Cunhaa, en 2010, ont fait une combinaison de l'alginate et de la gélatine pour des gels mixtes, l'alginate a été extraite par un polyosidique linéaire à partir d'algues qui se gélifie en présence de calcium sous la forme de structures à facettes multiples. La gélatine a été obtenue à partir de la dénaturation de la triple hélice du collagène obtenu à partir de tissus animaux est bien connue que par sa propriété de se gélifier avec un chauffage et un refroidissement supplémentaire.

Ils ont utilisé aussi les fibres de collagène, ce dernier est un ingrédient produit à partir de collagène qui n'est pas soumis à la réaction d'hydrolyse drastique menée dans la production de gélatine. La concentration d'alginate a été fixée à 1% (p / v) et de la gélatine à 1,5% (p / v).

La concentration des fibres de collagène a été fixée à 5% (p / v), des essais préliminaires ont montré que, une fois son gel pur à cette concentration présente des propriétés mécaniques similaires au système de la gélatine à 1,5%.

Les fibres du collagène conduisent à un gel mélangé à la perte d'eau plus faible conduisant à une plus grande stabilité au retrait (associée à la synérèse) par rapport au mélange de gélatine-alginate. En outre, les résultats ont montré que la gélification simultanée des deux bio-polymères sur les gels mixtes de la fibre de collagène conduisent à la formation de systèmes avec des propriétés mécaniques similaires d'alginate et de gélatine mélangées. [23]

En 2012, N. Devi et al ont fait une étude de coacervation complexe de gélatine (A) et alginate de sodium pour la micro-encapsulation l'huile d'olive. Les études ont été effectuées pour obtenir le rendement maximal de coacervat. Le rendement de la turbidité et de coacervat (%) mesuré a été effectué à l'appui du rapport des deux polymères et le pH qui ont produit une coacervation maximale. Le rapport optimal entre le ratio gélatine (A)/ alginate de sodium et le pH pour former le complexe de coacervat maximale a été trouvé de 3,5: 1 et de 3,5 à 3,8, respectivement.

Des microcapsules ont été liées en utilisant du glutaraldéhyde. Des études de microscopie électronique à balayage ont confirmé la formation de microcapsules sphériques à écoulement libre de différentes tailles. La taille des microcapsules augmente avec l'augmentation de la concentration du polymère.

L'efficacité d'encapsulation et les taux d'huile d'olive de libération étaient dépendants de la quantité d'agent de réticulation, la charge d'huile et la concentration en polymère. [24]

III. Matériels et méthodes :

III.1.Introduction :

Les polysaccharides et les protéines sont des polymères naturels qui sont largement utilisés comme des ingrédients fonctionnels pour des produits pharmaceutiques divers. A ce stade on les utilise sous forme d'un complexe. Ce dernier joue un rôle important dans le but d'avoir par exemple un émulsifiant formé in-situ, une matrice polymérique pour une libération prolongée de principe actif médicamenteux etc...

Les interactions protéines polysaccharides sont parmi les sujets les plus difficiles à comprendre en raison des interactions multiples pouvant surgir dans ce type d'association notamment des interactions électrostatiques ou hydrophobes-hydrophobes ce qui va donner naissance à des systèmes très variable allant de la solubilité jusqu'à la séparation de phase.

D'autre part, les polysaccharides, étant de nature hydrophile, restent généralement dans la phase aqueuse et ainsi peuvent aider à contrôler la rhéologie de la phase aqueuse comme épaississant, gélifiant et d'agir comme des agents de stabilisation.

III.2.Problématique :

Les protéines et les polysaccharides peuvent coexister dans un système avec des degrés de compatibilité très variable et ce en fonction des conditions de pH ; ratio, force ionique etc..., On peut citer la formation de complexes solubles très recherchés pour la stabilisation des systèmes dispersés, de complexes insolubles pour les systèmes à relargage prolongé mais aussi peuvent donner naissance à des incompatibilités thermodynamiques caractérisées par une séparation de phase.

Notre problématique consiste à étudier la complexation qui résulte lorsqu'on mélange les protéines et les polysaccharides dans des différentes conditions de pH (2 ; 2.5 ; 3, 3.5 ; 4) et à des ratios différents de protéines –polysaccharides (2 :1 ; 3 :1 ; 4 :1 ; 5 :1) à fin de déterminer les conditions optimales pour des applications diverses dans le domaine pharmaceutique.

III .3.Objectif :

Notre objectif est l'étude des interactions entre protéines polysaccharides de type gélatine / alginate en faisant varier des conditions physicochimiques tel que ratio polymérique, et pH.

Les systèmes obtenus ont été caractérisés sur le plan microscopique, rhéologique , zétamétrique , granulométrique et turbidimétrie afin de mettre en évidence la nature des complexes et comprendre les interactions qui sont mises en jeu.

III.4.Matériels :

III.4.1.Matières premiers :

III.4.1.1. Les polymères :

III.4.1.1.1. Alginate de sodium :

- Définition :

L'alginate de sodium, de formule $(C_6H_7Na_{1/2}O_6)^n$ est un additif alimentaire(E401). Il se présente sous forme de poudre blanche à blanc crème, inodore et sans saveur, très soluble dans l'eau. Il s'agit d'une longue molécule synthétisée à partir de l'acide alginique 2.

L'alginate de sodium est un sel extrait pour la première fois grâce à une solution alcaline, un liquide visqueux issu de la paroi cellulaire d'algues brunes. Sa fonction naturelle consiste à augmenter la flexibilité de l'algue. Il est classé dans les colloïdes.
[25]

- Structure chimique :

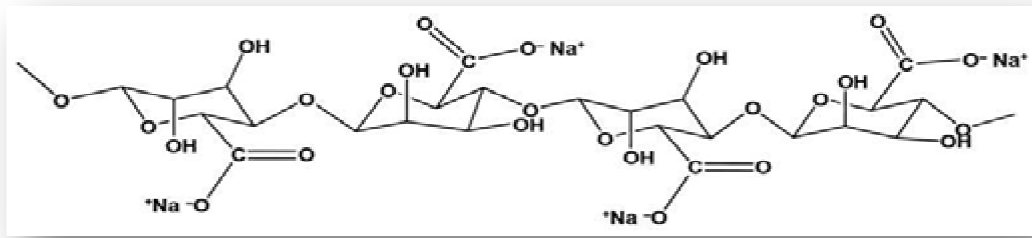


Figure III.1: Structure chimique de l'alginate du sodium.

- Propriétés :

L'alginate de sodium possède différentes propriétés et peut être classé dans différentes catégories d'excipients. Il peut servir comme agent stabilisant ; de suspension ; de viscosité ; de désintégration pour comprimés et capsules.

Les propriétés qui caractérisent cet excipient : [25]

- Sa solubilité : il est pratiquement insoluble dans l'éthanol, l'éther, le chloroforme, les solvants organiques et les solutions acides aqueuses dont le pH est inférieur à 3. En présence d'eau, il forme une solution colloïdale.
- Sa viscosité varie en fonction de la concentration, de la température, de la présence d'ions métallique...
- Rôle :

En tant qu'excipient utilisé en galénique, plusieurs synonymes peuvent être utilisés mais le symbole E401 sera plus souvent utilisé. Il découle des applications dans la formulation galénique des produits. Il est notamment utilisé dans la formulation des médicaments destinés à la voie orale ou les topiques. [25]

III.4.1.1.2. Gélatine :

- Définition :

La gélatine est un mélange de nature protéique obtenu par hydrolyse acide partielle (type A) ou hydrolyse alcaline (type B) du collagène animal. Elle peut être constituée par un mélange des deux types. Le collagène provient soit des os, soit de la peau des animaux de boucherie. La gélatine se présente en substance solide translucide plus en moins fine, paillettes irrégulières ou en feuilles plus ou moins flexibles, transparente ou légèrement jaune, presque sans goût et sans odeur, obtenue par l'ébullition prolongée de tissus conjonctifs (peaux) ou d'os d'animaux. Elle gonfle au contact de l'eau froide et peut ainsi adsorber 5 à 10 fois son poids d'eau. Soluble dans l'eau chaude, elle donne une solution colloïdale qui se prend par refroidissement en une gelée pratiquement incolore. [21]

- Structure chimique :

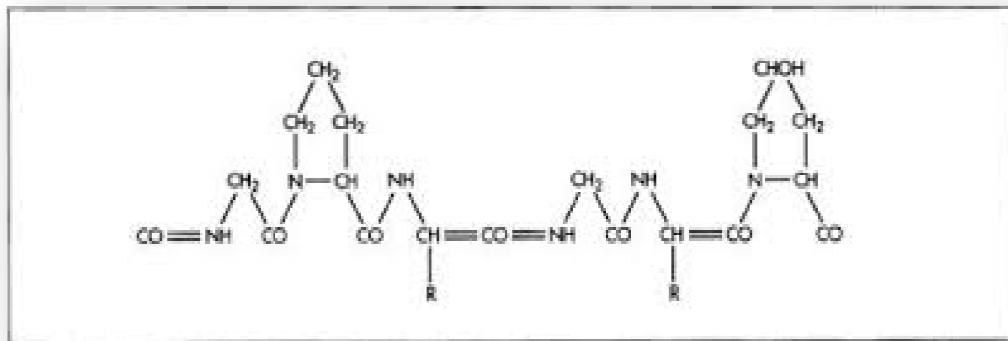


Figure III.2: Structure chimique de la molécule de gélatine. [26]

- Propriété :

La gélatine est thermoréversible; elle fond lorsqu'elle est chauffée et se solidifie lorsqu'elle est refroidie. Mélangée à de l'eau, elle forme un gel colloïdal semi-solide.

La gélatine en solution est amphotère, capable d'agir comme un acide ou comme une base. Dans les solutions acides de la gélatine est chargée positivement et migre sous forme d'un cation dans un champ électrique. Dans les solutions alcalines gélatine est chargée négativement et migre sous forme d'un anion. Le pH du point intermédiaire, où la charge nette est nulle et aucun mouvement ne se produit, est connu comme le point isoélectrique (IEP) [27]. Gélatine de type (A) a une large gamme isoélectrique entre pH 7 et 9, par contre la gélatine type (B) dispose d'une gamme étroite isoélectrique entre pH 4.7 et 5.4. [28-31]

Tableau III.1: les propriétés physico-chimiques de la gélatine.

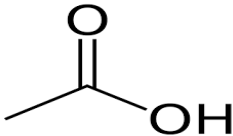
Humidité	8 à 13%
densité relative	1/3 à 1/4
Solubilité	Soluble dans des solutions aqueuses. Insoluble dans des solvants organiques.
Température de dissolution	50 à 60° C
Pouvoir de stabilisation	Supérieur aux autres polymères naturels
pH isoélectrique	Type A entre 7 et 9 Type B entre 4.7 et 5.4

- Rôle :

Dans l'industrie pharmaceutique, la gélatine est utilisée pour la fabrication des gélules et des capsules. La gélatine est utilisée comme agent liant dans les formulations sèches telles que les grains et les comprimés. [21]

III .4.2.Les réactifs :

Tableau III.2 : Les propriétés physico-chimiques des réactifs.

Nom	Nom chimique	Formule	Propriétés physico-chimiques
CH ₃ COOH	Acide acétique		Masse molaire : 60,05 g/mol densité à 20/4 : 1,048- 1,054 point de congélation ≥15.6 °C Miscibilité : miscible dans l'eau et dans l'acétone en toute proportion. Insoluble dans l'eau volatile : 0,005 %

III.4.3.Équipements :

Deux types d'équipement sont utilisés, les équipements de préparation et les équipements de contrôle :

III.4.3.1.Les équipements de préparation :

Tableau III.3: Les équipements de préparation utilisé.

Équipement	Marque	Spécification
Balance analytique	KERN	Précision : 0,001 g à 0,1 g
Agitateur magnétique, plaque chauffante	STUART	Vitesse : allant jusqu'à 2000 rpm
pH mètre	OHAUS	/

Petit matériel	Becher ; Vers montre ; Barrot magnétique Éprouvette ; lame Pissette ; Spatule Pipette pasteur	/
----------------	---	---

III.4.3.2. Les équipements de contrôles :

Tableau III.4 : Les équipements de contrôle utilisés.

Équipement	Marque	Équipement	Marque
Spectromètre UV/VIS	SHIMADZO UV VIS	Zêta mètre piloté par un logiciel Zétasiser advanced	MALVERN
Microscope optique équipé par une caméra	JENALUMAR	Rhéomètre MCR 302 système PP 25	ANTON PAAR
Granulomètre laser piloté par un logiciel	MALVERN		

III.5. Méthodes :

III.5.1. Méthode de préparation :

III.5.1.1. Matrice d'essai :

Nous avons réalisé 20 essais en faisant varier les pH à (2 ; 2.5 ; 3, 3.5 ; 4) et les ratios protéine /polysaccharides (gélatine / alginate) à (2 :1 ; 3 :1 ; 4 :1 ; 5 :1) à une concentration globale de polymère de 2%, la matrice d'essai est représentée comme suit :

Tableau III.5 : Matrice des essais.

Essai	Ratio	pH
1	2 :1	2
2	3 :1	
3	4 :1	
4	5 :1	
5	2 :1	2,5
6	3 :1	
7	4 :1	
8	5 :1	
9	2 :1	3
10	3 :1	
11	4 :1	
12	5 :1	
13	2 :1	3,5
14	3 :1	
15	4 :1	
16	5 :1	
17	2 :1	4
18	3 :1	
19	4 :1	
20	5 :1	

III .5.1.2.Étapes de préparation :

Les mélanges de protéines et polysaccharides sont préparés en faisant disperser séparément l'alginate et la gélatine dans l'eau purifiée puis on mélange les deux solutions (fig.III.3) et on ajuste le pH à la valeur désirée. (fig.III.4)

III.5.1.2.1.Préparation de la phase protéine :

On chauffe la gélatine à une température entre 50 et 60 C⁰ dans une quantité suffisante d'eau purifiée sous agitation magnétique, lorsque la gélatine se dissout on la laisse refroidir.

III.5.1.2.2. Préparation de la phase polysaccharides :

On ajoute l'alginate, après on met la solution sous agitation et on complète jusqu'au volume qui convient avec l'eau purifiée.

