

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :
HERZI Nejia

le : jeudi 21 mars 2013

Titre :

Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles

Ecole doctorale :
Mécanique, Énergétique, Génie civil et Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :
LGC

Directeur(s) de Thèse :
CONDORET Jean-Stéphane
ROMDHANE Mehrez

Rapporteurs :

ABERT-VIAN Maryline
ZAGROUBA Féthi

Membre(s) du jury :

SUBRA Pascale
GALMIER Marie-Josèphe
CAMY Séverine
BOUJILA Jalloul



Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Toulouse France
Délivré par l'Institut National Polytechnique de Toulouse
Spécialité Génie de Procédés et de l'Environnement

ET

Docteur de l'École Nationale d'Ingénieurs de Gabès
Spécialité Génie Chimique-Procédés

Par

Nejia HERZI

*Extraction et purification de substances naturelles :
comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des
techniques conventionnelles*

Soutenue le 21 Mars 2013, devant le jury composé de :

Dr. Maryline ABERT-VIAN	Maître de Conférences, HDR à l'Université d'Avignon	Rapporteur
Pr. Féthi ZAGROUBA	Professeur à l'Université de Carthage	Rapporteur
Pr. Jean-Stéphane CONDORET	Professeur à l'INP Toulouse	Co-directeur
Pr. Mehrez ROMDHANE	Professeur à l'ENIG	Co-directeur
Dr. Séverine CAMY	Maître de Conférences à l'INP Toulouse	Examineur
Dr. Jalloul BOUAJILA	Maître de Conférences, HDR à UPS Toulouse	Examineur
Dr. Marie-Josèphe GALMIER	Maître de Conférences, HDR à Université d'Auvergne	Examineur
Dr. Pascale SUBRA	Directeur de Recherche CNRS	Examineur

Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture

1. Journal of Natural Product Research (acceptée)
Extraction of Essential Oil from *Cupresseus semperevirens*: comparison of global yields, chemical composition and antioxidant activity obtained by hydrodistillation and supercritical extraction.
N. HERZI, S. CAMY, J. BOUAJILA, M. ROMDHANE and J. S. CONDORET
2. Journal of Food Science (acceptée)
Supercritical CO₂ extraction of essential oil from two species of eucalyptus: global yield, chemical composition and antioxidant activity
N. HERZI, J. BOUAJILA, S. CAMY, S. CAZAUX, M. ROMDHANE, J.S. CONDORET
3. Journal of Food Chemistry (avec correction)
Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: yield, chemical composition and antioxidant activity.
N. HERZI, J. BOUAJILA, S. CAMY, M. ROMDHANE, J.S. CONDORET
4. The Journal of Supercritical Fluid Extraction (acceptée)
Supercritical CO₂ extraction of *Tetraclinis articulata*: chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling
N. HERZI, S. CAMY, J. BOUAJILA, P. DESTAC, M. ROMDHANE, J.S. CONDORET

Communications orales internationales

1. HERZI N., BOUAJILA J., CAMY S., ROMDHANE M. & CONDORET J.S., Congrès International sur les Plantes Aromatiques et Médicinales, CIPAM2012, Sidi bel-Abbès, Algérie- 08 - 10 Mai 2012.
‘Supercritical CO₂ Extraction of Essential Oil from *Cupressus Semperevirens*: Global Yields, Chemical Composition And Antioxidant Activity’
2. N. HERZI, J. BOUAJILA, S. CAMY, S. CAZAUX, M. HOUJA, J.-S. CONDORET, M. ROMDHANE, CIPAM2011 International Congress on Aromatic and Medicinal Plants Cagliari (Italy), 13-15 April 2011.
‘Extraction and identification of essential oils from two species of eucalyptus using supercritical CO₂’

Communications par affiche

- 1.** HERZI N., BOUAJILA J., CAMY S., ROMDHANE M., CONDORET J.S., ISSF 2012-10th International Symposium on Supercritical Fluids, San Francisco. CA, USA, 13 – 16 May 2012.

‘Comparison of Extraction Techniques for Essential Oil from *Tetraclinis articulata*: assessment of antioxidant activity of extracts’
- 2.** HERZI N., BOUAJILA J., CAMY S., ROMDHANE M., CONDORET J.S., JSC2012 - Journées supercritiques Albi (France)- 15-16 mars 2012.

‘Extraction of volatile fractions of natural substances by supercritical CO₂’
- 3.** N. HERZI, J. BOUAJILA, S. CAMY, S. CAZAUX, M. KHOUJA, M. ROMDHANE, J.S. CONDORET, The international conference on Natural products, held in Castres (France), 24 – 28 May, 2011.

‘Antioxidant activity and chemical composition of supercritical CO₂ extracted essential oil of *Tetraclinis articulata* from Tunisia’
- 4.** N. HERZI, Y. ARJOUNI, J.S. CONDORET, A. ROMANE, M. ROMDHANE, CIPAM 2011 International Congress on Aromatic and Medicinal Plants Cagliari (Italy), 13-15 April 2011.

‘Extraction of essential oils from cypress (*cupressus sempervirens*) in Tunisia and morocco: optimization of some extraction parameters essential oil’

Table de Matières

Remerciements.....	1
Introduction Générale.....	3
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	5
Partie I : Extraction des plantes aromatiques et médicinales.....	7
I. Les PAM et les huiles essentielles.....	7
I.1. Extraction solide-liquide.....	7
I.2. Définitions des substances naturelles.....	7
I.3. Structure des plantes et localisation des HEs dans la plante.....	8
I.4. Composition chimique et propriétés physico-chimiques.....	8
I.4.1. Les composés terpéniques.....	9
I.4.2. Les composés phénoliques.....	10
I.4.3. Les antioxydants.....	11
I.5. Propriétés biologiques des HEs.....	11
I.6. Contrôle des HEs.....	12
II. Facteurs affectant la composition et le rendement des HEs.....	12
III. Principaux marchés des HEs.....	13
IV. Techniques d'extraction des substances naturelles.....	13
IV.1. Méthodes traditionnelles d'extraction des HEs.....	13
IV.1.1. Hydrodistillation.....	13
IV.1.2. Entraînement à la vapeur.....	14
IV.1.3. Expression à froid.....	14
IV.2. Extraction des extraits aromatiques par solvant organique sur appareillage Soxhlet.....	15
IV.3. Méthodes innovantes d'extraction des HE.....	15
IV.3.1. Hydrodistillation assistée par ultrasons.....	15
IV.3.2. Extraction assistée par micro-ondes.....	15
IV.3.3. Extraction par fluide supercritique et par l'eau sub-critique.....	16
Partie II : Extraction par fluide supercritique.....	17
I. Les fluides supercritiques.....	17
I.1. Généralité.....	17
I.2. Propriétés du dioxyde de carbone supercritique.....	18
I.3. Propriétés de transport.....	19
I.3.1. Viscosité.....	19
I.3.2. Diffusivité.....	20
I.3.3. Solubilité dans le CO ₂ supercritique.....	21
I.3.4. Masse volumique.....	22
I.3.5. Polarité du CO ₂ « géométrie variable ».....	22
I.3.6. Ajout de co-solvant.....	23
II. Avantages et inconvénients de l'utilisation du CO ₂ supercritique.....	23
III. Cinétique d'extraction solide-fluide supercritique.....	24
IV. Grands domaines d'application de l'extraction solide-fluide par CO ₂ supercritique.....	25
IV.1. Industrie agroalimentaire.....	26
IV.2. Industrie pharmaceutique.....	26
Partie III : Extraction par eau sub-critique.....	27
I. L'eau sub-critique.....	27
I.1. Généralités.....	27
I.2. Propriétés spécifiques de l'eau sub-critique.....	27

I.2.1. Diagramme de phases de l'eau	28
I.2.2. Constante diélectrique de l'eau	28
I.2.3. Viscosité dynamique de l'eau	29
I.2.4. Masse volumique de l'eau	30
I.2.5. Capacité thermique massique de l'eau	31
II. Extraction des huiles volatiles par l'eau sub-critique	32
II.1. Extraction par solvant accélérée «ASE»	32
II.2. Extraction des principes actifs par l'eau sub-critique	32
II.3. Paramètres influant sur l'extraction d'huile volatile	32
II.3.1. Influence de la température d'extraction	33
II.3.2. Influence de la pression d'extraction	33
II.3.3. Influence du temps d'extraction	33
II.3.4. Cinétique d'extraction	34
II.4. Avantages et limitations de l'extraction par l'eau sub-critique grâce a l'ASE	34
II.4.1. Les avantages	34
II.4.2. Les inconvénients	34
Conclusion	34
Chapitre II : Matériels et méthodes	35
I. Monographie des plantes aromatiques et médicinales étudiées	37
I.1. <i>Tetraclinis articulata</i>	37
I.1.1. Présentation	37
I.1.2. Composition chimiques de l'huile essentielle de <i>T. articulata</i>	38
I.1.3. Utilisation de <i>Tetraclinis articulata</i>	39
I.1.4. Préparation de l'échantillon de la matière végétale	39
I.2. <i>Eucalyptus Camaldulensis</i> et <i>Eucalyptus Cinerea</i>	39
I.2.1. Présentation	39
I.2.2. Utilisation de l' <i>eucalyptus</i>	40
I.3. Cyprès de Provence (<i>Cupressus sempervirens</i>)	40
I.3.1. Présentation	40
I.3.2. Utilisation du <i>Cupressus sempervirens</i>	41
I.4. <i>Callitris glaucophylla</i>	41
I.4.1. Présentation	41
I.4.2. Utilisation du <i>Callitris glaucophylla</i>	42
II. Les techniques d'extraction des HEs, des huiles volatiles et des extraits aromatiques	42
II.1. Extraction des HEs par HD	43
II.2. Extraction des huiles volatiles et non volatiles par dioxyde de carbone supercritique	44
II.2.1. Extraction par CO ₂ supercritique : SFE200	44
II.2.2. Extraction par CO ₂ supercritique : SFE1000 bar	46
II.3. Extraction des huiles volatiles avec l'eau sub-critique utilisant l'appareil «ASE200»	47
II.3.1. Description de l'appareil ASE200	47
II.3.2. Extraction par l'eau sub-critique utilisant ASE200	49
II.4. Extraction des extraits aromatiques par solvant organique « Soxhlet »	49
III. Techniques de caractérisation et traitement des plantes et des extraits obtenus	51
III.1. Lyophilisateur	51
III.2. Microscopie Electronique à balayage (MEB)	52
III.3. Thermogravimétrie : méthode de détermination du taux d'humidité	52

III.4. Chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase gazeuse- spectrométrie de masse.....	53
III.5. Dosage des phénols totaux	54
III.6. Mesure de l'activité antioxydante	54
III.6.1. DPPH [•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) activité des radicaux libres Scavenging	54
III.6.2. Dosage antioxydant par ABTS ⁺ /2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline- 6-sulfonate	55
 Chapitre III : Utilisation des techniques conventionnelles d'extraction de substances naturelles.....	57
I. Extraction de <i>T. articulata</i> par «Soxhlet».....	58
I.1. Influence de la nature du solvant sur le rendement global d'extraction	58
I.2. Influence de la durée d'extraction.....	59
I.3. Influence de la taille des particules	60
I.4. Influence de débit du solvant d'extraction	61
I.5. Influence du taux de remplissage et rapport quantité de solvant/ masse de matière végétale sèche (Ms).....	62
II. Extraction de <i>T. articulata</i> par HD	64
II.1. Cinétique d'extraction des HEs de <i>T. articulata</i>	64
II.2. Effet du débit de condensation	65
II.3. Effet du rapport eau /matière végétale sèche (Ms)	66
III. Modélisation de l'HD.....	68
III.1. Choix du modèle	68
III.2. Modèle de Sovová pour l'HD des HEs	69
III.2.1. Hypothèses du modèle	70
III.2.2. Bilan massique de l'HE dans l'extracteur :	71
III.3. Application du modèle	75
Conclusion.....	78
 Chapitre IV : Extraction par CO₂ supercritique	80
I. Extraction des feuilles de <i>Tetraclinis articulata</i> par CO₂ supercritique ...	82
I.1. Cinétique d'extraction.....	82
I.1.1. Temps statique d'extraction par CO ₂ supercritique	84
I.1.2. Temps dynamique d'extraction CO ₂ supercritique.....	85
I.2. Influence de la pression sur le rendement d'extraction	86
I.3. Influence de la température sur le rendement d'extraction.....	88
I.4 Effet du débit de CO ₂ sur le rendement d'extraction.....	89
I.5. Influence de l'ajout d'un co-solvant dans le processus d'extraction avec le CO ₂ supercritique	92
I.6. Influence de la granulométrie de la matière végétale sur l'extraction	94
II. Modélisation.....	96
II.1. Analyse préliminaire des phénomènes physiques mis en jeu.....	96
II.2. Description des équations du modèle	99
II.3. Estimation du coefficient de dispersion axiale	100
II.4. Utilisation de la modélisation pour l'extrapolation du procédé d'extraction	102
Conclusion.....	102

CHAPITRE V : Extraction des substances naturelles par eau sub-critique	104
I. Influence des paramètres intervenant lors de l'extraction des huiles volatiles de <i>T. articulata</i> par l'eau sub-critique	106
I.1. Conditions d'extraction	106
I.2. Influence de la durée d'extraction	106
I.3. Influence de la température d'extraction	107
I.4. Influence de la pression d'extraction	110
I.5. Influence de la taille des particules	112
I.6. Influence du taux de remplissage de la cellule d'extraction	113
II. Extraction des substances naturelles de feuilles de <i>T. articulata</i> par autre solvant en utilisant l'ASE200	114
Conclusion	115
Chapitre VI: Comparaison des procédés d'extraction	118
I. Comparaison des méthodes d'extraction de <i>T. articulata</i>	120
I.1. Conditions et rendement d'extraction	120
I.2. Composition chimique	122
I.3. Dosage des composés phénoliques	126
I.4. Propriétés antioxydants	128
II. Applications à d'autres plantes	132
II.1. Cyprès de sempervirens	132
II.1.1. <i>Le rendement d'extraction</i>	132
II.1.2. <i>Composition chimique</i>	133
II.1.3. <i>Teneur en composés phénoliques et activité antioxydante</i>	134
II.2. Eucalyptus Cinérea et Eucalyptus Camaldulensis	135
II.2.1. <i>Rendement global d'extraction</i>	135
II.2.2. <i>Composition chimique</i>	136
II.2.3. <i>Détermination de la teneur en composés phénoliques</i>	139
II.2.4. <i>Activité antioxydante des fractions volatiles HD et CO₂-SC</i>	140
II.3. Callitris glaucophylla	141
II.3.1. <i>Rendement global d'extraction</i>	141
II.3.2. <i>Composition chimique</i>	142
II.3.3. <i>Teneurs en composés phénoliques et activité antioxydant</i>	143
Conclusion	143
Conclusion générale	147
Abréviations	149
Références bibliographiques	151
Résumé	171
Abstract	172
Liste des Figures	173
Liste des Tableaux	176
Annexes	177

Remerciements

Cette thèse s'est effectuée dans le cadre d'une cotutelle entre l'Institut National Polytechnique (INP) de Toulouse-France et l'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (ENIG) de l'Université de Gabès-Tunisie.

Elle s'est déroulée au Laboratoire Génie Chimique (LGC, UMR CNRS 5503, Toulouse), au Laboratoire des IMRCP (UMR CNRS-UPS 5623) situé à la Faculté de Pharmacie de Toulouse de l'Université Paul Sabatier et au Laboratoire de Génie Chimique-Procédés à l'ENIG-Tunisie.

Je voudrais en premier lieu remercier les rapporteurs de ce travail et de manière générale l'ensemble des membres du jury.

Je remercie Madame Pascale SUBRA, Directeur de recherche CNRS, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury.

Je remercie vivement Monsieur Féthi ZAGROUBA, Professeur à l'Université de Carthage en Tunisie et Madame Maryline ALBERT-VIAN, Maître de Conférences HDR à l'Université d'Avignon d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Leurs remarques et conseils, tous très constructifs, m'ont beaucoup aidée.

Je suis très reconnaissante à Madame Marie-Josèphe GALMIER, Maître de Conférences, HDR à Université d'Auvergne d'avoir participé à mon jury de thèse. Je remercie Monsieur Chaker CHTARA, Responsable de la recherche scientifique 'Groupe Chimique Tunisien', pour ses qualités humaines et pour son aide pour le financement de cette thèse.

Nombreuses sont les personnes que je souhaite remercier pour m'avoir aidée et soutenue durant ces trois ans.

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur **Mehrez ROMDHANE**, Professeur à l'ENIG Tunisie, qui a été mon enseignant durant trois années de cycle ingénieur en Génie Chimique-Procédés et mon directeur durant ma préparation de mon projet de fin des études, mon mastère et mes trois années de thèse. J'ai beaucoup apprécié ses qualités d'enseignant et d'encadrement. J'aimerais lui adresser mes plus vifs remerciements pour son dynamisme, son soutien, ses conseils et sa confiance qui m'ont permis de mener à bien cette thèse. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance pour ces années de travail sous sa direction.*

*Je remercie également Monsieur **Jean-Stéphane CONDORET**, Professeur à l'ENSIACET-INP Toulouse France, pour m'avoir toujours soutenue et encouragée tout au long de ce travail, pour toutes ses suggestions, son soutien et sa disponibilité tout au long de cette thèse. Je le remercie aussi pour son organisation qui m'a évitée le maximum de soucis administratifs. Cette thèse n'aurait jamais été ce qu'elle est sans lui. Je souhaite lui transmettre l'expression de ma reconnaissance et ma plus profonde gratitude.*

*Je remercie sincèrement Madame **Séverine CAMY**, Maitre de conférences à l'ENSIACET-INP Toulouse France, ma co-directrice à l'INP Toulouse, pour ses conseils et pour sa bonne humeur de tous les jours. Le côté humain qu'elle a apporté à ces années de thèse à travers sa gentillesse, sa disponibilité et sa rigueur dans le travail est un des éléments majeurs du bon déroulement de cette thèse.*

*Je tiens également à remercier Monsieur **Jalloul BOUAJILA**, Maitre de conférences à l'Université Paul Sabatier, Toulouse France, pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein du laboratoire, pour m'avoir encouragée et pour n'avoir jamais fermé la porte de son bureau et ainsi permis de discuter à de nombreuses reprises de ce travail. Ses compétences sont inestimables pour moi. Merci pour leur efficacité et leur motivation à réaliser un travail de qualité. Merci pour leurs qualités humaines, leur bonne humeur et leur soutien tout au long de la thèse.*

Je remercie Madame Selvie d'avoir réalisé les analyses par GC-MS.

J'adresse mes remerciements également à tous les membres de LGC ainsi les techniciens pour leurs qualités humaines.

Bien sûr, je ne peux terminer sans remercier mes proches de tout cœur et notamment mes parents pour leur soutien inconditionnel dans toutes les étapes de ma vie, merci de m'avoir toujours laissée faire mes choix et les assumer.

Merci à mes frères et sœurs et spécialement mon frère Lotfi pour leur soutien.

Merci à mes amies qui m'ont entourée lors de ce travail.

Enfin, mes plus vifs remerciements à mon futur mari pour sa patience ; je lui dédie cette thèse.

Introduction Générale

Ces dernières années, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) ont suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine thérapeutique. En effet, les substances naturelles extraites de ces plantes ont permis de grandes avancées en raison de leur valeur ajoutée dans la préparation de nombreux produits en particulier dans les domaines nutraceutiques, pharmaceutique, la cosmétique et les parfums. Les enjeux politiques, économiques, sociétaux, et environnementaux incitent également les industriels à innover sur le plan technologique et à améliorer l'efficacité énergétique et environnementale de leurs procédés, grâce au développement d'une chimie dite verte en remplacement des procédés chimiques traditionnels.

Les techniques traditionnelles d'extraction de ces substances naturelles à partir des plantes nécessitent d'importantes adaptations afin de réduire les risques pour la santé, la sécurité et l'environnement. En conséquence, la recherche de produits et de procédés alternatifs plus respectueux de l'homme et de son environnement occupent une place primordiale en recherche et développement, y compris en ce qui concerne des opérations unitaires du génie chimique avec les technologies séparatives associées telle que l'extraction solide-liquide.

Pour répondre aux besoins des différentes industries qui doivent satisfaire à la fois les demandes économiques changeantes et le respect de l'environnement tout en restant mondialement compétitives, des approches scientifiques modernes du génie chimique et des procédés ont vu le jour. Il s'agit par exemple de «l'approche verte du génie des procédés» et de «l'éco-extraction» et ses principes [1,2] qui sont fortement mobilisées sur l'intensification des procédés et sur le couple produits/procédés verts. Le but est de produire beaucoup plus et mieux en consommant beaucoup moins, avec des technologies innovantes conduisant à une meilleure utilisation des matières premières et de l'énergie.

Ce présent travail s'inscrit dans ce cadre. Notre objectif principal consiste en l'application des nouvelles technologies dites «vertes», telle que l'utilisation de dioxyde de carbone à l'état supercritique et d'eau sub-critique pour l'extraction des produits et des antioxydants naturels contenus dans des PAM tunisiennes. Ces procédés permettent d'aboutir à un produit de haute qualité (absence de résidus de solvant organique et de dégradation thermique). De plus, les durées usuelles d'extraction en utilisant ces techniques sont très

intéressantes: quelques dizaines de minutes permettent d'avoir des rendements globaux d'extraction importants, ce qui conduit à des coûts de fonctionnement attractifs.

Pour la présente étude, nous proposons un plan en six chapitres:

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique qui donnera un aperçu sur les différentes notions abordées dans ce travail: les huiles essentielles (HEs) et les techniques d'extraction conventionnelles; ensuite, nous détaillerons les nouvelles technologies utilisées.

Dans le second chapitre, nous détaillerons le matériel et les méthodes employés et nous décrirons les moyens d'analyses et de caractérisation des extraits obtenus.

Le troisième chapitre présentera la mise en œuvre des techniques traditionnelles, en particulier l'hydrodistillation (HD), l'optimisation des paramètres d'extraction et leur modélisation. La plante d'étude sera *Tetraclinis articulata*.

Le quatrième chapitre sera consacré à l'extraction par CO₂ supercritique, l'optimisation de l'application de cette nouvelle technique à l'extraction d'HEs à partir des feuilles de *T. articulata* et aussi à la modélisation par le modèle de Reis Vasco. Les résultats du modèle seront comparés à ceux obtenus expérimentalement.

Le cinquième chapitre apportera l'étude d'une nouvelle technologie proposée dans ce travail, l'extraction par l'eau sub-critique. Ainsi, ce procédé sera utilisé et optimisé pour l'extraction des substances naturelles de *T. articulata*.

Et enfin, le sixième chapitre fera l'objet de l'analyse des résultats obtenus par l'extraction des HEs à partir de quatre autres matières premières : *Eucalyptus cinérea*, *Eucalyptus Camaldulensis*, *Cyprés sempervirens* et *Callitris glaucophylla*. Pour chaque matière première, les méthodes d'extraction au CO₂-SC et l'HD ont été appliquées. Ensuite, nous présenterons les résultats relatifs à l'identification des compositions chimiques des HEs, leurs dosages des composés phénoliques et les activités biologiques.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Ce chapitre présente une synthèse bibliographique permettant de définir les différents termes abordés dans ce sujet. Ce chapitre se compose de trois parties.

Dans une première partie, nous définirons les substances naturelles et leurs propriétés. Nous présenterons un aperçu des connaissances concernant les modes d'extraction conventionnelle et innovante. Ensuite, les différentes techniques d'analyse utilisées pour caractériser les extraits seront également résumées. Enfin, les activités biologiques, l'utilisation en médecine traditionnelle et la valeur ajoutée destinés à plusieurs secteurs industriels (pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire) ainsi que les potentiels thérapeutiques, économiques et écologiques de l'HE seront abordés.

Dans une deuxième partie, nous présenterons les fluides supercritiques, leurs propriétés et leur utilisation pour l'extraction des substances naturelles.

Dans une troisième partie, nous définirons les propriétés de l'eau sub-critique, l'appareil ASE et l'utilisation de l'eau sub-critique pour l'extraction des substances naturelles.

Partie I : Extraction des plantes aromatiques et médicinales

I. Les PAM et les huiles essentielles

I.1. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant.

L'extraction est une étape nécessaire et présente dans de nombreux procédés de fabrication dans les différents domaines industriels relevant de la pharmacie, de la cosmétique, de la parfumerie et de l'agroalimentaire [2].

Au cours de la dernière décennie, la préoccupation pour la qualité et la sécurité des aliments et des médicaments, occupent une grande place avec les règlements pour le niveau de toxicité, et la volonté d'accroître la préférence pour les produits «naturels» par opposition aux substances synthétiques. En outre, la croyance populaire qui présente ce qui est «naturel» comme bon, fournit une incitation positive au développement de l'industrie des produits naturels, en particulier dans les aliments, les aromatisants, les produits de parfumerie, et le secteur pharmaceutique. Il ne fait aucun doute que la sécurité des producteurs et des consommateurs est désormais devenue une exigence majeure de tout produit ou procédé. En conséquence, les règlements sur l'utilisation de solvants dangereux, cancérigènes ou toxiques ainsi que les coûts élevés de l'énergie pour la régénération du solvant ont réduit la croissance des industries conventionnelles d'extraction de produits naturels.

I.2. Définitions des substances naturelles

Les PAM contiennent des molécules à haute valeur ajoutée, parmi lesquelles on trouve des composés ayant une activité olfactive. Ils représentent ce que l'on appelle HE et sont très convoités par les industries pharmaceutiques et cosmétiques [3,4].

Selon la norme française NF T 75-006 (AFNOR, 1980) : «l'HE est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation «sèche». L'HE est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques» [5].

Connue aussi sous le nom d'essence, une HE est un ensemble de molécules volatiles extraites de PAM par distillation sèche, par expression, par incision de la plante [6]. Il s'agit d'un

ensemble de molécules aromatiques d'origine naturelles qui sont utilisées par l'aromathérapie pour leurs effets bénéfiques sur la santé. L'aromathérapie est l'art de préserver la santé avec les HEs. Elle fait recours à une méthodologie rigoureuse qui s'inspire de données scientifiques solides confirmées tant par l'expérimentation clinique que par les recherches en laboratoire [7].

En Europe, l'utilisation des HE en massage a été mise en place par la biochimiste française Marguerite Maury dans les années 50. Ceci fera apparaître de nouvelles exigences relatives aux choix des végétaux, aux modalités de cueillette et aux techniques d'extraction et de conservation [8].

Ainsi, l'aromathérapie de nos jours est devenue l'une des thérapies complémentaires la plus puissante. En effet, en plus de sa forte valeur ajoutée en matière de santé, elle a pu apporter une action bénéfique des soins naturels pour la beauté et l'esthétique.

I.3. Structure des plantes et localisation des HEs dans la plante

Les HEs sont présentes en quantité appréciable chez environ 2 000 espèces de PAM, réparties en 60 familles. Elles se localisent dans toutes les parties vivantes (fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines) de la plante et avec une quantité plus importante au niveau des parties supérieures (fleurs et feuilles). Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule [6].

L'accumulation des HEs, partie des métabolites secondaires, se fait généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante telle que les poils sécréteurs pour la famille des Lamiacées, les poches sécrétrices pour les Myrtacées et des canaux sécréteurs pour les Astéracées [9].

I.4. Composition chimique et propriétés physico-chimiques

Après l'extraction on obtient des substances à forte odeur aromatique, de densité inférieure à celle de l'eau (à l'exception des huiles de cannelle, de girofle et de saffras) [6]. En effet, elles sont généralement sous forme liquide à température ambiante, très volatile, insoluble dans l'eau mais soluble dans les alcools et la plupart des solvants organiques jusqu'à un certain pourcentage bien défini. L'HE contient un nombre de molécules différentes dont la plupart sont poly-moléculaires, composées d'un grand nombre de composants (jusqu'à 500

molécules différentes dans l'HE de rose). A coté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), il existe des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces. Généralement, on classe ces composés en deux groupes : les hydrocarbures terpéniques et les composés oxygénés [6]. La structure des composés des HEs est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue (Figure I.1).

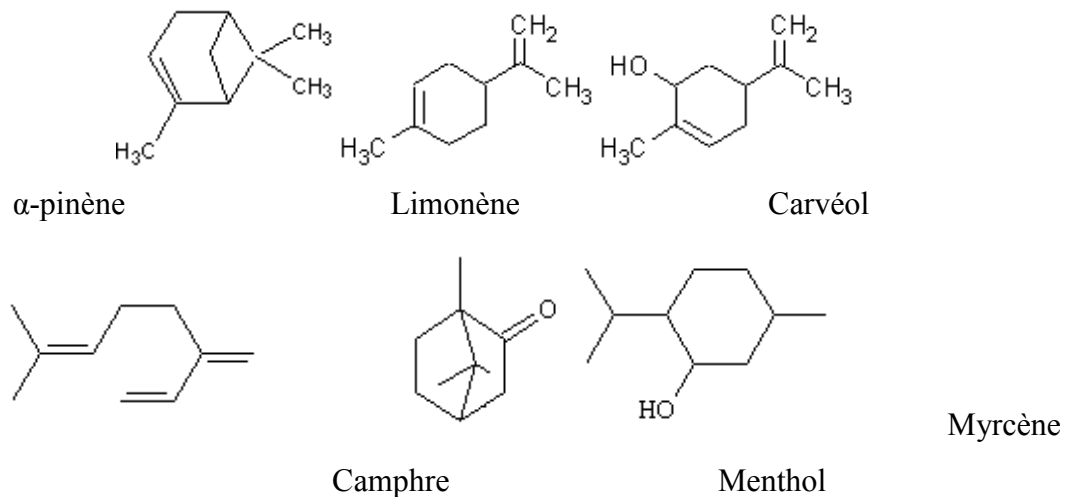


Figure I. 1 : Structure chimique de quelques composés terpéniques

I.4.1. Les composés terpéniques

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par l'agglomération de plusieurs isoprènes (Figure I.2 : Isoprène). Dans les PAM on trouve souvent une famille d'arôme constituée d'une grande partie de ces terpènes. Ces terpènes possèdent généralement des propriétés biologiques importantes telles que des propriétés fongicides ou insecticides.

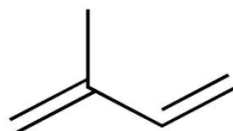


Figure I. 2 : Isoprène

Les terpènes peuvent être classés selon leur nombre de motifs isoprènes ainsi que leurs arrangements.

Les constituants les plus simples de la série des terpènes sont les monoterpènes, comportent deux unités isoprène (C_5H_8), dont les principaux se trouvent dans l'HEs (90%) [10]. Ils peuvent être bicycliques, monocycliques ou acycliques. Les dérivés hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ qui comportent trois unités isoprènes sont appelés les sesquiterpènes. Ils se trouvent sous deux formes, hydrocarbures et oxygénés tels que les aldéhydes et les acides, présents dans la nature. Ainsi, ces composés constituent la classe la plus diversifiée des terpènes et ils se trouvent dans de nombreuses catégories structurales, polycycliques, tricycliques, bicycliques, monocycliques, acycliques [10].

I.4.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés parmi les produits du métabolisme secondaire des PAM. Ils correspondent à un vaste ensemble de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique (Figure I-3 : Phénol) [10] portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ces composés, d'intérêt biologique, sont principalement présents dans les végétaux (fruits, légumes, céréales...) et dans les produits qui en dérivent (thé, jus de fruits, vin, bière, ...).

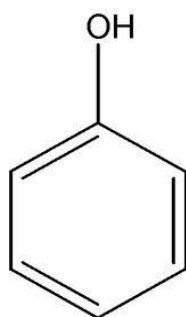


Figure I. 3 : Phénol

Une des particularités des composés phénoliques réside dans leur importante diversité. En effet, on trouve aujourd'hui plus de 8000 composés phénoliques, dont 5000 sont des flavonoïdes [11].

Les composés phénoliques sont actuellement l'objet d'une littérature abondante. En effet, leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine seraient nombreuses : effets protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires, effets anti-inflammatoires, ou encore antiviraux pour n'en citer que quelques-uns [12,13]. Par ailleurs ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et leurs propriétés antioxydantes [14].

I.4.3. Les antioxydants

L'antioxydant est une substance capable de neutraliser ou de réduire les dommages causés par l'oxygène ou les radicaux libres dans l'organisme. Dans les végétaux, les principaux antioxydants sont les vitamines C et E, les caroténoïdes et le sélénium [6]. Ces antioxydants sont définis aussi comme des agents redox qui réagissent avec les oxydants afin de stopper ou ralentir le processus d'oxydation, et ainsi ajust l'équilibre redox cellulaire. En plus de leur utilisation en thérapeutique, ils sont utilisés dans différentes industries telles que les industries agro-alimentaires. Ainsi, l'antioxydant constitue un additif alimentaire pouvant protéger les denrées alimentaires des altérations provoquées par l'oxydation par l'oxygène moléculaire, telles que le rancissement des matières grasses. Plusieurs types d'antioxydants existent tels que les antioxydants moléculaires, les antioxydants exogènes, les antioxydants phénoliques naturels dans les PAM [6].

I.5. Propriétés biologiques des HEs

Les HEs sont reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, elles agissent de manière remarquable dans la plupart des domaines de la santé et de la maladie. Ce sont des substances douées d'activités pharmacologiques beaucoup plus importantes que les plantes fraîches [6]. Elles possèdent de nombreuses activités biologiques [6,10]. En effet, elles sont réputées efficaces en phytothérapie contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne tel que les bactéries endocanaliaires [15] et contre les dermatophytes au niveau de la microflore vaginale [16]. De plus, elles sont connues par leurs propriétés cytotoxiques [17,18]. Par ailleurs, les HEs pourraient également être efficaces en tant qu'un additif alimentaire pour la protection contre les champignons phytopathogènes [18] et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires [19]. Les travaux de Zakarya et *al.* [20], en étudiant les variations qualitatives et quantitatives de 21 espèces, ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait.

L'utilisation des HEs et leurs composants dans l'industrie alimentaire a été l'un des principaux défis pour satisfaire aux exigences des consommateurs qui réclament plus de naturel et des produits peu transformés [21-24]. Selon ces propriétés, l'HE de PAM a été utilisée comme agents antimicrobiens naturels et antioxydants rapporté dans la viande, le poisson, les fruits, les légumes et les produits laitiers [21]. De nombreuses autres applications de l'HE dans

l'alimentation ont été rapportées, comme l'utilisation de l'origan et de la sauge dans la viande bovine et porcine [25], le thym et le romarin dans la mortadelle [26] et l'eucalyptus dans les légumes-feuilles [27].

I.6. Contrôle des HEs

Le développement du monde industriel, ainsi que les législations complexes et sévères exigés quant à la qualité et au respect de l'environnement, confrontent le chimiste à certains problèmes tels que la demande d'analyse et sa complexité. Par conséquent, la chromatographie en phase gazeuse (CG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CG est une technique bien adaptée à l'analyse des HEs, compte tenu de la volatilité des constituants. Elle permet de séparer les composés volatils d'un mélange complexe ainsi que l'analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit [6,28].

Il existe deux types de chromatographie gazeuse: la *chromatographie gaz-solide* (CGS) et la *chromatographie gaz-liquide* (CGL).

Cette méthode ne peut suffire à une bonne identification, sans l'apport du couplage entre la CG et une technique d'identification spectroscopique, en général la spectrométrie de masse (CG-SM). La combinaison en ligne de la chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse ou CG-SM permet la détermination de la nature des constituants des mélanges [29,30].

II. Facteurs affectant la composition et le rendement des HEs

L'intérêt pour l'utilisation des HEs dans différentes industries et en particulier dans l'industrie alimentaire [31] a conduit au développement des méthodes de caractérisation permettant d'accéder à des informations telle que la détermination de leurs compositions chimiques [8,9], de leurs propriétés biologiques [10], de leur cytotoxicité [11,12] ou de leur activité antioxydante [13,14]. De nombreux facteurs peuvent influencer sur la composition chimique de l'HE. Un ensemble de paramètres a été étudié dont certains avec Bowes *et al.* [32], et autres, comme l'origine géographique [33], la saison de récolte [34,35] et la méthode d'extraction [36,37].

III. Principaux marchés des HEs

Les principaux marchés des HEs sont les Etats-Unis, l'Europe de l'Ouest, le Japon et le Canada. Les Etats-Unis sont le plus grand marché domestique des HEs au monde [6]. Ils sont également le grand producteur d'HEs si l'on considère les huiles de pin. Le marché des HEs est en croissance. La majeure partie n'est pas produite localement à cause des contraintes de coût, de climat et des conditions géographiques de certaines régions. Le marché est très varié et on y trouve un grand nombre de manufacturiers ainsi que beaucoup de courtiers. En Europe Occidentale, la France est traditionnellement le centre de commerce du parfum. Marseille, Bordeaux et Paris sont restés longtemps le centre du marché des HEs. Londres, Hambourg et Rotterdam sont des centres de collection et de distribution ainsi que Brème, Amsterdam et Anvers.

Malgré sa faible teneur, l'intérêt économique et industriel de cette fraction des composés aromatiques dans les PAM a donné naissance à des techniques d'extraction différentes par le type des solvants, par la consommation d'énergie nécessaire ou par la sélectivité. Ce sont les techniques qui seront présentées par la suite.

IV. Techniques d'extraction des substances naturelles

Les HEs sont obtenues de diverses manières. Le choix de la technique dépend de la localisation histologique de l'huile dans le végétal et de son utilisation [6].

IV.1. Méthodes traditionnelles d'extraction des HEs

Ces techniques d'extraction reposent toutes sur le même principe, basé sur l'entraînement des molécules volatiles de la plante par la vapeur d'eau. Le degré de contact entre la plante et l'eau est le seul paramètre qui diffère.

IV.1.1. Hydrodistillation

Dans le cas de l'HD, la plante se trouve dans un réacteur où elle est en contact direct avec l'eau bouillante. Selon la densité ou la quantité de la plante utilisée, elle peut flotter ou être complètement immergée dans l'eau. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. Le chauffage permet l'éclatement et la libération des molécules volatiles contenues dans la

matière végétale. La vitesse de vaporisation des composés volatiles des PAM par l'hydodistillation est connue par la variation de leur concentration en fonction de la résistance à la diffusion de l'HE dans les tissus cellulaires et également selon la solubilité des molécules volatiles dans l'eau [5,9].

IV.1.2. Entraînement à la vapeur

C'est le moyen le plus répandu pour extraire les molécules volatiles des PAM. Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, mais la vapeur d'eau produite par une chaudière est injectée et traverse la matière végétale de bas en haut, éclate les cellules et entraîne les molécules volatiles.

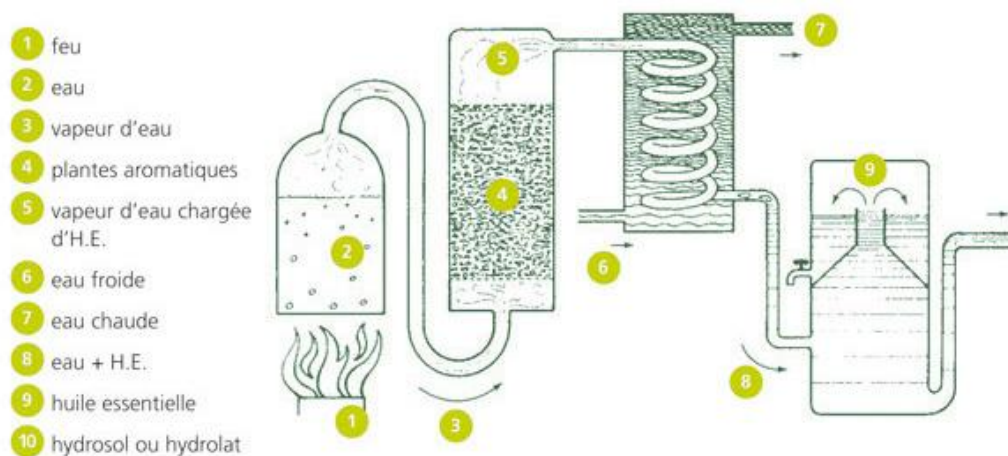


Figure I. 4 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante

(http://www.pranarom.com/aromatherapie_scientifique/pranarom_huile_essentielle).

En traversant un tube réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composés volatils se condense en un mélange hétérogène composé d'HE et d'hydrolat [6,10]. On peut également récupérer la phase aqueuse, comportant une faible proportion de composés aromatiques, qui porte alors le nom d'eau florale (Figure I.4).

IV.1.3. Expression à froid

C'est une technique "physique" simple où les écorces des agrumes (citron, orange,...) sont pressées à froid pour extraire leurs HEs en utilisant des rouleaux ou des éponges. Aucune source de chaleur n'est utilisée, laissant ainsi à l'huile une odeur très proche de l'original. Le

principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits renfermant l'HE. L'huile libérée est ensuite recueillie par un courant d'eau [6,10].

IV.2. Extraction des extraits aromatiques par solvant organique sur appareillage Soxhlet

L'extraction par solvant organique à chaud est actuellement largement utilisée. Le principe de cette méthode consiste à faire tremper les plantes dans un solvant organique volatil à chaud, soit pour obtenir des produits que l'on ne peut extraire par un autre procédé, soit en vue de rendements plus élevés [6]. Dans l'appareillage Soxhlet un système de régénération interne du solvant permet de mettre en contact en permanence le végétal avec du solvant pur. Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité, stabilité, inertie chimique et température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale [10].

IV.3. Méthodes innovantes d'extraction des HE

IV.3.1. Hydrodistillation assistée par ultrasons

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement de la plante «pré» ou «post» opératoire. En effet, la structure des parois des plantes et les tissus cellulaires se désorganisent, sous l'effet des ondes ultrasonores et les micros cavitations générées par les ultrasons [38]. Ainsi, ces changements favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également influencer sur la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des HEs. Les principaux avantages de ce procédé sont l'accélération de la cinétique d'extraction et l'amélioration du rendement.

IV.3.2. Extraction assistée par micro-ondes

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux HEs et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée [6]. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans

les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile (Figure I.5).

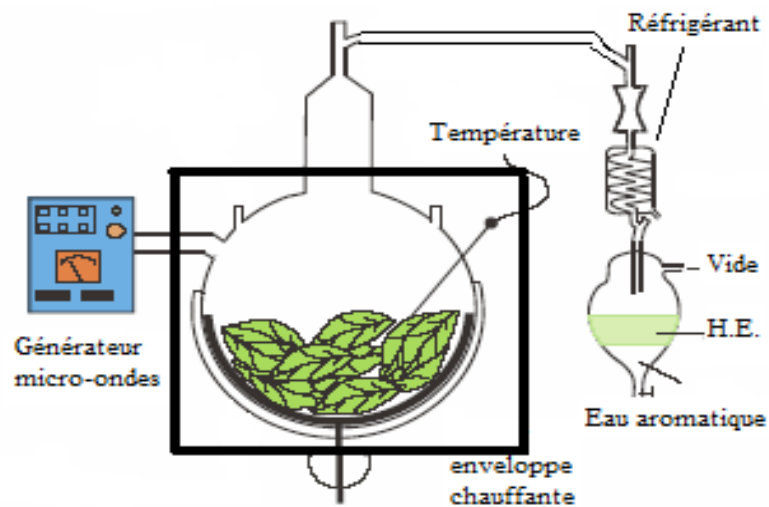


Figure I. 5: Hydrodistillation assistée par micro-ondes. [39]

Les auteurs de ce procédé lui attribuent certains avantages tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite [40].

IV.3.3. Autres méthodes d'extraction

Plusieurs autres nouvelles technologies d'extraction des huiles volatiles à partir des PAM sont développées tels que les procédés assistés par induction thermomagnétique, l'extraction par fluide supercritique et par l'eau sub-critique, ces techniques qui ont été utilisés lors de cette étude seront développées dans la partie II et la partie III de cette étude bibliographiques etc ...

Partie II : Extraction par fluide supercritique

I. Les fluides supercritiques

I.1. Généralité

Le diagramme de phase pression-température (P,T) d'un corps pur présente les différents états de la matière (solide, liquide et gazeux) en fonction de la pression et de la température (Figure I-6). Les domaines de ces trois états sont délimités par les courbes d'équilibre (solide gazeux, solide-liquide et liquide-gazeux). L'état supercritique a été découvert par le Baron Cagniard de la Tour en 1822. Il constata la disparition de la frontière gaz-liquide de certaines substances chauffées en milieu fermé. En effet, tout corps pur possède un point critique correspondant à une pression et une température données. Un fluide est dit à l'état supercritique lorsqu'il est chauffé au-delà de sa température critique et lorsqu'il est comprimé au-dessus de sa pression critique.

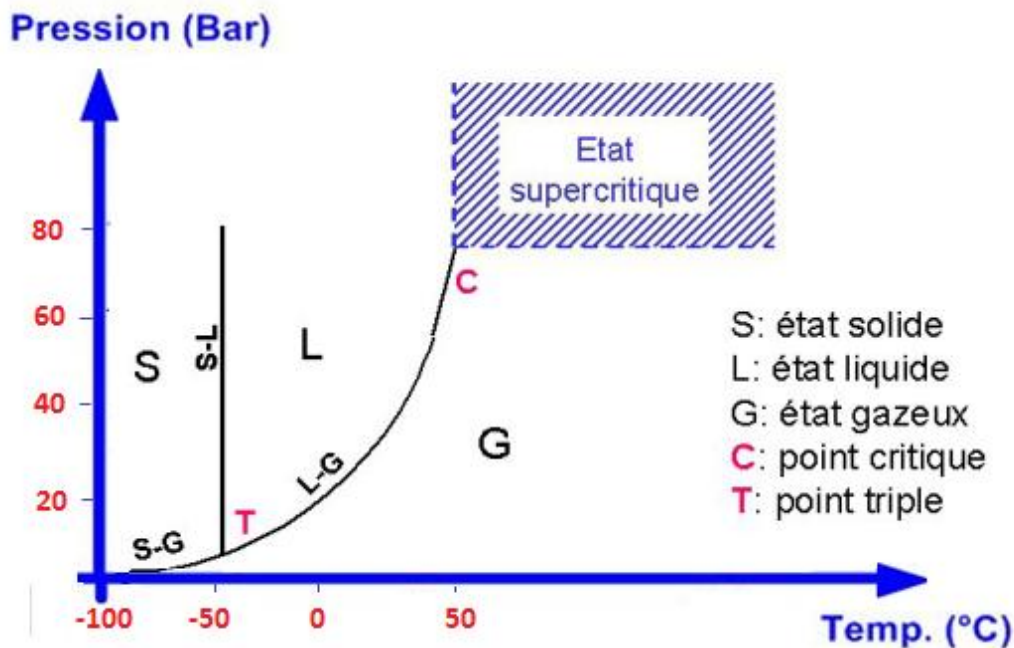


Figure I. 6 : Diagramme de phases P-T du CO₂

Le comportement d'un fluide supercritique est intermédiaire entre celui de l'état liquide et l'état gazeux. En particulier, il possède une masse volumique élevée comme celle des liquides, un coefficient de diffusivité intermédiaire entre celui des liquides et des gaz, et une viscosité faible comme celle des gaz. Cet état supercritique a été appliqué au CO₂ à la fin des

années 1970 où il a été observé expérimentalement pour la première fois exposé à 31,1°C et 74 bar. Dans cet état, ce composé possède de remarquables propriétés de solubilisation des substances organiques. Ainsi, contrairement à la majorité des solvants organiques il n'est pas toxique. La technologie utilisant les fluides supercritiques suscite actuellement beaucoup d'intérêt dans différents domaines : industriel, pharmaceutique et agroalimentaire.

Les coordonnées critiques pour certains fluides présentés dans le Tableau I.1. Comme le montre ce tableau, les paramètres critiques (pression, température et densité) varient fortement suivant le choix du fluide supercritique.

Cependant, les fluides supercritiques les plus utilisés sont le CO₂ et l'eau. Toutefois cette dernière pose certains problèmes. En effet, ses coordonnées critiques réduisent son accessibilité expérimentale et son caractère corrosif exige un appareillage adapté assez coûteux [41,42].

Tableau I. 1: Coordonnées critiques de certains fluides [42].

Composés	Température (T_c °C)	Pression (P_c bar)	Masse volumique (ρ_c g/ cm³)
CO ₂	31,1	73,8	0,468
Ethane	32,2	48,8	0,203
Ethylène	9,3	50,4	0,2
Propane	96,7	42,5	0,220
Propylène	91,9	46,2	0,23
Toluène	318,6	41,147	0,29
oxyde nitreux	36,5	71,0	0,457
Eau	374,2	220,5	0,272

I.2. Propriétés du dioxyde de carbone supercritique

Le dioxyde de carbone supercritique présente des propriétés physico chimiques intermédiaires entre celles de la phase liquide et celles de la phase gazeuse. Les propriétés du CO₂ dans les différents états sont rassemblées dans le Tableau I.2.

Généralement le CO₂ supercritique permet de solubiliser des composés apolaires et de faibles masses moléculaires. Ensuite, la faible viscosité dynamique et la forte masse volumique résultent en une viscosité cinématique faible, qui favorise les phénomènes de convection naturelle massique.

Ainsi, la viscosité, la masse volumique et un pouvoir de diffusivité très élevé par rapport au liquide, facilitent la pénétration du CO₂ supercritique dans des milieux poreux.

Tableau I. 2 : Propriétés physiques du CO₂ à l'état gaz, supercritique et liquide [43].

Propriétés	Masse volumique, ρ (kg/m ³)	Diffusivité, D (m ² /s)	Viscosité, η (Pa.s)
Gaz (30°C et 1 atm)	0,6 à 2	(1 à 4) 10 ⁻⁵	(1 à 3) 10 ⁻⁵
CO ₂ supercritique (Tc et Pc)	200 à 500	0,7 10 ⁻⁷	(1 à 3) 10 ⁻⁵
Liquide (30°C et 1 atm)	600 à 1600	(0,2 à 2) 10 ⁻⁹	(0,2 à 3) 10 ⁻³

On peut également modifier ses propriétés en changeant les paramètres opératoires tels que la température et la pression. Ce qui montre que son pouvoir solvant est «à géométrie variable». En effet, en changeant la pression, appliquée sur le fluide, la masse volumique du CO₂ supercritique peut varier entre celle d'un gaz et celle du liquide. La variation de la masse volumique, permet d'améliorer la sélectivité d'extraction des composés aromatiques.

I.3. Propriétés de transport

I.3.1. Viscosité

La viscosité des fluides supercritiques est supérieure à celle des gaz, plus faible que celle des liquides et très variable au voisinage du point critique (Tableau I.2).

Une faible valeur de viscosité permet de favoriser le transfert de matière grâce à une meilleure pénétration dans le solide ce qui permet de réduire l'apport énergétique pour déplacer le fluide [44]. La Figure I.7 montre l'évolution de la viscosité en fonction des paramètres P et T. Cette Figure montre qu'à température constante, une augmentation de la masse volumique avec la pression entraîne un accroissement de la viscosité. Par contre, à pression constante, une augmentation de la température décroît la masse volumique du milieu, ce qui provoque une diminution de la viscosité.

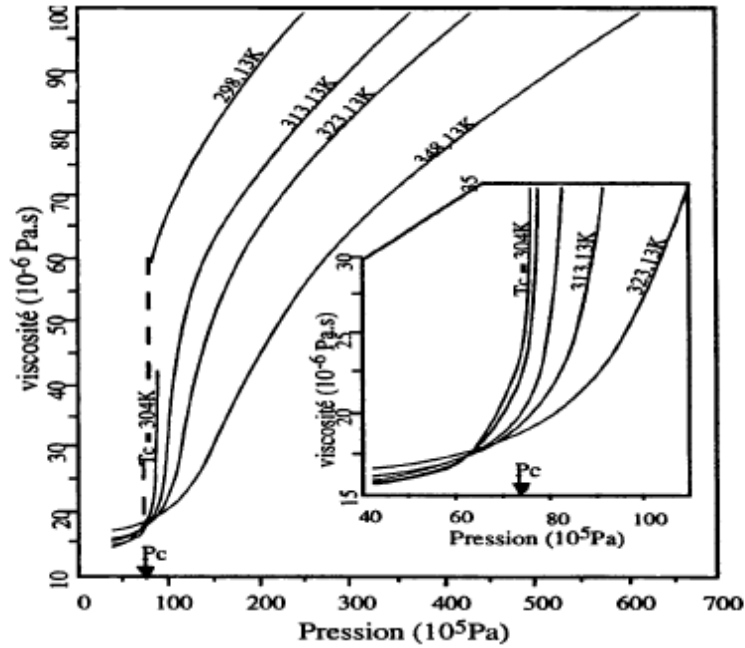


Figure I. 7 : Evolution de la viscosité du CO₂ en fonction de la pression et de la température [45].

I.3.2. Diffusivité

Le transfert de matière dépend également d'une autre propriété : la diffusivité. Elle augmente avec la température mais diminue pour une élévation de pression car cette élévation entraîne une augmentation de la masse volumique, ce qui limite le transfert de matière. En raison de leur faible viscosité et de leur diffusivité plus élevée que celles des liquides, les fluides supercritiques présentent un intérêt certain pour des applications telles que l'extraction, le traitement des solides, les synthèses organiques et la chromatographie.

Une bonne approximation du coefficient de diffusion est donnée par la corrélation (Eq.I.1) développée par Wilke et Chang [46]:

$$D = 7.410^{-5} \frac{TM^{0.5}}{\eta V^{0.6}} \quad \text{Eq. I.1}$$

Où D est la diffusivité du soluté dans le solvant (m²/s), M est la masse molaire du fluide (g/mol), η est la viscosité du solvant pur (kg/m.s) et v est le volume molaire du soluté (cm³/mol).

I.3.3. Solubilité dans le CO₂ supercritique

Le pouvoir solvant du CO₂ supercritique dépend exponentiellement de sa masse volumique [47]. Dans le domaine supercritique, la densité des molécules est voisine de celle du liquide, favorisant ainsi les interactions intermoléculaires. Cela confère à cet état un certain pouvoir solvant vis-à-vis de solutés normalement à l'état liquide ou solide dans ces conditions de pression et de température.

La Figure I.8 illustre le changement de phase du CO₂ à partir des phases gaz et liquide distincte vers une phase homogène supercritique.

