

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de

MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par

ALIOUANE Fatiha

Thème

ÉTUDE DE L'EXTRACTION DU LIMONÈNE À PARTIR DES ÉCORCES D'ORANGE

Devant le jury composé de :

M^r ELIAS Abdelhamid

Pr - UMMTO

Président

M^r MOUSSAOUI Ramdane

MC A - UMMTO

Promoteur

M^{me} MAKHLOUFI Malika

MC A - UMMTO

Examinatrice

Soutenu le 13 /07/ 2015

Remerciements

Ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de Chimie Appliquée et Génie Chimique (LCAGC) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

En premier lieu, je remercie Dieu le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

*Je tiens à adresser mes sincères remerciements à mon promoteur Monsieur **MOUSSAOUI Ramdane**, Maître de Conférences A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou qui m'a témoigné son soutien et m'a prodigué une orientation judicieuse et rigoureuse durant toutes les phases de ce mémoire. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **ILIAS Abdelhamid**, Professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.*

*Je remercie profondément Madame **MAKHLOUFI Malika**, Maître de conférences A à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.*

*Je remercie le directeur du Laboratoire (LCAGC), Monsieur **TEZKRATT Saïd** et Monsieur **KADI Hocine**.*

Je remercie tout le personnel du Laboratoire LCAGC pour leur accueil et aide pendant mon travail.

Je remercie tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicaces

À mes chers parents qui ont toujours veillé sur moi

À mes frères et ma sœur

À Mon oncle Lounes

À toutes ma famille

À tous ceux qui me sont chers

À Chafaa ma source de réconfort et d'encouragement



Résumé

Cette étude porte sur l'extraction du limonène à partir des écorces d'orange broyées en utilisant les méthodes d'extraction suivantes: le reflux total, le soxhlet et l'hydrodistillation.

L'extraction par reflux total a été effectuée en procédant à la recherche des meilleures conditions de travail. A cet effet, une étude paramétrique portant sur l'effet de la température, du temps de contact et du rapport liquide-solide sur le rendement de l'extraction du limonène a été examinée. Dans ce cas, les conditions optimales de l'extraction obtenues sont : température = 70°C, temps de contact = 30 min et rapport liquide-solide (L/S) = 7 ml/g.

Les meilleurs rendements en huile essentielles sont obtenus dans les cas des extractions au soxhlet (2.43 %) et à reflux total (1.71 %).

Les analyses qualitatives des huiles essentielles effectuées par UV-Visible et CCM ont montré que l'huile extraite par hydrodistillation est composée uniquement de limonène, tandis que les autres huiles essentielles obtenues par les deux autres procédés renferment en plus du limonène composé majoritaire, d'autres composées non identifiés.

Mots clefs : Ecorces d'orange, huile essentielle, limonène, extraction, reflux total, rendement

Abstract

This study focuses on the extraction of limonene from crushed orange peels using the following extraction methods: the total reflux, the soxhlet and the hydrodistillation

The extraction of total reflux was carried out by conducting to the search for the better working conditions. For this purpose, a parametric study of the effect of temperature, contact time and the liquid-solid ratio on the extraction yield of limonene was examined. In this case, the optimal conditions of extraction obtained are: temperature = 70 °C, contact time = 30 min and liquid-solid ratio (L /S) = 7 ml / g.

The best yields of essential oil extractions were obtained for the soxhlet 2.43% and total reflux 1.71%.

The qualitative analyses of essential oils were carried out using UV-Visible and thin layer chromatography (TLC) and revealed that the extracted oil by hydrodistillation is only composed of limonene, while other essential oils obtained by the others methods contains the limonene as the main compound, additionally other unidentified compound.

Key words: Orange peels, essential oil, limonene, extraction, total reflux, yield

PLAN

Liste des abréviations

Liste des figures et tableaux

Introduction	1
---------------------------	----------

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre 1: Les agrumes

1.1. Origine et histoire des agrumes	2
1.2. Généralité sur les agrumes	2
1.3. Différentes variétés d'agrumes	3
1.4. Situation des agrumes dans le monde.....	4
1.5. Situation des agrumes en Algérie	6
1.6. Transformation des agrumes	6
1.6.1. Co-produits de la transformation des agrumes.....	7
1.6.2. Huiles essentielles et essences des agrumes	7
1.7. Composition des huiles essentielles des agrumes	7
1.8. Domaines d'application et intérêt phytothérapie.....	9

Chapitre 2 : Les huiles essentielles

2.1. Définitions	10
2.2. Composition Chimique des Huiles Essentielles	10
2.2.1. Les terpènes	11
2.2.1.1. Les monoterpènes	11
2.2.1.2. Les sesquiterpènes	11
2.2.2. Les composés aromatiques	12
2.2.3. Les composés phénoliques	12
2.3. Notion de chémotype	13
2.4. Activités biologiques des huiles essentielles	13

2.5. Conservation des huiles essentielles.....	13
2.6. Domaines d'utilisation des huiles essentielles	14
2.6.1. En pharmacie	14
2.6.2- En cosmétologie	14
2.6.3. Dans les industries agroalimentaires	15
2.7. Caractérisations chimiques	15
2.7.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	15
2.7.2. Analyse par rayonnement Ultra-violet	15

Chapitre 3 : Le limonène

3.1. Définition	17
3.2. Propriétés physico-chimiques et organoleptique	17
3.3. Propriétés optiques	18
3.4. La biosynthèse du limonène	18
3.5. Procédé de production	19
3.6. Utilisation du limonène	19
3.6.1. En cosmétologie	19
3.6.2. En pharmacie	20
a. Thérapie anticancéreuse.....	20
b. Des patchs à l'orange	20
3.6.3 Autres utilisations.....	21
3.7. Le Limonène et l'Environnement.....	21
3.8. Aspects biologiques et toxicologiques	21

Chapitre 4 : Les méthodes d'extraction

4.1. Hydrodistillation.....	23
4.2. Entraînement à la vapeur d'eau	24
4.3. Hydrodiffusion	25
4.4. Extraction par solvant sur appareillage Soxhlet	25
4.5. Extraction par chauffage à reflux total	26
4.6. Extraction à froid.....	27
4.7. Extraction assistée par micro-ondes	28
4.8. Extraction par ultrasons	28
4.9. Extraction par CO ₂ supercritique.....	28

Deuxième partie : Etude expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Matériel végétal et opérations de prétraitement	30
1.1.1. Séchage	30
1.1.2. Broyage.....	30
1.2. Méthodes	31
1.2.1. Détermination de la teneur en matières volatiles	31
1.2.2. Extraction	32
1.2.2.1. Extraction à reflux total	32
a) Effet de la température	33
b) Effet du temps de contact	33
c) Effet du rapport liquide-solide (L/S)	33
1.2.2.2. Extraction dans un soxhlet.....	35
1.2.2.3. Hydrodistillation.....	36
1.2.2.4. Rendement d'extraction.....	37
1.2.3. Méthodes d'analyse	37
1.2.3.1. Chromatographie sur couche mince	37
1.2.3.2. UV-Visible	39
1.2.4. Indice de réfraction.....	39

Chapitre 2: Résultats et discussions

2.1. Teneur en matières volatiles	41
2.2. Extraction de l'huile essentielle.....	41
2.2.1. Extraction à reflux total	41
a) Effet de la température du bain	41
b) Effet du temps de contact	42
c) Effet du rapport liquide-solide (L/S)	42
2.2.2. Extraction dans un soxhlet.....	43
2.2.3. Hydrodistillation.....	43
2.2.4. Etude comparative entre les trois méthodes d'extraction utilisées.....	44
2.3. Analyses physico-chimiques	45

2.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	45
2.3.2. UV-Visible	46
2.4. Indice de réfraction.....	48
Conclusion	49
Références bibliographiques	

Abréviations

CCM : Chromatographie sur couche mince

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CO₂ : Dioxyde de carbone

°c : Degré Celsius

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

F.M.C : Food Machinery Corporation

GRAS: Generally Recognized as Safe

L/S : Rapport liquide solide

ml/g : Millilitre par gramme

min : Minute

n²⁰ : Indice de réfraction à 20°C

ppm : Partie par million

R_f : Rapport frontal

T_{M.V} : teneur en matières volatiles

tr/min : Tour par minute

UV : Ultraviolet

% : Pourcentage

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1. Coupe transversale d'une orange	3
Figure 2. Les 10 pays principaux producteurs d'orange dans le monde durant la période 2007 - 2010	4
Figure 3. Les 5 pays principaux transformateurs d'orange dans le monde durant la période 2007 – 2010	5
Figure 4. Structure de l'isoprène	11
Figure 5. Exemples de structures de terpènes rencontrées dans les huiles essentielles	12
Figure 6. Exemples de composés aromatiques	12
Figure 7. Structure du Phénol	13
Figure 8. Structure de limonène	17
Figure 9. Formes énantiomères du limonène.....	18
Figure 10. Biosynthèse du limonène	19
Figure 11. Dérivés du limonène	20
Figure 12. Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle.....	23
Figure 13. Le montage d'hydrodistillation	24
Figure 14. Entraînement à la vapeur d'eau ascendante	24
Figure 15. Montage d'hydrodiffusion.....	25
Figure 16. Appareil soxhlet	26
Figure 17. Montage à reflux.....	26
Figure 18. Schéma représentatif de l'extraction par FMC in line	27
Figure 19. Schéma du procédé d'extraction par micro-onde.....	28
Figure 20. Schéma d'extraction par le CO ₂ supercritique	29
Figure 21. Ecorces d'oranges coupées.....	30
Figure 22. Ecorces d'oranges broyées	31
Figure 23. Détermination de la teneur en matières volatiles d'écorces d'orange broyées ...	31
Figure 24. Extraction à reflux total.....	32
Figure 25. Filtration	33
Figure 26. Montage de distillation	34
Figure 27. Montage de séchage	34