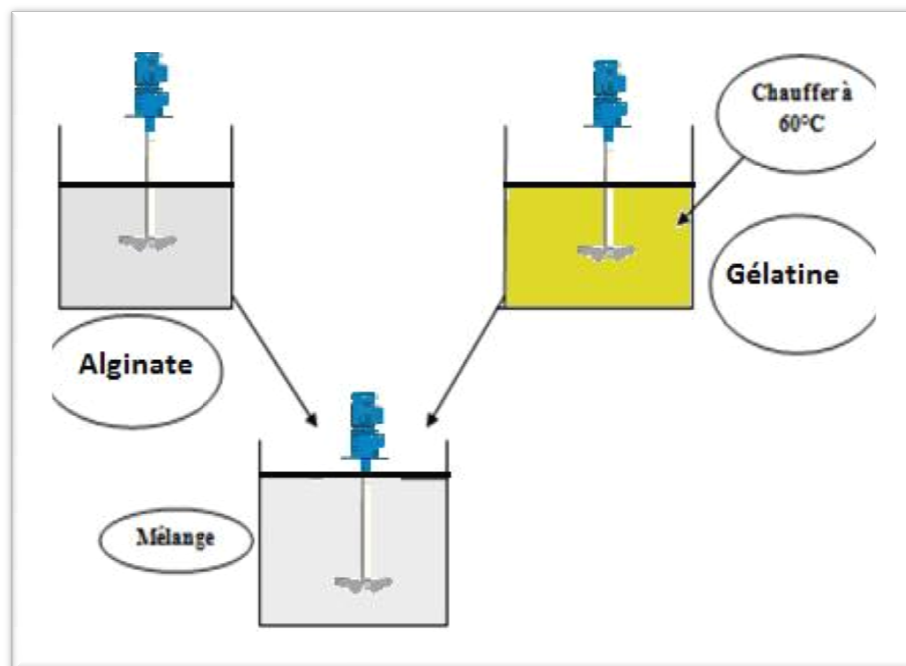


Figure III.3 : Schéma représentant les étapes de préparation du mélange.

III .5.1.3.Ajustement de pH :

L'ajustement de pH des solutions se fait avec l'acide acétique CH_3COOH jusqu'à l'atteinte des différentes valeurs de pH (2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4) pour chaque ratio.

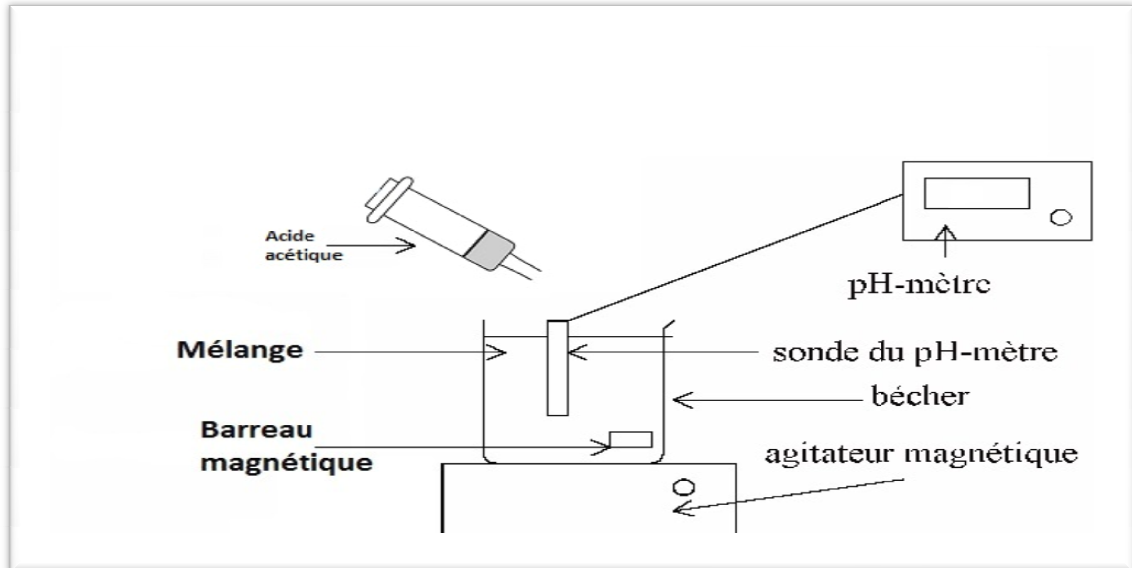


Figure III .4: Schéma de l'ajustement du pH.

III.5.2.Méthodes de contrôle :

III.5.2.1.Mesure de la turbidité :

La turbidité a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible. La longueur d'onde a été choisie après un scanne par un spectrophotomètre UV-visible des solutions d'alginate et de gélatine entre 200 et 900 nm.

La longueur d'onde est choisie dans la zone où le maximum d'absorption des deux polymères alginate et gélatine est très éloignée. Le scanne nous a permis de sélectionner la longueur d'onde à 600 nm. La turbidité est exprimée par l'absorbance des solutions à différents pH.

III.5.2.2. La Microscopie :

L'observation microscopique a été faite par un microscope optique **Jenalumar** qui est équipé d'une caméra. L'échantillon est mis entre lame et lamelle et observé sous le grossissement 25 (le grossissement est choisi selon la clarté des images obtenues).

III.5.2.3. La Rhéologie :

Un rhéomètre est un appareil de laboratoire capable de faire des mesures relatives au comportement rhéologique d'un fluide. L'objectif de ce test est de caractériser la réponse rhéologique de la suspension suite à l'application d'une contrainte de cisaillement, lorsqu'elle est en écoulement variable.

Pour cela, on fait varier la vitesse de cisaillement de 0.001 à 100 s⁻¹, en rampe logarithmique, à une température de 20 °C. Le nombre de points de mesure est de 30 points, et le temps entre une mesure et une autre est égal au temps d'équilibre, déterminé à partir du test de relaxation qui est de 10s.

Afin de dégager les paramètres rhéologiques caractéristiques de ces courbes d'écoulement, on se propose d'ajuster ces rhéogrammes par un ensemble de modèles usuels (Carreau, Cross, Ostwald).

L'écriture de ces modèles et les valeurs de ces paramètres sont consignées dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.6: Valeurs des paramètres caractéristiques des différents modèles.

Modèle	Écriture	Paramètres
Carreau	$\eta = a(1 + (b * \dot{\gamma})^2)^{\frac{(c - 1)}{2}} + d$	a =74.06462 ; b = 168.8216 c = 0.047906 ; d =0.013449 R ² = 0.99874

Cross	$\eta = \frac{(a + b)}{(1 + K * \dot{\gamma})^n}$	K = 174.858 ; n =0.99421 a =0.015324 ;b = 96.7718 R ² =0.98843
Ostwald	$\eta = K * \dot{\gamma}^n$	K = 0.568664 ;n = -0.787628 R ² = 0.87146

Avec : a, b, c, d : Variables sans unités .

K : Constante, l'indice de consistance

R² : Coefficients de corrélation.

$\dot{\gamma}$: Contrainte de cisaillement 1/s.

n : Indice d'écoulement sans dimension.

η : Viscosité en Pas

A la lumière de cette caractérisation rhéologique plusieurs modèles sont susceptibles de bien représenter le rhéogramme expérimental des suspensions, comme celui de Carreau, de Cross, ou d'Ostwald, et ce en raison de leur coefficient de corrélation qui est proche de 1. Notre choix s'est porté alors sur le modèle de Carreau, vu que ses paramètres sont simples, peu nombreux, ce qui assure une bonne stabilité statistique des résultats interprétables physiquement.

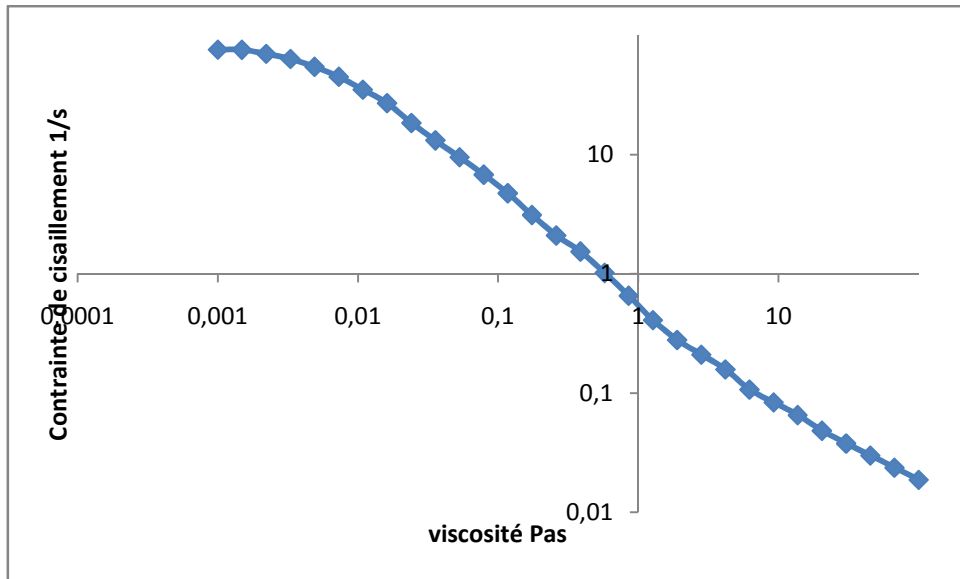


Figure III.5: *Courbe de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement.*

On rappelle que le modèle de Carreau s'écrit de la façon suivante :

$$\eta = a(1 + (b * \dot{\gamma})^2)^{\frac{(c - 1)}{2}} + d$$

Avec : η : La viscosité en pas.

$\dot{\gamma}$: La contrainte de cisaillement 1 / s.

a ; b ; c ; d : sont des variables.

III.5.2.4. Observation macroscopique :

L'observation macroscopique a été faite visuellement, ou l'échantillon est placé dans un contenu transparent (tube à essais), et observé à l'œil nu à intervalle de temps régulier.

III.5.2.5. L'analyse Granulométrique :

L'étude granulométrique a été réalisée à l'aide d'un granulomètre laser de type « Master sizer Malvern » muni d'un logiciel Mastersizer pour le traitement des résultats.

La voie utilisée est la voie liquide ou l'échantillon étudié est mis en suspension dans un fluide dans notre cas c'est l'eau purifiée qui circule à travers une cellule de verre à faces parallèles éclairée par un faisceau de lumière laser. Les résultats sont exprimés graphiquement et sous formes de tableau. Les paramètres granulométriques pris en compte pour l'interprétation étant le diamètre de particules en volume et en surface, sachant que le diamètre en volume est $D_{[4,3]}$, et en surface $D_{[3,2]}$.

III.5.2.5.1. Diamètres moyens :

Les particules sont rarement de taille unique ou monodisperse et elles font partie d'une distribution de taille.

Le diamètre moyen dépend de la grandeur prise en compte : le nombre, la longueur, la surface ou le volume, ceci nous permet de calculer des diverses moyennes d'une distribution :

- La dimension moyenne suivant le nombre des particules :

$$d_{10} = d_{mn} = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i} \dots\dots\dots \text{(III.1)}$$

- La dimension moyenne suivant les longueurs :

$$d_{21} = d_{ml} = \frac{\sum n_i d_i^2}{\sum n_i d_i} \dots\dots\dots \text{(III.2)}$$

- la dimension moyenne suivant la masse ou le volume :

$$d_{43} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \dots\dots\dots \text{(III.3)}$$

- La dimension moyenne suivant les surfaces :

$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \dots\dots\dots (III.4)$$

Cette valeur est également connue sous le nom «diamètre sauter».

III.5.2.5.2. Span :

Ou la largeur de la distribution, exprime la valeur relative d'un écart par rapport à la tendance centrale.

$$Span = \frac{(d_{90} - d_{10})}{d_{50}} \dots\dots\dots (III.5)$$

III.5.2.6. La Zêtamétrie :

Le potentiel zêta est la mesure de l'intensité de la répulsion ou de l'attraction électrostatique ou électrique entre les particules. La mesure du potentiel Zêta a été effectué par la méthode d'électrophorèse, réalisée par le zêta mètre de type Malverne (2000), dont le traitement mathématique des résultats est assuré par le logiciel Zetasizer Advanced. Le principe de la méthode repose sur la détermination de la mobilité électrophorétique des macromolécules mises dans un champ électrophorétique. L'analyse se fait à l'aide d'une cellule capillaire ou l'échantillon à analyser doit être limpide, c'est à dire très dilué afin d'assurer une mesure fiable de la mobilité électrophorétique.

IV. Résultats et discussion :

IV.1. Aspect macroscopique et microscopique :

Les observations microscopiques à différents pH sont données dans les photos ci-après :

IV .1. pH =2 :

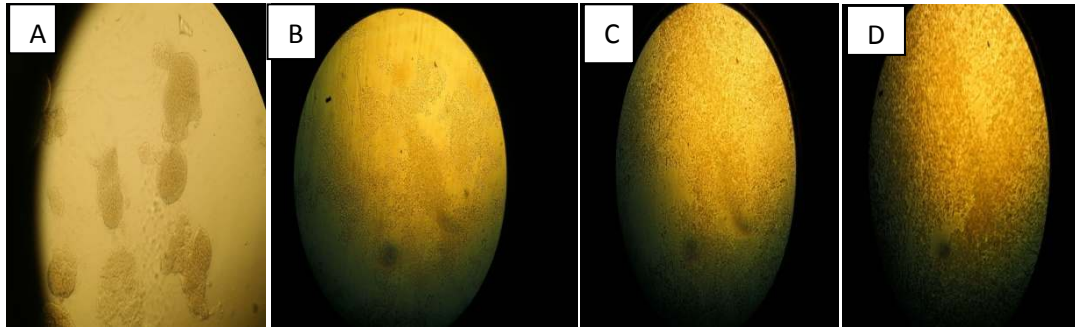


Figure IV.1: Photos microscopiques des différents essais à pH 2 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; Grossissement : G X 25.

Commentaire :

A la vue de ces photos microscopiques, on remarque la présence d'agglomérats de macromolécules sous forme de complexes insolubles et ce pour les différents ratios de polymères .Néanmoins, on peut constater que plus la le ratio gélatine /alginate augmente plus le complexe est dense.

