

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences alimentaire
Option : Biotechnologie, Bio ressources , Aliment et Nutrition.



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Application de surfactants alimentaires
pour la séparation des substances
biologiques**

Présenté par :

Hassaini Lamia & Herroug yamina

Soutenu le : **11 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

M ^{elle} Achat Sabiha	MCB	Presidente
M ^{elle} Brahmi Fatiha	MAA	Encadreur
M ^r Kati Djamel Eddine	MCA	Examineur
M ^r Dahmoune Farid	MAB	Invité

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciement

Tout d'abord, on remercie Dieu, le Généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas et aussi de nous avoir donné la force afin d'accomplir ce modeste travail.

*Nous avons l'honneur de formuler notre gratitude et notre profonde reconnaissance à l'égard de **M^{elle} BRAHMI F.** Notre promotrice et notre Co-promoteur **Monsieur DAHMOUNE F.** pour leurs précieuses aides, leurs Orientations et le temps qu'ils nous ont accordé pour notre encadrement.*

*On tient à remercier vivement **M^{elle} ACHAT S.** qui nous fait l'immense honneur de présider le jury. Ainsi que **Monsieur KATI D.** pour l'honneur qu'elle nous a accordé en acceptant d'évaluer ce modeste travail.*

*Nous remercions aussi Tout les membres du laboratoire B.B.B.S
Nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de Loin à la réalisation de ce Travail.*

Merci;
Lamia & Yamina

Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

A mes très chers parents qui m'ont donné tout afin de continuer et réussir mes

Études, que dieu les protège et leur prête une longue vie.

*A Mes adorables sœurs : **katiba, fouzia, aida, nadjette, kahina et Sonia** que
j'aime.*

*A mon unique frère **Jugurtha** à qui je souhaite beaucoup de succès dans sa
vie.*

*A mes chères amis **celia, chaneze, yamina, Meriem, yasmine, fouzy***

A tous mes oncles et tantes

A la famille hassaini

A mon binôme yamina, qui m'a aidé à réaliser ce travail.

A toute la promotion Master II biotechnologie

Lamia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents qui m'ont toujours encouragé tout au long de mes études et pour leurs efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris afin de me voir

Réussir, que dieu vos protèges.

A mes frères Azzedine, Mounir, à qui je souhaitent beaucoup de réussite dans leur vie.

A mes sœurs Salima, Mouna, Soussou et son enfant Iliane ainsi leurs familles.

A toute ma famille

A tout mes amis (es) : Karima , Sousou , Djamila, Radia , Djaouida , Bahia , Karima , Fouzi, malek, tahar, najim ...etc.).

Yamina

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma simplifié d'un tensioactif.....	02
Figure 2 : Tensioactif et micelle.....	04
Figure 3 : Courbe représentant la tension de surface en fonction de la concentration en tensioactif.....	05
Figure 4 : Dispersions : phase dispersée et phase dispersante.....	05
Figure 5 : Composition des CGA _S (A) Photographie sous un microscope électronique (B) Schéma de la structure des CGA _S	06
Figure 6 : schéma représentatif de la production des CGA _S	07
Figure 7 : Illustration morphologique de dispersion de CGA pendant le temps de drainage : (a) 10s, (b) 300s et (c) 600 s	09
Figure8 : Processus de déstabilisation d'une mousse.....	10
Figure9 : Comparaison structurale entre la CGA (a) et les bulles conventionnelles.....	11
Figure 10 : Photographie du dispositif des CGA _S (Photos éditer par les auteurs)	14
Figure 11 : photographie des feuilles de la menthe verte.....	15
Figure 12 : Dispositif utilisé pour l'extraction (micro-onde domestique ; Samsung MW813ST).....	16
Figure 13 : schéma représentatif de mécanisme de séparation des CGA _S	18

Figure 14 : Chélation des métaux par les flavonoïdes (Sava et Sîrbu, 2010).....	20
Figure 15 : Schéma réactionnel du test au DPPH (Batoul et <i>al.</i>, 2010).....	22
Figure 16: courbe d'évaluation de gaz hold-up généré à partir tween... (10 mM).....	20 25
Figure 17 : Structure chimique de l'acide gallique Krief, (2003).....	26
Figure 18 : Courbe d'évolution des résultats de séparation (FS) et de rendement (RE) des différents ratios avec CGA_S générés à partir de tween 20	26
Figure 19 : Structure chimique de l'acide chlorogénique (Benaïssa, 2011).....	27
Figure 20 : Rendements et facteurs de séparation de l'ACH en présence des CGAS_S générés à partir de tween 20 en fonction de différents ratios.....	27
Figure 21 : Structure chimique de l'acide caféique (Nkhili, 2009).....	28
Figure 22 : Courbe d'évolution des résultats de séparation et de rendement de l'acide caféique avec des différents ratios testés.....	28
Figure 23 : Courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des polyphénols avec des différents ratios testé.....	31
Figure 24 : courbe des résultats de la séparation et de rendement d'indice polyphénol effectué avec des différents ratios testés.....	32

Figure 25 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des flavonoïdes avec des différents ratios.....	33
Figure 26 : courbe d'évaluation des résultats de séparation et de rendement de la « chlorophylle a » avec des différents ratios.....	34
Figure 27 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle « b » effectué ratios.....	34
Figure 28 : courbe d'évolution de l'activité anti-radicalaire en fonction des différents ratios.....	35
Figure 29 : courbe d'évolution de phosphomolybdate des CGA_S différents ratios.....	36
Figure 30 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des polyphénols à des temps différents.....	37
Figure 31 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement d'indice de polyphenol a des temps différents.....	37
Figure 32 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des flavonoïdes a des temps différents.....	38
Figure 33 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle a effectuées à des temps différents.....	39
Figure 34 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle « b » à des temps différents.....	39
Figure 35 : courbe d'évolution de l'activité anti-radicalaire en fonction de temps pour la phase liquide et aphron des CGA_S générée a partir extrait pur.....	40
Figure 36: courbe d'évolution de phosphomolybdate effectuée à partir des CGA_S générées par le tween 20 en fonction du temps (min).....	41

Figure 37 :courbe d'évolution de phophomolybdate effectuée à partir des CGA_S générées par le tween 20 en fonction du temps (min).....	42
Figure 38 :courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de l'indice de ployphenols effectuée a partir CGA_S générées par le tween 20 en fonction de temps (min).....	42
Figure 39 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des flavonoïdes effectuée a partir CGA_S générées par le tween 20 en fonction de temps (min).....	43
Figure 40: courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle « a » effectué par CGA_S générées par tween 20 en fonction du temps (min).....	44
Figure 41 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle « b » à des temps différents (min).....	44
Figure 42 : cinétique d'évolution des résultats de mesure de l'activité anti-radicalaire des CGA_S mélangées avec l'extrait en fonction du temps (min).....	45
Figure 43 : courbe d'évolution de phosphomolybdate effectuée à partir CGA_S générées par le tween 20 en fonction du temps (min).....	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Quelques exemples de différents types de surfactants	03
Tableau II. Place des mousses au sein des systèmes dispersés	06
Tableau III. produits chimiques utilisé	13
Tableau IV. Résultats des rendements optimums des standards utilisés ...	30
Tableau V. Résultats des dosages des différents composés de la menthe....	31

Liste des abréviations

A_{control} : Absorbance du contrôle ;

A_{échantillon} : Absorbance de l'échantillon

ACaf : acide caféique.

ACh : **acide** chlorogénique

AG : acide gallique

CGA : colloïdal a gaz aphron

CMC : concentration micellaire critique.

C_{PA} : **concentration** de la phase aphron.

C_{PL} : concentration de la phase liquide.

DF : le facteur de dilution.

DPPH : 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

H₃PMo₁₂O₄₀ : Acide Phosphomolybdique.

Mo⁺⁵ : Molybdène réduit.

Mo⁺⁶ : Molybdène oxydé.

Mo₈O₂₃ : Molybdène.

MoW₁₁O₄₀ : Acide phosphotungstique

RE : le rendement.

SE : facteur de séparation

V_{PA} : volume de la phase aphron.

V_{PL} : volume de la phase liquide.

Introduction

Les composés phénoliques suscitent un grand intérêt car ils peuvent jouer un rôle sur l'incidence de certaines maladies dégénératives associées à la consommation d'aliments à base de plantes. Toutefois, les preuves scientifiques ne sont pas encore concluantes et des recherches approfondies sont nécessaires. Leurs effets sur la santé sont souvent attribués à leur activité antioxydante qui est gouvernée par une variété de mécanismes (**Cheyrier, 2012**).

La majorité des études répertoriées dans la littérature traitent les structures chimiques, nutritionnelles, biochimiques, alors que peu d'études portent sur les propriétés physico-chimiques et colloïdale qui sont, cependant, d'une grande importance dans la compréhension du comportement et la fonctionnalité de ces substances. Le fractionnement, qui a pour but de simplifier un extrait brut en séparant les molécules en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, va permettre de réduire la complexité du matériel de départ et donc faciliter, à posteriori, son identification. Le développement de méthodologies rapides qui permettent l'analyse et l'identification des molécules séparées par fractionnement est actuellement l'un des défis majeurs actuels en phyto-chimie. La technique des colloïdes à gaz Aphron (CGA_S) est une technique de partage préparative moderne qui peut être employée pour le fractionnement et la purification de produits naturels d'origine diverse.

L'objectif de ce travail est d'essayer d'appliquer cette technique pour séparer les composés phénoliques des non-phénoliques, en l'appliquant sur des standards, ensuite sur une matrice réelle qui est la menthe verte. Ce mémoire est donc structuré en différentes parties :

- ✚ La première est consacrée à l'état de l'art sur la CGA ;
- ✚ La deuxième partie qui est scindée en deux sections à savoir :
 1. Essais sur les solutions standards (A. Gallique, A. Caféique et A. Chlorogénique) ;
 2. Application de cette technique sur la matrice réelle (menthe verte).

TABLE DES MATIERES

Table des matières.....	I
Liste des tableaux.....	II
Table des figures.....	III
Liste des abréviations	V
Introduction général	01
I. Généralités sur les tensions actifs et les CGA _S	02
I.1. Tensions actifs.....	02
I.1.1. Classification.....	02
I.1.2. Propriétés.....	03
I. 2.Colloïdal Gaz Aphron (CGA _S).....	05
I.2.1. Dispersions.....	05
I.2.2. Colloïdales Gaz Aphron (CGA _S).	06
I.3. Production des CGA _S	07
I.3.1.Conditions générales d'obtention d'une mousse.....	07
I.3.2. Génération des CGA _S	07
I.4. Caractérisation des CGA _S	08
I.4.1 Taille et distribution	08
I.4.2. Stabilité	09

I.5. Comparaison entre la micro mousse conventionnelle et les bulles des CG_S.....	10
I.6. Applications des CGA_S.....	11
II.1. Réactifs chimiques et appareillage	13
II.1.1. Réactifs chimiques	13
II.1.2. Présentation de l'appareillage utilisé	13
II.2. Préparation de la solution standard et du matériel végétal.....	14
II.3. Extraction par microonde	15
II.4. Génération et caractérisation des CGA_S	16
II.5. Séparation des CGA_S	17
II.6. Dosage des polyphénols totaux.....	19
II.6.1. Principe	19
II.6.2. Mode opératoire	19
II.7. Indice des polyphénols	19
II.7.1. Principe	19
II.7.2. Mode opératoire	19
II.8. Dosage des flavonoïdes totaux	20
II.8.1. Principe.....	20
II.8.2. Mode opératoire.....	20
II.9. Dosage des chlorophylles a, b, et des caroténoïdes.....	21
II.9.1. Principe.....	21

II.9.2. Mode opératoire	21
II.11. Evaluation de l'activité antioxydante.....	21
II.11.1. Pouvoir antiradicalaire au DPPH.....	21
II.11.1.1 Principe	21
II.11.1.2.Mode opératoire	22
II.11.2.Test au phosphomolybdate d'ammonium.....	23
II.11.2.1. Principe.....	23
II.11.2.2.1.Mode opératoire.....	23
III. Description du montage réalisé pour générer les CGA _S	24
III.1. Stabilité et gaz hold-up	24
III.2.Standards.....	25
III.3. Application des CGA _S sur une matrice réelle.....	30
III.3.1. Caractérisation de la matrice (la menthe).....	30
III.3.2. Génération des CGA _S on utilise un extrait dilué 1 mg/ML.....	31
III.3.3. Génération des CGA _S avec l'extrait concentré.....	36
III.3.4. Génération des CGA _S en présence de l'extrait.....	41
Conclusion général.....	46
Bibliographie	
Annexe	

I. Généralités sur les tensions actifs et les CGA_S

I.1. Tensions actifs

L'utilisation des tensioactifs est à l'heure actuelle à l'origine de nombreuses formulations dans des domaines variés tels que l'agrochimie, la pharmacologie, ou la préparation et la stabilisation des peintures (**Bordes, 2007**).

Un tensioactif ou agent de surface actif est un composé qui modifié la tension superficielle entre deux surfaces de deux liquides ou celle entre un liquide et un solide (**Wertz, 2012**) avec des molécules aux propriétés spécifiques : détergente, mouillante, et solubilisante grâce à leur structure amphiphile (**Ghezouali, 2010**).

Un tensioactif (en anglais surfactant) est une molécule composée de deux parties principales :

- Une partie qui s'accroche à l'eau : la **partie hydrophile** (ou encore polaire) ;
- Une partie qui s'accroche à la graisse : la **partie lipophile** (ou encore hydrophobe) (Figure 1).

C'est cette structure particulière qui lui donne ses propriétés et toute son utilité (**Kernen et Cintrat, 2011**).

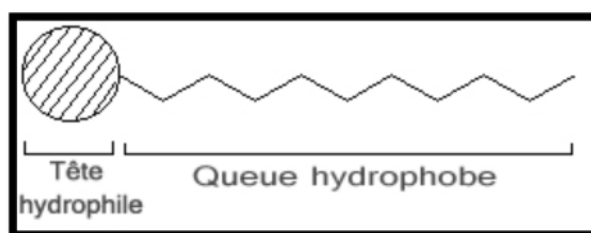


Figure 1 : Schéma simplifié d'un tensioactif (**Ghezouali, 2010**).

I.1.1. Classification

Les tensioactifs ont tous une structure amphiphile, seules des variations au niveau des charges situées dans la "tête" (partie hydrophile) permettent d'en différencier quatre types (**Kernen et Cintrat, 2011**) qui sont :

- **Tensioactifs anioniques** : ils possèdent généralement une tête hydrophile chargée négativement.
- **Tensioactifs non ioniques** : en solution aqueuse ils ne s'ionisent pas, car ils possèdent un groupe hydrophile du type alcool, phénol, ester, éther ou même amide caractérisé par absence de charge.
- **Tensioactifs cationiques** : avec une tête hydrophile chargée positivement.
- **Tensioactifs zwitterioniques ou amphotères** : ils possèdent deux groupements de charges opposées. Suivant le pH ils sont sous forme cationique ou sous forme anionique (**Ghezouali, 2010**).

Le tableau I renferme la classification de quelques tensioactifs en se basant sur leurs structures et leurs dissociations en présence de leur solution aqueuse.

Tableau I : Quelques exemples de différents types de surfactants (**Dahmoune, 2014**).

Tension actif	CMC	Charge
Sodium Dodcyl Sulfate (SDS)	8,2	A
Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)	1,0	C
Polyoxéthylène (20)sorbitan monolaurate	0,06	N
Lauryldiméthylamine N-oxide (LDAO, Empigen OB)	3-1	Z

Note : A : anionique; C : cationique; N : neutre ; Z : zwitterionique ; CMC: concentration micellaire critique.

I.1.2. Propriétés

Les propriétés des tensioactifs sont influencées par plusieurs facteurs, d'une part la nature des molécules, d'autre part la formulation globale dans laquelle se trouve le tensioactif, et enfin la température (**Ghezouali, 2010**).

I.1.2.1. Adsorption aux interfaces

Les molécules tensioactives ont tendance à se concentrer aux interfaces et à s'orienter de façon à augmenter les interactions attractives (partie hydrophile/phase hydrophobe). Ce phénomène d'adsorption du tensioactif provoque une diminution de la tension superficielle ou de la tension inter faciale jusqu'à ce que l'interface soit saturée (Ghezouali, 2010).

I.1. 2.2. Micellisation

La plupart des propriétés des tensioactifs se comprennent bien, de manière qualitative, à partir de caractère amphiphile des molécules. En revanche, il existe une propriété qui n'est pas explicable simplement à ce stade : c'est la capacité des liquides comme l'eau ou l'huile à solubiliser et à transporter des quantités importantes des molécules amphiphiles.

Cette solubilité ne se comprend que par la formation, en solution, de petits agrégats appelés micelles (Ghezouali, 2010) où les queues hydrophobes forment le cœur de l'agrégat et les têtes hydrophiles sont en contact avec le liquide environnant. Des micelles sphériques ou cylindriques ou des bicouches peuvent être formées (Figure 2) lorsque la concentration en molécule dissoute dépasse un certain seuil, appelé concentration micellaire critique (CMC) (Wertz, 2012).

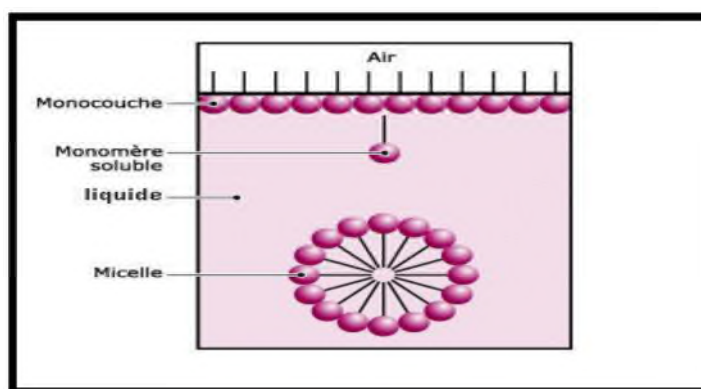


Figure 2 : Tensioactif et micelle (Kernen et Cintrat, 2011).

I.1.2.2.1. Concentration micellaire critique

La CMC "Concentration Micellaire Critique" est la concentration à partir de laquelle la surface est saturée de tensioactifs et que les molécules restantes se regroupent sous forme de micelles. Une fois atteinte, la tension de surface est au minimum et ne diminuera plus. Dès que cette concentration est atteinte, le produit devient efficace (Figure 3) (Kernen et Cintrat, 2011).