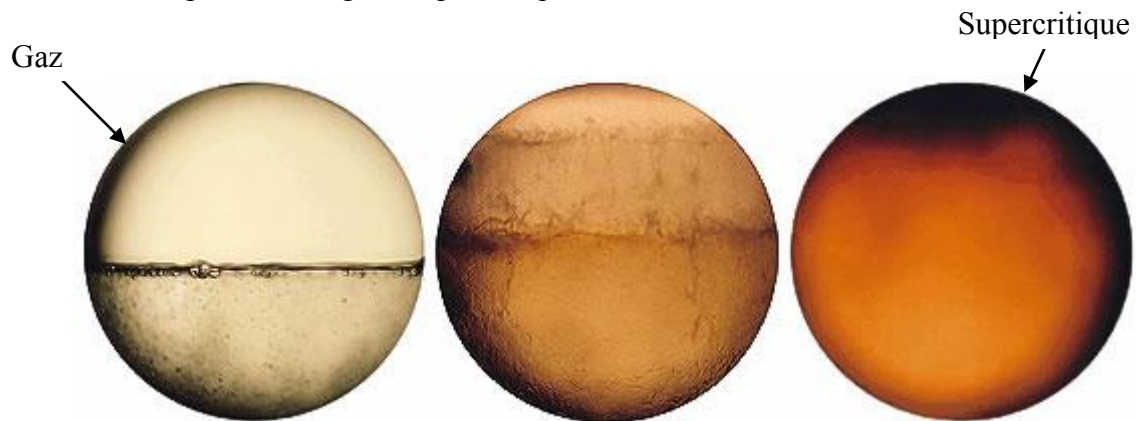
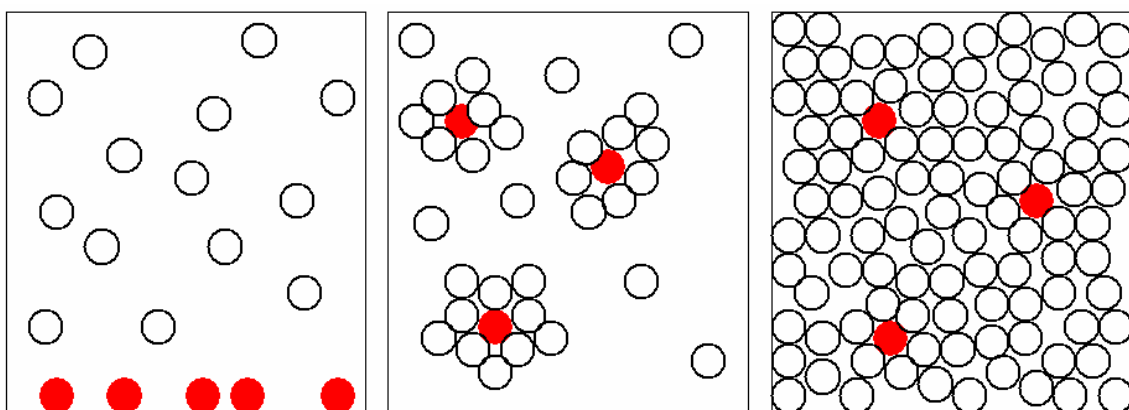


Figure I. 8 : Changement de phase de dioxyde de carbone supercritique [48]

La Figure I.9 présente une vision simplifiée de la situation d'un soluté non volatil présent dans les différents états d'un solvant.



a- Deux phases, solide-gaz **b-** Une phase, fluide supercritique **c-** Une phase, liquide

Figure I. 9 : Phénomène d'agrégation dans un fluide supercritique. ○ Molécule de solvant, ● Molécule de soluté [49].

En effet, dans le cas d'un soluté solide soumis à la pression d'un gaz, les interactions sont très faibles et aucune solvation significative ne se produit (Figure I.9a). En phase liquide, la concentration de la solution est telle que la solvation est grande et une seule phase est observée (Figure I.9c). On constate que la densité pour un fluide supercritique est modérée, plus faible que dans le cas d'une phase liquide mais très supérieure à celle observée en phase gaz. Les agrégats formés autour des molécules de solutés montrent que la densité locale est élevée avec une solvation relative (Figure I.9b). Pour de faibles concentrations en soluté, une seule phase serait observée [49].

I.3.4. Masse volumique

Dans le domaine d'extraction de matière végétale par un fluide supercritique, la connaissance de la solubilité du soluté dans le milieu est une donnée importante et nécessaire pour le développement d'un tel procédé. Dans le fluide supercritique, le profil de solubilité du soluté évolue avec la température et la pression. Ainsi, la solubilité peut être reliée directement à ces facteurs en termes de paramètres tels que la fugacité et les paramètres de solubilité et de masse volumique du CO₂. Cela a été démontré par l'approche (Eq.I.2) qui corréle la solubilité à la masse volumique du CO₂ développée par Chrastil [47].

$$\ln S_s = k' \ln(\rho_{sc_{CO_2}}) + a' \quad \text{Eq.I.2}$$

Où S_s est la solubilité du soluté (g/L) pour une température constante, $\rho_{sc_{CO_2}}$ est la masse volumique du CO₂ supercritique (g/L) et k' et a' sont des paramètres semi-empiriques.

I.3.5. Polarité du CO₂ « géométrie variable »

Le CO₂ est un composé non polaire et par conséquent la solubilité de composés non polaires sera plus importante que celle de composés polaires. Ainsi, dans le but de remédier à cet inconvénient et d'améliorer son pouvoir solvant pour l'extraction, on peut modifier sa masse volumique ou sa polarité par l'ajout de co-solvant en faibles quantités (5 à 15%) [42,49]. La polarité du CO₂ supercritique est estimée par le paramètre de solubilité de Hildebrand. Ce paramètre est déterminé à partir de l'équation (Eq.I.3) de Giddings [50]:

$$\delta_H = \frac{1,25 \rho_{FSC} \sqrt{P_c}}{\rho_{liq}} \quad \text{Eq. I.3}$$

Dans cette équation, P_c est la pression critique du fluide, ρ_{FSC} et ρ_{liq} les masses volumiques du fluide à l'état supercritique et à l'état liquide, respectivement.

I.3.6. Ajout de co-solvant

Lors de l'extraction au CO_2 supercritique, l'augmentation de la polarité du solvant peut être réalisée en ajoutant 5 à 15% de co-solvant polaire [51-54]. Généralement, les co-solvants les plus utilisés sont le méthanol [54,55], l'éthanol [56,57], l'eau ou des huiles végétales [57]. Ces trois derniers sont non-toxiques et donc plus intéressants.

II. Avantages et inconvénients de l'utilisation du CO_2 supercritique

Le CO_2 supercritique possède plusieurs avantages par rapport aux autres fluides supercritiques industriels. On peut citer le fait qu'il possède une faible température critique ($T_c = 31,1^\circ\text{C}$), qu'il soit non inflammable et non toxique, qu'il n'y a pas de solvant résiduel à la fin du traitement (évacuation sous pression atmosphérique), qu'il est chimiquement inerte, qu'il n'y a pas de problèmes d'oxydation du produit et qu'il pose moins de problèmes de sécurité. De plus, il possède des propriétés de transport très favorables, meilleurs que celles des solvants liquides usuels.

Les principaux avantages de l'utilisation du CO_2 supercritique dans les différents domaines sont [58]:

- Il est relativement inerte vis-à-vis des composés réactifs, ce qui est un avantage d'un point de vue environnemental et des procédés, dans la mesure où les réactions secondaires avec le CO_2 sont relativement rares.
- Il ne peut pas être oxydé. Cette impossibilité d'oxydation explique son ininflammabilité.
- Il ne crée pas de contamination dans les phases liquides qui sont en contact avec lui.

- Au-dessus de 31°C, les gaz dont la température critique est basse sont miscibles en toutes proportions avec le CO₂. C'est un avantage important pour la mise en œuvre de procédés chimiques où intervient un contact gaz-liquide.
- Il présente une faible viscosité. Sa tension de surface est bien plus basse que celle des solvants organiques et la diffusivité des solutés y est bien plus élevée.

Néanmoins, le CO₂ supercritique possède une très faible polarité comme inconvénient. On est donc souvent amené à travailler sous des pressions très élevées ou alors à accroître le pouvoir solvant par l'ajout d'un co-solvant polaire tel que l'éthanol et le coût de l'installation.

III. Cinétique d'extraction solide-fluide supercritique

La cinétique d'extraction dépend des conditions opératoires (pression, température, débit du fluide), de la nature et de la granulométrie du produit à traiter. La Figure I.10 présente la forme générale de la cinétique d'extraction par fluide supercritique (rendement en extrait en fonction du temps). De nombreuses extractions ne sont limitées que par la solubilité du ou des solutés à extraire dans le CO₂, tel que dans le cas de l'extraction des lipides.

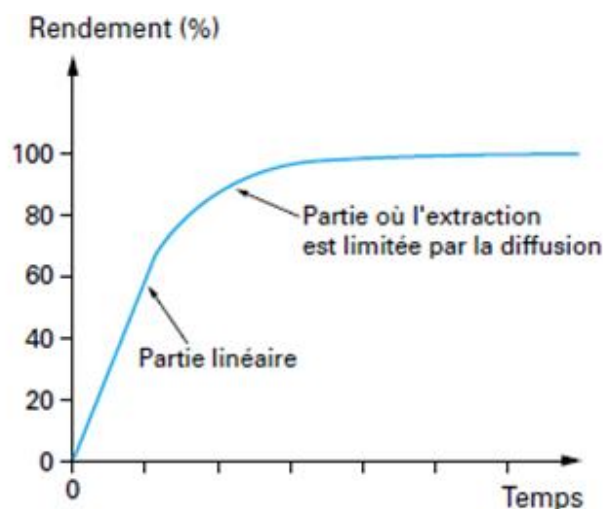


Figure I. 10 : Allure générale des courbes d'extraction par fluide supercritique [59]

Alors que d'autres ne sont limitées que par la diffusion interne ou par l'équilibre d'adsorption. Par conséquent, l'accès du CO₂ supercritique dans la plante peut dans certains cas être particulièrement difficile selon la structure des particules végétales et la localisation des substances naturelles dans les particules [59].

La Figure I.10, montre la forme générale de la cinétique d'extraction au CO₂-SC. Ainsi, elle présente généralement une partie linéaire en début d'extraction qui correspond à l'extraction de la partie du soluté facilement accessible, suivie d'une deuxième partie où l'extraction est limitée par la diffusion interne, et la dernière partie sous forme d'un plateau qui correspond à l'épuisement de la plante et à la fin de l'extraction.

Par conséquent, la majorité des extractions sont complexes et leur efficacité varie en fonction des paramètres thermodynamiques et cinétiques. Ainsi, les substances naturelles, dans certains cas, ne sont pas distribuées de façon homogène dans la plante. En effet, on trouve dans la plante une fraction de solutés facilement accessibles et une fraction non accessible contenue dans les cellules intactes (non endommagées par le pré-broyage) de la plante et dans la plupart des cas, l'extraction est alors limitée par la diffusion [59].

IV. Grands domaines d'application de l'extraction solide-fluide par CO₂ supercritique

L'extraction par fluide supercritique prend de plus en plus d'importance par rapport aux techniques conventionnelles pour l'extraction des huiles volatiles à partir des PAM. Dans certains cas, elle offre des solutions que ne peuvent pas apporter les techniques traditionnelles parce qu'elle est conforme aux normes de plus en plus strictes en matière d'environnement. Pour preuve, le dioxyde de carbone (CO₂), est disponible en abondance et à moindre coût ; il est non toxique et non inflammable. Sa stabilité thermique permet d'éviter les risques liés à sa dégradation et il suffit uniquement de respecter les consignes de sécurité usuelles concernant le stockage et l'utilisation de gaz sous pression. De plus, ses propriétés physico-chimiques le rendent omniprésent en chimie verte [60,61].

Actuellement, de nombreuses unités industrielles sont en fonctionnement dans le monde, principalement destinées au traitement de produits naturels. Les plus grandes unités se trouvent dans le domaine agroalimentaire et un nombre croissant d'unités de capacité plus faible dans le domaine pharmaceutique. Ainsi, dans le domaine de l'extraction des substances naturelles, le dioxyde de carbone supercritique présente plus de 90% des applications industrielles et un peu moins pour les publications scientifiques [59,2].

Parmi les applications industrielles, l'extraction de la caféine des grains de café [2] est la plus connue. Elle permet de réduire le pourcentage de caféine d'une valeur comprise entre 0,7 et 3% à un taux final de 0,02% et ce sans extraire les composés conférant l'arôme. En plus de cette application, de nombreux exemples d'extraction de substances naturelles d'intérêt

biologique peuvent être cités tels que l'extraction de la nicotine [62,63], de la dioxine [64], du paclitaxel [65,66], de la coronarienne et de la voacangine [67], de l'artémisinine [68], de l'acétate d'aurentiamide [69], de la vinblastine [70], de la cocaïne [71], de la tagitinine C [72], des pyréthrinés [73]. Ainsi, il est utilisé dans les domaines agroalimentaires tels que l'extraction de colorants naturels [74,75], d'antioxydants naturels [76,77], les acides gras [78,79], pour la production de boissons sans alcool [80,81], de denrées alimentaires avec moins de lipides [82,83], et de bouchons en liège traités [84]. Egalement le domaine de l'extraction des arômes et parfums est un secteur qui offre un large éventail d'applications [52,85,86].

IV.1. Industrie agroalimentaire

Dans les dernières décennies, la part du naturel dans l'aromatisation des produits alimentaires ne cesse de croître. En effet, les réalisations actuelles ainsi que les développements futurs ont comme objectif principal, la fabrication des produits alimentaires de qualité naturelle en utilisant des procédés «verts», même si le coût est plus élevé. Par conséquent, l'application du CO₂ supercritique dans le domaine des arômes peut être considérée comme une des meilleures solutions. Cependant, leur marché reste encore limité sans doute à cause de leur prix plus élevé [59].

IV.2. Industrie pharmaceutique

Actuellement un des développements le plus prometteur des procédés basés sur l'utilisation de CO₂ supercritique concerne le domaine pharmaceutique. En effet, le CO₂ supercritique peut être utilisé pour l'extraction et purification de principes actifs à partir de PAM, les antioxydants naturels et obtenir des produits pur sans solvant résiduels.

Enfin, l'utilisation du CO₂ supercritique est très diverse et on peut concerner la plupart des domaines, tel que le traitement de matériaux en contribuant à l'élimination de composés organiques pour nettoyer les céramiques et les polymères [59].

Partie III : Extraction par eau sub-critique

I. L'eau sub-critique

I.1. Généralités

Le point critique de l'eau est $P_c = 221$ bar et $T_c = 374^\circ\text{C}$. L'eau à l'état sub-critique est une eau surchauffée ou encore une eau chaude pressurisée, généralement à une température inférieure à 250°C et une pression inférieure à 100 bar. Ainsi, dans ces conditions, l'eau est liquide mais certaines de ses propriétés physico-chimiques sont modifiées. En effet, à l'état sub-critique, les molécules d'eau sont plus "libres" les unes par rapport aux autres et sont donc plus "disponibles" pour réagir avec d'autres substances. Il est donc plus facile de solubiliser certaines molécules dans l'eau à l'état sub-critique que dans l'eau en condition standards.

Les premiers intérêts pour l'eau sub-critique comme solvant présentant des qualités environnementales, datent des années 70 avec les crises pétrolières de cette époque [87]. Ensuite, les activités de recherche en amont se sont focalisées sur la décontamination des sols, avec une extraction de composés peu ou non polaires de sols pollués ou l'extraction quantitative de composés organochlorés [88,89].

Généralement, l'extraction des produits naturels par eau sub-critique a été utilisée à l'échelle laboratoire. Actuellement, des développements de pilotes à plus grande échelle sont réalisés [2].

Dans ce chapitre, nous présenterons les propriétés de l'eau sub-critique et le principe ainsi que les avantages de l'extraction à l'eau sub-critique. L'application de l'extraction avec l'eau sub-critique utilisant un appareillage de type Dionex ASE200 sur les feuilles de *T. articulata* et l'influence des paramètres opératoires seront abordées.

I.2. Propriétés spécifiques de l'eau sub-critique

Naturellement, l'eau apparaît comme le solvant le plus vert qui soit. En effet, elle est la molécule la plus abondante sur Terre, et elle présente des avantages certains puisque qu'elle est non toxique, non inflammable et inoffensive pour la santé. Bien qu'utilisée très souvent comme solvant dans le domaine de la synthèse organique, un grand intérêt pour l'eau en tant que solvant a été généré par le développement du nouveau concept de chimie verte. L'intérêt principal de l'utilisation de l'eau sub-critique réside dans les variations importantes de ses propriétés physico-chimiques [2,90].

I.2.1. Diagramme de phases de l'eau

Le comportement physique de l'eau en tant que corps pur est relativement bien connu. Il se traduit par son diagramme d'état représenté en fonction de la pression et de la température (Figure I.11).

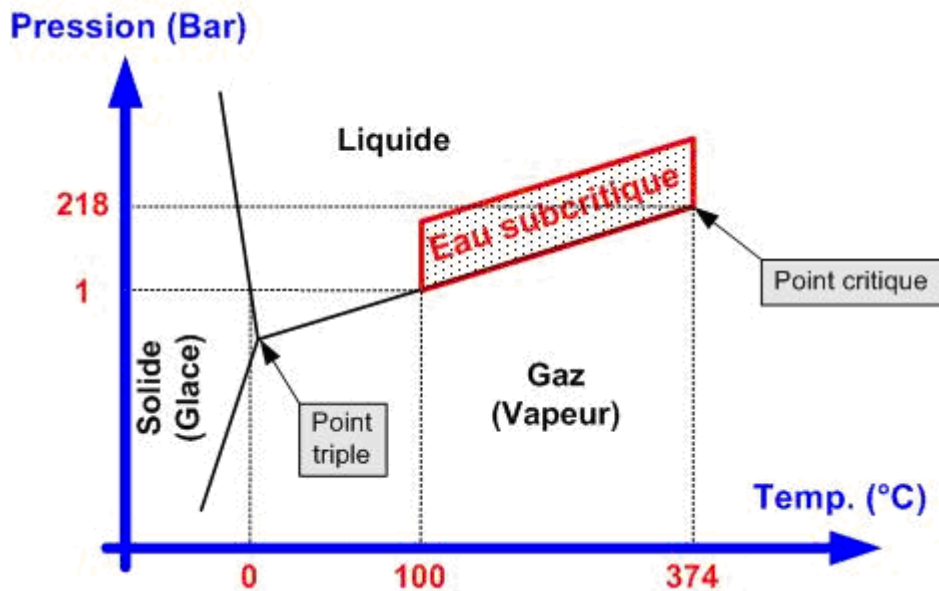


Figure I. 11 : Diagramme de phases de l'eau

[\[http://www.valifluid.com/FR/PAGE_Gamme_Service.php\]](http://www.valifluid.com/FR/PAGE_Gamme_Service.php)

La particularité de l'eau est d'avoir une courbe d'équilibre solide-liquide ayant une pente négative. Sur ce diagramme, les états classiques (solide, liquide et vapeur), le point critique et le domaine sub-critique sont définis.

I.2.2. Constante diélectrique de l'eau

La permittivité relative ou constante diélectrique est définie comme un nombre sans dimension noté ϵ . Il s'agit d'une propriété physique qui décrit la réponse d'un milieu donné à un champ électrique appliqué. L'eau a une permittivité relative statique d'environ 78,4 à 20°C. Cette valeur élevée est due aux effets collectifs des molécules dipolaires de l'eau.

L'évolution de la constante diélectrique de l'eau en fonction de la température pour une pression constante (100, 200 et 300 bar) est représentée dans la Figure I.12 [91].

Sa valeur chute d'une valeur de 80 à $P=200$ bar et $T=20^\circ\text{C}$ pour tendre vers 2 à la même pression et $T=400^\circ\text{C}$, valeur proche du comportement de la vapeur.

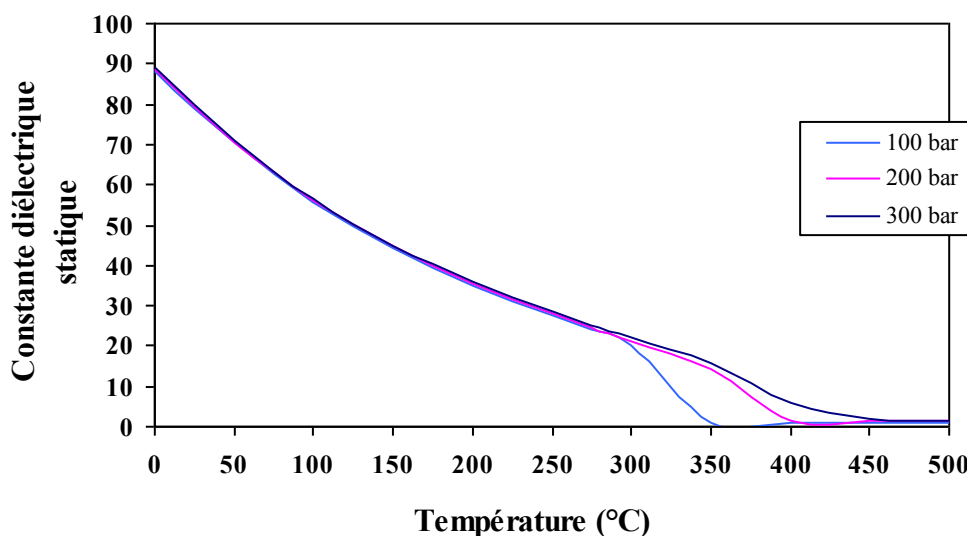


Figure I. 12 : Variation de la constante diélectrique statique de l'eau en fonction de la température pour P=100 bar, P=200 bar et P=300 bar [92]

Dans les conditions ambiantes, l'eau avec sa valeur élevée de la constante diélectrique se comporte comme un solvant extrêmement polaire et n'est donc pas considérée comme un bon solvant d'extraction pour les molécules peu polaire. Cependant, l'eau sub-critique possède une valeur de la constante diélectrique faible et comparable à celle du méthanol et de l'éthanol (à 25°C). Dans ces conditions, il devient possible d'utiliser l'eau comme solvant organique pour l'extraction des substances naturelles [93].

I.2.3. Viscosité dynamique de l'eau

L'eau, à pression et température ambiante, a une viscosité de l'ordre de 10^{-3} Pa.s.

La Figure I.13 représente l'évolution de la viscosité de l'eau en fonction de la température pour trois valeurs de pression : 100, 200 et 300 bar [91].

Toujours indépendante de la pression, la Figure I.13 montre une évolution significative de la viscosité dynamique de l'eau avec des valeurs passant de 887,8 μ Pa.s à 107,77 μ Pa.s pour les températures 25°C et 250°C, respectivement. On peut alors constater les conséquences de ces évolutions sur les propriétés de transport dans le procédé d'extraction [94]. Afin de déterminer ces conséquences il est intéressant d'étudier les propriétés de transport de l'eau.

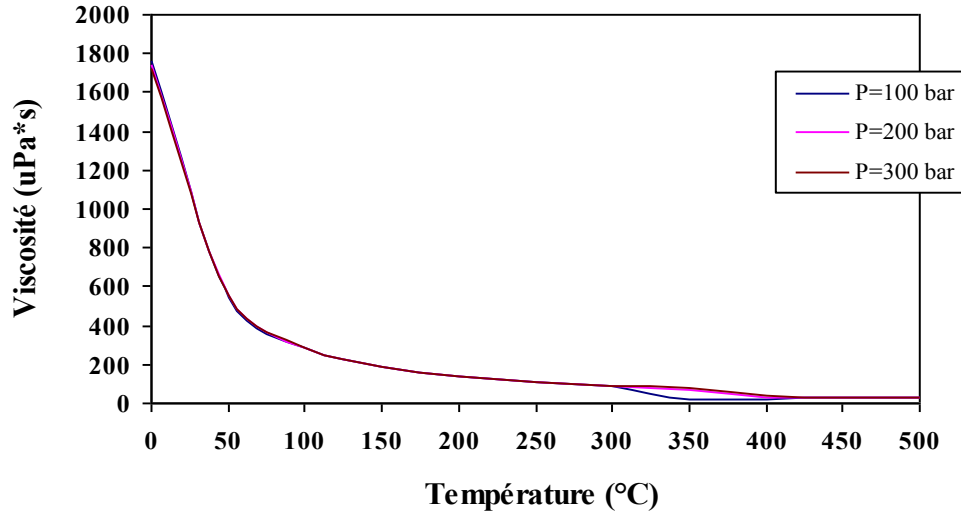


Figure I. 13 : Variation de la viscosité dynamique de l'eau en fonction de la température pour P=100 bar, P= 200 bar et P=300 bar [91].

I.2.4. Masse volumique de l'eau

L'évolution de la masse volumique en fonction de la température de l'eau est présentée en Figure I.14 pour les pressions : 100, 200 et 300 bar.

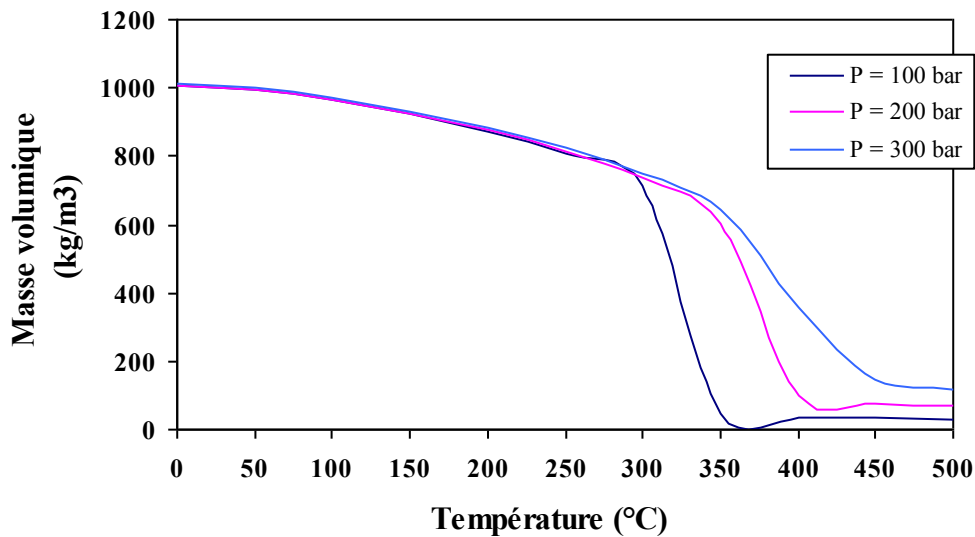


Figure I. 14 : Variation de la masse volumique (kg.m^{-3}) de l'eau en fonction de la température pour P=100 bar, P= 200 bar et P=300 bar [91].

Cette figure montre une forte variation au voisinage de la température critique (374°C) allant des valeurs proches de celle de l'eau liquide à celles de la vapeur d'eau.

Par contre, on observe des évolutions assez faibles entre 1000 et 800 kg/m³ pour les différentes pressions. On peut donc considérer que le pouvoir solvant dû à la masse volumique n'est pas affecté dans les domaines considérés pour l'extraction avec l'eau sub-critique (150°C).

I.2.5. Capacité thermique massique de l'eau

La capacité thermique de l'eau est une grandeur qui permet de quantifier sa capacité de restituer de l'énergie par échange thermique pendant une transformation avec variation de sa température.

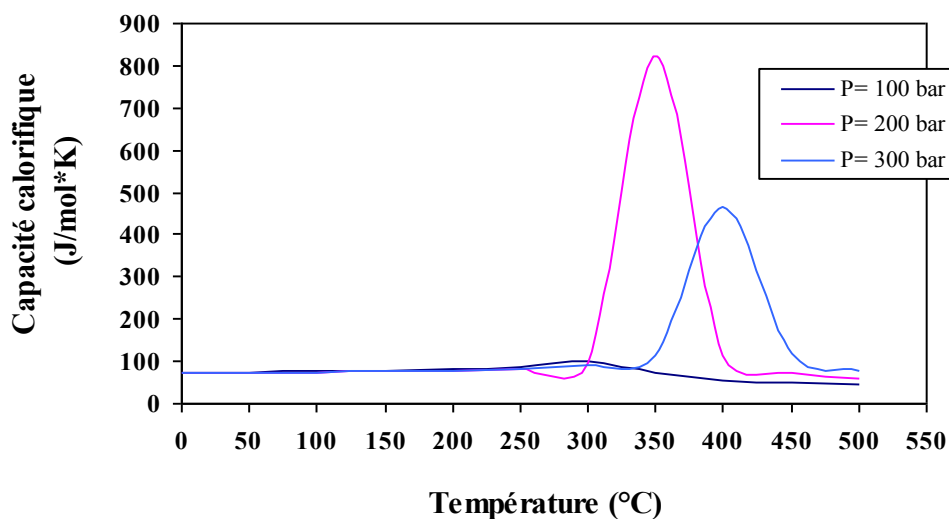


Figure I. 15 : Variation de la capacité thermique en fonction de la température pour P=100 bar, P= 200 bar et et P=300 bar [91].

L'évolution de la capacité thermique de l'eau en fonction de la température et de la pression est représentée dans la Figure I.15 [91].

Ainsi, à proximité de la pression critique, la quantité de chaleur à fournir pour le passage du domaine sous-critique au domaine supercritique sera importante. C'est l'une des raisons pour laquelle les pressions rencontrées pour l'extraction avec l'eau sub-critique sont rarement supérieures à 100 bar, une pression suffisamment éloignée du point critique et ce qui permet de diminuer le coût énergétique pour passer à la température critique.

II. Extraction des huiles volatiles par l'eau sub-critique

II.1. Extraction par solvant accélérée «ASE»

L'extraction par solvant accélérée est une contribution récente et innovante aux techniques d'extraction. Cette technique est brevetée par la société Dionex sous le nom d'ASE (Accelerated Solvent Extraction). Cette technique fonctionne à des températures et des pressions élevées de façon à accroître l'efficacité de l'extraction.

L'appareil ASE permet l'extraction solide-liquide avec des solvants sous de hautes pressions et à des températures situées au dessus du point d'ébullition des solvants [95] ce qui rend le processus d'extraction plus efficace et plus rapide. Cet appareil permet de réaliser plusieurs cycles d'extraction (entre 1 et 5). Elle engendre l'introduction du solvant propre en augmentant le gradient de concentration entre le solvant et la matrice solide, ce qui améliore le transfert de masse et augmente le rendement d'extraction.

II.2. Extraction des principes actifs par l'eau sub-critique

L'extraction des principes actifs d'origine végétale par l'eau sub-critique, en utilisant l'appareil ASE200 est une méthode innovante importante dans laquelle on utilise de l'eau chaude avec des températures comprises entre 100°C (point d'ébullition de l'eau) et 374,1°C (point critique de l'eau) et avec une certaine pression, variable selon la température, qui maintient l'eau sous sa forme liquide [96,97]. A température ambiante, l'eau est un solvant polaire qui possède une constante diélectrique (ϵ'), de 75,5. Cependant, dans une atmosphère pressurisée à des températures élevées de l'ordre de 250-300°C, la polarité de l'eau diminue et la constante diélectrique aussi. Elle devient équivalente à celle d'un solvant organique tel que l'éthanol ($\epsilon'=24$) [98]. Ainsi le processus de l'eau sub-critique permet l'extraction de molécules moyennement polaires à non-polaires sans utiliser de solvants organiques avec une amélioration solubilisation des principes actifs [99].

II.3. Paramètres influant sur l'extraction d'huile volatile

Dans cette partie, la cinétique d'extraction et le phénomène de transfert de masse dans le processus d'extraction avec l'eau sub-critique sont discutés. De plus, dans le but d'améliorer la compréhension des processus qui se produisent lors de l'extraction des HEs par l'eau sub-critique, les différents paramètres de fonctionnement, tels que la température, la pression, le temps d'extraction, la taille des particules et le taux de remplissage des cellules qui ont une

influence sur le rendement d'extraction par eau sub-critique ont été discutés et ensuite étudiés avec la plante *T. articulata* dans le chapitre IV.

II.3.1. Influence de la température d'extraction

La température est le paramètre opératoire qui présente la différence la plus importante entre l'extraction par solvant organique et l'extraction par l'eau sub-critique. En effet, dans ce dernier des températures d'extraction bien au-dessus du point d'ébullition sont utilisées. Au contraire, dans l'extraction par Soxhlet, la température d'extraction est limitée par la température d'ébullition du solvant utilisé. Cependant, la température élevée présente certains avantages dans le processus d'extraction tels que l'amélioration de la diffusion à l'intérieur des tissus cellulaires et l'accélération du transfert de masse.

Dans notre cas, la solubilité des composants dans l'eau sera améliorée lorsque l'on réalisera l'extraction à des températures élevées. Par conséquent, le taux d'extraction sera beaucoup plus important [99-103].

II.3.2. Influence de la pression d'extraction

Dans le processus d'extraction avec l'eau sub-critique à l'aide de l'outil ASE, une pression minimale est nécessaire pour maintenir l'eau à l'état liquide pour une température supérieure au point d'ébullition atmosphérique. Il a été rapporté par Richter que la pression n'a aucun effet [102,103] sur le rendement d'extraction.

II.3.3. Influence du temps d'extraction

L'extraction par l'eau sub-critique peut être effectuée en mode statique, en mode dynamique, ou en combinant ces deux modes. En mode statique, l'échantillon est extrait avec un solvant à une température élevée et sous pression sans aucune sortie de l'eau. Lorsque l'extraction a atteint l'équilibre, les extraits sont recueillis par balayage rapide de la cellule d'extraction avec un solvant et un gaz inerte. En mode dynamique, l'eau s'écoule de façon continue à travers la cellule d'extraction.

Certaines plantes peuvent conserver les principes actifs dans des pores ou d'autres structures. L'augmentation du temps statique à des températures élevées peut permettre à ces composés de diffuser dans l'eau [99,100,104-105].

II.3.4. Cinétique d'extraction

Le processus d'extraction avec l'eau sub-critique peut être modélisé par trois étapes successives. Tout d'abord, les solutés doivent diffuser du cœur des particules de la matière végétale vers la surface. Ensuite, ils doivent transférer à partir de la surface des particules dans l'eau. Enfin, les solutés sont élués de la cellule d'extraction. La cinétique d'extraction des substances naturelles avec l'eau sub-critique est limitée par la plus lente de ces trois étapes. Évidemment, le temps nécessaire pour le transfert de masse du noyau des particules à la surface peut aussi être plus court avec le broyage [107].

II.4. Avantages et limitations de l'extraction par l'eau sub-critique grâce à l'ASE

II.4.1. Les avantages

- Un temps d'extraction court, le faible volume d'eau utilisé et son automatisation en utilisant l'appareil ASE.
- D'un point de vue économique et de la sécurité des opérateurs, l'utilisation de l'eau est nettement avantageuse par rapport à certains produits comme l'hexane.
- Les caractéristiques de diffusivité dans les matrices végétales améliorent l'efficacité d'extraction.
- La polarité modulable de l'eau sub-critique en fait un solvant possiblement intermédiaire entre l'eau en condition standard et des solvants apolaires comme le benzène ou l'hexane.

II.4.2. Les inconvénients

- A haute température, beaucoup de groupes fonctionnels sont susceptibles de s'hydrolyser.
- Le coût du processus d'extraction est un point négatif (coût énergétique et le coût d'achat de l'automate).

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons identifié les différents termes abordés dans ce travail. Nous avons défini les HEs et ces propriétés chimiques, physiques et biologiques ainsi que les domaines d'utilisation et les différentes techniques d'extraction. Ensuite, nous avons présenté les propriétés, les avantages et inconvénients des nouvelles technologies tels que l'extraction par CO₂ supercritique et l'extraction à l'eau sub-critique.

Chapitre II : Matériels et méthodes

Cette partie est consacrée à la description des matériels et méthodes utilisés afin de mener à bien la présente étude. Elle englobera trois sous-parties essentielles.

La première portera sur la présentation des matières végétales utilisées, la seconde portera sur les différentes techniques d'extraction mises en œuvre ainsi que leurs principes de fonctionnement et enfin dans la dernière partie les méthodes d'analyses utilisées et les méthodes permettant d'accéder aux activités biologiques des extraits seront détaillées.

I. Monographie des plantes aromatiques et médicinales étudiées

Dans ce travail, on s'intéresse à l'extraction et à la valorisation des métabolites secondaires de certaines plantes tunisiennes ainsi qu'à l'optimisation des procédés d'extraction.

Nous avons utilisé quatre procédés d'extraction, les uns traditionnels, les autres innovants. Pour étudier l'efficacité de ces procédés et optimiser les paramètres opératoires, nous avons sélectionné cinq plantes représentatives des substances naturelles. Afin de contrôler la qualité des extraits obtenus, et comparer les procédés d'extraction, nous avons mis en œuvre des techniques d'analyses de composition chimique. Enfin, pour valoriser les extraits quelques propriétés biologiques ont été étudiées.

I.1. *Tetraclinis articulata*

I.1.1. Présentation

Le Thuya de Berbérie (*T. articulata*) appartenant à la famille des Cupressacées [108] est lié géographiquement aux trois pays du Maghreb : Tunisie, Maroc et Algérie. En dehors de ces pays, on n'en rencontre qu'une petite quantité dans la province de Carthagène (Espagne) et à Malte [109].



Figure II. 1: *Tetraclinis articulata*

En Tunisie, selon le Rapport National d'Evaluation des Ressources Forestières Mondiales 2010, depuis l'année 1990 cette plante est classée 7^{ème} parmi les dix espèces les plus répandues avec 0,1 millions de mètres cubes matériel sur pied dans la forêt.

Le thuya est un arbre monoïque, sa floraison a lieu au printemps, entre mars et mai. Le fruit est un cône liégeux de forme générale cubique constituée de quatre volves ornées d'un ombilic près du sommet [110].

I.1.2. Composition chimiques de l'huile essentielle de *T. articulata*

Peu d'études ont été réalisées sur *T. articulata* et sur la composition chimique de ses HEs. En Tunisie, à notre connaissance deux études ont été effectuées. L'étude réalisée par Ben Hadj Ahmed *et al.* [111], sur les HEs de *T. articulata*, récoltées dans la région de Sned à Gafsa, rapporte des tests d'activité antioxydante (par DPPH*) des HEs mais pas de composition chimique. L'autre étude réalisée par Tékaya-Karoui *et al.* [112], sur les HEs de *T. articulata*, récoltées de la région de Zaghouan à Tunis, montre une différence de composition des huiles de différentes parties de la plante. L'huile des branches est riche en camphène (43,2%), Z-murolène (29,0%) et p-cymène-8-ol (10,4%). Les racines aussi sont riches en camphène (70,2%).

A notre connaissance, quelques études ont été effectuées sur *T. articulata* originaire du Maroc. L'étude récemment réalisée sur la composition chimique des HEs des feuilles et du bois de *T. articulata* récoltées dans la région d'Amsa à Téouan, montre que les feuilles sont riches en acétate de bornyle (16,5%), camphre (19,1%) et bornéol (9,6%), et par contre que le bois est riche en cédrol (28,2%) et 1,7-di-épi-cédrol (17,9%) [108]. Les résultats rapportés par Aitigri [113], montrent que les HEs du bois de *T. articulata* prélevé dans la région de Rabat sont plus riches en carvacrol et en α -cédrol. L'étude de la composition chimique des HEs de *T. articulata* de la région de Khemisset et Aoulouz au Maroc a noté la présence majoritaire de carvacrol (21,3%-36,4%), α -cédrène (10,1-13,1%), cédrol (1-7,3%) et terpinèn-4-ol (2,8-6%) [114]. Aussi, les HEs des parties aériennes de *T. articulata* de Malt ont été identifiées, 18 composés ont été identifiés dont l' α -pinène, le limonène, le camphre et l'acétate de bornyle étaient les principaux composants [115].

I.1.3. Utilisation de *Tetraclinis articulata*

Différentes parties de cet arbre sont utilisées dans la médecine populaire pour leurs multiples effets thérapeutiques. Il est principalement utilisé contre les infections respiratoires et intestinales, les douleurs gastriques, le diabète, l'hypertension, comme anti-diarrhéique, fébrifuge, diurétique, anti-rhumatismal et hypoglycémiant oral [109,116-118]. Des études antérieures sur *T. articulata* ont indiqué son utilisation comme antibactérien et antifongique [109-111,119], cytotoxique [120], anti-oxydant et anti-inflammatoire [121].

Il s'agit de la plante principale de notre étude. L'optimisation et l'étude de différents procédés ont été réalisées sur cette plante. Nous avons par la suite testé quatre autres plantes avec les conditions optimales ainsi déterminées sur *T. articulata*.

I.1.4. Préparation de l'échantillon de la matière végétale

Dans ce travail, les expériences ont été réalisées avec des feuilles de *T. articulata* récoltées au mois de mars 2010 au nord de la Tunisie. Les feuilles ont été séchées à l'air libre jusqu'à la stabilisation de leur poids, elles ont ensuite été broyées et tamisées de manière à obtenir des particules avec trois fractions de granulométrie ($0,8 < dp < 1,2$ mm ; $1,2 < dp < 1,8$ mm ; et $1,8 < dp < 2,5$ mm).

I.2. *Eucalyptus Camaldulensis* et *Eucalyptus Cinerea*

I.2.1. Présentation

Les *Eucalyptus* sont des arbres forestiers représentant une partie importante de la superficie forestière de la Tunisie. L'arbre d'*eucalyptus* peut atteindre 125 à 160 mètres de hauteur. L'*eucalyptus* compte plus de 300 espèces et appartient à la famille des myrtacées (Myrtaceae). Lors de cette étude, nous avons utilisé deux espèces d'*eucalyptus* : *Camaldulensis* et *Cinerea*, qui sont deux espèces parmi les plus abondantes en Tunisie. Les feuilles d'*E. camaldulensis* et *E. Cinerea* ont été recueillies en Octobre 2010 dans la région de Korbos (Tunisie) et séchées à l'ombre jusqu'à ce que leur poids soit constant. La teneur en humidité de la matière végétale séchée, déterminée par la thermogravimétrie, était de 10% en masse. Après broyage et tamisage, la granulométrie moyenne des deux espèces était de 0,8 mm.

Ainsi, l'extraction des HEs et volatiles des feuilles de ces deux espèces d'*Eucalyptus* a été jugée intéressante, en raison des intérêts économiques, alimentaires et médicinaux de ces espèces [122].

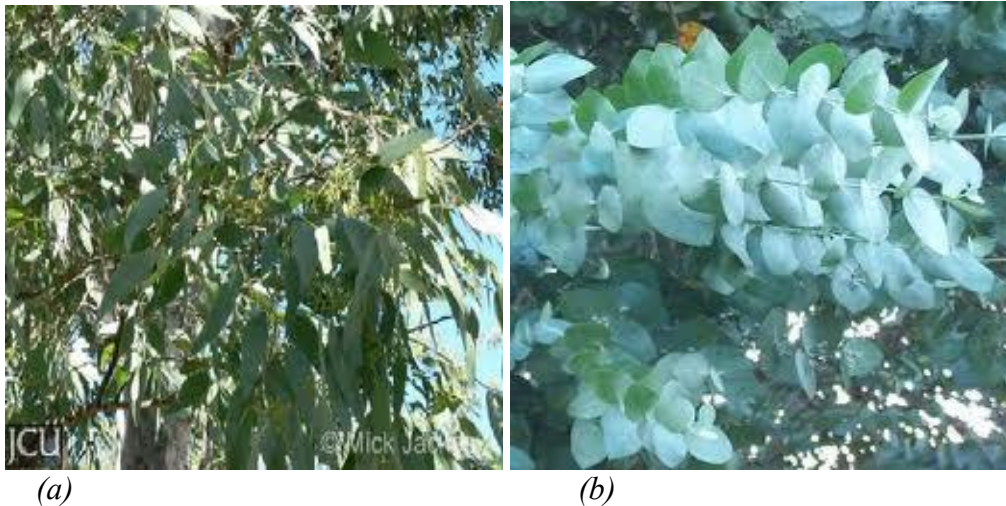


Figure II. 2 : *Eucalyptus camaldulensis* (a) et *Eucalyptus cinerea* (b)

I.2.2. Utilisation de l'*eucalyptus*

L'eucalyptus est l'une des espèces les plus largement cultivées, bien connue pour sa production d'HE, avec une forte activité biologique utilisée dans différents domaines [123]. Des extraits de feuilles d'*Eucalyptus* ont été approuvés comme additifs alimentaires. Les extraits sont également utilisés dans des formulations cosmétiques [124]. L'huile, riche en cinéole, est une substance active pour des savons.

Des études se concentrant sur l'HE d'un grand nombre d'espèces d'*Eucalyptus* extraite par HD, tels que les travaux réalisées par Elaissi *et al.* [125,126]. Cependant, à notre connaissance, seules quelques études [127-129] ont été effectuées sur l'extraction d'*Eucalyptus* par le CO₂ supercritique.

I.3. Cyprès de Provence (*Cupressus sempervirens*)

I.3.1. Présentation

Le *C. sempervirens* est une espèce conifère de la famille des Cupressacées. C'est un arbre à feuillage persistant et aromatique monoïque, atteignant 30 mètres de haut qui pousse dans différentes parties de plusieurs pays, dont la Tunisie.



Figure II. 3: Cyprès de Provence (*C. sempervirens*)

I.3.2. Utilisation du *Cupressus sempervirens*

Le *C. sempervirens* a été traditionnellement utilisé pour le traitement du rhume, de la grippe, des maux de gorge et des rhumatismes. Les feuilles de cette plante sont utilisées comme antiseptiques et antispasmodiques.

Une autre étude montre que les HEs de *C. sempervirens* possèdent des propriétés antimicrobiennes, qui peuvent être utilisées comme agents antimicrobiens naturels pour les maladies humaines et infectieuses et pour la conservation des aliments. En outre, le développement des agents antimicrobiens naturels aide à diminuer les effets négatifs (pollution de l'environnement, de la résistance) de produits chimiques synthétiques et de médicaments [130].

I.4. *Callitris glaucophylla*

I.4.1. Présentation

Le *C. glaucophylla* est une espèce de conifère de la famille de Cupressacée originaire d'Australie. Le *C. glaucophylla* est un arbre de petite à moyenne taille, qui se développe habituellement à environ 18 m de haut, mais peut occasionnellement atteindre une hauteur de 30 m. feuilles sont réduites à des écailles minuscules, de 1-3 mm de long, disposées en verticilles de trois, le revêtement des rameaux est en forme d'aiguilles vertes et les fruits sont des cônes sphériques, de couleur brun foncé. Les feuilles sont riches en huiles et en résine.



Figure II. 4: *Callitris glaucophylla*

I.4.2. Utilisation du *Callitris glaucophylla*

Le *C. glaucophylla* est l'une des espèces largement cultivées en Tunisie, bien connue pour sa production d'HE, avec une forte activité biologique. L'HE de cette plante a été testée et utilisée dans des médicaments [131], et a montré une efficacité certaine.

Traditionnellement, la plupart dans le monde et spécialement en Australie utilisent la plante pour des traitements médicaux. Ils utilisent différentes parties de l'arbre pour soigner leurs patients. Les feuilles de *C. glaucophylla*, sont immergées dans l'eau bouillante, puis la phase aqueuse est utilisée en tant que remède contre la grippe [132].

II. Les techniques d'extraction des HEs, des huiles volatiles et des extraits aromatiques

Parmi les différentes étapes les plus importantes pour l'isolement et l'exploitation des substances bioactives d'origine naturelle on retrouve l'étape d'extraction [133]. Dans cette partie, nous présenterons les équipements utilisés pour mettre en œuvre les quatre techniques d'extraction décrites dans l'analyse bibliographique : l'HD, l'extraction par Soxhlet, l'extraction au CO₂ supercritique et l'extraction par l'eau sub-critique.

II.1. Extraction des HEs par HD

L'extraction des HEs des plantes aromatiques et médicinales par HD a été réalisée à l'aide d'un appareil de type « Clevenger » de 2L. Cette technique consiste à introduire une masse de matière végétale dans un ballon contenant une quantité suffisante d'eau distillée. Une fois mis en place, le ballon est chauffé à l'aide d'une chauffe-ballon. L'ensemble est porté à l'ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. L'extraction peut s'effectuer avec ou sans recyclage l'hydrolat obtenu lors de la décantation.

Dans ce travail, les HEs de *T. articulata*, *E. Cinerea*, *E. camaldulensis*, *Cypres de Provence* et *C. glaucophylla* ont été obtenues par HD jusqu'à extraction totale de l'HE (3 heures en moyenne) à partir d'une masse de matière végétale de 100g. Le rendement calculé par rapport à la masse de matière sèche a été utilisé afin d'optimiser les conditions d'extraction. Les HEs sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

Le dispositif expérimental utilisé dans notre travail est représenté dans la Figure II.5.

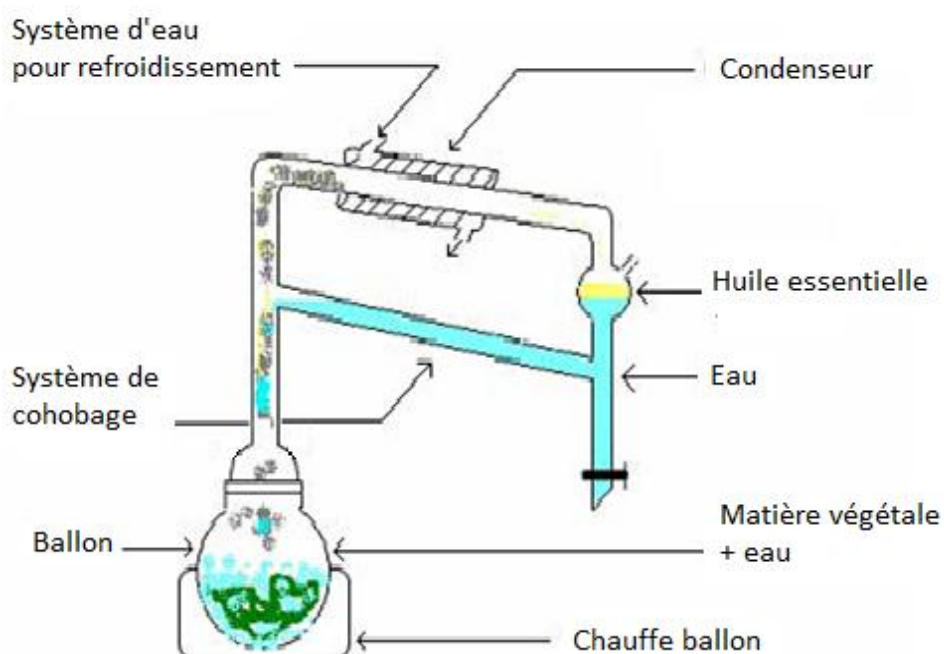


Figure II. 5: Dispositif expérimental d'HD avec cohobage de l'HE

Lors de l'extraction des HEs, plusieurs phénomènes sont à la base du transfert de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence de différents paramètres sur la qualité et le rendement de l'huile obtenue [134]. Ces facteurs peuvent avoir deux types

d'origines : naturelle et technologique. La localisation des structures d'élaboration ou de stockage des HEs peut être superficielle ou interne.

De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'HD, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée d'extraction. Ainsi durant la distillation, l'eau bouillante pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'HE de cellule sécrétrice interne. La solution aqueuse chargée de composés terpéniques, diffuse ensuite à travers une épaisseur de tissu, plus ou moins dense, selon l'organe, vers la surface extérieure où l'HE est vaporisée et entraînée sous forme d'azéotrope.

On attribue le terme d'hydrodiffusion à ce type de transport contrôlé par la polarité des constituants. Ce phénomène est responsable de la vitesse relative de distillation des différentes substances naturelles dépendant davantage de leurs solubilités dans l'eau que de leurs points d'ébullition. Si l'hydrodiffusion constitue l'étape limitant de l'HD, alors l'ordre de sortie des composés est dicté par leur polarité et non par leur volatilité [135,136]. L'isolement de composés volatils après leur distillation est déterminé dans une large mesure par leur degré de solubilité dans l'eau. Par conséquent, l'eau résiduelle peut être plus ou moins saturée en constituants polaires selon la difficulté de séparation des phases.

II.2. Extraction des huiles volatiles et non volatiles par dioxyde de carbone supercritique

II.2.1. Extraction par CO₂ supercritique : SFE200

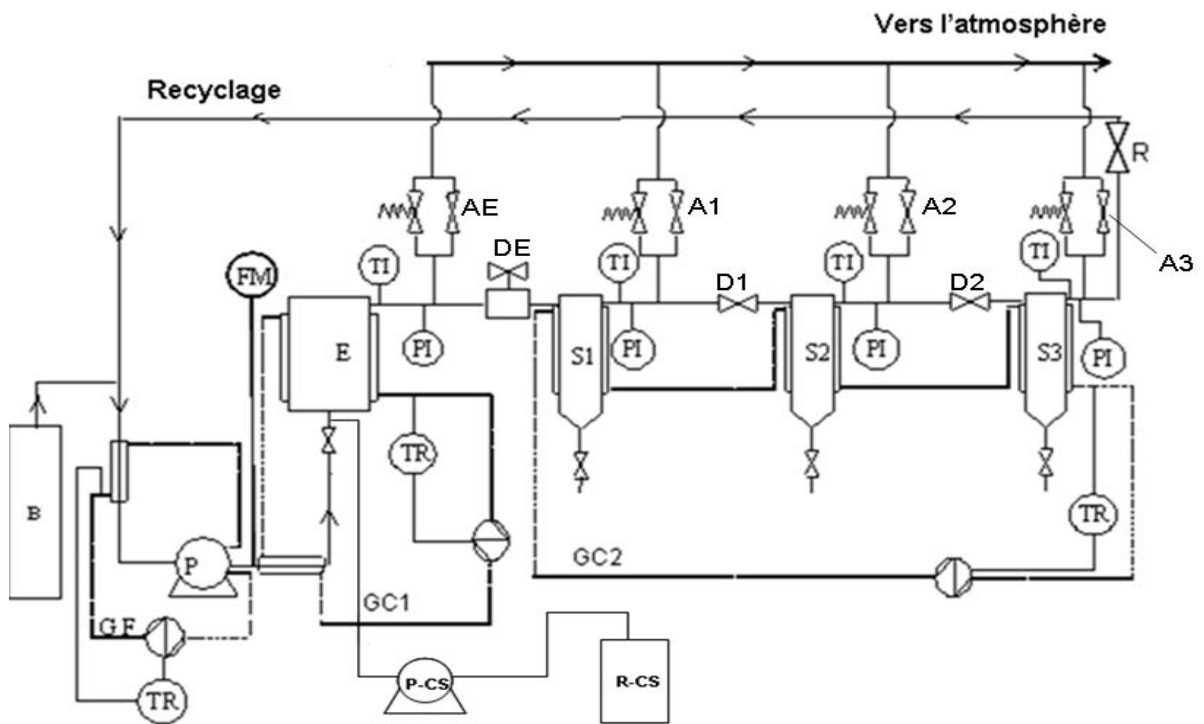
Les premières expériences ont été réalisées avec une installation pilote construite par la société Separex Chimie Fine, France (série 3417 type SFE200). L'installation comprend un extracteur de 200 mL et trois séparateurs (Figure II.6.a). Le schéma de l'installation est présenté sur la Figure II.6.b.