IV.2. pH=2.5 :

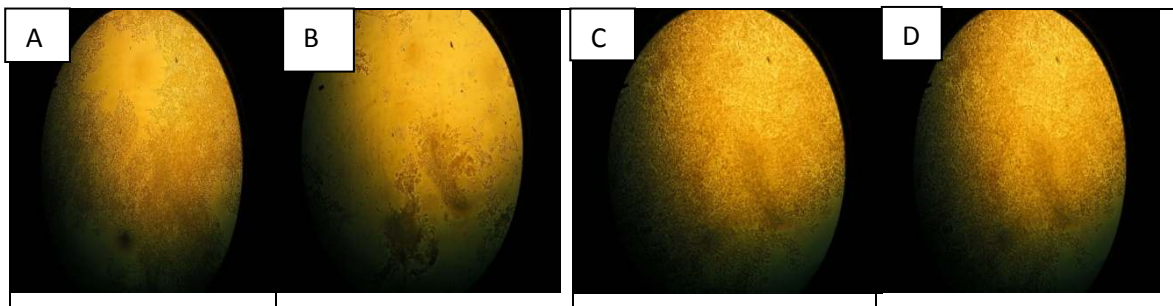


Figure IV.2: Photos microscopiques des différents essais à pH 2.5 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; Grossissement : G X 25.

Commentaire :

De même les photos microscopiques des essais à pH 2,5 montrent la présence d'agglomérats de macromolécules sous forme de complexes insolubles et ce pour les différents ratios de polymères et le complexe formé est d'autant plus dense que le ratio gélatine /alginate augmente.

L'aspect macroscopique des ces essai à pH 2 et pH 2,5 présente un aspect opaque et homogène, c'est-à-dire sans séparation de phase témoignant la formation de complexes insoluble.

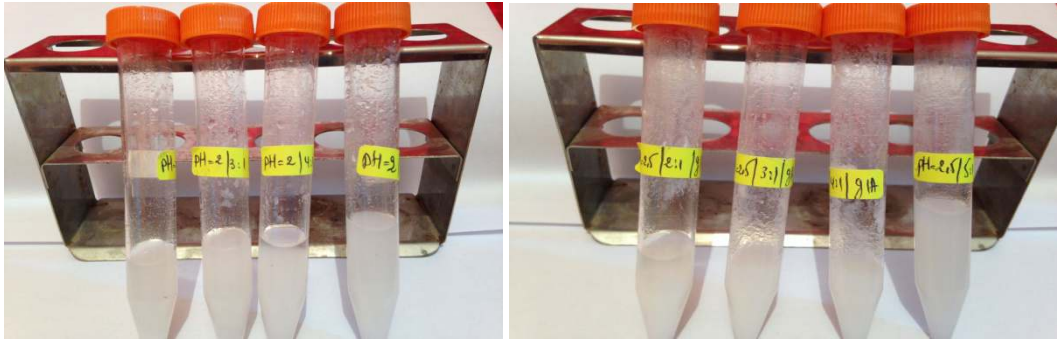


Figure IV.3: Photos macroscopiques des différents essais à pH 2 (gauche) et 2,5 (droite) ; à différents ratios (2 :1 ; 3 :1 ;4 :1 ;5:1).

IV.3.pH= 3 :

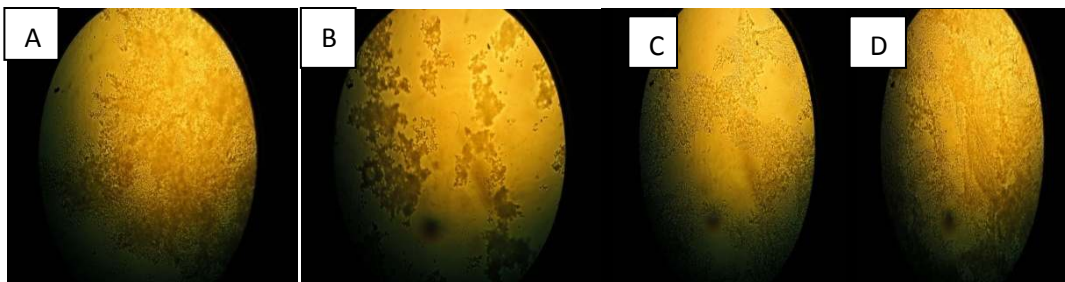


Figure IV.4: Photos microscopiques des différents essais à pH 3 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; grossissement : G X 25.

IV.4.pH=3,5 :

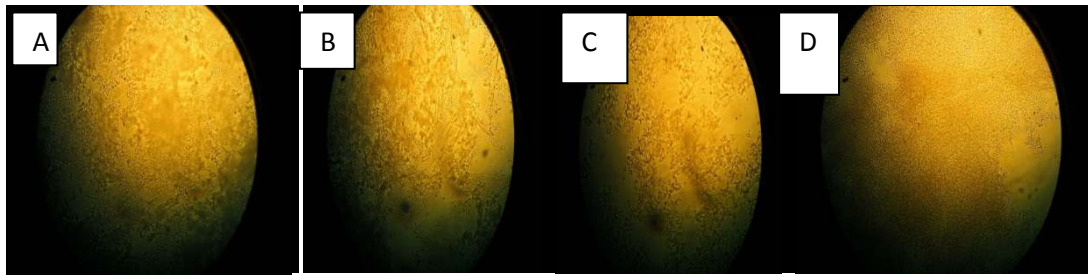


Figure IV.5: Photos microscopiques des différents essais à pH 3,5 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; grossissement : G X 25.

Commentaire :

Les photos microscopiques des essais à pH 3 et 3,5 montrent la présence d'agglomérats de macromolécules sous forme de complexes insolubles et ce pour les différents ratios de polymères, aussi, on peut constater que plus le ratio gélatine /alginate augmente plus le complexe est dense.

Sur le plan macroscopique on remarque une séparation de phase avec une sédimentation du complexe et un surnageant très limpide.

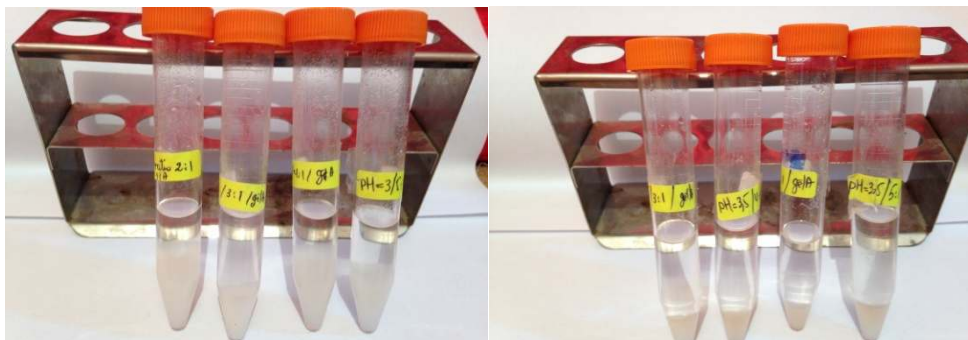


Figure IV.6: Photos macroscopiques des différents essais à pH 3 et 3.5 ; à différents ratios (2 :1 ;3 :1 ;4 :1 ;5:1).

IV.5.pH=4 :

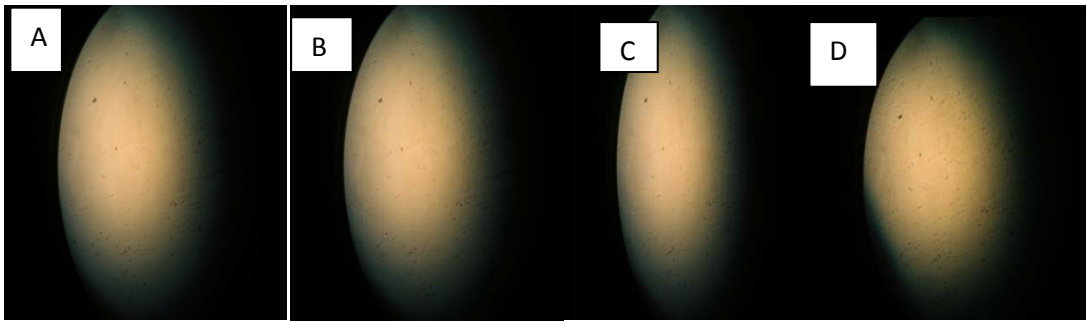


Figure IV.7 : Photos microscopiques des différents essais à pH 4 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; grossissement : G X 25.

Commentaire :

Les photos microscopiques des essais du pH 4 mettent en évidence des solutions optiquement vides non résolues au microscope optique et cela pour les différents ratios de polymères. Ceci démontre la formation de complexes solubles présentant un aspect macroscopique limpide.

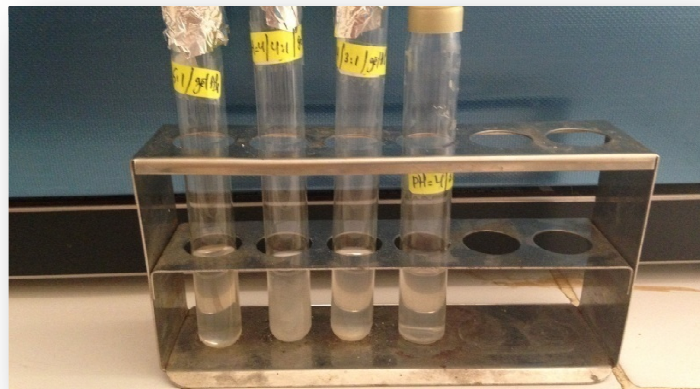


Figure IV. 8: Photo macroscopique des différents essais à pH 4 ; à différents ratios (2 :1 ; 3 :1 ; 4 :1 ; 5:1).

Discussion :

Les photos microscopiques et macroscopiques des différentes solutions gélatine/alginate présentent des aspects différents en fonction des ratios et des pH.

Pour les pH allant de 2 et 2,5 nous notons la présence de complexes insolubles avec un aspect visuel opaque et des agglomérats macromoléculaires au microscope. Pour les pH de 3 et 3,5 nous signalons une séparation de phase avec un sédiment dense représentant le complexe insoluble et un surnageant limpide, la microscopie montre des agrégats macromoléculaires du complexe formé.

IV.2.La zétamétrie :

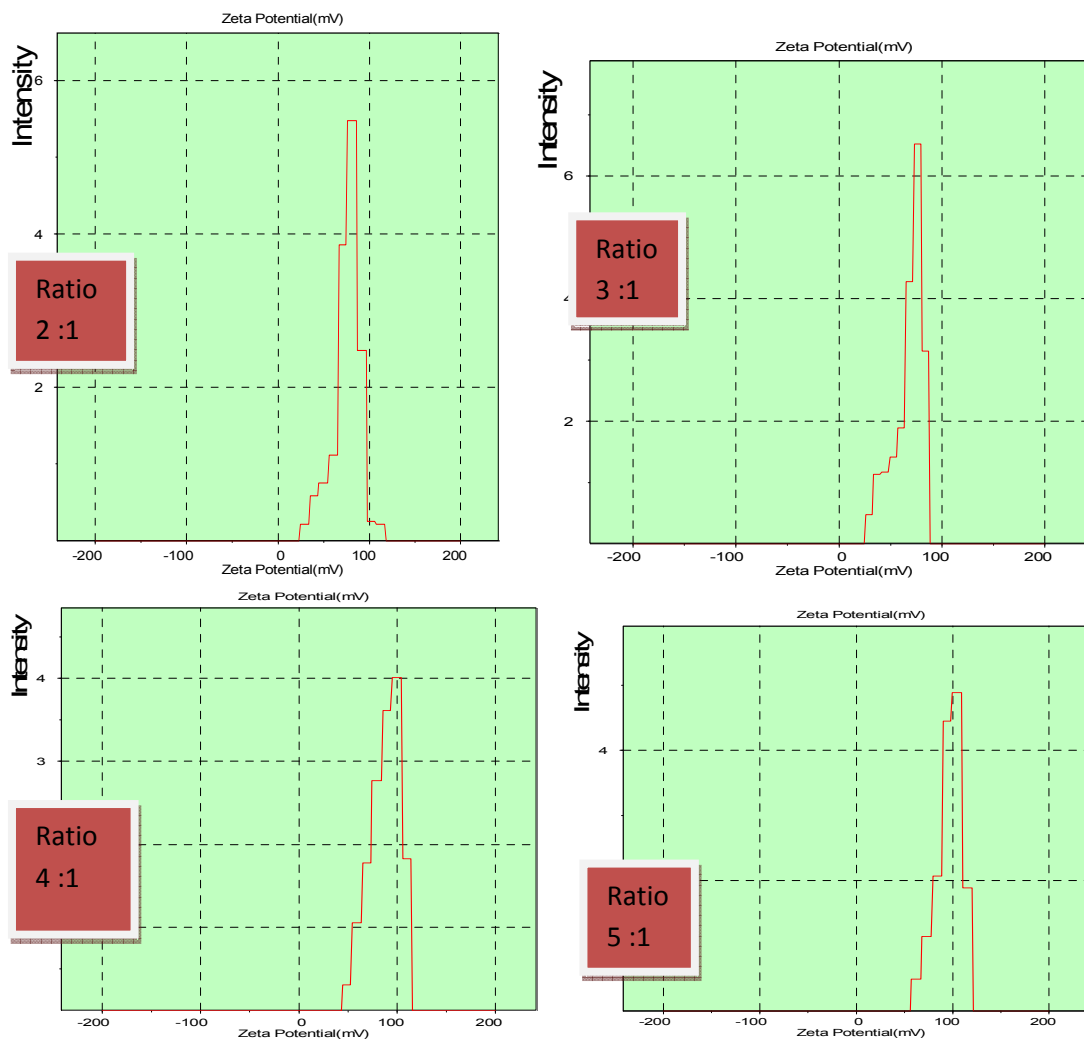


Figure IV.9 : Résultats de la zétamétrie à pH 2 des différents ratios.

Les résultats obtenus de potentiel zêta sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV.1 : Résultats des mesure du potentiel zêta aux différents pH pour les divers ratios (2 :1 ; 3 :1 ; 4 :1 ; 5 :1).