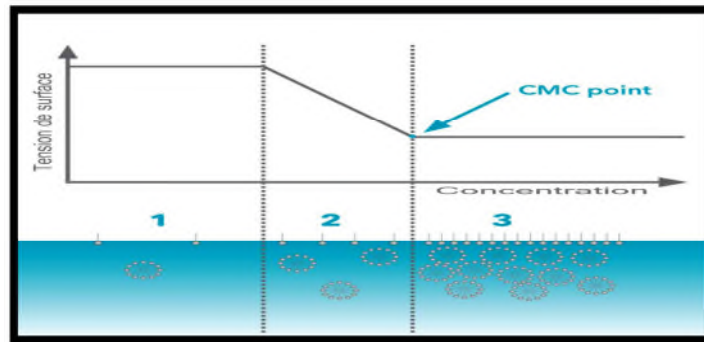


Figure 3 : Courbe représentant la tension de surface en fonction de la concentration en tensioactif (Kernen et Cintrat, 2011).

I.1.2.3. Solubilité

La formation de micelles permet de rendre plus favorable la dissolution dans l'eau des amphiphiles, en réduisant l'aire de contact entre les chaînes hydrocarbonées et l'eau. Effectivement, les solubilités sont parfois extraordinairement élevées (Ghezouali, 2010).

I. 2.Colloïdal Gaz Aphron (CGA_S)

I.2.1. Dispersions

La dispersion résulte de la fragmentation d'une substance en particules de petites tailles distribuées de façon homogène au sein d'une autre substance. Ces deux substances ne peuvent pas se mélanger et peuvent se trouver sous différents états physiques, solide, liquide ou gazeux. Elle est toujours caractérisée par la présence de deux phases (Figure 4) :

- Phase dispersée (interne ou discontinue).
- Phase dispersante (externe ou continue) (CQP, 2012).

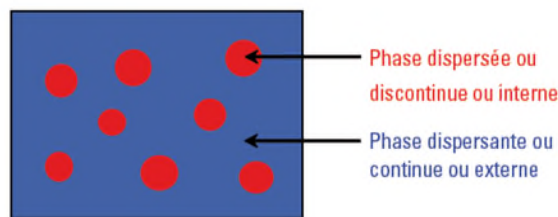


Figure 4 : Dispersions : phase dispersée et phase dispersante (Doumeix, 2004)

Le résultat de la dispersion dépend de l'état physique des deux phases comme le montre le tableau suivant :

Tableau II : Place des mousses au sein des systèmes dispersés (Doumeix, 2004).

Etat physique de la phase dispersée	Etat physique de la phase dispersante	Résultat de la dispersion
Liquide	Liquide	Emulsion
Solide Poudre	Liquide	Suspension
Liquide	Gaz	Aérosol
Solide	Gaz	
Gaz	Liquide	Mousse

Les mousses appartiennent donc au système dispersé où la phase interne est un gaz, tandis que la phase externe est un liquide. Dans notre présent travail nous nous sommes intéressées uniquement à l'étude de la mousse. Il s'agit des Colloïdal Gaz Aphron « CGA_S ».

I.2.2. Colloïdal Gaz Aphron (CGA_S)

Le terme Colloïdal Gaz Aphron a été proposé pour la première fois en 1972 par Sebba pour décrire les microbulles avec un noyau gazeux de 10-100 μm de taille à l'intérieur (Fuda et Jauregi, 2006) et d'une porosité d'environ 0,7 μm (Larmignat *et al.*, 2008). Ce terme provient d'un mot grec "αφρος" ou foam qui signifie la mousse (Dahmoune, 2014). Cette dernière est stabilisée par de multiples surfactants. Les CGA_S portent la même charge que le tensioactif à partir duquel elles sont générées (Sebba,

1979). Elles sont encapsulées par des minces films contenant 65% d'aire en volume (Figure 5-A) (Roy *et al.*, 1994 ; Stuckey, 1998). Elles sont composées de deux parties principales: un noyau gazeux et une coquille aqueuse composée de deux couches d'agent tensio-actif, avec une troisième couche qui stabilise la structure (Figure 5-B) (Arabloo, 2014).

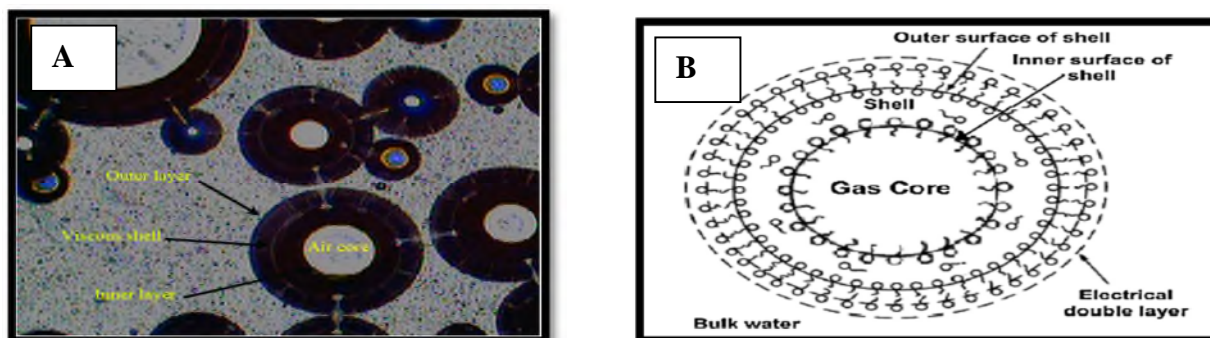


Figure 5 : Composition des CGA_S (A) Photographie sous un microscope électronique (Sadeghialiabadi et Amiri, 2015) (B) Schéma de la structure des CGA_S (Arabloo *et al.*, 2014).

I.3. Production des CGA_S

I.3.1. Conditions générales d'obtention d'une mousse

Pour former une mousse, il faut tout d'abord mélanger un gaz et un liquide ; il faut aussi un troisième composant, car les liquides purs ne moussent pas, étant donné que les bulles formées tendent à s'éclater dès qu'elles arrivent au contact de d'autres bulles ou à la surface libre du liquide. La présence d'une substance susceptible de stabiliser les films durant les premiers instants de la vie de la mousse est indispensable pour permettre aux bulles de s'accumuler pour former la dispersion gaz-liquide. Ces substances sont en général des surfactifs (encore appelés souvent tensioactifs) (Salager et Choplin, 2008).

Selon le type d'agent tensio-actif utilisé pour la génération des CGA_S, la surface externe de la microbulle peut être chargée, négativement, positivement ou neutre. A la surface de cette bulle s'adsorbe des molécules de charge opposée ce qui permet une bonne séparation de liquide. Par conséquent, la sélectivité de l'adsorption peut être contrôlée (Spigno *et al.*, 2015).

I.3.2. Génération des CGA_S

Les CGA_S sont générées par agitation intense d'une solution aqueuse de tensioactif contenue dans un bêcher qui renferme un disque rotatif alimenté par un moteur électrique qui entraîne des vitesses élevées (> 8000 rpm (Figure 6)) (Larmignatet *al.*, 2008 ; Dermiki *et al.*, 2009).

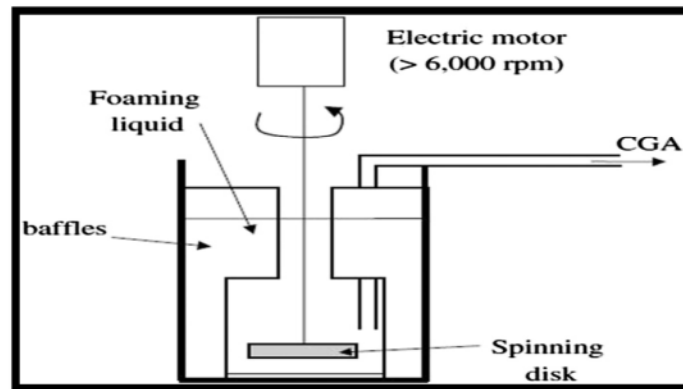


Figure 6: schéma représentatif de la production des CGA_S (Tseng *et al.*, 2006).

Les micro-mousses générées possèdent un aspect visuel très similaire au lait, contrairement aux mousses classiques qui tendent à être transparentes. Sebba a utilisé des solutions de tensio-actifs d'environ 10 mM de différents produits comme le sodium Dodécylbenzène sulfonate (SDBS), Sodium Dodecyl sulfonate (SDS) et les savons d'ammonium quaternaire, l'état d'équilibre est atteint rapidement, juste après 5-10 minutes (Sebba, 1971).

Les CGA_S sont très appropriés comme agents de séparation et de transfert de masse (Hashim *et al.*, 2012). Ils agissent comme des échangeurs d'ions et de récupération de produits (Dermiki *et al.*, 2009).

I.4. Caractérisation des CGA_S

Les CGA_S sont caractérisées le plus souvent en termes de distribution granulométrique et de stabilité.

I.4.1 Taille et distribution

La taille des microbulles a un effet significatif sur leur stabilité. De diverses méthodes ont été utilisées pour déterminer la distribution des différentes grandeurs (taille

et diamètre). Les techniques de diffraction au laser sont utilisées pour mesurer le diamètre des microbulles. Alors que, le microscope photonique et l'analyse d'image sont les plus utilisées pour déterminer la taille des microbulles (Ali Hashim *et al.*, 2012).

La taille et le diamètre dépendent du type et de la concentration de l'agent tensioactif, de la concentration ionique, et de la présence de d'autres molécules ou particules (Arabloo et Shahri, 2014 ; Molaei et Waters, 2015). D'ailleurs, Amiri et Woodburn ont estimé l'épaisseur de la coquille préparée à partir d'un agent tensioactif cationique : cétyl triméthyl ammonium bromure (CTAB) à 750 nm. Par contre, d'après Bredwell et Worden, l'épaisseur de la coque préparée avec un autre tensioactif non ionique (Tween 20) varié entre 200 et 300 nm (Ali Hashim *et al.*, 2012).

I.4.2. Stabilité

La caractéristique la plus importante des CGA_S est leur forte stabilité comparativement aux mousses conventionnelles. Les microbulles se stabilisent au fur et à mesure de leur bas taux de coalescences (Amiri et Sadeghialiabadi, 2014).

Dans la plupart des études, la stabilité des CGA_S a été déterminée en termes de demi-vie, qui augmente d'une façon significative (210s à 300s) en augmentant de la vitesse d'agitation (à partir 5000 rpm à 5500 rpm) (Figure 7) (Molaei et Waters, 2015).

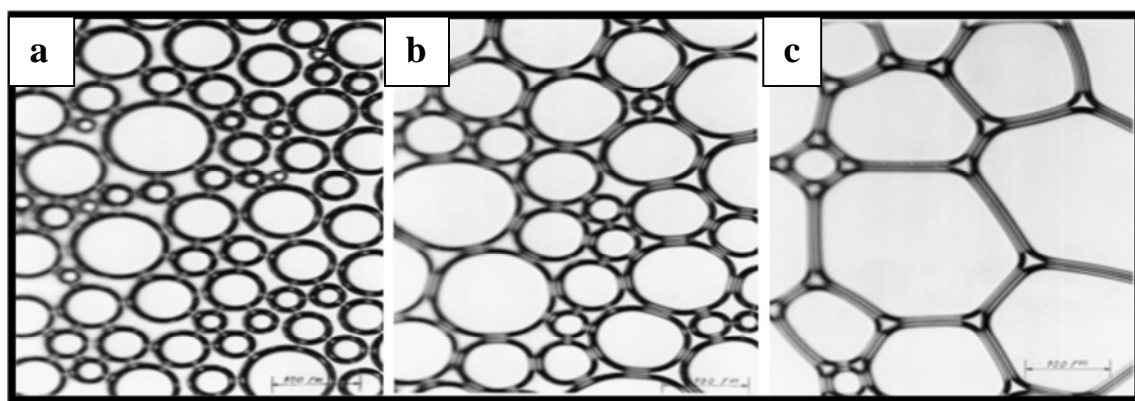


Figure 7 : Illustration morphologique de dispersion de CGA pendant le temps de drainage : (a) 10s, (b) 300s et (c) 600 s (Moshkelani et Amiri, 2008).

La stabilité des CGA_S dépend également de l'épaisseur des microbulles, de la viscosité de l'encapsulation et de la nature de tensioactif utilisé et sa concentration :

- **Épaisseur** : les microbulles ne sont pas stables si l'épaisseur de leurs coquilles est inférieure à 4 μm ou supérieure à 10 μm (Molaei et Waters, 2014).
- **Viscosité de l'encapsulation** : la coque doit avoir une certaine viscosité afin de minimiser le phénomène connu sous le nom "d'effet Marangoni". Ce dernier provoque le transfert de l'eau de la coque vers le liquide, ce qui génère des bulles plus minces et instables (Molaei et Waters, 2015).
- **Nature de tensioactif** : dans le cas des tensioactifs ioniques, la stabilité des dispersions des CGA est provoquée par des interactions électrostatiques. Par contre, quand les CGA_S sont fabriquées à partir des tensioactifs non ioniques, les interactions électrostatiques ne sont pas la principale force stabilisante, donc d'autres forces (forces stériques) contribuent à la stabilité de ces dispersions (Molaei et Waters, 2015).

Néanmoins, le concept de stabilité n'est pas simple à définir en raison de nombre de phénomènes intervenants dans la déstabilisation d'une dispersion. Nous parlons plutôt de processus de déstabilisation, qui induit des répercussions sur la structure et les propriétés du système. Plusieurs processus peuvent être distingués comme le montre la figure suivante (Allouche, 2003) :

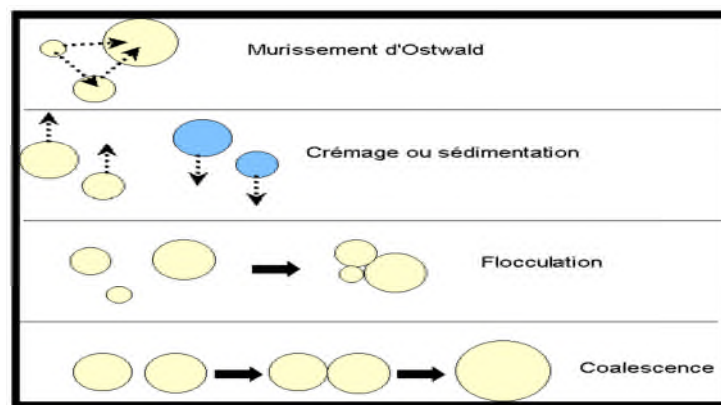


Figure 8 : Processus de déstabilisation d'une mousse (Allouche, 2003).

- Le mûrissement d'Ostwald correspond à la diffusion des petites gouttes de la phase dispersée vers les gouttes les plus grosses.
- Le crémage, ou la sédimentation, est lié à une séparation des deux phases par différence de densité entre elles.

- La floculation correspond à l'agrégation de gouttes sans rupture du film interfacial, provoquée par la présence de forces attractives.

La coalescence est due au rapprochement de gouttes par des forces d'interaction. Ici, le film interfacial se rompt pour donner naissance à une seule goutte (Allouche, 2003).

I.5. Comparaison entre la micro mousse conventionnelle et les bulles des CGA_S

Il est intéressant de noter que les CGA_S diffèrent totalement du reste des microbulles classiques principalement par leurs morphologies.

Les CGA_S sont des microbulles sphériques dispersées dans une phase continue (l'eau), alors que les microbulles conventionnelles ont une forme hexagonale et interconnectée les une aux autres comme le montre la figure 9 (Dahmoune, 2014).

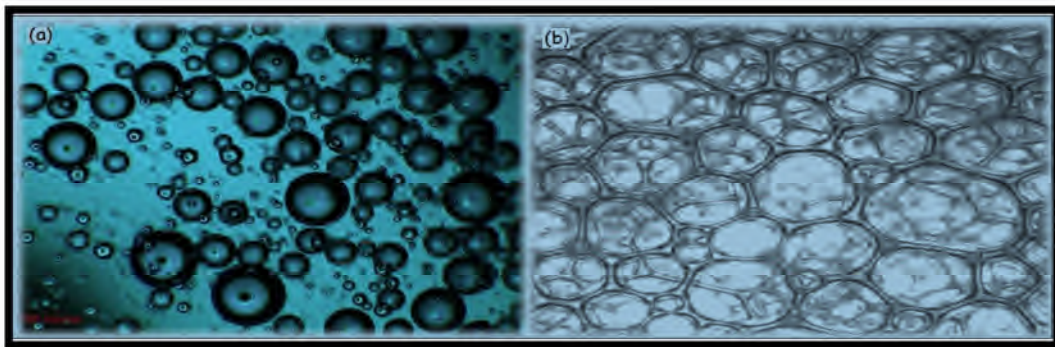


Figure 9: Comparaison structurale entre la CGA (a) et les bulles conventionnelles (b) (Dahmoune, 2014).

I.6. Applications des CGA_S

Il y a un intérêt croissant et récent de l'application de tensioactifs dans les procédés de séparation. Cela s'explique par le fait qu'ils ne nécessitent pas généralement de grandes sources d'énergie, peuvent être recyclés et sont capables de traiter de matériaux facilement dégradables (Spigno *et al.*, 2010).

Colloïdales Gaz Aphrons ont trouvé de nombreuses applications grâce à leurs caractéristiques uniques, telles que la grande surface interfaciale pour adsorber ou se charger et d'excellentes propriétés d'écoulement par rapport à celles de la mousse et ainsi un bon blocage conventionnel des mécanismes qui permet un bon contact avec le

solvant/soluté, en font une alternative potentielle pour de nombreuses applications (**Memon et al., 2010**).

Les CGAs ont été utilisés dans de nombreux procédés de séparation tels que de protéine et d'enzymes (**Spigno et al., 2014**), de bioproduits telle que la séparation des bactéries (**Sebba, 1987**), des cellules et de levure (**Save et Pangarkar, 1994**), des caroténoïdes (**Dermiki et al., 2008**), et de polyphénols extraits des plantes (**Spigno et al., 2010**). Elles sont également utilisées dans la récupération des déchets toxiques provenant du sol (la décontamination des sols) (**Roy et al., 1995**), l'élimination des eaux usées (**Grimes, 2002 et Ciriello et al., 1982**), de colorants et de gouttelettes d'huile dispersées dans l'eau (**Spigno et , Jauregi , 2005**), la fermentation dans un bioréacteur (**Weber et Agblevor, 2005**) et la synthèse d'un matériau (**Riviello et al., 2006**).