La pression maximale dans ce pilote est de 300 bar avec un débit maximal de CO₂ supercritique de 5kg/h. Dans ce travail, l'extracteur a été chargé avec 50 g de feuilles séchées de *T. articulata*, broyées (particules de diamètre entre 0,8 mm et 2 mm).

Les trois séparateurs *S1*, *S2* et *S3* sont connectées en série en sortie de l'extracteur *E*. L'installation est alimentée par le CO₂ liquide qui se trouve dans une bouteille sous pression *B*. Dans un premier temps, le CO₂ est maintenu à l'état liquide à l'aide du groupe froid GF puis est pompé à l'aide de la pompe *P*. Dans un seconde temps, à l'aide d'un échangeur tubulaire, le CO₂ est porté au-delà de sa température critique puis introduit dans l'extracteur *E* en passant par le débitmètre *FM*.



a)



b)

Figure II. 6: Photographie (a) et schéma (b) de l'installation d'extraction supercritique SFE200

Les conditions opératoires (températures, pression et débit de CO₂) sont maintenues constantes. En effet, les températures sont réglées à l'aide d'un système de contrôle de température comprenant les groupes chauds *GC1* et *GC2* et des échangeurs de chaleur « doubles enveloppes » autour de l'extracteur et des trois séparateurs *E*, *S1*, *S2* et *S3*. Pour certains protocoles d'extraction, la température du séparateur *S1* est contrôlée par un groupe froid *GF*. La pression d'extraction (*E*) est contrôlée à l'aide d'un déverseur *DE*. Deux vannes de contrôle *D1* et *D2* sont utilisées pour contrôler les pressions dans les séparateurs *S1* et *S2*. Sur la Figure II.6.b, les symboles *TI* et *PI* représentent respectivement les indicateurs de température et de pression. Ces indicateurs sont reliés à un enregistreur (Endress + Hauser) permettant l'enregistrement du profil de ces grandeurs au cours du temps d'extraction. Les *TR* représentent aussi des régulateurs de la température des groupes chauds et du group froid. Le système peut fonctionner en circuit fermé ou ouvert. En effet, à la sortie de l'extracteur et de chaque séparateur se trouve une vanne d'évacuation vers l'atmosphère (*AE*, *A1*, *A2* et *A3*, respectivement) permettant de diriger le solvant vers l'évent (circuit ouvert) et de recycler le CO₂ (circuit fermé) en fermant ces vannes et en ouvrant la vanne de recyclage *R*. Dans ce cas le CO₂ passe par une ligne de recyclage.

Cette installation permet également de travailler avec un co-solvant. Il est introduit par la pompe HPLC *P-CS* à partir du réservoir de co-solvant *R-CS*, et mélangé avec le CO₂ juste avant l'entrée de l'extracteur.

II.2.2. Extraction par CO₂ supercritique : SFE1000 bar

Le second appareil, est également une installation pilote construite aussi par la société Séparex Chimie Fine, France. Le schéma de l'installation est présenté sur la Figure II.7.

L'installation 'Autoclave haute pression A21' (Figure III.7), est composée d'un extracteur de 225 mL pouvant aller jusqu'à 1000 bar et 200°C. Un seul séparateur est relié à la sortie de l'extracteur. La pression dans l'extracteur est réglée par un régulateur de pression (déverseur). Dans ce travail, l'extracteur a été chargé avec 28g de feuilles séchées de *T. articulata* broyées en des particules de diamètres situé entre 0,8 mm et 2 mm.

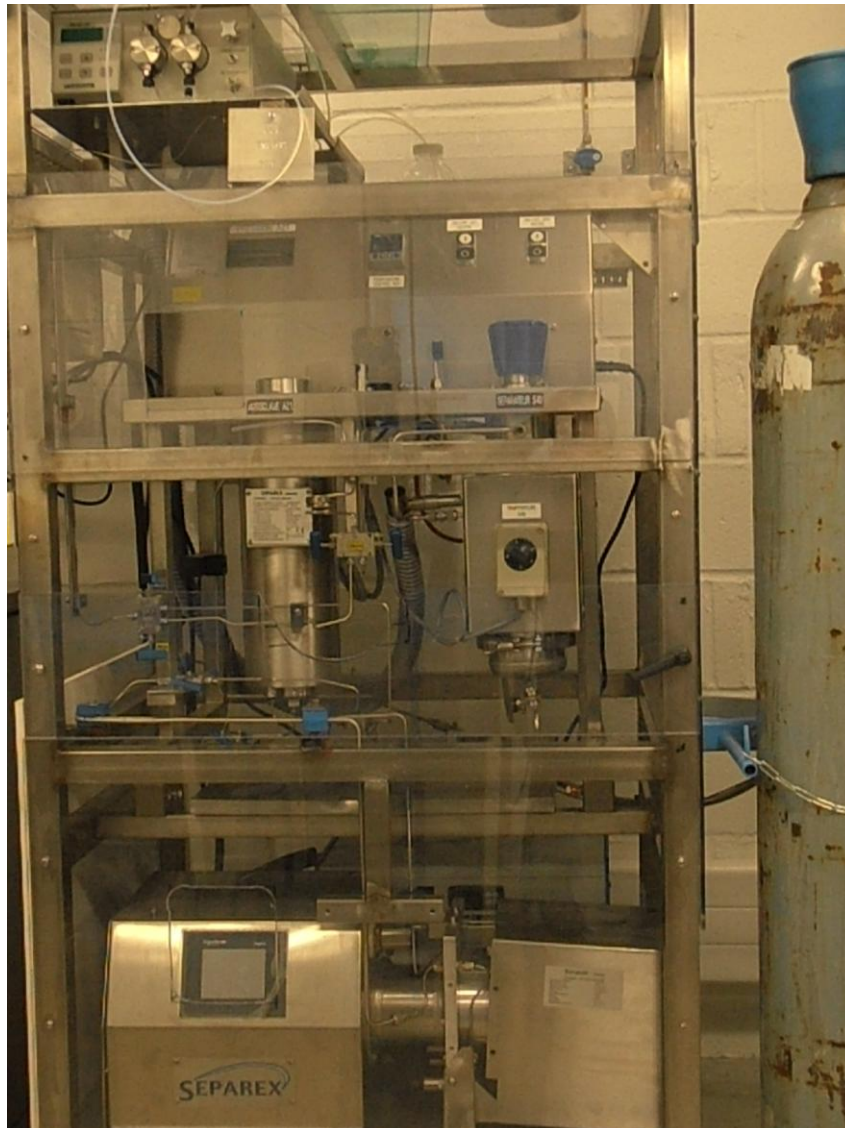


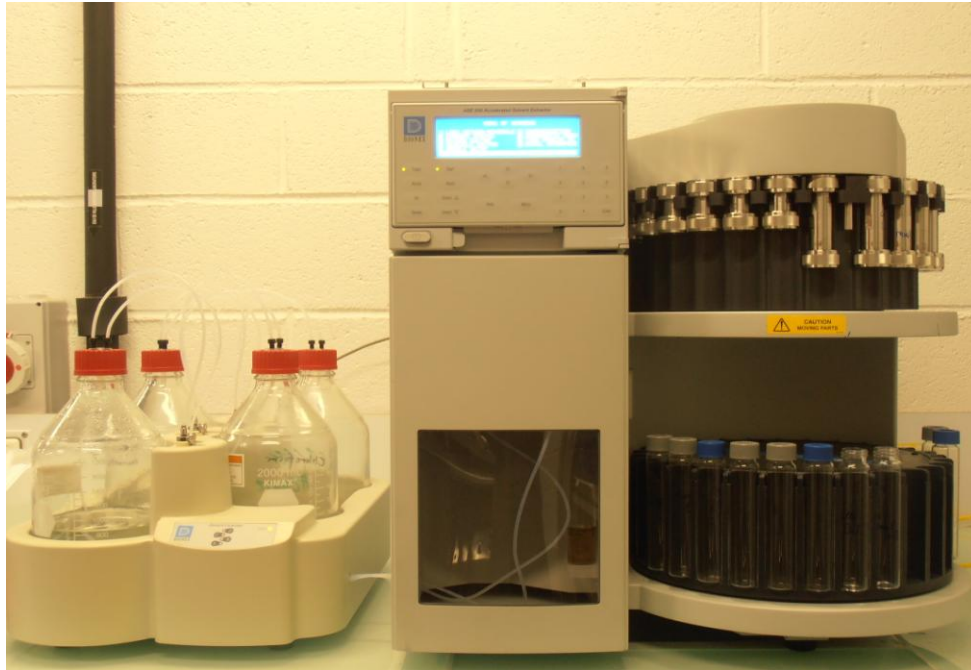
Figure II. 7: Installation d'extraction supercritique «SFE1000 bar»

II.3. Extraction des huiles volatiles avec l'eau sub-critique utilisant l'appareil «ASE200»

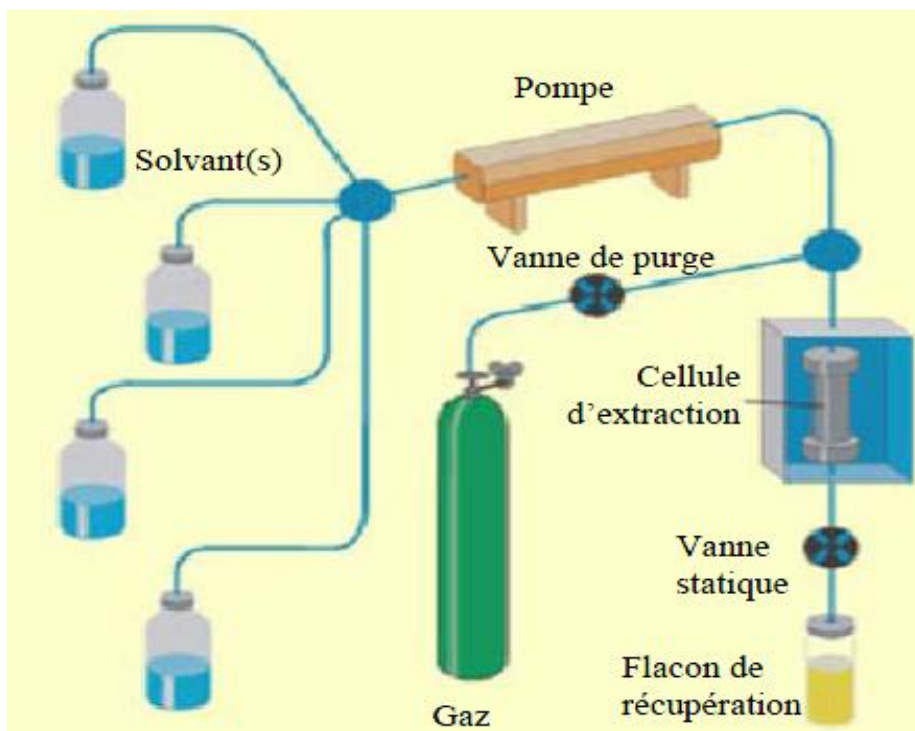
II.3.1. Description de l'appareil ASE200

L'extraction par solvant accélérée a été réalisée grâce à un appareil ASE200 de la société Dionex (Figure II.8.)

L'extraction s'effectue dans des cellules métalliques contenant une certaine masse de matière végétale broyée et se déroule automatiquement selon les étapes décrites ci-dessous. Ces paramètres sont programmés préalablement via une interface électronique. La Figure II.8 présente l'extracteur automatique Dionex ASE200 avec programmeur-distributeur pour 4 solvants différents et des cellules d'extraction de 5 et 11 mL.



(a) Appareil Dionex ASE200



(b) système d'extraction accélérée par solvant [www.Dionex.com]

Figure II. 8: Photographie (a) et schéma de principe (b) de l'ASE200

L'ASE200 apporte une méthode d'extraction par solvant associée à l'automatisation complète du processus et à la différence de la méthode de référence du Soxhlet, cette technique présente l'avantage d'être rapide (30 min par échantillon), peu onéreuse (utilisation de

quantités moindres de solvant) et nécessitant peu de manipulation (24 extractions programmables sans intervention). Il est conçu pour une extraction rapide et économique d'échantillons solides. Après chauffage, l'extrait est vidé de la cellule d'échantillon dans un flacon de collection standard et est prêt pour l'analyse.

Les paramètres consignés de l'ASE200 sont : Température, Pression

Volume de solvant

Solvant d'extraction

Durée de l'extraction

Volume de rinçage

Durée de la purge

Nombre de cycle d'extraction

Les méthodes ASE sont utilisées et certifiées dans les domaines environnementaux, pharmaceutiques, industriels et agroalimentaires [2].

II.3.2. Extraction par l'eau sub-critique utilisant ASE200

Dans le contexte du développement durable et de la chimie verte, notre choix dans ce travail s'oriente vers les solvants verts pour l'extraction des substances naturelles.

Comme préalablement expliqué, l'eau à l'état sub-critique peut permettre d'effectuer des extractions très sélectives de composés polaires à des températures relativement faibles et moyennement polaires ou non polaires à des températures élevées. L'extraction complète des substances naturelles a été démontrée avec un temps d'extraction de quelques minutes avec l'eau sub-critique [137-141].

Afin d'éliminer le solvant et récupérer l'extrait après extraction, nous avons procédé à sa lyophilisation. L'appareil utilisé pour cette étape est appelé Lyophilisateur Christ Alpha 1-2 LD.

II.4. Extraction des extraits aromatiques par solvant organique « Soxhlet »

L'extracteur de Soxhlet permet le traitement des solides (matière végétale) avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés. Le corps en verre de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matière végétale (100g). Cette cartouche est fixée sur un

réservoir de solvant (ballon) et est surmontée d'un réfrigérant [142,133]. Le schéma d'un appareil Soxhlet est représenté sur la Figure II.9.

Le ballon contenant le solvant d'extraction est chauffé, et le solvant ainsi vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec la matière végétale. Le solvant collecté dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et la matière végétale est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est continue jusqu'à épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche [143].

L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction qui s'écoule devient de plus en plus clair c'est-à-dire avec une concentration négligeable de soluté. Solvants testés sont l'éthanol et l'hexane

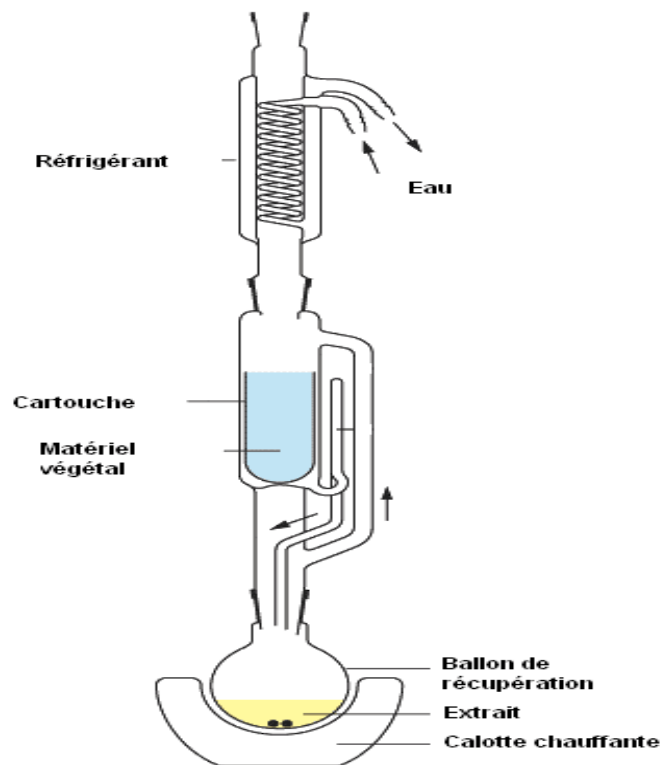


Figure II. 9 : Schéma de l'extracteur Soxhlet

Afin d'éliminer le solvant et récupérer l'extract, nous avons procédé à l'évaporation sous vide en utilisant un appareil 'Rotavapor'. L'évaporateur rotatif est une technique rapide et efficace de séparation : elle permet l'extraction d'un solvant dont la température d'ébullition est abaissée en travaillant sous pression réduite.

III. Techniques de caractérisation et traitement des plantes et des extraits obtenus

III.1. Lyophilisateur

Le lyophilisateur est une machine permettant de dérouler un processus de lyophilisation. Il est composé d'une enceinte frigorifique pouvant être tirée au vide et d'une surface plus froide faisant office de piège frigorifique. La Figure II.10 présente l'appareil de lyophilisateur.



Figure II. 10 : Lyophilisateur

Des lyophilisateurs peuvent être utilisés pour des applications peu exigeantes techniquement (lyophilisation de plantes, de papiers humides, séchage de vestiges archéologiques...), mais les lyophilisateurs sont surtout utilisés pour la production pharmaceutique, où les contraintes de délais et de qualité ont conduit à compliquer fortement leur construction.

Dans notre étude, nous avons utilisé un lyophilisateur type 'Christ Alpha 1-2 LD', Bioblock Scientific (Illkirch, France).

III.2. Microscopie Electronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy* en anglais) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Ainsi, lorsqu'un faisceau d'électrons bombarde une cible, il se produit dans l'échantillon une diversité d'interactions qui conduisent à l'émission de signaux caractéristiques exploités en microscopie électronique à balayage. La Figure II.11 présente l'appareil du MEB. Il a été utilisé pour déterminer les structures des particules de chaque plante (Figure III-annexe).



Figure II. 11 : Microscopie électronique à balayage

Dans notre étude, nous avons utilisé LEO 435 VP équipé d'un détecteur EDX Oxford, avec 2 détecteurs : détecteur d'électrons rétrodiffusés 4 secteurs et un détecteur EDX swiftEd3000 Oxford, dans le Laboratoire de Génie Chimique à Toulouse.

III.3. Thermogravimétrie : méthode de détermination du taux d'humidité

La mesure du taux d'humidité a été réalisée à l'aide d'un appareil Halogen Moisture Analyzer modèle HB43. Le principe de mesure est le chauffage par rayonnement infrarouge

d'une Source Halogène et la détermination continue de la masse au cours du séchage, avec une plage de mesure (0,5-99%) et une précision de la mesure (0,1-0,5%). Dans cet appareil, il est recommandé de choisir une faible masse d'échantillon, mais pas inférieure à la masse nécessaire pour obtenir la précision de mesure exigée (1g). Il faut choisir une température définie de manière à ce que l'échantillon ne se décompose pas et que sa structure chimique ne soit pas modifiée. La Figure II.12 présente l'appareil de mesure du taux d'humidité. Le taux de matière sèche de l'échantillon est visualisé en pour-cent du poids à l'état humide (=PH= poids initial=100%), il est désigné par «%DC » (Dry Content).

$$\text{DC [0...100\%]} = \frac{\text{poids à l'état sec PS}}{\text{Poids à l'état humide PH}} * 100\%$$



Figure II. 12 : HB43-S Halogen Moisture Analyzer

III.4. Chromatographie en phase gazeuse et chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

L'analyse quantitative et qualitative de l'HE a été réalisée par CG-FID et CG-MS à la Faculté de Pharmacie, au laboratoire IMRCP. En effet, nous avons utilisé un chromatographe en phase gazeuse Varian Star 3400 Cx (Les Ulis, France) équipé d'une colonne capillaire de silice DB-5ms (5% phenylmethylpolysiloxane, 30mm ; 0,25mm ; 0,25µm épaisseur de phase). La température de la colonne chromatographie est de 60°C, s'élève à raison de 5°C/min jusqu'à 260°C. Puis atteint 340°C à raison de 40°C/min avec un temps total d'analyse de 57 minutes.

Pour l'analyse, l'HE ou l'extrait est dilué dans l'éther de pétrole. 1 µL de l'échantillon est injecté dans le rapport du mode split 1:10. De l'hélium (pureté 99,999%) est utilisé comme gaz porteur à 1 mL /min. L'injecteur est actionné à 200°C. Le spectromètre de masse (Varian Saturn CG-SM-SM-4D) a été ajusté pour un courant d'émission de 10 mA et la tension de

multiplicateur d'électrons entre 1400 et 1500 V. Le piège température était de 220°C et celle de la ligne de transfert était de 250°C. La numérisation de masse était de 40 à 650 uma.

Les composés ont été identifiés par comparaison de leur RI (indices de rétention) par rapport à des n-alcanes C5-C24 obtenus sur une colonne apolaire DB-5ms, avec celles indiquées dans la littérature, et par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux enregistrés dans NIST 08 (National Institute of Standards and Technology) et rapportés dans des articles publiés, ainsi que par co-injection de composés de référence disponibles. La composition de chaque extrait en pourcentage a été calculée par la méthode de normalisation des aires des pics CG, en supposant que le facteur de réponse était identique pour tous les composés. Les résultats ont été calculés en faisant la moyenne des valeurs de trois injections d'HE, sans utiliser les facteurs de correction. Toutes les déterminations ont été effectuées en triple exemplaires.

III.5. Dosage des phénols totaux

Les teneurs en composés phénoliques totaux dans les HEs et les extraits aromatiques ont été évaluées suivant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu [144]. La solution de Folin-Ciocalteu (0,2 N) a été préparée en mélangeant 10 mL de Folin et 90 mL d'eau distillée. Un volume d'extrait dilué (100 µL) a été ajouté à la solution de Folin (0,2 N, 500 µL). Ce mélange a été laissé au repos à température ambiante pendant 30 min avant l'addition d'une solution de carbonate de sodium (75 g/L dans l'eau, 400 µL). Après 1 h d'incubation, les absorbances ont été mesurées à 765 nm contre le blanc (cuve sans extrait) en utilisant un spectrophotomètre Helios (Unicam, Cambridge, Royaume-Uni). Une courbe d'étalonnage a été tracée en utilisant de l'acide gallique (0 à 300 mg/L). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent acide gallique (EAG)/g de masse sèche.

III.6. Mesure de l'activité antioxydante

III.6.1. DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) activité des radicaux libres Scavenging

Le test DPPH•, est un test très simple et rapide, qui ne nécessite qu'un spectromètre d'absorption UV-Vis. Ce test est basé sur la capacité du radical stable 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle (Figure II.13) de réagir avec des molécules donneuses d'hydrogène, présentes dans les composés phénoliques.

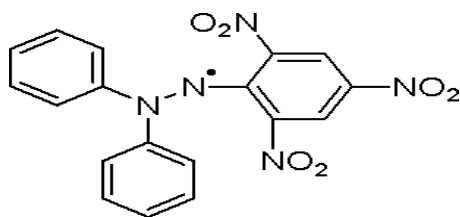


Figure II. 13 : Molécules du radical DPPH[•]

On note qu'au cours de ce test, une dégradation de la couleur de la DPPH[•] est observée, la lumière, l'oxygène et le pH du mélange réactionnel influençant l'absorbance de DPPH[•] [145]. La capacité de piégeage du radical DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) des HEs et des extraits aromatiques a été évaluée selon la méthode décrite par Blois [146] avec quelques modifications. Le volume de 1,5 mL d'HEs et de chaque extrait aromatique, dilué à 1/20 par rapport à la concentration initiale, a été mélangé à 1,5 mL d'une solution de 0,2 mM de DPPH[•] méthanolique. Après une période d'incubation de 30 min à 25°C, l'absorbance a été enregistrée à 524 nm, la longueur d'onde d'absorbance maximale de DPPH[•]. Un blanc a également été réalisé en appliquant la même procédure pour une solution mais sans HE. L'activité anti-radicalaire de chaque solution est ensuite calculée en pourcentage d'inhibition selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = 100 (A (\text{blanc}) - A (\text{échantillon})) / A (\text{blanc})$$

L'activité antioxydant des différents extraits est exprimée en concentration inhibitrice du 50% du signal (CI₅₀) initial de DPPH[•]. L'acide ascorbique est utilisé comme une référence. Toutes les mesures ont été effectuées en triple exemplaires.

III.6.2. Dosage antioxydant par ABTS^{•+} /2,2-azinobis-3-éthylbenzothiazoline- 6-sulfonate

L'ABTS^{•+} est la méthode la plus connue parmi les essais indirects. Le principe de cette méthode est de surveiller la décroissance du radical cationique ABTS^{•+} qui provient de l'oxydation du 2,2'-azinobis (3-éthylbenzothiaziline-6-sulfonate) causée par l'ajout des substances phénoliques. L'ABTS^{•+} présente une bande d'absorption importante entre 600 et

750 nm, ce qui nous permettra de la quantifier facilement par spectrophotométrie UV-Visible. La stabilité de ce radical cationique tout seul, sera affectée en présence de composés donneurs d'hydrogène. Pour cela, l'ABTS^{•+} réagit énergétiquement avec eux (exemple composés phénoliques) pour se convertir en ABTS²⁺ : une forme incolore. La Figure II.14 présente la réaction de l'ABTS^{•+} en présence d'un antioxydant.

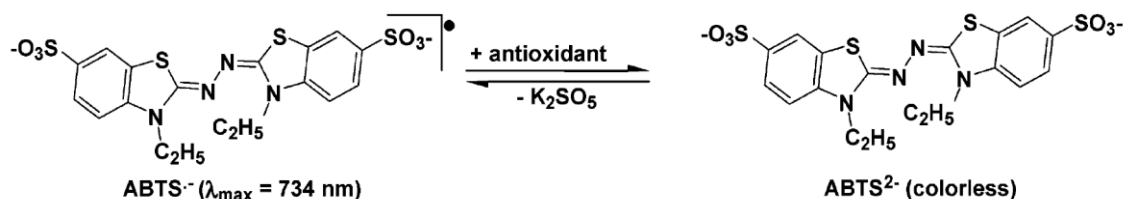


Figure II. 14 : Réaction de l'ABTS^{•+} en présence d'antioxydant [147]

Miller [145] fut le premier à utiliser cette méthode en 1993 pour tester des échantillons biologiques. Actuellement, cette méthode est utilisée pour tester les extraits naturels et les composés synthétiques. L'avantage de la méthode ABTS^{•+} est sa stabilité ainsi que la simplicité de routine au laboratoire. Cependant, cette méthode est limitée puisqu'elle est indirecte.

La capacité de piégeage des radicaux libres des échantillons par le cation ABTS^{•+} a été déterminée comme décrit par Re *et al.* en 1999 [148]. L'ABTS^{•+} a été généré par le mélange d'ABTS^{•+} (7mM) à pH 7,4 avec le persulfate de potassium (2,5 mM), et suivi par un stockage dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 avant utilisation. Le mélange est dilué avec de l'éthanol pour donner une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à 734 nm. Les extraits analysés, sont dilués à 1/20 de la concentration initiale, pour obtenir les meilleurs résultats expérimentaux. Chaque HE ou extrait aromatique dilué (100 µL) est mis à réagir avec une solution d'ABTS^{•+} (900 µL), puis l'absorbance est mesurée après 6 min d'incubation. L'acide ascorbique est utilisé comme standard et la capacité de piégeage des radicaux libres est exprimée en CI₅₀ (mg/L). Les valeurs calculées indiquent la concentration nécessaire pour piéger 50% des radicaux ABTS^{•+}. La capacité de piégeage des radicaux libres a été déterminée en utilisant la même l'équation précédemment utilisée pour la méthode DPPH[•]. Toutes les mesures ont été effectuées en triple exemplaires.

Chapitre III : Utilisation des techniques conventionnelles d'extraction de substances naturelles

Ce chapitre est consacré à la présentation des différents résultats expérimentaux obtenus par les méthodes conventionnelles d'extraction des HEs. Ce chapitre est composé de 2 parties.

*Dans une première partie, nous développerons l'extraction des HEs de *T. articulata*, par HD et extraction par solvant organique en utilisant un appareillage de type «Soxhlet». Une étude paramétrique a été mise en œuvre, pour déterminer les conditions opératoires optimales d'extraction.*

*Dans une deuxième partie, nous présenterons la validation du modèle mathématique de Sovová sur l'extraction des HEs par HD et l'application de ce modèle sur le *T. articulata*.*

Une partie des travaux rapportés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication en cours de corrections

Journal of Food Chemistry

Comparison of different methods for extraction from *Tetraclinis articulata*: yield, chemical composition and antioxidant activity.

N. HERZI, J. BOUAJILA, S. CAMY, M. ROMDHANE, J.-S. CONDORET

I. Extraction de *T. articulata* par «Soxhlet»

De nos jours, l'extraction conventionnelle des substances naturelles et en particulier l'HE est réalisée via deux grandes techniques : l'extraction par solvant organique «Soxhlet» et l'HD qui ont été décrites dans le précédent chapitre. Les qualités organoleptiques des produits extraits sont, surtout, exploitées dans l'industrie des arômes alimentaires et de la parfumerie [156,143]. Dans le cas de l'extraction par solvant organique «Soxhlet», plusieurs facteurs interviennent tels que : la nature du solvant, le temps d'extraction ou le nombre de cycles nécessaire, le débit de condensation, le rapport solvant/matière végétale et le taux de remplissage du cartouche [157].

Dans cette partie, quelques paramètres ont été examinés pour l'optimisation de l'extraction des HEs de *T. articulata* par le «Soxhlet». Les paramètres étudiés nous ont permis d'optimiser la production de substances naturelles de *T. articulata* et de le comparer avec les autres techniques d'extraction (chapitre VI).

I.1. Influence de la nature du solvant sur le rendement global d'extraction

Le choix du solvant d'extraction peut se faire sur la base de ses capacités de pénétration dans la matière végétale, de son pouvoir de solubilisation et de ses propriétés de transfert de matière. Notre choix du solvant repose essentiellement sur sa capacité et sa sélectivité en vue d'extraire l'ensemble des HEs sans avoir une action destructrice sur les molécules aromatiques. Par conséquent, il doit avoir une bonne capacité de pénétration cellulaire et de diffusion dans les organes sécréteurs. Ces aptitudes sont liées à la structure moléculaire du solvant et à ses caractéristiques physiques.

Dans notre étude nous avons choisi de travailler avec deux solvants organiques : l'hexane et l'éthanol. L'hexane est un solvant non-polaire, avec un comportement assez similaire à celui du CO₂ supercritique ; il est possible d'extraire un grand nombre de composants présents dans l'HE (la capacité anti-oxydante est ensuite comparée à l'extraction au CO₂-SC). L'éthanol est connu comme un bon solvant d'extraction des composés polaires tels que les composés phénoliques ; ces deux solvants ont été choisis en raison de leurs polarités opposées permettant l'extraction de différents types de composés (non polaire et polaire).

Dans le but d'évaluer la capacité d'extraction de ces deux solvants, les extractions ont été réalisées dans les mêmes conditions opératoires : une masse de matière végétale de 100g avec un volume de solvant à 400 mL, un débit de solvant égal à 1,9 mL/s et un taux de

remplissage de matière végétale de 60%. Les résultats obtenus pour les deux solvants en termes de rendement global sont présentés sur la Figure III.1.

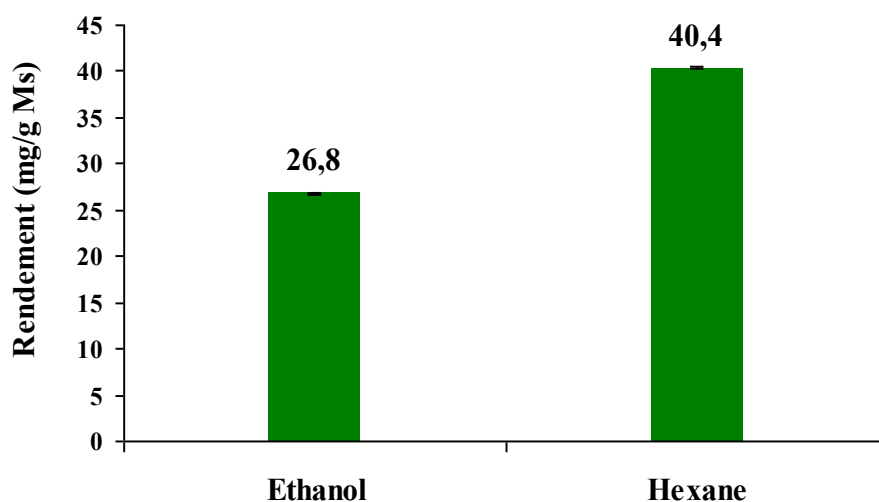


Figure III. 1: Rendement global d'extrait de *T. articulata* obtenu par Soxhlet avec l'hexane et l'éthanol pour t=6h.

Les deux solvants utilisés, l'hexane et l'éthanol, sont de polarités très différentes. Les résultats montrent que le rendement d'extraction avec l'hexane est le plus élevé : 40 mg/g par rapport à 26,8 mg/g pour l'éthanol (voir la Figure III.1). Ce résultat est probablement dû au fait que les composés non volatils de *T. articulata* sont beaucoup plus solubles dans l'hexane que dans l'éthanol. Bien que l'hexane donne un rendement plus important en extrait, l'éthanol a été choisi pour l'étude des autres paramètres car il est moins toxique et dans le but d'extraire plus de composés phénoliques.

I.2. Influence de la durée d'extraction

La durée d'extraction correspond au temps nécessaire au solvant pour pénétrer dans la matière végétale et extraire la totalité des substances naturelles. Ce paramètre dépend donc du type de solvant et de la matière végétale ainsi que de sa structure.

Dans ce contexte, afin d'étudier l'influence de ce paramètre et d'optimiser le temps d'extraction des produits naturels de *T. articulata* par Soxhlet avec l'éthanol comme solvant, trois expériences ont été réalisées pour trois durées différentes d'extraction (4h, 6h et 8h). Les résultats sont représentés sur la Figure III.2.

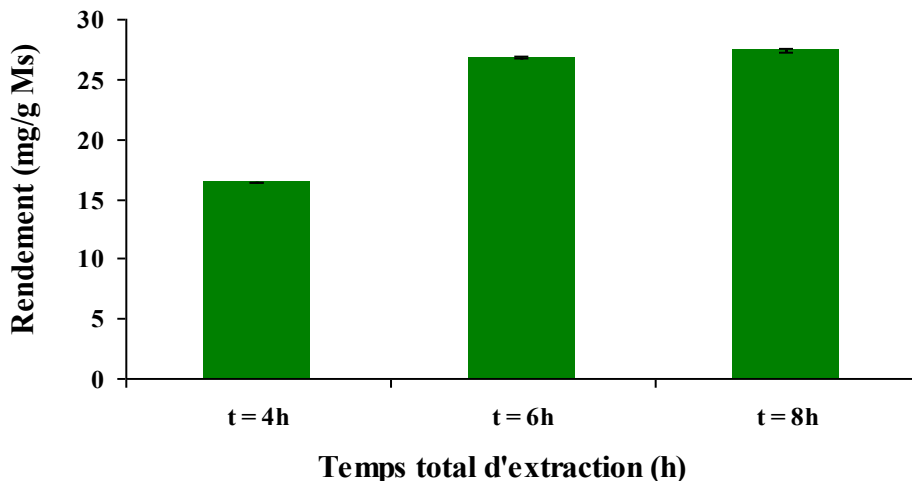


Figure III. 2 : Rendement global d'extrait de *T. articulata* obtenu par Soxhlet en fonction du temps d'extraction avec l'éthanol pour un débit de solvant 1,9 mL/s.

Les résultats montrent qu'une durée de 4 heures n'est pas suffisante pour l'extraction de la totalité des huiles de *T. articulata*. De plus, on constate que les résultats obtenus après 6 et 8 heures d'extraction sont très proches (2% d'écart). Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont été reportés par Anees Ahmad *et al.* en 2010 [158] concernant l'optimisation des conditions opératoires du Soxhlet. Notre objectif est de minimiser le temps d'extraction et donc réduire la consommation énergétique. En conséquence la durée de 6 heures a été choisie comme le temps d'extraction adéquat pour récupérer les fractions volatiles de *T. articulata* avec l'éthanol.

I.3. Influence de la taille des particules

Trois tailles de particules moyennes ont été testées avec l'éthanol pour une durée d'extraction de 6 heures. Les résultats sont représentés sur la Figure III.3.

Les résultats montrent l'effet de la granulométrie sur le rendement global d'extraction. En effet, la capacité d'extraction des produits naturels des plantes aromatiques et médicinales par solvant organique est liée à la structure de la matière première. Ainsi, après le broyage, la taille des particules diminue et donc la surface spécifique devient plus grande, ce qui facilite la pénétration du solvant à l'intérieur des particules.

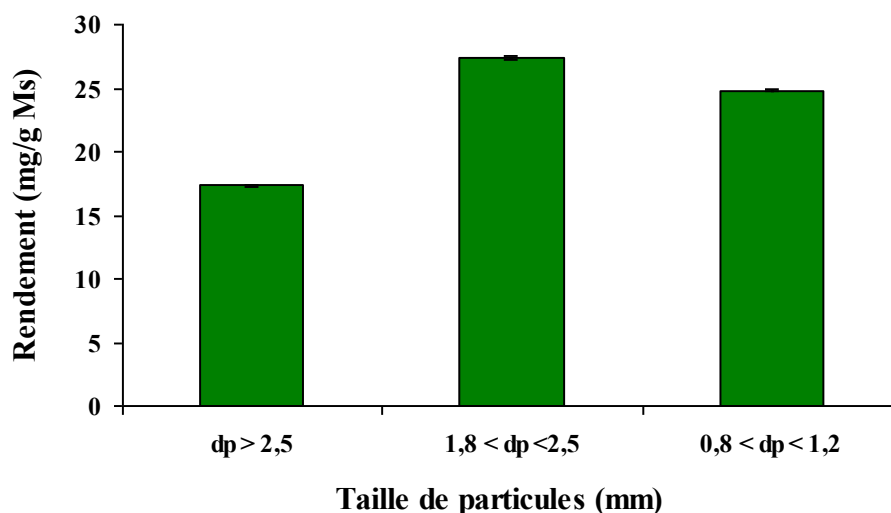


Figure III. 3 : Variation du rendement global d'extraction de *T. articulata* avec l'éthanol au "Soxhlet" pour différentes tailles de particules avec un débit de 1,9 mL/s et t=6h.

De plus, la résistance au transfert de matière interne des solutés va diminuer. Cela explique l'augmentation du rendement après le broyage. Cependant, une diminution du rendement est observée pour les particules les plus fines, ce résultat est probablement dû à la perte de composés volatils sur les couteaux du broyeur lors du broyage plus intense nécessaire pour obtenir les plus petites particules.

I.4. Influence de débit du solvant d'extraction

Le débit du solvant d'extraction dépend directement de la puissance de chauffe, qui influe sur le nombre de cycles effectués. L'influence de ce paramètre a été étudiée afin d'optimiser le processus ainsi que le nombre de cycles nécessaire. Les résultats obtenus pour trois débits différents (nous avons fait varier la puissance de chauffe et par conséquent le débit) sont représentés sur la Figure III.4.

Les résultats montrent l'existence d'un débit optimal pour une meilleure extraction. En effet, une augmentation du débit de 1,5 mL/s à 1,9 mL/s permet une amélioration du rendement global d'extraction de 36%. Ce résultat est probablement dû à l'augmentation du nombre de cycles avec l'augmentation du débit et au fait que l'extraction avec un débit de 1,5 ml/s ne soit pas terminée au bout de 6 heures Il faut donc plus du temps pour un débit faible.

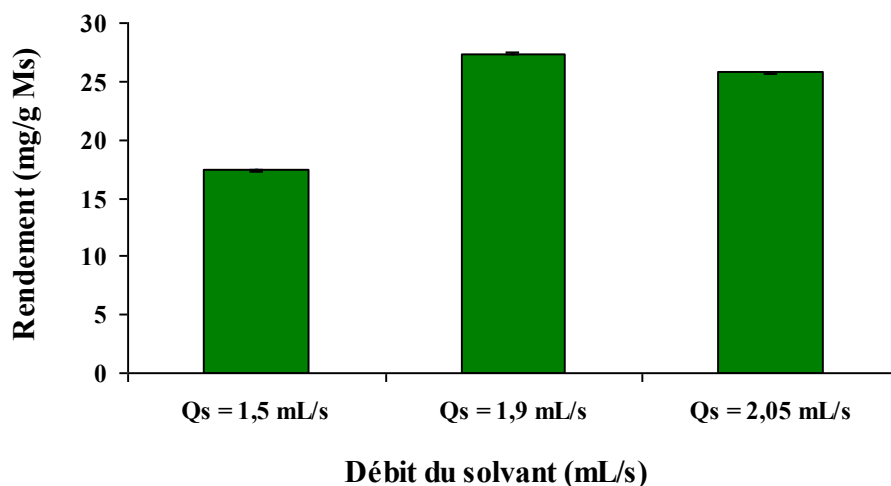


Figure III. 4 : Variation du rendement global d'extraction de *T. articulata* pour différentes valeurs de débit du solvant.

Cependant, pour un débit relativement élevé, 2,05 mL/s, une diminution de 6% a été observée. Cet écart est relativement faible et peut être attribué aux incertitudes expérimentales. Par ailleurs, en travaillant avec un débit élevé, le temps de séjour du solvant dans la cartouche est faible ce qui réduirait le temps de contact entre le solide et le solvant. Par conséquent, pour l'extraction des substances naturelles de *T. articulata* par solvant organique, il semble qu'un débit modérément élevé soit nécessaire. Dans notre cas, le meilleur résultat est obtenu avec 1,9 mL/s.

D'autre part, le choix de ce paramètre lié au coût de fonctionnement du procédé, pourrait être optimisé à travers une étude technico-économique.

I.5. Influence du taux de remplissage et rapport quantité de solvant/ masse de matière végétale sèche (Ms)

Dans le but de déterminer la quantité de matière végétale et de solvant à utiliser pour garantir une meilleure extraction, l'effet du taux de remplissage de la cartouche et le rapport solvant/Mv ont été étudiés pour l'extraction de *T. articulata* avec l'éthanol par «Soxhlet». Les résultats sont représentés sur les Figures III.5 et III.6.

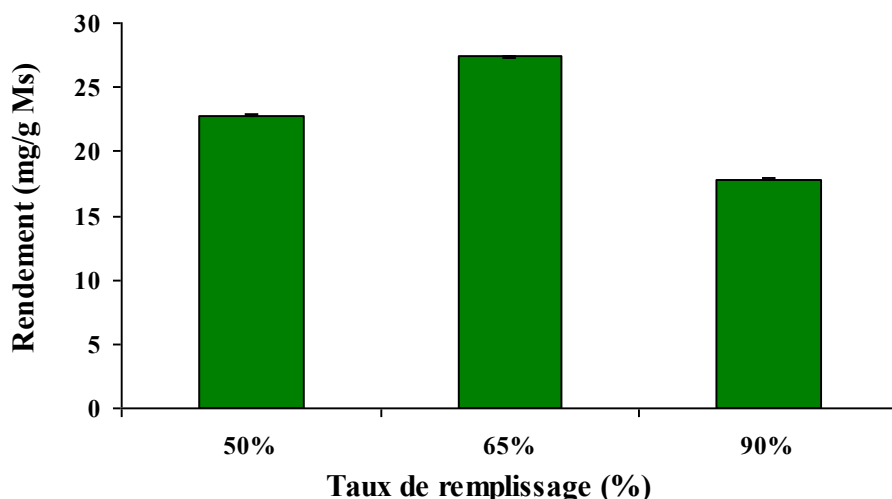


Figure III. 5 : Variation du rendement global d'extraction de *T. articulata* en fonction du taux de remplissage pour un rapport solvant/Ms =4 et t=6h.

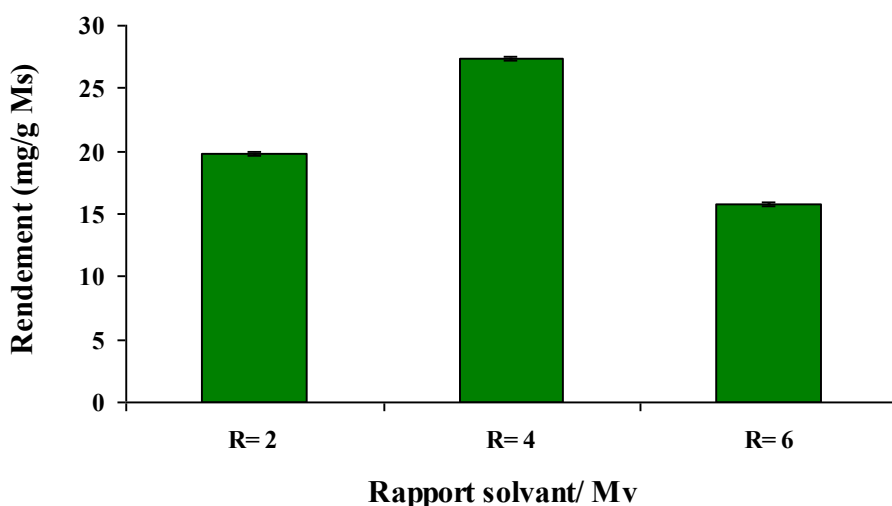


Figure III. 6 : Variation du rendement global d'extraction de *T. articulata* en fonction du rapport solvant/Ms avec un taux de remplissage égal à 65% et t=6h.

Les résultats montrent que le rendement global d'extraction de *T. articulata* dépend de la quantité de matière utilisée ainsi que de la quantité de solvant correspondant à celle-ci. La Figure III.5 montre qu'un taux de remplissage moyen de 65% est préférable pour assurer l'homogénéité et le passage du solvant à travers la totalité des particules. En effet, la concentration du solvant en contact avec la matière végétale est faible tant que le taux de remplissage est faible, ce qui permet d'augmenter la surface d'échange. Pour ce taux de remplissage, la Figure III.6 montre qu'une quantité faible de solvant est déconseillée et qu'une quantité plus grande peut ralentir le processus d'extraction et demande plus de cycles

pour extraire la totalité de soluté de la plante. Ainsi, notre but étant de minimiser la quantité de solvant utilisée nous pouvons considérer qu'un rapport solvant/Mv égal à 4 donne le meilleur rendement d'extrait de *T. articulata*.

II. Extraction de *T. articulata* par HD

Les conditions opératoires d'extraction des HEs par HD doivent être optimisées, afin de minimiser le temps d'extraction, améliorer le rendement global d'HEs et la qualité des produits finaux. Dans ce cas, une étude paramétrique a été effectuée, en faisant varier le temps d'extraction, le rapport masse d'eau/masse de matière végétale, et le débit de condensation dans le condenseur.

II.1. Cinétique d'extraction des HEs de *T. articulata*

Le temps est un paramètre très important dans le processus d'extraction qui dépend principalement de la tension de la vapeur des composés aromatiques. En effet, la cinétique d'extraction de l'HE dépend de la nature du substrat végétal traité, de la localisation et de la nature des sites producteurs des HEs qui influent sur le phénomène de transfert par HD, et par la suite sur le temps total d'extraction [3,159,160]. Dans le but d'étudier ce paramètre et de déterminer le temps nécessaire d'extraction des HEs de *T. articulata*, un suivi du rendement en fonction de la durée a été réalisé à l'aide de l'appareil «Clevenger» décrit dans le chapitre précédent. Les résultats de la cinétique d'extraction sont présentés sur la Figure III.7.

La Figure III.7 montre que l'allure de la cinétique d'extraction est classique. Elle peut être divisée en deux étapes : la première étape est rapide (jusqu'à 100 min) et elle correspond à l'extraction des HEs situées à la surface du solide. La deuxième étape moins rapide que la première et elle correspond à l'extraction des HEs situées au cœur du solide.

A partir de cette courbe, on peut voir que l'extraction est presque complète (98%) après 180 min. L'extraction après 150 minutes n'a pas augmenté significativement le rendement en HE.

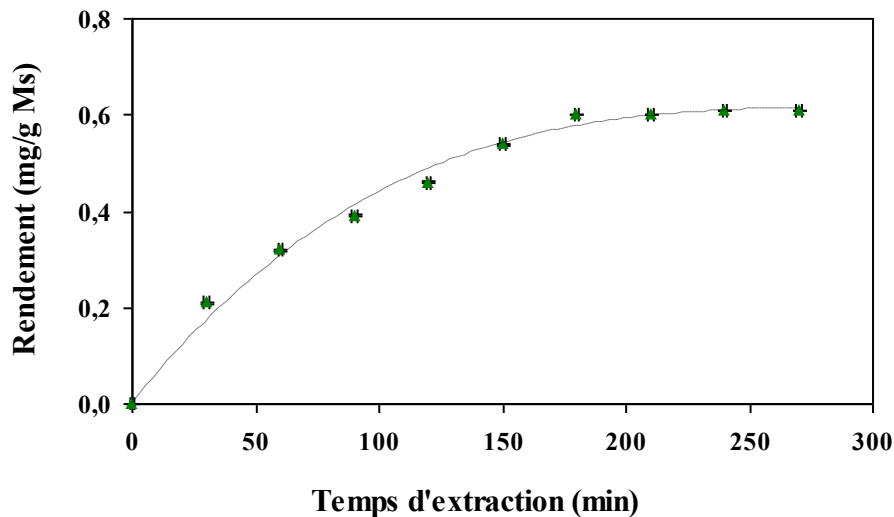


Figure III. 7: Cinétique d'extraction des HEs de *T. articulata* obtenues par HD ($Q=0,02$ mL/s ; $R=10$; $dp=1,2$ mm).

Ce résultat expérimental confirme le principe de la deuxième loi de diffusion de Fick où après un certain temps, la concentration en soluté dans la matrice végétale diminue de sorte qu'un équilibre final est atteint [160]. Ainsi, prolonger le temps d'extraction au-delà de cette durée n'augmente pas significativement le rendement d'extrait. Par ailleurs, la vitesse de transfert est ainsi décroissante jusqu'à atteindre une valeur minimale nulle à laquelle il y a épuisement des feuilles [161]. Le comportement de cette courbe de cinétique d'extraction est similaire avec ce que nous avons vu précédemment pour l'extraction au CO_2 -SC. Mais ce dernier est plus intéressant en termes de temps.

II.2. Effet du débit de condensation

Le débit de condensation (mL/s) est directement lié au flux de vapeur sortant du ballon chauffé et est donc lié à la puissance de chauffe du chauffe-ballon. Celle-ci, a été fixée à une valeur fixée manuellement sur un rhéostat. Dans le but de minimiser les dépenses en énergie, quatre puissances de chauffe ont été testées pour l'extraction des HEs de *T. articulata*. Les résultats obtenus pour une durée d'extraction de 240 min, une masse de 100g de *T. articulata* et un rapport eau/ matière végétale de 10 sont représentés sur la Figure III.8. Le temps d'extraction pour chaque expérience à partir duquel on obtient la première goutte de condensation est 180 min.

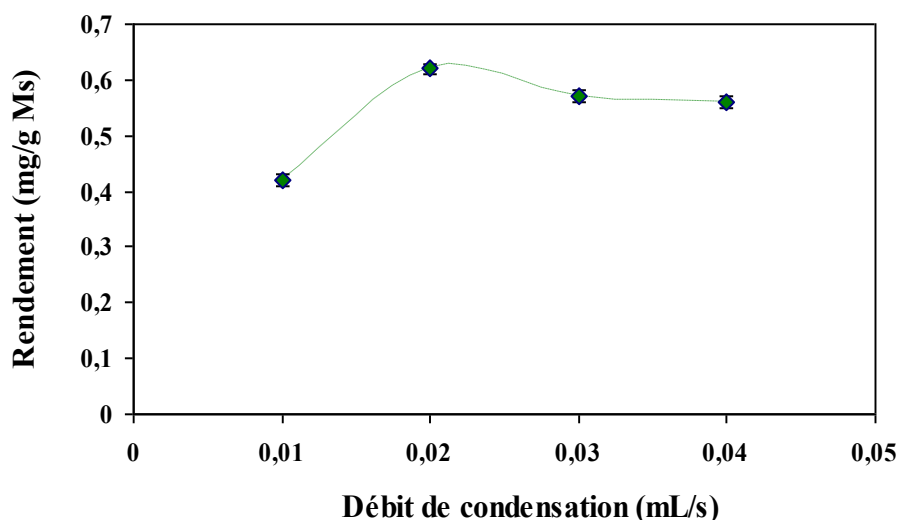


Figure III. 8 : Variation du rendement global en HE de *T. articulata* obtenu par HD pour différents débits de condensation (t=180 min ; R=10 ; dp=1,2 mm).

Les résultats montrent que l'extraction avec un faible flux de vapeur (débit de condensation <0,02mL/s) donne un rendement d'extraction faible, car la cinétique d'extraction est ralentie. Ainsi, un flux de vapeur élevé permet d'augmenter la capacité du système à extraire les HES localisées dans la surface de la plante. Il permet aussi de libérer les HES et de les forcer à diffuser à travers les particules végétales. Ceci, permet une augmentation du taux initial d'extraction et du rendement global d'huile [160]. En effet, à faible flux de vapeur, pour obtenir le même rendement, plus de temps serait nécessaire et par conséquent l'extraction n'était probablement pas complète au bout de 180 minutes. Cependant, l'augmentation du débit de condensation à 0,045mL/s a aussi fait apparaître une baisse du rendement global d'extraction. Une grande augmentation du débit de condensation induit une diminution du temps de séjour du condensat dans le décanteur et elle ne laisse pas le temps aux HES de se séparer du liquide. En conséquence, afin de minimiser la quantité d'énergie dissipée, le débit égal à 0,02mL/s a été choisi comme le meilleur débit pour l'extraction des HES de *T. articulata*.

II.3. Effet du rapport eau /matière végétale sèche (Ms)

Quatre rapports quantité d'eau/quantité de matière végétale sèche ont été testés pour l'extraction des HES de *T. articulata* avec un débit de condensation de 0,02mL/s et une durée

d'extraction de 180 min pour une quantité de matière végétale constante 50g. Les résultats sont représentés sur la Figure III.9.

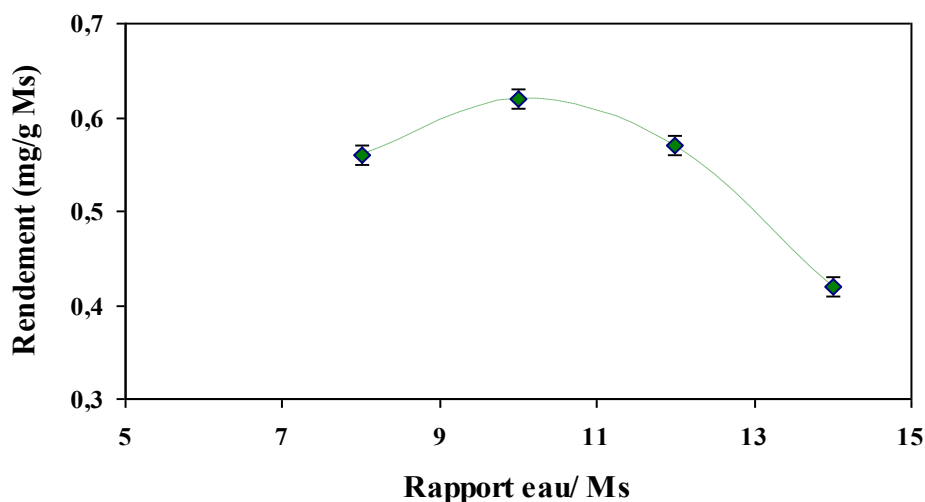


Figure III. 9 : Variation du rendement global en HE de *T. articulata* obtenu par HD en fonction de rapport eau/Ms ($t=180$ min ; $Q=0,02$ mL/s ; $dp=1,2$ mm).