Essai	Ratio	pH	Potentiel zêta	Mobilité électrophorétique
1	2 :1	2	73.10	2.728
2	3 :1		59.80	2.262
3	4 :1		76.80	2.855
4	5 :1		92.80	3.504
5	2 :1		44.70	1.589
6	3 :1	2,5	78.90	2.866
7	4 :1		37.30	1.366
8	5 :1		86.50	3.190
9	2 :1		82.80	3.131
10	3 :1	3	0.097	2.6
11	4 :1		48.47	1.805
12	5 :1		32.90	1.231
13	2 :1		26.60	0.889
14	3 :1	3,5	71.50	2.316
15	4 :1		93.90	2.983
16	5 :1		69.6	2.281
17	2 :1		-48.60	-1.757
18	3 :1	4	-39.90	-1.475
19	4 :1		-35.90	-1.260
20	5 :1		-32.20	-1.109

Commentaire :

Les résultats de l'analyse zétamétrique présente une potentielle électrocinétique positive pour des valeurs de pH inférieur à 4 ce qui montre une charge globale positive du complexe formé. A partir du pH 4 nous enregistrons une potentielle électrocinétique négative ce qui donne une charge globale négative du complexe.

V.3. La turbidité :

La turbidité des essais est appréciée par la mesure des données par un spectrophotomètre UV/VIS. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IV. 2: L'absorbance des échantillons à différents pH et ratios.

Essai	Ratio	pH	Absorbance
1	2 :1	2	0,245
2	3 :1		0,347
3	4 :1		0,280
4	5 :1		0,511
5	2 :1		0,185
6	3 :1	2,5	0,219
7	4 :1		0,384
8	5 :1		0,470
9	2 :1		0,120
10	3 :1	3	0,130
11	4 :1		0,158
12	5 :1		0,186
13	2 :1		0,142
14	3 :1	3,5	0,165
15	4 :1		0,262
16	5 :1		0,340
17	2 :1		0,042
18	3 :1	4	0,080
19	4 :1		0,046
20	5 :1		0,049

Étude de l'influence du pH sur la turbidité :

L'influence du pH sur l'absorbance des différents ratios est montrée sur les graphes suivants :

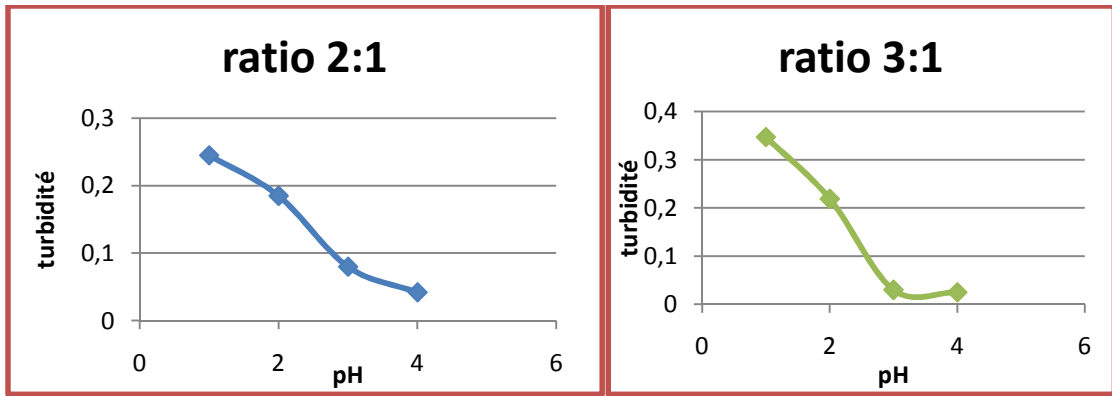


Figure IV.10 : *Effet du pH sur l'absorbance des échantillons aux ratios gél/Alg 2 :1 et 3 :1.*

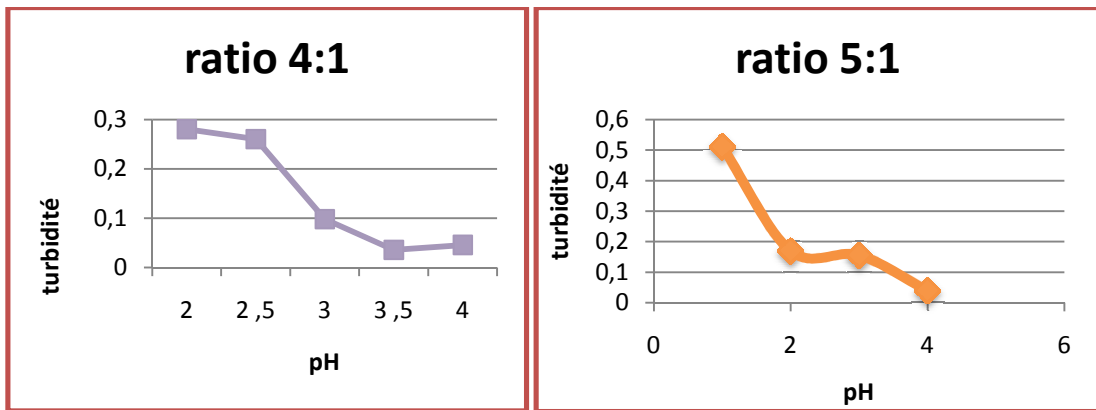


Figure IV.11: *Influence du pH sur l'absorbance des échantillons aux ratios gél/Alg 4:1 et 5:1.*

Commentaire :

A la vue des graphes nous remarquons que la turbidité enregistre des valeurs allant de 0,120 à 0,511 pour des pH allant de 2 à 3,5 ; par contre, pour le pH 4, nous enregistrons des valeurs très faibles de 0,042 et c'est en raison de la solubilité des complexes formés dans cette valeur de pH, cette remarque est constatée pour les différents ratios étudiés.

IV .4. La rhéologie :

La modélisation mathématique des rhéogrammes obtenue selon le modèle de Carreau est représentée graphiquement :

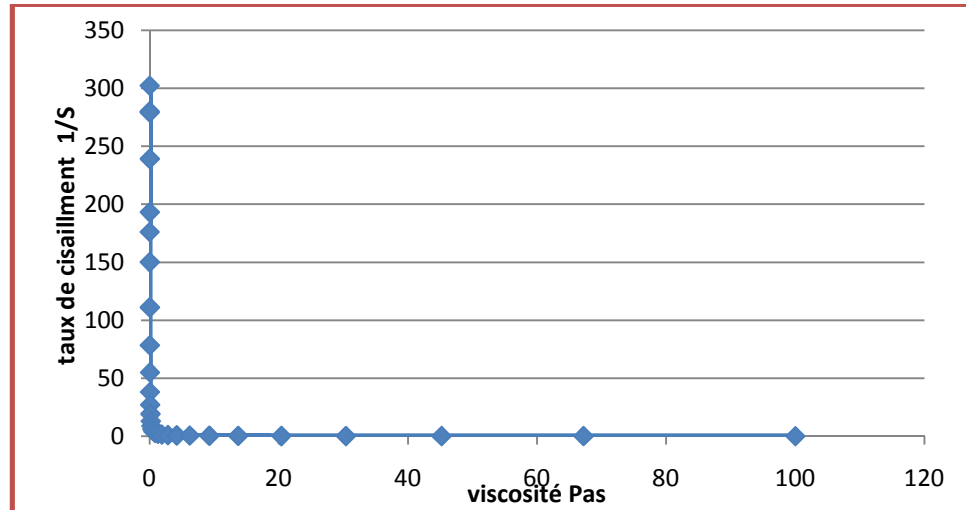


Figure IV.12 : Viscosité en fonction du taux de cisaillement ratio 4:1 ; pH 2,5.

La viscosité de Carreau tirée à partir des graphes est donnée dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV. 3: La viscosité de Carreau.

Essai	Ratio	pH	Viscosité de Carreau [mPas/s]
1	2 :1	2	3.14
2	3 :1		1.40
3	4 :1		18.7
4	5 :1		18.8
5	2 :1	2,5	8.16
6	3 :1		3.45
7	4 :1		5.59
8	5 :1		9.22
9	2 :1	3	9.77
10	3 :1		1.91
11	4 :1		3.07
12	5 :1		2.14

13	2 :1	3 ,5	0.842
14	3 :1		0.646
15	4 :1		0.741
16	5 :1		0.679
17	2 :1		0.121
18	3 :1	4	0.952
19	4 :1		0.244
20	5 :1		0.558

Commentaire :

Sur l'ensemble des graphes nous observons une diminution de la viscosité en fonction du taux de cisaillement avec une augmentation de la contrainte de cette dernière. Néanmoins ; les valeurs de viscosité de carreau allant de 18,8 à 0,121mPa.s. Les valeurs les plus importantes sont enregistrées pour les essais de pH de 2, 2,5, 3 et 3 ,5 pour le pH 4 la viscosité enregistre des valeurs très faibles en raison de la solubilité du complexe formé à cette valeur de pH.

IV.5.La granulométrie :

IV.5.1. pH=2 :

Tableau IV. 4 : Distribution granulométrique en volume; des différents ratios à pH 2.

Distribution μm	2 :1	3 :1	4 :1	5 :1
D [4 ,3]	187.29	203.58	147.56	193.74
D [3,2]	74.67	74.57	62.01	79.70
D (s, 0.1)	1.82	1.84	3.21	4.14
D (s, 0.5)	34.39	39.05	38.72	48.99
D (s, 0.9)	204.17	195.78	148.26	192.46

Commentaire :

Les diamètres moyens en volume D [4, 3] des différents essais à pH 2 sont compris entre 147 et 203 μm et entre 62 et 79 μm pour le diamètre en surface D [3 ,2] cette taille relativement importante est expliquée par le caractère insoluble des complexes.

IV.5.2.pH=2,5 :

Tableau IV. 5 : Distribution granulométrique en volume, des différents ratios à pH 2,5.

Distribution μm	2 :1	3 :1	4 :1	5 :1
D [4 ,3]	170.69	179.84	102.26	208.72
D [3,2]	55.06	70.58	50.95	97.16
D (s, 0.1)	44.03	46.05	33.93	7.37
D (s, 0.5)	142.24	151.52	90.84	65.79
D (s, 0.9)	341.67	358.06	186.94	225.70

Commentaire :

Les diamètres moyens en volume D [4, 3] des différents essais à pH 2,5 sont compris entre 102 et 208 μm et entre 50 et 97 μm pour le diamètre en surface D [3 ,2]. Aussi pour ces essais à pH 2,5 la taille des macromolécules formés est relativement importante expliquée par le caractère insoluble des complexe.

IV.5.3.pH=3 :

Tableau IV. 6 : Distribution granulométrique en volume, des différents ratios à pH 3.

Distribution μm	2 :1	3 :1	4 :1	5 :1
D [4 ,3]	300.68	353.98	302.05	296.68
D [3,2]	100.24	48.85	96.30	88.34
D (s, 0.1)	2.26	1.59	2.71	2.57
D (s, 0.5)	38.05	10.64	31.21	32.43
D (s, 0.9)	297.00	76.44	291.97	279.66

Commentaire :

Les diamètres moyens en volume D [4, 3] des différents essais à pH 3 sont compris entre 296 et 353 μm et entre 48 et 100 μm pour le diamètre en surface D [3, 2] cette taille relativement importante est expliquée par le caractère insoluble des complexes.

IV.5.4.pH=3,5 :**Tableau IV. 7 :** Distribution granulométrique en volume des différents ratios à pH 3,5.

Distribution μm	2 :1	3 :1	4 :1	5 :1
D [4 ,3]	71.30	245.72	90.95	247.05
D [3,2]	14.22	84.32	26.63	69.73
D (s, 0.1)	1.43	0.43	0.45	0.26
D (s, 0.5)	5.95	32.16	13.57	11.58
D (s, 0.9)	30.88	240.35	65.70	211.78

Commentaire :

Les diamètres moyens en volume D [4, 3] des différents essais à pH 3.5 sont compris entre 71 et 203 μm et entre 14 et 84 μm pour le diamètre en surface D [3, 2] cette taille relativement importante est expliquée par le caractère insoluble des complexes.

IV.5.5.pH=4 :**Tableau IV. 8 :** Distribution granulométrique en volume des différents ratios à pH 4.

Distribution μm	2 :1	3 :1	4 :1	5 :1
D [4 ,3]	40.65	50.10	57.38	49.90
D [3,2]	8.14	14.37	15.53	14.2
D (s, 0.1)	1.23	0.25	0.84	2.30
D (s, 0.5)	3.35	1.72	5.56	12.83
D (s, 0.9)	8.11	14.41	14.65	13.40

Commentaire :

Les diamètres moyens en volume $D [4, 3]$ des différents essais à pH 4 sont compris entre 40 et 57 μm et entre 8 et 75 μm pour le diamètre en surface $D [3, 2]$, cette taille est relativement faible, elle est expliquée par le caractère soluble des complexes formés.

Discussion globale :

A l'issue de notre expérimentation consacrée à l'étude des complexes protéines polysaccharides, encore appelée les complexes poly-électrolytiques formés essentiellement par les interactions électrostatiques issues des charges positives des protéines et les charges négatives du polysaccharide. A cet effet, nous avons étudié l'effet de plusieurs paramètres sur la nature du complexe formé, notamment, le pH et le ratio protéine polysaccharide sur quelques paramètres caractéristiques, tels que la taille du complexe, le potentiel électrocinétique, la turbidité et les paramètres rhéologiques.

Les complexes formés dépendent essentiellement du pH. À pH inférieur au pH iso électrique de la protéine (pour la gélatine 4, 5), les complexes sont insolubles avec un aspect opaque et homogène à des pH compris entre 2 et 2,5 et une séparation de phases avec la précipitation du complexe aux valeurs de pH comprises entre 3 et 3,5.

Ce phénomène peut être expliqué de la façon suivante : à des pH faibles il ya une neutralisation des charges négatives du polysaccharide qui formera avec la protéine chargée positivement un complexe par attraction électrostatique (**Burgess, 1990; Singh et Burgess, 1989**). La turbidité, dans ce domaine, est maximale et la viscosité enregistre les taux les plus élevés.

En ce qui concerne la taille du complexe formé, il est de l'ordre de 71,32 à 353,98 μm pour les pH 2 ;2,5 ;3 ;3,5 et entre 40,65 à 57,38 μm pour le pH 4 . Cette taille relativement importante est expliquée par la concentration globale des deux polymères.