Figure 28. Extraction par soxhlet.....	3
Figure 29. Extraction par hydrodistillation.....	36
Figure 30. Distillat et décantation.....	37
Figure 31. Plaque CCM	38
Figure 32. Eluant	39
Figure 33. Réfractomètre	40
Figure 34. Effet de la température sur le rendement de l'extraction à reflux total.....	41
Figure 35. Influence du temps de contact sur le rendement d'extraction.....	42
Figure 36. Evaluation du rendement en fonction du volume de solvant	42
Figure 37. Rendement en huile essentielle en fonction du procédé utilisé.....	44
Figure 38. Aspect des huiles essentielles obtenues par les différentes méthodes d'extraction.....	45
Figure 39. Chromatogrammes	46
Figure 40. Spectre UV/Visible de l'huile essentielle extraite par la méthode à reflux total	47
Figure 41. Spectre UV-Visible de l'huile essentielle extraite au soxhlet	47
Figure 42. Spectre UV-Visible de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation.....	47
Figure 43. Spectre UV-Visible du limonène pur	48

Liste des tableaux

Tableau 1. Les 10 pays principaux producteurs d'orange dans le monde durant la période 2011-2012	5
Tableau 2. Propriétés physico-chimique et organoleptique du limonène.....	17

Introduction

Les agrumes de la famille des Rutacées sont les plus répandus dans le monde, ils représentent un secteur important dans le domaine d'agro-alimentaire. Ils offrent ainsi une grande étendue d'utilisation allant, de la consommation à l'état frais à la transformation en jus, confits ou liqueurs mais aussi à l'extraction de leurs essences à partir des écorces, qui sont composés essentiellement du limonène (Rahman et al., 2007).

Pour des raisons économiques et écologiques, il est préférable pour l'extraction du limonène d'utiliser des sous produits de l'industrie des jus d'agrumes. L'Algérie compte parmi les pays producteurs et transformateurs d'agrumes dont notamment les oranges.

La quantité d'oranges produite et celle transformée en jus, confitures,... par l'Algérie sont estimées respectivement à 415 et 22 mille tonnes durant la période allant de 2011 à 2012 (FAO, 2012).

L'industrie de fabrication des jus à partir des agrumes rejette annuellement des tonnages énormes des sous-produits qui peuvent constituer une source intéressante de matières premières pour la production du limonène, qui est le constituant majoritaire des huiles essentielles d'agrumes environ 95 % (Rossi, 2013).

La valorisation de ces déchets qui consiste en la récupération des composés tels que le limonène, les polyphénols,... permettra non seulement d'apporter une valeur ajoutée à l'industrie des agrumes, mais aussi de contribuer à la dépollution de l'environnement.

L'objectif de notre travail consiste en :

- L'étude de l'extraction des huiles essentielles à partir des écorces d'oranges broyées par le procédé à reflux total, ceci en examinant l'effet sur le rendement des paramètres suivants: la température, le temps de contact et le rapport liquide/solide (L/S).
- La comparaison des résultats obtenus par l'extraction à reflux total avec ceux des méthodes d'hydrodistillation et soxhlet.

Afin de caractériser les huiles essentielles obtenues par les trois méthodes d'extraction, celles-ci ont subi les analyses physico-chimiques suivantes: chromatographie sur couche mince (CCM), spectrophotométrie UV-Visible et indice de réfraction.

Première partie
Etude bibliographique

Chapitre 1

Les Agrumes

Les agrumes possèdent de nombreuses vertus, leur teneur élevée en vitamines, leur faible apport calorique et leur potentiel antioxydant font de ces fruits un aliment très demandé au niveau mondial.

1.1. Origine et histoire des agrumes

D'après Webber et al. (1967), le cédratier, arbre voisin du citronnier et dont le fruit est un agrume appelé le cédrat a poussé en Mésopotamie il y a environ 4000 ans avant Jésus Christ. La plupart des agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour des montagnes de l'Himalaya et du Sud-est Asiatique. La première mention écrite sur les agrumes se trouve dans la littérature Sanskrit environ 800 ans avant Jésus Christ.

1.2. Généralité sur les agrumes.

Les « citrus » plus communément appelés agrumes sont des fruits provenant des arbres de la famille des rutacées, ils ont presque la même structure qui est la suivante: L'écorce, partie non comestible du fruit ; la pulpe, partie comestible qui est constituée de poils ou de vésicules enfermant le jus (Spiegel-Roy et Goldschmidt., 1996). A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles. La coupe transversale du fruit (Figure 1) permet de distinguer les parties suivantes:

- Une peau ou une écorce rugueuse, résistante, de couleur vive (du jaune à l'orange), plus connue sous le nom d'épicarpe (ou flavedo), qui recouvre le fruit et le protège des dommages. Ses glandes oléifères contiennent des huiles essentielles qui donnent au fruit son odeur caractéristique.
- Un mésocarpe (ou albedo) blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit.
- La partie interne, constituée de la pulpe, est divisée en segments (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (Guimaraes et al., 2010).

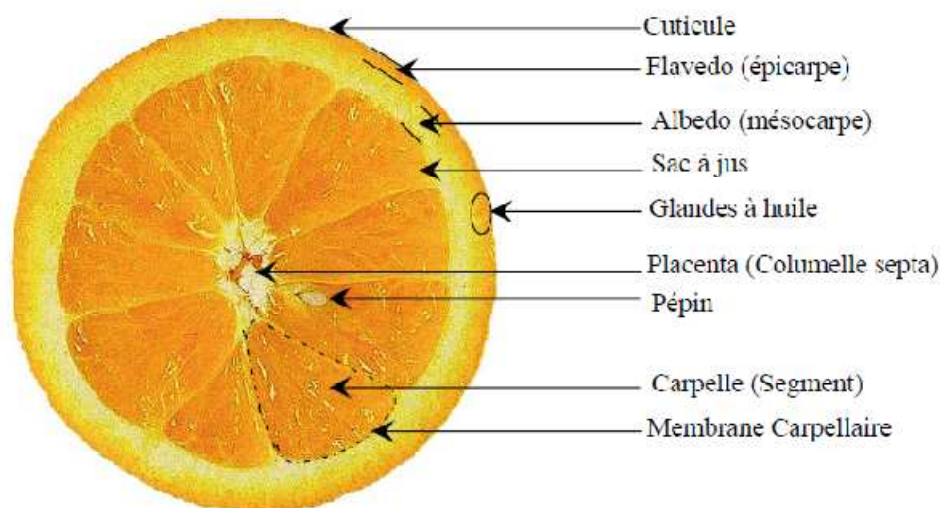


Figure 1. Coupe transversale d'une orange
(Guimaraes et al., 2010)

1.3. Différentes variétés d'agrumes

Il existe différentes variétés d'agrumes consommés et utilisés industriellement pour la production des jus de fruit partout dans le monde (Bousbia, 2011).

- Oranges « *Citrus sinensis* (L.) Osbeck » : appelées aussi oranges du Portugal, oranges douces et le terme le plus populaire est oranges de la Chine. Depuis, son nom scientifique est devenu *Citrus sinensis* (agrumes chinois). Elles représentent l'espèce commerciale de *Citrus* la plus importante dans le monde.
- Mandarines « *Citrus reticulata* Blanco » : elles occupent une place de plus en plus importante dans le marché des agrumes frais.
- Bigarades « *Citrus aurantium* L. » : elles sont communément appelées « oranges amères », mais c'est une espèce différente de l'orange douce. Des appellations plus familières telle que « Pomme du jardin des Hespérides » lui ont été données. Ce fruit est peu ou pas comestible.
- citrons « *Citrus limon* (L.) Burm f » : sont juteux, acides et très parfumés. Le citron est reconnu pour ses propriétés diététiques (35 kcal/100g). Il renferme du calcium à un taux relativement élevé (25mg/ 100g). Le jus de citron contient essentiellement trois acides : malique, ascorbique et citrique.
- Limes « *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle » : La Lime est un petit citron vert, qui peut cependant devenir jaune et être confondu ainsi avec les citrons jaunes.
- Cédrats « *Citrus medica* L.» : Le cédrat est un fruit ovale et verruqueux. L'écorce du

fruit est très épaisse, jaune pâle et laisse peu de place à la pulpe. L'essence du zeste évoque l'odeur du cèdre.

- pomelos « *Citrus maxima* » : le pomelo n'est pas très juteux ni acide; comparé aux autres agrumes, il peut être très doux et il est le plus grand agrume.
- Pamplemousses « *Citrus paradisi* (Burm.) merrill ».
- Kumquats « *Citrus japonica* Thunb »: sont des agrumes de petite taille, de couleur rouge orangée avec une chair peu juteuse et contenant de gros pépins. C'est le seul agrume qui se mange avec sa peau.

1.4. Situation des agrumes dans le monde

Avec une production estimée à 115 millions de tonnes, la culture des agrumes est la plus importante culture fruitière dans le monde. Cependant, la majeure partie de cette production se concentre dans certaines zones géographiques et est cultivée dans l'hémisphère Nord (Etats unie, Mexique, Chine ...), et l'hémisphère sud (Brésil, Argentine,...). Les principaux pays producteurs d'agrumes et spécifiquement d'orange durant la campagne 2007-2010 sont portés dans la figure 2. Il s'agit du Brésil, des pays du Bassin Méditerranéen, de la Chine et des Etats-Unis. Ces pays comptent pour plus de deux tiers de la production totale d'agrumes. Dans la figure 3, sont donnés les 5 pays principaux transformateurs d'oranges dans le monde.