II.1. Réactifs chimiques et appareillage :

II.1.1. Réactifs chimiques

L'ensemble des réactifs utilisés lors des expériences sont de grade analytique et ils sont rassemblés dans le tableau III:

Tableau III: produits chimiques utilisée.

Les réactifs chimiques	Marque
Tween 20	Panreac
Acide caféique	Sigma-Aldrich
Acide chlorogénique	Sigma-Aldrich
Acide gallique	Sigma-Aldrich
Methanol99%	Prolabo
Ethanol96%	Pralabo
Folin-Ciocalteu (2 N)	Prolabo
Carbonates de sodium	Sigma-aldrich
AlCl ₃	Prolabo
Molybdate d'ammonium	Biochem chemopherma
DPPH	Sigma-aldrich
Phosphate de sodium	Biochem chemopherma
NaH ₂ PO ₄ ,	Fluka, Chemika

II.1.2. Présentation de l'appareillage utilisé

L'équipement utilisé au cours de cette investigation est un dispositif semi-préparatif monté au laboratoire 3BS, il est composé essentiellement d'une ampoule à décanter de 250 ml et d'un générateur d'une mousse qui s'appelle CGA_S, se fait par l'intermédiaire d'un disque rotatif qui fonctionne à des vitesses réglables de 1000-16000 rpm par un moteur électrique. Ce générateur est composé d'une tige en métal alimentaire (inoxydable) qui sert à mélanger ou mixer la solution en question. La production des microbulles des CGA_S a

été faite grâce à une tige tournante émergée dans un bêcher d'environ 1,5 L à une vitesse de 8 000 rpm. Ce compartiment, a été également relié à une pompe qui aspire la mousse générée vers un deuxième compartiment qui est composé d'une ampoule à décomptée fixé sur un statif comme la montre la Figure 10 et dénommée (Green-fractionnement assisté par des colloïdes à gaz aphron CGA_S).

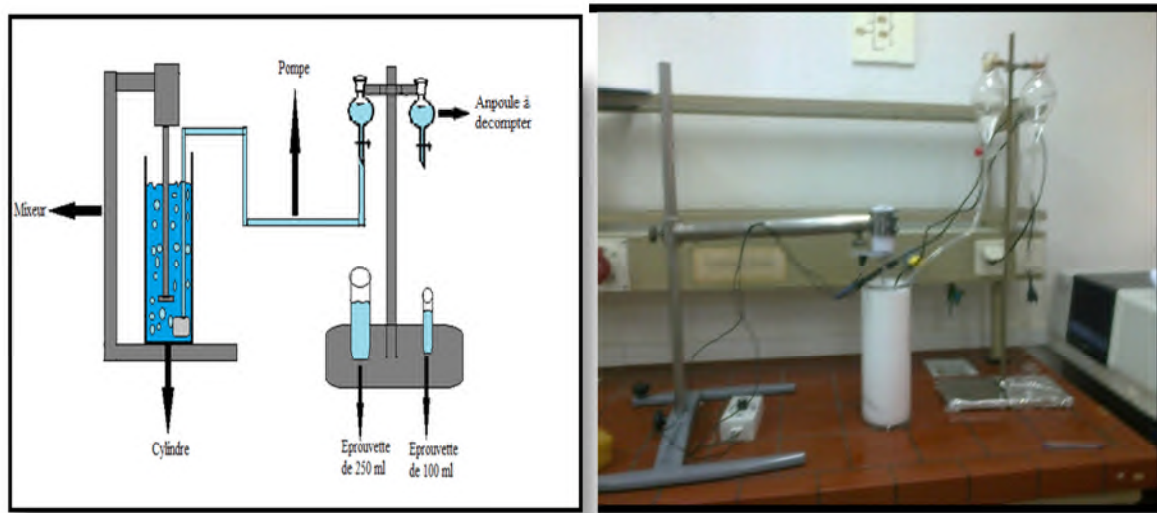


Figure 10 : Photographie du dispositif des CGAs (Photos éditer par les auteurs).

II.2. Préparation de la solution standard et du matériel végétal

Au cours de ce travail, nous avons d'abord travaillé avec une solution standard qui est préparée avec trois acides phénoliques à savoir l'acide gallique, cinnamique et caféïque, ensuite nous avons extrait les composés phénoliques à partir des feuilles de la menthe, puis après, nous avons procédé à l'application de la technique décrite précédemment (CGA_S) pour

- La récupération des différents standards dans la phase aphron ;
- Séparation des composés phénoliques de non-phénoliques.
- ✓ **La solution standard** : des solutions aqueuses d'acide chlorogénique, caféïque et gallique ont été préparées à une concentration de 1mg/ml. A partir de ces solutions, différentes ratios ont été préparées (1/4, 1/8, 1/16, 1/32 v/v).
- ✓ **Matrice réelle (la menthe verte)** : Avant toute manipulation, les plantes récoltées (Figure 11) ont subi un nettoyage avec de l'eau afin d'éliminer la poussière et les impuretés. La matière végétale peut contenir un degré variable d'humidité et exige souvent un prétraitement avant l'extraction. En outre, autant que les plantes sont employées sous la forme sèche par les guérisseurs traditionnels et en raison des

différences dans les teneurs en eau dans les différents tissus végétaux, les plantes sont habituellement séchées à l'air libre jusqu'à stabilisation du poids avant l'extraction (Das et al., 2010). A cet effet, la menthe a été séchée à l'air libre, à l'abri de la lumière et sous l'ombre pendant environ une vingtaine de jours.



Figure 11: photographie des feuilles de la menthe verte.

Les feuilles de l'espèce précédemment séchées sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique de laboratoire de marque IKA basic 11A jusqu'à l'obtention des poudres fines. Ces dernières ont été tamisées à l'aide d'un tamis dont le diamètre des pores est inférieur à 250 μ m. Les poudres obtenues sont conservées dans des flacons en verre fermés et stockés à l'abri de la lumière et de l'humidité.

II.3.Extraction par microonde

La technique d'extraction solide /liquide la plus utilisée pour l'extraction notamment des polyphénols est généralement le procédé d'extraction conventionnel « macération agitation ». Cette technique consomme non seulement une grande quantité de solvants, mais aussi le temps d'extraction (Shon et al., 2003).

Le procédé d'extraction assisté par microondes a apporté une solution de choix. Grâce à un chauffage sélectif, sans inertie, les microondes combinées à des solvants d'extraction ont permis de remédier aux problèmes des temps d'extraction souvent trop longs. L'extraction assistée par micro-onde (ESAM) consiste à traiter par micro-onde un solide sec ou humide, en contact avec un solvant partiellement ou totalement transparent. Les micro-ondes permettent d'accélérer la cinétique d'extraction, d'améliorer le rendement

de la récupération et de réduire le ratio solvant /matrice (Michel *et al.*, 2003, Shon *et al.*, 2003).

Une masse d'échantillon a subi une extraction par épuisement, un volume de 28mL d'éthanol 50% (v/v) est additionné à 1g d'échantillon de menthe, dans un ballon à fond plat. L'ensemble est placé dans l'enceinte à micro-onde à une puissance de 400W pendant 123sec (Figure03).Après refroidissement, le mélange a été filtré à l'aide d'une pompe sous vide en utilisant un filtre(verre fritté) de diamètre 2 μ m. Les poudres retenues par le filtre ont été réutilisées pour l'extraction par épuisement une deuxième fois dans un volume de 20mL et une troisième fois dans 10 mL d'éthanol 50% (v/v). L'extrait obtenu a été conservé dans un réfrigérateur a 4°C pour des analyses ultérieures (Dahmoune *et al.*, 2013).



Figure 12: Dispositif utilisé pour l'extraction (micro-onde domestique ; Samsung MW813ST).

II.4. Génération et caractérisation des CGA_S

Dans un bécher de 1,5 L, nous avons introduit 800 mL d'eau distillée. Ils sont additionnés de d'une solution de tween 20 à 10 mM, le mélange a été mixé à une vitesse d'environ 8000 t/min par l'intermédiaire d'un mixeur pendant 5 minutes. Afin de mesurer la stabilité de la solution des CGA_S , deux volumes de 100 et 250 mL sont pompés dans des éprouvettes graduées. Le gaz hold-up (ϵ) et la concentration de tensioactif dans les CGA_S ont été ensuite calculés à partir de la mesure du volume drainé (chaque 10 ml), le volume des CGA_S et la molarité de l'agent tensioactif de la solution initiale utilisée pour générer les CGA_S sont donnés dans l'équation (1) et (2), respectivement :

$$\epsilon = \frac{V_{CGA} - V_{liquide\ drainé}}{V_{CGA}} \dots \dots \dots (1)$$

$$\text{Concentration desurfactant} = \frac{V_{\text{liquidedrainé}} * \text{MOLARITE de liquide}}{V_{\text{CGA}}} \dots \dots \dots (2)$$

Où :

\mathcal{E} : le gaz hold up.

V_{CGA} : volume de la CGA pompe.

$V_{\text{liquie drainé}}$: volume du liquide drainé.

Où la molarité est la concentration molaire de la solution de surfactant utilisé pour générer les CGAs.

Les CGAs ont été également générées avec l'extrait afin de voir l'influence des forces d'interaction entre les micelles de surfactant et les composants de l'extrait.

II.5.Séparation des CGAs

Les essais ont été réalisés en utilisant des ampoules à décompter. Premièrement, on verse la solution d'extrait dans l'ampoule à décompter à une concentration fixée, ensuite les bulles des CGAs générées sont aspirées à un débit connu pour remplir l'ampoule à décompter (correspond à un temps de mélange).

Après le remplissage de l'ampoule à décompter 250 ml, le mélange (extrait-CGA) a été laissé en contact pendant un temps de 5 minutes (temps de contact). Les deux phases ont été ensuite récupérées et leurs volumes respectifs ont été mesurés.

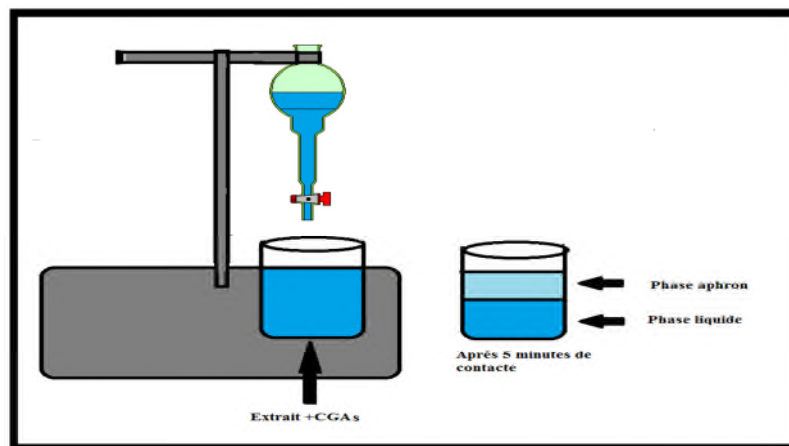


Figure 13 : schéma représentatif de mécanisme de séparation des CGAs.

Afin de caractériser les phases aphones et liquides, les mêmes tests réalisés pour l'extrait ont été appliqués sur les deux phases.

En se basant sur le volume de la phase aphron récupérée (V_{AP}) et sa concentration (C_{AP}) et le volume de la phase liquide (V_{LP}) et sa concentration (C_{LP}), l'efficacité de recouvrement (rendement) a été calculée pour chaque composé analysé comme suite :

$$RE = \frac{CPA * VPA}{(CPA * VPA) + (CPL * VPL)} * 100$$

Où :

RE : le rendement.

C_{PA} : concentration de la phase aphron.

C_{PL} : concentration de la phase liquide.

V_{PA} : volume de la phase aphron.

V_{PL} : volume de la phase liquide.

Le facteur de séparation (FS) a été calculé afin d'avoir une idée sur l'affinité des composés la phase aphron comparativement à leur affinité à la phase liquide :

$$FS = \frac{C \text{ phase aphron}}{C \text{ phase liquide}}$$

Où :

FS : facteur de séparation.

C_{phase aphron} : concentration de la phase aphron.

C_{phase liquide} : concentration de la phase liquide.

II.6. Dosage des polyphénols totaux

II.6.1. Principe

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Folin –Ciocalteu. Le mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) est réduit en oxydes métalliques (W_8O_{23} / Mo_8O_{23}), de couleur bleue dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des polyphénols, présents dans l'échantillon qui présente un maximum d'absorption entre 725 et 760 nm (**Ribéreau-Gayou et al., 1982**).

II.6.2. Mode opératoire

Le protocole élaboré par Singleton et al. (1982) a été utilisé pour le dosage des polyphénols totaux. Le réactif de Folin-Ciocalteu (2,5 mL) est additionné à extrait ou au

standard (500 μL). Une solution de monocarbonate de sodium à 7,5 est ensuite ajoutée au mélange. Après 15 minutes d'incubation au bain marie à 50°C, l'absorbance est mesurée à 760 nm contre un blanc (**annexe III.1**).

II.7. Indice des polyphénols :

II.7.1. Principe

L'indice des polyphénols est une deuxième méthode plus directe pour évaluer les teneurs en composés phénoliques (**Dahmoune et al., 2013**)

II.7.2. Mode opératoire

Réalisation d'une dilution de 1/50 ;

Faire une lecture directe au spectrophotomètre de tous les extraits ;

lecture à 280 nm ;

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage Eq AG/g MS à 280 nm (**annexe III.2**) (**Dahmoune et al., 2013**).

II.8. Dosage des flavonoïdes totaux

II.8.1. Principe

Les flavonoïdes totaux ont été mesurés par un dosage colorimétrique basé sur la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (**Khennouf et al., 2010**). Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner un complexe avec le groupement (CO) de chlorure d'aluminium (Figure 13). Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux du fer et aluminium (**Ribèreau-Gayou et al., 1982**). L'intensité de la couleur jaune des complexes formés par les flavonoïdes traités avec l' AlCl_3 a été mesurée par spectrophotométrie (**Sava et Sîrbu, 2010**).

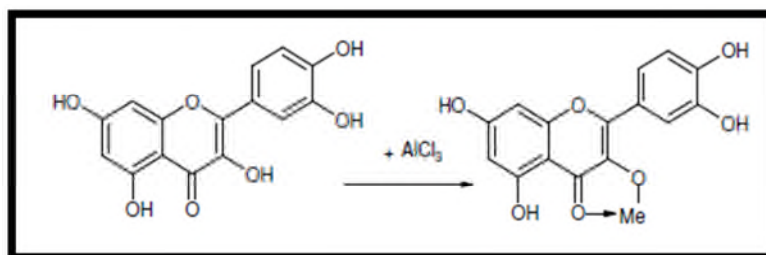


Figure 14 : Chélation des métaux par les flavonoïdes (Sava et Sîrbu, 2010).

II.8.2. Mode opératoire

Les flavonoïdes totaux ont été mesurés par un dosage colorimétrique basé sur la méthode décrite par (Bhorun *et al.*, 1996). 1 ml de chlorure d'aluminium (ALCl₃ 2%) est ajouté à 1ml d'extrait. Après 10 minutes d'incubation à l'obscurité, l'absorbance du mélange, de couleur jaune, est déterminée à 430nm. Chaque analyse est répétée trois fois.

La courbe d'étalonnage (annexe III.3) a été réalisée en utilisant la rutine comme standard.

Les concentrations en flavonoïdes sont exprimées en milligrammes équivalent Rutine par 1g de poudre

II.9. Dosage des chlorophylles a, b, et des caroténoïdes

II.9.1. Principe

Le dosage de la chlorophylle et des caroténoïdes a été déterminé par la méthode décrite par (Lichtenthaler ,1982). Elle est basée sur la mesure des différentes absorbances pour chacune des chlorophylles a, b et des caroténoïdes.

II.9.2. Mode opératoire

Lecture des absorbances à 664 nm et 648 nm concernant les chlorophylles a et b respectivement. Pour les caroténoïdes la lecture de l'absorbance a été faite à 470 nm (Lichtenthaler, 1982).

Les concentrations des chlorophylles (a, b) et des caroténoïdes dans l'échantillon ont été calculées à l'aide des formules suivantes :

$$\text{Chlorophylle a: } C_a (\mu\text{g/ml}) = 13.36A_{664} - 5.19A_{648}$$

$$\text{Chlorophylle b: } C_b (\mu\text{g/ml}) = 27.43A_{648} - 8.12A_{664}$$

$$\text{Caroténoïdes: } C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 2.13C_a - 97.64C_b) / 209.$$

II.11. Evaluation de l'activité antioxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante d'extrait de menthe, deux méthodes ont été employées : l'activité antiradicalaire au DPPH et la capacité antioxydante totale au phosphomolybdate d'ammonium.

II.11.1. Pouvoir antiradicalaire au DPPH

II.11.1.1 Principe :

L'activité antioxydante peut être exprimée en termes de capacité à réduire les radicaux libres, lors de la réaction avec un radical spécifique tel que le DPPH. La capacité à piéger ce radical stable est une méthode largement utilisée pour évaluer la capacité antiradicalaire en un temps relativement court par rapport à d'autres méthodes (Rufino et al., 2009).

Pour évaluer l'activité scavenger des extraits, ces derniers sont mis à réagir avec un radical stable, le 2,2-Diphényl-picrylhydrazyl (DPPH[•]) préparé dans une solution de méthanol. Dans sa forme radicalaire, le DPPH possède un maximum d'absorbance à 517 nm.