Plus la quantité des polymères dans le mélange est importante plus la taille des complexes formés sera plus grande ; les études de **(Phares & Sperandio, 1964)**, qui ont travaillé sur les interactions protéines polysaccharides ont démontré, d'une part, que la taille des complexes formés est affectée significativement par la concentration totale des polymères, d'autre part, il y a augmentation du ratio protéine polysaccharide ; ce qui fait augmenter les interactions électrostatiques et permet la formation de complexes cohésifs.[32]

L'aspect macroscopique des essais appartenants à cette plage de pH 2,2,5, 3,3,5 montre un aspect opaque blanchâtre et au microscope des complexes insolubles sous forme d'agrégats macromoléculaires (fig. V.1, à V.4). A pH 4, et à l'œil nu les résultats obtenus montrent un aspect complètement limpide. Un vide optique est obtenu au microscope (fig. V.5). Avec des valeurs de turbidité exprimée en densité optique très faible de l'ordre de 0.042 et une viscosité réduite de l'ordre de 0,121 Pa.s. Ces résultats confirment la formation de complexes solubles à ce pH très proche du pH isoélectrique de la protéine.

Ceci correspondant à la saturation des sites positifs de la protéine par le polysaccharide, avec un potentiel électrocinétique globale négative de l'ordre de -48.60 mV. On peut schématiser les différents types de complexes formés suite à la variation de pH, comme suit :

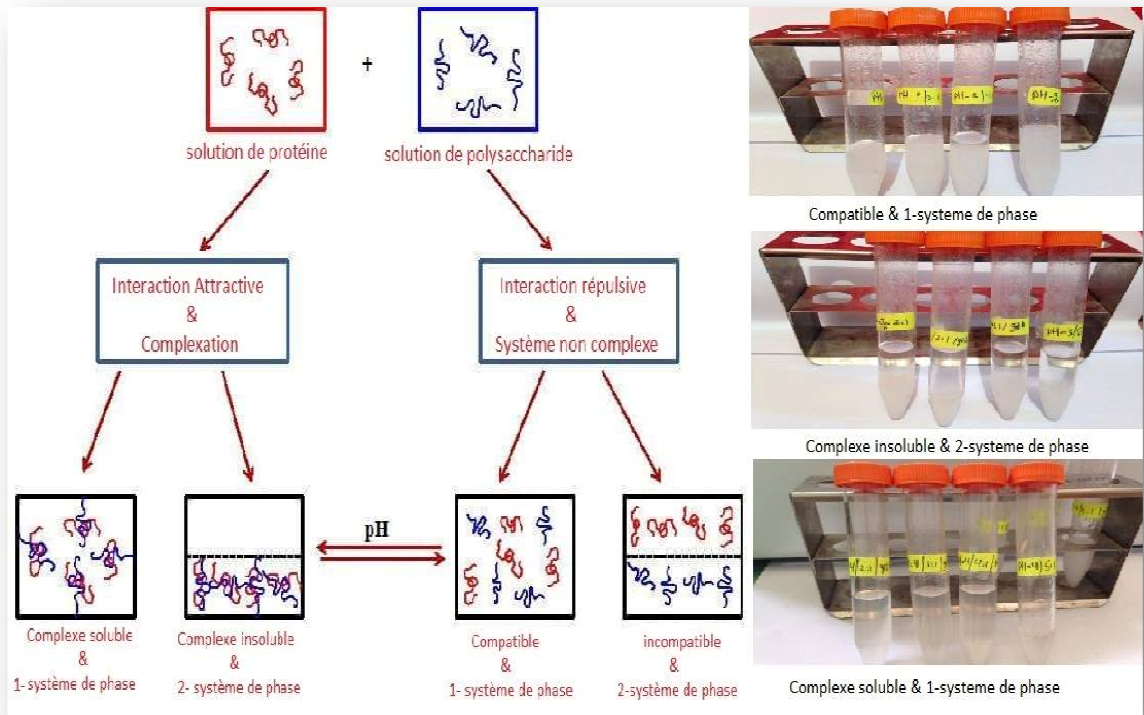


Figure IV.13: *Différents complexes formés entre protéines et polysaccharides.*

Conclusion générale :

Le mode d'association entre les protéines et les polysaccharides en solution est la conséquence du caractère polyélectrolytique. Les liaisons qui stabilisent entre les deux polymères peuvent être ioniques ou physiques. Parmi les paramètres étudiés, dans ce travail, la taille du complexe, le potentiel électrocinétique, la turbidité, les paramètres rhéologiques et le paramètre le plus important : le pH.

La formation du complexe dépend du pH. A pH inférieure au pH isoélectrique de la protéine (pH 2 à 2,5), les complexes sont insolubles avec un aspect opaque. Et lorsque le pH est entre 3 et 3,5, une séparation de phase avec précipitation du complexe est obtenue. On peut établir qu'à pH acide il ya une neutralisation des charges du polysaccharide qui formera avec les protéines un complexe par attraction électrostatique. La turbidité, dans ce domaine, est maximale et la viscosité enregistre les taux les plus élevés. En ce qui concerne, la taille du complexe formé, elle est de l'ordre de 57.38 μm pour le pH 4 et elle est affectée significativement par la concentration totale de polymère, et d'autre part, par l'augmentation du ratio protéines polysaccharides.

La micro-encapsulation est une révolution pour l'industrie pharmaceutique ; c'est une technique utilisée afin de protéger les composés fragiles, en particulier ceux qui sont sensibles à l'hydrolyse ou l'oxydation. Le développement du procédé d'encapsulation requiert une démarche complexe qui consiste à : choisir un type de procédé ; définir la matière première utilisable; étudier leur formulation et le procédé d'encapsulation.

Au terme de notre travail nous avons pu déterminer les différentes zones et types de complexes obtenus en fonction du pH et le ratio des polymères gélatine / alginate de sodium. A cet effet, par exemple, le complexe soluble obtenu dans la zone de pH égal à 4 sera très intéressant, pour son utilisation comme émulsifiant d'interface. Les complexes insolubles utilisés autant que matrices d'encapsulations, seront très prometteux, pour les principes actifs pharmaceutiques ou autres avec des propriétés complètement nouvelles par rapport aux matériaux de base gélatine et alginate de sodium.

Liste de figures :

Figure	Titre de figure	Page
Figure I. 1	Les microparticules.	4
Figure I.2	Les nanoparticules.	5
Figure I.3	Les liposomes.	5
Figure I.4	Domaines d'application de la micro-encapsulation.	7
Figure I.5	Différentes techniques d'encapsulations	9
Figure I.6	Réticulation interfaciale des microcapsules par coacervation complexe.	11
Figure I.7	Schéma de principe du procédé de micro-encapsulation par évaporation de solvant.	12
Figure I.8	Schéma de principe du procédé d'encapsulation par gélification thermique (hot melt).	13
Figure I.9	Mécanisme de la polycondensation interfaciale.	14
Figure I.10	Mécanisme de formation des microparticules par polymérisation interfaciale.	15
Figure I.11	Étape de formation d'un film d'enrobage par spraycoating sur des particules solides.	17
Figure I.12	Schéma de principe de congélation de gouttes.	18
Figure II.1	Des modes possibles de l'interaction protéines /polysaccharides	21
Figure II.2	Comportement de polymères protéines /polysaccharides	24
Figure II.3	Influence de pH sur les interactions entre protéines /polysaccharides	29
Figure II.4	Structure de la molécule de gélatine	33
Figure III.1	Structure chimique d'alginate de sodium.	37
Figure III.2	Structure chimique de la molécule de gélatine.	38
Figure III.3	Schéma représentant les étapes de préparation du mélange.	43
Figure III.4	Schéma de l'ajustement du pH.	44
Figure III.5	Courbe de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement	47
Figure IV.1	Photo microscopique des différents essais à pH 2 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; grossissement : G X 25	50
Figure IV.2	Photo microscopique des différents essais à pH 2.5 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; grossissement : G X 25.	50
Figure IV.3	Photos macroscopiques des différents essais à pH 2 et 2.5 ; à différents ratios (2 :1 ;3 :1 ;4 :1 ;5:1).	51

Figure IV.4	Photos microscopiques des différents essais à pH 3 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; grossissement : G X 25.	51
Figure IV.5	Photos microscopiques des différents essais à pH 3.5 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; grossissement : G X 25.	52
Figure IV.6	Photos macroscopiques des différents essais à pH 3 et 3.5 ; à différents ratios (2 :1 ;3 :1 ;4 :1 ;5:1).	52
Figure IV.7	Photos microscopiques des différents essais à pH 4 ; A (ratio 2 :1) ; B (ratio 3 :1) ; C (ratio 4 :1) ; D (ratio 5:1) ; grossissement : G X 25.	53
Figure IV.8	Photos macroscopiques des différents essais à pH 4 ; à différents ratios (2 :1 ;3 :1 ;4 :1 ;5:1).	53
Figure IV.9	Résultats de la zétamétrie à pH 2 à différents ratios	54
Figure IV.10	Effet du pH sur l'absorbance des échantillons aux ratios gé/Alg 2 :1 et 3 :1.	57
Figure IV.11	Influence du pH sur l'absorbance des échantillons au ratio gé/Alg 4:1 et 5:1.	57
Figure IV.12	Viscosité en fonction du taux de cisaillement ratio 4:1 ; pH 2.5.	58
Figure IV.13	Différents complexes formés entre protéine et polysaccharide.	64

Références bibliographiques :

- [1] : contribution a l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif:oxacilline sodique encapsule en vue de déterminer les conditions de conservation par Yahia Nafti université Ziane Achour de Djelefa – ingenieur d'état en biologie option : con
- [2] : contribution a l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif:oxacilline sodique encapsule en vue de déterminer les conditions de conservation par J.richard, J.benoit, techniques de l'ingénieur, traité génie des procédés.
- [3] : Formulation des microencapsule a libération prolonge a bade de principe actif très peu soluble ou insoluble et caractérisation biopharmaceutique ; par Zahaf Mounia ;2014.
- [4] : doctorat de l'universite pierre et marie curie ;spécialité chimie physique et chimie analytique ; présente par Mathieu goutayer ; soutenu le 11 décembre 2008
- [5] : J.p.benoît, S.briançon, E.fattal, E.fessi, P. legrand, c.passirani, sphéroïdes et formes vectorisées. p 13, 23
- [6] : D.barthès-biesel, E.leclerc (2009), conception et réalisation d'un système micro fluidique pour la production de gouttes calibrées et leur encapsulation, mémoire de doctorat,
- [7]: fabrication of a polymer high-aspect-ratio pillar array using uv imprinting par hidetoshi shinohara 1,*, hiroshi goto 1, T akashi kasahara 2 and jun mizuno 2; micromachines 2013, 4, 157-167; doi:10.3390/mi4020157.
- [8]: M. perino (2009), energy conservation in building and community systems programme, international energy agency.
- [9] : T.félicie (2009), conception et mise en œuvre d'un procédé intensifié continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale, mémoire de doctorat, université de toulouse (france).

[10] : k.bedie (2008), microencapsulation de composés nutraceutiques dans des complexes protéines-polysaccharides, mémoire de doctorat, université laval.

[11] : micro-encapsulation de composés nutraceutiques dans des complexes protéines-polysaccharides ; préparé par kouadio Gerard Bedie ; février 2008.

[12]: k., Amit a prasun bandyopadhyay. polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids. the complex world of polysaccharides. intech, 2012-10-31. doi: 10.5772/50561

[13]: hydrogels: méthodes de préparation, caractérisation et applications; by Syed k. h. gulrez, Saphwan al-assaf and Glyn o phillips.

[14] : étude de l'interaction associative entre la β - lactoglobuline et le xanthane natif ou le xanthane traité aux hautes pressions hydrodynamiques ; préparé par Sandra Isabel Laneuville Ballester ; décembre, 2004.

[15] : étude des propriétés émulsifiantes d'un complexe de protéines de lactosérum et d'acétylchitosane ; mémoire préparé à la faculté des études supérieures de l'université laval pour l'obtention du grade de master en sciences (m-sc.)

[16]: Polysaccharide-protein interactions and their relevance in food colloids; Amit k. ghosh and Prasun bandyopadhyay; chapitre 14

[17] : Doctorat de l'université pierre et marie curie école doctorale de chimie physique et chimie analytique de paris centre; présenté par ; Leslie Rolland ; propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à cœur liquide.

[18]: Fmc alginates. general technology; fmc biopolymere; mastering of innovation thinking. Fmc alginates. general technology; fmc biopolymere; mastering of innovation thinking.

[19]: academic science; a review on ionotropic gelation method: novel approach for controlled gastroretentive gelspheres; Poonam patil, Daksha Chavanke, Milind Wagh ;received: 01 may 2012, revised and accepted: 20 jun 2012

[20]: trends in food science & technology 20 (2009) 316e332polyion-complex ; hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review Stefano Farrisa,b, karen ;m. Schaichb, Linshu liuc, Luciano ;Pie.

[21]: Gelatin manufacturers institute of america; gelation handbook; members as of january 2012.

[22]: <https://tpebonbons.files.wordpress.com/2013/02/structuregel.jpg>

[23]: Effect of collagen fiber and gelatin on gelling properties of alginate gels; Ana Carla k.satoal 1, Rosiane l.cunhaa 2.a departement of food engineering, faculty of food engineering, university of campinas (unicamp); Barzil (lacksato@yahoo.com.br , 2rosia.

[24]: L'étude thermogravimétrique a révélé une amélioration de la stabilité thermique avec réticulation. study of complex coacervation of gelatin a and sodium alginate for microencapsulation of olive oil; n. devi*, d. hazarika, c. deka, and d. k. kakati; department of chemistry, gauhati university, assam, india; received may 2012, accepted june 2012.

[25] : les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingenierie ; application a la construction d'un biomateriau ; presente et soutenue publiquement le 02 juillet ; par Emilie vincent ; universite Henri Poincare - nancy 1 ;2010.

[26] : How products are made <http://www.madehow.com/volume-5/gelatin.html>.

[27]: Janus, j., kenchington, a.w., and ward, a.g., 1951. research, vol. 4, p. 247, london.).