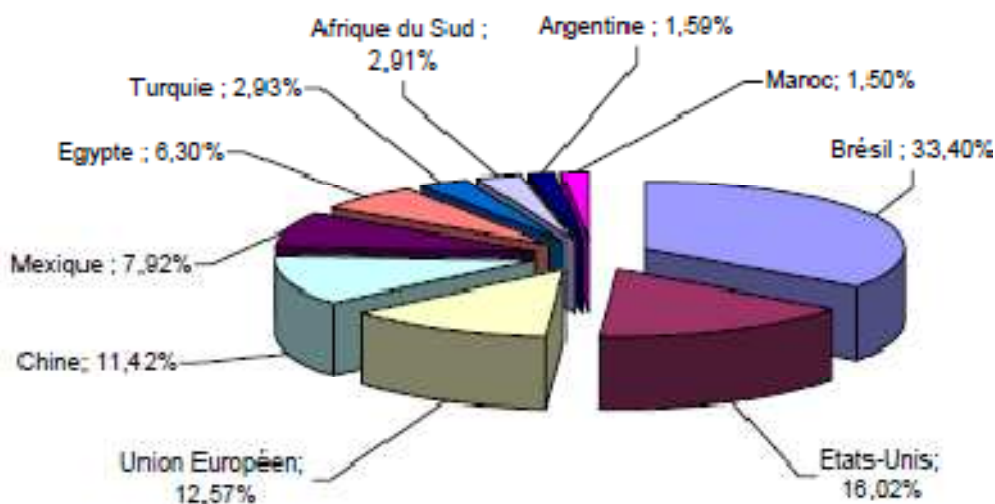


Figure 2. Les 10 pays principaux producteurs d'orange dans le monde durant la période 2007 - 2010 (USDA, 2010).

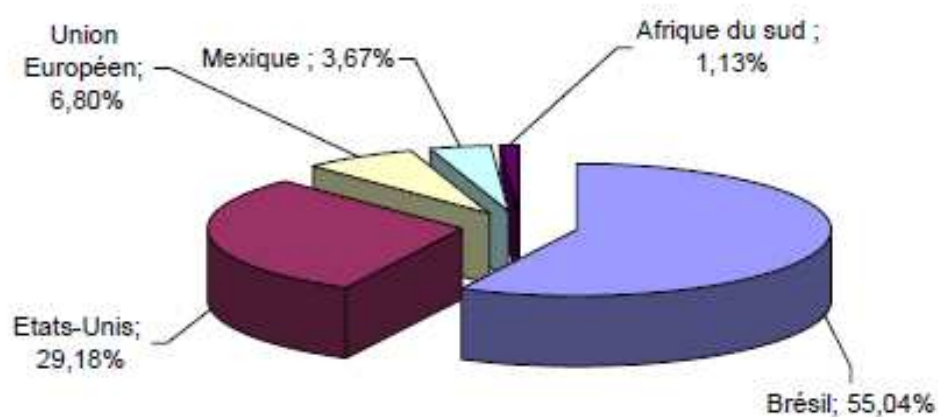


Figure 3. Les 5 pays principaux transformateurs d'orange dans le monde durant la période 2007 – 2010 (USDA, 2010).

D'après l'organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), les principaux pays producteurs d'oranges durant la campagne 2011-2012 sont mentionnés dans le tableau 2. Parmi ces pays, le Brésil est le plus grand producteur d'orange (39 % de la production totale).

Les pays	Quantités (mille tonnes)
Brésil	18155
Etats unies	7954
Chine	6600
Mexique	3200
Espagne	2684
Egypte	2350
Italie	2260
Afrique de sud	1400
Maroc	948
Grèce	910

Tableau 1. Les 10 pays principaux producteurs d'orange dans le monde durant la période 2011-2012 (FAO, 2012).

1.5. Situation des agrumes en Algérie

D'après l'association des producteurs Algériens de Boisson (2013); L'agrumiculture occupe une superficie de 65.000 ha, dont 55.000 réservés à la production. Cette production agrumicole est constituée de: 72% d'oranges, 16% de clémentines, 4% de mandarine et 7% de citrons, les autres variétés (pomelos, pamplemousse, etc.) étant estimées à 1%. D'après les données de la FAO (2012), l'Algérie occupe la 7^{ème} place parmi les pays méditerranéens producteurs des agrumes (517 mille tonnes) et la 6^{ème} place dans la production d'orange qui est de 415 mille tonnes durant la période 2011-2012. Parmi cette production, 22 mille tonnes d'oranges sont destinés à la transformation.

Autre fois, l'Algérie était considéré comme un pays exportateur d'agrumes de qualité. Dans les années 50, ce pays était l'un des rares du bassin Méditerranéen qui possédait des parcs à bois soumis à un contrôle sanitaire et variétal; malheureusement, en raison d'une réorganisation insuffisante dans les années 1970, la superficie cultivée et la production des agrumes a considérablement diminué au cours des 30 dernières années. Aujourd'hui, les vergers d'agrumes se concentrent principalement dans les plaines irrigables de la Mitidja, du Chellif, de Habra et Mascara ainsi que le périmètre de Bouna Moussa et la plaine de Safsaf ; cependant le pays n'arrive même pas à satisfaire les besoins locaux, relégué loin derrière les grands pays exportateurs de ce fruit, se voyant même dépasser par ses voisins Marocains et Tunisiens qui conservent leur présence sur le marché international de ce produit très apprécié par les consommateurs. Le vieillissement des vergers, leur état sanitaire, l'arrachage anarchique provoqué par l'urbanisation, la salinité des terres, le manque de main d'oeuvre serait à l'origine des baisses enregistrées dans la production des agrumes ces dernières années (Journées Méditerranéennes sur l'Agrumiculture, 2014).

1.6. Transformation des agrumes

Dotés d'arômes qui ne sont seulement qu'un de leurs produits, les agrumes (Citrus) sont un bon exemple de transformation des produits agricoles à grande échelle qui utilise une approche de raffinerie. Une gamme de culture d'agrumes est transformée pour produire des huiles essentielles à double usage aussi bien comme arômes que comme ingrédients de parfum. On prend une variété d'agrumes qui est largement utilisée dans le monde; Les oranges, sont pressées pour en extraire le jus. La peau d'orange restante est ensuite soumise à pression ou à être râpée pour en extraire « huile pressée à froid » ou "essence d'agrumes", source d'arômes et de nombreuses molécules utiles au parfum. Ces essences composée essentiellement de limonène et d'autres hydrocarbures terpéniques.

1.6.1. Co-produits de la transformation des agrumes

Les produits résultant de la transformation d'agrumes sont les jus de fruits, les huiles essentielles et la peau. Cette dernière, avec la pulpe et les graines, constituent les résidus industriels et comptent pour 40-60 % du poids de la matière première (Bousbia, 2011). L'utilisation de ce résidu est une exigence fondamentale de l'industrie de transformation des fruits, non seulement pour des raisons économiques, mais aussi pour réduire l'impact environnemental grave que cela pourrait induire en cas d'abandon.

Les principaux sous-produits issus de ce résidu, sont les suivants : l'eau est le principal constituant, elle représente d'un point de vue quantitatif 80 à 85 % du poids total de ce déchet. La matière sèche est constituée principalement de sucres solubles (glucose, fructose, et saccharose, et de faibles teneurs de pentoses), de sucres insolubles (cellulose, hémicellulose, protopectine), d'acides organiques (citrique, malique, isocitrique, oxalique) et une teneur importante de flavonoïdes (hespéridine dans la majorité des espèces d'agrumes). Les écorces de lime, de bergamote, de citron et d'orange sont principalement utilisées pour extraire les huiles essentielles (limonène). (Bousbia, 2011).

1.6.2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles de la famille des rutacées, notamment les huiles d'agrumes sont largement utilisées comme arômes et parfums en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction et des espèces, ainsi que, de la méthode employée pour leur extraction.

L'écorce des fruits contient une essence récupérée soit par distillation ou par expression à froid constituée d'hydrocarbures terpéniques dont 95 % est le limonène (Rossi, 2013).

La distillation des fleurs d'agrumes conduit à une huile appelée «huile essentielle de néroli » très sollicitée par les parfumeurs. L'hydrolat qui est un sous produit de cette distillation s'appelle « eau de fleur d'oranger », très appréciée tant à l'échelle ménagère qu'industrielle (Peyron, 2002). Les huiles essentielles des écorces d'agrumes mènent à des sous-produits intéressants tel que le limonène.

1.7. Composition des huiles essentielles des agrumes

Les fruits d'agrumes ont des arômes distinctifs car ils libèrent de petites quantités de composés volatils dans l'atmosphère. La quantité des substances libérée augmente avec la maturité des fruits et l'élévation de la température de stockage. L'émission des substances volatiles augmente aussi considérablement si la peau est blessée ou coupée et les sacs à huiles rompus. Ces huiles volatiles sont associées aux saveurs et arômes caractéristiques des

agrumes. Chimiquement parlant, il s'agit notamment d'hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes), alcools, esters, aldéhydes, cétones et acides organiques volatils.

Les huiles volatiles d'agrumes comprennent plusieurs composés. Dans la plupart des cas, ces composés volatiles doivent être isolés et concentrés par un moyen physique tel que la distillation et/ou par un moyen chimique : extraction par solvant suivie d'un séchage. Les essences sont obtenues par pression à froid ou lors de la concentration du jus congelé d'orange, qui constitue une valeur importante en tant qu'aromatisant (Moshonas et Shaw, 1979). La nature des composants aromatiques ainsi que leur proportion en huile essentielle diffèrent d'une espèce à l'autre.

D'après Stanley (1962), l'hydrocarbure monoterpénique limonène représente une teneur de 80 à 95 % et les terpènes oxygénés environ 5 % de l'huile tel que le citral, linalol, le nérol le carvéol..., fournissent des arômes propres à chaque espèce, tandis que les esters ne représentent qu'une petite fraction des huiles d'agrumes, mais ils donnent un arôme caractéristique.