Les résultats montrent l'effet de la quantité d'eau sur le rendement global d'extraction d'HE où apparaît un optimum autour de la valeur 10. Ceci a également été mis en évidence par Muhammad Hazwan *et al.* [162]. En effet, un minimum d'eau ($R=10$), où la totalité de la matière végétale est immergée dans l'eau, est nécessaire pour obtenir un système d'ébullition solide-liquide efficace. Cependant, une quantité élevée d'eau ($R>12$) est néfaste pour le rendement, probablement parce que cela induit une perte de solutés hydrosolubles dans un volume plus important d'eau. La diminution du rendement final des HEs pour un taux de solvant élevé peut être attribuée à la dissolution et/ou à la transformation hydrolytique des constituants de l'huile avec l'augmentation de la quantité d'eau [160]. Cette influence négative des valeurs excessives de taux de solvant également été observée [163] et cela a été expliqué et justifié par une approche de modélisation.

Enfin, les conditions optimales d'extraction de *T. articulata* par le procédé d'HD ont été estimées à une durée d'extraction de 3 heures; un débit de condensation de 0,02mL/s et un taux de solvant égal à 10. Les différents paramètres étudiés dans cette partie nous ont permis d'optimiser la production de l'HE de *T. articulata* par l'application du modèle mathématique développé par Sovová [163].

III. Modélisation de l'HD

Les données cinétiques de l'extraction des HEs et précisément de *T. articulata* sont très rares. La mise en œuvre d'un modèle mathématique de la cinétique d'extraction pourrait d'une part améliorer la compréhension du processus d'extraction et d'autre part éviter la réalisation de nombre trop important d'expériences [164]. En plus, la modélisation permet aussi un meilleur contrôle de la cinétique d'extraction.

III.1. Choix du modèle

La distribution initiale du soluté dans la matière végétale peut déterminer le choix du modèle à utiliser. En effet, la substance extractible peut être libre à la surface de la matière solide ou dans les pores ou également distribuée à l'intérieur des cellules végétales. Chaque distribution correspond à plusieurs modèles. En outre, ces modèles peuvent rendre compte de l'influence de différentes résistances au transfert de masse, de l'existence des conditions d'équilibre, ainsi ils peuvent mettre en évidence la transition entre les différents mécanismes de transfert de masse [163,165-168]. Par conséquent, de nombreux modèles ont été proposés afin de décrire la diffusion du soluté contenu dans la solution au contact du solide vers la masse fluide.

En effet, Svetomir *et al.* [160] ont étudié la cinétique d'extraction de l'HE de *Juniperus communis* par HD à l'aide d'un modèle à deux paramètres de diffusion à travers la matière végétale. Le modèle a été bien corrélé avec les résultats expérimentaux.

Le même raisonnement a été mis en œuvre avec le modèle développé en 2011 par Jutarut Pornpunyapat *et al.* pour l'extraction des HEs par HD [169] dans lequel il a choisi l'HD batch et sans réaction chimique. Le modèle est basé sur la première loi de Fick (Eq.III.1):

$$\frac{\partial q_p}{\partial t} = D_{eff} \frac{\partial^2 q_p}{\partial x^2} \quad \text{Eq. III.1}$$

avec :

q_p : concentration moyenne d'HE dans la plante à un temps ' t '.

x : distance le long de la direction de diffusion.

D_{eff} : coefficient de diffusion effective.

Ensuite, on peut citer le modèle de la couche limite, basé sur l'hypothèse que la particule est entourée d'un film mince, qui introduit une résistance supplémentaire au transfert de matière. Le gradient de concentration est considéré comme linéaire dans la couche et s'annule à l'extérieur. Développé par Benyoussef *et al.* 2002 [161], ce modèle est basé sur deux équations. La première pour le soluté chimiquement lié:

$$\frac{\partial X_f(t,r)}{\partial t} = -K_c X_f(t,r) \quad \text{Eq. III.2}$$

Et la deuxième pour le soluté libre :

$$\frac{\partial X_1(t,r)}{\partial t} = D_a \frac{\partial^2 X_1(t,r)}{\partial r^2} + \frac{2D_a}{r} \frac{\partial X_1(t,r)}{\partial r} + K_c X_f(t,r) \quad \text{Eq. III.3}$$

Enfin, Sovová [10] a développé un modèle tenant compte de cellules cassées pendant l'étape de broyage et de cellules intactes. Ce modèle est écrit pour deux types de particules : sphérique et plates.

III.2. Modèle de Sovová pour l'HD des HEs

D'après la structure de notre plante *T. articulata* observée par le MEB (Figure III-annexe) (Chapitre II) et les résultats obtenus expérimentalement, le modèle de Sovová [10] a été choisi.

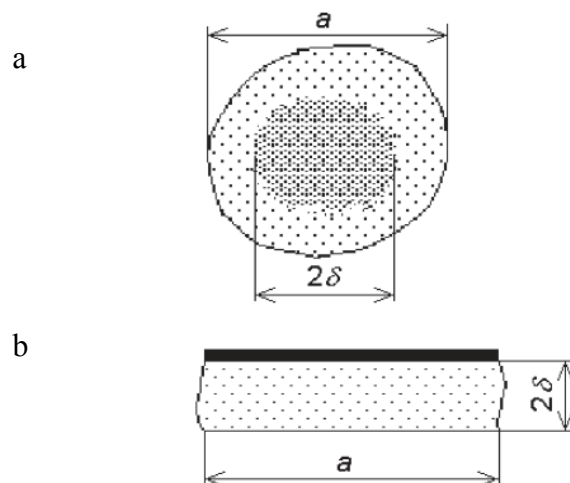


Figure III. 10: Schéma des deux types de particules traitées: (a) particule sphérique avec le cœur de cellule intacte entouré par les cellules cassées; (b) particule plate où les HEs se présentent dans la surface dans des trichomes glandulaires.

Les deux types de particules traitées par ce modèle sont schématiquement représentés dans la Figure III.10.

III.2.1. Hypothèses du modèle

Pour réaliser la modélisation du processus de transfert de matière, des hypothèses simplificatrices ont dû être posées, à savoir :

1. L'HE peut être considérée comme un composé unique
2. Les particules sont identiques en taille, forme, teneur en HE
3. Pour chaque particule :
 - la fraction d'HE dans les cellules cassées de la plante est notée ' r '.
 - la fraction d'HE dans les cellules intactes de la plante est notée ' $1-r$ '.
4. On considère que le système se comporte comme un lit fluidisé à trois phases (solide, liquide et vapeur).
5. Dans le bilan massique, on néglige la masse d'eau située dans la phase vapeur, dans le condenseur et dans le séparateur par rapport à la masse d'eau placée dans le ballon.
6. La résistance au transfert de masse dans les cellules brisées est négligeable.
7. L'équilibre est établi instantanément entre les phases :

$$x_v = k_v x_w = k_v k_w x_b \quad \text{Eq. III.4}$$

Avec :

x_v : concentration massique d'huile dans la phase vapeur, g (huile)/ kg (vapeur)

x_s : concentration massique d'huile restant dans l'hydrolat, g (huile)/ kg (eau)

x_w : concentration massique d'huile dans l'eau bouillante, g (huile)/ kg (matières végétales)

k_v : coefficient de partage liquide-vapeur

k_w : coefficient de partage liquide-cellules cassées

8. La concentration initiale dans le noyau de particules composées des cellules cassées est égale à la concentration en particules non traitées (x_u) :

$$x_i(t=0) = x_u \quad \text{Eq. III.5}$$

Avec :

x_u : concentration massique d'HE non traitée, g (huile)/kg (matière sèche)

9. La concentration d'HE dans l'eau (hydrolat) est supposée être constante (x_s). Le rendement au cours du temps est calculé par :

$$Y = \frac{Q}{N} \int_0^t (x_v - x_s) dt \quad \text{Eq. III.6}$$

Le début de l'extraction $t=0$ est le moment où les premières gouttes de la condensation atteignent le séparateur.

III.2.2. Bilan massique de l'HE dans l'extracteur :

L'équilibre entre les cellules cassées, l'eau bouillante et la phase vapeur est supposé être mis en place quasi-instantanément. Ainsi, le transfert de matière pour les cellules intactes est simulé comme un processus quasi-stationnaire où l'évolution de la fraction de soluté au cours du temps s'écrit :

$$-\frac{dx_i}{dt} = \frac{k}{\lambda} (x_i - x_b) \quad \text{Eq. III.7}$$

A $t = 0$, une partie de l'HE contenue dans les cellules cassées facilement accessibles a été déjà dissoute dans l'eau bouillante. Dans ce cas, le bilan d'HE dans les cellules cassées et dans l'eau bouillante s'écrit :

$$rN(x_u - x_b) = N_w x_w, \text{ pour } t=0, \quad \text{Eq. III.8}$$

D'après l'hypothèse, (7) la concentration d'HE dans les différentes phases à $t = 0$ s'écrit :

$$x_i = x_u \quad \text{Eq. III.9}$$

$$x_b = \frac{r}{r + \gamma k_w} x_u \quad \text{Eq. III.10}$$

$$x_w = \frac{k_w r}{r + \gamma k_w} x_u \quad \text{Eq. III.11}$$

$$x_v = \frac{k_v k_w r}{r + \gamma k_w} x_u \quad \text{Eq. III.12}$$

Le bilan massique global sur l'HE dans l'extracteur pour des particules homogènes peut s'écrire :

$$\text{Accumulation (A)} = \text{Entrée (E)} - \text{Sortie (S)}$$

$$(1-r)N \frac{dx_i}{dt} + rN \frac{dx_b}{dt} + N_w \frac{dx_w}{dt} + Q(x_v - x_s) = 0 \quad \text{Eq. III.13}$$

D'après l'équation III.4 : $\frac{dx_i}{dt} + \frac{k}{\lambda}(x_i - x_b) = 0$ On peut écrire :

$$x_b = \frac{x_v}{k_v k_w} \quad \text{Eq. III.14}$$

Donc on obtient :

$$\frac{\lambda}{k} \frac{dx_i}{dt} + x_i - \frac{x_v}{k_v k_w} = 0 \quad \text{Eq. III.15}$$

en utilisant le temps adimensionnel :

$$\tau = \frac{k}{\lambda} t \quad \text{Eq. III.16}$$

L'équation III.15 devient :

$$\frac{dx_i}{d\tau} + x_i - \frac{x_v}{k_v k_w} = 0 \quad \text{Eq. III.17}$$

Ainsi pour simplifier l'équation de bilan (Equation III.7), des paramètres adimensionnels ont été introduits :

$$\alpha = \gamma k_w + r \quad \text{Eq. III.18}$$

$$\beta = \frac{x_s}{k_v k_w x_u} \quad \text{Eq. III.19}$$

$$Z = \frac{Q k_v k_w \lambda}{N k \alpha} \quad \text{Eq. III.20}$$

D'où le bilan sur l'HE dans l'extracteur qu'on exprime alors :

$$-k_v k_w \frac{1-r}{\alpha} x_i + \frac{dx_v}{d\tau} + \left(\frac{1-r}{\alpha} + Z \right) x_v = Z x_s \quad \text{Eq. III.21}$$

La résolution de cette équation avec les conditions initiales pour $\tau=0$, $x_i = x_u$

et $x_v = \frac{k_v k_w r}{\alpha} x_u$, en utilisant la transformée de Laplace qui fournit une méthode générale de

résolution des équations différentielles conduit à :

$$\frac{x_i}{x_u} = \beta + \frac{1}{2}[(1 - \beta - B_1)\exp(-p_1\tau) + (1 - \beta + B_1)\exp(-p_2\tau)] \quad \text{Eq. III.22}$$

$$\frac{x_v}{k_v k_w x_u} = \beta + \frac{1}{2\alpha}[(r - \alpha\beta - B_2)\exp(-p_1\tau) + (r - \alpha\beta + B_2)\exp(-p_2\tau)] \quad \text{Eq. III.23}$$

avec :

$$p_1 = \frac{1}{2}(h + \sqrt{h^2 - 4Z}) \quad \text{Eq. III.24}$$

$$p_2 = \frac{1}{2}(h - \sqrt{h^2 - 4Z}) \quad \text{Eq. III.25}$$

$$h = 1 + \frac{1-r}{\alpha} + Z \quad \text{Eq. III.26}$$

$$B_1 = \frac{2(Z + 1/\alpha) - h(1 + \beta)}{\sqrt{h^2 - 4Z}} \quad \text{Eq. III.27}$$

$$B_2 = \frac{2(1 + \alpha\beta Z) - h(r + \alpha\beta)}{\sqrt{h^2 - 4Z}} \quad \text{Eq. III.28}$$

Où $(h^2 - 4Z) = (1 - Z)^2 + [(1 - r) / \alpha + 2 + 2Z] (1 - r) / \alpha$, donc $(h^2 - 4Z)$ n'est pas négatif et p_1 et p_2 sont des nombres réels. En appliquant l'équation III.3 et celle obtenue par la résolution de la transformée de Laplace, l'équation III.16 et l'équation III.12, le rendement d'HE peut s'écrire :

$$Y = \frac{Q}{N} \int_0^{\tau} (x_v - x_s) d\tau = \frac{Q}{N} \int_0^{\tau} (x_v - \beta k_v k_w x_u) d\tau \quad \text{Eq. III.29}$$

$$Y = \frac{Q}{N} \int_0^{\tau} \left(\left[k_v k_w x_u \left(\beta + \frac{1}{2\alpha} \left[\begin{array}{l} (r - \alpha\beta - B_2)\exp(-p_1\tau) \\ + (r - \alpha\beta + B_2)\exp(-p_2\tau) \end{array} \right] \right) \right] - \beta k_v k_w x_u \right) d\tau \quad \text{Eq. III.30}$$

L'intégration de l'équation III.29 permet de déterminer l'expression du rendement d'HE:

$$Y = Y_{\infty} \left[1 - f \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) - (1 - f) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right) \right] \text{ Pour } T_2 > T_1 \quad \text{Eq. III.31}$$

avec :

$$f = \frac{Z}{2p_1} \frac{r - \alpha\beta - B_2}{1 - \beta(\gamma k_w + 1)} \quad \text{Eq. III.32}$$

$$T_1 = \frac{\lambda}{kp_1} \quad \text{Eq. III.33}$$

$$T_2 = \frac{\lambda}{kp_2} \quad \text{Eq. III.34}$$

Y_∞ est le rendement asymptotique déterminé à partir des résultats à l'équilibre, c'est-à-dire quand 't' n'a plus d'influence, où on a :

$$\frac{dx_i}{dt} = 0, \quad \frac{dx_b}{dt} = 0 \quad \text{et} \quad \frac{dx_w}{dt} = 0$$

Alors $Q(x_v - x_s) = 0$ et l'équilibre liquide-vapeur donne $x_v = k_v x_w$

Donc,

$$Y_\infty = \frac{Q_r}{Nx_u} \quad \text{Eq. III.35}$$

où Q_r est la quantité récupérée, qui peut être déterminé par la relation suivante :

Quantité récupérée = Quantité initiale – Quantité restante

$$Q_r = Q_i - Q_{res} \quad \text{Eq. III.36}$$

La quantité restante est la somme de la quantité restante dans les cellules (intactes et brisées) et la quantité contenue dans l'eau :

$$Q_{res} = rNx_b + (1-r)x_i + N_w x_w \quad \text{Eq. III.37}$$

$$Q_{res} = rN \frac{x_s}{k_v k_w} + (1-r) \frac{x_s}{k_v k_w} + N_w \frac{x_s}{k_v} = N \frac{x_s}{k_v k_w} + N_w \frac{x_s}{k_v} \quad \text{Eq. III.38}$$

$$Q_r = Nx_u - N \frac{x_s}{k_v k_w} - N_w \frac{x_s}{k_v} \quad \text{Eq. III.39}$$

$$Q_r = N(x_u - x_u \beta - x_u \gamma \beta k_w) \quad \text{Eq. III.40}$$

$$Q_r = Nx_u (1 - \beta(1 - \gamma k_w)) \quad \text{Eq. III.41}$$

Donc :

$$Y_{\infty} = \frac{Qr}{N} = x_u (1 - \beta(1 - \gamma k_w)) \quad \text{Eq. III.42}$$

III.3. Application du modèle

Les paramètres du modèle dans le cas d'extraction des HEs de *T. articulata* sont présentés dans le Tableau III.1. Les grandeurs accessibles ont été déterminées expérimentalement. Le coefficient de transfert k , les constantes d'équilibre k_v et k_w ainsi que le taux de cellules cassées r sont identifiés à partir des résultats expérimentaux.

Tableau III. 1: Paramètres du modèle pour l'extraction d'HE de *T. articulata*

Grandeurs accessibles		Grandeurs estimées		Paramètres du modèle	
Q (kg/min)	0,012	k (m/min)	$1,64 \cdot 10^{-7}$	Yinf (mg/g)	0,63
a (m)	0,0012	k_v	0,80	f	1,14
x_u (g HE/kg)	0,7	k_w	0,80	T_1	96,65
x_s (g HE/kg d'eau)	0,0001	r	0,99	T_2	237,13
N (kg matière sèche)	0,05			T_2/T_1	2,45
N_w (kg eau)	0,5				

Avec a : le diamètre moyen de particule, x_s : concentration massique d'HE restant dans l'hydrolat, g (HE)/kg (eau) déterminée expérimentalement, et x_u : concentration massique d'HE non traitée, g (HE)/kg (matières sèches).

La simulation de la cinétique d'extraction des HEs de *T. articulata* par HD a été effectuée en supposant les particules sphériques.

La première étape du traitement des données est l'ajustement de l'équation Eq. III.31 avec les données expérimentales, comme le montre la Figure III.11, avec le résultat $Y_{inf}=0,63$ mg/g, $f=1,14$; $T_1=96,65$ min et $T_2=237,13$. L'écart-type des rendements expérimentaux et calculés liés à la teneur en huile des feuilles de *T. articulata* a été de 0,4%. Sur la Figure III.11 la courbe cinétique expérimentale est comparée avec la courbe calculée en utilisant le modèle et montre qu'un bon accord est obtenu ce qui valide le choix du modèle proposé.

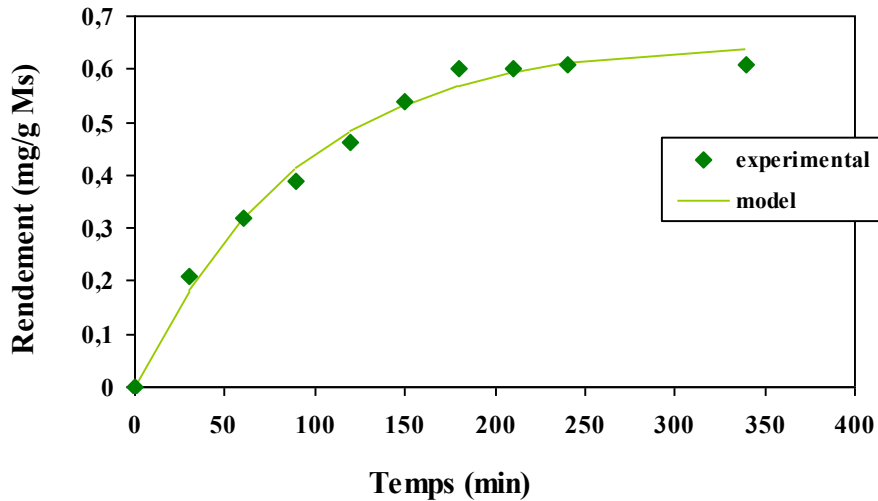


Figure III. 11 : Simulation de l'extraction de l'HE de *T. articulata* par HD (particules sphériques)

L'application de ce modèle à l'HE pour différents rapport eau/Mv a donné les courbes cinétiques représentées sur la Figure III.12.

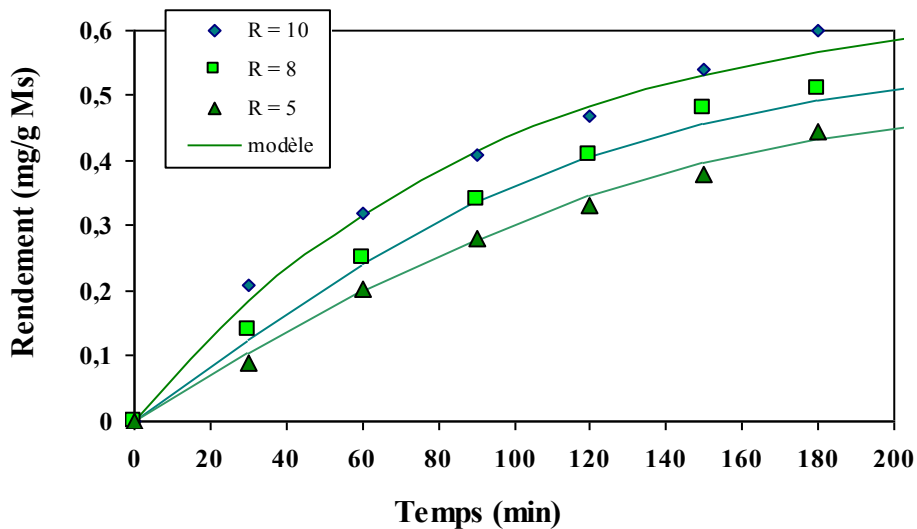
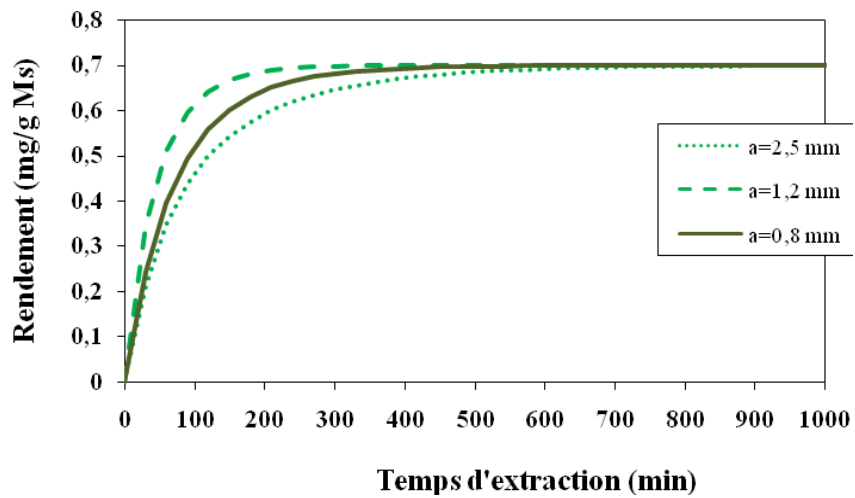


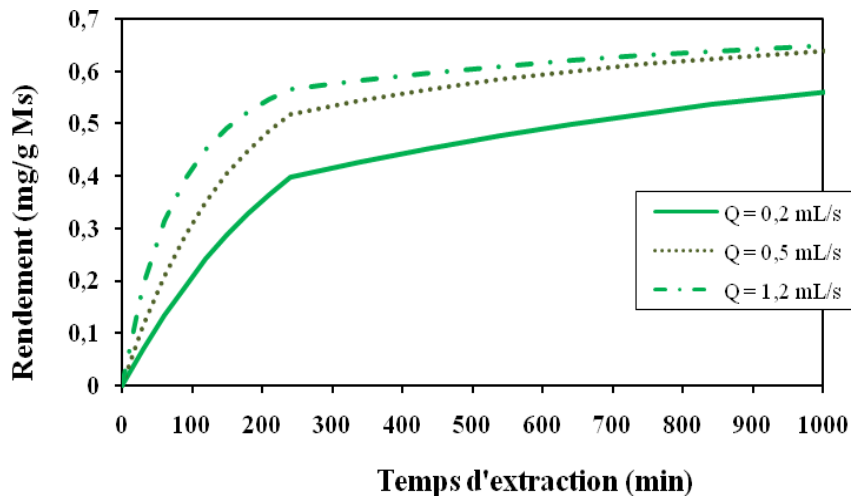
Figure III. 12 : Simulation avec le modèle de Sovová de l'extraction de l'HE de *T. articulata* par HD ($t=180$ min ; $Q=0,02$ mL/s ; $dp=1,2$ mm).

Les résultats présentés dans les deux Figures montrent, d'une part, que les courbes relatives au modèle sont en accord avec les courbes expérimentales. D'autre part, les courbes présentées dans la Figure III.12 montrent l'effet du rapport eau/matière végétale sèche sur la cinétique d'extraction et aussi bien sur le rendement global d'HEs de *T. articulata*, ce qui est confirmé par le modèle de Sovová avec l'huile de thym.

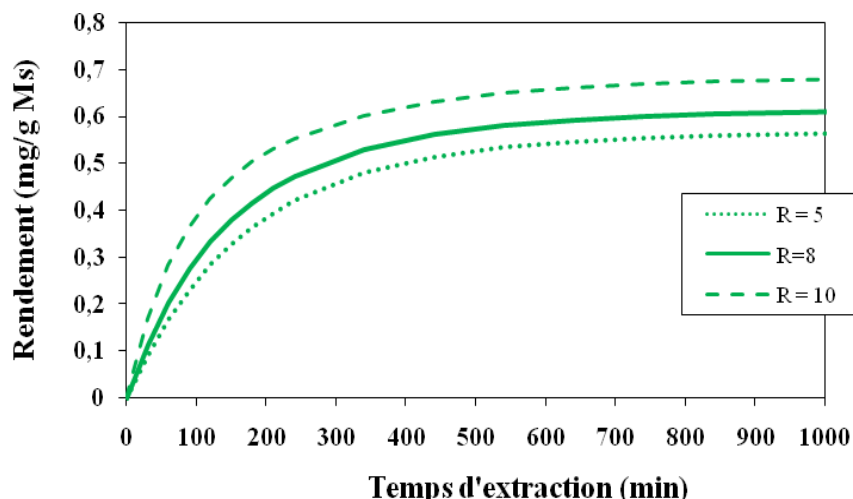
Par la suite nous avons utilisé le modèle pour vérifier l'effet des paramètres d'extraction, de la taille des particules, du débit de condensation et du rapport eau/ Mv, sur la cinétique et le rendement global en fonction de temps d'extraction (1000 min). La Figure III.13 montre les résultats du modèle avec les données de *T. articulata*, les courbes (b et c) montrent un écart durant les premières heures d'extraction. Cet écart tend à s'atténuer au fur et à mesure de l'évolution de l'opération, pour devenir relativement faible au-delà de la troisième heure de traitement de la matière végétale.



(a)



(b)



(c)

Figure III. 13: Simulation de l'extraction d'HE de *T. articulata* en fonction du temps pour différentes tailles de particules (a), différents débit de condensation (b) et différentes valeurs de rapport eau / matière végétale sèche (c)

Par contre, si l'on observe la courbe (a) qui représente la cinétique pour différentes tailles de particules, on constate que les courbes s'écartent au fur et à mesure de l'évolution de l'opération et chaque courbe atteint un maximum vers 6 heures. Les courbes expérimentales sont comparées avec les résultats calculés en utilisant notre modèle. Un bon accord a été observé pour les différents paramètres étudiés.

Enfin, ces résultats montrent que le modèle cinétique que nous avons choisi permet de bien représenter les phénomènes d'extraction de l'HE de *T. articulata* par HD.

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons travaillé sur deux méthodes conventionnelles les plus utilisées dans le domaine d'extraction des plantes aromatiques et médicinales dans le monde : l'HD (Clevenger) et l'extraction par solvant organique (Soxhlet). Nous avons déterminé les conditions opératoires optimales pour ces deux techniques. Ensuite, nous avons appliqué le modèle de Sovová pour simuler l'extraction des HEs de *T. articulata* par HD.

Cette étude est nécessaire pour optimiser le rendement d'extrait des méthodes conventionnelles et le comparer avec les méthodes innovantes présentées dans les autres chapitres de cette thèse.

Chapitre IV : Extraction par CO₂ supercritique

Ce chapitre sera consacré à l'application de la technique d'extraction d'HE avec le dioxyde de carbone supercritique. Il est composé de deux parties.

*La première partie traite de l'extraction des substances naturelles des feuilles de *T. articulata*, par le dioxyde de carbone supercritique et l'optimisation des conditions opératoires.*

La seconde partie traite de la modélisation de ce procédé et sa validation par comparaison des résultats du modèle avec ceux obtenus expérimentalement.

Une partie des travaux rapportés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication soumise à

The Journal of Supercritical Fluid
Supercritical CO₂ extraction of *Tetraclinis articulata*

N. HERZI, S. CAMY, J. BOUJILA, P. DESTAC, M. ROMDHANE, J.S. CONDORET

I. Extraction des feuilles de *Tetraclinis articulata* par CO₂ supercritique

L'extraction par CO₂ supercritique est un exemple de technique simple, rapide, efficace et pratiquement sans solvant ni prétraitement [170,171]. Les objectifs de cette nouvelle technologie sont l'élimination de l'utilisation de solvant organique pour obtenir un produit pur et propre tout en diminuant la durée d'extraction et la consommation d'énergie. Ainsi, avec cette technologie il n'est plus nécessaire de purifier l'extrait en fin du traitement, contrairement aux solvants liquides. L'intérêt de choisir de manière sélective les conditions de traitement (température et/ou pression) est majeur pour le CO₂-SC. Ce choix permet de piéger les composants de façon distinctive et de récupérer un extrait purifié, ce qu'il n'est pas possible d'obtenir avec des solvants liquides.

Dans ce contexte, l'application de cette méthode a été réalisée sur *T. articulata*. Afin de pouvoir déterminer les conditions opératoires optimales d'extraction, l'effet de différents paramètres opératoires sur le rendement global d'extraction de la fraction volatile et non volatile a été étudié. Enfin, dans le but de valoriser les données expérimentales obtenues et pour une meilleure compréhension des phénomènes d'extraction par le CO₂-SC, nous nous sommes intéressés à la modélisation de ce procédé d'extraction.

L'influence de chacun de ces paramètres sur le rendement global d'extraction est étudiée dans cette partie.

I.1. Cinétique d'extraction

Afin de déterminer le temps nécessaire pour l'extraction des HEs de *T. articulata* par le dioxyde de carbone supercritique, des expériences sur la cinétique d'extraction ont été réalisées. Lors de cette étude, pour chaque expérience, 50g de feuilles de *T. articulata* séchées et broyées ont été utilisés. L'extraction a été réalisée à un débit de CO₂ de 20g/min, une température et une pression dans l'extracteur de 40°C et 90 bar, respectivement. La taille des particules est de l'ordre de 1,2 mm.

Lors des expériences servant à établir la cinétique d'extraction, l'extraction a été périodiquement arrêté, l'extracteur a été ramené à pression atmosphérique, l'extrait dans les trois séparateurs a été récupéré et le rendement calculé. Ensuite, l'extraction a été reprise. A partir de ces calculs de quantité d'extrait, la courbe cinétique d'extraction a été tracée.

Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure IV.1. Cette figure présente le rendement global d'extrait volatil obtenu par CO₂-SC exprimé en mg/g de matière sèche (Ms) en fonction du temps d'extraction (min).

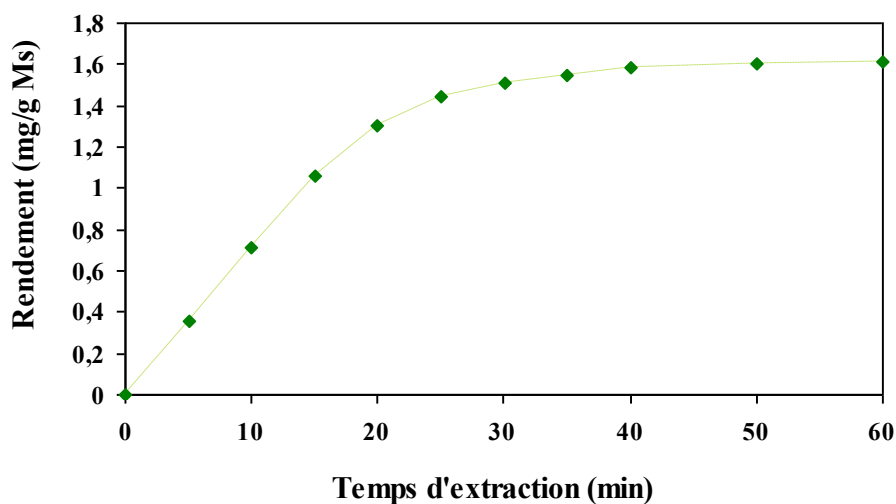


Figure IV. 1 : Rendement d'extraction de la fraction volatile de *T. articulata* en fonction du temps d'extraction, avec un débit de CO₂=20 g/min, T = 40°C, P = 90 bar et une taille de particules moyenne de 1,2 mm.

La courbe montre que l'extraction semble presque complète après 30 minutes. Cependant, 30 minutes supplémentaires d'extraction ont été ajoutées pour assurer l'épuisement de la matière extractible. Comme la forme de la courbe le suggère (pseudo-linéarité initiale de la courbe), l'extraction est principalement limitée par la solubilité de la fraction volatile dans le CO₂ ou par l'équilibre solide-fluide de la fraction volatile (solubilité apparente).

Ensuite, afin de mettre plus clairement en évidence le régime d'extraction, la quantité de fraction volatile extraite (mg/g Ms) a été tracée en fonction de la quantité de CO₂ consommée (g).

La Figure IV.2 montre comment le rendement d'extraction (mg/g Ms) varie avec la quantité de CO₂ utilisée. Une étape relativement constante est observée initialement correspondant à l'extraction du soluté facilement accessible se trouvant à la surface des particules. S'en suit une période de transition au cours de laquelle le taux d'extraction diminue rapidement. Cette diminution rapide du taux d'extraction est causée par un appauvrissement de la couche d'huile continue sur la surface des particules.

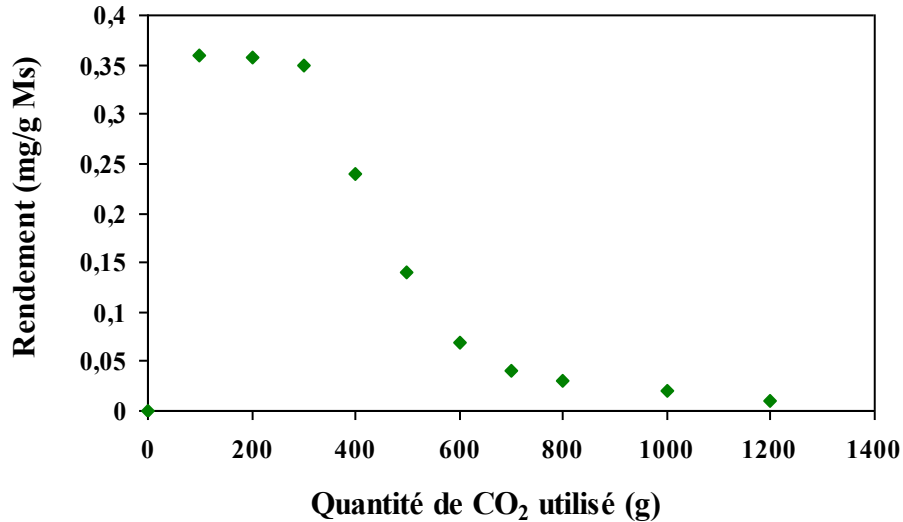


Figure IV. 2 : Rendement instantané d'extraction de la fraction volatile de *T. articulata* en fonction de la quantité du CO₂ consommée avec un débit de CO₂=20 g/min, T= 40°C, P=90 bar et une taille de particules moyenne de 1,2 mm.

Enfin, dès que la totalité de l'extrait présent à la surface des particules est enlevée, une diminution du rendement d'extraction est observée, qui dépend alors entièrement de la vitesse de diffusion de l'huile de l'intérieur des tissus cellulaires vers la surface. Une courbe similaire pour l'extraction d'huile à partir des graines de tournesol a été décrite par Kiriamiti *et al.* [172] sur le même appareil avec des conditions opératoires (pression, température) différentes (250 bar, 60°C, respectivement).

La durée d'extraction est un facteur important dans le processus d'extraction par fluide supercritique ; la durée totale peut être constituée par un temps statique suivi d'un temps dynamique d'extraction.

I.1.1. Temps statique d'extraction par CO₂ supercritique

Le mode statique permet l'établissement de l'équilibre entre les phases solide et fluide. Il ne nécessite pas de débit de CO₂, conduisant à une économie de solvant. Dans la première partie de cette étude, l'influence des périodes statiques sur l'efficacité d'extraction par CO₂ supercritique a été démontrée. Trois temps d'extraction statique (5, 10, 15 min), suivi de 30 min de temps dynamique d'extraction ont été testés. La pression et la température dans

l'extracteur ont été fixées à 90 bar et 40°C avec un débit de CO₂ de 20g/min et des particules de diamètre 1,2 mm.

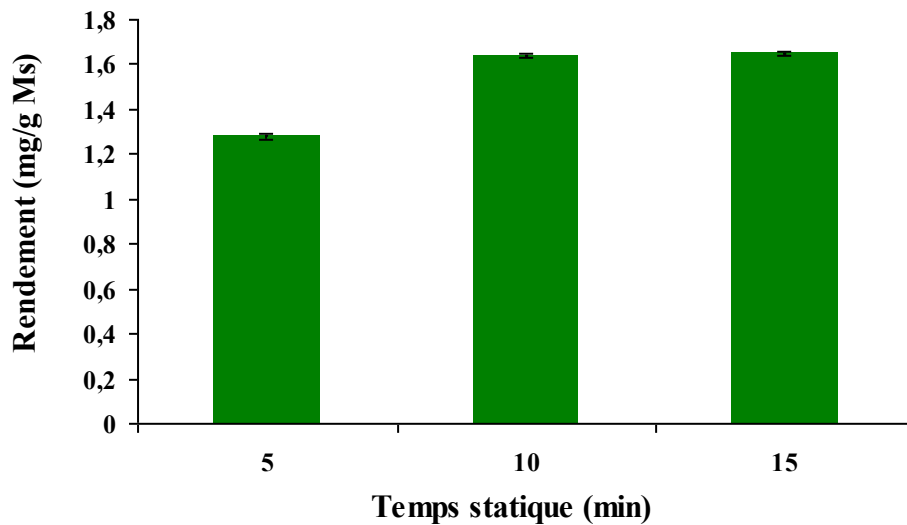


Figure IV. 3 : Influence du temps statique sur le rendement global d'extraction de la fraction volatile de *T. articulata* par CO₂- SC avec un débit de CO₂=20g/min, T=40°C, P=90 bar et une taille de particules moyenne de 1,2 mm.

Les résultats obtenus, présentés dans la Figure VI.3, montrent que l'augmentation de la durée d'extraction statique de 5 à 10 min augmente l'efficacité d'extraction de plus de 40%. Cependant, l'augmentation du temps d'extraction statique de 10 à 15 min a des effets minimes sur le rendement global d'extraction. Par conséquent, dans les expériences suivantes, 10 min ont été utilisées pour l'extraction de la fraction volatile de *T. articulata*.

I.1.2. Temps dynamique d'extraction CO₂ supercritique

L'effet du temps d'extraction dynamique sur l'extraction des fractions volatiles a été étudié tout en gardant les autres paramètres fixés. Trois valeurs de temps dynamique (20, 30, et 60 min) ont été testées avec 10 minutes de temps d'extraction statique. La pression et la température d'extraction sont de 90 bar, 40°C; le débit de CO₂ est de 20g/min avec des particules de diamètre 1,2 mm pour toutes les expériences.

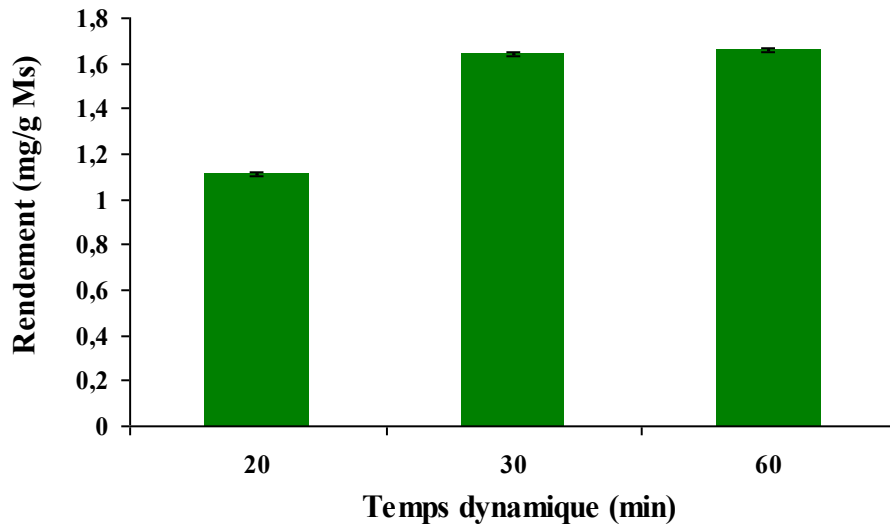


Figure IV. 4: Influence du temps dynamique sur le rendement global d'extraction avec un débit de $\text{CO}_2=20\text{g/min}$, $T=40^\circ\text{C}$, $P=90\text{ bar}$ et une taille de particules moyenne de 1,2 mm.

La Figure IV.4 montre comment un temps plus long d'extraction accroît l'efficacité de l'extraction de la fraction volatile. Cependant, à partir d'un certain temps dynamique d'extraction le rendement devient peu à peu invariant. Par conséquent, une durée dynamique de 30 min a été choisie pour l'extraction de fraction volatile de *T. articulata* par le CO_2 supercritique par la suite.

I.2. Influence de la pression sur le rendement d'extraction

Dans le but de déterminer l'influence de la pression d'extraction, les expériences ont été réalisées sur deux installations d'extraction au CO_2 (décrite dans le chapitre II). La pression dans l'extracteur a été fixée à différentes valeurs comprises entre 90 et 1000 bar, afin de déterminer l'influence de ce paramètre sur le rendement global d'extraction de fraction volatile de *T. articulata* pour une température de 40°C et un débit de CO_2 de 20g/min et avec des particules de taille 1,2 mm.

Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure IV.5. Cette figure donne la variation du rendement global de fraction volatile de *T. articulata* en fonction de la pression d'extraction.

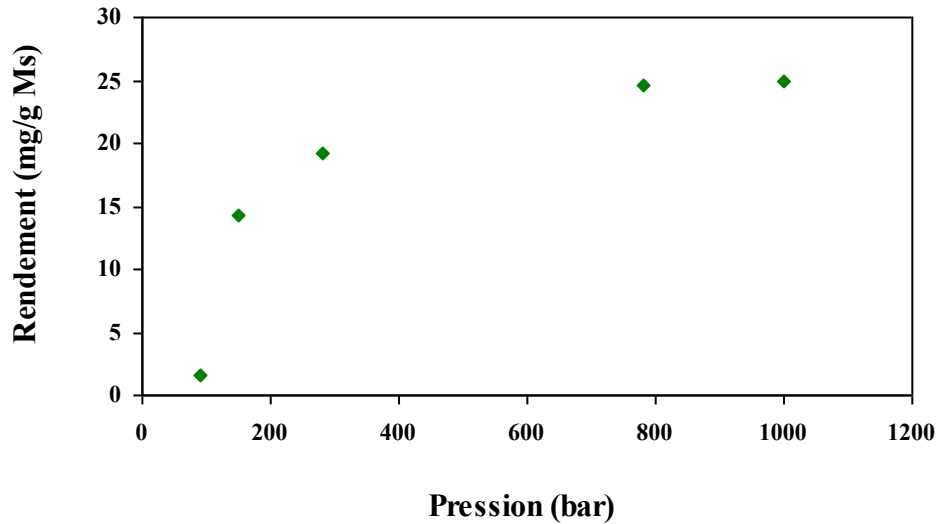


Figure IV. 5 : Variation du rendement global de *T. articulata* en fonction de la pression d'extraction avec un débit de CO₂=20 g/min, T=40°C, t=30 min et une taille de particules moyenne de 1,2 mm.

Comme prévu, une augmentation de la pression d'extraction montre une forte influence positive sur le rendement global. En fait, l'augmentation de la pression d'extraction de 90 à 150 bar permet d'augmenter le rendement de plus de 9 fois et une augmentation de 90 à 1000 bar permet de multiplier le rendement par 16.

En effet, la pression a un effet direct sur la masse volumique du CO₂, ce qui augmente son pouvoir solvant. Cependant, une pression d'extraction élevée favorise l'extraction des composés lourds ayant des grandes masses moléculaires telles que les lipides ou les cires [170].

Par contre, comme les fractions volatiles des matières végétales sont solubles dans le CO₂ supercritique à 90 bar, la sélectivité de l'extraction de ces composés est favorisée par une pression d'extraction peu élevée. Ces conditions opératoires sont mentionnées à plusieurs reprises dans la littérature [171,173]. Par conséquent, dans le cas de l'extraction des substances naturelles et spécialement les fractions volatiles, une basse pression (90 bar) est préférable pour assurer une extraction sélective envers les fractions volatiles.

I.3. Influence de la température sur le rendement d'extraction

Afin de déterminer l'influence de la température sur le rendement global d'extraction de la fraction volatile de *T. articulata* par le CO₂-SC, la température dans l'extracteur a été modifiée de 40 à 60°C pour une pression de 90 bar et un débit CO₂ de 20g/min et avec des particules de taille 1,2 mm.

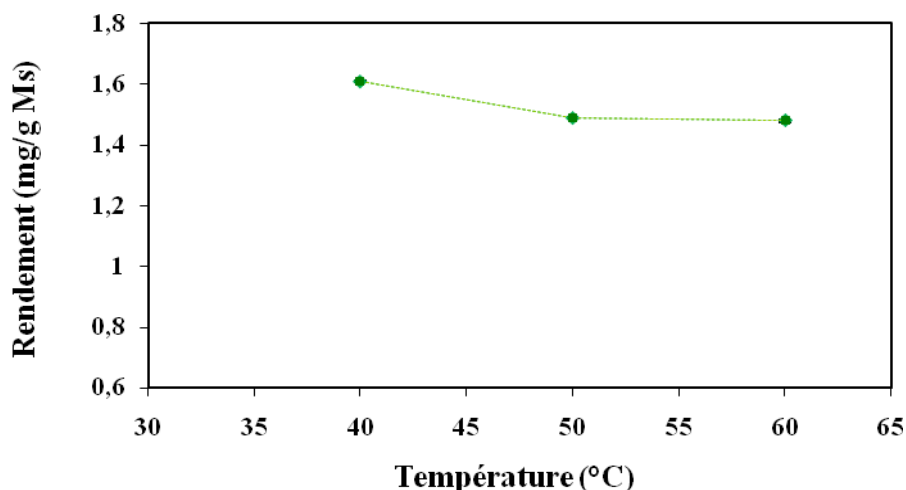


Figure IV. 6 : Variation du rendement global de *T. articulata* en fonction de la température d'extraction avec un débit de CO₂=20g/min, P=90 bar, t=30 min et une taille de particules moyenne de 1,2 mm.

Les résultats sont représentés dans la Figure IV.6 et montrent qu'une augmentation de la température, induisant une diminution de la masse volumique du CO₂ supercritique, conduit à une diminution du rendement global d'extraction. Cela peut être lié à l'effet de la solubilité rétrograde bien connu où, lorsque la température augmente, l'augmentation de la tension de vapeur n'est pas suffisante pour compenser la perte de pouvoir solvant en raison de la diminution de la densité du CO₂.

Cependant, d'autres travaux concernant l'effet de la température d'extraction sur le rendement global montrent que l'augmentation de la température accélère également le transfert de masse ce qui améliore le rendement d'extraction [175,170]. Par conséquent, il est difficile de prédire l'effet de la température. En outre, il doit être souligné que l'extraction à haute température peut avoir un effet néfaste sur la qualité de l'extrait en raison de possibilité d'avoir une réaction de dégradation. Ainsi, la possibilité de procéder à l'extraction des composés volatils à basse température est l'un des principaux avantages de la technologie CO₂-SC par rapport aux techniques conventionnelles comme l'HD ou la distillation sèche.

Ensuite, dans le but de déterminer l'influence de la température dans l'extracteur sur la cinétique du processus d'extraction supercritique, nous avons tracé les isothermes d'extraction à 40, 50 et 60°C, pour une pression d'extraction de 90 bar, un débit de CO₂ de 20 g/min, une taille de particules de 1,2 mm et 60 min de temps d'extraction (Figure IV.7).

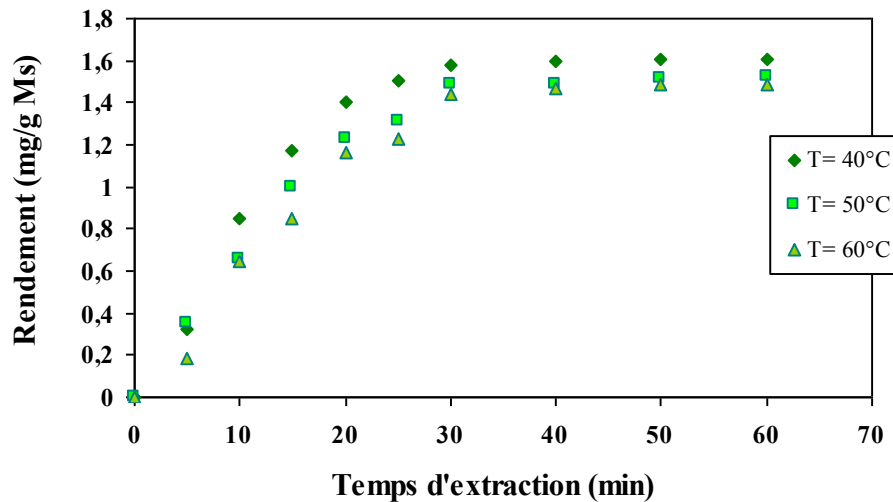


Figure IV. 7 : Cinétiques d'extraction pour différentes températures (40, 50 et 60°C) pour un débit de CO₂=20g/min, P=90 bar, T=40°C et une taille de particules moyenne de 1,2 mm

Les résultats présentés sur la Figure IV.7 montrent une cinétique similaire pour les différentes températures. Les trois courbes présentent deux parties : une première partie semble linéaire en fonction du temps et une deuxième partie, qui commence après 30 min, semble être un palier qui correspond à l'épuisement de la matière végétale.

I.4 Effet du débit de CO₂ sur le rendement d'extraction

Le débit de CO₂ est un paramètre important dans le processus d'extraction par fluide supercritique qui est directement lié à l'apport d'énergie. En effet, le choix qui se pose est un compromis entre l'augmentation du rendement global d'extrait, une diminution de la durée d'extraction et de la consommation de CO₂ et donc du coût de fonctionnement [2]

Dans le but de déterminer le débit de CO₂, plusieurs débits ont été testés entre 5 et 30g/min pour une pression de 90 bar et une température de 40°C, avec des particules de taille 1,2 mm. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure IV.8.

L'augmentation du débit de CO₂ a montré un effet positif et significatif sur le rendement global d'extrait de *T. articulata*. Ces résultats indiquent que, pour le débit de CO₂ de 5g/min, 60 min d'extraction sont à peine suffisantes pour réaliser une extraction complète tandis que 30 min pourraient être suffisantes pour 20g/min.

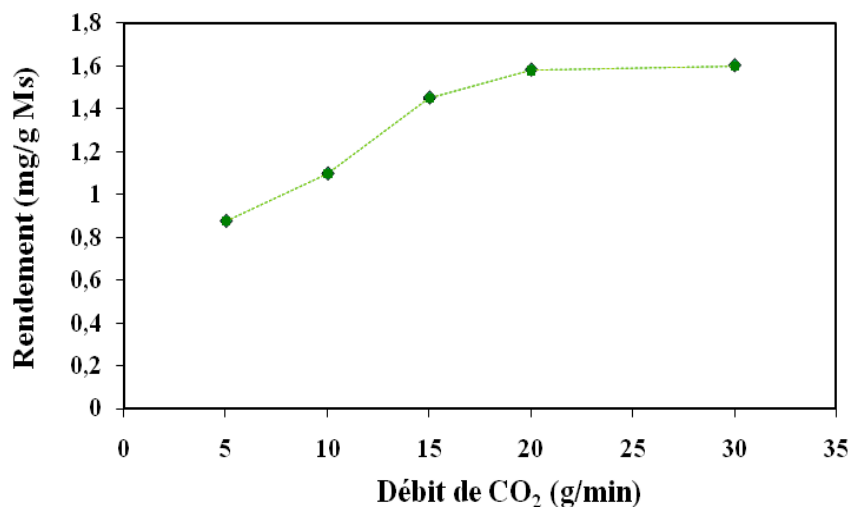
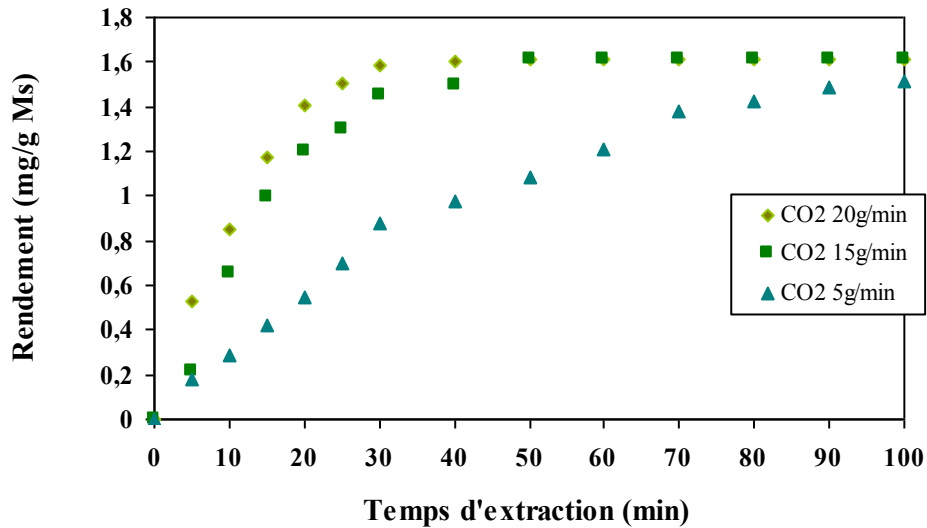
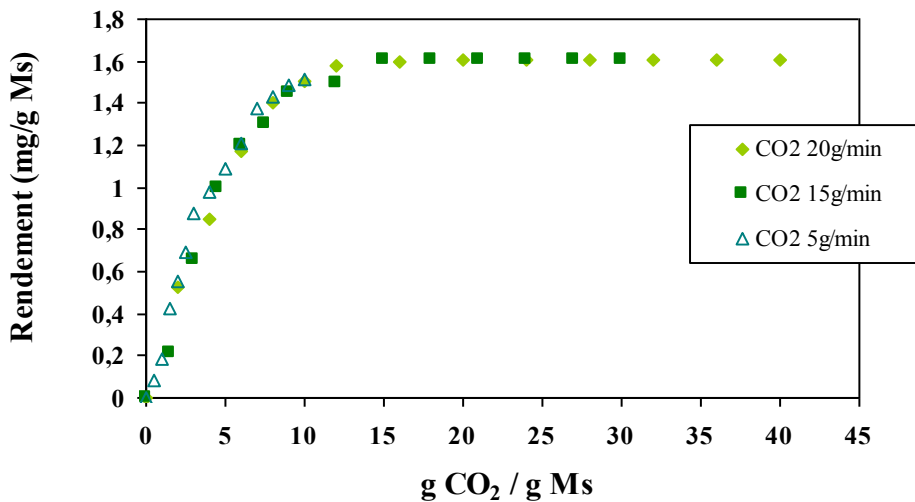


Figure IV. 8 : Variation du rendement global en fonction du débit de CO₂ supercritique pour une température T=40°C, P=90 bar, t=30 min et une taille de particules moyenne de 1,2 mm

Le plateau obtenu pour des débits élevés correspond à une extraction complète de la matière végétale et une variation très faible entre les débits 20 et 30g/min. Ce qui nous permet de dire que la meilleure valeur de débit de CO₂ en termes de rendement global et de temps d'extraction est 20g/min pour une extraction de 30 minutes.