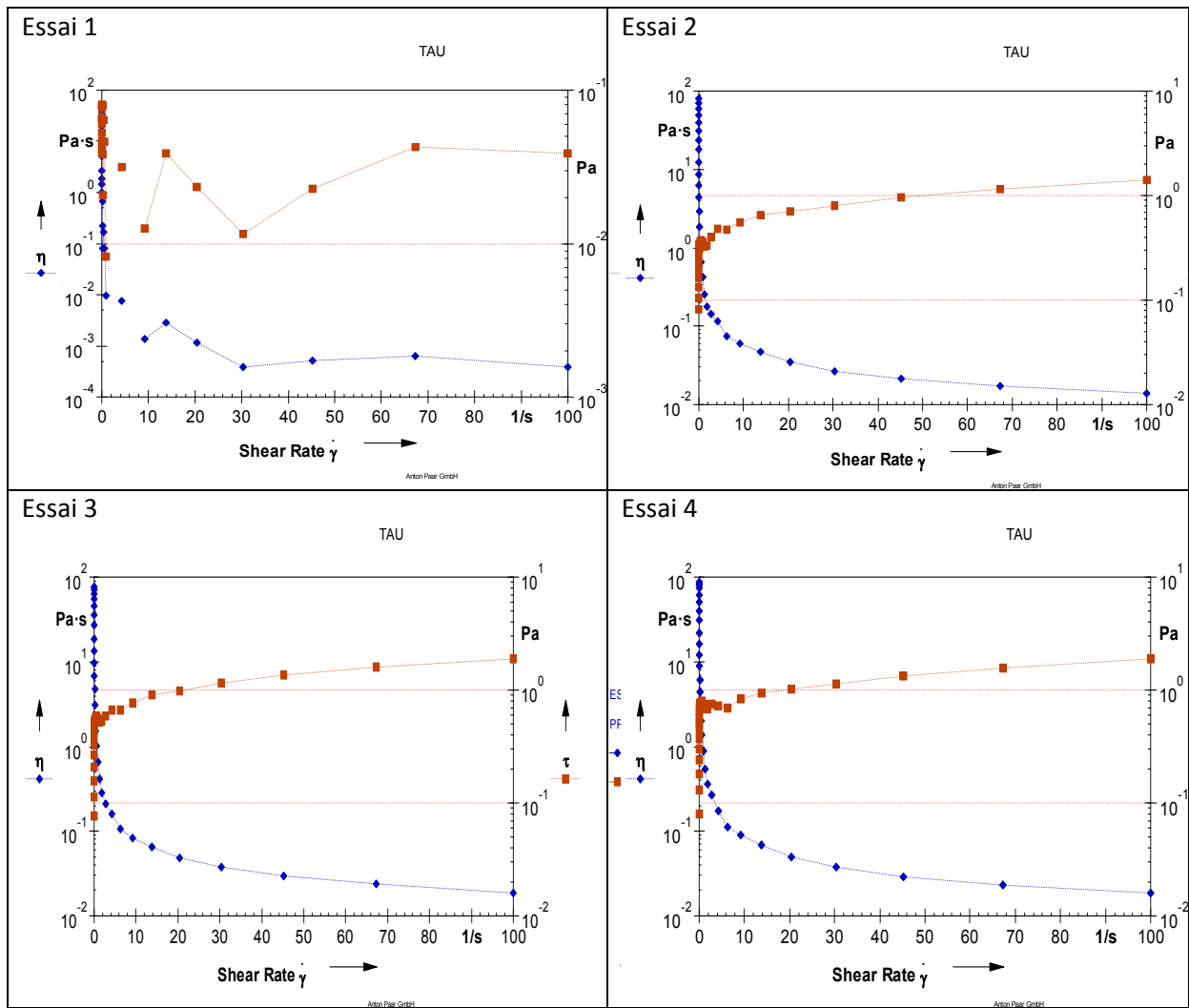
[28] :Maxey, c.r., and palmer, m.r. 1967. in photographic gelatin ii, r.j., cox, ed., pp. 27-36, academic press,london.

[29]: Chen, l.,Jia, y., and Peng, b. 1985. photographic gelatin, proceedings of the fourth iag conference (1983), H. ammann-brass and J. pouradier, eds., pp. 95-106.

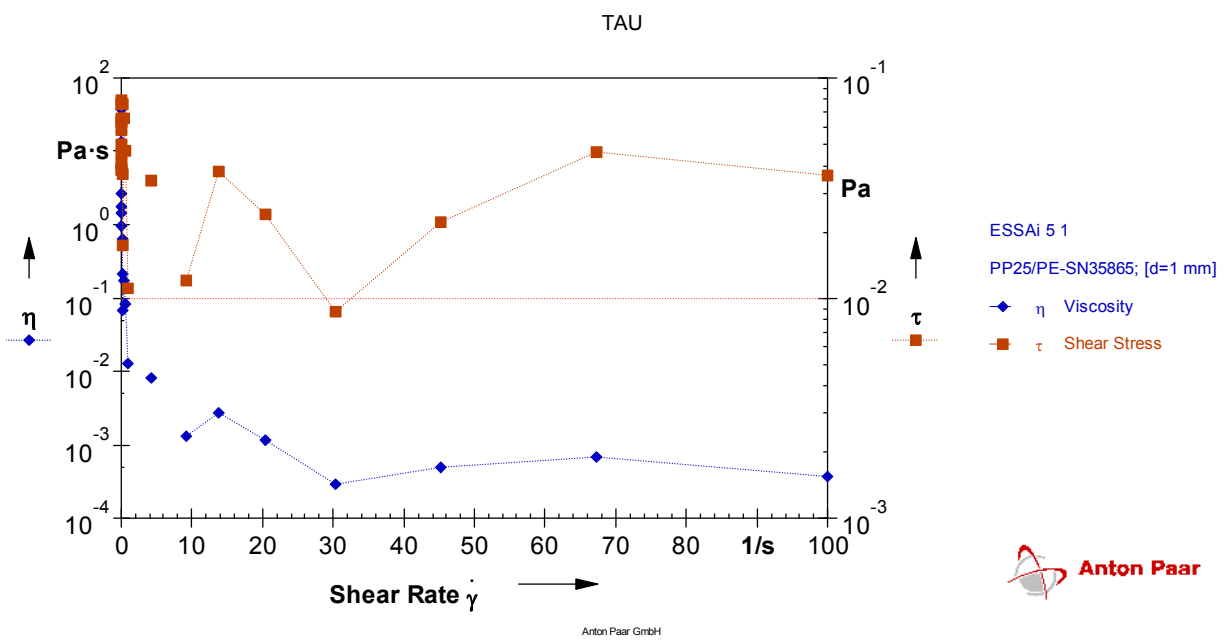
[30]: Toda, y. 1985. photographic gelatin, proceedings of the fourth iag conference (1983), H. ammann-brass and J. pouradier, eds., pp. 107-124.

[31]: Toda, y. 1987. photographic gelatin, proceedings of the fifth rps symposium (1985), s.j. bond, ed., pp. 28-37.

[32] : Tarie-Christine Boucher impact des traitements physiques sur la stabilité des matrices d'encapsulation à base d'isolat de protéines de lactosérum et de pectine faiblement méthylée
2007

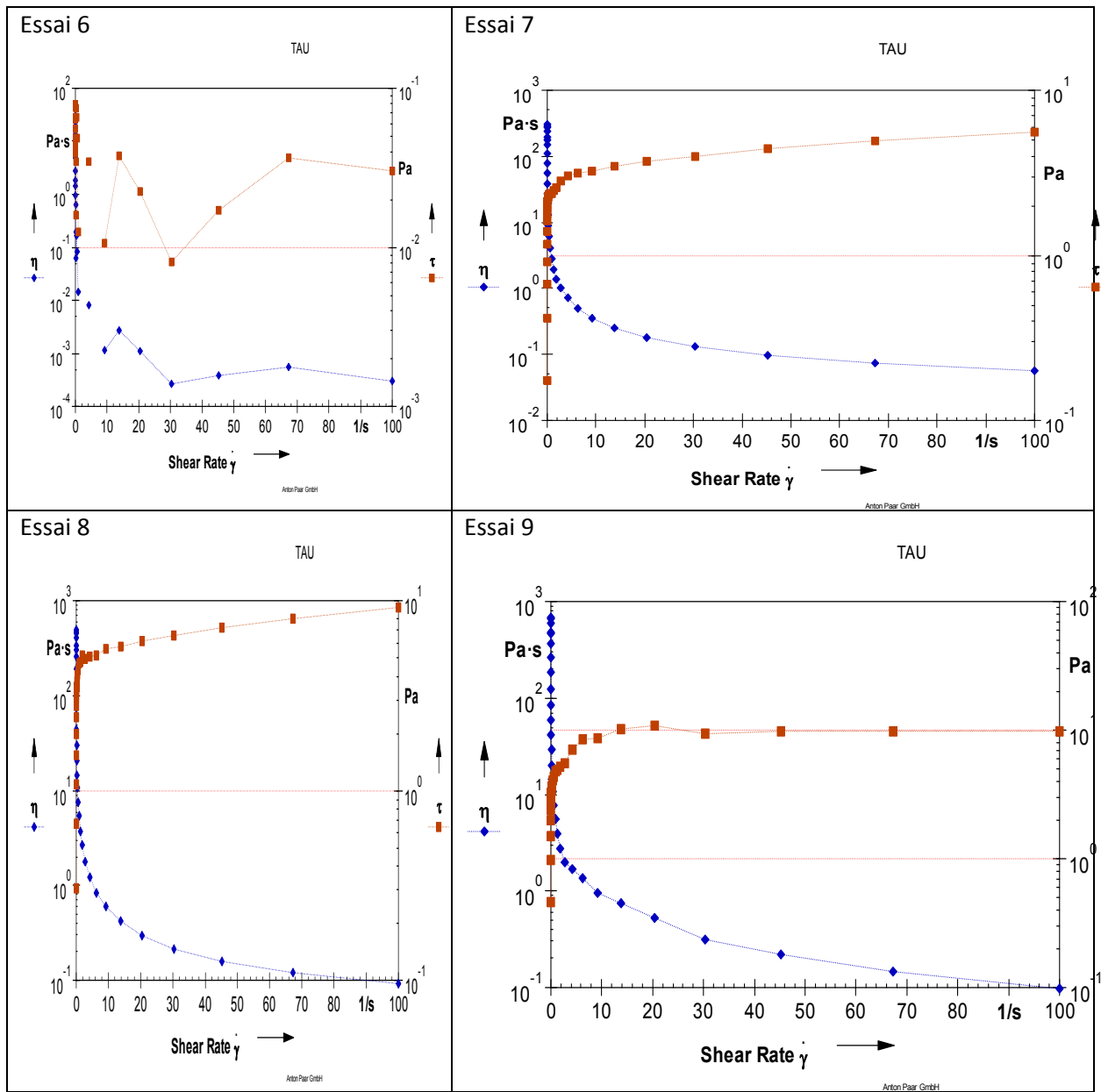


Essai 5

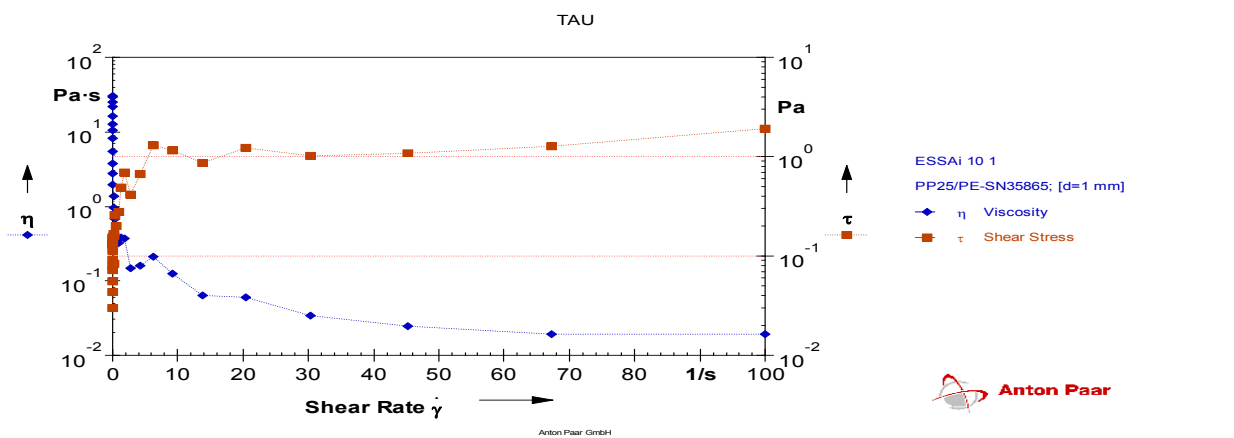


Graphes qui représentent la variation de la viscosité et la contrainte de cisaillement pour le essai (1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5)