D'après Hunter et Brogden (1965), se trouvent les autres hydrocarbures monoterpéniques tels que: α -thujène, α -pinène, camphène, β -pinène, sabinène, β -myrcène, Δ -3-carène, α -phellandrène, α -terpinène, β -terpinène, p-cymène, terpinolène, et des sesquiterpènes tels que : le cubébène, le copaène, l'élémente, le caryophyllène, le farnésène, l' α -humulène, le valencène, et Δ -cardinene.

Les composés carbonylés (aldéhydes et cétones) apportent une contribution importante aux arômes d'agrumes (Stanley et al., 1961).

Les composés alcoolisés sont également présents parmi les substances aromatiques volatiles d'agrumes. Les alcools prédominants de l'huile d'orange et de l'essence sont le linalol et l'octanol. D'importantes quantités de 4-terpinéol et d' α -terpinéol ont également été trouvées. Le méthanol, l'éthanol, le n-propanol, l'isobutanol, le n-butanol, l'isopentanol, le n-pentanol, le n-hexanol, le 3-héxénol, le n-heptanol, le méthyle hepténol, le 2-nonanol, le n-nonanol, le n-décanol, le citronellol, le nérol, le géraniol, l'undécanol, et le dodécanol sont présents en traces (Attaway et al., 1962).

Les composés volatils soufrés (sulfure d'hydrogène, sulfure de diméthyle) ont également été identifiés (à des concentrations de l'ordre du ppm) en employant la méthode d'extraction analytique « *Headspace* » sur des fruits d'agrumes.

1.8. Domaines d'application et intérêt phytothérapie

Les huiles essentielles de citrus sont utilisées pour la préparation des parfums, des savons, désodorisants, des bougies parfumées. En industrie alimentaires comme aromatisants, en aromathérapie, elles sont utilisées pour traiter l'insomnie, l'anxiété et aussi pour calmer les palpitations. L'huile essentielle de citron est employée comme désaltérant et possède des propriétés antimicrobiennes, stimulantes, stomachiques, diurétiques (Bardeau, 2009).

Chapitre 2

Les huiles essentielles

Depuis des siècles, l'homme a utilisé les plantes dans plusieurs domaines, tels que la parfumerie, la pharmacologie et l'agroalimentaire, grâce à leurs propriétés découvertes par hasard. Les plantes produisent un grand nombre de composés. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. Ce n'est qu'après le développement de la chimie que les huiles essentielles extraites des plantes commencent à livrer leurs secrets et que leurs composants principaux ont été identifiés.

2.1. Définitions

Les huiles essentielles appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal ; elles sont odorantes et très volatiles, c'est -à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (Padrina et leucheroni, 1996).

Les huiles essentielles sont des « liquides volatiles, la plupart du temps insolubles dans l'eau, mais librement solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales et minérales. Elles sont habituellement non huileuses au contact de la peau. Leurs composants peuvent être regroupés en six classes selon leur structure chimique :

- ✓ les hydrocarbures, tel que le limonène dans l'huile de citron.
- ✓ Les alcools, tel que le bornéol dans le camphrier de Bornéo.
- ✓ Les esters, tel que le salicylate méthylique dans l'huile de wintergreen.
- ✓ Les aldéhydes, tel que l'aldéhyde benzoïque dans l'huile d'amandes amères.
- ✓ Les cétones, telle que la menthone dans l'huile de menthe poivrée.
- ✓ Les lactones et oxydes, telle que la coumarine des haricots de Tonka (funk & wagnalls, 2004).

2.2. Composition Chimique des Huiles Essentielles

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques.

2.2.1. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte, leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone C_5H_8 (Figure 4). Ils sont subdivisés selon le nombre d'entité isoprènes en monoterpènes formé de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$), en séquiterpènes formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$), en diterpènes formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$) et en tétraterpènes formés de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes (Hernandez-Ochoa, 2005).

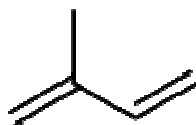


Figure 4. Structure de l'isoprène

2.2.1.1. Les monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). Ils comportent deux unités isoprène (C_5H_8), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales (Bruneton, 1999).

2.2.1.2. Les sesquiterpènes

Ce sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{24}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques et polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature.

Dans la figure 5, sont donnés quelques exemples de composés terpéniques.

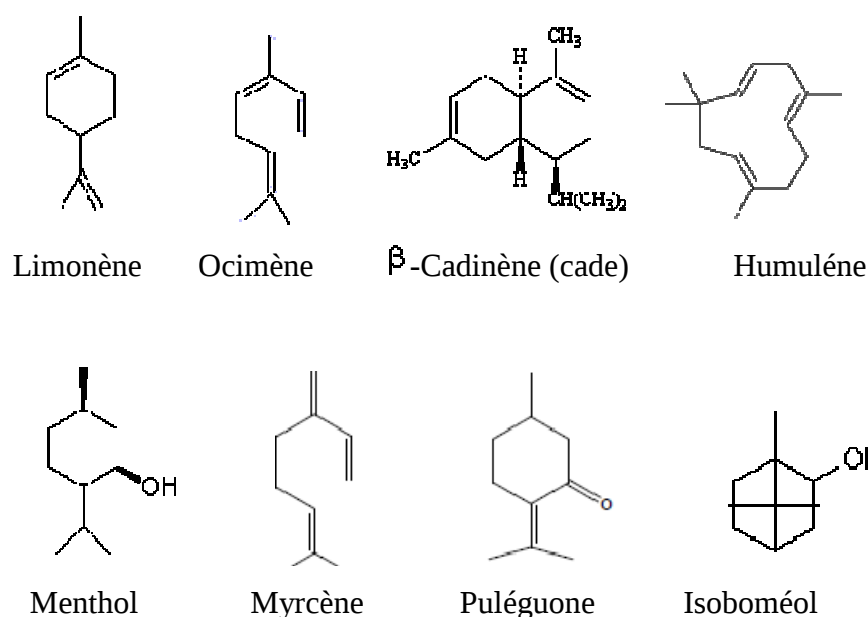


Figure 5. Exemples de structures de terpènes rencontrées dans les huiles essentielles (Bruneton, 1999).

2.2.2. Les composés aromatiques

Une autre classe de composés volatiles fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragol et bien d'autres. Dans la figure 6 sont illustrés les structures de l'eugénol et l'estragol (Bruneton, 1999).

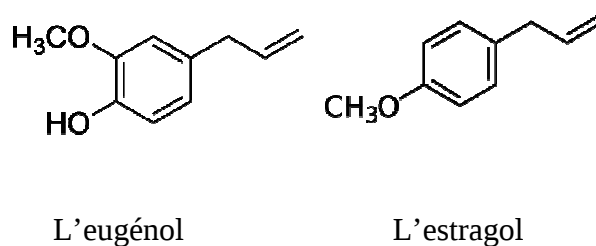


Figure 6. Exemples de composés aromatiques (Bruneton, 1999).

2.2.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés parmi les produits du métabolisme secondaire des plantes aromatiques. Ils correspondent à un vaste ensemble de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique (Phénol, Figure 7) portant un ou plusieurs

hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ces composés, d'intérêt biologique, sont principalement présents dans les végétaux (fruits, légumes, céréales...) et dans les produits qui en dérivent (thé, jus de fruits, vin, bière, ...) (Bruneton, 1999).

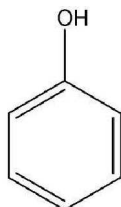


Figure 7. Structure du Phénol

Les composés phénoliques sont actuellement l'objet d'une littérature abondante. En effet, leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine seraient nombreuses : effets protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires, effets anti-inflammatoires, ou encore antiviraux (Yang et al., 2000). Par ailleurs ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et leurs propriétés antioxydantes (Tapiero et al., 2002).

2.3. Notion de chémotype

Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif, présent dans l'huile essentielle. C'est l'élément qui permet de distinguer les extraits d'une même variété botanique mais, d'une composition biochimique différente. Cette classification permet de sélectionner les huiles essentielles pour une utilisation bien précise, plus sûre et plus efficace (Pibiri, 2005).

2.4. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne, par exemple contre les bactéries endocanaliaires ou au niveau de la microflore vaginale et d'origine fongique contre les dermatophytes.

2.5. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances très délicates, elles s'altèrent facilement, ce qui rend leur conservation difficile. Les risques de dégradation sont multiples : photoisomérisation, photocyclisation, coupure oxydative de propénylphénols,

peroxydation des carbures et décomposition en cétones et alcools (limonène). Ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons propres et sec en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté, à l'abri de la lumière et de la chaleur (Bruneton, 1999).

2.6. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles peuvent avoir d'intéressantes applications dans différents secteurs :

2.6.1. En pharmacie

L'importance des plantes aromatiques est indiscutable. Leur contenu en essence et la nature chimique des constituants de celle-ci leur confèrent de grandes perspectives d'application. Ces substances sont d'un grand intérêt pour le domaine médical et pharmaceutique. Les huiles essentielles ont un champ d'action très large, elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des levures et des moisissures. Leur effet biologique a souvent été trouvé supérieur à celui de plusieurs fongicides du commerce. (Singh et al., 1983). Les huiles essentielles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques; ce qui leur donne une place parmi les moyens thérapeutiques de désinfection. Elles sont utilisées comme anti infectieux (eucalyptus), analgésique (girofle). Les perspectives d'application peuvent s'étendre à d'autres domaines comme, par exemple, la stomatologie, le traitement des affections bactériennes et fongiques de la cavité buccale, les soins dentaires ou simplement pour l'hygiène dentaire sous forme de pâte dentifrice ou de pâte à mâcher.