(a)



(b)

Figure IV. 9 : Variation du rendement d'extraction pour différents débit de CO₂ (5, 15 et 20g/min) en fonction de la durée d'extraction (a) et en fonction de la quantité de CO₂ (b) pour une température T=40°C, P=90 bar, t=30 min et une taille de particules moyenne de 1,2 mm

En outre, la courbe de rendement global d'extraction de *T. articulata* en fonction de la quantité de CO₂ consommée pour les 3 débits de CO₂ (5, 15 et 20g/min) a été tracée. Les résultats obtenus montrent que les trois courbes sont confondues et quasi-linéaires (Figure IV.9).

Ces résultats confirment la présence de la limitation du processus d'extraction par la solubilité ou l'équilibre. La pente de la partie linéaire de ces courbes donne la concentration du soluté dans le fluide à la sortie ou une valeur de la solubilité apparente des substances extraites [172]. La valeur ainsi calculée est $0,165 \cdot 10^{-2} \text{ g/gCO}_2$, une valeur qui est nettement inférieure à la valeur habituelle de solubilité de terpènes (pour l'alpha-pinène, par exemple, elle est de $1,051 \cdot 10^{-2} \text{ g/gCO}_2$) [176]. Donc, lorsque la limitation de transfert de masse n'est pas suspectée, cela indique très probablement la présence d'un phénomène d'équilibre matière végétale-fluide et donc la limitation de l'extraction par cet équilibre.

I.5. Influence de l'ajout d'un co-solvant dans le processus d'extraction avec le CO₂ supercritique

Dans notre installation, le co-solvant a été ajouté et mélangé au CO₂ juste avant l'entrée dans l'extracteur à l'aide d'une pompe HPLC. Afin de déterminer l'effet de l'ajout d'un co-solvant pour l'extraction des fractions volatiles de *T. articulata* par CO₂-SC deux solvants polaires ont été testés : l'éthanol et l'eau. L'éthanol a été choisi car c'est un co-solvant polaire classique, présentant une toxicité réduite et qui est largement utilisé. De son côté, l'eau est un co-solvant qui apparaît comme le solvant le plus 'vert' qui soit, évidemment non-toxique, et propre.

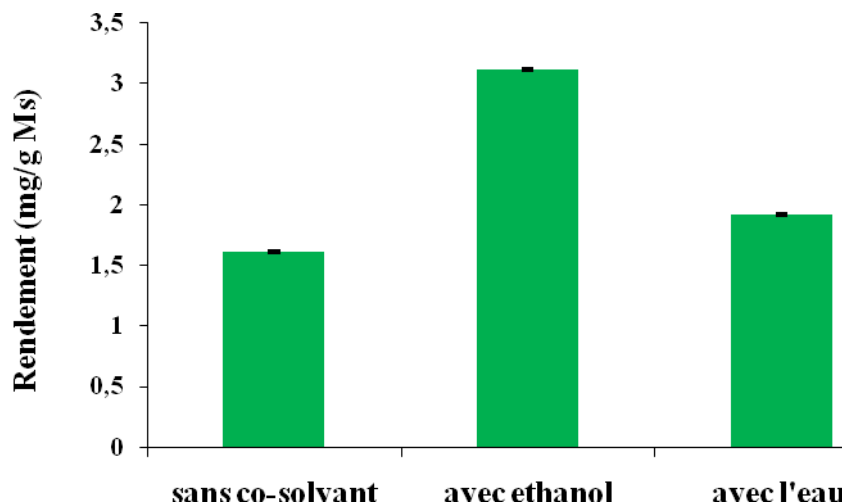
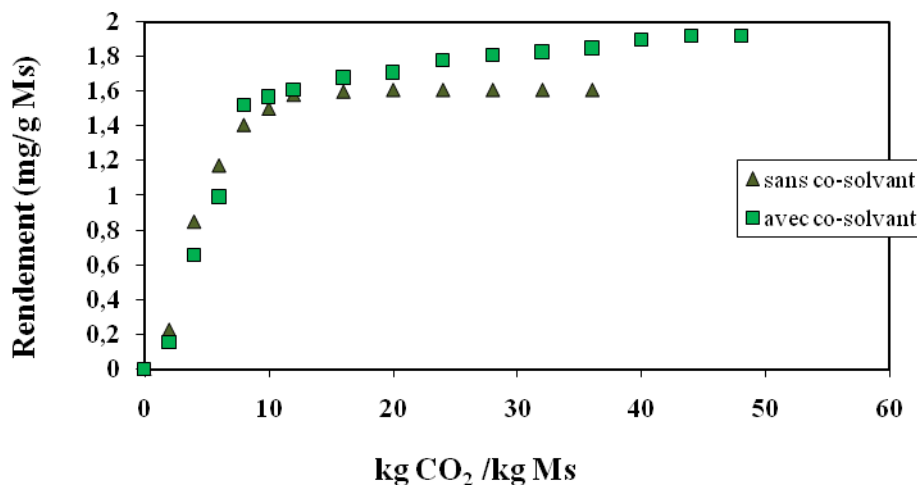
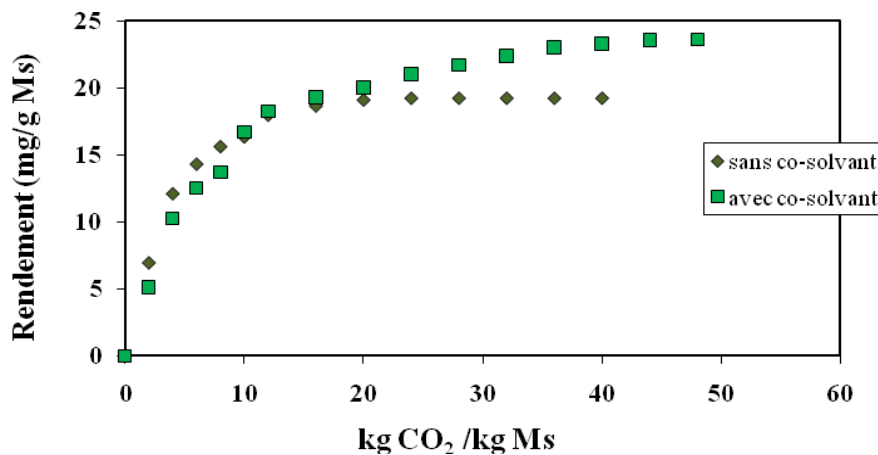


Figure IV. 10 : Rendement d'extraction global de *T. articulata* par CO₂-SC en fonction de la nature du co-solvant pour un débit de CO₂=20g/min, P=90 bar, T=40°C, t=30 min et une taille de particules moyenne de 1,2 mm

Les résultats obtenus avec une pression de 90 bar, une température de 40°C et des particules de taille 1,2 mm, avec comme co-solvant 5% d'éthanol et 0,33% d'eau sont présentés sur la Figure IV.10. Cette figure montre que l'ajout d'un co-solvant améliore le rendement global d'extrait de *T. articulata*. Bien que l'éthanol donne le meilleur résultat comme co-solvant, il présente cependant une toxicité si on le compare à l'eau. Donc, l'utilisation de l'éthanol comme co-solvant atténue la non-toxicité du CO₂ supercritique, la technique du CO₂-SC devenant ainsi moins «propre». Dans ce cas, l'eau a été considérée comme le meilleur choix de co-solvant pour le CO₂-SC.



a) basse pression 90 bar



b) haute pression 280 bar

Figure IV. 11 : Influence de la présence de l'eau comme co-solvant dans la cinétique d'extraction avec CO₂ supercritique à basse (a) et à haute (b) pression pour un débit de CO₂= 20g/min, T=40°C, t=30 min et une taille de particules moyenne de 1,2 mm.

Dans ce cas, l'étude de l'influence de l'eau comme co-solvant sur la cinétique d'extraction avec le CO₂ supercritique a été étudiée à basse et à haute pression (respectivement 90 et 280 bar) à une température et un débit de CO₂ constant de 40°C et de 20g/min, respectivement, en utilisant des particules de taille moyenne 1,2 mm. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure IV.11 (a et b)

Les courbes présentées sur la Figure IV.11, présentent une même allure pour les deux pressions. En effet, au début de l'extraction, on remarque que les résultats sont proches avec ou sans co-solvant. Cependant, à partir d'une certaine masse de CO₂ utilisée une différence significative se remarque pour les deux cas. L'extraction sans co-solvant est complète et atteint la quantité maximale d'extrait vers 20 kg CO₂/kg Mv, ce qui n'est pas le cas pour l'extraction avec co-solvant, qui se poursuit mais avec une vitesse plus faible.

Ces résultats montrent l'influence significative de l'ajout de l'eau comme co-solvant dans la capacité d'extraction avec le processus de CO₂ supercritique.

I.6. Influence de la granulométrie de la matière végétale sur l'extraction

Différents facteurs liés à la matière végétale tels que la taille des particules, la forme, la surface, la porosité et l'humidité, peuvent affecter les résultats de l'extraction par le CO₂-SC. L'extraction par le CO₂-SC dépend donc non seulement du choix des paramètres d'extraction, mais également de la matière végétale considérée et son prétraitement avant extraction [177].

Comme le rendement d'extraction est lié à la capacité du CO₂-SC à diffuser au sein de la plante ainsi qu'à la diffusion des solutés vers l'extérieur de la matière végétale, la structure physique de la matière végétale a une importance capitale.

La taille des particules a un effet sur le rendement d'extraction qui dépend des conditions d'extraction [178-180]. En effet, d'une part, une diminution de la taille des particules va conduire à une amélioration de la surface spécifique; le CO₂ pénétrant plus facilement à l'intérieur des particules et permettant ainsi d'augmenter la quantité d'extrait et de diminuer le temps de transfert interne des solutés [181].

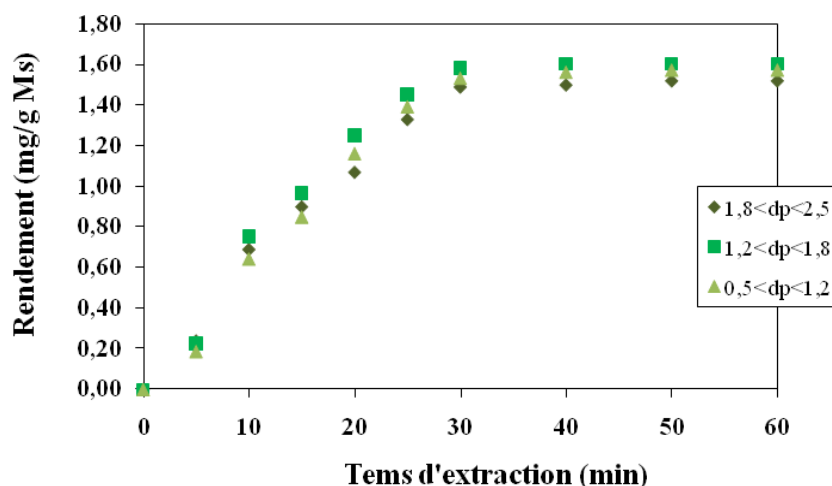


Figure IV. 12 : Influence de la taille des particules sur le rendement global d'extraction de la fraction volatile de *T. articulata* par CO₂-SC

D'autre part, le broyage peut conduire indirectement à une déstructuration de la matière végétale et donc à une perte des composés.

Dans le but de déterminer l'influence de la granulométrie sur le rendement d'extraction global de *T. articulata*, trois fractions ont été principalement utilisées : ($0,5 < dp < 1,2$; $1,2 < dp < 1,8$; $1,8 < dp < 2,5$) pour une pression de 90 bar, une température de 40°C, un débit de CO₂ de 20g/min et 60 min comme temps d'extraction. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure IV.12.

Les résultats montrent une différence faible du rendement global et indiquent que le meilleur rendement a été obtenu pour des particules ayant un diamètre moyen compris entre 1,2 et 1,8 mm. Les particules les plus fines donnent un rendement global très légèrement plus faible. Cela est très probablement lié à une perte de solutés au cours de l'étape de broyage, comme précédemment démontré avec Khajeh *et al.* [182].

Pendant le broyage, le soluté peut être dégradé en raison d'une surchauffe locale ou a pu rester collé sur les lames du broyeur. Une diminution faible du rendement global a été observée également lors de l'utilisation de particules avec des diamètres plus grands ($>1,8$ mm). Cela pourrait s'expliquer par une limitation diffusionnelle interne qui induit probablement une cinétique d'extraction plus lente. Cependant, cette différence est faible et on constate une certaine dispersion dans les points expérimentaux. Les courbes peuvent donc être considérées comme globalement similaires. En particulier le rendement final est atteint

après le même temps (environ 30 min) pour toutes les tailles de particules, ce qui indique un comportement cinétique assez similaire.

Ce résultat est en accord avec la limitation d'équilibre prédominante suspectée qui prédit que la cinétique n'est que très légèrement dépendante du transfert de masse interne, et donc de la taille des particules.

II. Modélisation

II.1. Analyse préliminaire des phénomènes physiques mis en jeu

En raison de très grande diversité de la matière végétale, de très nombreux modèles sont disponibles dans la littérature, allant des plus simples aux plus complexes, capables de gérer tous les phénomènes physiques qui se produisent lors de l'extraction. Opérer un choix entre ses modèles est toujours difficile et le modèle le plus complexe pourrait ne pas être le plus utile. Ce choix dépend de l'estimation de nombreux paramètres alors que certains d'entre eux peuvent avoir une influence négligeable. De plus, leur complexité empêche parfois de comprendre facilement ce qui est nécessaire pour choisir les conditions optimales pour le processus d'extraction, en particulier lorsque l'extrapolation à grande échelle est envisagée. Ainsi, une interprétation qualitative aisée des courbes cinétiques par la mise en œuvre de modèles simplifiés est très utile. L'étude des courbes d'extraction expérimentales à différents débits et pour différentes tailles de particules est également particulièrement instructive. Cette approche a été recommandée récemment par Sovová [183,184] qui fournit une méthode simplifiée très utile basée sur l'utilisation des temps caractéristiques impliqués pour tous les processus physiques. La comparaison de ces temps caractéristiques aide considérablement à discriminer les paramètres importants.

Nous avons limité cette approche à l'extraction de l'huile volatile. La modélisation a donc été proposée pour les résultats obtenus à 90 bar et 40°C. Dans cette présente étude, la superposition des courbes obtenues dans la Figure IV.9 (b) a clairement indiqué une limitation par le phénomène d'équilibre entre le solide et le fluide. Dans ce cas, lorsque le transfert de masse externe ne participe pas, l'estimation du coefficient d'adsorption (équilibre solide-liquide) est obtenue à partir de la pente initiale des courbes de la Figure IV.9 (b). L'hypothèse qui consiste à négliger la limitation de transfert de masse externe peut être évaluée par le calcul du temps caractéristique de transfert de masse externe t_f et en le

comparant au temps d'extraction de la partie linéaire t_l . Ces temps caractéristiques sont donnés par Sovová [183]:

$$t_f = \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \frac{\lambda}{k_f} \quad \text{Eq. IV.1}$$

$$t_l = G / K_m q' [1 - \exp(-1/\theta_f)] \quad \text{Eq. IV.2}$$

Le temps caractéristique de transfert de masse externe t_f dépend de k_f et, λ qui est le rapport volume/surface de la particule (= $R/3$ pour des particules sphériques) et, ε la fraction de vide du lit de particules. Le temps d'extraction t_l , correspondant à la fin de la partie linéaire de la courbe d'extraction, est en fonction de q' , qui est le débit spécifique de CO₂ relatif à la masse du solide, G qui est la fraction de cellules facilement accessibles, K_m est le coefficient de partage du soluté (kg plante/kg solvant) et θ_f , le rapport entre le temps caractéristique de transfert externe t_f et le temps de séjour t_r donné par :

$$t_r = \frac{\gamma}{q'} \quad \text{Eq. IV.3}$$

Pour fournir une évaluation quantitative de ces temps caractéristiques, l'extraction à un débit de 20g/min, pour des particules sphériques de taille moyenne 1,2 mm, a été considérée parce que ces conditions sont les plus susceptibles de subir une influence du transfert de masse externe. Pour une fraction de vide $\varepsilon=0,457$, le temps caractéristique de transfert externe t_f est calculé à 1,05 s en utilisant la corrélation de Tan *et al.* [185] pour l'évaluation de k_f (qui a donné $k_f = 1,61 \cdot 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$) et t_r est égal à 75 s. La valeur de t_f est faible par rapport t_r , par conséquent la résistance de transfert de masse externe peut être négligée. D'après la Figure. IV.9 (a), la valeur $G = 0,7$ de la fraction accessible est estimée ; elle correspond à la fin de la partie linéaire des courbes et se produit à environ $t_l=750$ s (avec une valeur de $K_m=C_0/q_0=0,14 \text{ kg Mv/kg CO}_2$). Ce résultat permet d'utiliser un modèle d'équilibre simple pour la partie linéaire de la courbe d'extraction comme proposé par l'approche de Reis-Vasco [186] pour l'extraction de l'HE de *Menthe pouliot*.

L'interprétation de la dernière partie des courbes d'extraction est plus délicate. Dans une première approche, comme l'a suggéré Sovová, cette partie pourrait correspondre à l'extraction de la partie non accessible du soluté selon un processus limité par le transfert de masse interne. Dans ce cas, les courbes de la Figure IV.9 (b) devraient présenter une influence du débit sur la fin du processus. Ce n'est pas le cas parce que les courbes se

superposent jusqu'à la fin de l'extraction. En outre, cette incohérence se confirme lorsque l'on tente d'ajuster les données expérimentales avec le modèle simplifié pour l'écoulement piston avec adsorption d'écrit par Sovová [183]:

$$e = x_u - (1-G)x_u \exp\left(-\frac{t-t_1}{t_{comb,i}}\right) \text{ pour } t \geq t_1 \quad \text{Eq. IV.4}$$

Dans cette équation x_u est la teneur initiale du soluté dans le solide. Elle est déterminée à partir de la valeur du rendement global final des courbes d'extraction ($x_u=1,6 \cdot 10^{-2}$ g/g). Le temps caractéristique de transfert de masse combiné $t_{comb,i}$ est obtenu en fonction de t_f , K_m et t_i (temps caractéristique de transfert de masse interne) qui implique le coefficient de diffusion effectif interne D_e . Ces temps caractéristiques sont donnés par (Eq.IV.5 et Eq.IV.6):

$$t_i = \frac{R^2}{15D_e} \quad \text{Eq. IV.5}$$

$$t_{comb,i} = t_i + \frac{t_f}{\gamma k_m} \quad \text{Eq. IV.6}$$

γ est le rapport entre la masse de CO₂ initial et la masse de solide dans l'extracteur. Lors de l'utilisation de cette approche sur les courbes expérimentales obtenues à différents niveaux de débit de CO₂, l'identification des paramètres a donné une valeur différente du coefficient de diffusion interne D_e pour chaque débit, alors que ce paramètre ne devrait pas être affecté par le débit.

Tous ces éléments indiquent que l'allure à la fin des courbes d'extraction correspond plus probablement à l'influence de la dispersion axiale (qui n'est pas prise en compte dans le modèle simplifié). Finalement, ceci suggère un procédé extraction limité par l'équilibre entre le solide et le fluide, où tout le soluté est accessible et avec une limitation de transfert de masse externe négligeable mais une dispersion axiale significative. D'ailleurs, le calcul du nombre de Peclet pour un coefficient de dispersion axiale donné par la relation de Funakuzuri *et al.* [186], donne la valeur $Pe = h_u/(D_L \varepsilon) = 19$ et montre donc une influence non négligeable de la dispersion axiale. Il est donc possible d'écrire un modèle simple qui correspond à la première partie du modèle de Reis-Vasco, c'est-à-dire, les équations différentielles de bilan massique correspondant au cas d'une extraction limitée par adsorption du soluté et décrivant le modèle d'écoulement comme un écoulement piston avec dispersion axiale [187].

II.2. Description des équations du modèle

Les équations de bilan massique dans ce cas correspondent aux hypothèses simplificatrices suivantes: (i) la vitesse superficielle du CO₂ supercritique, u , est constante au cours du processus, (ii) le processus est isotherme et la perte de charge est négligée, (iii) on suppose une relation d'équilibre linéaire, et (iv) l'huile volatile est décrite comme un seul composant, le "soluté".

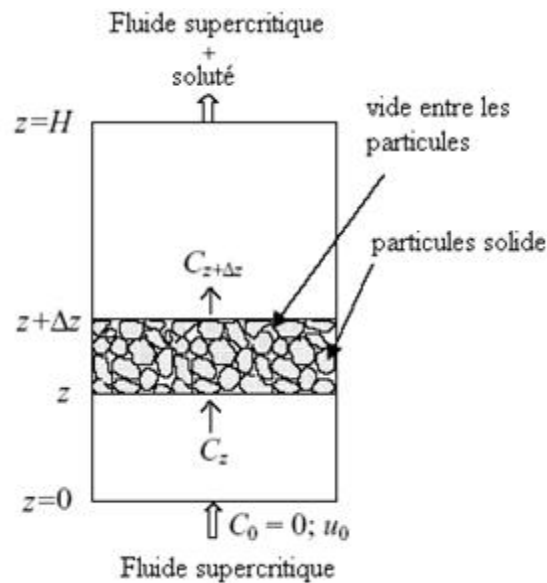


Figure IV. 13 : Schéma de l'extracteur.

La Figure IV.13 présente un schéma simplifié de l'extracteur avec de hauteur H.

Les équations de bilan de matière sont établies sur un élément de longueur Δz , les conditions initiales et limites (voir Figure IV.13) sont [187]:

$$\left[(u\varepsilon AC)_z + \left(-D_L \varepsilon A \frac{\partial C}{\partial z} \right)_z \right] - \left[(u\varepsilon AC)_{z+\Delta z} - \left(-D_L \varepsilon A \frac{\partial C}{\partial z} \right)_{z+\Delta z} \right] = A_s d_z \left(\frac{\partial q}{\partial t} \right) + A d_z \left(\frac{\partial C}{\partial t} \right) \quad \text{Eq. IV.7}$$

$$\frac{u(C_z - C_{z+\Delta z})}{dz} + \frac{\left[\left(-D_L \frac{\partial C}{\partial z} \right)_z - \left(-D_L \frac{\partial C}{\partial z} \right)_{z+\Delta z} \right]}{dz} = \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q}{\partial t} + \frac{\partial C}{\partial t} \quad \text{Eq. IV.8}$$

$$\rho_f \varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} + \rho_f (1 - \varepsilon) \frac{\partial q}{\partial t} = -\rho_f u \frac{\partial C}{\partial z} + D_L \rho_f \varepsilon \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad \text{Eq. IV.9}$$

$$C = K_m q \quad \text{Eq. IV.10}$$

$$t=0, C=C_0 \quad \text{et} \quad x_u = q_0 + \gamma C \quad z > 0 \quad \text{Eq. IV.11}$$

$$z=0, \quad \frac{u}{\varepsilon} C - D_L \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad t > 0 \quad \text{Eq. IV.12}$$

$$Z=H, \quad \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad t > 0 \quad \text{Eq. IV.13}$$

L'équation VI.6 peut être réécrite sous la forme:

$$\left(1 + \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \frac{\rho_s}{\rho_f} \frac{1}{K_m} \right) \frac{\partial C}{\partial t} + \frac{u}{\varepsilon} \frac{\partial C}{\partial z} - D_L \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} = 0 \quad \text{Eq. IV.14}$$

où u est la vitesse superficielle du fluide supercritique (m/s), C est la concentration de l'huile volatile dans la phase fluide (g soluté/g CO₂), C_0 est la concentration de l'huile volatile dans le solvant au début du processus d'extraction (correspond à l'équilibre avec la concentration en phase solide initiale q_0), q est la concentration de l'huile volatile dans la phase solide (g soluté/g Ms), t est le temps d'extraction, z est la coordonnée axiale du lit d'extraction, K_m est une constante d'équilibre (Eq. IV.10), ε est la fraction de vide du lit et ρ_s est la masse volumique de la matière végétale, et D_L est le coefficient de dispersion axiale (m²/s).

L'équation aux dérivées partielles a été résolue avec le logiciel Matlab. La teneur initiale d'huile volatile de *T. articulata* a été déterminée à partir du rendement global final obtenu par les courbes d'extraction, soit $Q_{ini} = 1,6 \cdot 10^{-2}$ g soluté/g Ms a été identifiée. La concentration initiale du soluté dans le CO₂ a été obtenue à partir de la pente initiale de la Figure IV.9 (b) et la valeur $C_0 = 0,2 \cdot 10^{-2}$ soluté g/g de CO₂ a été obtenue. La constante d'équilibre d'adsorption K_m a été évaluée à 0,14 kg de plante /kg CO₂. À 90 bar et 40°C, la densité et la viscosité du CO₂ ont été évaluées à $\rho_f = 448,45$ kg/m³ et $\mu_f = 40,1 \cdot 10^{-6}$ Pa.s.

II.3. Estimation du coefficient de dispersion axiale

Le coefficient de dispersion axiale D_L a été déterminé en utilisant la corrélation proposée par Funazukuri [186]:

$$D_L = 1,317(\text{Re } Sc)^{1,392} \left(\frac{D_{12}}{\varepsilon} \right) \quad \text{Eq. IV.15}$$

$$\text{Re} = \frac{\rho_f u d_p}{\mu_f} \quad \text{Eq. IV.16}$$

$$Sc = \frac{\mu_f}{\rho_f D_{12}} \quad \text{Eq. IV.17}$$

Le coefficient de diffusion binaire D_{12} a été estimé par l'équation Wilke-Chang tel que proposé par Funazukuri [186]:

$$D_{12} = 7,410^{-12} \frac{T \sqrt{\phi M_{CO_2}}}{\mu_f V_{2bp}^{0,6}} \quad \text{Eq. IV.18}$$

T est la température (K), Φ est le facteur d'interaction du solvant ($\Phi = 1$ pour le CO_2), M est la masse molaire du solvant (CO_2) et V_{2bp} est le volume molaire du soluté à son point d'ébullition normal exprimé en cm^3/mol . Comme l' α -pinène est un composé présent dans tous les extraits volatils, son volume molaire $V_{2bp} = 178,63 \cdot 10^{-3} m^3/kmol$ a été utilisé dans l'équation (Eq.IV.18) [188]. Une valeur de $D_{12} = 1,7 \cdot 10^{-8} m^2/s$ a été obtenue pour 90 bars, $40^\circ C$. Le coefficient de dispersion axiale a ainsi été évalué égal à $1,9 \cdot 10^{-5} m^2/s$ et $Pe = 19$ pour un débit de CO_2 égal à 20 g/min.

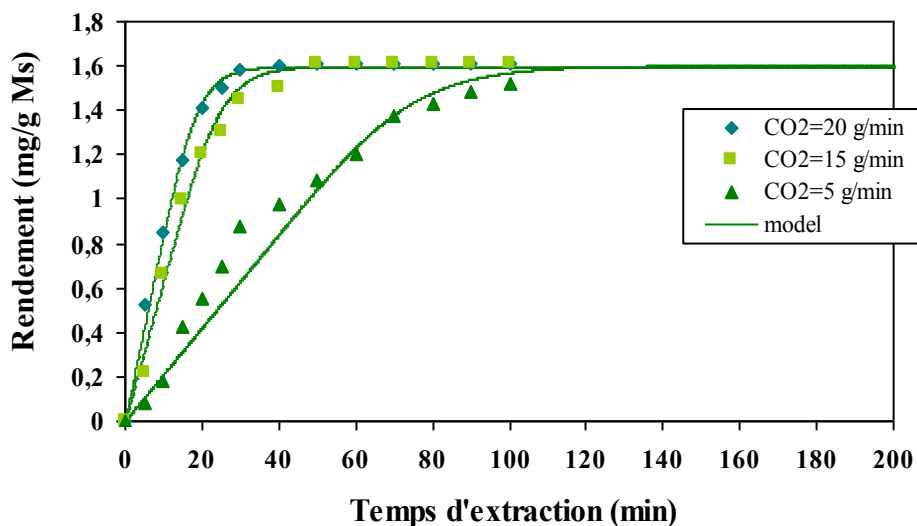


Figure IV. 14 : Simulation du rendement de l'huile volatile de *T. articulata* avec le modèle de Reis-Vasco (première partie) à différents débits de CO_2 pour des particules de taille moyenne de 1,2 mm, la pression 90 bars et la température de $40^\circ C$.

Sur la Figure IV.14, les courbes expérimentales sont comparées aux rendements calculés en utilisant le modèle avec la valeur dispersion axiale décrite ci-dessus. Un bon accord est observé pour les 3 différents débits de CO₂. D'après les analyses qualitatives que nous avons développées, ce résultat valide le choix du modèle proposé.

II.4. Utilisation de la modélisation pour l'extrapolation du procédé d'extraction

Comme nous l'avons mentionné, une dispersion axiale significative a été mise en évidence à l'échelle du laboratoire ($Pe=19$ pour un débit de CO₂=20g/min). Néanmoins, son influence sur la durée d'extraction est faible. Par exemple, à 20g/min, la durée d'extraction nécessaire pour obtenir un rendement de 90% est prédite à 16 minutes avec le modèle simplifié de Sovová (qui néglige la dispersion axiale), t_1 obtenue par l'équation (Eq.IV.2), tandis que notre modélisation, qui prend en compte la dispersion axiale, donne une valeur proche de 20 minutes.

Cette différence plutôt faible permet de proposer des pistes pour extrapoler le procédé à l'échelle industrielle en maintenant le débit spécifique q' et le rapport hauteur/diamètre de l'extracteur (5 dans notre cas). Avec cette extrapolation, par simple calcul à partir de l'approche de Sovová, par exemple pour l'extraction d'une masse de matière végétale égale à 1000 fois ce qui est traité dans notre extracteur à l'échelle du laboratoire conduisent au dimensionnement d'un extracteur de 113 L (diamètre 0,3 m, hauteur 1,6 m) percolé par 240 kg/h de CO₂ (vitesse superficielle de 10 mm/s) dans lequel un rendement de 90% est obtenu après 16 minutes d'extraction. Dans ces conditions la valeur du nombre de Peclet est égale à 82, ce qui est plus favorable que dans l'extracteur à échelle du laboratoire (où $Pe=19$). Ce résultat confirme la validité de cette simple extrapolation du procédé.

Conclusion

Le but du présent travail a été d'étudier l'extraction par CO₂ supercritique et l'application de ce procédé pour extraire de l'HE à partir de *T. articulata* de Tunisie. Cette étude expérimentale de l'extraction par le CO₂ supercritique, réalisée à différentes conditions opératoires (température, pression, diamètre de particules et débit de solvant,) a permis de mettre en évidence les effets de chaque paramètre sur le rendement global et les conditions opératoires optimales pour les produits volatils et l'extrait à haute pression. L'aspect

physique de l'extraction à basse pression supercritique (90 bar) a été étudié et la modélisation de la cinétique d'extraction s'est avérée adéquate, révélant un processus d'extraction principalement limité par l'équilibre d'adsorption d'huile volatile sur la matrice végétale à proximité de la surface de la feuille. Un bon accord de la prédiction du modèle avec les expériences a validé le modèle et le phénomène supposé limitant du processus d'extraction.

CHAPITRE V : Extraction des substances naturelles par eau sub-critique

Ce chapitre est consacré à la présentation des résultats d'extraction d'huiles volatiles par l'eau à l'état sub-critique.

*Lors de l'extraction des huiles volatiles de *T. articulata* avec l'eau sub-critique une étude paramétrique a été mise en œuvre, pour optimiser les conditions opératoires d'extraction.*

Ensuite, dans le but de réaliser une étude aussi complète que possible nous avons effectué des extractions dans les mêmes conditions à l'aide du même appareil 'ASE200' en utilisant un autre solvant avec l'eau.

I. Influence des paramètres intervenant lors de l'extraction des huiles volatiles de *T. articulata* par l'eau sub-critique

Lors de l'extraction des substances naturelles par l'eau sub-critique, des phénomènes physico-chimiques sont à la base d'échange de matière entre le solide et le solvant d'extraction (eau), d'où l'influence de multiples facteurs sur le rendement global et la cinétique d'extraction [189,139,138]. Ainsi, les facteurs influençant le rendement et la cinétique d'extraction peuvent avoir deux types d'origines : naturelle et technologique. Par conséquent, l'optimisation des paramètres opératoires est importante pour contrôler la cinétique du processus d'extraction [190-193].

Dans cette partie, les conditions opératoires ont été étudiées afin d'optimiser les paramètres intervenant lors de l'extraction des substances naturelles par l'eau à l'état sub-critique.

I.1. Conditions d'extraction

Les expériences de cette étude ont été réalisées avec les feuilles de *T. articulata*, cueillies en Mars 2010 dans une forêt du nord de la Tunisie, séchées à l'air libre jusqu'à la stabilité de leur poids. Les feuilles séchées ont été broyées jusqu'à obtention de particules dont la granulométrie varie entre 0,8 mm et 2 mm. Dans le processus d'extraction par l'eau sub-critique, l'évaporation de l'eau après extraction a été réalisée dans un lyophilisateur. Après l'évaporation la quantité d'huile a été pesée et le rendement a été exprimé en mg d'huile par g de matière sèche.

I.2. Influence de la durée d'extraction

La durée d'extraction est un paramètre très important aussi bien sur le plan technico-économique, que sur celui de la qualité des extraits. Dans nos expériences, une combinaison d'extraction statique et dynamique a été utilisée. À cet égard, la pratique de l'eau sub-critique est très similaire à la pratique de CO₂-SC. Après une certaine période d'extraction statique, les échantillons ont été extraits en mode dynamique.

Afin d'étudier et d'optimiser ce paramètre pour le cas d'extraction des substances naturelles du *T. articulata* avec l'eau sub-critique, la cinétique d'extraction en fonction du temps a été déterminée. Les résultats sont représentés sur la Figure V.1.

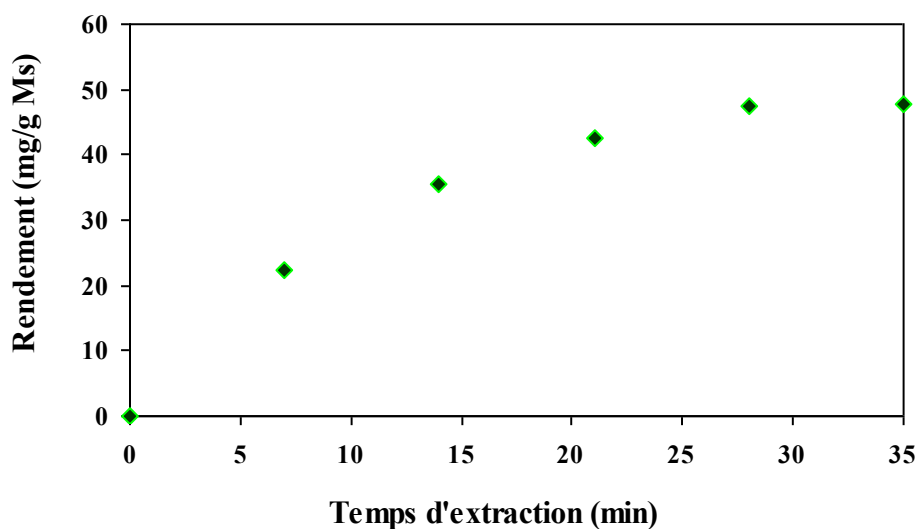


Figure V. 1 : Cinétique d'extraction des substances naturelles de *T. articulata* avec l'eau sub-critique (T=150°C et P= 100 bar)

Cette figure montre l'augmentation du rendement global d'extraction des substances naturelles en fonction du temps. Sur cette courbe, un palier a été observé au bout de 30 min d'extraction, ce qui indique l'épuisement de la matière végétale. Par conséquent, un temps d'extraction de 30 min a été utilisé pour l'étude des autres paramètres.

Comme nous l'avons vu précédemment avec l'HD, Soxhlet et l'extraction au CO₂-SC, le temps de contact de la matière végétale avec le solvant d'extraction a un effet important sur le rendement global d'extraction. En effet, l'allure des courbes de cinétique pour chaque procédé est très similaire, une augmentation relativement linéaire au début de l'extraction suivi par un palier correspond à la fin de l'extraction. Cependant, ce paramètre est très longue (entre 6 et 12 fois plus) dans les méthodes conventionnelles (3 h pour l'HD et 6h pour Soxhlet) par rapport aux nouvelles technologies (30 min).

1.3. Influence de la température d'extraction

Nous avons vu plus haut (chapitre I), l'évolution importante des propriétés de l'eau sub-critique en particulier en fonction de la température. Ce paramètre est considéré comme le paramètre principal qui influence, quantitativement et qualitativement, l'extraction des huiles volatiles à partir de l'eau sub-critique [194,195,106]. Ainsi une augmentation de température induit une augmentation de solubilité, ce qui permet des extractions sélectives, en augmentant progressivement la température et la polarité [196]. Mais il faut toujours

contrôler l'augmentation de la température pour éviter la dégradation des composés d'intérêt. Plusieurs recherches ont porté sur l'extraction de certains principes actifs de PAM tel que les antioxydants [197,198] grâce à l'eau sub-critique. Ainsi, certaines d'entre elles, ont montré qu'une augmentation de température de 100 à 200°C permet d'augmenter les quantités de composés volatils extraites [139,199-202].

La température d'extraction pour les feuilles de *T. articulata* a été optimisée afin de maximiser le rendement d'extraction des substances naturelles. Dans ce cas, trois températures sont étudiées (100, 120 et 150°C) dans les mêmes conditions opératoires, pour des particules de taille moyenne 1,2 mm une pression égale à 100 bar, pendant 30 min. Les résultats sont représentés sur la Figure V.2.

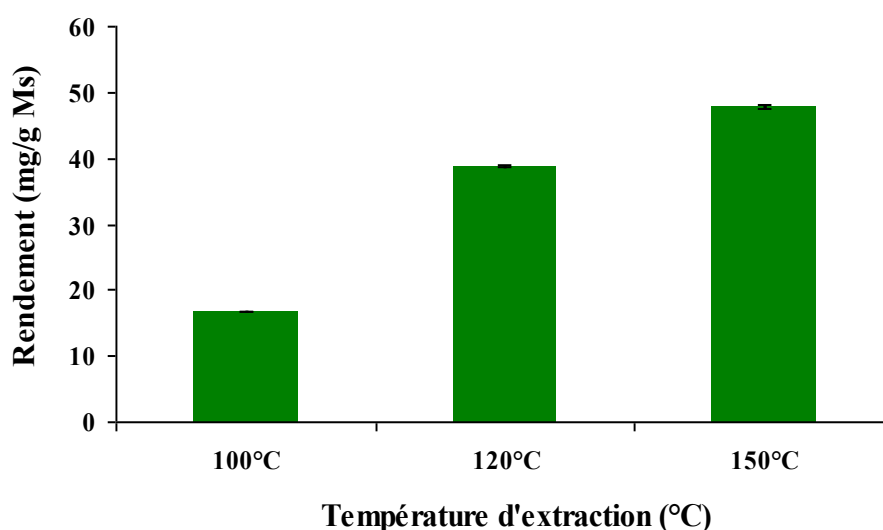


Figure V. 2 : Variation du rendement d'extraction de *T. articulata* avec l'eau sub-critique en fonction de la température d'extraction pour une pression de 100 bar, 30 min d'extraction et des particules de 1,2 mm de diamètre.

Comme on peut le voir sur la Figure V.2, le rendement global d'extraction de *T. articulata* est amélioré avec l'augmentation de la température d'extraction. En effet, lorsque la température d'extraction augmente de 100 à 120°C, le rendement d'extrait augmente de 56%, et de même, entre les températures 100 et 150°C une augmentation de 65% a été observée. Cette amélioration est probablement due à l'augmentation de la solubilité des composés cibles dans l'eau sub-critique avec l'augmentation de la température de l'eau. Par conséquent, l'extraction par l'eau sub-critique doit donc être effectuée à la température la plus élevée possible. Cependant, l'augmentation de la température est limitée par la réactivité

de l'eau et la sensibilité des composées cibles à la dégradation thermique [203]. Ainsi, une température d'extraction de 150°C a-t-elle été choisie comme la meilleure valeur pour augmenter l'efficacité du processus d'extraction de *T. articulata* par l'eau à l'état sub-critique.

Nous avons ensuite étudié l'influence de la température sur la cinétique d'extraction. La Figure V.3 présente un comparatif des résultats de la cinétique d'extraction des substances naturelles de *T. articulata* obtenus avec trois températures (100, 120, 150°C).

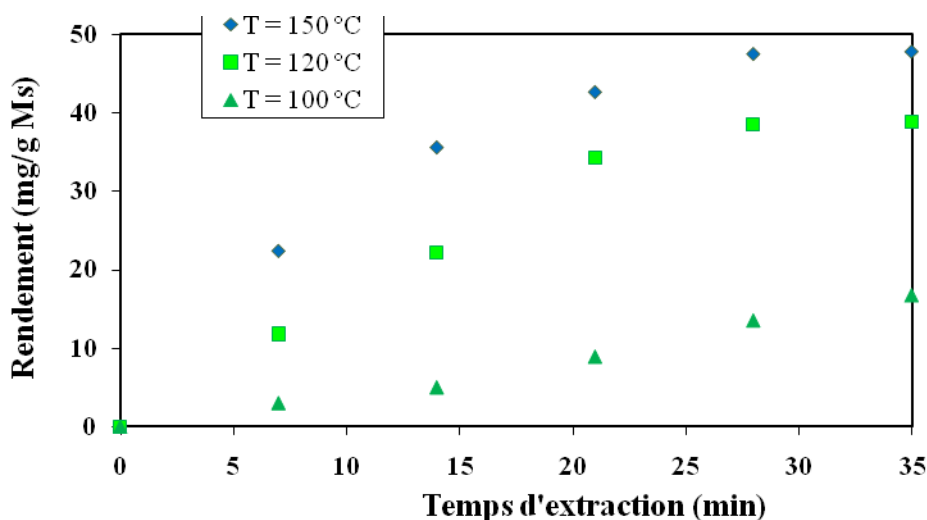


Figure V. 3 : Cinétique d'extraction des substances naturelles de *T. articulata* par l'eau sub-critique pour différentes température d'extraction, P = 100 bar.

La Figure V.3 montre la cinétique d'extraction à chaque température, où une allure similaire est observée pour les trois températures. Cependant, on constate une augmentation des rendements instantanés avec l'augmentation de la température. Cela confirme ce que nous avons vu précédemment avec le rendement global. Ces résultats peuvent être expliqués aussi par la diminution drastique de la constante diélectrique de l'eau en augmentant la température sous une pression modérée.

Une étude similaire de ce paramètre a été effectuée avec le procédé d'extraction au CO₂-SC, où nous avons vu un effet néfaste de l'augmentation de température sur la capacité du CO₂ pour l'extraction des substances naturelles. Ceci nous permet de conclure que l'effet de ce paramètre dépend du solvant et de méthodes d'extraction.

I.4. Influence de la pression d'extraction

Dans le but de déterminer l'effet de la pression sur l'efficacité du processus d'extraction avec l'eau sub-critique, nous avons tracé la courbe de saturation de l'eau (pression, température). Les résultats sont présentés sur la Figure V.4.

Avec l'augmentation de la température, l'augmentation de la pression est nécessaire pour maintenir l'eau à l'état liquide et rester en dessous de la zone d'ébullition. Sur cette courbe, on peut voir qu'en travaillant à une pression supérieure à 10 bar, on peut réaliser des extractions avec de l'eau à l'état liquide jusqu'à une température de 160°C environ [104, 204].

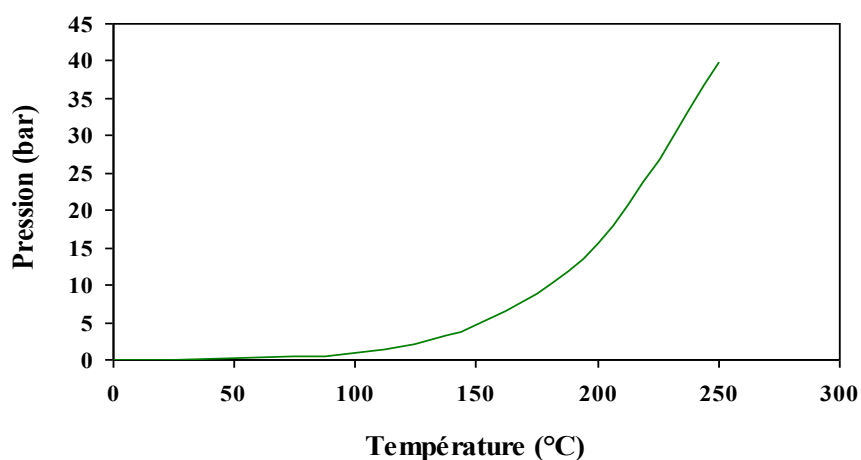


Figure V. 4 : Courbe de saturation de l'eau pure [91]

Des extractions à différentes pressions (90, 100 et 120 bar) sont réalisées à une température constante de 150°C. Les résultats sont représentés sur la Figure V.5.

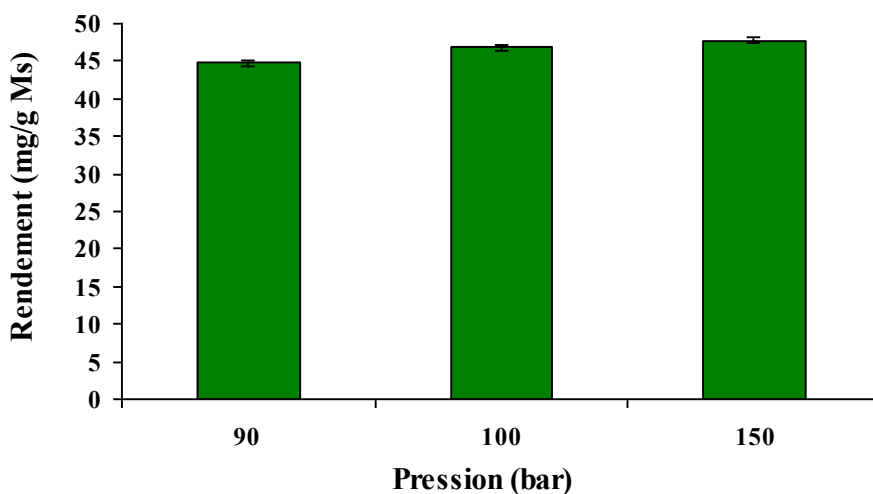


Figure V. 5 : Rendement d'extraction de substances naturelles de *T. articulata* à 150°C pour trois pressions d'extraction (90, 100 et 150 bar).

Aucune différence dans les rendements d'extraction n'a été observée pour une variation de pression dans la gamme de 90 à 150 bar (Figure V.5).

Cela implique que la sélection de la pression d'extraction est assez facile. L'effet de la pression (100 bar et 150 bar) sur la cinétique d'extraction des substances naturelles de *T. articulata* est représenté sur la Figure V.6. Ces résultats confirment que la pression, qui a peu d'influence sur les propriétés de l'eau à cette température, n'est pas un paramètre majeur pour l'extraction en eau sub-critique. Dans notre cas, nous avons choisi de travailler avec une pression d'extraction de 100 bar.

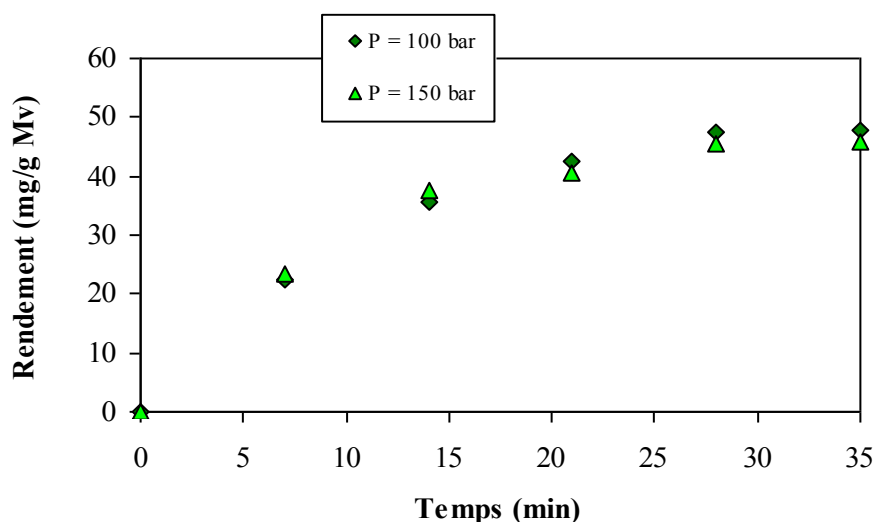


Figure V. 6 : Influence de la pression de processus de l'eau sub-critique sur la cinétique d'extraction des substances naturelles de *T. articulata* pour T= 150°C

L'influence de la pression d'extraction a été étudiée précédemment avec la méthode d'extraction au CO₂-SC. Nous avons vu un effet très important de ce paramètre sur la capacité d'extraction du CO₂ et donc sur le rendement global des substances naturelles de *T. articulata*. Ces résultats nous permettent de confirmer l'importance de l'étude de sensibilité aux paramètres opératoires pour chaque procédé afin de mieux maîtriser les processus d'extraction et ainsi d'améliorer la qualité du produit.

I.5. Influence de la taille des particules

L'effet de la taille moyenne des particules sur le rendement d'extraction des substances naturelles de *T. articulata* a été réalisé à une température de 150°C, une pression de 100 bar et un temps d'extraction de 30 min. Les résultats sont représentés sur la Figure V.7.

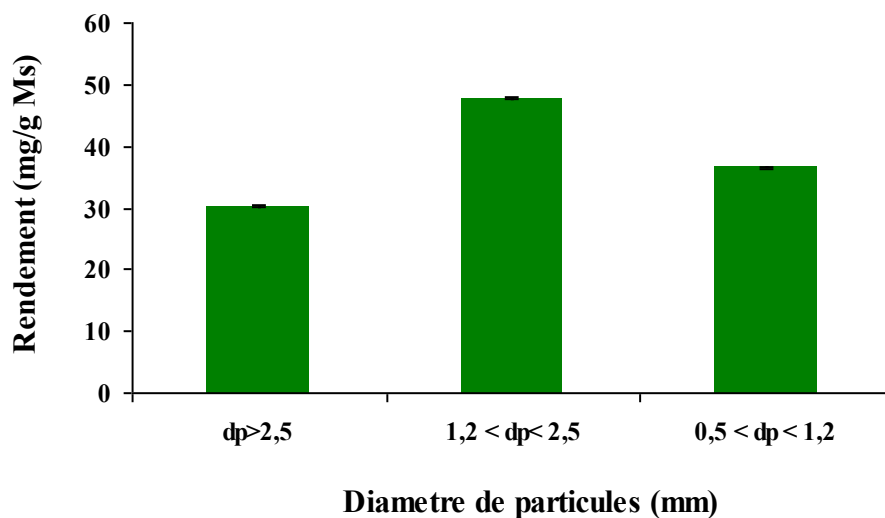


Figure V. 7 : Variation du rendement d'extraction des substances naturelles par l'eau sub-critique en fonction de la taille des particules (T=150°C et P=100 bar).

D'après la Figure V.7, nous avons observé l'effet de la taille moyenne de particules sur le rendement global d'extraction. Comme nous l'avons vu précédemment pour l'HD et l'extraction au CO₂-SC, on constate ici que le rendement le plus élevé (47,8 mg/g Ms) est obtenu pour des particules de taille moyenne entre (1,2 < dp < 2,5 mm). Alors que le rendement diminue pour des particules avec une taille moyenne plus grande ou plus petite. Par conséquent, les feuilles de *T. articulata* doivent être moyennement broyées ou coupées en petites particules avant l'extraction. Ces résultats peuvent être expliqués par l'amélioration de la surface spécifique et de la quantité extraite avec la diminution de la taille des particules, et ensuite la diminution du temps de transfert interne des solutés. Par contre, de manière indirecte, l'opération de broyage peut conduire à une déstructuration de la matière végétale et donc rendre le soluté plus disponible. L'importance de ce paramètre dépend donc de la matière utilisée et des conditions opératoires d'extraction [205].

I.6. Influence du taux de remplissage de la cellule d'extraction

Dans le même contexte, le taux de remplissage des cellules d'extraction est l'un des paramètres qui doivent être pris en compte avant l'extraction.

Afin de déterminer le taux de remplissage le plus convenable dans notre cas, trois tests ont été réalisés pour différents taux de remplissage (45%, 60% et 85%) par rapport à la capacité totale de la cellule d'extraction. Les extractions ont été réalisées pour une pression de 100 bar, une température de 150°C et des particules de diamètre ($1,2 < dp < 2,5$). Les résultats sont représentés sur la Figure V.8.