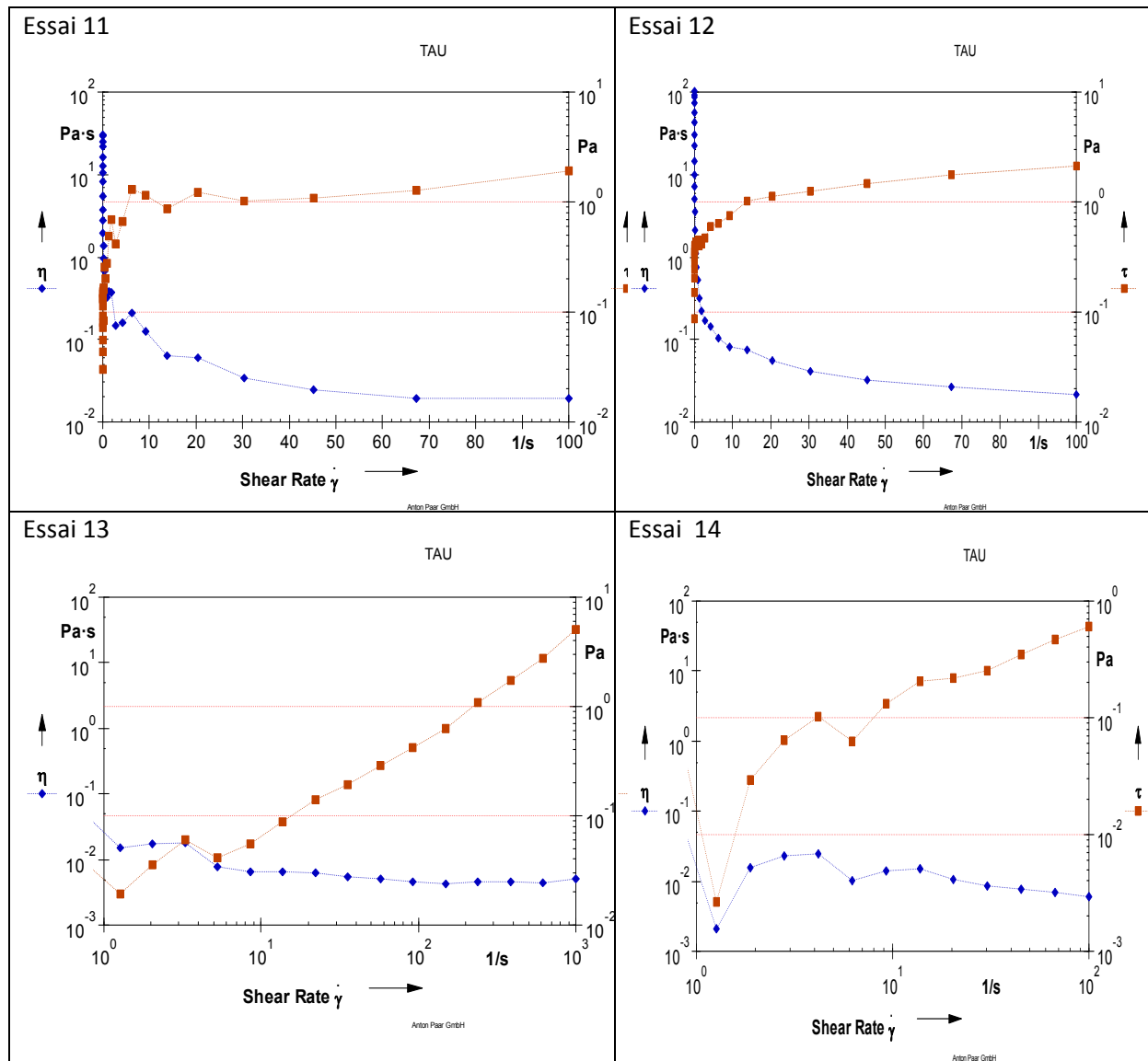




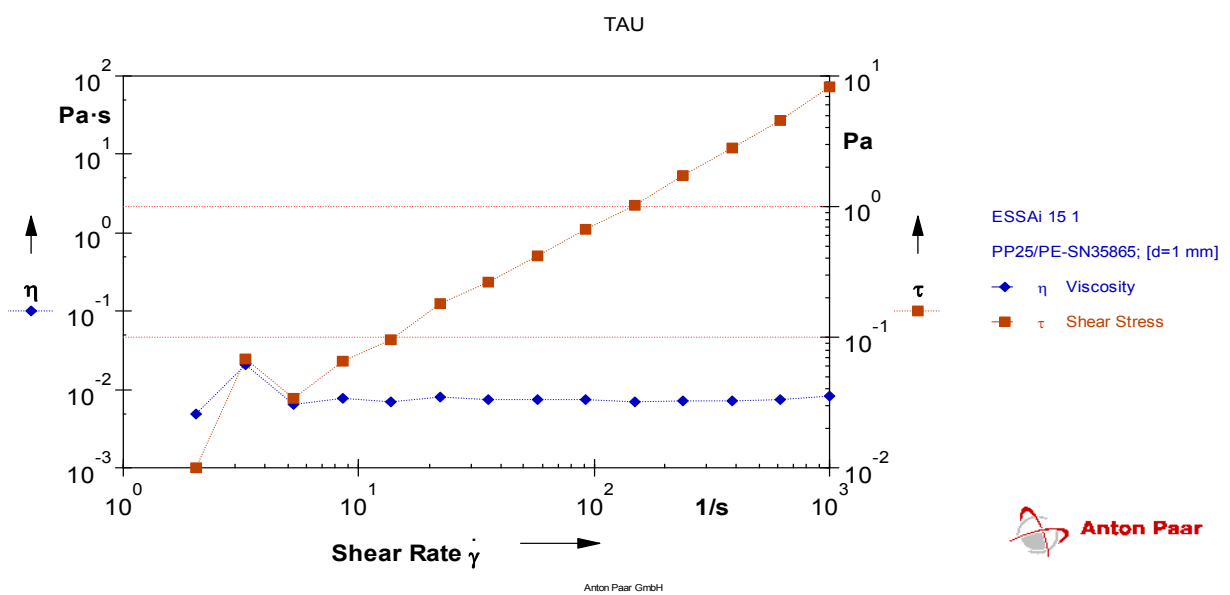
Essai 10



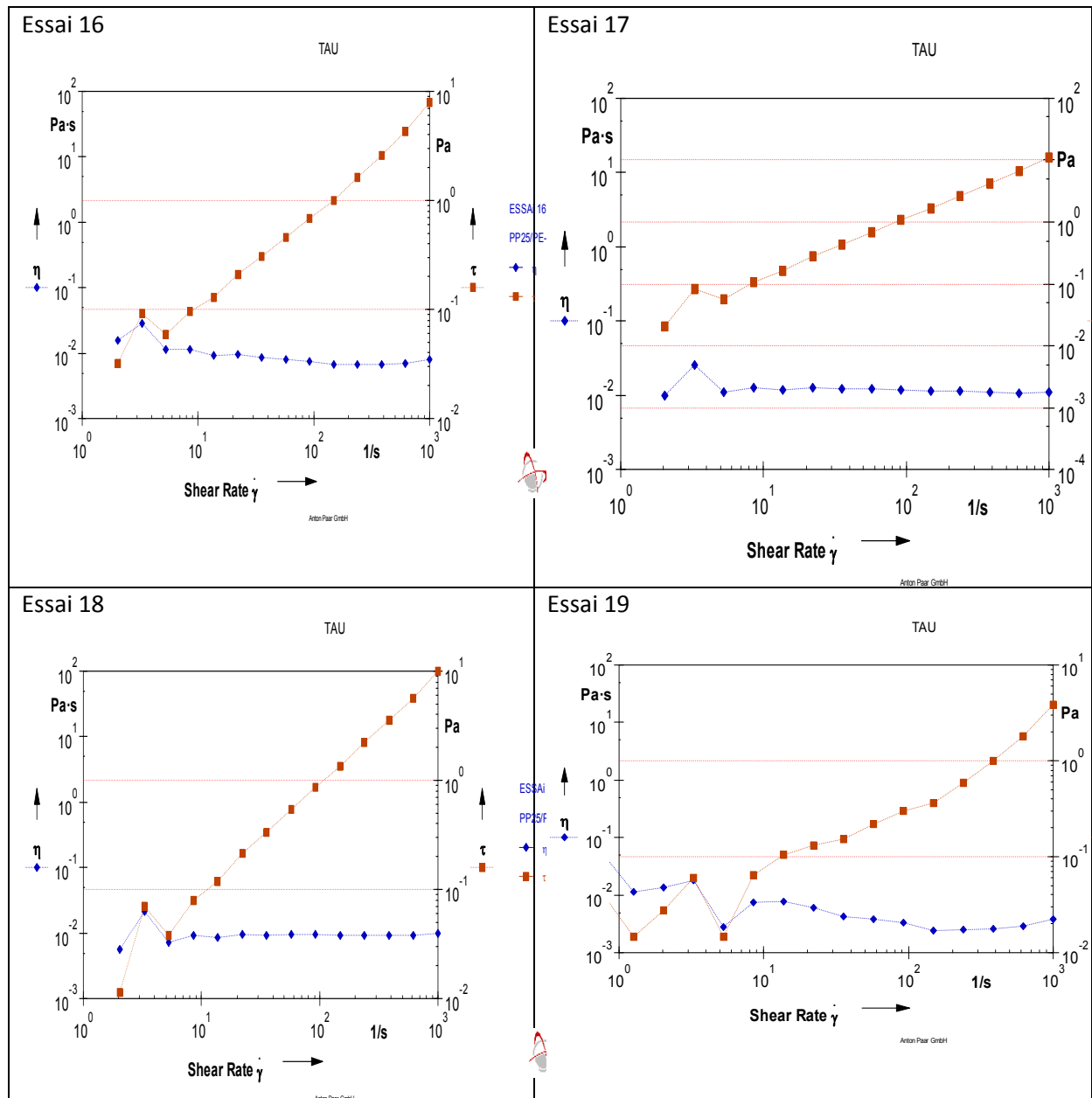
Graphes qui représentent la variation de la viscosité et la contrainte de cisaillement pour le essai (6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10)



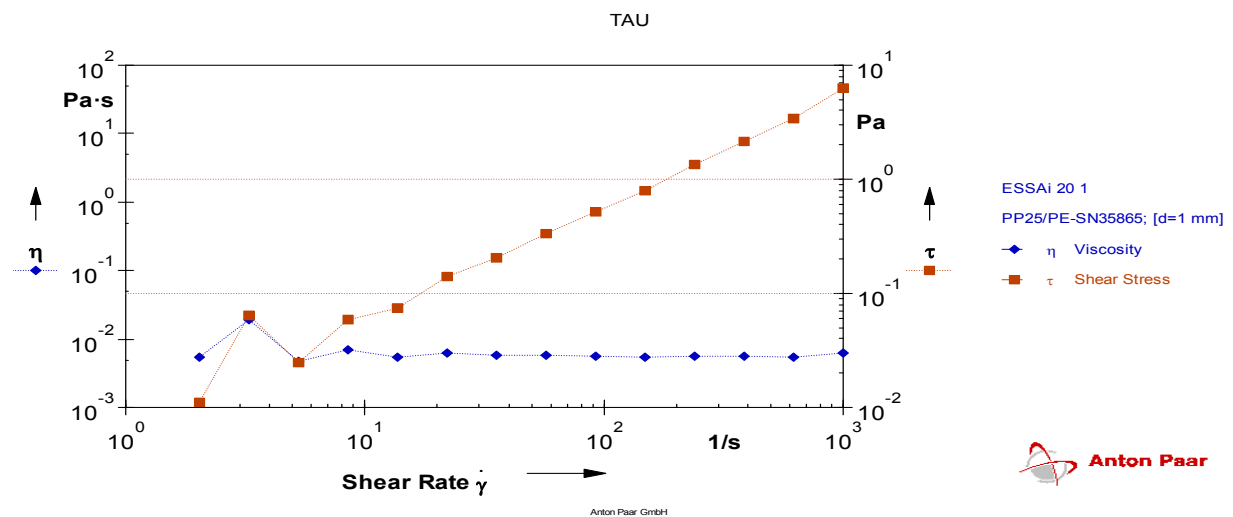
Essai 15



Graphes qui représentent la variation de la viscosité et la contrainte de cisaillement pour le essai (11 ; 12 ; 13 ; 14 ; 15)

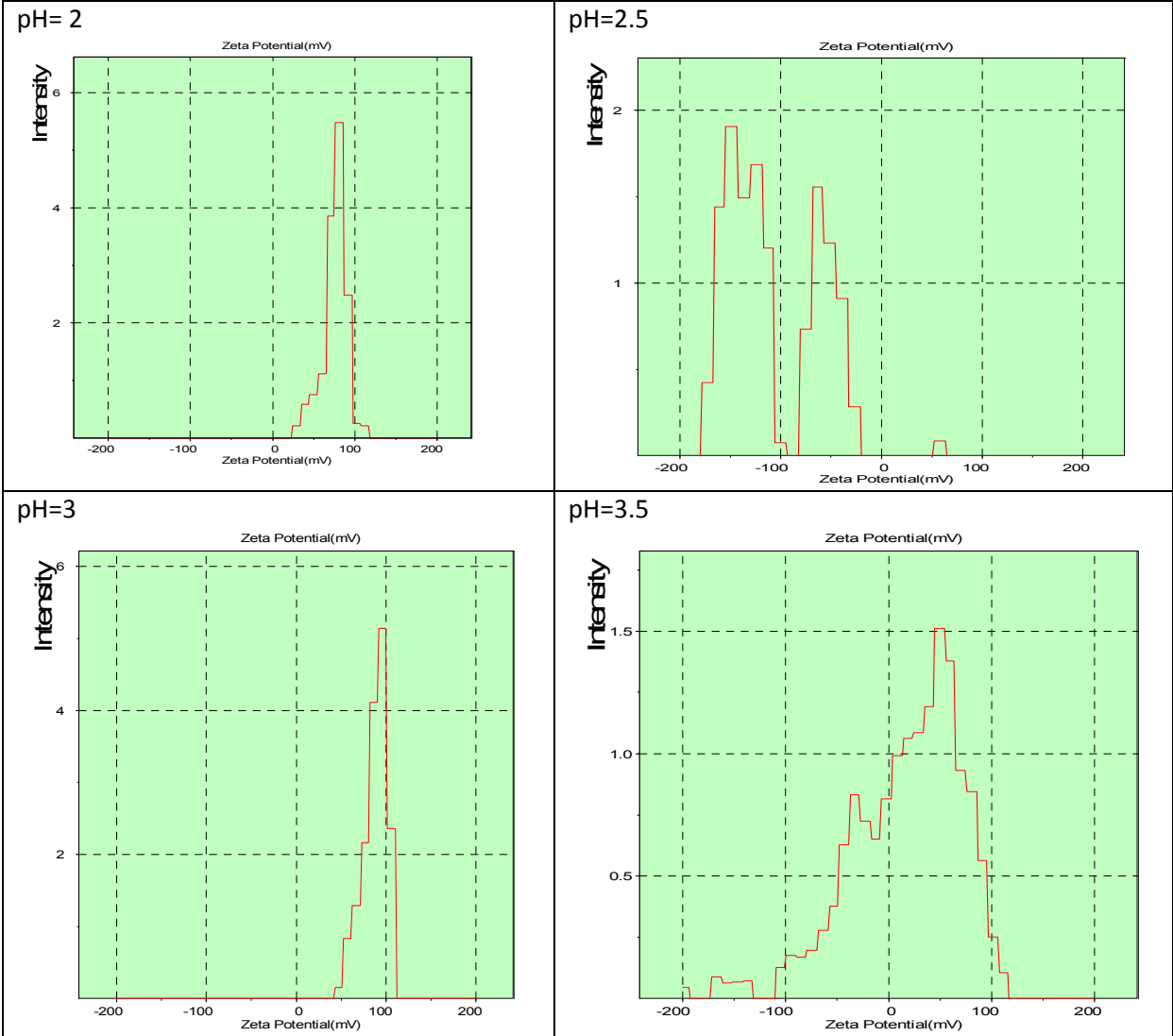


Essai 20



Graphes qui représentent la variation de la viscosité et la contrainte de cisaillement pour le essai (16 ; 17 ; 18 ; 19 ; 20)