2.6.2. En cosmétologie

L'industrie des cosmétiques et le secteur des produits d'hygiène sont également des consommateurs, même si le coût souvent élevé des produits naturels conduit parfois à privilégier, pour les formulations de grande diffusion, les produits synthétiques. Puisque la majorité des cosmétiques contiennent une certaine quantité d'huile essentielle comme élément parfumant, il serait probable que ces essences servent aussi à préserver ces cosmétiques tout en leur assurant une odeur agréable. A la limite de la pharmacie et des produits d'hygiène, on notera la présence des huiles essentielles dans les préparations pour bain (bain « calmants » ou « relaxants ») (Bruneton, 1999).

2.6.3. Dans les industries agroalimentaires

Les huiles essentielles sont présentes dans le processus de fabrication de nombreux produits finis destinés aux consommateurs. Ainsi, elles sont utilisées dans l'agroalimentaire (gâteaux, biscuits, sauce, chewing gum, chocolats et bonbons...) pour aromatiser la nourriture.

2.7. Caractérisations chimiques

2.7.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode qui permet de séparer les constituants d'un mélange et éventuellement de les identifier; elle permet également de contrôler la pureté d'une substance.

Le mélange est fixé sur un support appelé phase stationnaire (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque), est entraîné par un solvant approprié appelé éluant (phase mobile) qui migre par capillarité sur la plaque. Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle, chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire. Après migration les taches doivent être révélées. La révélation peut se faire par immersion dans un bain de permanganate de potassium ou de vapeur de diiode ou encore par observation à la lumière UV si la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence. Le rapport frontale R_f caractérisant la position d'un composé sur une plaque est défini par l'expression suivante :

$$R_f = \frac{dx}{ds}$$

Où

dx: distance parcourue par le composé à partir de la ligne de dépôt

ds: distance parcourue par le solvant à partir de la ligne de dépôt

2.7.2-Analyse par rayonnement UV

La spectrophotométrie UV-Visible est basée sur l'absorption de radiations dans les domaines de l'ultraviolet (200-400 nm) et du visible (400-900) par les molécules d'un analyte dilué dans une solution donnée. La loi de Beer Lambert, montre que l'absorbance ou la densité optique **A** est proportionnelle à la concentration de la solution traversée par la radiation.

$$A = \log I_0/I = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

- A est l'absorbance ,sans unité accessible au moyen de spectrophotomètre .
- I/I_0 est la transmittance ou la transmission ($T = I/I_0$).
- ε est le coefficient d'absorption molaire (coefficient d'extinction molaire), exprimée en $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Elle dépend de la longueur d'onde, la nature chimique de l'entité et la température.
- l est la longueur du trajet optique en cm (épaisseur de la solution traversée).
- C est la concentration molaire (mol/L) de l'analyte. Quand C est exprimé en g/l, ε est appelé coefficient d'absorption, il est exprimé en $\text{l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Chapitre 3

Le limonène

3.1. Définition

Le limonène $C_{10}H_{16}$ est un hydrocarbure liquide appartenant à la famille des terpènes. Il est produit naturellement par divers végétaux, notamment les agrumes et représente le constituant majoritaire de toutes les huiles issues des peaux de ces fruits, environ 95 % (Rossi, 2013).

Les principaux synonymes de limonène sont: d-Limonène, (+)-Limonène, (D)-Limonene, (R)-(+)-Limonene, D-(+)-Limonène. La structure du limonène est donnée par la figure 8.

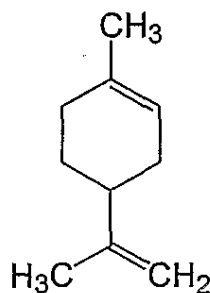


Figure 8. Structure de limonène

3.2. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques

Les propriétés physico-chimiques et organoleptiques sont mentionnées dans le tableau suivant:

Formule brute		$C_{10}H_{16}$
Masse molaire (g/mol)		136.23
Température d'ébullition (°C)		176
Température de fusion (°C)		-75
Masse volumique (g/Cm ³)		0.84
Solubilité	Eau	Insoluble
	Hexane	soluble
Apparence		Liquide incolore
odeur		Parfumée caractéristique des agrumes

Tableau 2. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques du limonène

3.3. Propriétés optiques

Le limonène est une molécule chirale qui existe sous la forme de deux énantiomères (deux formes isomériques) (Figure 9). La chiralité est la propriété que possèdent certaines molécules de ne pas être identiques à leur image dans un miroir. Seule la lumière polarisée peut différencier les deux formes.

- ❖ L'énantiomère d-limonène (le suffixe « d » signifie dextrogyre) dévie à droite le plan de la lumière polarisée.
- ❖ L'énantiomère l-limonène (le suffixe « l » signifie lévogyre) dévie le plan de polarisation vers la gauche.
- ❖ Le dipentène ou dl-limonène est le mélange racémique des deux molécules (d-limonène et l-limonène) (Bégin et Gérin 2010).

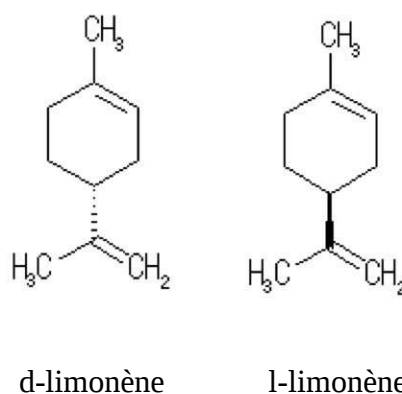


Figure 9. Formes énantiomères du limonène

Le d-limonène est un constituant naturel de certains, plantes, fruits et légumes. On le retrouve dans les huiles essentielles des pelures d'agrumes (orange, citron, lime, etc.), les cornichons et le céleri.

L'autre isomère (l-limonène) se retrouve principalement dans les huiles essentielles de pin, la térébenthine et de menthe.

3.4. La biosynthèse du limonène

Le limonène est biosynthétisé par la plante (Figure 10) en partant soit d'un dérivé d'un sucre, le glycéraldéhyde, soit de l'acétyl-Coenzyme A.

Ce composé permet à la plante de synthétiser deux molécules : le diphosphate d'isopentenyle (IPP) et diphosphate de diméthylallyle (DMAPP). La réaction de ces

molécules l'une avec l'autre conduit au diphosphate de gényrayle (GPP) qui est le précurseur direct du limonène.

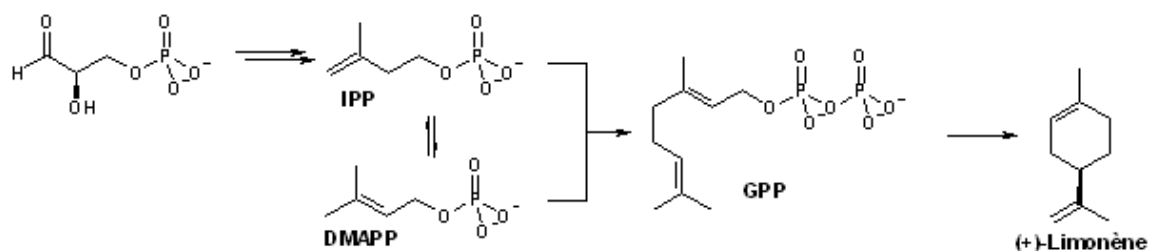


Figure 10. Biosynthèse du limonène

<http://www.exchem.fr/limonene>

3.5. Procédé de production

Le limonène est largement répandu dans la nature. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) rapporte que le d-limonène a été décelé dans plus de 300 huiles essentielles. Le d-limonène est un sous-produit de l'industrie des jus d'oranges, de citrons et de pamplemousses. Il est obtenu à partir de l'huile des pelures de ces agrumes dans laquelle sa concentration peut atteindre 95 % en poids. La récupération du limonène se fait par extraction selon deux méthodes. L'extracteur d'huile brune «Brown Oil Extractor »récupère l'huile avant l'extraction du jus alors que l'extracteur en ligne FMC (« FMC In Line Extractor ») récupère l'huile des fruits pendant le procédé d'extraction du jus. Il s'agit de procédés fonctionnant par bris mécanique des alvéoles contenant l'huile essentielle et qui sont situées dans l'épicarpe des fruits (Bégin et Gérin 2010).

3.6. Utilisations du limonène

Le limonène présente différentes utilisations, parmi celles-ci, nous avons :

3.6.1. En cosmétologie

Le limonène est utilisé depuis un demi-siècle comme arôme dans les parfums, savons, crèmes, lotions.

3.6.2. En pharmacie

a. Thérapie anticancéreuse

Il a été montré que certains terpènes, tel le limonène possédaient une activité anticancéreuse, à la fois in-vitro et in-vivo-. Les mécanismes à la base de cette action ne sont

pas encore bien élucidés, mais des pistes ont cependant été explorées. Ainsi, il semble que le limonène ou son produit de dégradation majoritaire qui est l'acide périllique ne soient pas en eux-mêmes actifs. En revanche, l'ester méthylique de l'acide périllique est identifié comme étant un possible inhibiteur de l'isoprénnylation de certaines protéines cellulaires. Les composés dérivés du limonène sont illustrés par la figure 11.