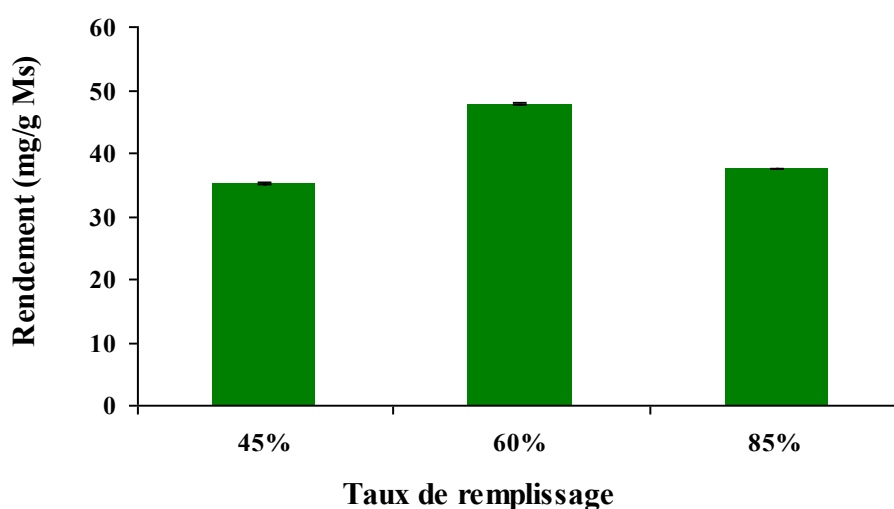


Figure V. 8 : Variation du rendement global des substances naturelles de *T. articulata* obtenu par l'eau sub-critique avec l'eau sub-critique pour différents taux de remplissage de la cellule d'extraction, P=100 bar, T=150°C et $1,2 < dp < 2,5$.

Les résultats montrent qu'une augmentation de 26% du rendement global a été observée pour une variation de taux de remplissage entre 45 et 60%. Cependant, une diminution de l'ordre de 27% a été observée aussi pour une variation de taux de remplissage entre 60 et 85%. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que, plus le taux de remplissage est faible, plus la surface d'échange est importante, ce qui permet d'extraire la totalité de soluté dans la matière par conséquent améliore le rendement d'extraction.

Par conséquent, un taux de remplissage moyen de l'ordre de 60% est préférable à condition que les exigences relatives à l'homogénéité des échantillons et la sensibilité soient satisfaites. Cela confirme l'influence de la quantité de matière végétale choisie par rapport à la cellule

d'extraction, comme nous l'avons vu précédemment pour le remplissage de la cartouche d'extraction avec le Soxhlet.

II. Extraction des substances naturelles de feuilles de *T. articulata* par autre solvant en utilisant l'ASE200

Le choix d'un solvant d'extraction approprié est probablement l'étape la plus difficile dans le développement de méthodes d'extraction à température élevée à l'aide de l'appareil ASE200. Ainsi, les solvants utilisés pour l'extraction au 'Soxhlet' classique peuvent ne pas être adaptés pour celle avec ASE200 parce que les matériaux végétaux peuvent être dissouts ou gonfler à une température élevée utilisée.

Tableau V. 1 : Les différentes expériences réalisées pour la *T. articulata* avec l'appareil ASE

Echantillon	Solvant	Température (°C)	Cycles
1	Ethanol (100°C)	100	1
2	Ethanol (100°C)	100	2
1	Eau (100°C)	100	1
2	Eau (100°C)	100	2
1	Eau (50%) +éthanol (50%)	100	1
2	Eau (50%) +éthanol (50%)	100	2
1	Ethanol (150°C)	150	1
2	Ethanol (150°C)	150	2

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi comme solvant d'extraction des solvants 'verts' comme le dioxyde de carbone supercritique et l'eau sub-critique ainsi que l'éthanol comme solvant de comparaison entre les différentes techniques.

L'éthanol a été utilisé dans le cadre de l'extraction Soxhlet et dans la CO₂-SC comme co-solvant et avec l'appareil ASE de façon à ce que l'on puisse comparer les résultats.

Dans le but de déterminer l'effet du solvant d'extraction, l'éthanol et l'eau ont été testés pour l'extraction des substances naturelles de *T. articulata* avec la technologie 'ASE' (Tableau V.1). Les rendements globaux d'extraction (exprimés en mg/g Ms) obtenus pour les différentes expériences ont été enregistrés dans le Tableau V.2.

Les résultats montrent l'effet de la nature du solvant et de la température d'extraction sur le rendement global d'extrait. En effet, en comparant les solvants d'extraction utilisés, à une température de 100°C, l'éthanol est le solvant le plus efficace par rapport au mélange H₂O/éthanol et H₂O.

Tableau V. 2 : Rendement global d'extrait de *T. articulata* obtenu par l'appareil ASE

Température (°C)	Solvant	Rendement (mg/g Ms)
100	Eau (100%)	16,7
	Ethanol (100%)	27,4
	Eau & Ethanol (50% / 50%)	17,4
150	Ethanol (100%)	26,7
	Eau (100%)	47,8

Par contre, à une température plus élevée, 150°C, l'eau (100%) donne le meilleur rendement. Ces résultats sont probablement dus au changement des propriétés du solvant avec les conditions opératoires d'extraction.

L'eau à une température de l'ordre de 150°C est à l'état sub-critique, ses propriétés de transport changent pour augmenter l'efficacité du processus d'extraction et la capacité extractible des substances naturelles devient plus importante (chapitre I). Par ailleurs on constate que la température a peu d'impact sur le rendement d'extraction obtenu avec l'éthanol. On retrouve avec l'ASE un rendement identique à celui obtenu avec l'éthanol en Soxhlet (réalisé à la température d'ébullition de l'éthanol, soit 78,4°C).

Conclusion

L'extraction par l'eau sub-critique est un procédé d'extraction très récent (début 1995). Elle a eu un succès considérable pour différentes applications analytiques dans les pays développés. L'un de nos buts premiers était d'évaluer l'impact des différents paramètres opératoires de cette technique sur le rendement global d'extraction et d'en tirer un jeu de conditions opératoires « optimales » dans le cas de l'extraction des substances naturelles d'une plante tunisienne, *T. articulata*.

L'influence des paramètres d'extraction, tels que la température, le temps d'extraction, le type de solvant et la pression a été évaluée. Les résultats ont montré que la température et la durée d'extraction étaient des paramètres critiques à considérer dans le processus de l'eau sub-critique.

L'eau sub-critique (solvant 'vert') présente différents avantages par rapport à l'HD ou à l'extraction par solvant classique, en particulier la réduction du temps d'extraction et de la quantité de solvants organiques nécessaires (généralement toxiques). Ainsi, du point de vue du rendement global, l'eau sub-critique s'avère être un très bon solvant alternatif d'extraction pour les substances naturelles des plantes aromatiques et médicinales.

Chapitre VI: Comparaison des procédés d'extraction

Ce chapitre traite de l'analyse qualitative des différents extraits obtenus avec chaque méthode d'extraction. Ce chapitre est composé de 2 parties.

*Dans une première partie, nous allons comparer les quatre méthodes d'extraction, en termes d'efficacité d'extraction et de qualité de produits obtenus. Ainsi, la composition chimique, la quantité de composés phénoliques et les activités biologiques de chaque extrait de *T. articulata* obtenu seront étudiées.*

*Dans une deuxième partie, nous présenterons les résultats obtenus pour l'extraction des substances naturelles de quatre autres matières premières décrites dans le chapitre II : *Eucalyptus cinérea*, *Eucalyptus Camaldulensis*, *Cypres semprevirens* et *callitris glaucophylla*.*

Une partie des travaux rapportés dans ce chapitre a fait l'objet de deux publications acceptées

Natural Product Research

Extraction of Essential Oil from *Cupressus sempervirens*: comparison of global yields, chemical composition and antioxidant activity obtained by hydrodistillation and supercritical extraction.

N. HERZI, S. CAMY, J. BOUJILA, M. ROMDHANE and J. S. CONDORET

Journal of Food Science

Supercritical CO₂ extraction of essential oil from two species of eucalyptus: global yield, chemical composition and antioxidant activity

N. HERZI, J. BOUJILA, S. CAMY, S. CAZAUX, M. ROMDHANE, J.-S. CONDORET

I. Comparaison des méthodes d'extraction de *T. articulata*

I.1. Conditions et rendement d'extraction

L'extraction des feuilles de *T. articulata* par différentes méthodes et sous différentes conditions, peut conduire à la récupération de fractions volatiles et non volatiles. Les différents résultats en termes de rendement global ont été détaillés dans les chapitres précédents. Nous résumons ci-dessous les résultats expérimentaux obtenus dans les conditions optimales déterminées, dans le but de comparer l'efficacité d'extraction de ces méthodes.

Les rendements globaux d'extraction correspondant aux résultats obtenus dans les différentes conditions d'extraction de chaque méthode sont présentés dans le Tableau VI.1.

Tableau VI. 1 : Comparaison du rendement global d'extraction des substances naturelles des feuilles de *T. articulata* par différentes méthodes d'extraction et différentes conditions d'extraction

	Température (°C)	Temps d'extraction (min)	Pression (bar)	Rendement (mg/g Ms)
CO₂-Supercritique	40	30	90	1,6
CO₂- Supercritique	40	30	280	19,2
CO₂- Supercritique	40	30	1000	25,9
Eau sub-critique	150	30	100	47,8
Soxhlet (Ethanol)		360		26,8
Soxhlet (Hexane)		360		40,4
Hydrodistillation	100	180	1	0,61

D'après ces résultats, lorsque l'on compare le rendement global d'huile volatile (1,6 mg/g) obtenu par l'extraction au CO₂-SC et l'HE (0,61 mg/g) obtenue par HD, on observe une efficacité plus grande du CO₂ supercritique à basse pression (61%) pour l'extraction des composés aromatiques de *T. articulata* par rapport aux techniques traditionnelles. Par ailleurs, l'extraction au CO₂-SC à haute pression (280 bar et 1000 bar) donne des rendements globaux, comprenant cette fois des fractions volatiles et non volatiles, très importants égaux à 19,2 et 25,9 mg/g, respectivement.

Ces résultats indiquent l'efficacité de cette technologie d'extraction: avec un solvant «vert», en un temps court (30 min) à haute pression on obtient un résultat similaire en quantité par rapport à celui obtenu avec de l'éthanol en 360 min (26,8 mg/g) et de meilleure qualité

(aucune trace de solvant). De même, l'extrait obtenu par l'eau sub-critique 47,8 mg/g en une demi-heure est plus important que celui obtenu par Soxhlet-hexane (40,4 mg/g) après 6 heures d'extraction. De plus, l'extrait obtenu par Soxhlet est une pâte marron, ce qui suggère la présence d'impuretés indésirables en plus du résidu du solvant organique. Par conséquent, l'extrait final obtenu en utilisant des solvants «verts» avec les nouvelles technologies est obtenu en quantité et qualité plus élevées (Figure VI.1), tout en répondant aux besoins des différentes industries et satisfaisant à la fois les demandes économiques changeantes et le respect de l'environnement. La Figure VI.1 présente une photographie des extraits obtenus par HD et CO₂-SC. On constate une légère différence de couleur de ces extraits, ce qui traduit une différence de composition chimique.

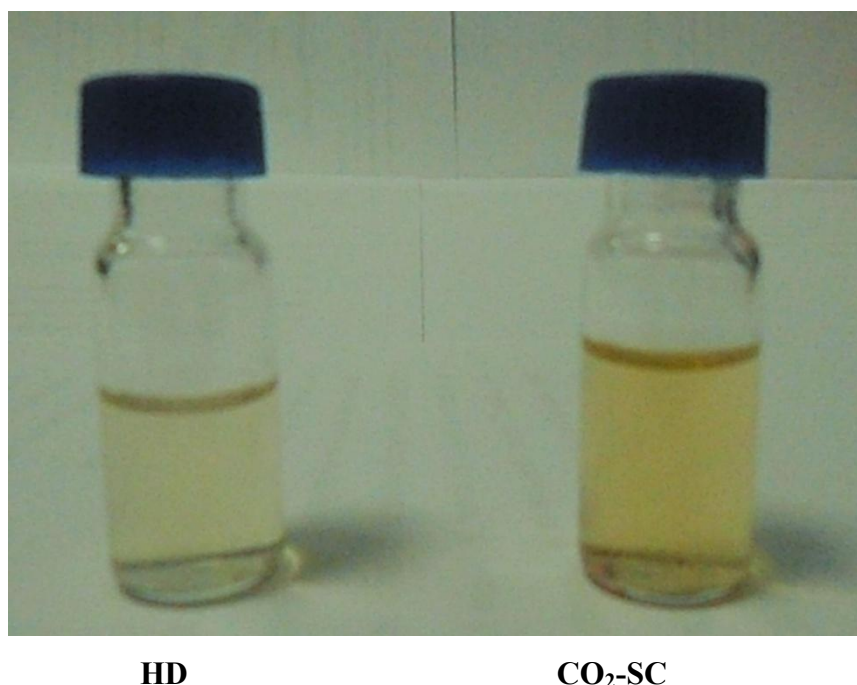


Figure VI. 1: Photo de l'extrait

Dans le but de mieux comparer les méthodes d'extraction, nous avons reporté sur la même Figure VI.2 l'évolution du rendement d'extraction des huiles volatiles de *T. articulata* c'est-à-dire ceux obtenus par CO₂-SC à 90 bar et par HD, en fonction du temps.

La Figure VI.2 présente la cinétique d'extraction des huiles volatiles de *T. articulata* obtenue par HD dans les meilleures conditions déterminées dans le chapitre III (débit de condensation 0,02 mL/s, rapport eau/Ms 10) et par extraction au CO₂-SC dans les conditions les plus favorables (débit de CO₂ 20g/min, pression 90 bar, température 40°C) déterminées dans le chapitre IV.

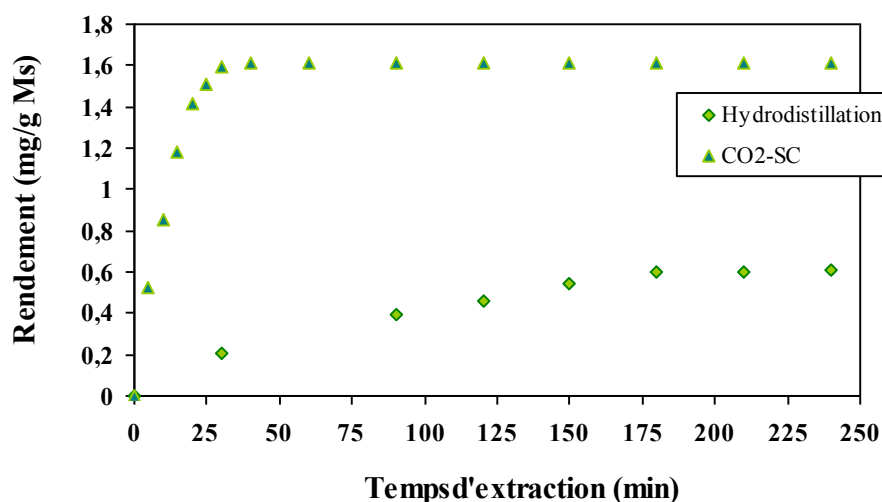


Figure VI. 2: Cinétique d'extraction des huiles volatiles de *T. articulata* obtenue par HD (pour un débit de condensation 0,02 mL/s, rapport eau/Ms 10) et CO₂-SC (débit de CO₂ 20 g/min, pression 90 bar, température 40°C)

D'après la Figure VI.2, le comportement des courbes de cinétique d'extraction par CO₂-SC et HD est similaire dans leur évolution. On observe dans les deux cas une partie où le rendement augmente linéairement au cours du temps, qui correspond à l'extraction des huiles volatiles les plus accessibles. Ensuite, une partie où l'extraction est moins rapide est observée qui correspond à l'extraction de l'huile située à l'intérieur des cellules de la plante. Enfin, la partie correspondant à la fin de l'extraction est représentée par un plateau.

La Figure VI.2 montre aussi, d'une part, une valeur supérieure du rendement d'extraction de CO₂-SC par rapport à celui obtenu par HD (1,61 mg/g et 0,61 mg/g, respectivement) et d'autre part, des temps d'extraction différents : là où l'HD nécessite 180 minutes pour atteindre son plateau (fin de l'extraction), ce temps ne dépasse pas 30 minutes pour le CO₂-SC. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que l'on gagne du temps et de l'énergie, pour obtenir des produits plus purs et naturels.

I.2. Composition chimique

L'identification des composés volatils de différents extraits de *T. articulata* obtenus par chaque méthode d'extraction, est réalisée au moyen de GC-FID et quantifiée par GC-MS. Les résultats d'analyse complets sont présentés dans le Tableau VI.2 (annexe). Ces résultats montrent que les HEs et volatiles obtenues par HD, CO₂-SC, Soxhlet et par eau sub-critique

ont des compositions très différentes. Les chromatogrammes correspondants sont présentés dans la Figure VI.3 (annexe). Ainsi, au total 92 composés ont été identifiés par ces différentes méthodes, les composants principaux sont : l'acide palmitique (1,32-36,19 %), l'alpha-pinène (1,08-31,32 %), le Podocarp-7-en-3-one, 13a-methyl-13-vinyl (1,6-,25,53 %), linalool acetate (1,72-21,44 %), α -terpinene (0,12-16,65 %), alloaromadendrene (1,41-11,8 %) et Podocarp-8(14)-en-15al, 13a-methyl-13-vinyl (4,25-10,79 %). Un total de 56 composés a été identifié dans les HEs obtenues par HD, 56, 29 et 14 composés dans les huiles volatiles obtenues par CO₂-SC à 90, 280 et 1000 bar, respectivement, 57 composés dans les fractions volatiles obtenues par l'eau sub-critique et 65 composés dans les extraits de Soxhlet, qui représentaient 98,63% (HD), 96,24% (CO₂-SC 90 bar), 83,85% (CO₂-SC 280 bar), 98,14% (CO₂-SC 1000 bar), 94, 94% (eau sub-critique) et 96,75% (Soxhlet ethanol) de l'huile volatile total. Par souci de simplification de l'analyse, la discussion a été limitée aux composants majeurs (dont la fraction est supérieure à 2%) identifiés pour les différentes méthodes, soit 38 composés qui sont présentés dans le Tableau VI.3.

La principale différence entre la composition d'HE obtenue par HD et la fraction volatile obtenue par CO₂-SC est la proportion de certains composants.

Une observation critique des compositions des huiles révèle que des quantités plus élevées de monoterpènes oxygénés (12,36 et 6,92 %), hydrocarbures monoterpènes (34 et 40,73 %), hydrocarbures sesquiterpènes (8,83 et 21,48 %) et sesquiterpènes oxygénés (18,41 et 5,64 %) sont présents respectivement dans l'HE obtenue par HD par rapport à la fraction volatile extraite par CO₂-SC. Ceci est probablement dû aux propriétés du CO₂ supercritique et à la température d'extraction qui est plus faible dans ce cas. Ainsi qu'aux effets de temps de contact de la matière avec le solvant d'extraction. En effet, dans le cas de HD la matière est émergée dans l'eau chaude (100°C) pendant 3 heures alors que dans le cas de CO₂-SC, le temps d'extraction ne dépasse pas 30 min avec une température très faible 40°C.

Ces résultats montrent qu'une plus courte durée de fonctionnement à basse température est l'un des principaux avantages du CO₂-SC par rapport à l'HD avec la faible température. Par conséquent, pour *T. articulata*, l'extraction au CO₂-SC semble être un procédé intéressant pour l'obtention des huiles volatiles de haute qualité avec un bon rendement. Ainsi, Costa *et al.* [206] ont obtenu des résultats similaires lors du traitement des feuilles de *Lavandula viridis*, où des rendements plus élevés ont été obtenus par la CO₂-SC en comparaison avec l'HD. De même, Pavela *et al.* [207] ont obtenu un rendement plus élevé pour le CO₂-SC par rapport à l'HD lors du traitement du *Tanacetum parthenium (L.)*.

Tableau VI. 2 : Composés majeurs (>2%) de la fraction volatile de *T. articulata* obtenue par chaque méthode (HD, CO₂-SC, Soxhlet et eau sub-critique)

		Type de méthode d'extraction										
		CO ₂ -SC					Soxhlet				HD	
Débit (g/min)	20	20	5	20	20							0,02 mL/s
Température (°C)	40	60	40	40	40		-	-	-	-	-	-
Pression	90	90	90	280	1000							
Solvant	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₃	CO ₂	Eau	EtOH	EtOH	EtOH	Hexane	Eau	
Temps d'extraction (min)	30	30	30	30	30	30	240	360	480	480	180	
Rendement (mg/g)	1,6	1,6	0,6	19,7	25,9	47,8	21,2	26,8	27,4	40,4	0,61	
RI	Composés	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9	N°10	N°11
936	α-pinène	31,32	21,92	9,35	nd	nd	1,08	2,68	3,14	1,02	6,79	24,9
967	β-thujène	2,64	1,56	0,91	nd	nd	0,61	0,45	0,53	0,1	0,68	1,99
983	trans-iso limonène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,85	8,19	7,28	4,93	nd
1004	pseudo limonène	0,26	0,16	0,16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3,22	0,37
1008	3-carène	3,39	2,3	1,5	nd	nd	0,11	nd	nd	nd	3,32	3,44
1012	α-terpinène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13,36	16,65	13,87	4,21	0,12
1128	α-campholénal	3,44	2,67	3,43	0,1	0,43	2,12	1,51	1,81	0,12	1,9	3,84
1148	camphène hydrate	1,25	1,67	2,51	nd	nd	0,46	1,1	1,57	0,78	1,33	4,36
1266	linalol acetate	18,18	15,78	17,69	1,72	nd	2,84	6,15	5,52	2,48	7,44	21,44
1356	α-cubébène	1,11	1,15	1,22	0,47	nd	2,21	0,9	0,73	0,7	0,95	0,26
1400	γ-caryophyllène	4,16	5,43	5,81	2,05	nd	3,4	1,51	1,68	1,35	1,71	2,53
1461	alloaromadendrone	7,55	11,8	10,86	1,41	nd	3,79	nd	2,04	1,38	2,03	1,14
1494	α-zingiberene	2,14	3,52	4,75	2,38	nd	1,87	3,96	2,93	3,13	4,03	0,53
1501	α-amorphène	1,39	1,98	2,76	nd	nd	0,74	nd	nd	nd	nd	1,64

1557	caryophyllène alcohol	1,06	3,23	2,43	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1568	caryophyllene oxide	1,82	2,88	4,04	2,45	nd	1,08	4,21	2,44	2,2	3,54	4,24
1613	1-epi-Cubénol	0,52	1,23	1,67	2,12	nd	1,26	1,17	0,95	0,84	0,92	2,83
1626	γ-eudésmol	0,58	1,01	1,35	nd	nd	0,25	1,73	1,53	1,17	1,12	2,56
1642	spathuléol	0,43	0,77	1,05	0,77	nd	0,69	1,5	1,52	1,36	1,47	2,37
1678	cis- α -santalol	0,44	1,07	1,36	1,24	nd	0,3	2,41	2,8	2,24	2,19	1,74
1778	Platambin	nd	nd	0,31	nd	nd	1,69	1,96	2,82	1,9	0,82	nd
1962	acide palmitique	nd	nd	nd	2,98	36,19	4,19	2,69	1,32	2,2	1,52	nd
2095	Heneicosane	0,4	0,4	0,59	3,66	nd	1,52	2,26	2,01	2,2	2,53	0,09
2135	1R-pimaral	0,13	0,16	0,27	6,09	nd	2,16	2,14		1,83	nd	0,27
2143	cubitene	0,22	0,3	0,58	nd	nd	nd	1,55	1,47	2,33	1,65	nd
2216	15-ripperten- 3alpha-ol	0,41	0,94	1,62	2,11	nd	2,55	2,2	1,76	2,85	2,73	0,52
2274	larixol *	nd	nd	nd	2,17	nd	0,57	0,68	0,66	0,75	0,63	nd
2288	ni	nd	nd	nd	10,29	nd	5,15	0,33	0,44	0,44	0,4	nd
2311	trans-totarol	nd	nd	nd	4,85	0,05	0,87	0,67	0,52	0,74	0,62	0,07
2368	androst-5-en-17-ol, 4,4 diméthyle	nd	nd	nd	2,28	2,49	0,39	4,43	1,73	6,54	3,73	nd
2383	Podocarp-7-en-3- one, 13a-methyl-13- vinyl	nd	nd	nd	7,77	25,53	11,89	1,6	2,53	5,79	4,56	nd
2473	ni	nd	nd	nd	14,4	1,35	15,64	2,56	2,99	2,86	2,28	nd
2922	Acide Abiétique	nd	nd	nd	Nd	0,31	nd	4,41	5,68	5,68	0,51	nd
2925	ni	nd	nd	nd	Nd	1,05	nd	4,89	3,86	6,26	5,46	nd
2930	Podocarp-8(14)-en- 15al, 13a-methyl- 13-vinyl	nd	nd	nd	Nd	10,79	nd	nd	nd	4,25	nd	nd
	ni (M=552)	nd	nd	nd	Nd	2,14	0,52	nd	nd	nd	nd	nd
	ni (M=618)	nd	nd	nd	Nd	8,96	1,27	nd	nd	nd	nd	nd
	ni (M=296)	nd	nd	nd	7,34	7,98	8,38	nd	nd	nd	nd	nd
	Total	82,84	81,93	76,22	78,65	97,27	79,6	80,86	81,82	86,64	79,22	81,25

De plus, le changement des conditions d'extraction avec le CO₂-SC, influe aussi sur la composition chimique des extraits. D'une part, un changement de la température d'extraction (40 à 60°C) montre une variation dans les teneurs des composés. Il est probable que, à 60°C, la solubilité des solutés diminue en raison du phénomène de solubilité rétrograde spécifique aux fluides supercritiques. D'autre part, la diminution du débit de CO₂ (20 à 5 g/min) à température constante, entraîne une diminution des teneurs d'hydrocarbures monoterpènes (40,56% à 13,1%), et une augmentation de la proportion de sesquiterpènes oxygénés (5,64% à 14,6%) et des hydrocarbures sesquiterpéniques (21,76% à 31,2%). Ceci indique une extraction sélective favorisée par cette technologie (CO₂-SC) selon les conditions d'extraction. Ainsi, pour différentes pressions (90 à 1000 bar), des changements importants sont constatés au niveau de la composition chimique des extraits. Il semble qu'il y ait peu de similitudes entre les compositions chimiques des extraits étudiés obtenus par HD et CO₂-SC à chaque pression (surtout à haute pression). Cependant, comme nous le verrons par la suite, à haute pression, nous avons obtenu le meilleur rendement d'extrait contenant des composés ayant des propriétés antioxydants.

Enfin, l'injection en CG des fractions volatiles obtenues par Soxhlet a permis l'identification de composés volatils mais avec des teneurs faibles. Ceci s'explique par la présence de composés de haute masse moléculaire qui se sont révélés être présents en grandes quantités. Il en est de même pour l'extrait obtenu par l'eau sub-critique.

I.3. Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont utilisés pour la prévention de diverses maladies qui sont principalement associées aux radicaux libres. Plus généralement, les composés phénoliques ont été reconnus comme agents antioxydants, qui ralentissent la dégradation due aux effets de l'oxydation en assurant un meilleur vieillissement, et présentent donc une activité médicinale et des fonctions physiologiques [208].

La teneur en composés phénoliques des extraits de *T. articulata* a été déterminée et les résultats sont résumés dans le Tableau VI.4. La concentration des composés phénoliques dans les extraits, exprimée en équivalents acide gallique (mg d'équivalent acide gallique (EAG)/g de matière sèche des plantes) dépend de la polarité du solvant et de la méthode utilisée pour l'extraction. Une large gamme de concentrations phénoliques a été observée dans ces extraits. Cela est dû aux conditions d'extraction de chacune des méthodes : le temps de contact, la pression et la température d'extraction. La teneur en phénols totaux varie de 1 à

466 mg/g EAG. Comme prévu, l'HE obtenue par HD et la fraction volatile obtenue par CO₂-SC (basse pression) fait apparaître une très petite quantité de composés phénoliques . L'extrait obtenu par l'eau sub-critique à 150°C présente une quantité nettement plus élevée de phénols totaux, par rapport aux extraits obtenus par Soxhlet ou CO₂-SC -haute pression. Le contenu en composés phénoliques diminue dans l'ordre : eau sub-critique>CO₂-SC (fraction non-volatile>Soxhlet>HD>CO₂-SC (fraction volatile). En effet, la quantité de composés phénoliques obtenue dans les HE de HD (8,89 ± 0,16 mg EAG/g de matière sèche) est faible mais plus importante que celle contenue dans la fraction volatile obtenue par CO₂-SC (0,49 à 1,18±0,02 mg EAG/g de matière végétale sèche). Ce résultat confirme le faible pouvoir solvant du CO₂ à basse pression pour ces molécules. La quantité de composés phénoliques présente dans la fraction non volatile des extraits CO₂-SC à haute pression est également plus élevée (102,03±4,57 et 192,25±7,91 pour 280 bar et 1000 bar, respectivement).

Tableau VI. 3 : Teneur en composés phénoliques et activité antioxydante exprimées en CI₅₀ (mg/L) pour les différents extraits de *T. articulata* obtenus par HD, Soxhlet, CO₂-SC et eau sub-critique.

Méthodes	Echantillons	Ppt mg/g EAG	DPPH*	ABTS ⁺
			CI ₅₀ (mg/L)	CI ₅₀ (mg/L)
	VTC		4,08 ± 0,14	2,66 ± 0,06
CO ₂ -SC	N°1	1,08 ± 0,06	182,47 ± 5,63	45,28 ± 1,93
	N°2	1,18 ± 0,02	146,02 ± 1,99	40,91 ± 0,53
	N°3	0,49 ± 0,00	242,79 ± 10,09	96,98 ± 2,78
	N°4	102,03 ± 4,57	120,21 ± 3,65	33,55 ± 0,40
	N°5	192,25 ± 7,91	108,16 ± 3,07	29,77 ± 1,30
Eau sub-critique	N°6	466,82 ± 18,38	7,18 ± 0,08	4,12 ± 0,12
Soxhlet	N°7	11,52 ± 0,16	2669 ± 125	375 ± 17,55
	N°8	32,9 ± 1,6	1110 ± 55	51 ± 1,71
	N°9	89,7 ± 3	1836 ± 61	293 ± 14,
	N°10	140,5 ± 9	943 ± 50	281 ± 7,75
Hydrodistillation	N°11	8,89 ± 0,16	3681 ± 69	324 ± 14

Avec CI_{50} c'est la valeur caractéristique de l'activité antioxydante, donne la concentration correspondant à 50% d'inhibition. Plus le CI_{50} est faible, plus le pouvoir antioxydant de la molécule est élevé.

Ces résultats sont dus au changement de propriétés du CO_2 -SC sous l'effet de l'augmentation de la pression d'extraction. Il en est de même pour l'eau: le changement de ses propriétés (une température élevée et une pression suffisante pour qu'elle soit dans l'état sub-critique) la rendent plus efficace pour extraire les substances phénoliques.

Le meilleur résultat en termes de quantité de composés phénoliques a été obtenu avec l'eau sub-critique ($466,82 \pm 18,38$ mg EAG/g de matière sèche des plantes). Les valeurs obtenues par CO_2 -SC à 1000 bar et eau sub-critique en 30 min sont plus élevées que celles de l'extrait d'éthanol par Soxhlet ($11,52 \pm 0,16$ à $89,7 \pm 3$ mg EAG/g de matière sèche) et de l'extrait à l'hexane par Soxhlet ($140,5 \pm 9$ mg EAG/g de matière sèche).

Ces résultats confirment aussi l'efficacité des nouvelles technologies et leurs avantages par rapport aux techniques traditionnelles.

Le résultat obtenu par HD a été confirmé par d'autres études sur *T. articulata* comme celle de Marocco [209].

I.4. Propriétés antioxydants

Les propriétés antioxydantes des extraits des plantes aromatiques sont principalement attribuées à des composés actifs présents dans ces plantes. Cela peut être dû à la forte proportion de constituants principaux, mais aussi à la présence d'autres constituants en petites quantités mais présentant une activité forte ou à la synergie entre eux. L'activité antiradicalaire des extraits est évaluée *in vitro* par les méthodes DPPH[•] et ABTS^{•+} et comparée à celle d'un antioxydant synthétique plus couramment utilisé tel que l'acide ascorbique (Vitamine C). Les différentes valeurs de CI_{50} (mg/L) obtenues à la fois par la méthode ABTS^{•+} et par la méthode DPPH[•] pour les différents extraits ainsi que pour la vitamine C (VC) sont regroupées dans le Tableau VI.4. Les deux tests sont basés sur le même principe de mesure de l'inhibition de différents radicaux en présence d'antioxydants (chapitre II). Cependant, il existe souvent des différences de valeurs entre les méthodes du fait que les sources de radicaux libres soient différentes, et que les antioxydants répondent différemment aux méthodes de mesure. La tendance générale obtenue pour les différents extraits testés est cependant la même avec les deux méthodes [210].

En effet, pour le test DPPH[•], la valeur la plus importante de CI₅₀ de l'HE a été obtenue par HD (3681±69 mg/L), ce qui indique un pouvoir antioxydant très faible. Ce résultat est conforme à celui obtenu par Ben Hadj Ahmed *et al.* [111] (1214,13 mg/L par le test DPPH[•]) avec *T. articulata* d'Algérie. Alors que les valeurs de CI₅₀ (mg/L) varient de 146 à 242 mg/L pour les fractions volatiles obtenues par CO₂-SC, ce qui est très important par rapport à celles des HEs. Ensuite, pour les fractions non volatiles, les valeurs varient de 108,16±3,07 à 122,91±4,30 mg/L pour le CO₂-SC, de 7 à 36 mg/L pour l'extrait obtenu avec l'ASE et de 943 à 2668 mg/L pour les extraits de Soxhlet. Les valeurs obtenues par le test ABTS^{•+} sont plus élevées. En effet, l'CI₅₀ de l'HE obtenue par HD est 324 mg/L, celui de la fraction volatile de CO₂-SC varie de 40,91 à 96,98 mg/L. La fraction non volatile obtenue par ASE varie de 4 à 20 mg/L, avec le CO₂-SC elle varie de 29,77 à 40,91 mg/L, et avec le Soxhlet, elles varient de 51 à 375 mg/L. La grande variation des valeurs de CI₅₀ est due à l'efficacité de la méthode d'extraction et au pouvoir du solvant utilisé pour extraire les antioxydants naturels. De même, on observe l'effet du changement des conditions d'extraction pour chaque méthode sur le pouvoir antioxydant de son extrait. En effet, les résultats montrent qu'une augmentation de la température (de 40°C à 60°C) entraîne une diminution de l'activité antioxydante de l'extrait. Faire varier le débit de CO₂ (de 20g/min à 5g/min) diminue aussi l'activité antioxydante (45±2 à 97±3 mg/L) de l'extrait. Ces résultats peuvent être expliqués par le changement des propriétés lorsqu'on change la température et par le fait que, pour le temps d'extraction choisi, et puisque le processus d'extraction est supposé être limité par la solubilité apparente, l'extraction à 20g/min est complète, ce qui n'est pas le cas à 5 g/min. Dans ce dernier cas, les composés qui contribuent à l'activité antioxydante ne sont pas complètement récupérés.

De même, pour l'extraction Soxhlet, deux solvants ont été testés et le temps d'extraction a été modifié dans le cas de l'éthanol. Dans ce cas, les résultats montrent qu'une durée d'extraction de 6 heures était préférable pour obtenir un rendement intéressant (essai n°8) avec une bonne activité antioxydante des extraits (51 mg/L avec test ABTS^{•+}). Les meilleurs résultats obtenus par les deux tests étaient ceux de l'extrait obtenu avec l'eau sub-critique (7,18 mg/L pour le DPPH[•] et 4,12 mg/L pour l'ABTS^{•+}). Ces extraits montrent en effet un pouvoir antioxydant très élevé comparé aux résultats standards (VTC: 4,08±0,14 par DPPH[•] et 2,66±0,06 de l'ABTS^{•+}).

Par conséquent, ces résultats montrent bien le pouvoir antioxydant important des fractions volatiles de *T. articulata* obtenues par CO₂-SC (à 90 bar et 40°C) par rapport à celui de l'huile essentielle obtenue par HD. De même, pour la fraction non volatile, le pouvoir

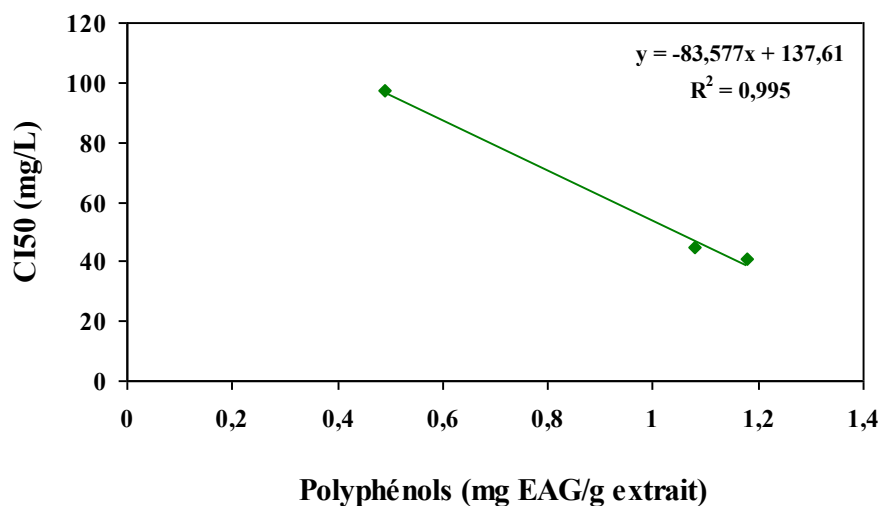
antioxydant des extraits obtenus par les nouvelles technologies est beaucoup plus important par rapport à ceux obtenus par Soxhlet (éthanol et hexane). Ces résultats suggèrent que le CO₂-SC et l'eau sub-critique permettent de récupérer un ou plusieurs composés possédant des propriétés antioxydantes élevées alors que ces composés ne sont pas extractibles avec l'HD ou le Soxhlet-solvant organique. Une autre hypothèse pourrait être que, dans le cas de l'extraction Soxhlet ou HD, ces composés actifs sont détruits dans les deux méthodes parce qu'ils sont exposés à des températures élevées pendant une longue période. Ceci démontre les intérêts principaux du processus de CO₂-SC et d'eau sub-critique par rapport aux techniques traditionnelles d'extraction [211]. En effet, une certaine dégradation thermique peut se produire lors de l'extraction conventionnelle, puisque la matrice végétale dans l'HD a été soumise à une température de 100°C pendant 3 heures et qu'elle a été en contact pendant 6 heures avec le solvant organique dans le cas du Soxhlet par rapport à une extraction ne dépassant pas 30 min à 90 bar et 40°C pour le CO₂-SC. Dans le cas de l'ASE, la matière végétale est en contact avec de l'eau à température élevée mais pendant une durée plus courte en comparaison avec le Soxhlet ou l'HD.

L'importance du temps de contact est démontrée en comparant l'HE extraite par HD (en 3 heures) avec de l'eau à 100°C ayant une très grande CI₅₀ et l'extrait obtenu avec l'eau sub-critique (en 30 min) à 150°C. Ainsi, nous pouvons confirmer ces résultats en comparant l'extrait obtenu par le Soxhlet avec de l'éthanol pendant 6h (1110 mg/L pour le DPPH[•] et 51 mg/L pour l'ABTS^{•+}) et celui obtenu par l'ASE avec de l'éthanol pendant 30 min (36,9 mg/L pour DPPH[•] et 20,78 mg/L pour l'ABTS^{•+}).

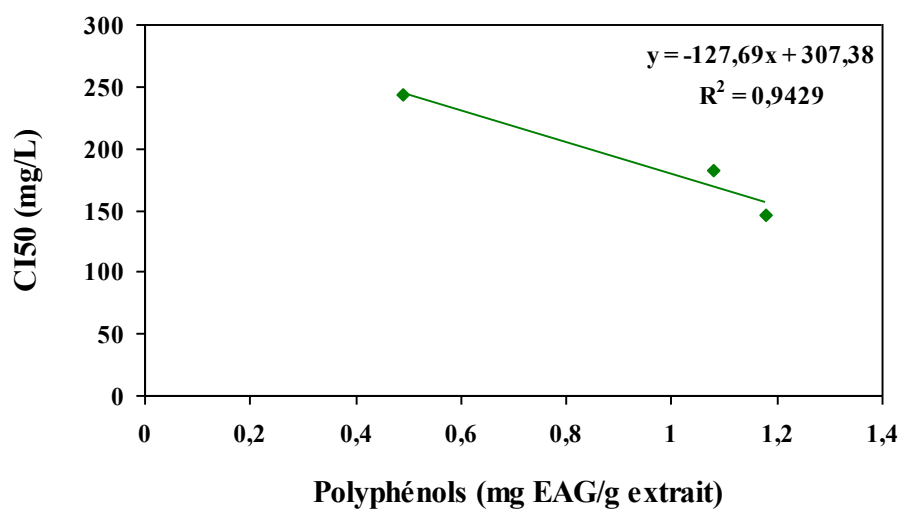
L'activité antioxydante est souvent due à la présence de composés phénoliques. Dans notre cas cependant, les extraits obtenus par CO₂-SC ont une teneur très faible en composés phénoliques alors que leur pouvoir antioxydant est important. Ceci montre peut-être que l'extraction des composés non phénoliques par CO₂-SC est responsable de cette activité ou que les composés phénoliques détectés sont très actifs. Ceci est confirmé par la bonne corrélation ($R^2 = 0,99$ pour ABTS^{•+} et $R^2 = 0,94$ pour DPPH[•]) entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques pour les fractions volatiles de CO₂-SC pour différentes conditions d'extraction (Figure VI.4). On peut donc supposer que, même à faible concentration, les composés phénoliques présents dans les extraits obtenus par CO₂-SC sont probablement des molécules très actives.

La corrélation entre la quantité de composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante est originale et est confirmée pour le CO₂-SC pour la première fois.

Bien que l'extrait de l'éthanol-Soxhlet ait donné de bons résultats, son utilisation en tant que procédé industriel est discutable, surtout au regard des risques qu'il génère (soit en raison de leur toxicité soit en raison de leur inflammabilité). L'utilisation d'un solvant «vert» tels que le CO₂-SC ou l'eau sub-critique ne présente aucun de ces inconvénients.



(a)



(b)

Figure VI. 3 : Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante déterminée par la méthode ABTS^{•+} (a) et la méthode DPPH[•] (b).

Ces résultats montrent que les extraits de *T. articulata* obtenus par CO₂-SC ou l'eau sub-critique pourraient être utilisés comme une source potentielle d'antioxydants naturels avec des applications possibles dans les systèmes alimentaires.

II. Applications à d'autres plantes

II.1. Cyprès de sempervirens

II.1.1. Le rendement d'extraction

Dans le but d'étendre les résultats obtenus pour *T. articulata* en utilisant les nouvelles technologies d'extraction des HEs ou des fractions volatiles, nous avons appliqué ces méthodes, dans les conditions les plus favorables déterminées précédemment avec *T. articulata* et rassemblées dans le Tableau VI.2, à l'extraction de feuilles de *C. sempervirens*. Nous allons, dans cette partie, nous intéresser à la fraction volatile de cette plante. Ainsi, nous avons comparé la fraction volatile obtenue par CO₂-SC à basse pression et l'HE obtenue par HD, en termes de quantité et de qualité. Le rendement global pour chaque méthode est calculé comme précédemment ($Y = \text{mg d'huile extraite/g de matière sèche chargée dans l'extracteur}$). Les résultats sont présentés dans le Tableau VI.5. D'après le Tableau VI.5, le rendement global de la fraction volatile (8,3 mg/g) obtenu par CO₂-SC en 30 min est plus important que celui de l'HE (6,2 mg/g) obtenu par HD en 3 heures. En outre, la couleur et l'odeur des extraits sont différentes. En effet, l'HE est jaune, alors que la fraction volatile obtenue par CO₂-SC est jaune foncé avec une forte odeur très proche de celle des feuilles de la plante *C. sempervirens*. Ces résultats confirment ceux qui ont été obtenus avec *T. articulata*, et peuvent être expliqués par la probable dégradation thermique des molécules actives obtenues par HD due à l'exposition pendant une longue période à une température élevée.

Ainsi, la méthode traditionnelle peut, dans une certaine mesure, altérer l'odeur des composés aromatiques contenus dans la plante.

Tableau VI. 4 : Rendement global des huiles volatiles de *C. sempervirens* obtenues par HD et CO₂-SC.

	HD	CO ₂ -SC (à 90 bar, 40°C)
Rendement (mg extrait/g matière sèche)	6,2	8,3
Temps d'extraction (min)	240	30
Couleur	Jaune	Jaune foncé
Odeur	Pas d'odeur spécifique	Odeur très naturelle proche de celle des

II.1.2. Composition chimique

Les fractions volatiles de *C. sempervirens* obtenues par chaque méthode ont été identifiées par CG-FID et quantifiées par CG-MS.

Les résultats des chromatogrammes et les principaux composés détectés dans les extraits de *C. sempervirens* obtenus par CO₂-SC et HD sont présentés dans la Figure VI.5.

Le spectre de masse de chaque composé a été analysé et afin d'identifier les composés nous avons utilisé la bibliothèque de spectres de masse des produits chimiques connus. Cinquante composés ont été identifiés représentant 98% de la totalité des HEs. Dans l'HE obtenue par HD seulement 8 composés ont été identifiés tandis que de nombreux autres composés ont été détectés dans les extraits CO₂-SC. Les principaux composants de l'HE obtenue par HD sont: l' α -pinène (46,6%), le Myrcène (15,7%), le pipéronal (5,3%) et le trans-4,5-époxy-(E)-2-docénal (5,4%), dans le chromatogramme de la Figure VI.5 -HD. Les principaux constituants des extraits CO₂-SC étaient: l'oxyde manoyl (15,9%), le trans-totarol (6,8%), l' α -acoradiène (5,7%) et le cis-alpha-santalol (5,3%) comme le montre le chromatogramme de la Figure VI.5-CO₂-SC.

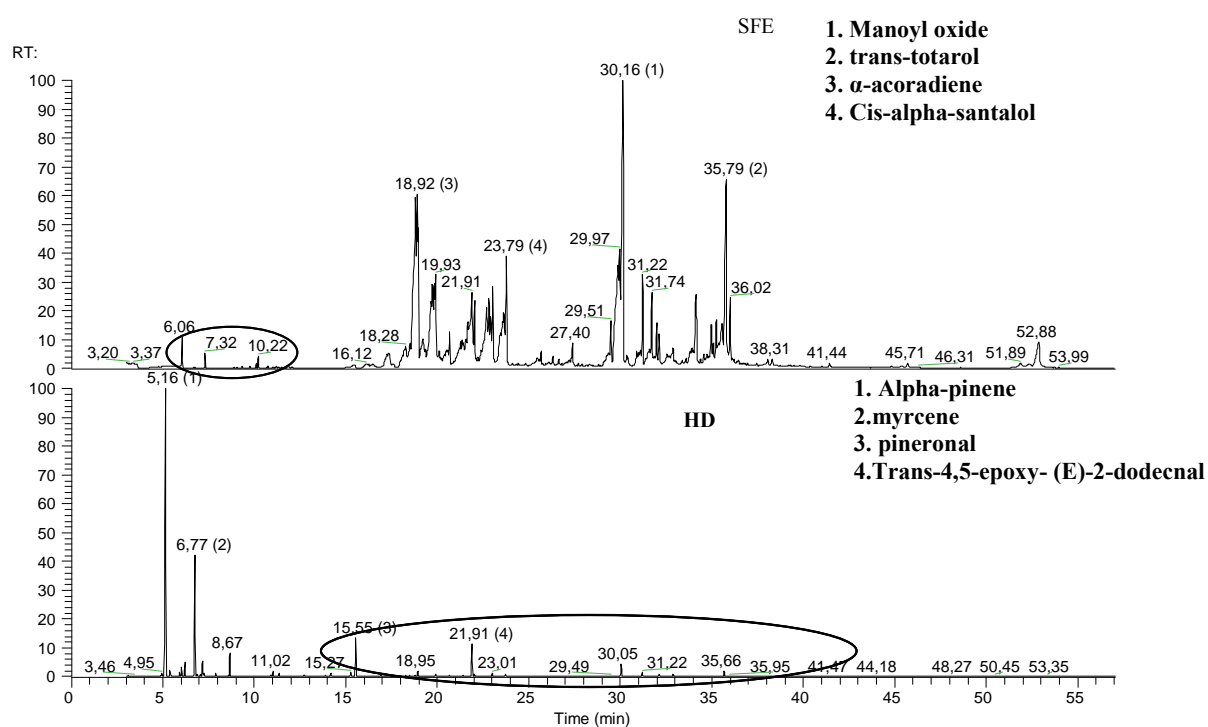


Figure VI. 4: Chromatogrammes et composés principaux de l'HE de *C. sempervirens* obtenue par CO₂-SC et HD.

En outre, nous pouvons observer que les composés oxygénés extraits par CO₂-SC, comme le manoyl oxyde, trans-totarol et l'alpha-acoradiene ne sont pas présents dans l'extrait HD, peut-être à cause d'une dégradation thermique de ces composés en raison de la température élevée de l'HD.

Ces résultats GC-MS peuvent expliquer la différence entre HD et CO₂-SC concernant l'odeur, la couleur et le rendement d'extraction.

II.1.3. Teneur en composés phénoliques et activité antioxydante

La teneur en composés phénoliques présents dans les extraits a été mesurée comme précédemment par la méthode de Folin-Ciocalteu et l'activité antioxydante des extraits a été évaluée par DPPH[•] et ABTS^{•+}. Une comparaison de la quantité totale phénolique et de l'activité antioxydante des huiles obtenues par les deux méthodes HD et CO₂-SC est résumée dans le Tableau VI.6. La différence observée entre les valeurs de DPPH[•] et ABTS^{•+} peuvent s'expliquer par les mécanismes impliqués dans les réactions.

Tableau VI. 5 : Teneur en composés phénoliques (EAG) et activité antioxydante exprimée en CI₅₀ (mg/L) obtenue par HD et CO₂-SC

	Teneur en composés phénoliques (mg EAG/g matière sèche)	DPPH [•] CI ₅₀ (mg/L)	ABTS ^{•+} CI ₅₀ (mg/L)
CO ₂ -SC	4,2±0,1	146±2	45±3
HD	10,9±1,2	3681±69	295±6
Vitamine C	-	4,0±0,1	2,7±0,1

La teneur en composés phénoliques dans l'HE de *C. sempervirens* obtenue par HD (10,9±1,2 mg EAG/g Matière végétale) est légèrement supérieure à celle de l'huile volatile obtenue par CO₂-SC (4,2±0,1 mg EAG/g Matière sèche). Cependant, les résultats de l'activité antioxydante obtenue avec les deux tests, principalement le test ABTS^{•+} montrent une activité

antioxydante importante de l'huile volatile obtenue par CO₂-SC (CI₅₀=45,0±3,2 mg/L) par rapport à l'HE obtenue par HD (CI₅₀=295±6 mg/L), par rapport à la référence à la vitamine C (CI₅₀=2,7±0,1 mg/L). Ces résultats avaient été aussi été montrés pour *T. articulata*.

Enfin, l'extraction des fractions volatiles de *C. semprevirens* par la méthode CO₂-SC offre de nombreux avantages par rapport à l'HD : le rendement d'extraction du CO₂-SC a été 34% plus élevé par rapport à l'HD. En outre, l'extraction au CO₂-SC est plus rapide (30 min) par rapport à l'HD (240 min). Enfin, les extraits CO₂-SC présentent un pouvoir antioxydant plus important.

II.2. *Eucalyptus Cinérea et Eucalyptus Camaldulensis*

II.2.1. Rendement global d'extraction

De manière similaire au cas précédent, les deux techniques d'extraction HD et CO₂-SC sont utilisées pour extraire la fraction volatile de deux espèces d'Eucalyptus. Le rendement global de chaque extrait des feuilles d'*E. cinerea* et *E. camaldulensis* obtenus par CO₂-SC et HD est donné dans le Tableau VI.7. L'intensité de la couleur des extraits des deux espèces est différente: l'HE obtenue par HD est jaune alors que celle obtenue par CO₂-SC présente une couleur jaune foncé qui peut être associée à des différences de composition chimique.

Tableau VI. 6: Rendement global d'extraction d'*E. cinerea* et *E. camaldulensis* obtenus par HD et CO₂-SC (Pour un débit de CO₂ 20 g/min, Pression 90 bar et température 40°C)

	<i>E. cinerea</i>		<i>E. camaldulensis</i>	
	HD	CO ₂ -SC	HD	CO ₂ -SC
Temps d'extraction (min)	180	30	180	30
Température (°C)	100	40	100	40
Rendement (mg extrait/g matière sèche)	23±0,16	27,5±0,24	6,2±0,1	8,8±0,21
Couleur	Jaune	Jaune foncé	Jaune	Jaune foncé

Le rendement global de l'HE extraite de *E. cinerea* et *E. camaldulensis* obtenu par HD est de 23 mg/g et 6,2 mg/g, respectivement. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature sur l'HE d'*E. cinerea* obtenue par HD [127] ce qui représente environ 3% (30

mg/g) ainsi que pour l'*E. camaldulensis* dont le rendement en HE [212] représente environ 8 mg/g. En outre, le rendement global de la fraction volatile de chaque espèce obtenue par extraction CO₂-SC à 40°C et 90 bar est de 27,5 mg/g et 8,8 mg/g, respectivement pour *E. cinerea* et *E. camaldulensis*. Ici encore, les résultats montrent que les rendements obtenus pour chaque plante par CO₂-SC en 30 min sont plus importants que ceux obtenus par HD en 3 heures. Ceci est en accord avec d'autres travaux pour ce qui est des capacités du CO₂-SC à extraire des fractions volatiles. En effet, Fadel et al. [128], dans les conditions expérimentales suivantes: 50°C, 200 bar pendant 120 minutes, ont montré que le rendement global obtenu était de 11 mg/g pour *E. camaldulensis*. Da Cruz et al. [129] avec du CO₂-SC à 250 bar et 40°C pendant 120 min, ont montré que le rendement était de l'ordre de 20 mg/g. Dans notre étude, la fraction volatile obtenue par CO₂-SC pour les deux espèces, *E. cinerea* et *E. camaldulensis* améliore le rendement d'extraction d'environ 20% et 30%, respectivement en comparaison avec l'HD. Comme précédemment, ceci est probablement dû aux propriétés du CO₂-SC et aux particularités du procédé déjà évoquées pour les autres plantes.