Le schéma réactionnel du principe du pouvoir antiradicalaire au DPPH est représenté dans la figure suivante :

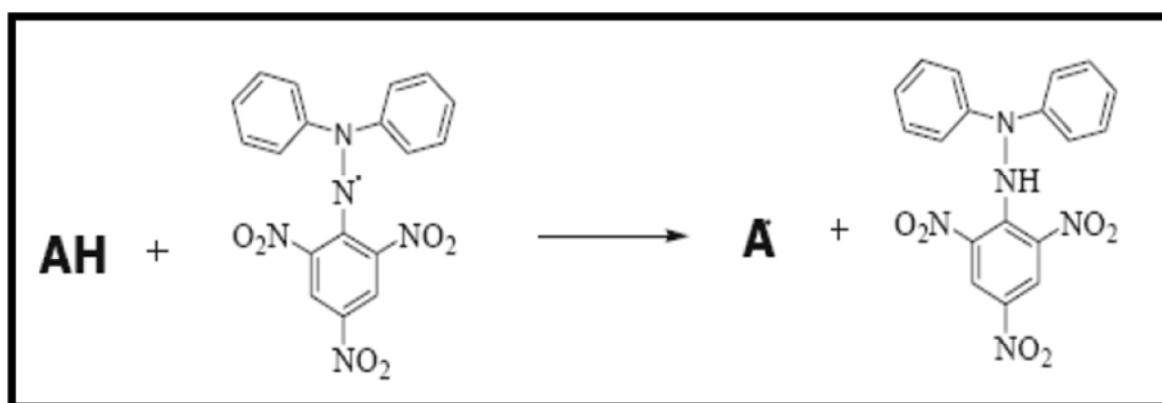


Figure 15 : Schéma réactionnel du test au DPPH (Batoul et al., 2010).

L'évaluation de l'activité antiradicalaire de l'extrait de menthe a été estimée selon la méthode décrite par (Bersuder *et al.*, 1998).

II.11.1.2. Mode opératoire

Un volume de 0,15 mL de la solution de DPPH (10^{-3} M) est ajouté à 2 mL d'extrait. Le mélange est ensuite soumis à une agitation au vortex, puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante (Bersuder *et al.*, 1998). La lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à 517 nm. Le pourcentage de réduction du radical DPPH est donné par l'expression suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{control}}} * 100$$

Avec :

A_{control} : Absorbance du controle ;

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance de l'échantillon

II.11.2. Test au phosphomolybdate d'ammonium

II.11.2.1. Principe

La capacité antioxydante totale des extraits de plantes étudiées a été déterminée par le test de phosphomolybdate d'ammonium. Cette méthode est basée sur la réduction de Mo^{+6} en Mo^{+5} par les composés antioxydants. Ensuite, il y a la formation d'un complexe vert de phosphate- Mo^{+5} à pH acide qui a une absorbance maximale à 695 nm. Une absorbance élevée indique que l'échantillon possède une activité antioxydante élevée (Negi *et al.*, 2003).

L'activité antioxydante totale des extraits de plante a été déterminée suivant le protocole décrit par (Brahmi *et al.*, 2012).

II.11.2.2.1. Mode opératoire

L'activité antioxydante des échantillons est évaluée par la méthode utilisant le phosphomolybdate telle qu'elle est décrite par (Negi *et al.*, 2003). Un volume de 200 μL d'extrait est mélangé avec 2 mL de la solution contenant les réactifs suivants : acide sulfurique à 0,6 mM, phosphate de sodium à 28 mM et molybdate d'ammonium à 4 mM.

Les tubes à essais ont été incubés dans un bain Marie à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement des échantillons à température ambiante, l'absorbance de mélange est mesurée à 695 nm contre un blanc.

En vue de ce qui a été réalisé dans le domaine de fractionnement par techniques conventionnelles, et plus particulièrement dans le domaine des substances bioactives, il est nécessaire de fournir un procédé de purification efficace, simple, rapide et économique. Une partie du travail relatée dans cette section consiste à la conception et la mise au point d'une nouvelle méthode de fractionnement des composés phénoliques. Un nouveau dispositif de laboratoire, nommé «Purification et fractionnement assistée par les colloïdes à gaz aphron (CGA_S) », a été développé.

III. Description du montage réalisé pour générer les CGA_S

L'équipement utilisé au cours de cette étude est un dispositif semi-préparatif monté au laboratoire équipé de deux compartiments dont le premier sert à générer la solution des CGA_S par un mixeur à vitesse contrôlée et le deuxième compartiment qui est mené d'une ampoule à décanter de 250 ml maintenue sur un support. Les deux compartiments sont reliés par un tuyau d'un centimètre de diamètre raccordé à une pompe à eau du côté CGA_S et d'ampoule de l'autre côté.

A partir des données bibliographiques et du contexte actuel, notre travail s'est orienté vers l'amélioration et la vulgarisation de cette technique de purification verte sur d'autres matrices végétales.

III.1. Stabilité et gaz hold-up

La mousse des CGA_S a été produite à partir d'un surfactant non ionique de grade alimentaire (Tween 20) à une concentration fixe de 10 mM. Cette concentration a été employée on se basant sur sa concentration micellaire critique (CMC). La figure 16 illustre l'évolution de la stabilité des CGA_S en fonction du temps.

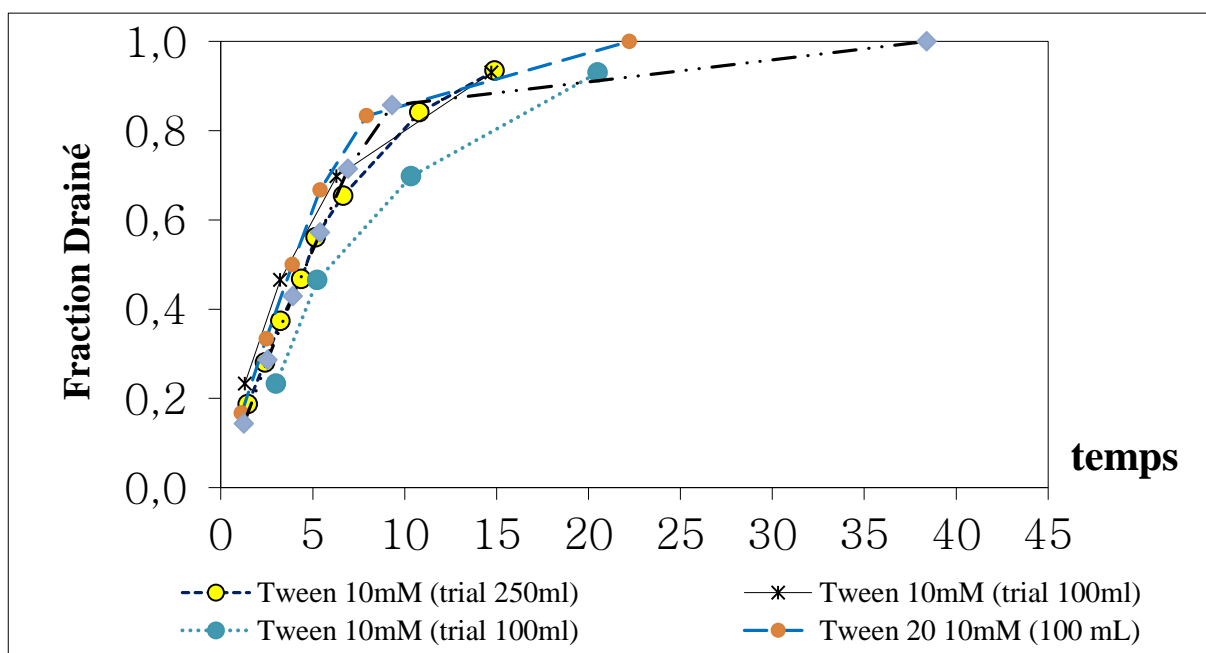


Figure 16: Courbe d'évaluation de gaz hold-up généré à partir tween 20 (10 mM).

D'après les résultats de cette figure ci-dessus, on constate que la stabilité des CGA_S générées dans cette présente étude est légèrement inférieure (279,4 s) à celle obtenue (493s) par (Dahmoune et al., 2014). Cette variation en terme de stabilité a été validée par la conformité du gaz hold-up = 70% obtenu à celui constaté par les mêmes auteurs 63%. Cette fluctuation, est due probablement au dispositif élaboré et aux conditions opératoires, qui s'explique peut-être par une mauvaise agitation qui a conduit à une génération des bulles moins stable et une diminution légèrement du gaz à l'intérieur des bulles formées, ou bien au tween utilisé durant (Spigno et al., 2009).

III.2. Standards

Dans cette étude plusieurs paramètres ont été fixés (la concentration, le pH et la température) afin d'étudier l'effet du ratio CGA_S/Standard sur le rendement de la phase aphon en terme de standards utilisés. On se basant sur les conditions opératoires recommandées par (Dahmoune et al., 2014 ; Spigno et al., 2015).

Les résultats de comportement des standards étudiés sont détaillés ci-dessous :

➤ Pour l'acide gallique

L'acide gallique est classé parmi les acides phénoliques caractérisé par la présence d'au moins d'un noyau benzénique avec des fonctions carboxylique, (Figure 17).

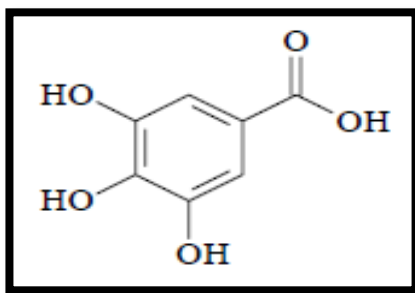


Figure 17 : Structure chimique de l'acide gallique (Krief, 2003).

La Figure18 montre l'évolution du rendement de l'AG dans la phase aphasique et liquide en fonction de différents ratios 4, 8, 16 et 32, l'axe secondaire illustre le facteur de séparation entre les deux phases en terme de la concentration de l'AG :

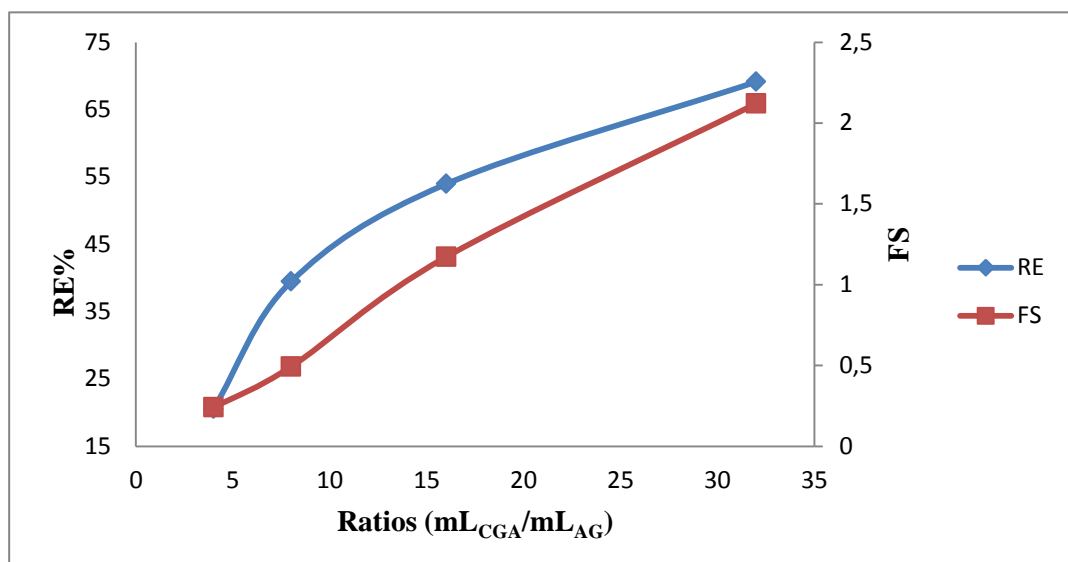


Figure 18: Courbe d'évolution des résultats de séparation (FS) et de rendement (RE) des différents ratios avec CGA_S générées à partir de tween 20.

D'après la figure 18, on remarque que le rendement ainsi que le facteur de séparation de l'AG sont en fonction de l'augmentation du rapport mL_{CGA}/mL_{AG} qui sont de 0,9939 et 0,9914 pour la phase aphasique et liquide respectivement. A la lumière de ces résultats, on constate que le rendement optimal est de 69 % avec un facteur de séparation de 2.1 qui revient au ratio 32 et cette valeur est légèrement inférieure de celle obtenue par (Spigno et al, 2014) avec un rendement (RE) de 77% et d'un facteur de séparation (FS) de 4.1.

➤ Pour l'acide chlorogénique

Les acides chlorogéniques sont identifiés essentiellement chez les artichauts, Café, pomme de terre et particulièrement dans la menthe. Ils sont caractérisés par des propriétés antioxydantes et anti-radicalaires, comme ils jouent un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Yezza et Bouchama., 2014).

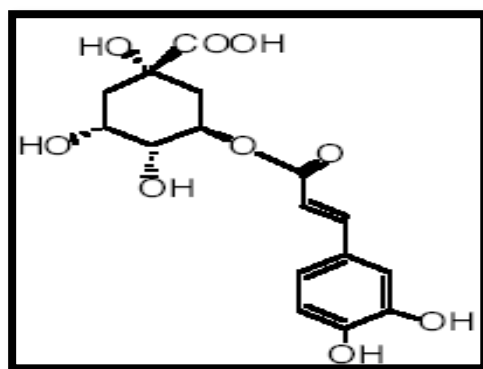


Figure 19 : Structure chimique de l'acide chlorogénique (Benaissa, 2011).

La figure 20, représente le rendement et facteurs de séparation de l'AC récupéré dans la phase aphasron.

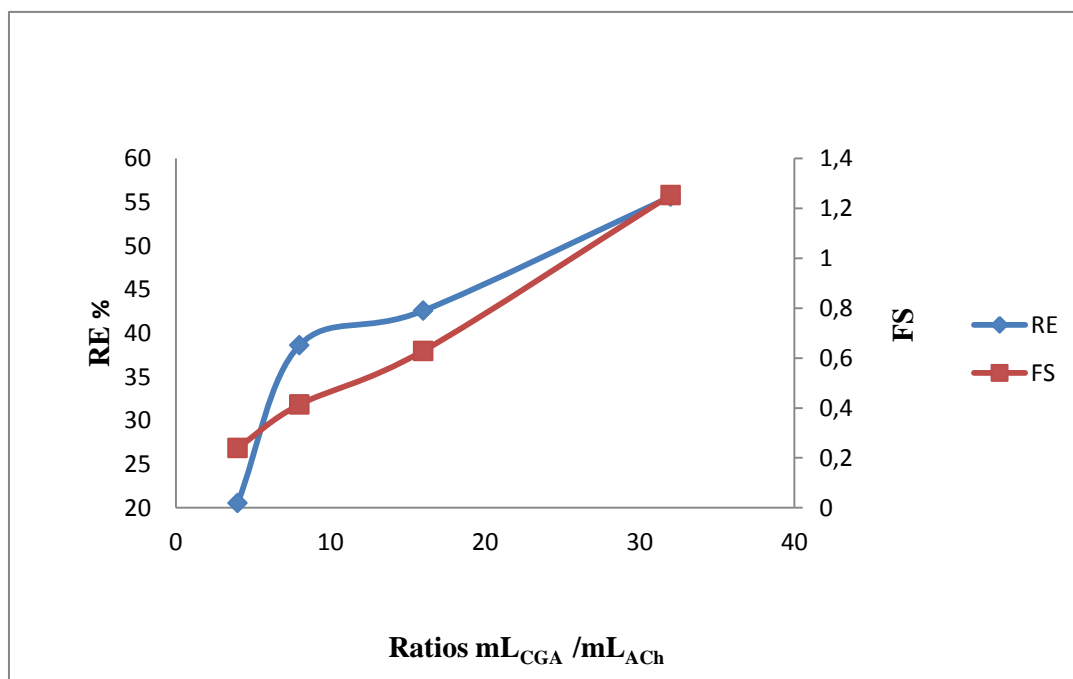


Figure 20 : Rendements et facteurs de séparation de l'AC en présence des CGAS_S générées à partir de tween 20 en fonction de différents ratios.

D'après les résultats obtenus dans la figure 20 qui représente le rapport entre la phase aphon et liquide, il apparaît clairement que l'efficacité, le rendement ainsi que le facteur de séparation ont la même allure avec des coefficients de corrélation de 0.9954 et 0.8357 pour la phase aphon et liquide respectivement. Cette évolution est en relation proportionnelle avec le rapport CGA/ACh, jusqu'à l'atteinte de l'optimum qui convient toujours au ratio 32 avec un rendement de 55% et un facteur de séparation de 1.25.

➤ L'acide caféique

L'acide caféique est un composé naturellement présent dans toutes les plantes, et particulièrement dans la menthe, il intervient dans la synthèse de la lignine (molécule formant les parois des cellules végétales). Il présente des propriétés antioxydantes, antitumorales, antivirales, antiradicalaires et anti-inflammatoires (Cunha *et al.*, 2004).

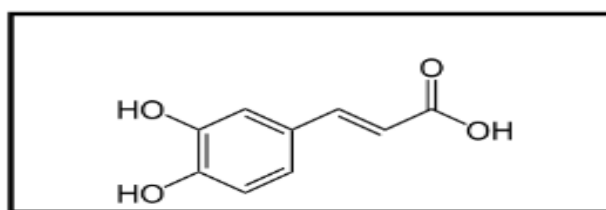


Figure 21: Structure chimique de l'acide caféique (Nkhili, 2009).

La mise en séparation de l'ACaf avec CGA_S générées avec tween 20 10 mM est illustrée dans la figure 22.

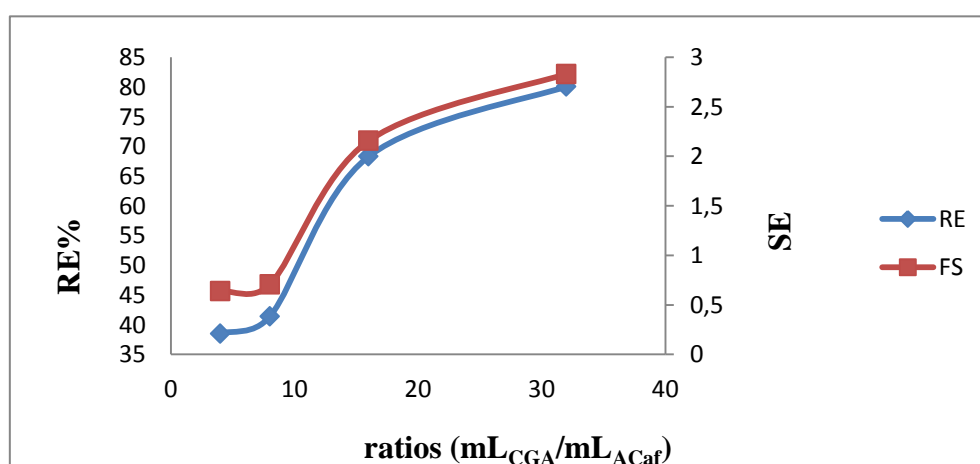


Figure 22: Courbe d'évolution des résultats de séparation et de rendement de l'acide caféique avec des différents ratios testés.