Ratio 2/1

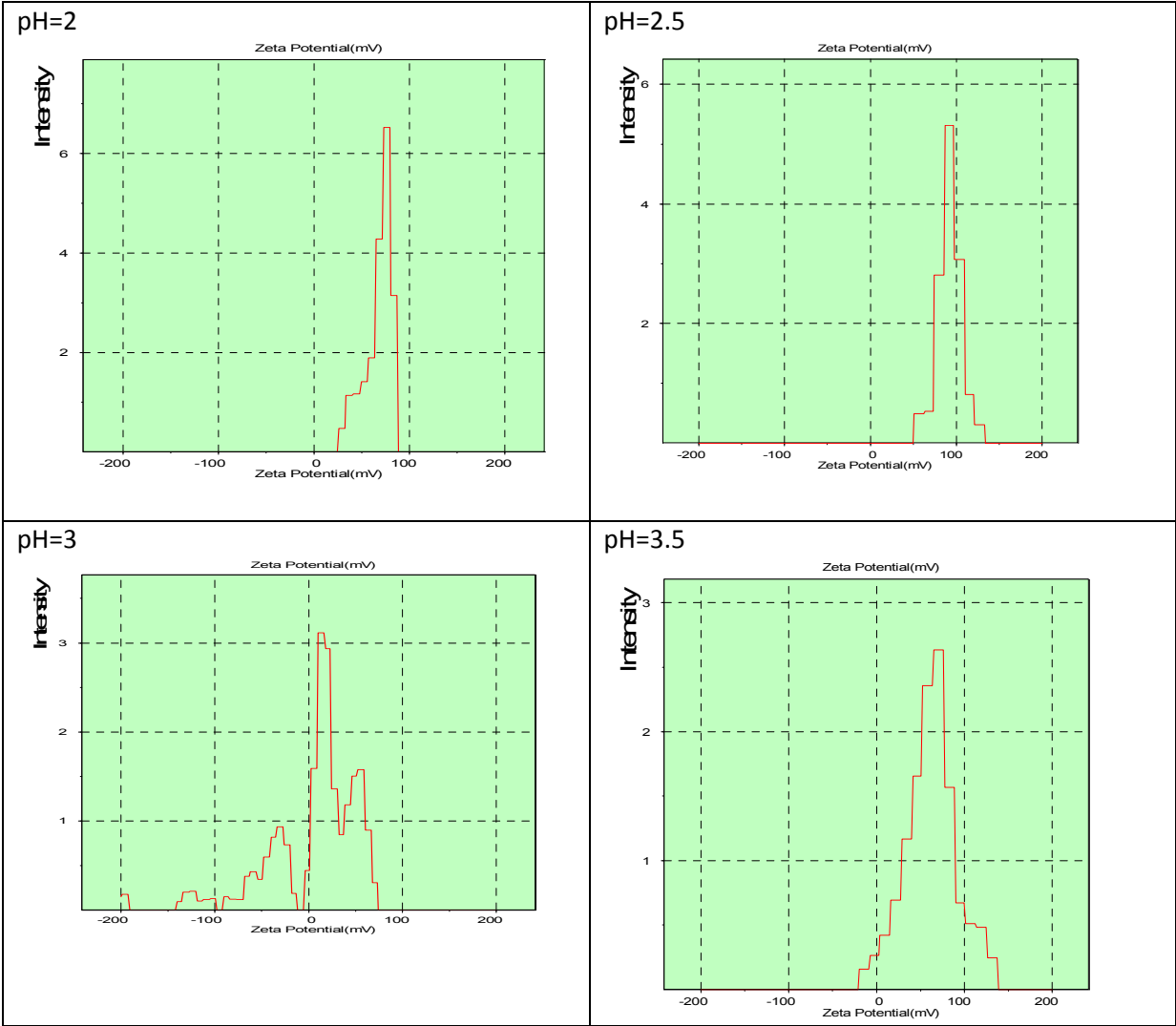


pH=4

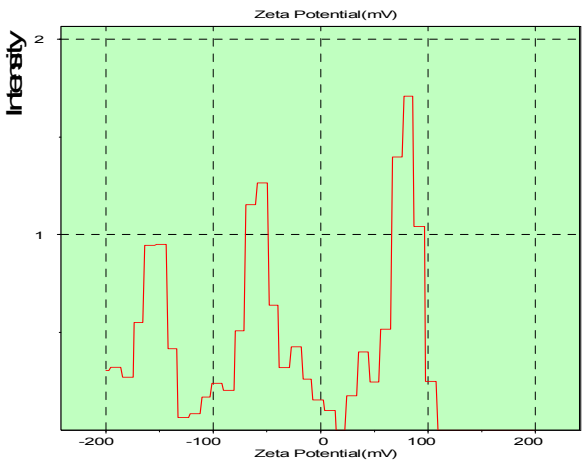


Grphe représente les résultats de la zêtamétrie de ratio 2/1

Ratio 3 /1

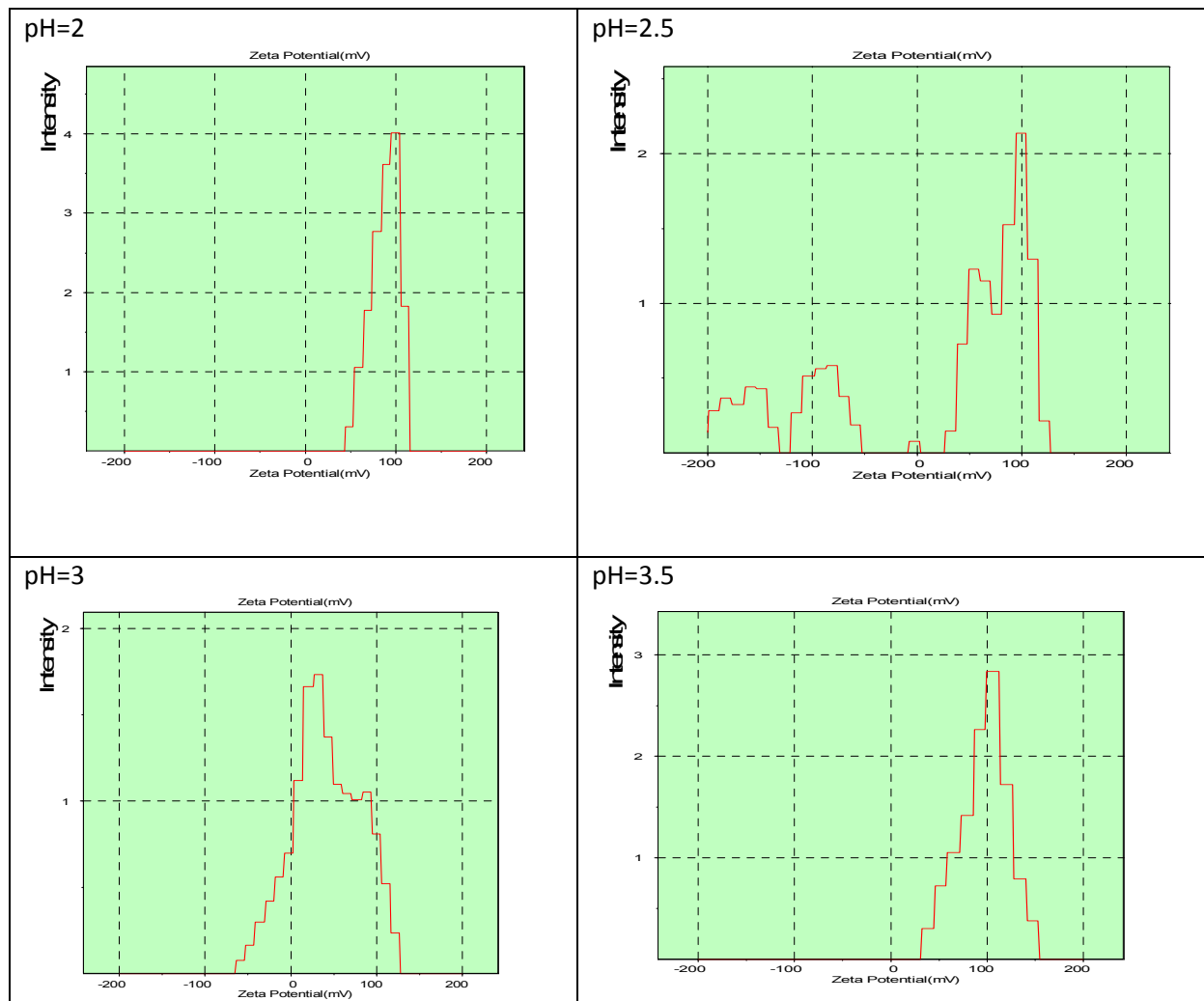


pH=4

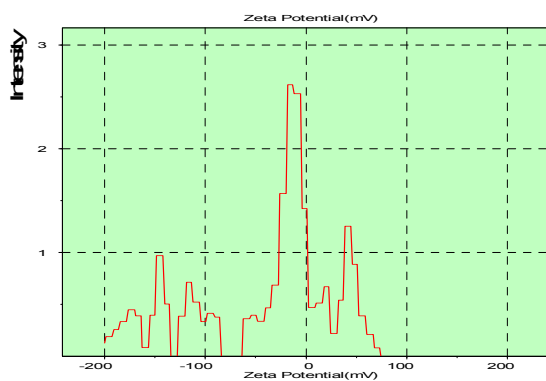


Graphe représente les résultats de la zêtamétrie ratio 3/1

Ratio 4/1

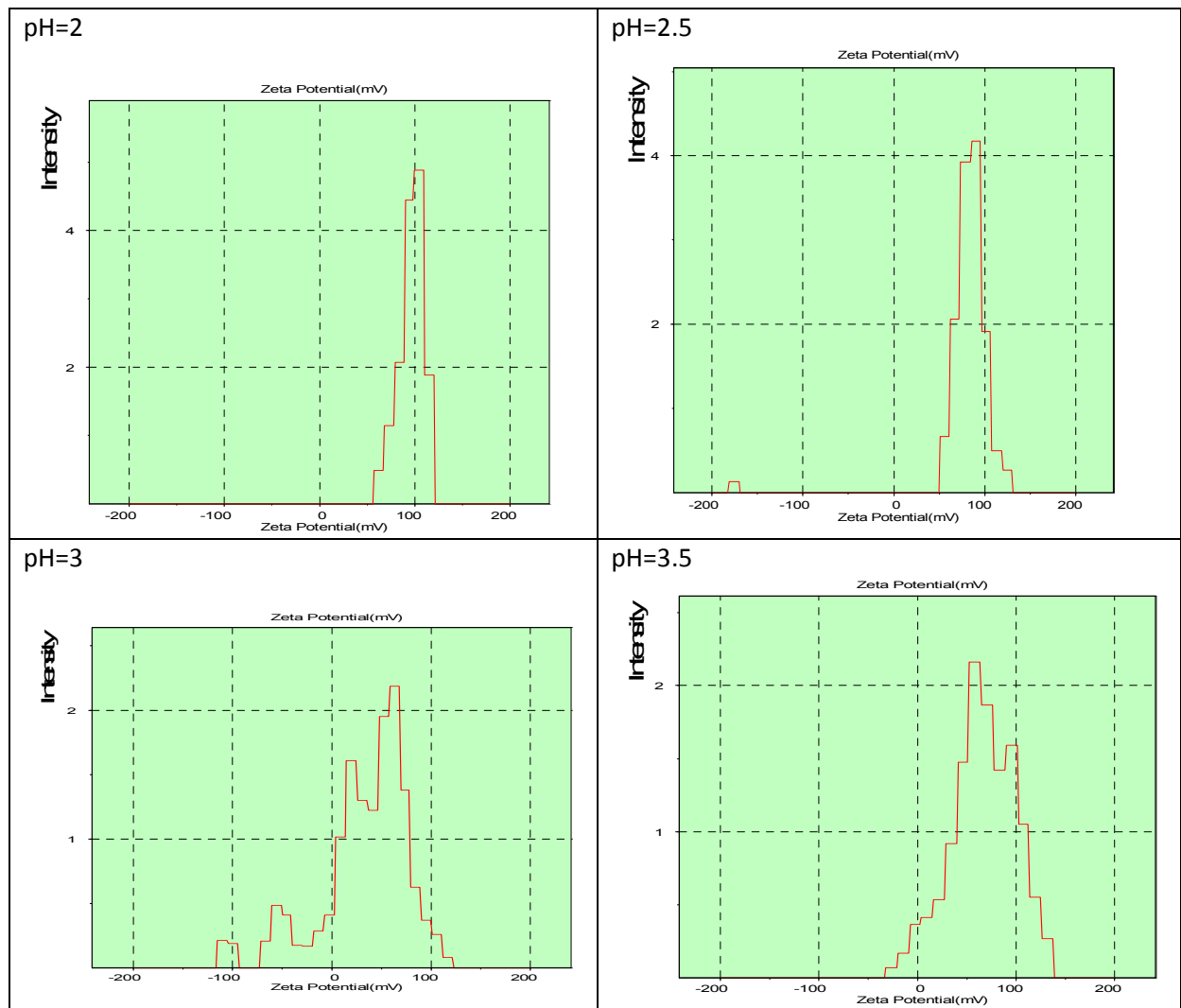


pH=4

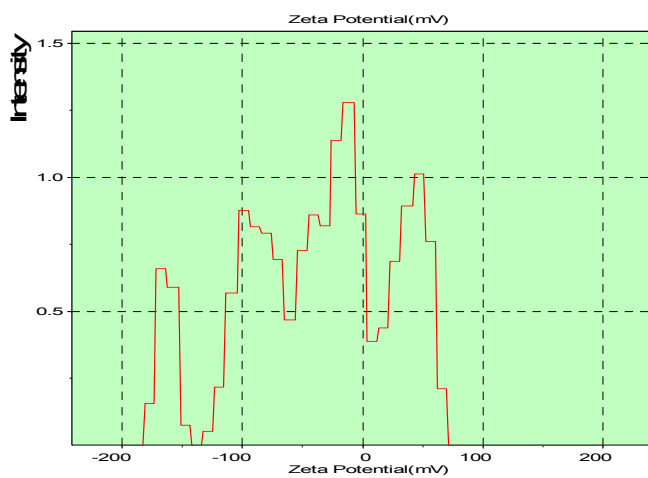


Graphe représente les résultats de la zétamétrie ratio 4/1

Ratio 5/1



pH=4



Graphe représente les résultats de la zétamétrie ratio 5/1