II.2.2. Composition chimique

Les fractions volatiles de chaque plante ont été injectées et identifiées par CG-MS. Les résultats sont présentés dans le Tableau VI.8 (annexe). Les chromatogrammes obtenus pour chaque extrait sont présentés dans la Figure VI.6.

Ces résultats montrent des compositions différentes entre les extraits de la même plante 37 composés (94,22 %), 39 (96,54 %), pour la fraction volatile de *E. cinerea* (HD, CO₂-SC) et 43 (97,17 %) et 41 (100 %) pour la fraction volatile de *E. camaldulensis* (HD, CO₂-SC) respectivement. La plupart des composés ont pu être identifiés à l'exception des extraits CO₂-SC d'*E. camaldulensis*. Nous avons pu identifier certains composés volatiles mais d'autre entre eux de grande masse moléculaire restent non identifié par CG-MS. Par souci de simplicité, la discussion a été limitée aux composants majeurs (fractions supérieures à 3%) identifiés pour les différentes méthodes (12 composés) présentés dans le Tableau VI.9.

Ce résultat est en accord avec d'autres publications qui rendent compte de plus de composés identifiés dans les extraits CO₂-SC que pour l'HE obtenu par HD mais avec une différence dans les composés majeurs dans les huiles volatiles des *E. camaldulensis* et *E. cinerea* [213, 214].

Les principaux composés pour l'HE d'*E. cinerea* obtenue par HD sont: le 1,8-cinéole (64,89%), le p-menth-1-en-ol (8,15%), le terpinène-4-ol (4,30%) et l'alpha-pinène (4,07%).

Les principaux composés identifiés dans la fraction volatile d'*E. cinerea* obtenue par CO₂-SC sont: le p-menth-1-ène-8-ol (31,87%), le 1,8-cinéole (16,1%), le 8,14 - cedranoxide (5,68%), le terpinène-4-ol (5,34%) et l'alcool caryophyllène (5,39%). Dans le cas de l'*E. camaldulensis*, l'HE obtenue par HD est riche en 1,8-cinéole (45,71%), en p-cymène (17,14%), en α-pinène (7,88%) et en limonène (5,06%). Alors que celui de la fraction volatile obtenue par CO₂-SC est riche en 8,14-cedranoxide (43,79%), en élémol (6,3%) et en myrtanal (4,38%).

Dans la littérature, à notre connaissance, une seule étude sur l'*E. cinerea* a comparé la composition chimique des fractions obtenues par CO₂-SC et HD et quantifié par GC-FID et identifié par CG-MS [127].

Tableau VI. 7 : Compositions chimiques (>3%) des extraits obtenus par chaque méthode

IK	Composés	<i>E. Cinerea</i>	<i>E. Cinerea</i>	<i>E. Camaldulensis</i>	<i>E. Camaldulensis</i>
		HD	CO ₂ -SC	HD	CO ₂ -SC
		%	%	%	%
937	α-pinene	4,07		7,88	
1025	p-cymène	1,52	0,37	17,14	0,90
1029	Limonène	3,05		2,06	
1033	1,8-cinéole	64,89	16,10	45,71	1,74
1177	terpinèn-4-ol	4,30	5,34	6,36	4,38
1318	P-menth-1-en-8-ol	8,15	31,87	0,17	
1421	béta-gurjunene		0,96	0,27	3,30
1456	beta-acoradiene	0,19	5,03		1,14
1538	8,14-cedranoxide	0,72	5,68	2,54	43,79
1545	Elémol	0,62	4,15	2,01	6,30
1555	caryophyllene alcohol	0,74	5,39	0,85	
1714	cis-beta-santalol		0,36		3,05
1728	E-gamma- curcumèn-12-ol				3,30
Total		89	75	86	62

L'HE produite par HD contenait le 1,8-cinéole (85,1%) comme constituant majeur, suivi par l'α-terpinéol (7,2%) et le limonène (4,4%). L'extrait produit par CO₂-SC a été dominé par le 1,8-cinéole (70,4%), l'alpha-terpinéol (8,6%) et globulol (3,1%). Nous avons remarqué une grande différence dans la composition chimique et la quantité de nos extraits comparés à

ceux de Mann [127]. Dans d'autres travaux [128,129] sur l'extraction de l'*E. camaldulensis* par HD et CO₂-SC, où ils ont identifié des compositions très différentes entre eux. Différences en composés majoritaires détectés et les teneurs des différents composés avec notre échantillon.

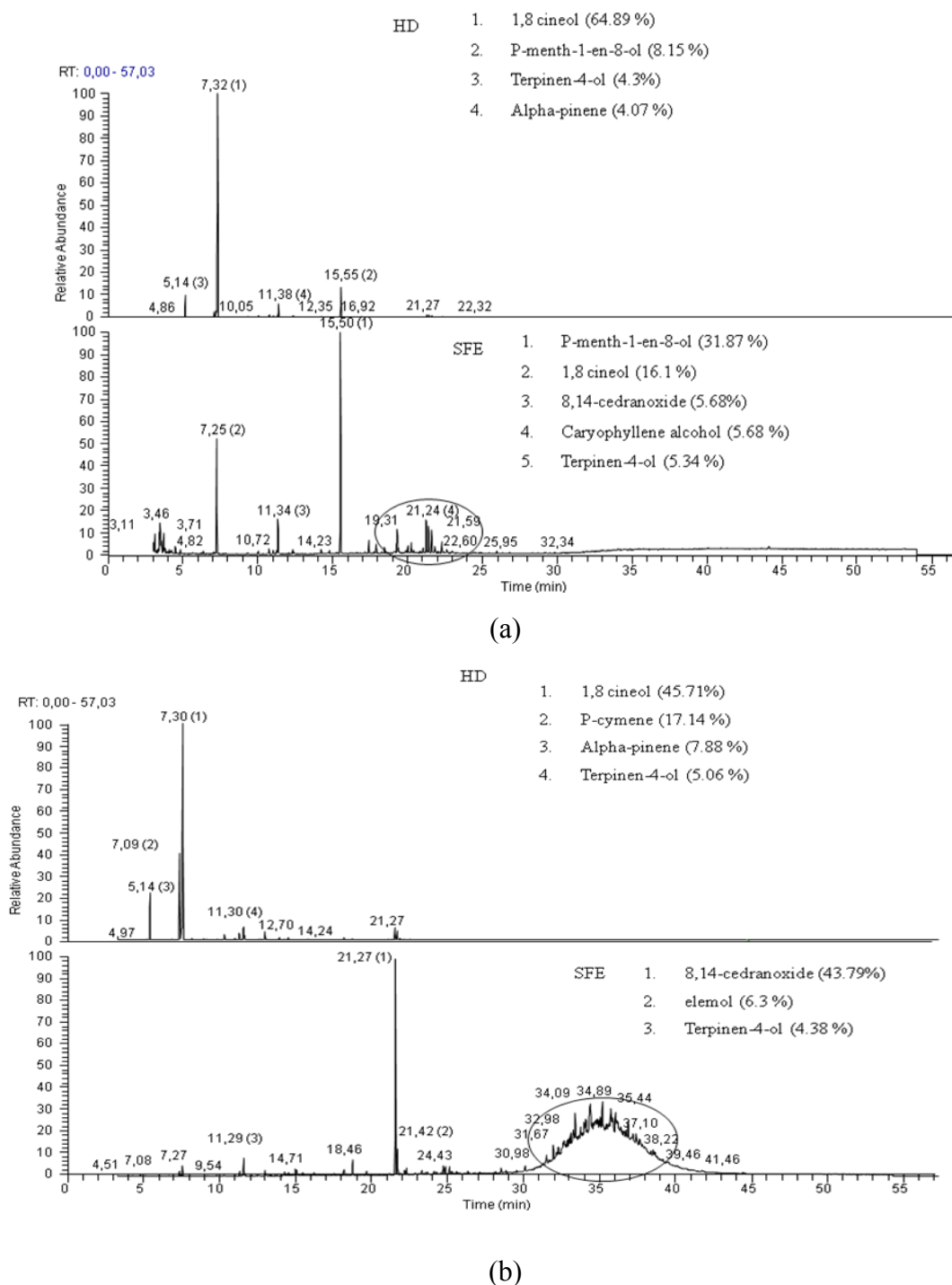


Figure VI. 5: Chromatogrammes des fractions volatiles obtenues par HD et CO₂.SC

de *E. cinerea* (a) and *E. camaldulensis* (b) (Pour un débit de CO₂ 20 g/min, Pression 90 bar et température 40°C).

Dans la plupart des cas rencontrés dans la littérature, la comparaison entre HD et le CO₂-SC a montré une différence de rendements, mais quelques variations dans la composition chimique pour les mêmes composés majeurs dans l'extrait ont également pu être observées. Notre étude, met pour la première fois en évidence de telles variations entre les principaux composés.

A titre de comparaison plus détaillée, dans les extraits obtenus par HD, le 1,8-cinéole est le principal composant de l'HE pour les deux espèces (64,89% des *E. cinerea* et 45,71% de *E. camaldulensis*). L' α -pinène et le limonène sont présents à des concentrations élevées dans les deux échantillons, mais le p-menth-1-ène-8-ol et le terpinène-4-ol sont présents à des concentrations élevées uniquement dans l'HE d'*E. cinerea*, et le p-cymène et le myrtanol dans l'*E. camaldulensis*. A l'inverse, dans les extraits CO₂-SC, le 1,8 cinéole (16,1%) a été détecté à une concentration élevée, mais il n'est pas le principal composé.

Les extraits de ces deux espèces obtenus par CO₂-SC, en particulier pour l'*E. camaldulensis*, ont été caractérisés par des teneurs plus élevées en composés plus lourds (masse moléculaire, temps de rétention dans la gamme 30-40 min) que dans le cas des HEs obtenues par HD, comme on peut le voir à partir des chromatogrammes de la Figure VI.6. En parallèle, des composants plus légers, par exemple de l' α -thujène, de l' α -pinène, du camphène, du limonène et du γ -terpinène, présents dans les HEs obtenues par HD, sont faiblement détectés dans les extraits CO₂-SC. Cela ne veut pas dire que les composés légers ne sont pas présents dans les extraits CO₂-SC, mais la présence d'autres composés, en particulier lourds, réduira de manière importante leur proportion. En effet, il serait surprenant que le CO₂-SC n'extrait pas ce type de composés plus légers qui sont connus pour être solubles dans le CO₂ dans ces conditions.

II.2.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques

Les teneurs en composés phénoliques dans les fractions de feuilles d'eucalyptus ont été déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu et les résultats ont été exprimés en équivalents acide gallique (EAG) (mg/g de matière sèche) et présentés dans le Tableau VI.10.

Les teneurs en composés phénoliques des deux espèces varient beaucoup selon la méthode d'extraction. Les HEs de ces deux espèces d'Eucalyptus présentent une teneur en composés phénoliques sensiblement plus élevée (43,85 mg EAG/g de *E. cinerea* et 60,19 mg EAG/g *E. camaldulensis*) par rapport à ceux obtenus par CO₂-SC (3,9 mg EAG/g de *E. cinerea* et 2,16 mg EAG/g de *E. camaldulensis*).

Tableau VI. 8 : Teneur en composés phénoliques (mg EAG/g de matière sèche) et activité antioxydante exprimée en CI₅₀ (mg/L) des fractions volatiles d'*E. cinerea* et *E. camaldulensis* obtenus par HD et CO₂-SC

	<i>E. cinerea</i>		<i>E. camaldulensis</i>	
	HD	CO ₂ -SC	HD	CO ₂ -SC
Teneur en composés phénoliques (mg EAG/g de matière sèche)	43,85±1,03	3,9±0,07	60,19±1,33	2,16±0,03
CI ₅₀ DPPH• (mg/L)	1519±52	468±21	1146±45	606±30
CI ₅₀ ABTS• ⁺ (mg/L)	399±15	65±3	183±3	128±4

Cela peut être dû à la faible polarité du CO₂ qui ne permet pas l'extraction de composés polaires lourds. En effet, ces composés ne sont pas détectés par GC-MS, ce qui indique qu'ils ne sont pas volatils. La plupart des études sur l'HD et les extraits par CO₂-SC, qui utilisent la CG-MS pour identifier les composés volatils, ne présentent pas l'analyse des composés phénoliques. À notre connaissance, aucune étude n'est présente dans la littérature sur la quantification de composés phénoliques dans les extraits de ces deux espèces d'Eucalyptus obtenus par HD ou CO₂-SC.

II.2.4. Activité antioxydante des fractions volatiles HD et CO₂-SC

Les activités antioxydantes, exprimées en CI₅₀ (mg/L), des HEs obtenues par HD et les fractions volatiles obtenues par CO₂-SC des deux espèces ont été mesurées par les tests DPPH• et ABTS•⁺ et comparées à celle du Vitamine C. Les résultats de chaque extrait d'Eucalyptus de deux espèces sont présentés dans le Tableau VI.10.

Le pouvoir antioxydant de la fraction volatile obtenue par CO₂-SC est plus important que celle de l'HE obtenue par HD. Il a été rapporté qu'il existe une relation entre l'activité antioxydante et la présence de phénols tels que le thymol et l'eugénol [215] et la teneur en

composés phénoliques contenus dans certaines HEs [216-220]. Cependant, dans notre étude, bien que les extraits obtenus par CO₂-SC contiennent une plus faible teneur en composés phénoliques que l'HE, leur pouvoir antioxydant est plus important. Ceci indique la présence de certains composés non phénoliques et actifs dans les fractions volatiles de CO₂-SC. En effet, une forte activité anti-radicalaire a été observée avec ABTS ^{•+} dans les extraits de CO₂-SC pour les deux espèces *E. cinerea* (65±3 mg/L) et *E. camaldulensis* (128±4 mg/L) par rapport à ceux des HEs obtenues par HD (399±15 mg/L, *E. cinerea* et 183±3 mg/L pour *E. camaldulensis*).

Les études sur des extraits de ces deux plantes obtenus avec le CO₂-SC sont très rares. Nous pouvons citer celle de Fadel et *al.*, [128] qui confirme la forte activité antioxydante de l'extrait obtenu par CO₂-SC.

De même que dans le cas de *T. articulata*, on observe que la composition chimique et les propriétés antioxydantes de l'huile volatile obtenue à partir des deux espèces d'Eucalyptus sont influencées par les méthodes d'extraction.

II.3. Callitris glaucophylla

II.3.1. Rendement global d'extraction

L'extraction des HEs et des fractions volatiles de *Callitris glaucophylla* a été effectuée par les deux techniques HD et CO₂-SC. Les résultats sont présentés dans le Tableau VI.11.

Les résultats montrent une amélioration de 39% du rendement global pour l'extraction le CO₂-SC par rapport à celui de l'HD. La qualité de produit observé est différente de par la couleur et l'odeur, ce qui confirme les résultats obtenus pour les autres plantes.

Tableau VI. 9: Rendement global des huiles volatiles de *C. glaucophylla* obtenue par HD et CO₂-SC.

	HD	CO ₂ -SC (à 90 bar, 40°C)
Rendement (mg extrait/g matière sèche)	0,51	0,84
Temps d'extraction (min)	240	30
Couleur	Jaune	Couleur jaune foncé
Odeur	Odeur non spécifique	Odeur très naturelle proche à celle des feuilles

Dans la littérature, à notre connaissance, on trouve peu d'information concernant cette plante. On peut citer par exemple le travail de Watanabe *et al.* sur *C. glaucophylla* d'Australie [221]. Mais aucun résultat n'est présent sur l'extraction des huiles volatiles des feuilles de *C. glaucophylla* par les technologies non traditionnelles.

II.3.2. Composition chimique

Les fractions volatiles des feuilles de *C. glaucophylla* obtenus par CO₂-SC et HD sont injectées et identifiées par GC-MS. Les chromatogrammes obtenus pour chaque extrait sont présentés dans la Figure VI.7.

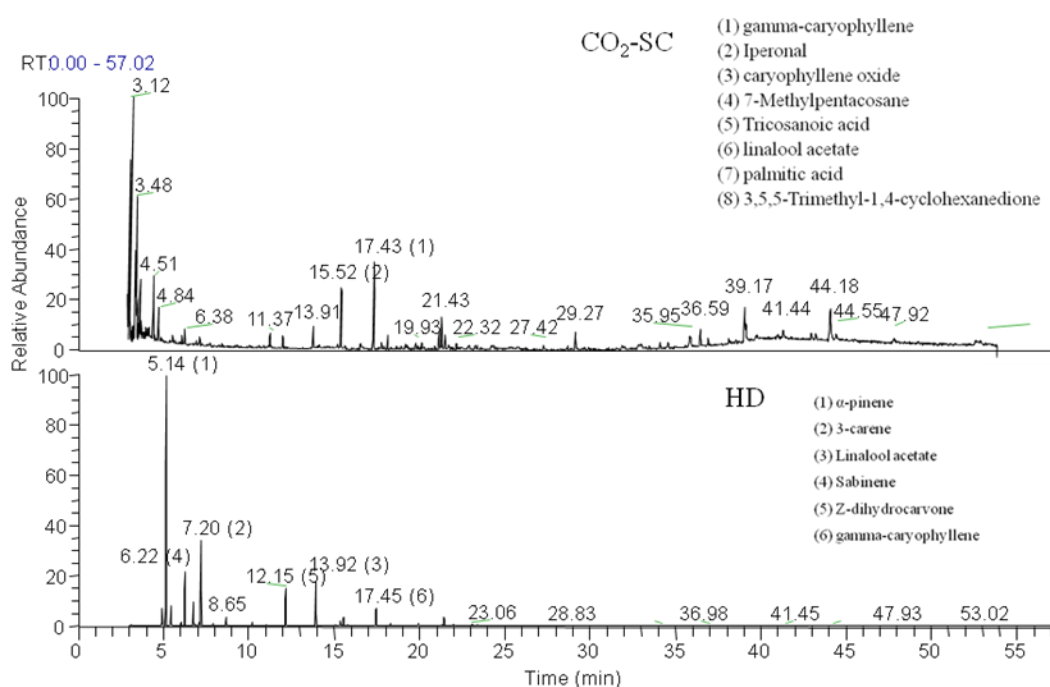


Figure VI. 6: Chromatogrammes des fractions volatiles obtenus par HD et CO₂-SC de *C. glaucophylla* (pour un débit de CO₂ 20 g/min, pression 90 bar et température 40°C)

Ces résultats montrent des différentes compositions entre les extraits de chaque méthode. Les composés majoritaires identifiés dans l'HE obtenu par HD sont présentés dans la Figure VI.7 (HD) (α-pinène (33,73%), 3-carène (14%), linalool acétate (7,5%), sabinène (7,24%), Z-dihydrocaryone (5,67%) et γ-caryophyllène (3,55%)). Cependant, celles d'huile volatile obtenue par CO₂-SC sont présentées dans la Figure VI.7 (CO₂-SC) (γ-caryophyllène (20,89%), Iperonal (11,26%), caryophyllène oxide (10,41%), 7-Methylpentacosane (9,38

%), Tricosanoic acid (8,95%), linalool acétate (5,34%), acide palmitique (4,52%) et 3,5,5-Trimethyl-1,4-cyclohexanedione (3,25%).

La différence en composition chimique est observée aussi avec les autres plantes, ce qui confirme l'effet de la méthode d'extraction sur la qualité des substances naturelles d'origine végétale.

II.3.3. Teneurs en composés phénoliques et activité antioxydant

La teneur en composés phénoliques présents dans les extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu et l'activité antioxydante a été évaluée par deux tests DPPH[•] et ABTS^{•+}. Une comparaison de la quantité totale phénolique et de l'activité antioxydante des huiles volatiles obtenues par les deux méthodes HD et CO₂-SC est résumée dans le Tableau VI.12.

Tableau VI. 10: Teneur en composés phénoliques (Gallic acid eq) et activité antioxydante exprimée en CI₅₀ (mg/L) pour la fraction volatile de *C. glaucophylla* obtenue par HD et CO₂-SC (Pour un débit de CO₂ 20 g/min, Pression 90 bar et température 40°C)

	Teneur en composés phénoliques (mg eq acide gallique/g matières sèche)	DPPH [•] CI ₅₀ (mg/L)	ABTS ^{•+} CI ₅₀ (mg/L)
CO ₂ -SC	4,84±0,1	136±2	41,6±3
HD	5,43±0,21	1399,2± 0	368,1±7
Vitamine C	-	4,0±0,1	2,7±0,1

Les résultats font apparaître les mêmes observations que pour les autres plantes: une faible teneur en composés phénoliques dans les fractions volatiles obtenues par les deux techniques (4,84±0,1 en CO₂-SC et 5,43±0,21 en HD, mg EAG/g Ms) et un pouvoir antioxydant important (41,6±3 mg/L) dans la fraction obtenu par CO₂-SC par rapport à celui de HE (368,1±7 mg/L).

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons comparé les différents extraits obtenus par CO₂-SC et HD pour 4 plantes. Cette comparaison a été faite en termes de qualité de produit obtenue, évaluée par la composition chimique des fractions volatiles et leur pouvoir antioxydant.

Les résultats pour *T. articulata* montrent bien l'efficacité des nouvelles technologies d'extraction par le dioxyde de carbone et l'eau sub-critique.

Cependant, le procédé le plus efficace pour extraire les fractions volatiles en quantité importante et présentant une activité anti-oxydante intéressante est le CO₂-SC à basse pression (90 bar). Concernant l'extraction des fractions non volatiles, les rendements et activités anti-oxydantes obtenus par CO₂-SC à haute pression et avec l'eau sub-critique sont beaucoup plus importants que ceux qui ont été obtenus par extraction avec un solvant organique.

Dans les conditions opératoires de CO₂-SC déterminées à partir des résultats obtenus sur *T. articulata*, nous avons réalisé quelques extractions sur d'autres plantes, où des résultats similaires ont pu être mis en évidence.

Conclusion générale

Tout au long de ce travail de recherche, nous avons comparé les performances des procédés traditionnels d'obtention des HEs (HD) et l'extraction par solvant organique aux nouvelles technologies d'extraction (extraction au CO₂-SC et à l'eau sub-critique). Ainsi, sur une première plante, *T. articulata*, nous avons optimisé les conditions opératoires de chaque technique. Cette optimisation a été réalisée dans un premier temps à l'aide d'une étude paramétrique, ensuite par la modélisation à partir de modèles mathématiques. Ensuite, nous avons appliqué ces techniques d'extraction à d'autres plantes aromatiques et médicinales et nous avons comparé les résultats obtenus quantitativement et qualitativement.

D'une part, les travaux réalisés ont permis d'évaluer la capacité des différentes techniques d'extraction à récupérer les principes actifs d'origine végétale. Ainsi, nous avons pu déterminer les avantages des nouvelles technologies par rapport aux traditionnelles. En effet, en termes de quantité, les meilleurs résultats des fractions volatiles ont été obtenus par CO₂-SC à 90 bar. Les fractions non volatiles, quant à elles, ont été obtenues par l'extraction au CO₂-SC à haute pression (1000 bar) et par extraction à l'eau sub-critique. Nous avons constaté que le temps d'extraction avec les nouvelles technologies était nettement réduit. Il ne dépasse pas 30 min avec le CO₂-SC et l'eau sub-critique alors qu'il est de l'ordre de 240 min pour l'HD et 6 heures pour l'extraction par solvant organique «Soxhlet». L'accélération de la cinétique d'extraction est essentiellement due à l'amélioration des phénomènes de transfert de masse. Ces résultats sont confirmés par les modèles mathématiques appliqués dans le cas de l'HD et celui de CO₂-SC. Par conséquent, ce gain de temps, tout en gardant une bonne qualité, permet d'atteindre l'un des objectifs des industriels, la productivité.

D'autre part, en termes de qualité, les résultats obtenus par l'identification des compositions chimiques à l'aide de GC-MS et l'évaluation du pouvoir antioxydant de chaque extrait obtenu par DPPH[•] et ABTS^{•+}, ont montré une meilleure qualité des produits obtenus par les nouvelles technologies par rapport à ceux obtenus avec des techniques traditionnelles. En effet, les extraits à l'eau sub-critique et au CO₂-SC montrent le pouvoir antioxydant le plus important.

Ensuite, nous avons étudié quatre autres plantes d'origine tunisienne dont deux de la même famille que celle utilisée dans l'optimisation et deux autres d'une famille différente. Nous

nous sommes intéressés uniquement à la fraction volatile, nous avons donc étudié l'extraction de chaque plante par la méthode conventionnelle de l'HD et la nouvelle technologie CO₂-SC à 90 bar dans les conditions opératoires optimales déterminées dans l'étude paramétrique, ainsi les résultats sont comparés par la suite en termes de quantité et de qualité. Les résultats obtenus dans cette étude confirment bien l'efficacité de la nouvelle technologie d'extraction des principes actifs d'origine végétale.

Enfin, dans un contexte promouvant la chimie verte et le développement durable, les nouvelles technologies, en utilisant des solvants 'verts' tels que le CO₂-SC et l'eau sub-critique, répondent aux exigences des industries pharmaceutique, cosmétique et agro-alimentaire, et respectent les normes pour la protection de l'environnement. Par conséquent, ces nouvelles technologies apparaissent bien comme la meilleure solution alternative et la plus efficace face à ces défis de l'industrie moderne.

A l'issue de ces travaux menés tout au long de cette thèse, un certain nombre de pistes de recherche sont à notre portée et méritent d'être expérimentées. En voici quelques-unes :

- L'extrapolation de ces résultats et le développement de ces procédés à l'échelle industrielle nous semblent très importants dans des domaines tels que les industries pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire.
- La modélisation du processus d'extraction à l'eau sub-critique pour en améliorer la capacité d'extraction.
- La modélisation du processus d'extraction au CO₂-SC à haute pression pour en améliorer l'extraction des antioxydants naturels.
- La valorisation des extraits de ces nouvelles technologies par des tests sur les activités biologiques telles que l'activité anticancéreuse et antipaludique.
- Le fractionnement de ces extraits et l'identification des molécules responsables de la meilleure activité.

Abréviations

d_p : diamètre de particule (mm)

T: Température (°C)

P: Pression (bar)

T: temps (min)

t_f : temps caractéristique de transfert de masse externe (s)

λ : rapport volume / surface de la particule (m)

ε : fraction de vide du lit de particules

k_f : coefficient de transfert de masse externe dans la phase fluide (m/s)

R: rayon de particule

t_1 : temps d'extraction

q' : débit spécifique de CO₂ référé à la masse du solide

G: fraction de cellules facilement accessible

K_m : coefficient de partage du soluté (kg plante/kg solvant)

Θ_f : rapport entre le temps caractéristique de transfert externe t_f et le temps de séjour t_r

γ : $(-\rho_f \varepsilon / \rho_s (1-\varepsilon))$ rapport massique solvant / solide dans l'extracteur

q_{ini} : teneur initiale du soluté dans le solide

$t_{comb,i}$: temps caractéristique de transfert de masse combiné

t_i : temps caractéristique de transfert de masse interne

u: vitesse superficielle du fluide supercritique (m/s),

C: concentration de l'huile volatile dans le solvant (g/g),

C_0 : concentration de l'huile volatile dans le solvant, au début du processus d'extraction (correspond à l'équilibre avec la concentration en phase solide initiale q_0),

q: concentration de l'huile volatile dans la phase solide (g/g),

t: temps d'extraction,

z: coordonnée axiale du lit d'extraction,

K_{eq} : constante d'équilibre ($K_{eq} = 1/K_m$ où

K_m : constante d'équilibre utilisée dans la modélisation de Sovová ,

ε : fraction de vide du lit et ρ_s est la densité du matière végétale, et

D_L : coefficient de dispersion axiale (m²/s).

q_p : concentration moyenne d'HE dans la plante à un temps 't'.

x: distance le long de la direction de diffusion.

D_{eff} : coefficient de diffusion effective.
 r : fraction d'huile facilement accessible
 N : masse de la matière végétale, kg
 x_i : concentration massique d'huile dans les cellules intactes, g huile/kg Ms
 x_b : concentration massique d'huile dans les cellules cassées, g huile/kg Ms
 N_w : masse d'eau, kg
 x_w : concentration massique d'huile dans l'eau bouillante, g huile/kg Ms
 Q : Débit de vapeur, kg/s
 x_v : concentration massique d'huile dans la phase vapeur, g huile/kg vapeur
 x_s : concentration massique d'huile restant dans l'hydrolat, g huile/kg eau
 λ : (= Volume/surface) dimension caractéristique des particules
 x_u : concentration massique d'HE non traitée, g huile/kg Ms
 k_v : coefficient de partage liquide-vapeur
 k_w : coefficient de partage liquide-cellules cassées
 γ : (= N_w/N) rapport eau/ matière végétale, kg/kg
 k : coefficient de transfert de masse dans le noyau des particules, m/s
 t : temps d'extraction, s

Références bibliographiques

- [1] F. Chemat, M. Abert Vian, G. Cravotto, Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 8615-8627, 2012.
- [2] F. Chemat, *Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs*. Dunod, Paris, 2011.
- [3] M. Mbolo, MA. Asseng Ze, S. Walter, *Les perspectives de la certification des produits forestiers non ligneux en Afrique centrale*. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, 2006.
- [4] M.N. Boukhatem, M.S. Hamaidi, F. Saidi, Y. Hakim, Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'HE du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens L.*) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature Technologie* 3, 37-45, 2010.
- [5] AFNOR : Association Française de Normalisation, Tour Europe, Cedex 7 - 92080 Paris, 1980.
- [6] A. Marrouf, G. Tremblin, *Abrégé de biochimie appliquée*, EDP sciences 2009.
- [7] M. Rémondet, *Le laboratoire de thérapie génique à l'épreuve de la clinique : Sociologie d'une expérimentation biomédicale*, Thèse, Paris, 2004.
- [8] A. Zermane, *Etude de l'extraction supercritique application aux systèmes agroalimentaires*, Université Mentouri de Constantine, Algérie, Thèse, 2010.
- [9] L.R. Hernandez Ochoa, *Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine «solvant/actif» d'origine végétale*, Institut National Polytechnique de Toulouse, thèse, 2005.
- [10] J. Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3e édition revue, Paris, 1999.
- [11] L. Bravo, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56 (11), 317-33, 1998.
- [12] F.L. Chung, M. Wang, A. Rivenson, M.J. Iatropoulos, J.C. Reinhardt, B. Pittman, C.T. Ho, S.G. Amin, Inhibition of Lung Carcinogenesis by *Black Tea* in Fischer Rats Treated with a Tobacco-specific Carcinogen: Caffeine as an Important Constituent. *Cancer Research* 58, 4096-4101, 1998.
- [13] C.S. Yang, J.Y. Chung, G.Y. Yang, S.K. Chhabra, M.J. Lee, *Tea and Tea Polyphenols in Cancer Prevention*, Symposium: Diet, Natural Products and Cancer Prevention: Progress and Promise. American Society for Nutritional Sciences, 2000.

- [14] H. Tapiero, K.D. Tew, B.G. Nguyen, G. Mathé, Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed Pharmacother* 56, 200-207, 2002.
- [15] B. Benjilali, A. Tantaoui-Elaraki, A. Ayadi, M. Ihlal, Method to Study Antimicrobial Effects of Essential Oils: Application to the Antifungal Activity of Six Moroccan Essences. *Journal of Food Protection* 47, 748-752, 1984.
- [16] C. Viollon, J.P. Chaumont, Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 128, 151-153, 1994.
- [17] A. Sivropoulou, E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras, M. Arsenakis, Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Origanum Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1202-1205, 1996.
- [18] M. Teimouri, Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* 6(4), 631-635, 2012.
- [19] T. Mangena., N.Y. Muyima. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *artemisia afra*, *pteronia incana* and *rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters in Applied Microbiology* 28 (4) 291-296, 1999.
- [20] D. Zakarya, T. Fathallah, M. Chascrette, Use of multifunctional autocorrelation method to estimate molar volumes of alkanes and oxygenated compounds. Comparison between components of autocorrelation vectors and topological indices. *Journal of physical organic chemistry* 6(10), 574-582, 1993.
- [21] L. Sánchez-González, M. Vargas, C. González-Martínez, A. Chiralt, M. Cháfer, Use of Essential Oils in Bioactive Edible Coatings. *Food Engineering Reviews* 3, 1-16, 2011.
- [22] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475, 2008.
- [23] A. Smith-Palmer, J. Stewart, L. Fyfe, The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology* 18, 463-470, 2001.
- [24] A.R. Collins, Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European Journal of Cancer* 41, 1923–1930, 2005.
- [25] M.K. Fasseas, K.C. Mountzouris, P.A. Tarantilis, M. Polissiou, G. Zervas, Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry* 106, 1188–1194, 2007.
- [26] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernandez-Lopez, J.A. Perez-Alvarez, Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Science* 85, 568–576, 2010.

- [27] A.G. Ponce, C.E. Del Valle, S.I. Roura, Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 37, 199–204, 2004.
- [28] F. Laverdière, A. Holstein, L. Thiebaut, R. Mallee, G. Gravejat, B. Desclozeaux, Dossier Couplage, 1999.
- [29] P. Longevialle, Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris, 3-14 et 83-98, 1981.
- [30] E. Constantin, Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec, Doc, Paris, 1-14, 1996.
- [31] S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3), 223-253, 2004.
- [32] K.M. Bowes, V.D. Zheljzkov, Factors affecting yields and essential oil quality of *Ocimum sanctum L.* and *Ocimum basilicum L.* cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129(6), 789-794, 2004.
- [33] M. Sari, D.M. Biondi, M. Kaabeche, G. Mandalari, M. D'Arrigo, G. Bisignano, A. Saija, C. Daquino, G. Ruberto, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal* 21, 890–898, 2006.
- [34] P.S. Shanjani, M. Mirza, M. Calagari, R.P. Adams, Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excelsa*. *Industrial Crops and Products* 32(2), 83–87, 2010.
- [35] K. Msaada, K. Hosni, M. Ben Taarit, T. Chahed, M. E. Kchouk, B. Marzouk, Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum L.*) fruits during three stages of maturity. *Food Chemistry* 102, 1131–1134, 2007.
- [36] M. Bendahou, A. Muselli, M. Grignon-Dubois, M. Benyoucef, J. M. Desjobert, A. F. Bernardini, J. Costa, Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum*, Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with HD. *Food Chemistry* 106(1), 132–139, 2008.
- [37] M. Maffei, D. Canova, C.M. Berteà, S. Scannerini, UV-A effects on photomorphogenesis and essential oil composition in *Mentha piperita*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 52, 105–110, 1999.
- [38] M. Romdhane, Extraction solide liquide sous ultrasons, INPT, thèse de doctorat, 1993.
- [39] M.E. Lucchesi, Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des HEs, Thèse, La Reunion, 2005.

- [40] C.W. Huie, A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373, 23-30, 2002.
- [41] P.G. Jessop, Homogeneously-catalyzed syntheses in supercritical fluids. *Topics in Catalysis* 5, 95-103, 1998.
- [42] M. Mukhopadhyay, *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*, 2000.
- [43] M.A. McHugh, V.J. Krukonis, *Supercritical fluid extraction: principles and practice*, 2nd edition, 1994.
- [44] M. Rantakylä, Particle production by supercritical antisolvent processing techniques, *Plant Design Report Series. Tehdassuunnittelun raporttisarja* 76, 2004.
- [45] Y. Masmoudi, *Etude du séchage au CO₂ supercritique pour l'élaboration de matériaux nanostructures : Application aux aérogels de silice monolithiques*, Thèse, Paris, 2006.
- [46] P.R. Sassi, P. Mourier, M.H. Caude, R.H. Rosset, *Measurement of Diffusion Coefficients in Supercritical Carbon Dioxide and Correlation with the Equation of Wilke and Chang*. American Chemical Society, 1987.
- [47] J. Chrastil, Solubility of Solids and Liquids in Supercritical Gases. *The Journal of Physical Chemistry* 86, 3016-3021, 1982.
- [48] A. Gupta, *Feasibility of supercritical carbon dioxide as a drilling fluid for deep underbalanced drilling operations*, Thèse, 2006.
- [49] R.S. Oakes, A.A. Clifford, C.M. Rayner, The use of supercritical fluids in synthetic organic chemistry, *Journal of the Chemical Society* 1, 917-941, 2001.
- [50] J.C. Giddings, M.N. Myers, L. McLaren, R.A. Keller, High-pressure gas chromatography of nonvolatile species. Compressed gas is used to cause migration of intractable solutes. *Science* 162 (3849), 67-73, 1968.
- [51] M. Angela, A. Meireles, Supercritical extraction from solid: process design data (2001–2003). *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7, 321–330, 2003.
- [52] F.J. Senorans, E. Ibanez, S. Cavero, J. Tabera, G. Reglero, Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of supercritical-fluid extracts of rosemary plants. *Journal of Chromatography A* 870, 491–499, 2000.
- [53] M. Vaher, M. Koel, Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 990, 225–230, 2003.
- [54] J.W. King, Fundamentals and applications of supercritical fluid extraction in chromatographic science. *Journal of chromatographic science* 27, 1989.

- [55] A. Chafer, T. Fornari, A. Berna, E. Ibanez, G. Reglero, Solubility of solid carnosic acid in supercritical CO₂ with ethanol as a co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids* 34, 323–329, 2005.
- [56] D. Grigonis, P.R. Venskutonis, B. Sivik, M. Sandahl, C.S. Eskilsson, Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*). *The Journal of Supercritical Fluids* 33, 223–233, 2005.
- [57] J. Shi, C. Yi, S. Jun Xue, Y. Jiang, Y. Ma, D. Li, Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO₂, *Journal of Food Engineering* 93, 431-436, 2009.
- [58] M. Poux, P. Cognet, C. Gourdon, Génie des procédés durables-Du concept à la concrétisation industrielle, Paris, 2010.
- [59] M. Perrut. Extraction par fluide supercritique. *Technique de l'ingénieur J 2 770-1-12*, 2008.
- [60] W. H. Hauthal, Advances with supercritical fluids. *Chemosphere* 43, 2001, 123-135.
- [61] H. Kiriamiti, S. Camy, C. Gourdon, J.S. Condoret, Supercritical Carbon Dioxide Processing of Pyrethrum Oleoresin and Pale. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (4), 880–884, 2003.
- [62] M. Fischer, T.M. Jefferies, Optimization of nicotine extraction from tobacco using supercritical fluid technology with dynamic extraction modelling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 (5), 1258-1264, 1996.
- [63] P. Fantozzi, M. Rossi, A. Schiraldi, L. Montanari, Removal of nicotine from tobacco leaf protein by supercritical CO₂. *Italian Journal of Food Science* 5 (4), 333-339, 1993.
- [64] W.N. Moore, L.T. Taylor, Gaining greater selectivity in the supercritical fluid extraction of digoxin from *Digitalis lanata* leaves. *Phytochemical Analysis* 8 (5), 238-243, 1997.
- [65] C. Moon-Kyoon, S. Hye-Won, L. Huen, Supercritical fluid extraction of paclitaxel and baccatin II from needles of *Taxus cuspidate*. *The Journal of Supercritical Fluids* 9, 192-198, 1996.
- [66] V. Vandana, A.S. Teja, L.H. Zalkow, Supercritical extraction and HPLC analysis of taxol from *Taxus brevifolia* using nitrous oxide and nitrous oxide + ethanol mixtures. *Fluid Phase Equilibria* 116, 162-169, 1996.
- [67] C.G. Pereira, M.O. Marques, A.S. Barreto, A.C. Siani, E.C. Fernandes, M. A. Meireles, Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO₂ + ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. *The Journal of Supercritical Fluids* 30, 51-61, 2004.

- [68] M. Kohler, W. Haerdi, Ph. Christen, J-L. Veuthey, Extraction of artemisinin and artemisinic acid from *Artemisia annua* L. using supercritical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A* 785, 353-360, 1997.
- [69] J. Peng, G. Fan, Y. Wu, Supercritical fluid extraction of aurenthamide acetate from *Patrinia villosa* Juss and subsequent isolation by silica gel and high-speed counter current chromatography. *Journal of Chromatography A* 1083, 52-57, 2005.
- [70] Y.H. Choi, K.P. Yoo, J. Kim, Supercritical extraction and liquid chromatography-electrospray mass analysis of vinblastine from *Catharanthus roseus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 50 (9), 1294-1296, 2002.
- [71] A. Brachet, Ph. Christen, J-Y. Gauvrit, R. Longerey, P. Lantéri, J-L. Veuthey, Experimental design in supercritical fluid extraction of cocaine from coca leaves. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 43, 353-366, 2000.
- [72] E. Ziemons, E. Goffin, R. Lejeune, A. Proença dan Cunha, L. Angenot, L. Thunus, Supercritical carbon dioxide extraction of tagitinin C from *Tithonia diversifolia*. *The Journal of Supercritical Fluids* 33, 53-59, 2005.
- [73] W.H.T. Pan, C.C. Chang, T.T. Su, F. Lee, M.R.S. Fuh, Preparative supercritical fluid extraction of pyrethrin I and II from pyrethrum flower. *Talanta* 42 (11), 1745-1749, 1995.
- [74] A. Berna, A. Tarrega, M. Blasco, S. Subirats, Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel; effect of the height of the bed. *The Journal of Supercritical Fluids* 18, 227-237, 2000.
- [75] L.F. França, G. Reber, M.A. Meireles, N.T. Machado, G. Brunner, Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. *The Journal of Supercritical Fluids* 14, 247-256, 1999.
- [76] C. Turner, J.W. King, L. Mathiasson, Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. *Journal of Chromatography* 936, 215-237, 2001.
- [77] A. De Lucas, E.M. de la Ossa, J. Rincon, M.A. Blanco, I. Gracia, Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *The Journal of Supercritical Fluids* 22, 221-228, 2002.
- [78] U. Fleck, C. Tiegs, G. Brunner, Fractionation of fatty acid ethyl esters by supercritical CO₂: high separation efficiency using an automated countercurrent column. *The Journal of Supercritical Fluids* 14, 67-74, 1998.

- [79] M. Létisse, M. Rozières, A. Hiol, M. Sergent, L. Comeau, Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without modifier: I. Optimization of extractions conditions. *The Journal of Supercritical Fluids* 38 (1), 27-36, 2006.
- [80] T. Gamse, I. Rogler, R. Marr, Supercritical CO₂ extraction for utilisation of excess wine of poor quality. *The Journal of Supercritical Fluids* 14, 123-128, 1999.
- [81] F.J. Senorans, A. Ruiz-Rodriguez, E. Ibanez, J. Tabera, R. Guillermo, Optimization of contercurrent supercritical fluid extraction conditions for spirits fractionation. *The Journal of Supercritical Fluids* 21, 41-49, 2001.
- [82] R.S. Mohamed, M.D.A. Saldana, SF.H. ocantaype, T.G. Kieckbusch, Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina. *The Journal of Supercritical Fluids* 16 (3), 225-233, 2000.
- [83] N. Devineni, P. Mallikarjunan, M.S. Chinnan, R.D. Phillips, Supercritical fluid extraction of lipids from deep-fried food products. *Journal of the American Oil Chemists Society* 74 (12), 1517-1523, 1997.
- [84] M.K. Taylor, T.M. Young, E. Christian, C.E. Butzke, S.E. Ebeler, Supercritical fluid extraction of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(6), 2208-2211, 2000.
- [85] M. Moldao-Martins, A. Palavra, M.L. Beiro da Costa, M.G. Bernardo-Gil, Supercritical CO₂ extraction of *Thymus zygis* L.. subsp. *sylvestris* aroma. *The Journal of Supercritical Fluids* 18, 25-34, 2000.
- [86] C. Perakis, V. Louli, K. Magoulas, Supercritical fluid extraction of black pepper oil. *Journal of Food Engineering* 71, 386-393, 2005.
- [87] G. Brunner, Near critical and supercritical water. Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *The Journal of Supercritical Fluids* 47, 373–381, 2009.
- [88] S.B. Hawthorne, Y. Yang, D.J. Miller, Extraction of organic Pollutants from Environmental Solids with Sub- and Supercritical Water. *Analytical Chemistry* 66, 2912-2920, 1994.
- [89] J. He, R. Balasubramanian, S. Karthikeyan, U.M. Joshi, Determination of semi-volatile organochlorine compounds in the atmosphere of Singapore using accelerated solvent extraction. *Chemosphere* 75, 640–648, 2009.
- [90] F. Mancini, Traitement des déchets issus de la biomasse pour la génération d'énergie, thèse de doctorat, université Bordeaux I, Ecole doctorale des sciences chimiques, 2006.
- [91] NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)

- [92] M. Uematsu, E.U. Franck, Static Dielectric Constant of water and steam. The Journal of Physical Chemistry 9 (4), 1980.
- [93] D.P. Fernandez, A.R.H. Goodwin and E.W. Lemmon, J.M.H. Levelt Sengers, R.C. Williams, A formulation of the static permittivity of water and steam at temperature from 238 K to 873 K at pressures up to 1200 MPa, Including derivatives and Debye-Hückel coefficients. The Journal of Physical Chemistry 26(4), 1125-1166, 1997.
- [94] D.G. Friend, A.H. Harvey, Properties of Water and Aqueous Systems: Metrological Applications, 14th International Conference on the Properties of Water and Steam in Kyoto.
- [95] P. Besse, A. Baccini, Analyse des données ou statistique exploratoire multidimensionnelle. Techniques de l'ingénieur, AF 620, 1-16, 2011.
- [96] A.S. Chauhan, P.S. Negi, R.S. Ramteke, Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seeds. Fitoterapia 78(7-8), 590-592, 2007.
- [97] P.S. Negi, A.S. Chauhan, G.A. Sadia, Y.S. Rohinishree, R.S. Ramteke, Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) seed extracts. Food Chemistry 92(1), 119-124, 2005.
- [98] M.D. Luque de Castro, M.M. Jimenez-Carmona, V. Fernandez-Perez, Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. Trends in analytical chemistry 18, 11, 1999.
- [99] D.M. Livermore, Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare?. Clinical Infectious Diseases 34(5), 634-640, 2002.
- [100] X. Lou, H.G. Janssen, C.A. Cramers, Parameters Affecting the Accelerated Solvent Extraction of Polymeric Samples. Analytical Chemistry 69, 1598-1603, 1997.
- [101] N.M. Ghani, N. Saim, R. Osman, Z. Abdullah Munir, Accelerated solvent extraction method with one-step clean-up for hydrocarbons in soil. The Malaysian Journal of Analytical Sciences 11(1), 193-197, 2007.
- [102] J.F. Lawrence, B. Niedzwiladek, P.M. Scott, Effect of Temperature and Solvent Composition on Extraction of Fumonisin B1 and B2 from Corn Products. Journal of AOAC international 83 (3), 2000.
- [103] L. Wang, C.L. Weller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology 17, 300-312, 2006.
- [104] B. E. Richter, Extraction of hydrocarbon contamination from soils using accelerated solvent extraction. Journal of Chromatography A 874, 217-224, 2000.

- [105] N. Saim, R. Osman, W.A.H. Md Yasin, R. Dol Hamid, Subcritical water extraction of essential oil from coriander (*Coriandrum sativum L.*) seeds. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* 12 (1), 2008.
- [106] M.B. Hossain, Catherine Barry-Ryan, A.B. Martin-Diana, N.P. Brunton, Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*), marjoram (*Origanum majorana L.*) and oregano (*Origanum vulgare L.*) using response surface methodology. *Food Chemistry* 126, 339–346, 2011.
- [107] B. Benthin, H. Danz, M. Hamburger, Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography A*. 837, 211–219, 1999.
- [108] A.F. Barrero, M.M. Herrador, P. Arteaga, J. Quilez, M. Akssira, F. Mellouki, S. Akkad. Chemical composition of the essential oil of leaves and wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Journal of Essential Oil Research* 17, 166–168, 2005.
- [109] M. Bourkhiss, M. Hnach, T. Lakhlifi, B. Bourkhiss, M. Ouhssine, B. Satrani, Production and characterization of the sawdust of wood essential oil of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 79, 4-11, 2010.
- [110] B. Bourkhiss, M. Ouhssine, M. Hnach, A. Amechrouq, A. Chaouch, B. Satrani, Chemical composition of the essential oil of *Tetraclinis articulata* (Vahl) from Maroc. *The Journal of Physical Chemistry* 35, 128–132, 2007.
- [111] S. Ben Hadj Ahmed, R.M. Sghaier, F. Guesmi, B. Kaabi, M. Mejri, H. Attia, D. Laouini, I. Smaali, Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia). *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters* 25(12), 1195-1201, 2011.
- [112] A. Tekaya-Karoui, N. Boughalle, S. Hammami, H. Ben Jannet, Z. Mighri, Chemical composition and antifungal activity of volatile components from woody terminal branches and roots of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters growing in Tunisia. *African Journal of Plant Science* 5, 115–122, 2011.
- [113] M. Aitigri, M. Holeman, A. Ildrissi, M. Berrada, Contribution to the chemical study of essential oils from the twigs and wood of *Tetraclinis arliculata* (Vahl) Masters. *Plant. Med Phytotherapy* 24, 36-43, 1990.

- [114] S. Zrira, B. Benjilali, A. Elmrani, Chemical Composition of the Sawdust Oil of Moroccan *Tetraclinis articulata* (Vahl). *Journal of Essential Oil Research* 17, 96-97, 2005.
- [115] J. Buhagiar, M.T.C. Podestat, P.L. Cioni, G. Flamini, L. Morelli, Essential oil composition of different parts of *Tetraclinis articulata*. *Journal of Essential Oil Research* 12, 29–32, 2000.
- [116] J. Bellakhdar, G. Honda, W. Miki, Herb–Drugs and Herbalists in the Maghrib. Institute of the Study of Languages and Cultures of Asia and Africa, Tokyo, 1982.
- [117] M. Ait Igri, M. Holeman, A. Ildrissi, M. Berrada, Contribution to the chemical study of branches and wood essential oils of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Plant Med. Phytotherapy* 24 (1), 36–43, 1990.
- [118] B. Bourkhiss, M. Ouhssine, M. Hnach, M. Bourkhiss, B. Satrani, A. Farah, Chemical composition and bioactivity of branches essential oil of *Tetraclinis Articulata*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* 146, 75–84, 2007.
- [119] F.Z. Abi-Ayada, M. Abi-Ayada, H.A. Lazzounia, S.A. Rebiahib, Bessierec, Antibacterial activity of essential oil extracted from leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters from Algeria flora. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1(1), 1-6, 2011.
- [120] J.A. Buhagiar, M.T. Podesta, A.P. Wilson, M.J. Micallef, S. Ali, The induction of apoptosis in human melanoma, breast and ovarian cancer cell lines using an essential oil extract from the conifer *Tetraclinis articulata*. *Anticancer Res.* 19, 5435–5443, 1999.
- [121] M. Bourkhiss, M. Hnach, J. Paolini, J. Costa, A. Farah, B. Satrani, Antioxi-dant and anti-inflammatory properties of essential oils of the various parts of *Tetraclinis articulata* (vahl) masters from Morocco. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 79, 141–154, 2010.
- [122] GDK Babu, B. Singh, Simulation of *Eucalyptus cinerea* oil distillation: A study on optimization of 1,8-cineole production. *Biochem Engineer J* 44, 226-231, 2009.
- [123] JJW. Coppen, *Eucalyptus* (Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles). Taylor & Francis; edition April 25th. 464, 2002.
- [124] M. Gilles, J. Zhao, M. An, S. Agboola, Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry* 119, 731-7, 2010.

- [125] H. Ramezani, H.P. Singh, D.R. Batish, R.K. Kohli, Antifungal activity of the volatile oil of *Eucalyptus citriodora*. *Fitoterapia* 73, 261–2, 2002.
- [126] A. Elaissi, K. Hadj Salah, S. Mabrouk, K. Mohammed Larbi, R. Chemli, F. Harzallah-Skhiri, Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species essential oils. *Food Chemistry* 129, 1427-34, 2011.
- [127] T.S. Mann, G.D. Kiran Babu, S. Guleria, B. Singh. Comparison of *Eucalyptus cinerea* essential oils produced by HD and supercritical carbon dioxide extraction. *Natural Product Communications* 6, 107-10, 2011.
- [128] H. Fadel, F. Marx, A. El-Sawy, El-Ghorab A. 1999. Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf oils. *Z Lebensm Unters Forsch A* 208, 212-6, 1999.
- [129] J. da Cruz Francisco, E.P. Järvenpää, R. Huopalahti, B. Sivik, Comparison of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. oils from Mozambique as obtained by HD and supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2339-42, 2001.
- [130] K. Mazari, N. Bendimerad, C. Bekhech, X. Fernandez, Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L.. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(10), 959-964, 2010.
- [131] E. Abdel-Salam Shaalan, D. Canyon, M.W. Faried Younes, H. Abdel-Wahab, A-H. Mansour, A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential, *Environment International* 31, 1149-1166, 2005.
- [132] R. Roupetz, Phytochemistry and pharmacology of volatile components of *Callitris glaucophylla* wood. Magister, Universitat Wien, 2009.
- [133] S.D. Sarker, Z. Latif, A.I. Gray, *Natural Products Isolation*, Second Edition, Humana Press Inc., 2006.
- [134] S. Hajji, J. Beliveau, D. Simon, Comparative study of an essential oil obtained according to two different extraction procedures: steam distillation and hydrodiffusion. *Actes - Colloq. Int. Plant. Aromat. Med. Maroc*, 229-230, 1985.
- [135] L. Lagunez Rivera, Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteurs chauffé par induction thermomagnétique directe, Thèse, INPToulouse, 2006.

- [136] C. Boutekedjiret, F. Bentahar, R. Belabbes, J.M. Bessiere, Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and HD. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 481-484, 2003.
- [137] M.H. Eikani, F. Golmohammad, S. Rowshanzamir, Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum L.*). *Journal of Food Engineering* 80, 735-740, 2007.
- [138] M. Khajenoori, A. Haghghi Asl, F. Hormozi, Proposed Models for Subcritical Water Extraction of Essential Oils, *Separation science and engineering Chinese. Journal of Chemical Engineering* 17(3) 359-365, 2009.
- [139] M.M. Jimenez-Carmona, J.L. Ubera, M.D. Luque de Castro, Comparison of continuous subcritical water extraction and HD of marjoram essential oil. *Journal of Chromatography A* 855, 625–632, 1999.
- [140] R. Soto Ayala¹, M.D. Luque de Castro, Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section, Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry* 75, 109–113, 2001.
- [141] L. Gamiz-Gracia, M.D. Luque de Castro, Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta* 51 1179–1185, 2000.
- [142] L. Quan, S.F. Li, S.J. Tian, H. Xu, A.Q. Lin, L. Gu, Determination of organochlorine pesticides residue in Ginseng root by orthogonal array design Soxhlet Extraction and gas chromatography. *Chromatographia* 1, 89–93, 2004.
- [143] M.C. Pibiri, Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'HEs, thèse de doctorat, EPF Lausanne, 2005.
- [144] O. Folin, V. Ciocalteu, On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 73, 627, 1927.
- [145] B. Ozcelik, J.H. Lee, D.B. Min, Effects of light, oxygen and pH on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) method to evaluate antioxidants. *Journal of Food Sciences* 68, 487, 2003.
- [146] M.S. Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199–200, 1958.
- [147] V. Roginsky, E.A. Lissi, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation de colorization assay. *Food Chemistry* 92, 23, 2005.