La figure 22 montre qu'il y ait une augmentation significative de rendement et du facteur de séparation qui sont en relation proportionnelle avec les ratios mL_{CGA}/mL_{ACaf} , jusqu'à l'atteinte de l'optimum qui convient toujours au ratio 32 avec un rendement de 80% et un facteur de séparation 2,8. Ces résultats sont en harmonie avec les résultats obtenus par (Spigno et al., 2014 ; Dahmoune et al., 2014) avec un rendement optimum de 72% et un facteur de séparation de 3.8.

Les résultats des rendements optimaux de récupération des standards sont résumés dans le tableau IV.

Tableau IV: les résultats des rendements optimaux des standards utilisés.

Standards	RE _{PL} %	RE _{PA} %
Acide. gallique	31	69
Acide chlorogénique	45	55
Acide caféique	20	80

Avec :

RE_{PL} : rendement de la phase liquide.

RE_{PA} : rendement de la phase aphas.

On peut conclure d'après les résultats obtenus que les 3 acides testés ont une affinité proportionnelle aux ratios mL_{CGA} .

On remarque aussi que l'acide caféique présente un rendement et le facteur de séparation élevés qui sont de 80% et 2.83 respectivement, puis l'acide gallique avec un rendement 69,11% et un facteur de séparation 2.11, et en dernier l'acide chlorogénique avec un rendement 55.62% et un facteur de séparation 1.25. Cette différence de variation entre la séparation de ces acides testés est due probablement à leurs structures. Dans tous les cas de figure il est conseillé d'essayer de maîtriser les facteurs de procédé afin de cerner le mécanisme de répartition de ces composés entre la phase aphas et liquide.

III.3. Application des CGA_s sur une matrice réelle

III.3.1. Caractérisation de la matrice (la menthe)

La menthe verte est une plante à grande consommation, sa partie aérienne florissante est traditionnellement utilisée pour ses effets antiseptiques pour son activité antioxydante ainsi que sa richesse en composés phénoliques (Merabti et Cheddani., 2009).

Le tableau suivant V illustre la caractérisation phytochimique de la menthe :

Tableau V:Résultats des dosages des différents composés de la menthe.

	Les Poly- phénols mg Eq AG /g MS	Indice de poly- phénol mg Eq AG/g MS	Les flavonoï- des mg Eq retine/g MS	Chlorophylles		Activité antioxydante	
				a mg/ml	b mg/ml	DPPH	Radical Phospho- molybdate
ABS	0,2945	0,934	0,106	0.268	0.335	0.217 (49%)	0.440
[C]	49,08	0,81	13.13	0.001841	0.00229	–	–

D'après les résultats du tableau V on constate que la teneur en polyphénols totaux retrouvée dans *M.spicata* est de 49.08 ± 0.00919 mgAG/gMS. Ces résultats sont en conformité (P<0.05) avec ceux trouvés par Kanatt et al. (2005) ($47,57 \pm 3.74$ mg /g MS).

On remarque aussi qu'elle contient une concentration de $13,13 \pm 0.0353$ mg de retine/gMS de flavonoïdes. Ces résultats sont en concordance avec ceux rapportés par Kanatt et al, (2005).

Pour ce qui concerne la teneur en chlorophylle, on a trouvé que la teneur de la menthe en chlorophylle a est de $1.82 \pm 0,00353$ µg/ml et celle de la chlorophylle b est de 2.29 ± 0.00353 µg/ml, les résultats de dosage apportés par (Hardou .,2014) sont de 1.78 ± 0.05 pour la chlorophylle a qui est légèrement semblable aux résultats de cette

présente étude, pour la chlorophylle b et de 2.03 ± 0.005 , elle est inférieure à celle trouvée dans notre matrice.

Pour mieux évalué l'activité antioxydante de la menthe nous avons effectué deux testes :teste auradicale DPPH° et au phosphomonybdate.

Pour ce qui concerne le pouvoir de piégeage du radical DPPH° est de valeur de 49% qui est largement supérieur à 29% trouvé par **brahmi et al. (2012)**. Et un pouvoir réducteur de posphomolybdate qui est de 0.440 ± 0.028 , il est important en le comparant avec celui trouve par **brahmi et al. (2012)** qui est de 0.18 ± 0.01 .

Ces résultats corrèlent avec les teneurs en polyphénols totaux, et cela peut être attribué à un effet qualitatif de l'extrait.

III.3.2. Essais de séparation en utilisant un extrait de concentration 1mg/mL

Après la préparation d'une dilution pour avoir une concentration de 1mg/mL de l'extrait de la menthe, la solution préparée a été mise en contact avec la solution des CGA_S générée dans les mêmes conditions que les standards. Les résultats obtenus sont présentés ci-après :

➤ Cas des polyphénols

Les résultats des essais de séparation réalisés avec CGA_S (générées avec Tween 20 a10 mM ou) et l'extrait de la menthe sont montrés dans la Figure 23.

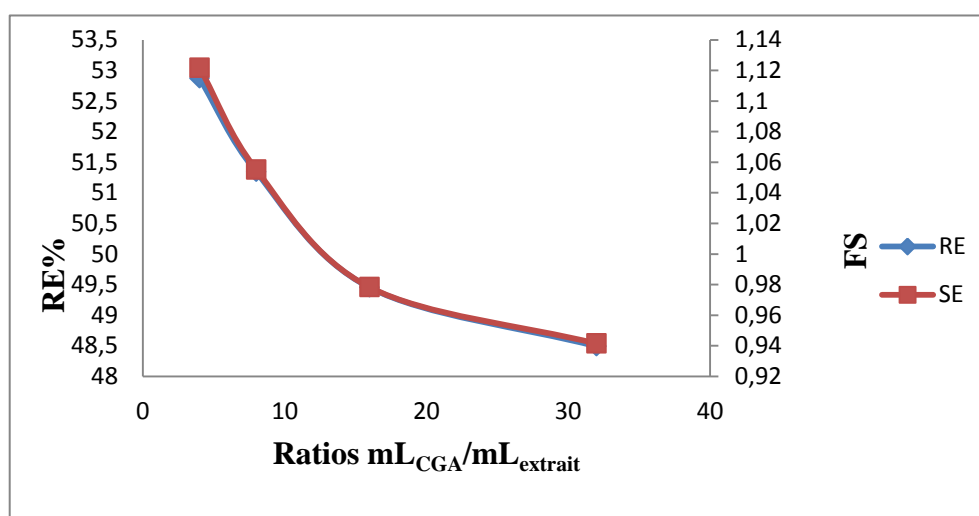


Figure 23: Courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des polyphénols avec des différents ratios testés.

D'après les résultats obtenus dans la Figure 23, on constate une diminution progressive de rendements de polyphénols avec l'augmentation du rapport $mL_{CGA}/mL_{Extrait}$ (1/4, 1/8, 1/16, 1/32). Evidemment, cette diminution est accompagnée avec la diminution des facteurs de séparation et cela jusqu'à 48% pour le rendement et 0,94 pour le facteur de séparation pour le ratio 32. Cette diminution peut être expliquée par une faible interaction entre les CGA et les composés phénoliques, ce qui a conduit à une faible affinité à la phase aphon. Ces résultats confirment que la séparation de ces composés est conduite non seulement par des interactions hydrophobes mais aussi avec les interaction électrostatiques (Dahmoune et al., 2014). La diminution du rendement dans la phase aphon pourrait être due à un effet de l'oxydation pendant le procédé de séparation (Dahmoune, 2014).

➤ Cas de l'indice des polyphénols

D'après les résultats de la figure 24 on observe une diminution progressive des rendements en fonction de facteur de séparation jusqu'à l'obtention d'un minimum de 48% pour le rendement et 0,74 pour le facteur de séparation.

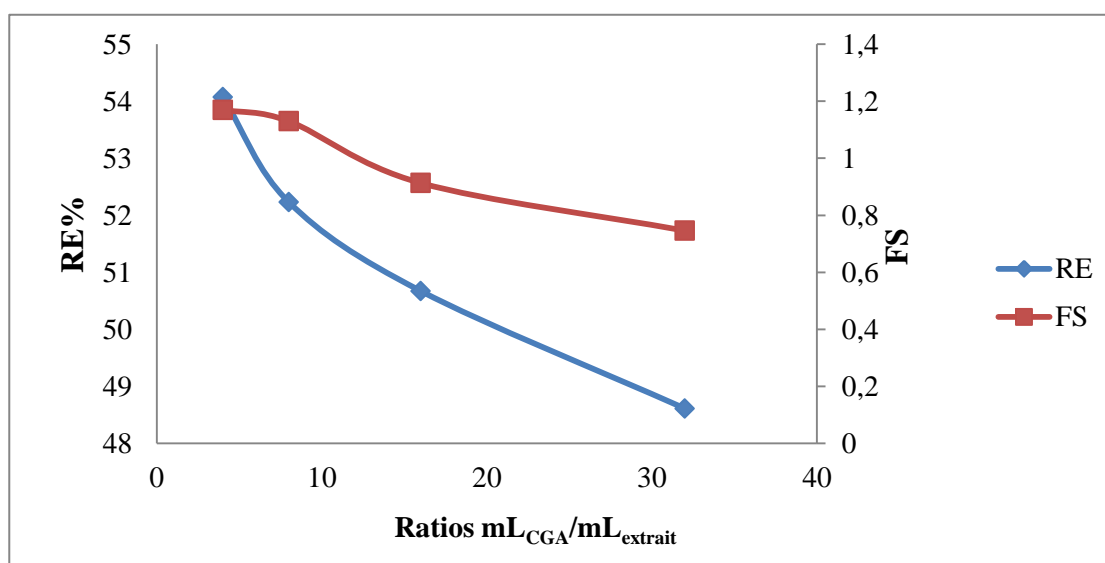


Figure 24: courbe des résultats de la séparation et de rendement d'indice polyphénol effectué avec des différents ratios testés.

Cette diminution confirme des résultats obtenus sur les polyphénols en utilisant la méthode indirecte au Folin-Ciocalteu (Dahmoune, 2014).

➤ Cas des flavonoïdes

Une augmentation importante a été aussi obtenue lors de l'analyse de rendement et le facteur de séparation des flavonoïdes en fonction des différents ratios. La tendance a été renversée par rapport aux polyphénols totaux (en comparant les figures 22 et 24). Le rendement des flavonoïdes est de 53% avec un facteur de séparation de 1,17 au ratio 32 contre un rendement des polyphénols de 48% et le facteur de séparation de 0,94. Cette diminution due probablement à l'affinité de ces composés à la phase aprotique ce qui a conduit à une augmentation de facteur de séparation et rendement au ratio 32.

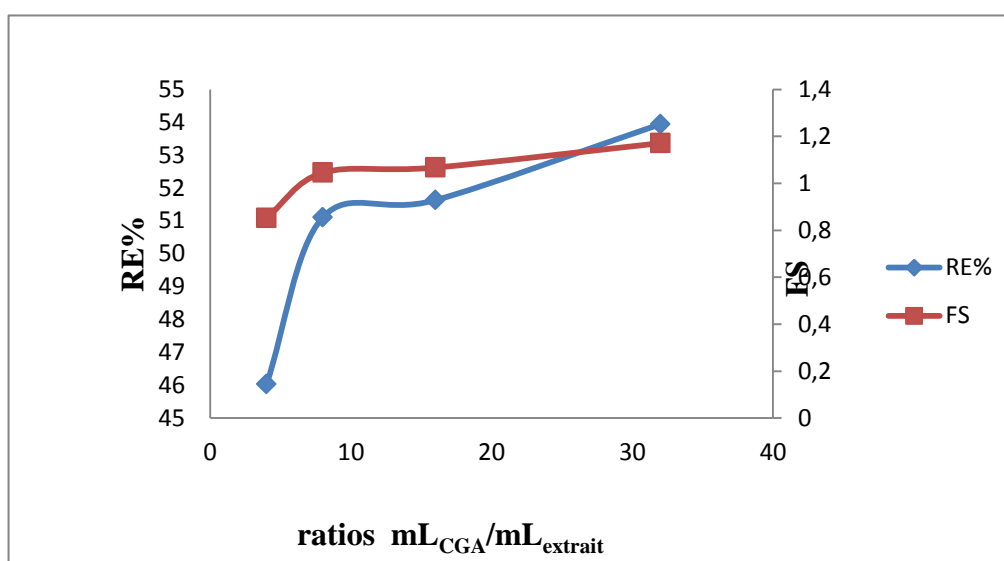


Figure 25: courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des flavonoïdes avec des différents ratios.

➤ La chlorophylle a et b

Les résultats sont illustrés dans les figures 26 et 27.

➤ Chlorophylle « a »

La figure 26 illustre les résultats de séparation des substances non-phénoliques, on note d'après cette figure que le changement de rendement ainsi que les facteurs de séparation sont influencés d'une manière croissante par l'augmentation du rapport $\text{mL}_{\text{CGA}}/\text{mL}_{\text{Extrait}}$. Ce qui peut être due aux fortes interactions entre les microbulles des CGAs avec la chlorophylle a. Nous tenons aussi à signaler que la chlorophylle a est répartie d'une manière positive avec la phase liquide (forte affinité avec la phase liquide au

ratio élevé 32. Ces résultats nécessitent d'autres investigations afin d'optimiser l'élimination complète de la chlorophylle dans la phase liquide.

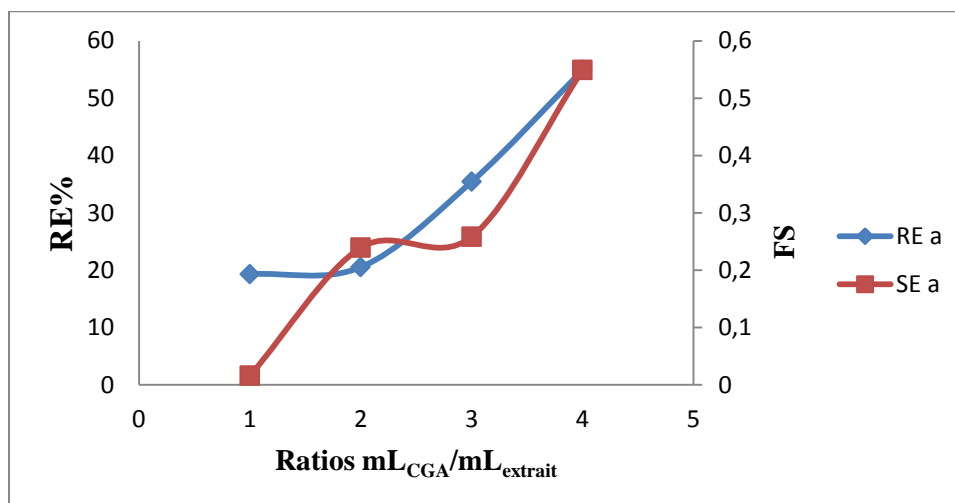


Figure 26 : courbe d'évaluation des résultats de séparation et de rendement de la « chlorophylle a » avec des différents ratios.

➤ Chlorophylle « b »

Une croissance importante a été aussi démontrée lors de l'analyse de rendement ainsi que le facteur de séparation de la chlorophylle « b » avec les CGA. On remarque que le rendement est de 83% et le facteur de séparation est de 3.62 au ratio 32, cependant, le rendement en terme de la chlorophylle a et b est inversement proportionnel aux rendements des PPT (ratio 4) dans la phase aphon ce qui est recherché dans ce travail.

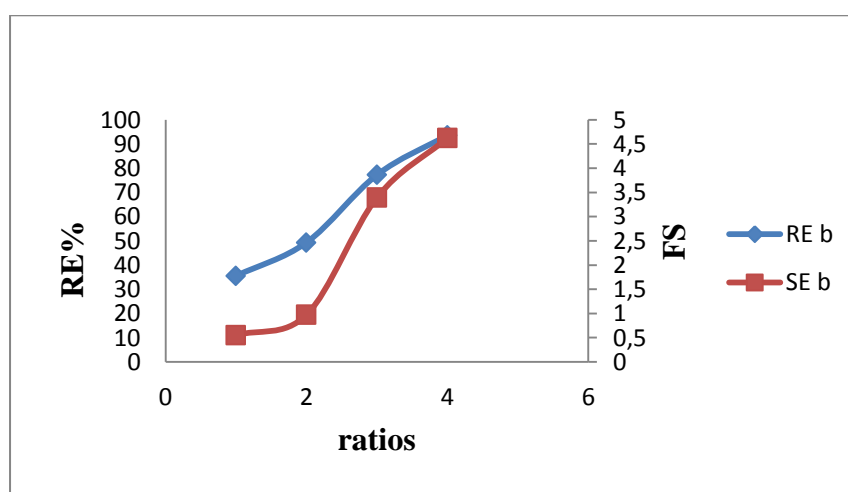


Figure 27: courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle « b » effectués ratios.

➤ **Activité antioxydante**

✓ **l'activité antiradicalaire au DPPH•**

D'après le graph ci-dessous, on constate un pourcentage d'inhibition du radical DPPH• important pour le ratio 4 (phase aphon) inversement a la phase liquide au même ratio. Néanmoins, la tendance a été renversée avec l'augmentation du rapport mL_{CGA}/mL_{Extrait} au ratio 16. L'activité antioxydante confirme les résultats obtenus avec les tests aux PPT et IP.

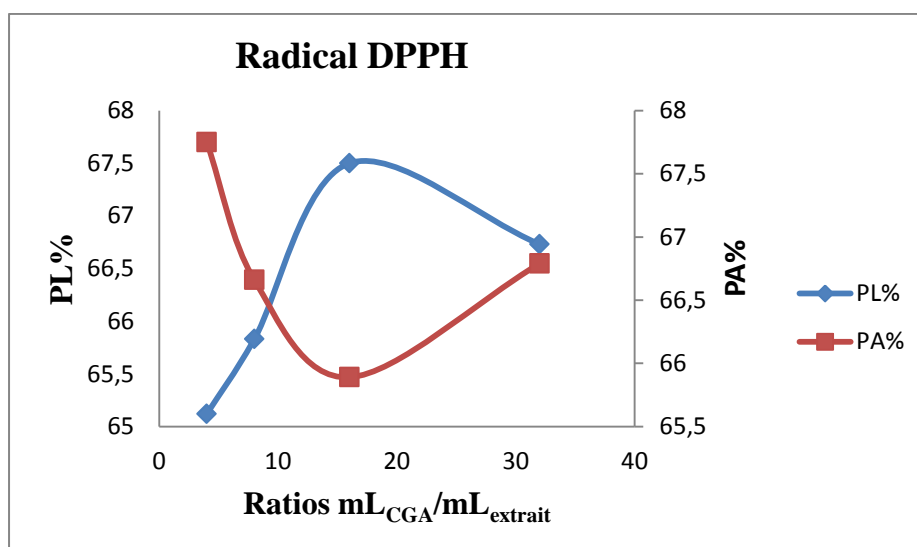


Figure 28 : courbe d'évolution de l'activité anti-radicalaire en fonction des différents ratios.