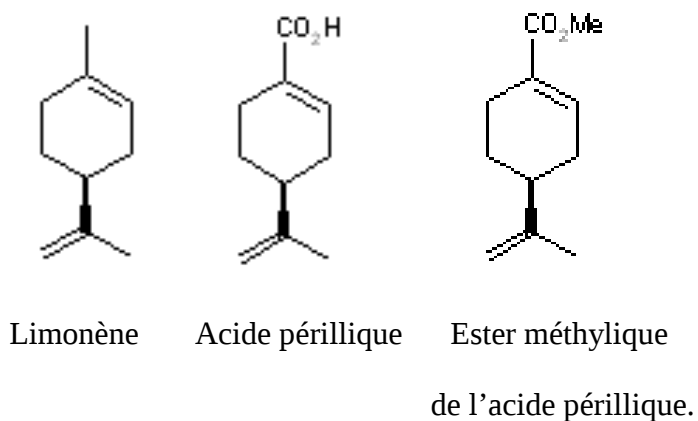


Figure 11. Dérivés du limonène

(<http://www.exchem.fr/limonene>).

L'isoprénnylation consiste à ajouter un groupe farsényl ou géranyl à l'extrémité libre d'un acide carboxylique d'une protéine. La protéine ainsi dénaturée ne va plus assurer son rôle biologique, pouvant entraîner la formation de tumeurs. Inhiber cette dénaturation permet de stopper l'évolution d'un cancer et de réduire la proportion de cellules tumorales. La mise en évidence de ce mécanisme d'action du limonène a ouvert la voie à la préparation d'inhibiteur de cette transformation. Ainsi le limonène a été engagé dans des essais en phase clinique I sur des patients atteints de cancers et semble bien toléré. Certains dérivés du limonène ont prouvés leur activité anticancéreuse sur des tumeurs de la prostate.

b. Des patchs à l'orange

Pour rester dans le domaine médical, il a été mis au point un nouveau type de patch à base de propylène glycol, de dibutylauroylglutamide et de limonène pour délivrer progressivement de l'halopéridol, un médicament utilisé dans le traitement de certaines psychoses et de la schizophrénie. L'utilisation de patch pour délivrer progressivement des médicaments se démocratise peu à peu, en raison des avantages apportés pour le patient. Cependant, les principes actifs doivent traverser la peau et le passage de cette barrière peut poser problème. Le limonène permet justement une meilleure pénétration percutanée (à travers la peau) et la

concentration en l'halopéridol reste ainsi constante dans le sang ([http://www.exchem. fr/limonene](http://www.exchem.fr/limonene)).

3.6.3. Autres utilisations

Parmi les utilisations multiples du limonène, notons ses applications dans la production de résines synthétiques, son utilisation comme solvant dans la substitution des solvants minéraux et en tant que base pour la synthèse de composés aromatiques (Di Giacomo et *al.*, 1992). Il servirait comme matière première dans la synthèse de résines terpéniques, pour la production de succédanés d'huiles essentielles et pour la fabrication d'édulcorants. Il est utilisé aussi comme dégraissant et nettoyant des pâtes de soudage dans l'industrie de l'électronique et des surfaces métalliques (Bégin et Gérin 2000). Il est utilisé en sérigraphie dans la formulation de nettoyants employés pour la régénération (dégravage) des écrans, et généralement considéré comme un bon solvant pour les huiles et Graisses. Enfin le limonène est également utilisé dans la formulation des compositions présentant une activité insecticide contre les fourmis, les araignées, les mouches, les chenilles, etc...

3.7. Limonène et l'Environnement

Le limonène est une substance ubiquiste dans l'environnement. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) rapporte la teneur de ce terpène dans une grande variété d'aliments et d'espèces végétales. Il a été décelé dans l'atmosphère urbaine et forestière, l'air ambiant intérieur, les boues d'épuration et dans l'eau de consommation (Von Burg, 1995). S'il est déversé sur le sol extérieur humide ou sec, le limonène devrait se volatiliser rapidement mais son adsorption pourrait atténuer ce phénomène. Le limonène est considéré comme l'un des solvants les plus photochimiquement réactifs qui se dégrade (IRTA, 1994). Sa présence dans l'atmosphère pourrait contribuer à la diminution globale de l'ozone troposphérique et favoriser ainsi la suppression du smog photochimique. Dans le travail établi par Bégin et Gérin, (2000), il est rapporté que des auteurs auraient provoqué la biodégradation du limonène à l'aide de bactéries (par exemple: pseudomonas, bactéries intestinales, *Bacillus stearothermophilus*).

3.7. Aspects biologiques et toxicologiques

Lorsqu'une molécule est produite à raison de plusieurs milliers de tonnes par an et qu'autant d'applications aient pu lui être trouvées, la question de sa toxicité se pose. Suite à de nombreuses études sur le sujet, des données pertinentes sont désormais disponibles (Bégin et

Gérin 2010). Le limonène pur n'est pas un agent sensibilisant de la peau et n'est pas allergène. En revanche, ses produits d'oxydation par l'air (notamment l'oxyde de limonène) sont irritants et peuvent provoquer l'allergie (Karlberg et al., 1993). Il a été noté que l'oxydation du limonène dans l'air favorise la formation des nanoparticules solides et conduit également à la formation de divers composés oxygénés (Vartiainen, 2006). En raison de leur taille, ces particules peuvent pénétrer dans les poumons et si l'on ne connaît pas encore la toxicité de celles-ci, l'oxydation du limonène (présent dans divers produits ménagers) est à envisager comme pouvant potentiellement entraîner des effets néfastes. À faible dose le limonène est non toxique chez l'humain. Il est en effet classé dans la catégorie GRAS « Generally Recognized as Safe » généralement considéré sans danger (Wallace, 1991). Le limonène a été testé avec succès comme agent de promotion de la pénétration transcutanée de médicaments lipophiles. Il n'a pas été prouvé que ce produit soit cancérigène ou génotoxique pour l'homme. Le Centre international de recherche sur le cancer a classé le d-limonène au niveau 3 : non classable comme cancérigène chez l'homme (Bégin et Gérin, 2000).

Première partie
Etude bibliographique

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles et le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter et des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire.

Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules odorantes constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation comme cela est indiqué dans la figure 12.

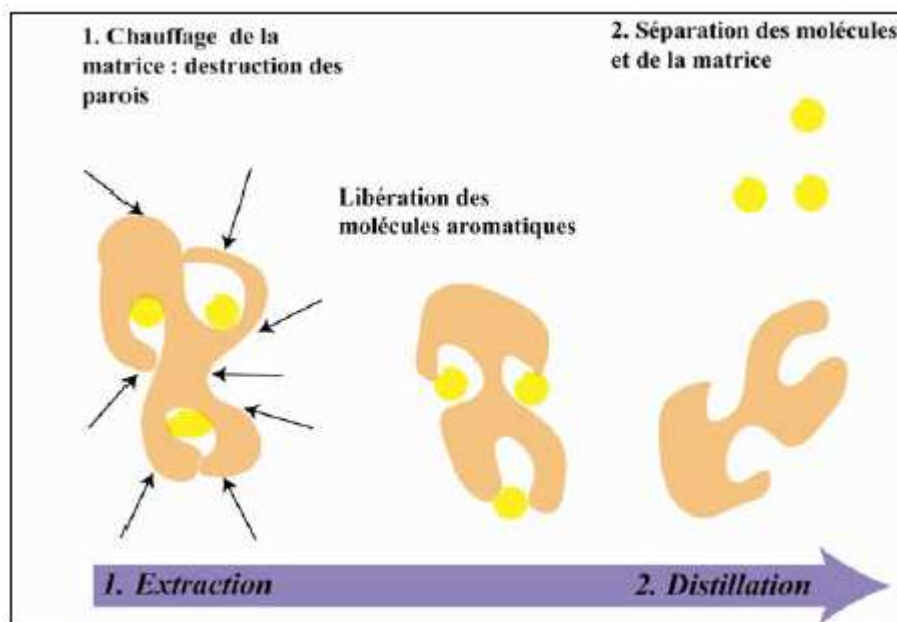


Figure 12. Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle (Lucchesi, 2005)

Les principales méthodes d'extraction sont :

4.1. Hydrodistillation

Le procédé d'hydrodistillation consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. De manière générale, au laboratoire, le système utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger (Figure 13).

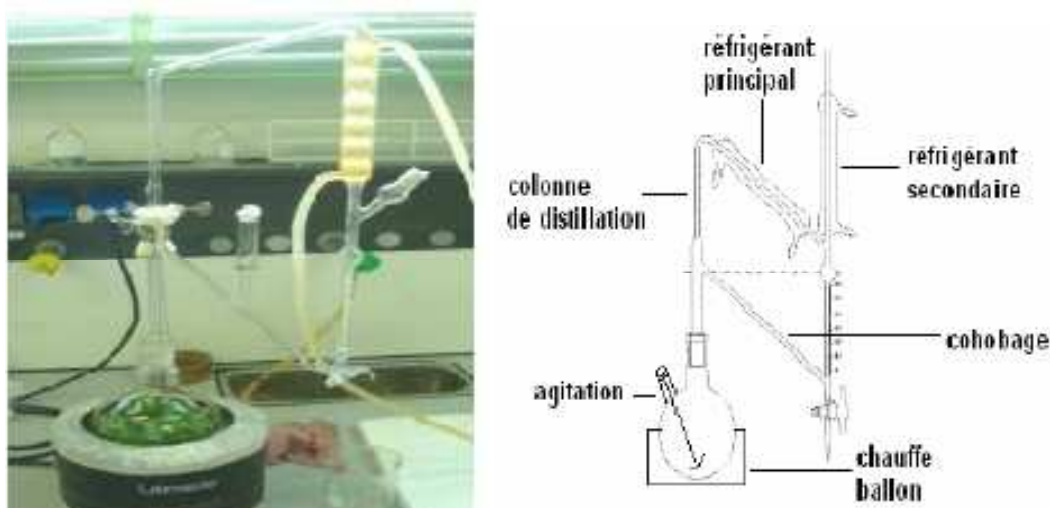


Figure 13. Le montage d'hydrodistillation

4.2. Entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur constitue le moyen le plus répandu pour extraire les molécules volatiles. Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, mais la vapeur d'eau produite par une chaudière est injectée et traverse la matière végétale de bas en haut, éclate les cellules et entraîne les molécules volatiles. En traversant le réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composés volatils se condense en un mélange hétérogène composé d'huile essentielle et d'hydrolat (Bruneton.1999). On peut également récupérer la phase aqueuse, comportant une faible proportion de composés aromatiques, qui porte alors le nom d'eau florale (Figure 14).