- [148] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9/10), 1231-1237, 1999.
- [149] W. Trager, J.B. Jensen, Human malarial parasites in continuous culture. *Science* 193: 673-675, 1976.
- [150] F. Benoit, A. Valentin, Y. Péliissier, F. Diafouka, C. Marion, D. Kone-Bamba, M. Koné, M. Mallié, A. Yapo, J-M. Bastide, In vitro antimalarial activity of vegetal extracts used in west african traditional medicine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 67-71, 1996.
- [151] C. Ribaut, A. Berry, S. Chevalley, K. Reybier, I. Morlais, D. Parzy, F. Nepveu, F. Benoit-Vical, A. Valentin, Concentration and purification by magnetic separation of the erythrocytic stages of all human *Plasmodium* species. *Malar Journal* 7, 45, 2008.
- [152] C. Lambros, J.P. Vanderberg, Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal Parasitol* 65, 418-420, 1979.
- [153] V. Muñoz, M. Sauvain, P. Mollinedo, J. Callapa, I. Rojas, A. Gimenez, A. Valentin, M. Mallié, Antimalarial activity and cytotoxicity of (-)-roemrefidine isolated from the stem bark of *Sparattanthelium amazonum*. *Planta med* 65, 448-449, 1999.
- [154] Y. Ouattara, S. Sanon, Y. Traoré, V. Mahiou, N. Azas, L. Sawadogo, Antimalarial activity of *swartzia madagascarensis* desv. (leguminosae), *combretum glutinosum* Guill & Perr. (combretaceae) and *tinospora bakis miers* (menispermaceae) Burkina fasso medicinal plants. *Afr J Trad CAM* 3, 75-81, 2006.
- [155] A. Valentin, F. Benoit-Vical, C. Moulis, E. Stanislas, M. Mallie, I. Fouraste, In vitro antimalarial activity of penduline, a bisbenzylisoquinoline from *Isopyrum thalictroides*. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 2305-2307, 1997.
- [156] C. Besombes, Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées, Thèse de doctorat, La Rochelle, 2008.
- [157] M.D. Luque de Castro, L.E. Garcõ Áa-Ayuso, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369, 1-10, 1998.
- [158] A. Ahmad, A.F.M. Alkarkhi, S. Hena, B.M. Siddique, K.W. Dur, Optimization of Soxhlet Extraction of Herba Leonuri Using Factorial Design of Experiment. *International Journal of Chemistry* 2(1), 198-205, 2010.

- [159] M.T. Golmakani, K. Rezaei, Comparison of microwave-assisted HD with the traditional HD method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris L.*, Food Chemistry 109, 925–930, 2008.
- [160] S.Z. Milojevic, T.D. Stojanovic, R. Palic, M.L. Lazic, V.B. Veljkovic, Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper (*Juniperus communis L.*) berries. Biochemical Engineering Journal 39, 547–553, 2008.
- [161] E.H. Benyoussef, S. Hasni, R. Belabbes, J.M. Bessiere, Modélisation du transfert de matière lors de l'extraction de l'HE des fruits de coriandre. Chemical Engineering Journal 85, 1-5, 2002.
- [162] H. Muhammad Hazwan, C.M. Hasfalina, J. Hishamuddin, Z.A. Zurina, Optimization and Kinetics of Essential Oil Extraction from Citronella Grass by Ohmic Heated Hydro Distillation. International Journal of Chemical Engineering and Applications 3 (3) 2012.
- [163] H. Sovová, S.A. Aleksovski, Mathematical model for HD of essential oils. Flavour and Fragrance Journal 21, 881–889, 2006.
- [164] E. Cassel, R.M.F. Vargas, N. Martinez, D. Lorenzo, E. Dellacassa, Steam distillation modeling for essential oil extraction process. Industrial crops and products 29, 171–176, 2009.
- [165] M. Romdhane, C. Tizaoui, The kinetic modelling of a steam distillation unit for the extraction of aniseed (*Pimpinella anisum*) essential oil, J Chem Technol Biotechnol 80, 759–766, 2005.
- [166] R.B. Sartor, A.R. Secchi, R.P. Soares, E. Cassel, Dynamic Simulation of Rosemary Essential Oil Extraction in an Industrial Steam Distillation Unit. Ind. Eng. Chem. Res. 50, 3955–3959, 2011.
- [167] T.Y. Peng, M.M. Don, M.A. Tahrel, Optimisation and Kinetics Studies on the Extraction of Essential Oil from *Zingiber Cassumunar*. Journal of Physical Science 23(1), 65–82, 2012.
- [168] L. Stanojević, M. Stanković, M. Cakić, V. Nikolić, L. Nikolić, D. Ilić, N. Radulović, The effect of HD techniques on yield, kinetics, composition and antimicrobial activity of essential oils from flowers of *Lavandula officinalis L.*. Hem. Ind. 65 (4) 455–463, 2011.
- [169] J. Pornpunyapat, P. Chetpattananondh, C.T. Tongurai, Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Aquilaria crassna* by HD and quality of agarwood oil, Bangladesh J Pharmacol 6, 18-24, 2011.

- [170] E. Reverchon, I. De Marco, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *The Journal of Supercritical Fluids* 38, 146–166, 2006.
- [171] P.B. Gomes, V.G. Mata, A.E. Rodrigues, Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction, *J. of Supercritical Fluids* 41, 50–60, 2007.
- [172] H.K. Kiriamiti, E. Rascol, A. Marty, J.S. Condoret, Extraction rates of oil from high oleic sunflower seeds with supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering and Processing* 41, 711-718, 2002.
- [173] H. Sovová , R. Komers, J. Kucera, J. Jez, Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil, *Chemical Engineering Science*, 49(15), 2499-2505, 1994.
- [174] J.C. Francisco, B. Sivik, Solubility of three monoterpenes, their mixtures and eucalyptus leaf oils in dense carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 23, 11–19, 2002.
- [175] L. Wang, B. Yang, X. Du, C.Yi, Optimisation of Supercritical Extraction of Flavonoids from *Pueraria lobata*. *Food Chemistry* 108, 737-741, 2008.
- [176] M. Akgun, N.A. Akgun, S. Dinçer, Phase behaviour of essential oil components in supercritical carbon dioxide. *The Journal of supercritical fluid* 15, 117-125, 1999.
- [177] C. Valérie, The determination of pesticide residues and metabolites using supercritical fluid extraction *Trends in analytical chemistry* 16, 1997.
- [178] J.M. Snyder, J.P. Friedrich, D.D. Christianson, Effect of Moisture and Particle Size on the Extractability of Oils from Seeds with Supercritical CO₂. *JAOCS* 61, 12, 1984.
- [179] E. Reverchon, A. Kaziunas, C. Marrone, Supercritical CO₂ Extraction of *Hiprose* Seed Oil: Experiments and Mathematical Modelling, *Chem. Eng. Sci.* 55, 2195–2201, 2000.
- [180] J.M. del Valle, E.L. Uquiche, Particle Size Effects on Supercritical CO₂ Extraction of Oil-Containing Seeds, Paper no. J10302 in *JAOCS* 79, 1261–1266, 2002.
- [181] S.M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi, Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A* 1163, 2–24, 2007.
- [182] M. Khajeh, Y. Yamini, N. Bahramifar, F. Sefidkon, M.R. Pirmoradei, Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and HD methods. *Food Chemistry* 91, 639–644, 2005.
- [183] H. Sovová, Steps of supercritical fluid extraction of natural products and their characteristic times. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2011.
- [184] H. Sovová, Modeling the supercritical fluid extraction of essential oils from plant materials. *Journal of Chromatography A* 1250, 27– 33, 2012.

- [185] C.S. Tan, S.K. Liang, D.C. Liou, Fluid-solid mass transfer in a supercritical fluid extractor. *Chemical Engineering Journal* 38, 17–22, 1988.
- [186] T. Funazukuri, C. Kong, S. Kagei, Effective axial dispersion coefficients in packed beds under supercritical conditions, *Journal of Supercritical Fluids* 13, 169–175, 1998.
- [187] E.M.C. Reis-Vasco, J.A.P. Coelho, A.M.F. Palavra, C. Marrone, E. Reverchon, Mathematical modeling and simulation of *Pennyroyal* essential oil supercritical extraction. *Chemical Engineering Science* 55, 2917-2922, 2000.
- [188] C.M. Silva, C.A. Filho, M.B. Quadri, E.A. Macedo, Binary diffusion coefficients of α -pinene and α -pinene in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 32, 167–175, 2004.
- [189] M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibañez, sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by products, algae and microalgae. *Food Chemistry* 136-148, 1998.
- [190] M.S. Yogendra Kumar, R. Dutta, D. Prasad, K. Misra, Subcritical water extraction of antioxidant compounds from *Seabuckthorn* (*Hippophae rhamnoides*) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry* 127, 1309–1316, 2011.
- [191] A.G. Carr, R. Mammucari, N.R. Foster, A Review of Subcritical Water as a Solvent and Its Utilisation for the Processing of Hydrophobic Organic Compounds. *Chemical Engineering Journal*, 2011.
- [192] L. He, X. Zhang, H. Xu, C. Xu, F. Yuan, Z. Knez, Z. Novak, Y. Gao, Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC–ABTS⁺⁺ assay, food and bioproducts processing, 2011.
- [193] M. Tanaka, A. Takamizu, M. Hoshino, M. Sasaki, M. Goto, Extraction of dietary fiber from *Citrusjunos peel* with subcritical water. *Food and bioproducts processing*, 2011.
- [194] A. Kubatova, D.J. Miller, S.B. Hawthorne, Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from *kava* root. *Journal of Chromatography A* 923, 187–194, 2001.
- [195] B. Annamaria, M. Maria, C. Jimenez, A. A. Clifford, Extraction of *Rosemary* by Superheated Water. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5205-5209, 1998.
- [196] E. Ibanez, A. Kubaatova, F.J. Senorans, S. Cavero, G. Reglero, S.B. Hawthorne, Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from *Rosemary* Plants, *J. Agric. Food Chem.* 51, 375-382, 2003.

- [197] H.K. Lee, H.L. Koh, E.S. Ong, S.O. Woo, Determination of ginsenosides in medicinal plants and health supplements by pressurized liquid extraction (PLE) with reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 25, 160-166, 2002.
- [198] Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *Journal of Chromatography A*, 1026, 9–23, 2004.
- [199] M.Z. Ozel, F. Gogus, J.F. Hamilton, A.C. Lewis, Analysis of volatile components from *Ziziphora taurica subsp. Taurica* by steam distillation, superheated-water extraction, and direct thermal desorption with GC-GC-TOFMS. *Anal Bioanal Chem* 382, 115–119, 2005.
- [200] M.Z. Ozel, H. Kaymaz, Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*. *Anal Bioanal Chem* 379, 1127–1133, 2004.
- [201] E.S. Ong, S.M. Len, Pressurized hot water extraction of berberine, baicalein and glycyrrhizin in medicinal plants. *Analytica Chimica Acta* 482, 81–89, 2003.
- [202] P.P. Singh, M.D.A. Saldaña, Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International* 44, 2452–2458, 2011.
- [203] A. Shalmashi, F. Golmohammad, M.H. Eikani, Subcritical Water Extraction of Caffeine from Black tea leaf of IRAN. *Journal of Food Process Engineering* 31, 330–338, 2008.
- [204] H.B. Hass, R.F. Newton, In *Handbook of Chemistry and Physics*, 62nd, CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, 1982.
- [205] M.Z. Ozel, F. Gogus, A.C. Lewis, Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry* 82, 381–386, 2003.
- [206] P. Costa, C. Grosso, S. Gonçalves, P.B. Andrade, P. Valentão, M.G. Bernardo-Gil, A. Romano, Supercritical fluid extraction and HD for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. *Food Chemistry* 135, 112-121, 2012.
- [207] R. Pavela, M. Sajfirtov, H. Sovová, M. Barnet, J. Karban, The insecticidal activity of *Tanacetum parthenium (L.)* Schultz Bip. Extracts obtained by supercritical fluid extraction and HD. *Industrial Crops and Products* 31, 449-454, 2010.
- [208] S. Rawat, I.D. Bhatt, A.S. Rawal, Total phenolic compounds and antioxidant potential of *Hedychium spicatum* Buch. Ham. ex D. Don in west Himalaya, India. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 574–579, 2011.
- [209] M. Bourkhiss, M. Hnach, J. Paolini, J. Costa, A. Farah, B. Satrani, propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des HEs des différentes parties de *Tetraclinis*

- articulata* (vahl) masters du maroc. Bulletin de la société royale des sciences de liège 79, 141-154, 2010.
- [210] H. Bendaoud, M. Romdhane, J.P. Souchard, S. Cazaux, J. Bouajila, Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi berries Essential Oils. Journal of Food Science 75(6), 466-472, 2010.
- [211] L.S Nerio, J. Olivero-Verbel, E. Stashenko, Repellent activity of essential oils: A review. Bioresource Technology 101, 372-378, 2010.
- [212] A. Farah, M. Fechtal, A. Chaouch, Effet de l'hybridation interspécifique sur la teneur et la composition chimique des HEs d'*Eucalyptus* cultivés au Maroc. Biotechnol Agron Soc Envir 6, 163-9, 2002.
- [213] C.M. Bignell, P.J. Dunlop, J.J. Brophy, J.F. Jackson, Volatile Leaf Oils of some South-western and Southern Australian Species of the Genus *Eucalyptus*. Part VIII. Subgenus *Symphyomyrtus*, (a) Section *Bisectaria*, Series *Cornutae* and Series *Bakeranae*, and (b) Section *Dumaria*, Unpublished Series *Furfuraceae* Group. Flavour and fragrance journal 11, 43-47, 1996.
- [214] C.M. Bignell, P.J. Dunlop, J.J. Brophy, Volatile Leaf Oils of some Queensland and Northern Australian Species of the Genus *Eucalyptus* (Series II) Part II. Subgenera (a) *Blakella*, (b) *Corymbia*, (c) Unnamed, (d) *Idiogenes*, (e) *Monocalyptus* and (f) *Symphyomyrtus*. Flavour and fragrance journal 12, 277-284, 1997.
- [215] Q. Chen, H. Shi, C.T. Ho, Effects of Rosemary Extracts and Major Constituents on Lipid Oxidation and Soybean Lipoxygenase Activity. JAOCS 69(10), 1992.
- [216] A. Wojdyło, J. Oszmianski, R. Czemerys, Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry 105, 940–949, 2007.
- [217] D. Z. Orčić, N. M. Mimica-Dukić, M. M. Francišković, S. P. Slobodan, D. J. Emilija, Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. Chemistry Central Journal, 5-34, 2011.
- [218] M. Khanavi, M. Hajimahmoodi, M. Cheraghi-Niroomand, Z. Kargar, Y. Ajani, A. Hadjiakhoondi, M. R. Oveisi, Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some *Stachys* species. African Journal of Biotechnology 8 (6), 1143-1147, 2009.
- [219] Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, H. Corke, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sciences 74, 2157–2184, 2004.

- [220] S. Moein, M. R. Moein, Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeria majdae*. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(7), 517-521, 2010.
- [221] Y. Watanabe, T. Mitsunaga, T. Yoshimura, Investigating antitermitic compounds from Australian white cypress heartwood (*Callitris glaucophylla* Thompson et Johnson) against *Coptotermes formosanus* Shiraki. *The Journal of essential oil research* 17 (3), 346-350, 2005.

Résumé

Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles

Ce travail concerne l'extraction de substances naturelles d'origine végétale en utilisant des procédés « verts » tels que l'extraction au CO₂ supercritique (CO₂-SC, de 90 à 1000 bar) et l'extraction à l'eau sub-critique (SWE). Ces procédés sont une alternative à l'hydrodistillation (HD) et l'extraction par solvant (SE) traditionnellement utilisés dans l'industrie des produits naturels. La majorité du travail a été réalisée sur l'espèce *Tetraclinis articulata* où les performances des procédés, CO₂-SC, HD, SWE et SE, ont été optimisées puis comparées en termes de rendement, composition chimique, durée..., et en particulier activité antioxydante des extraits (évaluée par les tests ABTS^{•+} and DPPH[•]). La plus forte activité antioxydante a été mise en évidence pour les extraits CO₂-SC, ceci étant très probablement dû à une moindre dégradation thermique, comme l'a indiqué la comparaison des compositions chimiques. La CO₂-SC basse pression (90 bar) a permis d'obtenir un extrait de bonne qualité et, pour ce cas, une modélisation a été proposée pour comprendre et identifier le mécanisme limitant qui s'est avéré être l'équilibre solide-fluide. La modélisation de l'hydrodistillation a également été proposée, basée sur le modèle de Sovová. Ensuite, l'approche a été étendue à d'autres plantes : *Eucalyptus cinerea*, *Eucalyptus Camaldulensis*, *Cypres sempervirens et callitris*.

Mots clés : CO₂ supercritique, eau sub-critique, hydrodistillation, antioxydants, *Tetraclinis articulata*,

Abstract

Extraction and purification of natural substances: comparison of supercritical CO₂ extraction and conventional techniques

This work has dealt with extraction of natural substances from plants using "green" processes such as supercritical CO₂ extraction (CO₂-SC from 90 to 1000 bar) and extraction with subcritical water (SWE). These processes are an alternative to hydrodistillation (HD) and solvent extraction (SE) traditionally used in the natural products industry. Main part of the work was done on the species *Tetraclinis articulata*, and performance of the different processes, CO₂-SC, HD, SWE and SE, were optimized and compared in terms of yield, chemical composition, duration ... and especially antioxidant activity of extracts (assessed by the ABTS⁺⁺ and DPPH^{*} tests). CO₂-SC extracts exhibited the strongest antioxidant activity and comparison of chemical compositions of the different extracts indicated that this is very probably due to lower thermal degradation of active molecules. For low pressure CO₂-SC (90 bar), a model was proposed to understand and identify the limiting mechanism that proved to be solid-fluid equilibrium. For hydrodistillation, modelling, based on the Sovová 's model was also proposed. Then, the approach was extended to other plants: *Eucalyptus cinerea* and *Eucalyptus camaldulensis*, *Cypres sempervirens* and *Callitris*.

Keywords: Extraction, supercritical CO₂, subcritical water, hydrodistillation, antioxidant, *Tetraclinis articulata*,

Liste des Figures

Figure I. 1 : Structure chimique de quelques composés terpéniques	9
Figure I. 2 : Isoprène	9
Figure I. 3 : Phénol.....	10
Figure I. 4 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante	14
Figure I. 5: Hydrodistillation assistée par micro-ondes.	16
Figure I. 6 : Diagramme de phases P-T du CO ₂	17
Figure I. 7 : Evolution de la viscosité du CO ₂ en fonction de la pression.....	20
Figure I. 8 : Changement de phase de dioxyde de carbone supercritique.....	21
Figure I. 9 : Phénomène d'agrégation dans un fluide supercritique. Molécule de solvant, ...	21
Figure I. 10 : Allure générale des courbes d'extraction par fluide supercritique	24
Figure I. 11 : Diagramme de phases de l'eau	28
Figure I. 12 : Variation de la constante diélectrique statique de l'eau en fonction de la température pour P=100 bar, P=200 bar et P=300 bar	29
Figure I. 13 : Variation de la viscosité dynamique de l'eau en fonction de la température	30
Figure I. 14 : Variation de la masse volumique (kg.m ⁻³) de l'eau en fonction de la température pour P=100 bar, P= 200 bar et P=300 bar	30
Figure I. 15 : Variation de la capacité thermique en fonction de la température	31
Figure II. 1: <i>Tetraclinis articulata</i>	37
Figure II. 2 : <i>Eucalyptus camaldulensis</i> (a) et <i>Eucalyptus cinerea</i> (b)	40
Figure II. 3: Cyprès de Provence (<i>C. sempervirens</i>)	41
Figure II. 4: <i>Callitris glaucophylla</i>	42
Figure II. 5: Dispositif expérimental d'HD avec cohobage de l'HE	43
Figure II. 6: Photographie (a) et schéma (b) de l'installation d'extraction	45
Figure II. 7: Installation d'extraction supercritique «SFE1000 bar».....	47
Figure II. 8: Photographie (a) et schéma de principe (b) de l'ASE200.....	48
Figure II. 9 : Schéma de l'extracteur Soxhlet.....	50
Figure II. 10 : Lyophilisateur	51
Figure II. 11 : Microscopie électronique à balayage	52
Figure II. 12 : HB43-S Halogen Moisture Analyzer	53
Figure II. 13 : Molécules du radical DPPH'	55
Figure II. 14 : Réaction de l'ABTS ^{•+} en présence d'antioxydant	56

Figure III. 1: Rendement global d'extrait de <i>T. articulata</i> obtenu	59
Figure III. 2 : Rendement global d'extrait de <i>T. articulata</i> obtenu	60
Figure III. 3 : Variation du rendement global d'extraction de <i>T. articulata</i>	61
Figure III. 4 : Variation du rendement global d'extraction de <i>T. articulata</i>	62
Figure III. 5 : Variation du rendement global d'extraction de <i>T. Articulata</i> en fonction du taux de remplissage pour un rapport solvant/Ms =4 et t=6h.	63
Figure III. 6 : Variation du rendement global d'extraction de <i>T. articulata</i> en fonction du rapport solvant/Ms avec un taux de remplissage égal à 65% et t=6h.....	63
Figure III. 7: La cinétique d'extraction des HES de <i>T. articulata</i>	65
Figure III. 8 : Variation du rendement global en HE de <i>T. articulata</i> obtenu par HD.....	66
Figure III. 9 : Variation du rendement global en HE de <i>T. articulata</i> obtenu par HD.....	67
Figure III. 10: Schéma des deux types de particules traitées: (a) particule sphérique	69
Figure III. 11 : Simulation de l'extraction de l'HE de <i>T. articulata</i> par HD (particules sphériques).....	76
Figure III. 12 : Simulation avec le modèle de Sovová de l'extraction de l'HE de <i>T. articulata</i> par HD (t=180 min ; Q=0,02 mL/s ; dp=1,2 mm).....	76
Figure III. 13: Simulation de l'extraction d'HE de <i>T. articulata</i> en fonction du temps pour différentes tailles de particules (a), différents débit de condensation (b) et différentes valeurs de rapport eau / matière végétale (c)	78
Figure IV. 1 : Rendement d'extraction de la fraction volatile de <i>T. articulata</i> en fonction du temps d'extraction, avec un débit de CO ₂ =20 g/min, T = 40°C, P = 90 bar et une taille de particules moyenne de 1,2 mm.....	83
Figure IV. 2 : Rendement instantané d'extraction de la fraction volatile de <i>T. articulata</i> en fonction de la quantité du CO ₂ consommée avec un débit de CO ₂ =20 g/min,.....	84
Figure IV. 3 : Influence du temps statique sur le rendement global d'extraction de la fraction volatile de <i>T. articulata</i> par CO ₂ - SC avec un débit de CO ₂ =20g/min, T=40°C, P=90 bar et une taille de particules moyenne de 1,2 mm.	85
Figure IV. 4: Influence du temps dynamique sur le rendement global d'extraction.....	86
Figure IV. 5 : Variation du rendement global de <i>T. articulata</i> en fonction de la pression d'extraction avec un débit de CO ₂ =20 g/min, T=40°C, t=30 min	87
Figure IV. 6 : Variation du rendement global de <i>T. articulata</i> en fonction de la température d'extraction avec un débit de CO ₂ =20g/min, P=90 bar, t=30 min.....	88
Figure IV. 7 : Cinétiques d'extraction pour différentes températures (40, 50 et 60°C).....	89
Figure IV. 8 : Variation du rendement global en fonction du débit de CO ₂ supercritique.....	90

Figure IV. 9 : Variation du rendement d'extraction pour différentes débit de.....	91
Figure IV. 10 : Rendement d'extraction global de <i>T. articulata</i> par CO ₂ -SC en fonction.....	92
Figure IV. 11 : Influence de la présence de l'eau comme co-solvant dans la cinétique d'extraction avec CO ₂ supercritique à basse (a) et à haute (b) pression	93
Figure IV. 12 : Influence de la taille des particules sur le rendement global d'extraction.....	95
Figure IV. 13 : Schéma de l'extracteur.	99
Figure IV. 14 : Simulation du rendement de l'huile volatile de <i>T. articulata</i> avec le modèle de Reis-Vasco (première partie) à différentes débits de CO ₂ pour des particules de taille moyenne de 1,2 mm, la pression 90 bars et la température de 40°C	101
Figure V. 1 : Cinétique d'extraction des substances naturelles de <i>T. articulata</i>	107
Figure V. 2 : Variation du rendement d'extraction de <i>T. articulata</i> avec l'eau sub-critique	108
Figure V. 3 : Cinétique d'extraction des substances naturelles de <i>T. articulata</i> par l'eau sub-critique pour différentes température d'extraction, P = 100 bar.	109
Figure V. 4 : Courbe de saturation de l'eau pure	110
Figure V. 5 : Rendement d'extraction de substances naturelles de <i>T. articulata</i> a 150°C....	110
Figure V. 6 : Influence de la pression de processus de l'eau sub-critique	111
Figure V. 7 : Variation du rendement d'extraction des substances naturelles	112
Figure V. 8 : Variation du rendement global des substances naturelles.....	113
Figure VI. 1: Photo de l'extrait	121
Figure VI. 2: Cinétique d'extraction des huiles volatiles de <i>T. articulata</i> obtenue par HD (pour un débit de condensation 0,02 mL/s, rapport eau/ Ms 10) et CO ₂ -SC (débit de CO ₂ 20 g/min, pression 90 bar, température 40°C)	122
Figure VI. 4 : Corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante déterminée par la méthode ABTS ⁺ (a) et la méthode DPPH [*] (b).	131
Figure VI. 5: Chromatogrammes et composés principaux de l'HE de <i>C. semperevirens</i> obtenue par CO ₂ -SC et HD.	134
Figure VI. 6: Chromatogrammes des fractions volatiles obtenues par HD et CO ₂ .SC.....	138
Figure VI. 7: Chromatogrammes des fractions volatiles obtenus par HD and CO ₂ -SC	142

Liste des Tableaux

Tableau I. 1: Coordonnées critiques de certains fluides.....	18
Tableau I. 2 : Propriétés physiques du CO ₂ à l'état gaz, supercritique et liquide	19
Tableau III. 1: Paramètres du modèle pour l'extraction d'HE de <i>T. articulata</i>	75
Tableau V. 1 : Les différentes expériences réalisées pour la <i>T. articulata</i>	114
Tableau V. 2 : Rendement global d'extrait de <i>T. articulata</i> obtenu par l'appareil ASE	115
Tableau VI. 1 : Comparaison du rendement global d'extraction des substances naturelles .	120
Tableau VI. 2 : Composés majeurs (>2%) de la fraction volatile de <i>T. articulata</i> obtenue ..	124
Tableau VI. 3 : Teneur en composés phénoliques et activité antioxydante exprimées.....	127
Tableau VI. 4 : Rendement global des huiles volatiles de <i>C. sempervirens</i>	132
Tableau VI. 5 : Teneur en composés phénoliques (EAG) et activité antioxydante	134
Tableau VI. 6: Rendement global d'extraction d'E. cinerea et <i>E. camaldulensis</i>	135
Tableau VI. 7 : Compositions chimiques (>3%) des extraits obtenus par chaque méthode .	137
Tableau VI. 8 : Teneur en composés phénoliques (mg EAG/g de matière sèche).....	140
Tableau VI. 9: Rendement global des huiles volatiles de <i>C. glaucophylla</i>	141
Tableau VI. 10: Teneur en composés phénoliques (Gallic acid eq) et activité antioxydante exprimée en CI50 (mg/L) pour la fraction volatile de <i>C. glaucophylla</i> obtenue par HD et CO ₂ -SC (Pour un débit de CO ₂ 20 g/min, Pression 90 bar et température 40°C)	143
Tableau VI. 11: Composition chimiques (CG-MS) des fractions volatiles de <i>T. articulata</i> obtenu par HD, Soxhlet, eau sub-critique (SWE) et CO ₂ -SC.....	177
Tableau VI. 12 : Composition chimiques (CG-MS) des fractions volatiles d'E. cinerea	180

Annexes

Tableau VI. 11: Composition chimiques (CG-MS) des fractions volatiles de *T. articulata* obtenu par HD, Soxhlet, eau sub-critique (SWE) et CO₂-SC

		Type de méthode d'extraction										
		CO ₂ -SC					Soxhlet				HD	
Débit (g/min)		20	20	5	20	20						0,02 mL/s
Température (°C)		40	60	40	40	40	-	-	-	-	-	-
Pression		90	90	90	280	1000						
Solvant		CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂	Eau	EtOH	EtOH	EtOH	Hexane	Eau
Temps d'extraction (min)		30	30	30	30	30	30	240	360	480	480	180
Rendement global (mg/g Ms)		1,6	1,6	0,6				21,2	26,8	27,4	40,4	0,61
KI	Composés	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9	N°10	N°11
906	Santoline triène	0,85	0,67	0,23	nd	nd	nd	0,08	0,1	0,09	0,17	0,39
931	Artemesia triène	0,8	0,47	0,25	nd	nd	nd	0,11	0,11	0,09	0,19	0,6
936	α -pinène	31,32	21,92	9,35	nd	nd	1,08	2,68	3,14	2,63	6,79	24,9
940	Cumène	0,33	0,14	0,24	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
953	α -fenchène	0,22	0,14	0,08	nd	nd	0,09	nd	nd	nd	0,06	0,14
958	Camphène	0,49	0,37	0,24	nd	nd	0,08	0,1	0,13	0,1	0,17	0,45
967	β -thujène	2,64	1,56	0,91	nd	nd	0,61	0,45	0,53	0,43	0,68	1,99
973	1-Ethyl-4-méthylbenzène	0,43	0,22	0,29	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
983	trans-iso limonène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,85	8,19	7,28	4,93	
990	myrcène	0,17	0,06	0,12	nd	nd	0,97	nd	nd	nd	nd	0,48
1004	pseudo limonène	0,26	0,16	0,16	nd	nd		nd	nd	nd	3,22	0,37
1008	3-carène	3,39	2,3	1,5	nd	nd	0,11	nd	nd	nd	3,32	3,44
1012	α -terpinène	nd	nd	nd	nd	nd	nd	13,36	16,65	13,87	4,21	0,12
990	myrcène	0,17	0,06	0,12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,48
1037	limonène	0,16	0,09	0,1	nd	nd	nd	0,11	0,15	0,13	0,1	0,18
1047	3-Méthyl-1-decène	0,13	0,12	0,16	nd	nd	nd	0,05	0,07	nd	0,07	nd
1068	isoterpinolène	0,26	0,14	0,16	nd	nd	0,28	0,26	0,35	0,28	0,25	0,46
1077	éthyle maltol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,32	0,36	0,27	0,29	0,26
1079	alcool artemisia	0,19	0,17	0,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,12	nd
1089	α -terpinolène	nd	0,08	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,12	nd
1108	cis-thujone	0,22	0,18	0,25	nd	nd	0,36	0,19	0,1	0,05	0,13	0,35
1122	trans-2,8-menthadienol	0,17	0,15	0,26	nd	nd	0,24	nd	nd	nd	nd	0,38
1128	α -campholénal	3,44	2,67	3,43	0,1	0,43	2,12	1,51	1,81	0,95	1,9	3,84
1132	isothujol	nd	nd	0,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,17

1148	camphène hydrate	1,25	1,67	2,51	nd	nd	0,46	1,1	1,57	0,78	1,33	4,36
1157	isobornéol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,29	0,35	nd	0,16	nd
1159	β -terpinéol	0,18	0,2	0,22	nd	nd	0,89	nd	nd	0,36	nd	0,73
1172	3,5,5-Triméthyl-1,4-cyclohexanedione	nd	0,14	0,26	0,09	0,14	1,12	0,28	0,41	0,28	0,37	1,41
1193	myrténal	0,23	0,2	0,41	nd	nd	nd	0,12	0,2	0,09	nd	0,08
1200	Z-dihydrocarvone	0,18	0,13	0,26	nd	nd	nd	0,13	0,24	0,11	0,16	0,34
1232	cis-carvéol	0,15	0,12	nd	nd	nd	nd	0,14	0,18	nd	0,14	
1266	linalool acétate	18,18	15,78	17,69	1,72	nd	2,84	6,15	5,52	2,48	7,44	21,44
1279	p-sec-butylphenol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,06	0,1	nd	0,07	0,58
1318	(Z)-3-Hexenyl 2-méthyl-(E)-2-butoate	0,38	0,17	0,33	nd	nd	nd	nd	0,11	0,1	nd	nd
1327	Trans-pulegone oxyde	0,91	0,79	0,96	0,31	nd	0,98	0,61	0,53	nd	0,67	1,53
1356	α -cubébène	1,11	1,15	1,22	0,47	nd	2,21	0,9	0,73	0,7	0,95	0,26
1370	Cyclosativene	0,72		0,65	nd	nd	0,44		0,36	0,23	0,37	0,16
1383	β -bourbonène	1,74	1,73	1,9	nd	nd		1,22	0,75	0,67	1,14	0,44
1400	γ -caryophyllène	4,16	5,43	5,81	2,05	nd	3,4	1,51	1,68	1,35	1,71	2,53
1409	aromadendrène	nd	nd	nd	nd	nd	0,26	nd	nd	nd	nd	nd
1435	α -trans-bergamotène	1,29	1,51	1,63	0,59	nd	0,56	0,53	0,51	0,4	0,54	1,04
1444	α -caryophyllène	nd	0,08	nd	nd	nd	nd	0,06	0,08	0,06	0,06	0,13
1455	α -patchoulène	0,48	0,61	0,75	nd	nd	nd	0,84	nd	nd	nd	0,18
1461	alloaromadendrène	7,55	11,8	10,86	1,41	nd	3,79	nd	2,04	1,38	2,03	1,14
1474	γ -muurolène	nd	nd	nd	nd	nd		0,68	0,64	0,49	0,47	0,35
1479	γ -curcumène	0,58	0,78	0,63	nd	nd	0,96	nd	nd	nd	nd	0,43
1494	α -zingiberène	2,14	3,52	4,75	2,38	nd	1,87	3,96	2,93	3,13	4,03	0,53
1501	α -amorphène	1,39	1,98	2,76	nd	nd	0,74	nd	nd	nd	nd	1,64
1516	α -selinène	0,32	0,35	0,31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1534	incisol	0,17	0,46	0,44	nd	nd	0,44	0,73	0,7	0,52	0,66	0,59
1557	caryophyllène alcool	1,06	3,23	2,43	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1568	caryophyllène oxyde	1,82	2,88	4,04	2,45	nd	1,08	4,21	2,44	2,2	3,54	4,24
1588	β -oploponone	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,38
1594	cedréol	0,48	0,96	1,12	1,03	nd		1,56	1,2	0,93	1,16	2
1613	1-épi-Cubéol	0,52	1,23	1,67	2,12	nd	1,26	1,17	0,95	0,84	0,92	2,83
1619	trans-isolongifolanone	nd	nd	0,15	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,42
1626	γ -eudesmol	0,58	1,01	1,35		nd	0,25	1,73	1,53	1,17	1,12	2,56
1642	spathuléol	0,43	0,77	1,05	0,77	nd	0,69	1,5	1,52	1,36	1,47	2,37
1660	14-Hydroxy-9-épi-(E)-caryophyllène	0,14	0,29	0,23	0,5	nd	0,09	0,48	0,5	0,44	0,42	0,97
1673	Cedr-8-en-13-ol	nd	0,1	nd	nd	nd	0,45	nd	nd	nd	nd	0,23
1678	cis- α -santalol	0,44	1,07	1,36	1,24	nd	0,3	2,41	2,8	2,24	2,19	1,74
1690	juniper camphor	nd	nd	0,52	nd	nd	0,58	0,65	nd	nd	0,13	nd

1717	(Z)-2-Heptadecene	0,22	0,4	0,74	nd	nd	0,3	1,1	1,64	1,39	1,55	nd
1729	cis- β -santalol	nd	nd	nd	nd	nd	0,12		1,13	nd	0,69	nd
1761	1,10-Dihydronootkatone	nd	nd	nd	0,88	nd	0,23	0,88	nd	nd	nd	0,08
1778	Platambin	nd	nd	0,31	nd	nd	1,69	1,96	2,82	1,9	0,82	nd
1789	14-Hydroxy-alpha-muuroleone	nd	0,42	nd	nd	nd		0,71	0,76	0,49	0,36	nd
1799	Alloaromadendrone oxyde	nd	nd	nd	nd	nd	0,3	0,35	0,47	0,19	0,15	nd
1928	16-hexadecanolide	nd	nd	0,31	0,43		0,78	0,18	0,41	0,22	nd	0,15
1962	acide palmitique	nd	nd		2,98	36,19	4,19	2,69	1,32	2,2	1,52	nd
1991	manoyl oxyde	0,13	0,37	0,5	nd	nd	1,65	0,59	0,36	0,43	0,66	0,26
2008	Kaur-16-ène	0,14	0,38	0,48	nd	nd	0,77	0,53	0,36	0,68	0,56	0,1
2053	abietatriène	nd	0,2	0,4	nd	nd	0,84	0,84	0,56	0,67	0,47	0,32
2095	Heneicosane	0,4	0,4	0,59	3,66	nd	1,52	2,26	2,01	2,2	2,53	0,09
2135	1R-pimaral	0,13	0,16	0,27	6,09	nd	2,16	2,14	nd	1,83	nd	0,27
2143	cubitène	0,22	0,3	0,58	nd	nd	nd	1,55	1,47	2,33	1,65	nd
2187	cembrène A ketone	0,25	0,49	0,95	1,37	nd	1,42	1,04	1,01	0,93	1,27	0,14
2216	15-ripperten-3alpha-ol	0,41	0,94	1,62	2,11	nd	2,55	2,2	1,76	2,85	2,73	0,52
2223	trans-totarol	0,12	0,19	0,32		nd				0,29		nd
2274	larixol	nd	nd	nd	2,17	nd	0,57	0,68	0,66	0,75	0,63	nd
2288	ni	nd	nd	nd	10,29	nd	5,15	0,33	0,44	0,44	0,4	nd
2311	trans-totarol	nd	nd	nd	4,85	0,05	0,87	0,67	0,52	0,74	0,62	0,07
2368	androst-5-en-17-ol, 4,4 dimethyl	nd	nd	nd	2,28	2,49	0,39	4,43	1,73	6,54	3,73	nd
2383	Podocarp-7-en-3-one, 13a-methyl-13-vinyl	nd	nd	nd	7,77	25,53	11,89	1,6	2,53	5,79	4,56	nd
2473	ni	nd	nd	nd	14,4	1,35	15,64	2,56	2,99	2,86	2,28	nd
2922	acide abiétique	nd	nd	nd	nd	0,31	nd	4,41	5,68	5,68	0,51	nd
2925	ni	nd	nd	nd	nd	1,05	nd	4,89	3,86	6,26	5,46	nd
2930	Podocarp-8(14)-en-15al, 13a-methyl-13-vinyl	nd	nd	nd	nd			nd	nd		nd	nd
					10,79	nd				4,25		
	ni (M=410)	nd	nd	nd	nd	0,73	0,14	nd	nd	nd	nd	nd
	ni (M=552)	nd	nd	nd	nd	2,14	0,52	nd	nd	nd	nd	nd
	ni (M=618)	nd	nd	nd	nd	8,96	1,27	nd	nd	nd	nd	nd
	ni (M=296)	nd	nd	nd	7,34	7,98	8,38	nd	nd	nd	nd	nd
		nd	nd	nd				nd	nd	nd	nd	nd
	Nombre de composés	56	60	62	29	14	57	66	65	63	68	56
	hydrocarbures monoterpènes	40,73	28,02	13,22	0	0	3,22	23	29,35	24,9	24,21	34

monoterpènes oxygénés	6,92	6,28	8,8	0,41	0,43	5,05	4,15	5,08	2,34	4,68	12,36
hydrocarbures sesquiterpènes	21,48	28,94	31,27	6,9	0	14,23	9,7	9,72	8,41	11,3	8,83
sesquiterpènes oxygénés	5,64	12,42	14,67	8,99	0	7,48	18,34	16,82	12,28	13,63	18,41
autres	21,14	20,26	25,49	67,55	97,71	64,96	41,49	35,78	52,46	39,3	25,03
Total	96,24	96,06	93,69	83,85	98,14	94,94	96,68	96,75	100,39	93,12	98,63

Tableau VI. 12 : Composition chimiques (CG-MS) des fractions volatiles d'*E. cinerea* et *E. camaldulensis* obtenu par HD et CO₂-SC

RI	Composés	<i>E. Cineria-</i>		<i>E. camaldulensis-</i>	<i>E. camaldulensis-</i>
		HD	CO ₂ -SC	HD	CO ₂ -SC
		%	%	%	%
928	α -thujène	nd	nd	0,17	nd
937	α -pinène	4,07	nd	7,88	nd
952	camphène	0,15	nd	0,12	nd
962	1-Ethyl-4-méthylbenzène	nd	0,35	nd	nd
982	β -pinène	nd	nd	0,11	nd
997	1,2,3-Triméthyle benzène	nd	0,43	nd	0,16
1007	α -phéllandrène	0,17	nd	0,21	nd
1018	α -terpinène	nd	nd	0,13	nd
1025	p-cymène	1,52	0,37	17,14	0,90
1029	limonène	3,05	nd	5,06	
1033	1,8-cinéole	64,89	16,1	45,71	1,74
1055	γ -terpinène	0,08	nd	0,27	nd
1070	artémisia kétone	0,08	nd	nd	nd
1084	α -terpinolène	0,17	nd	0,25	nd
1092	linalole	0,17	nd	0,19	0,13
1109	fenchole	0,20	0,26	0,21	nd
1114	1S- β -fenchol	nd	nd	0,27	0,29
1132	α -campholéal	0,51	0,53	1,19	0,33
1140	veratrole	nd	nd	0,21	nd
1154	2-Méthyle-1-phénylpropan-2-ol	0,04	nd	0,33	nd
1156	Iso-bornéole	0,64	0,94	0,34	nd
1166	lavandulole	0,45	0,59	1,46	0,88
1172	éthyle benzoate	0,04	0,58	0,16	nd
1174	myrtanal	0,38	nd	3,36	4,38
1177	terpinèn-4-ol	4,30	5,34	0,56	nd

1192	cis-pipéritol	nd	nd	0,07	0,20
1202	E-dihydrocarvone	0,15	0,22	0,12	nd
1210	trans-carveol	0,41	0,74	0,27	0,33
1213	verbénone	0,28	0,26	0,20	nd
1222	cuminaldehyde	nd	nd	1,69	1,31
1226	eucarvone	0,06	nd	nd	nd
1235	néral	nd	nd	0,19	0,36
1254	carvénone	nd	nd	0,45	nd
1266	p-tert-butylphenol	nd	nd	0,40	1,40
1274	perilla aldéhyde	0,30	0,63	0,54	0,98
1281	méthyl nerolate	nd	nd	nd	0,56
1289	Undecan-2-one	nd	0,16	nd	2,91
1291	1-Tridecène	nd	0,39	nd	nd
1292	thymol	0,20	nd	nd	nd
1318	P-menth-1-en-8-ol	8,15	31,87	0,17	nd
1330	p-Mentha-1,4-dien-7-ol	nd	nd	nd	0,91
1344	2,6-Dimethoxyphenol	nd	nd	nd	0,56
1356	citronellyl acétate	nd	0,23	nd	0,59
1366	3-phenylpropyl acétate	0,28	nd	nd	nd
1374	longicyclène	nd	0,33	nd	nd
1377	trans-4,5-Epoxy-(E)-2-decénal	nd	nd	nd	0,62
1383	β -bourbonene	0,11	2,42	0,09	nd
1401	longifolène	0,07	1,76	0,54	2,52
1413	Iso-caryophyllène	nd	0,34	nd	nd
1421	β -gurjunène	nd	0,96	0,27	3,30
1453	α -caryophyllène	nd		0,19	0,75
1456	β -acoradiène	0,19	5,03	nd	1,14
1458	(E)-2-Dodecenal	nd	0,43	nd	nd
1477	γ -muurolene	nd	0,56	nd	nd
1483	(E,E,Z)-2,4,7-Decatrienal	nd	1,15	nd	nd
1492	anisic acide	nd	1,67	nd	0,33
1517	cubébol	nd	nd	0,35	
1520	lilial	nd	nd	nd	1,31
1528	1,4-cadinadiène	0,16	1,28	0,17	
1538	8,14-cedranoxyde	0,72	5,68	2,54	43,79
1545	élémol	0,62	4,15	2,01	6,30
1555	caryophyllène alcool	0,74	5,39	0,85	nd
1564	trans-nerolidol	0,23	0,82	nd	nd
1573	spathuléol	nd	nd	nd	1,80
1587	viridiflorol	0,25	1,68	0,33	nd
1603	cédrenol	0,16	0,61	nd	1,01
1616	trans-isolongifolanone	nd	nd	nd	0,33
1632	hinesol	0,22	1,15	0,40	1,80

1660	14-hydroxy-9-epi-E-caryophyllène	nd	0,30	nd	1,63
1714	cis- β -santalol	nd	0,36	nd	3,05
1717	Z,Z-farnesol	nd	nd	nd	2,21
1724	α -cypérone	nd	nd	nd	2,09
1728	E- γ -curcumèn-12-ol	nd	nd	nd	3,30
1754	E,Z-farnesol	nd	0,47	nd	1,93
1766	dehydrovomifoliol	nd	nd	nd	0,75
1774	guaiazulène	nd	nd	nd	0,78
1800	5,13-Diméthylheptadécane	nd	nd	nd	0,36
<hr/>					
	hydrocarbures	9	1	31	1
	monoterpènes				
	Monoterpènes oxygénés	81,21	57,47	57,72	13,80
	hydrocarbures	0,53	12,69	1,61	7,71
	sesquiterpènes				
	Sesquiterpènes oxygénés	2,94	20,62	6,13	69,65
	Phénol	0	0	0	0,78
	autres	0,32	4,96	0,37	6,99
	Total	94,22	96,54	97,17	100

Estimation de la masse volumique de *T. articulata*

Afin de déterminer la masse volumique de la matière solide, on procède de la manière suivante :

- On pèse une quantité de plante (m_s) et on la place dans une éprouvette graduée.
- On ajoute un volume V_{hex} d'hexane (de masse volumique connue ρ_{hex} , $\rho_{hex} = 670$ kg/m³) jusqu'à atteindre un volume connu V_{tot} .
- On pèse de nouveau l'éprouvette pleine et on note la masse m_{tot} .
- On calcule la masse d'hexane ajoutée ($m_{hex} = m_{tot} - m_s$) ainsi que son volume $V_{hex} = m_{hex} / \rho_{hex}$.
- On cherche le volume de la matière végétale V_s ($V_s = V_{tot} - V_{hex}$) et on en déduit sa masse volumique $\rho_s = m_s / V_s$.

La masse volumique de la plante *T. Articulata* est d'environ 815 kg/m³.

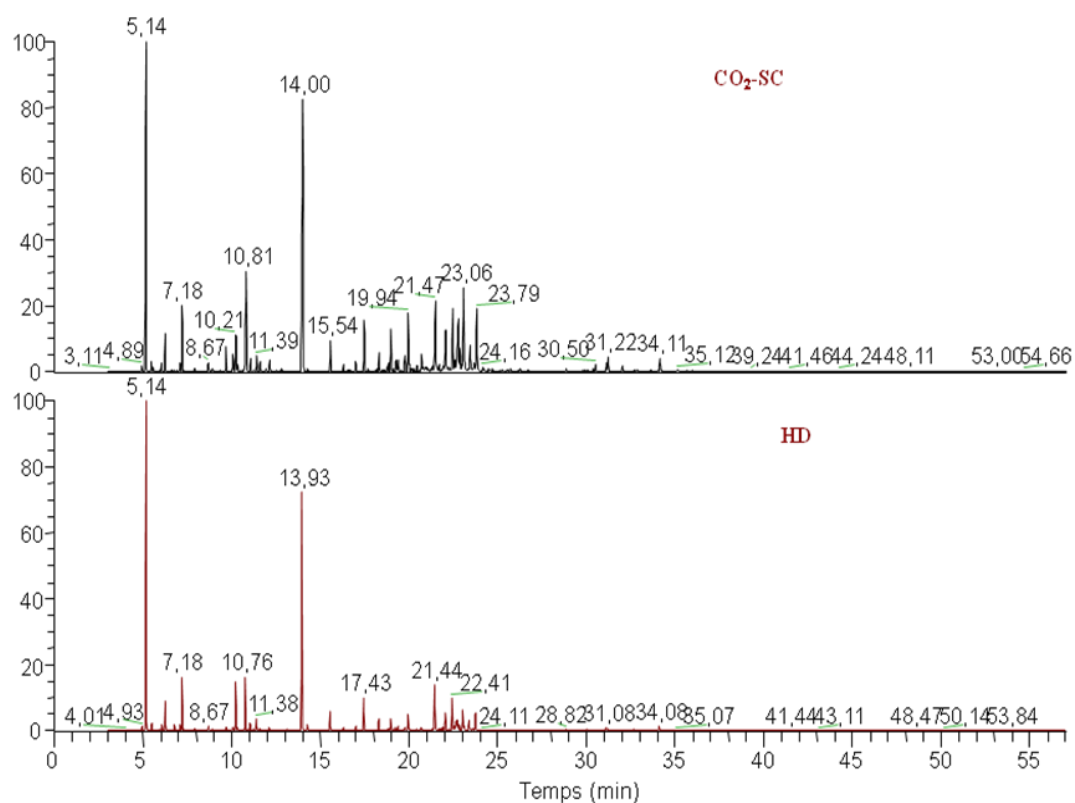
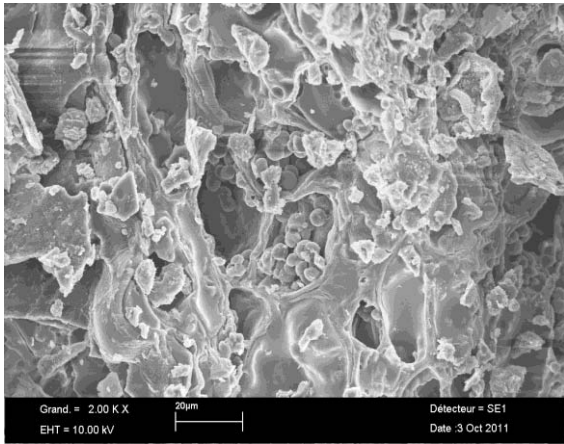
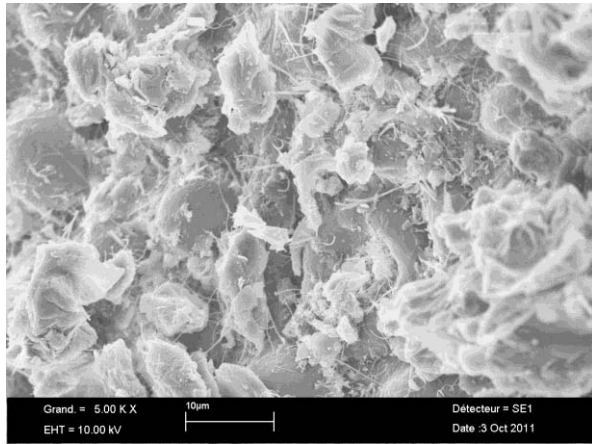


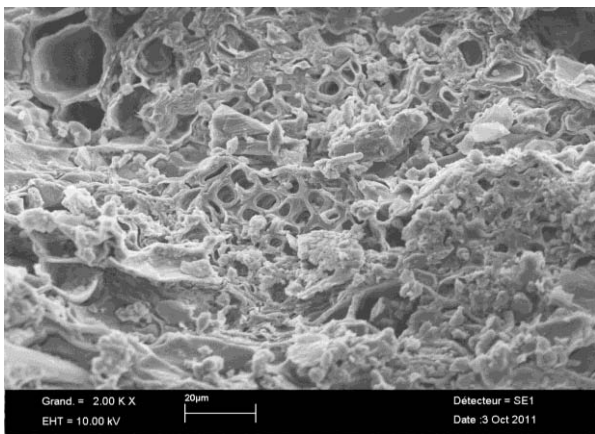
Figure VI. 7 : Chromatogramme d'huile essentielle obtenu par HD et huile volatile obtenu par CO₂-SC de *T. articulata*.



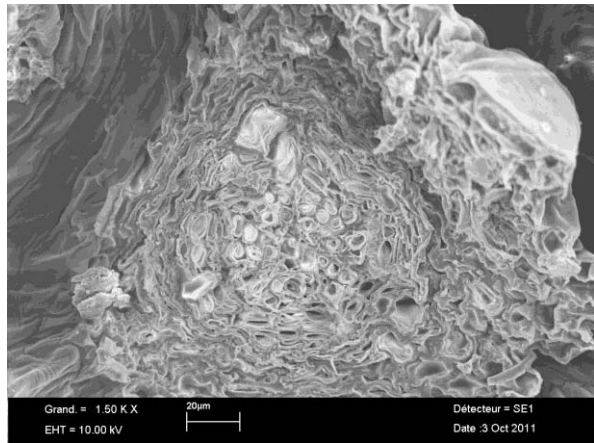
E. camaldulensis



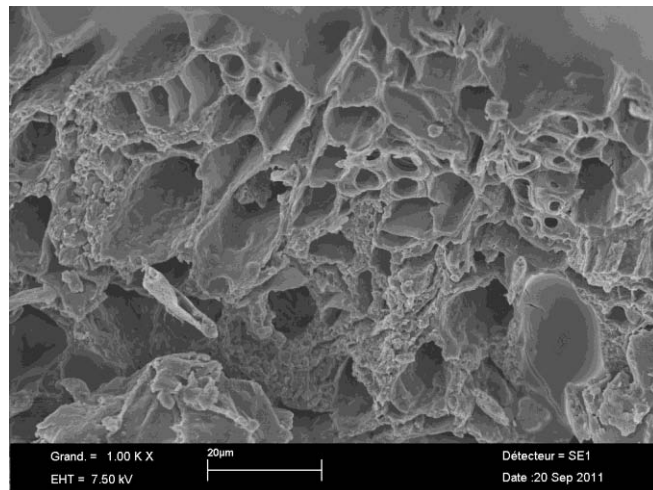
E. cinerea



C. sempervirens



C. glaucophylla



T. articulata

Figure III. : Image du MEB d'une section de différentes plantes utilisées dans cette thèse