✓ **phosphomolybdate d'ammonium**

D'après la figure 14, on observe que la variation de l'activité antioxydante est très faible pour tous les ratios (4, 8, 16 et 32).

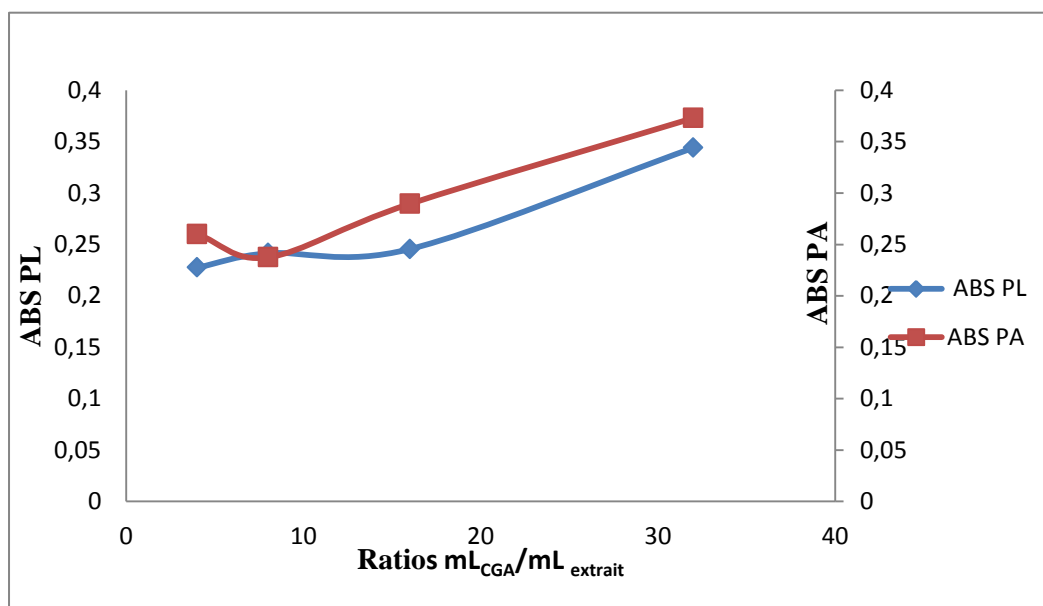


Figure 29 : courbe d'évolution de l'activité au phosphomolybdate en fonction des différents ratios.

III.3.3. Essais de séparation avec l'extrait concentré

Au fil des résultats obtenus précédemment, nous avons essayé d'appliquer ce procédé de séparation sur l'extrait non-dilué (fixation de ratio 32), sachant que l'extrait obtenu avec EtOH 50% a été concentré afin d'éliminer toute trace de l'éthanol, les résultats sont les suivants :

➤ Dosage des polyphénols

D'après les résultats qu'on a obtenu dans la figure 30, on remarque que le rendement ainsi que le facteur de séparation ont la même tendance de diminution à chaque fois qu'on augmente le temps de contact jusqu'à l'atteinte du minimum de 47% qui revient au rendement et avec un facteur de séparation de 0,98. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus avec l'extrait non-dilué.

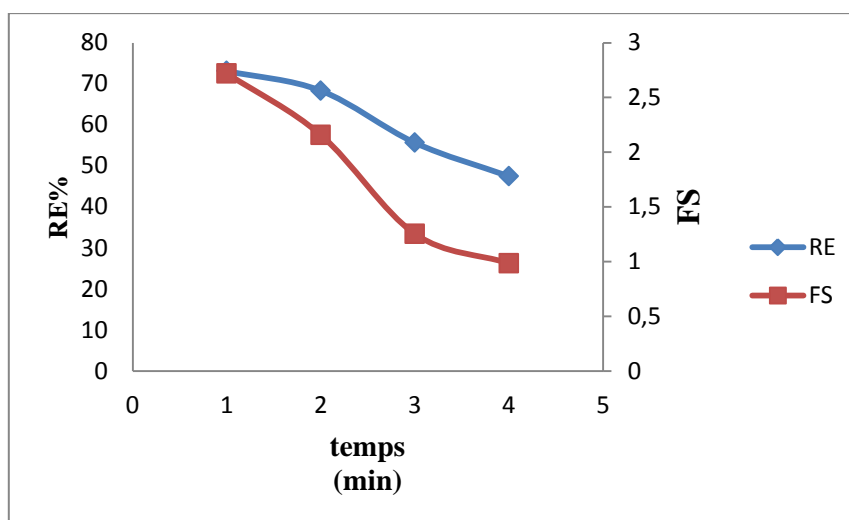


Figure 30: courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des polyphénols à des temps différents.

Cela est possiblement dû à une faible interaction entre les CGAs et les composés phénoliques, ce qui a conduit à une faible affinité à la phase aphasron. En outre, on peut expliquer cette diminution par l'oxydation des polyphénols pendant le procédé de séparation aux forts ratios (**Dahmoune., 2014**).

➤ Indice de polyphénol

Selon la figure 31, on remarque une diminution progressive de rendement et de facteur de séparation, ce qui confirme les résultats obtenus avec Folin-Ciocalteu.

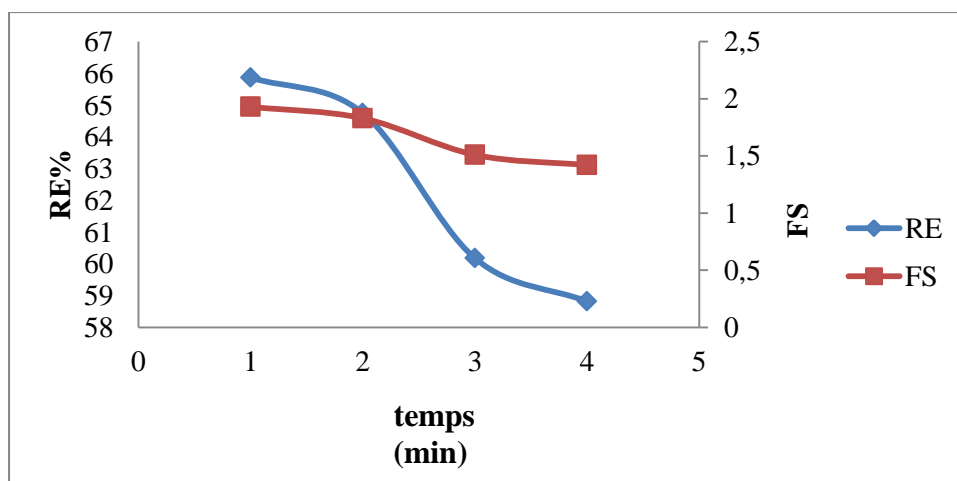


Figure 31 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement d'indice de polyphénol en fonction du temps.

➤ dosage des flavonoïdes

D'après la Figure 32 on constate une augmentation de rendement ainsi que le facteur de séparation jusqu'à l'atteinte d'un temps de 3 minutes, ensuite une légère stabilité de cette cinétique qui est due probablement à la saturation de ces microbulles causé par le phénomène de compétition due à la concentration dans notre échantillons ou à la déstabilisation des micelles des CGA_S pendant le temps de contact.

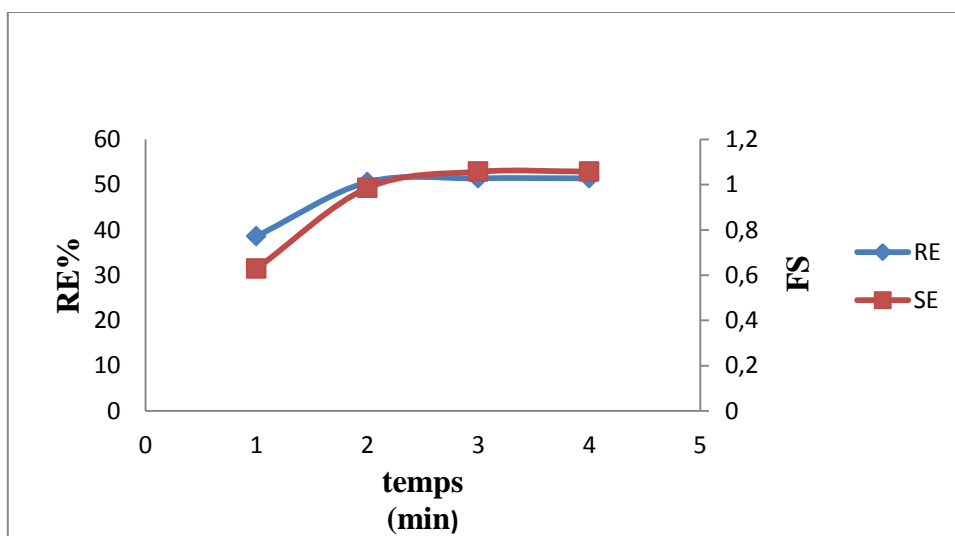


Figure 32: courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des flavonoïdes à des temps différents.

➤ Dosage de la chlorophylle a et b

✓ dosage de la chlorophylle a

Selon la figure ci-dessous on observe une élévation significative de rendement et de facteur de séparation, cela peut être expliqué par une bonne extraction de la chlorophylle par les micelles des CGA_S.

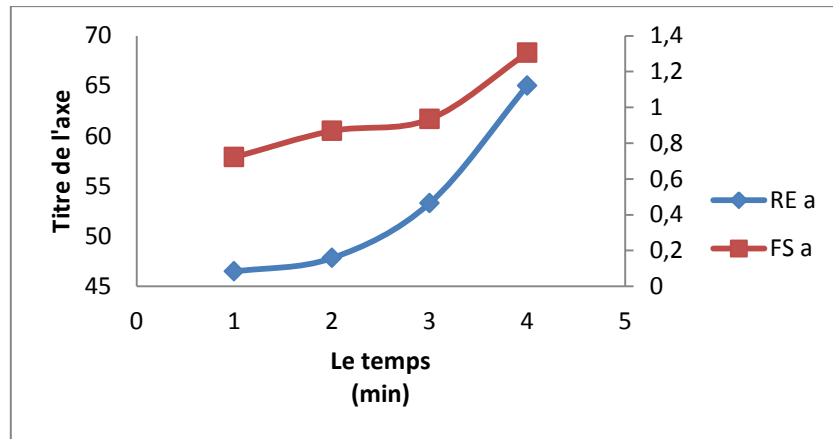


Figure 33 : courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle « a » effectuées à des temps différents.

➤ dosage de la chlorophylle b

D'après la Figure 34 on remarque une croissance impotente de rendement et de facteur de séparation à chaque fois qu'on augmente le temps de contact, cela peut être expliqué par la présence d'une affinité importante entre la chlorophylle « b » et les CGA_s en fonction du temps.

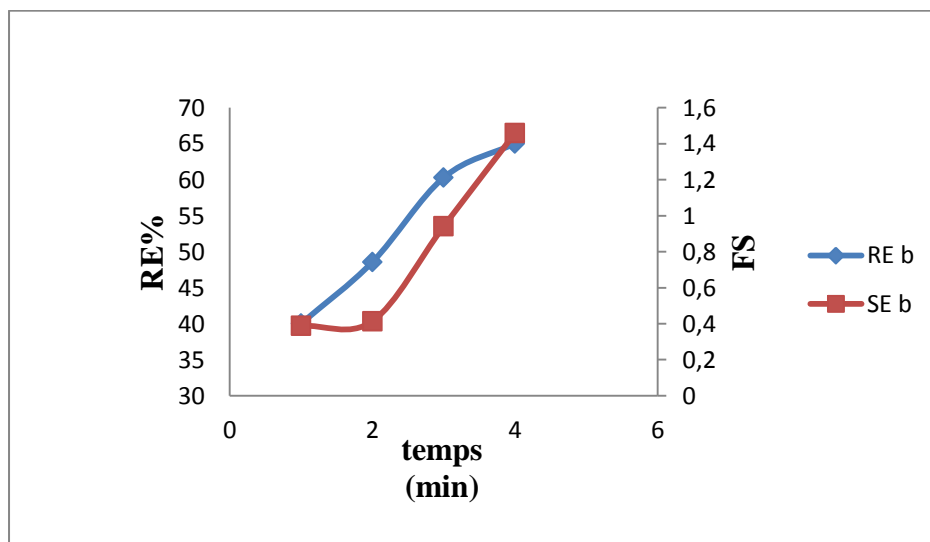


Figure34: Courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle « b » à des temps différents.

➤ **Activité antioxydante**

✓ **l'activité antiradicalaire au DPPH**

D'après les résultats obtenus dans la figure 35, on constate une augmentation significative de l'activité anti radicalaire de l'extrait concentré récupéré par la phase aphron et en parallèle avec la diminution de cette dernière dans la phase liquide puis stabilisation au temps de contact qui correspond à 3min, ce qui est probablement due à la stabilisation des microbulles et leur saturation pendant ce temps.

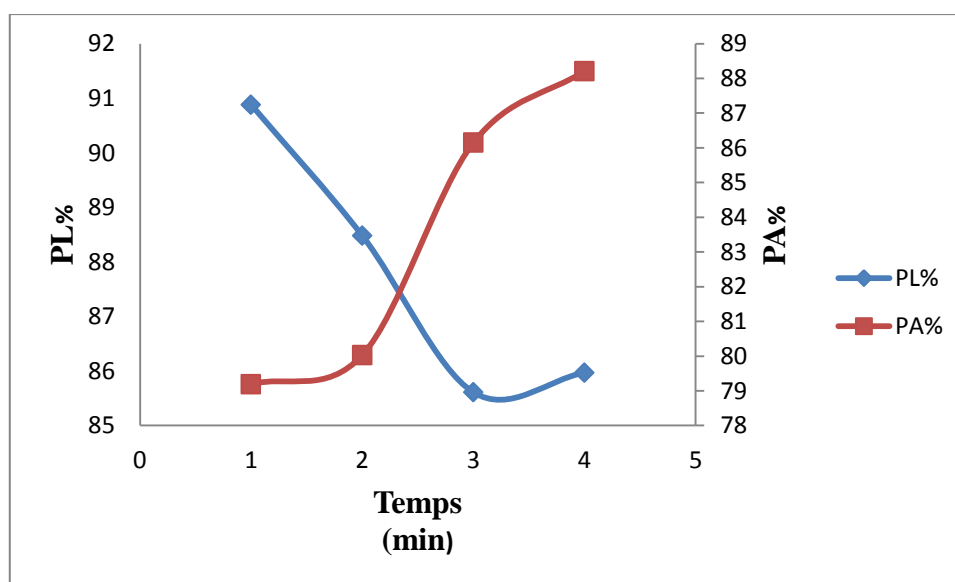


Figure 35: Courbe d'évolution de l'activité anti-radicalaire en fonction de temps pour la phase liquide et aphron.

✓ **phosphomolybdate d'ammonium**

La Figure 36 montre une diminution des absorbances dans la phase liquide suivit d'une croissance des absorbances de la phase aphron jusqu'à l'optimum pendant 4 minutes.

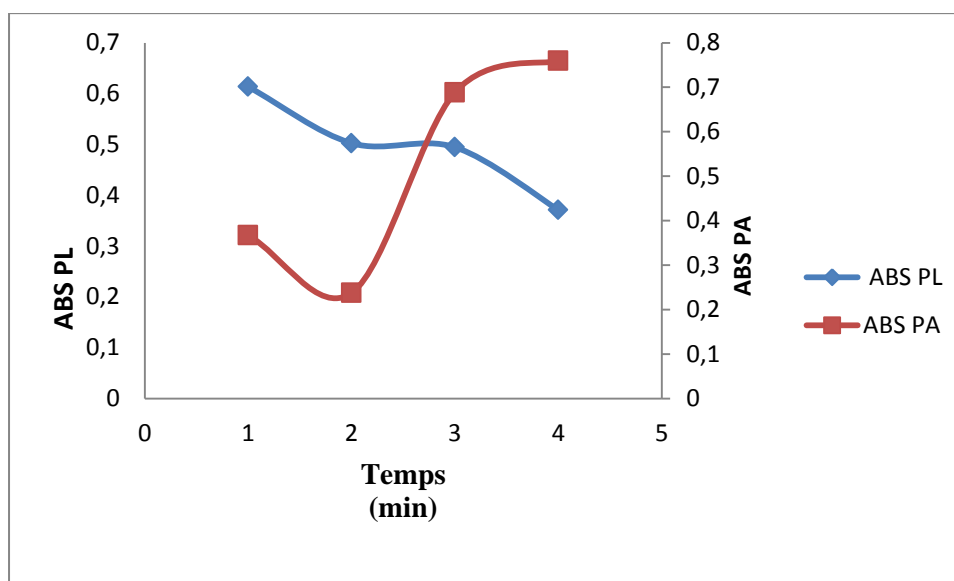


Figure 36 : Courbe d'évolution des absorbances en fonction du temps (min).

III.3.4. Génération des CGA_s en présence de l'extrait

Après avoir testé le comportement des CGAs avec l'extrait dilué et concentré, on a procédé à générer ces colloïdes à gaz aphon avec tween 20 10 Mm en présence de l'extrait. L'objectif de cette partie est d'essayer d'étudier le mécanisme d'interaction et pour confirmer hypothèse précédente. Les expériences de séparation ont été réalisées à différents temps allant de 1 jusqu'à 4 minutes avec l'extrait brut. Les résultats sont rapportés ci-après.

➤ Les polyphénols totaux

Le rendement (RE) de séparation obtenu en termes de composés phénoliques totaux est très similaire à celui obtenue avec l'extrait de l'extrait dilué (1 mg/mL).