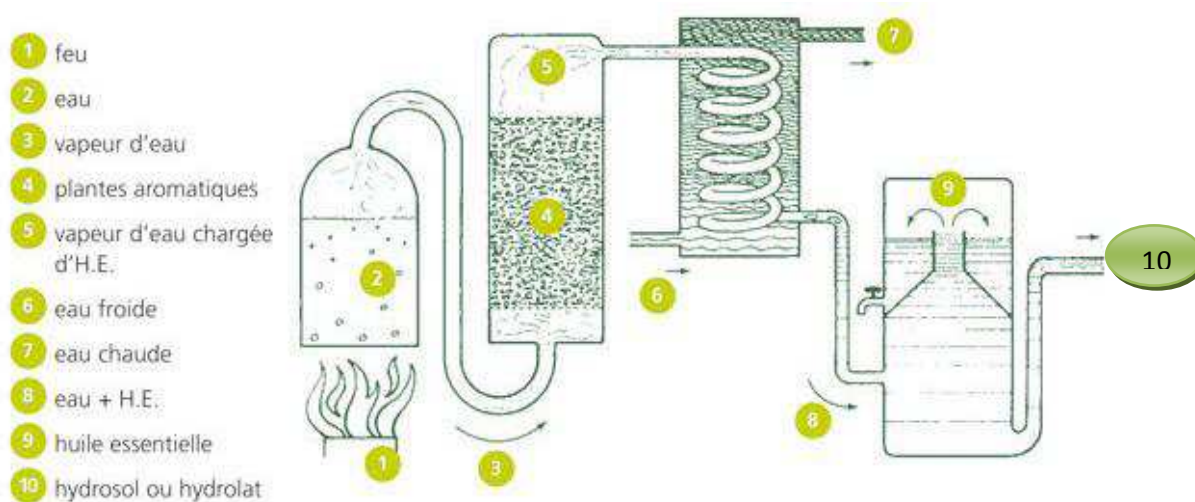


Figure 14. Entraînement à la vapeur d'eau ascendante

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

4.3. Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion consiste à pulser la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas (Figure 15). Ainsi, le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant, contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, par l'économie du temps et d'énergie.

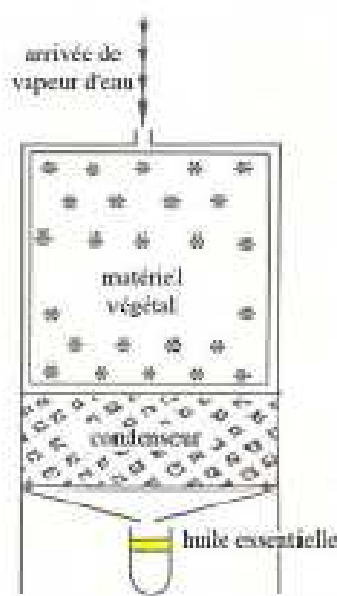


Figure 15. Montage d'hydrodiffusion

4.4. Extraction par solvant sur appareillage soxhlet

L'extraction par solvant organique à chaud est largement utilisée. Le principe de cette méthode consiste à immerger les plantes dans un solvant organique volatil à chaud, soit pour obtenir des produits que l'on ne peut extraire par un autre procédé, soit en vue de rendements plus élevés (Bruneton, 1999). Dans l'appareillage soxhlet (Figure 16), un système de régénération interne du solvant permet de mettre en contact en permanence le végétal contenu dans une cartouche de cellulose avec du solvant pur. Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : solubilité, sélectivité, stabilité, inertie chimique et température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale. Ce procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite.



Figure 16. Appareil soxhlet

4.5. Extraction par chauffage à reflux total

Cette méthode est utilisée pour accélérer une réaction chimique en évitant les pertes de réactifs ou de produit. Le ballon contenant le mélange réactionnel est surmonté d'un réfrigérant. Lors du chauffage, les vapeurs s'élèvent, vont dans le réfrigérant puis se condensent et retombent dans le ballon.

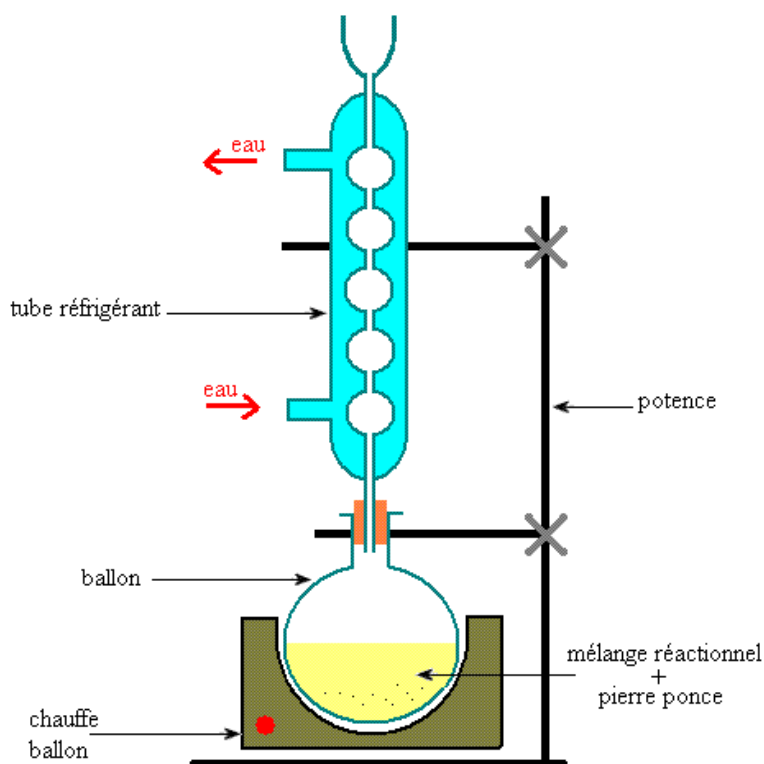


Figure 17. Montage général à reflux

4.6. Extraction à froid

Les huiles essentielles de fruits d'agrumes ont une très grande importance dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Cependant ce sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique, qui est l'expression à froid. Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par procédé mécanique (compression) les poches (cellules sécrétrices) qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits renfermant l'huile essentielle. L'huile libérée est ensuite recueillie par un courant d'eau.

La société américaine « Food Machinery Corporation » (F.M.C.) est parvenue à extraire simultanément le jus et l'essence d'agrumes par la machine d'extraction « in line » (Figure 16). Cette machine relativement complexe, permet à la fois l'extraction du jus et de l'huile essentielle du fruit sans que ces deux produits soient en contact. Pendant la compression du fruit entre deux moules lacérants pour en extraire l'huile essentielle, un cylindre pénètre le fruit pour en extraire le jus, qui est ainsi récupéré dans le cylindre alors qu'un jet d'eau entraîne l'huile essentielle (Kimball, 1999).

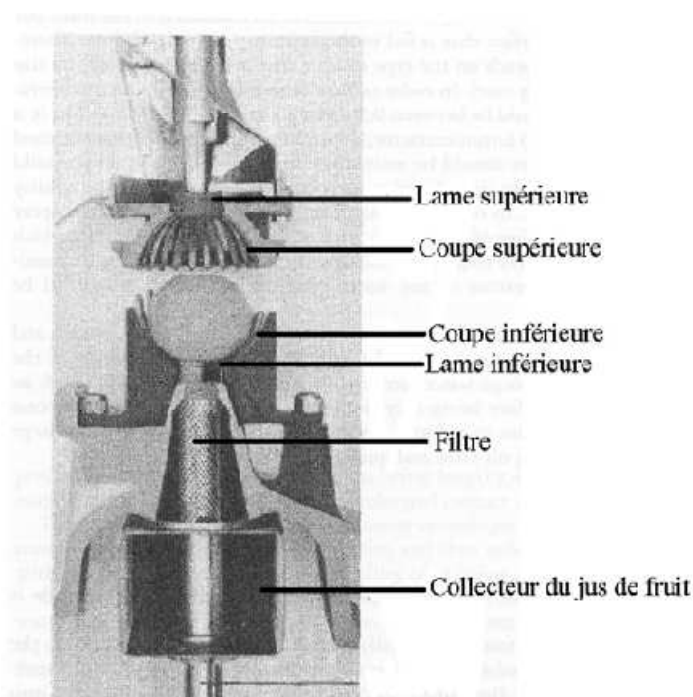


Figure 18. Schéma représentatif de l'extraction FMC « in-line »

4.7. Extraction assistée par micro-ondes

Le principe de cette méthode consiste à chauffer la plante par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte où la pression est réduite de façon séquentielle. Les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (Marrouf, 2009). Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile. La figure 19 illustre l'extraction par micro-onde.