On constate d'après la figure 37, la diminution du rendement ainsi que le facteur de séparation à chaque fois que le temps de contacte augmente jusqu'à l'atteinte d'un minimum de 50% pour le rendement et facteur de séparation de 1.02, cela en concordance avec les résultats de (Spigno et al., 2014). Cette diminution peut être expliquée soit par une faible interaction CGA_s polyphénols (Dahmoune , 2014) ou à la durée du débit de pompage, qui ont conduit à la réduction de l'affinité à la phase aphon (spigno et al.,2009).

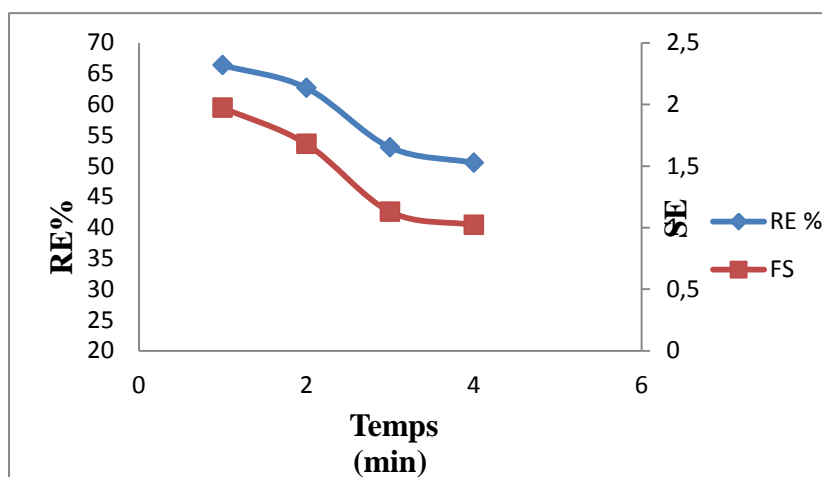


Figure 37: Courbe d'évolution des résultats de séparation des polyphénols en fonction du temps (min).

➤ **Indice de polyphénols**

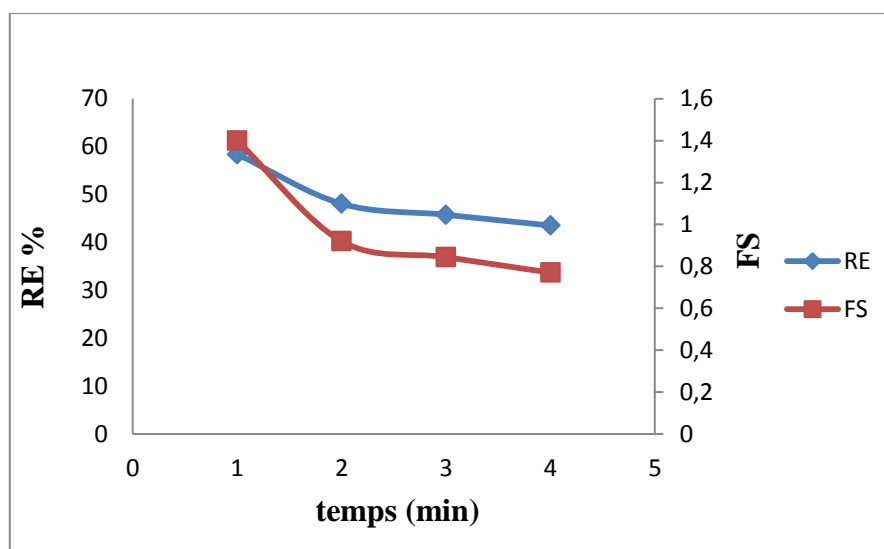


Figure 38: Variation de l'indice de polyphénols en fonction de temps (min).

On remarque d'après les résultats de la figure 38, une diminution des rendements ainsi le facteur de séparation jusqu'au minimum 43% qui correspond à un facteur de séparation de 0,77, la même tendance observée pour les polyphénols totaux obtenus par la méthode de F-C. ce qui confirme les résultats précédemment cités.

➤ les flavonoïdes

D'après les résultats montrés dans la figure 39 on constate une augmentation croissante lors de l'élévation de temps de contact ce qui confirme qu'à chaque fois on laisse ces composés interagissent plus, on obtiendra un rendement meilleur à son tour un facteur de séparation important.

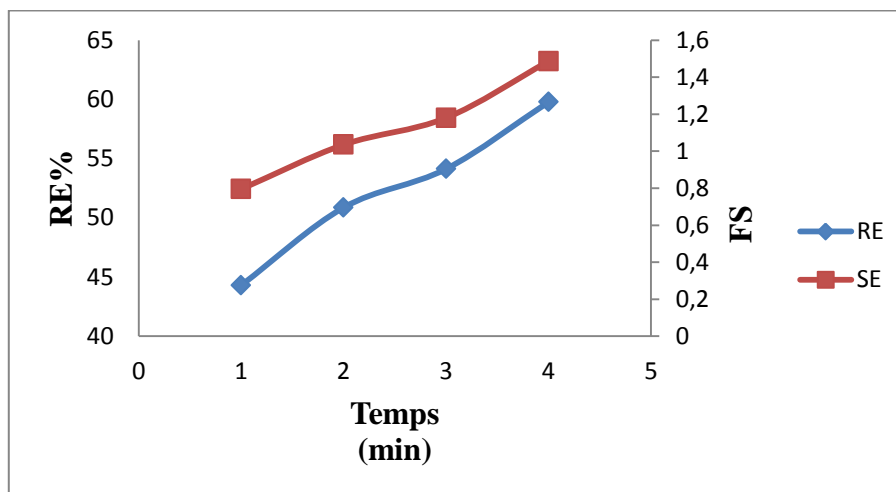


Figure 39: Courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement des flavonoïdes effectuée à partir de CGAs générées par le tween 20 en fonction de temps (min).

➤ Chlorophylle « a »

D'après les résultats obtenus dans la figure 40 montre qu'il y a une augmentation significative de rendement et facteur de séparation avec l'augmentation de temps de contact, z

Jusqu'à l'atteinte de l'optimum qui convient toujours au temps maximum (4 minutes).

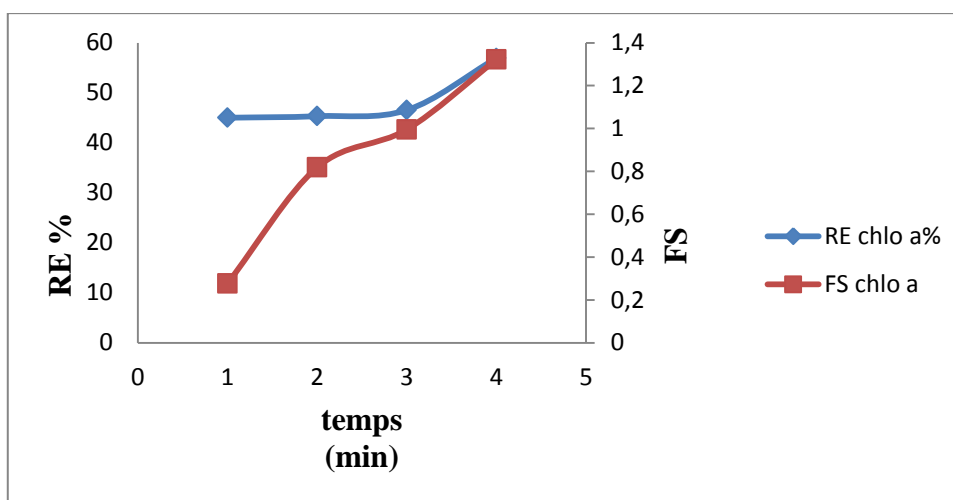


Figure 40 : Courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle « a » effectué par CGA_S générées par tween 20 en fonction du temps (min).

➤ Chlorophylle « b »

Une augmentation importante a été aussi obtenue lors de l'analyse de rendement et le facteur de séparation de la chlorophylle « b » en fonction du temps. Cela peut être due à une augmentation d'affinité de ces composés à la phase liquide en fonction du temps de contact. Cela aussi pourrait être dû à la stabilité de la mousse avec les extraits plus concentrés.

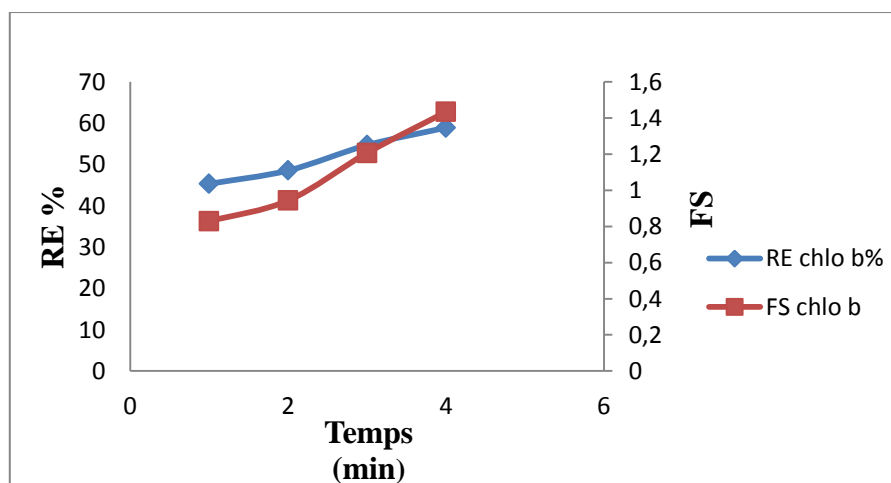


Figure 41: Courbe d'évolution des résultats de la séparation et de rendement de la chlorophylle « b » à des temps différents (min).

➤ **l'activité antiradicalaire de la phase aphron au radical DPPH**

Regardant l'activité antioxydante, on remarque d'après ces résultats une diminution de l'activité antiradicalaire (DPPH°) en augmentant le temps de contact jusqu'à 3min (Figure 42), mais cette tendance a été renversée avec le test au molybdate (figure 43).

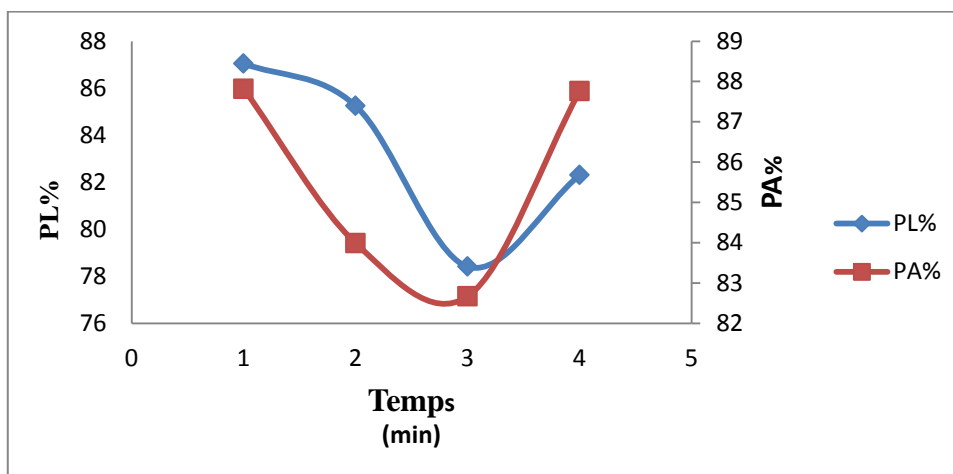


Figure 42 : la cinétique de mesure de l'activité antiradicalaire de l'extrait dans la phase aphron en fonction du temps (min).

➤ **Activité antioxydante de la phase aphron (phosphomolybdate d'ammonium)**

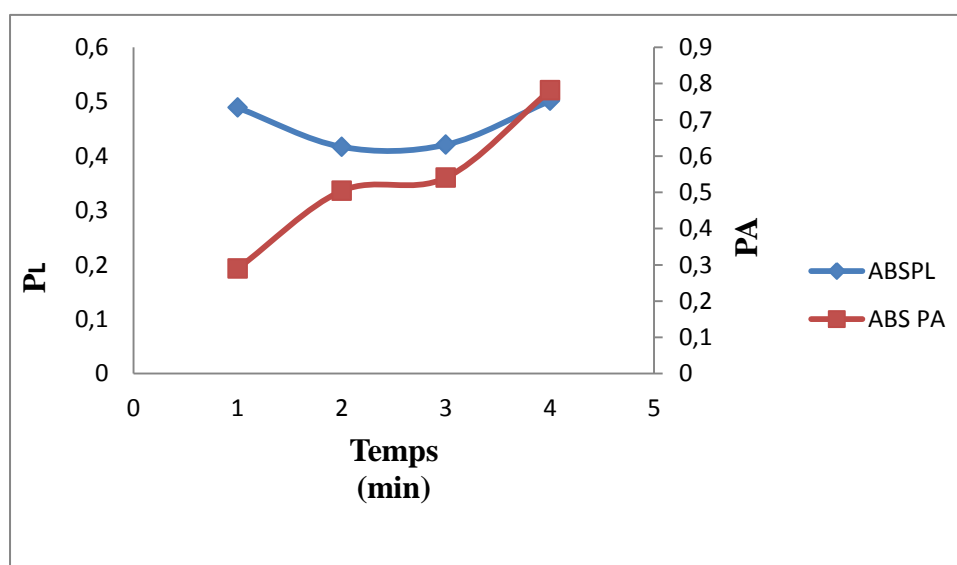


Figure 43: Résultats de test phosphomolybdate en fonction du temps (min).

Des efforts dans le domaine de la chimie verte sont actuellement concentrés sur l'identification du monde végétal, principalement les composés antioxydants naturels pour remédier l'effet indésirable causé par les substances synthétiques.

Dans ce travail, nous avons montré que la technique de fractionnement assistée par les colloïdes à gaz aphon (CGA_S) permet de séparer efficacement les composés phénoliques des non-phénoliques (la chlorophylle a et b). Le rendement de séparation est légèrement supérieur lorsqu'il est appliqué à la solution des standards (acide gallique, caféique et chlorogénique) ceci est peut être dû à l'effet de stabilisation des CGA_S par l'extrait.

Les concentrations en composés phénoliques des fractions récupérées sont soumises à différentes analyses (polyphénols totaux (PPT), indice des polyphénols (IP), flavonoïdes, chlorophylle a et b et activité antioxydante) en fonction des ratios.

D'après les résultats de l'extrait concentré, les rendements et les facteurs de séparation les plus élevés sont attribués au rapport $mL_{CGA}/mL_{Extrait}$ 32, avec un rendement dans la phase aphon est de $73\% \pm 0,007$ et un facteur de séparation de 2,71 pour les PPT.

Les flavonoïdes avec un recouvrement remarquable pour l'extrait mélangé avec CGA_S (cogénération) a un pourcentage de $59\% \pm 0,013$ et un facteur de séparation de $1,48 \pm 0,005$.

A la lumière de ces résultats, nous remarquons que l'élimination de 44% et 42% respectivement des chlorophylles a et b avec les CGA_S co-générées avec l'extrait.

Ces résultats suggèrent que la partition des polyphénols en présence des CGA_S est principalement due aux interactions hydrophobes.

Toutefois, comme complément à la présente étude, les points suivants nous semblent pertinents :

- Utilisation des techniques d'analyse performantes telles que : HPLC, LC-MS pour identifier les composés dans les deux phases ;
- Optimisation du processus de séparation par utilisation des plans d'expérience ;
- Tester les différents agents tensio-actifs ;
- Application des ultrasons pour générer les CGA_S en présence de l'extrait.

Nous suggérons aussi de prévoir un équipement bien dimensionné et sophistiqué pour contrôler tous les paramètres qui influencent le procédé.



Al-Dabbas M, Al-Ismail K, Kanefumi Kitahara K, Chishaki N, Hashinaga F, Suganuma T et Tadera K. (2007). The effects of different inorganic salts, buffer systems, and desalting of Varthemia crude water extract on DPPH radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 104: 734-739.

Ali Hashimn M, Mukhopadhyay S, Bhaskar Sen Guptab P et Jaya Narayan S. (2012). Application of colloidal gas aphrons for pollution remediation. *J Chem Technol Biotechnol* . 87: 305-324.

Allouche J. (2003). Développement de nouvelles méthodes pour l'élaboration d'émulsions multiples eau/huile/eau .thèse de doctorat de Génie des procédés. L'institut national polytechnique de lorraine. 10-11.

Amiri M.C et Sadeghialiabadi H. (2014). Evaluating the stability of colloidal gas aphrons in the presence of montmorillonite nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 457: 212-219.

Arabloo M et Shahri M.P. (2014). Experimental studies on stability and viscoplastic modeling of colloidal gas aphron(CGA)based drilling fluids. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 113:8-22.

Bibliographie

B

Ba K, Tine E, Destain J, Cissé N et Thonart P.(2010). Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*.14(1).

Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin J.C, Pinkas M, Luycky M et Gazin M.(1996).Oxygen spices scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation .*Arzneimittel Forsschung /Drung research* 46:1086-1089.

Batool F, Sabir S.M, Rocha J.B.T, Shah A.H, Zafar Saied Saify Z. S et Ahmed S. D. (2010). Evaluation Of Antioxidant And Free Radical Scavenging Activities Of Fruit Extract From *Zanthoxylum Alatum*: A Commonly Used Spice From Pakistan.*Pak. J.Bot.*42(6): 4299-4311.

Benaissa O. (2011).Etude des métabolismes terpéniques et flavoniques d'espace de la famille des composées, genre *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité biologique, thèse de Doctorat, université Mentouri Constantine. 603p.

Bersuder P, Hole M et Smith G.(1998). Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. i: investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. *journal of the american oil chemists' society*. 75:181–187.

Bibliographie

Bordes R. (2007).Synthese, physicochimie et polymérisation de tensioactifs paires d'ions dérivés du norbornene.thèse de doctorat de l'université de Toulouse ,Ecole doctorale de chimie,25.

Brahmi F, Madani Kh, Dahmoune F, Rahmani T, Bousbaa K, Oukmanou S et chibane M. (2010).Optimisation of solvent ectraction of antioxidants(phenolic compunds)from algerian mint (*Mentha spicata L.*) (2).77p.

Brand-Williams W, Cuvelier M.E et Berset C.(1995).Use of free radical method of evaluate antioxidant activity. LWT. 28: 25-30.



Chahrazed G. (2010). Interactions des polyélectrolytes complexes tensioactifs .Tlemcen, 20- 27.

Cheddani A et Nabti R. (2009). Etude comparative de l'activité antioxydante de la menthe pouliot « *Mentha Pulegium L.* » récoltée de différentes régions de la kabylie, these de Doctorat Sciences Biologiques.universite de Abderrahmane Mira Bejaia ,Faculte Science Alimentaire,1p.

Chibane M. (2012).Optimisation Of Solvent Extraction Of Antioxidants (Phenolic Compounds) From Algerian Mint (*Mentha spicata L.*) .Bejaia.2:76-77.

Ciriello S, Barnett S.M et Deluise F.J. (1982).Removal of heavy-metals from aqueous solutions using micro gas dispersions, Sep. Sci. Technol. 4 :(521–534).

Bibliographie

CQP (Dermocosmétologie Pharmaceutique). (2012) . Module 1.1 Les différentes formes galéniques II .Les mélanges hétérogènes. TC / CFA Toulouse.1p.

Đ

Dahmoune F. (2014).Extraction des polyphénols par micro-ondes et ultrasons. Etude de cas : Fractionnement des polyphénols par la technique CGA. Thèse de Doctorat Sciences Biologiques.universite de Abderrahmane Mira Bejaia ,Faculte Science Alimentire ,P(2).

Dahmoune F, Boulekbache L, Moussi K , Aoun O , Spigno G et Madani K. (2013). Valorisation of citrus limon residues for the recovery of antioxydants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction.

Das K, Tiwari R.K.S et Shriveastava . (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent : Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research. 4(2):104-111.

Dermiki M, Gordon M.H et Jauregi P. (2009).Recovery of astaxanthin using colloidal gas aphones (CGA): A mechanistic study, Department of Food Biosciences, The University of Reading, Whiteknights, P.O. Box 226, Reading, RG6 6AP, UK, Separation and Purification Technology 65: (54–64).

Bibliographie

£

Elmabruk H.A, Mansur, Yundong W et Youyuan Dai . (2006). Removal of suspensions of fine particles from water by colloidal gas aphones (CGAs). Separation and Purification Technology. 71-77.

F

Fuda E et Jauregi P.(2006). An insight into the mechanism of protein separation by colloidal gas aphones (CGA) generated from ionic surfactants. Journal of Chromatography .843- 317.

G

Ghezouali C. (2010) . Interactions des polyelectrolytes complexes tensioactifs .Tlemcen , (20- 27) P.

Grimes R.W. (2002) .Evaluation of a method using colloidal gas aphones to remediate metals contaminated mine drainage waters ,Western Research Institute Report WRI-02-R007.

H

Hashim A.M, Soumyadeep M, Bhaskar Sen Gupta et Jaya Narayan Saha. (2012).Application of colloidal gas aphones for pollution remediation. J Chem Technol Biotechnol; 87 : 305–324.

K

Kalaivani T et Mathew L. (2009). Phytochemistry and free radical scavenging activities of *Oroxylum indicum*. Environ. We Int. J. Sci. Tech. 4: 45-52.

Kanatt S.R, Sweetie R, Chander, Ramesh, Sharma A et Arun R. (2005).Antioxydants potential of mint (*Mentha spicata* L) in radiation-processed lamb meat.food chemistry 100(2):451-8.

Kernen L et Cintrat R. (2011).Tensioactifs et agregats en solution. Universite nice sophia antipolis.Chemie des matériaux organique et métalliques.1-5.

Khennouf S, Iratni N, Baghniani A, Mrzallah D and Arrar L. (2010). Antioxydant and antibacterial activities of extracts from *Artemisia herba alba* A sso. Leaves and some phenolic compounds. Journal of medecinl plantes research 4 (13): 1273-1280.

L

Larmignat S, Vanderpool D, Kei Lai H et Pilon L. (2008). Rheology of colloidal gas aphrons (microfoams).Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 322 :199–210.

Lichtenthaler H. K. (1982).Synthesis of prenyllipids in vascular plants (including chlorophylls, carotenoids, prenylquinones). In CRC Handbook of Bioscolar

Bibliographie

Rescrouces, vol. I, part I: Basic principles (A. Matsui and C.C.Black, eds.) .405-421. CRC Press, Boca Raton, Fla.



Maria S.M. Rufino ., Fabiano A.N, Fernandes , Ricardo E. Alves et Edy S. de Brito . (2009). Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system, food chemistry 114:693-695.

Memon AA, Memon N et Bhanger M I. (2010).Micelle-mediated extraction of chlorogenic acid from *Morus laevigata* W. leaves. Separation and Purification Technology.76-179.

Michel S, Jean-Yves A et Benoit L. (2003).Extraction assistée par micro-ondes. Techniques de l'ingénieur opérations unitaires du génie industriel alimentaire, base documentaire : TIB 430 Duo (ref ; article : F (3060).

Molaei A et Waters K.E. (2015). Aphron applications - A review of recent and current research. Advances in Colloid and Interface Science .216 :36–54.

Moshkelani M et Amiri M.C. (2008). Electrical conductivity as a novel technique for characterization of colloidal gas aphrons (CGA), Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 317:262–269.

Moshkelani M et Amiri M C.(2015) . Aphron applications -A review of recent and current research. Advances in Colloid and Interface Science 216: 36–54.

Bibliographie

N

Negi P S , Jayaprakasha G. K et Jena B.S. (2003). Antioxydant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80: 393-397.

Nurmi A. (2008). Antioxidant studies on selected Lamiaceae herbs *in vitro* and in humans. These Doctorate. University of Helsinki and University of Kuopio. 24- 27.

Nkahili E. (2004). Polyphenols de l'alimentation: Extraction, Interactions avec les ions du Fer Et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Diplôme de Doctorat, Spécialité :Science des aliments. Université Cadi Ayyad. Marrakech Université D'vignoni Et Des Pays De Vaucluse Ecole Doctorale 306- SA ,Montpellier.378P.

P

Pacifico S, D'Abrosca B, Golino , Mastellone C, Piccolella S, Fiorentino A et Monaco P. (2008). Antioxidant evaluation of polyhydroxylated nerolidols from redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) leaves. *LWT - Food Science and Technology*. 41: 1665-1671.

Pilon L et Warriar G R. (2006). Rheology and convective heat transfer of colloidal gas aephrons in horizontal mini-channels. *Int J Heat Fluid Flow*; 27 :298–310.

Prasad K N, Hao J, Shi J, Ting Liu T, Li J, Wei X, Shengxiang Qiu S, Sophia Xue S et Jiang Y. (2009). Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 413-419

Bibliographie



Ribereau-Gayon PP. (1982).Incidences oenologiques de la pourriture du raisin 1. EPPO

Bulletin 12.2: 201-214.

Roy D, Valsaraj K.T, Constant W.D, Darji M et Hazard J. (1994) .Removal of hazardous oily waste from a soil matrix using surfactants and colloidal gas aphon suspensions under different flow conditions 38: 27–144.

Roy D, Kommalapati R.R, Valsaraj K.T et Constant W.D. (1995). Soil flushing of residual transmission fluid: application of colloidal gas aphon suspensions and conventional surfactant solutions, Water Res. 29 :5589–59.

Rufino M.S.M, Fernandes F.A.N , Alves R. E et Brito E. S. (2009). Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. Food Chemistry. 114: 693-695.

Riviello A.E, Young D et Sebba F. (1994).A novel method for production of finely divided tin metal powders, Powder Technol. 78:19-24.



Save S.V et Pangarkar VG. (1994). Characterisation of colloidal gas aphon. Chemical Engineering Communications .127:35.

Salager J.L et Choplin L. (2008).Mousses Formation, formulation et propriétés.in techniques de l ingénieur Vol.Genie des procedes chapitre J2-200,1-14.

Bibliographie

Sava C et Sîrbu R. (2010). Analytical study of the determination of flavonoids in Black Sea algae. *Ovidius University Annals of Chemistry*. 21(1): 29-34.

Sebba F. (1971). Microfoams-an unexploited colloid system. *Journal of Colloid and Interface Science*. 35-643.

Shon M. Y, Kim T. H et Sung N. J. (2003).Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of *Hymenochaetaceae*) extracts.*Food Chemistry*.82:593–597.

Spigno G, Amendola D, Dahmoune F et Jauregi P. (2015). Colloidal gas aphrons based separation process for the purification and fractionation of naturalphenolic extracts. *food and bioproducts processing* 9 4: 434–442.

Spigno G et Jauregi P. (2005). Recovery of Gallic acid with colloidal gas aphrons (CGA), *Int. J. Food Eng.* 1 (4) article no.

Spigno G, Dermiki M, Pastori C, Casanova F et Jauregi P. (2010). Recovery of gallic acid with colloidal gas aphrons generated from a cationic surfactant. *Separation and Purification Technology*; 71:56.

Bibliographie

W

Watcharasing S, Angkathunyakul P et Chavadej S. (2008). Diesel oil removal from water by froth flotation under low interfacial tension and colloidal gas aphon conditions. *Separation and Purification Technology* 62:118–127.

Weber J et Agblevor F.A. (2005). Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production, *Process Biochem.* 40: (669–676).

Z

Ziaee H, Arabloo M, Ghazanfari M.H et Rashtchian D. (2015). Herschel-Bulkley rheological parameters of lightweight colloidal gas aphon (CGA) based fluids. *Chemical engineering research and design.* 93 : 21–29.

Annexes

Annexe I : matériels et réactifs utilisés

I.1.Réactifs utilisés

- Carbonate de sodium (biochem chemopharma).
- Chlorure d'aluminium (Biochem chemopharma).
- 2,2-Diphényl-1-picrraylhydrazyl(DPPH) (Sigma).
- Ethanol pur (Riedel de Haen).
- Folin-Ciocalteu (Prolabo).
- Méthanol (Prolabo).
- Molybdate d'ammonium tetrahydraté (Biochem chemopharma)
- Tween 20.

I.2.Matériels utilisés

- Bain-marie (MEMMERT).
- Balance (Radwag).
- Béchers.
- Broyeur électrique (IKA A11 basic).
- Eprouvettes (100et250ml).
- Etuves (MEMMERT,ecocell et trade Raypa).
- Fioles.
- Micropipettes.
- Pipettes en verre.
- Plaque agitatrice (VELP Scientifica).
- Spectrophotomètre UV-VIS (SpectroScan).
- Vortex.

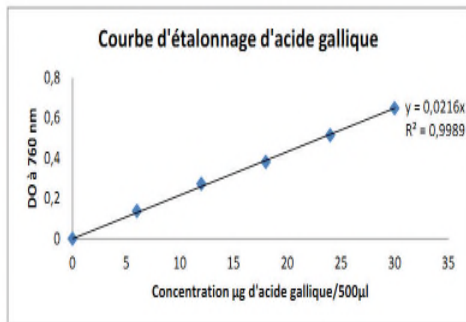
Annexe II : Préparation des différentes solutions tampons utilisées

Solution	Préparation
Solution de monocarbonate de sodium (NaCO_3)	NaCO_3 eau
Réactif de folin cieucateau	Folin eau
Solution de chlorure d'aluminium AlCl_3	Chlorure d'aluminium (AlCl_3)
Solution de molybdate	NaH_2PO_4 eau distillé Molybdate d'ammonium
Test de DPPH	Ethanol Poudre de DPPH

Annexes III: Les courbes d'étalonnage

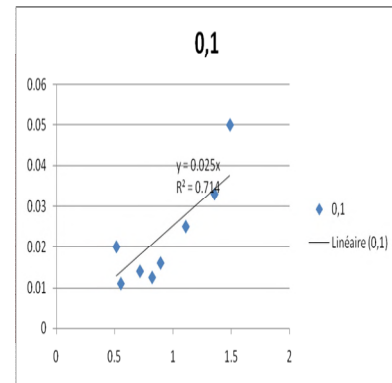
III.1. Courbe d'étalonnage des polyphenols totaux

(A)

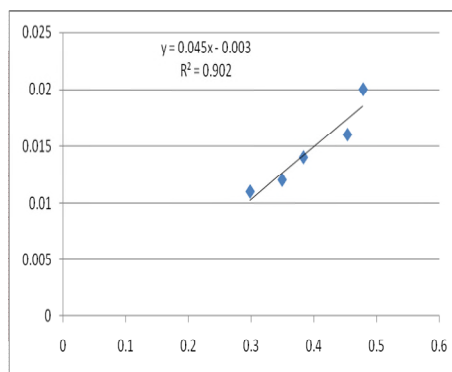


Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

(B)



(C)

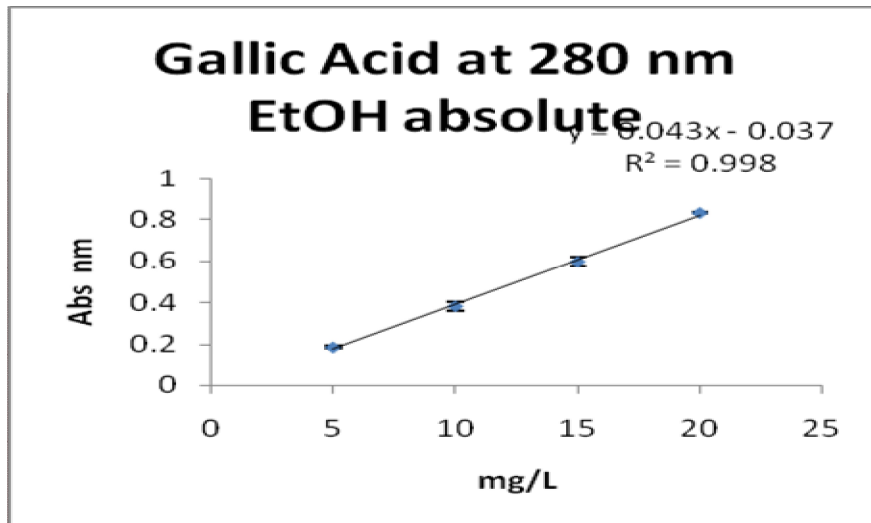


A : courbe d'étalonnage d'acide gallique.

B : courbe d'étalonnage d'acide chlorogénique.

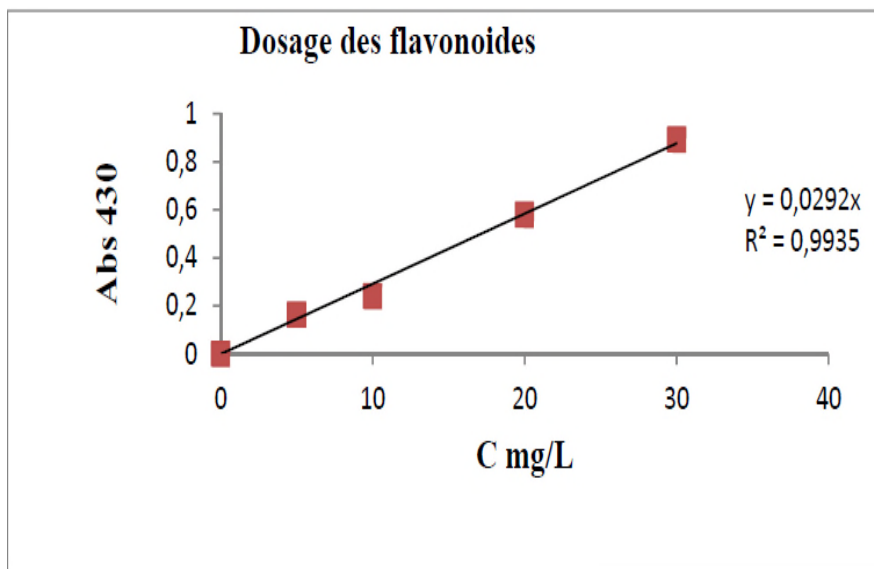
C : courbe d'étalonnage d'acide caféique.

III .2.Courbe d'étalonnage de l'indice de polyphenols



Courbe étalonnage de l'acide gallique a 280 nm.

III .3.Courbe d'étalonnage des flavonoïdes



Courbe d'étalonnage de la rutine.

Résumé

L'utilisation des colloïdes à gaz aphron (CGA_S) dans le domaine de la chimie verte présente de nombreux avantages. Elle également un intérêt économique et un impact sur environnement.

Un état d'art sur cette technique consiste sur l'application originale, ses caractéristiques, sa sélectivité, son efficacité et son originalité. Ces connaissances cognitives nous ont permet d'élaborer un prototype expérimental qui a mis en œuvre la caractérisation des molécules phénoliques de non-phénoliques.

A la lumière de ces résultats, nous avons démontré que la technique de fractionnement assistée par les colloïdes à gaz aphron (CGA) permet de séparer efficacement les composés phénoliques des non-phénoliques (la chlorophylle a et b). Le rendement de séparation est légèrement supérieur lorsqu'il est appliqué à la solution standard de l'acide gallique et caféique ceci peut être dû à l'effet de stabilisation des CGA_S par l'extrait. D'après les résultats de l'extrait concentré, les rendements et les facteurs de séparation les plus élevés sont attribués au rapport mL_{CGA}/mL_{Extrait} 32, avec un rendement dans la phase aphronique de 73% ± 0,005 et un facteur de séparation de 2,71 pour les polyphénols totaux .

Mots clés : CGA, Fractionnement, Stabilité, Composés phénoliques, Rendement, Facteur de séparation.

Summary

The using of colloid gas aphron (CGA_S) in the green chemistry has many advantages, such as the use of water as solvent, economic and eco-friendly. It has also economical and environmental impact.

A state of art of this technique consists in the original application, its features, selectivity, efficiency and originality. These cognitive knowledge has allows us to develop an experimental scale that implemented the characterization of phenolic molecules of non-phenolics. According to this finding, we have shown that the fractionation technique assisted by CGA can effectively separate the phenolic compounds of the non-phenolics (chlorophyll a and b). The separation efficiency is slightly higher when applied to the standard solution of Gallic acid and Caffeic this may be due to CGA-extract stabilization

From the results of the extract not diluted, the highest yields and separation factors have been assigned to ratio mL_{CGA} / mL_{Extrait} of 32, with a yield in the aphronic phase of 73% and a separation factor of 2.71 for total phenolic compounds.

Keywords: CGA, Purification, Stability, Phenolic compounds, Recovery, separation factor.

Conclusion et perspective

Introduction

Matériel et Méthodes

partie I
synthèse bibliographique

partie II
partie pratique

Références bibliographiques

Résultats et discussion

Annexes