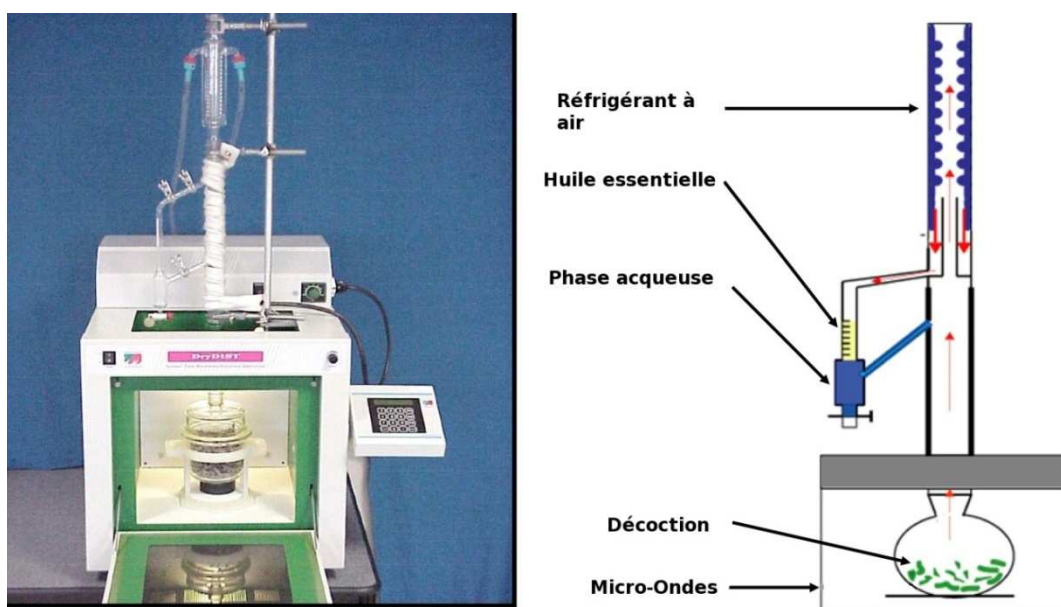


Figure 19. Schéma du procédé d'extraction par micro-ondes.

4.8. Extraction par ultrasons

La matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant de manière générale, et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des composés aromatique ou des essences de plantes, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (Chemat et al., 2003).

4.8. Extraction par CO₂ supercritique

Cette technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de

carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie (Figure 20). Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant.

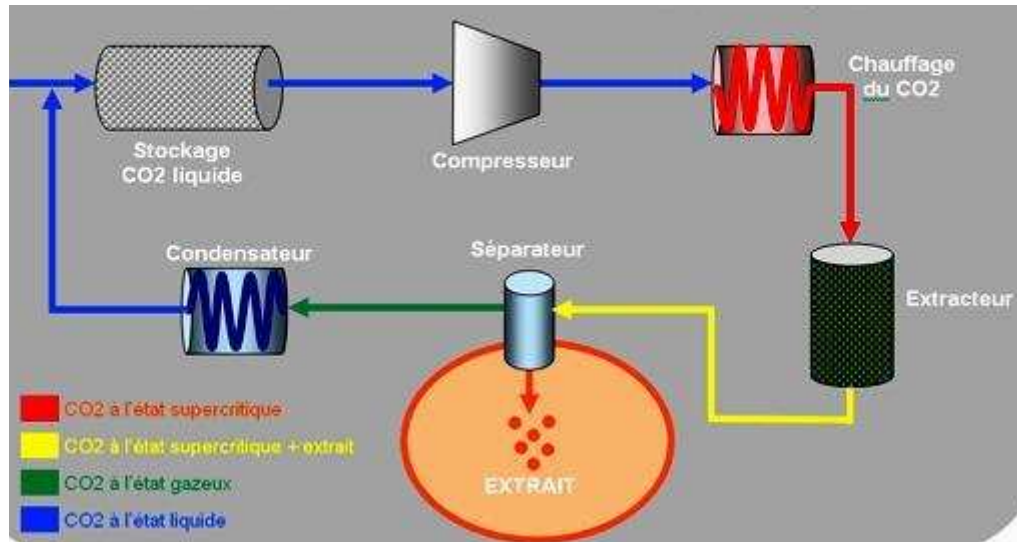


Figure 20 .Schéma d'extraction par le CO₂ supercritique

A decorative frame resembling a scroll, with a vertical strip on the left and a horizontal strip at the top, both featuring rounded ends and a light gray shaded area. The text is centered within the horizontal strip.

Deuxième Partie
Etude Expérimentale

Première partie

Etude bibliographique

Le matériel et les méthodes utilisées lors de procédé d'extraction de limonène sont décrits dans ce chapitre.

1. Matériel

1.1. Matériel végétal et opérations de prétraitement

Le matériel végétal ayant fait l'objet de notre étude est constitué de zestes ou écorces d'oranges. Ces oranges proviennent de la plantation d'agrumes située à Oued-Aissi (7 Km environ à l'est de la ville de Tizi-Ouzou). Les oranges de variété « Thompson » utilisées ont été collectées au mois de mars de l'année 2015.

Les fruits fraîchement récoltés ont été d'abord nettoyés, lavés et ensuite séchés avec une serviette en coton. Les écorces entières ont été coupées en dés (Figure 21) à l'aide d'un couteau en acier inoxydable après avoir être séparées de l'endocarpe.



Figure 21. Ecorces d'orange coupées

1.1.1. Séchage

Les zestes réduits en dés sont séchés dans une étuve portée à une température de 60 °C pendant une durée de 13 heures.

1.1.2. Broyage

Les zestes d'oranges séchées subissent un broyage à l'aide d'un broyeur à couteau de marque Moulinex. Après broyage, les écorces d'oranges sont réduites à l'état de poudre (Figure 22).



Figure 22. Ecorces d'oranges broyées

1.2. Méthodes

1.2.1. Détermination de la teneur en matières volatiles

La teneur en matières volatiles des écorces d'orange broyées a été déterminée par la méthode suivante:

Une masse (m_0) de 10 g d'écorces d'oranges broyées a été introduite dans une étuve portée à une température de $(86 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Ce matériel végétal reste soumis au séchage jusqu'à l'obtention d'une masse constante (Figure 23). L'opération a été répétée trois fois.

La teneur en matières volatiles est donnée par la relation suivante :

$$T_{M.v}(\%) = \frac{m_0 - m}{m_0} \times 100$$

m_0 : masse de l'échantillon avant le séchage.

m : masse de l'échantillon après le séchage.



Figure 23. Détermination de la teneur en matières volatiles d'écorces d'orange broyées

1.2.2. Extraction

Trois méthodes d'extraction ont été utilisées pour obtenir le limonène à partir des zestes d'orange: méthodes à reflux total, soxhlet et hydrodistillation.

1.2.2.1. Extraction à reflux total

Le système d'extraction utilisé est composé d'un ballon de capacité 250 ml qui contient le mélange réactionnel (Ecorces d'orange + solvant) muni d'un réfrigérant afin d'obtenir un reflux total. Ce réacteur baigne dans un cristalliseur rempli d'huile de silicone déposé sur une plaque chauffante munie d'une agitation magnétique (300 tr/min). Le montage est illustré par la figure 24.

La prise d'essai soumise à l'extraction est de 20 g. Cette quantité de poudre d'écorces d'orange est introduite dans un ballon contenant de l'hexane comme solvant.



Figure 24.Montage de l'extraction à reflux total

Nous procédons à la recherche des conditions optimales de l'extraction (température, temps de contact et rapport liquide/solide (L/S)).

a) Effet de la température du bain

La détermination de la température optimale de l'extraction est effectuée en maintenant le temps de contact et le rapport liquide/solide constants ($t = 20$ min, $L/S = 5$ ml/g).

Les valeurs des températures que nous avons utilisées sont : 24,7 ; 50 ; 70 et 80 °C.

b) Effet du temps de contact

L'étude de l'influence de ce paramètre sur l'extraction est effectuée en maintenant la température et le rapport L/S constants ($T =$ température optimale = 70 °C, $L/S = 5$ ml/g).

Les durées d'extraction étudiées sont : 10 ; 20 ; 30 ; 50 ; 70 ; 80 et 90 min.

c) Effet du rapport liquide-solide (L/S)

La recherche du rapport L/S optimal, c'est-à-dire le meilleur volume de solvant pour une quantité de 20 g d'écorces broyées nécessaire à l'obtention d'un rendement maximum est effectuée en gardant constants la température et le temps de contact ($T =$ température optimale = 70 °C, $t =$ temps de contact optimal = 30 min).

Les valeurs du rapport L/S étudiées sont : 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 et 11 ml/g.

Après chaque extraction, le mélange subit une filtration sur papier filtre à pression atmosphérique (Figure 25).



Figure 25. Filtration

Le filtrat (huile essentielle et solvant) obtenu subit ensuite une distillation qui permet de séparer le solvant de l'huile essentielle. La distillation est donnée par la figure 26.



Figure 26. Montage de distillation

L'huile essentielle récupérée subit des séchages de durée 20 min dans une étuve portée à 80 °C (Figure 27) jusqu'à obtention d'un poids constant.



Figure 27. Montage de séchage

1.2.2.2. Extraction dans un soxhlet

L'extracteur de Soxhlet permet l'extraction des huiles essentielles à partir de la matière végétale de manière épuisante. Une cartouche en cellulose remplie de matière végétale (20g) est introduite à l'intérieur de l'extracteur. La partie inférieure du soxhlet est connectée à un ballon de capacité 250 ml contenant un solvant constitué d'hexane. La partie supérieure de cet appareil est reliée à un réfrigérant qui permet la condensation des vapeurs de solvant.

L'appareillage utilisé est représenté par la figure 28.

Le ballon contenant le solvant d'extraction (hexane) est chauffé à l'aide d'un bain de sable porté à une température voisine de celle d'ébullition du solvant employée (68 °C).

Le solvant ainsi vaporisé puis condensé dans l'extracteur tout en restant en contact avec la matière végétale, permet la récupération de l'huile essentielle. L'opération est menée jusqu'à épuisement (pendant environ 6 heures). Le solvant collecté dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et la matière végétale est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est continue jusqu'à épuisement de la matière végétale chargée dans la cartouche.

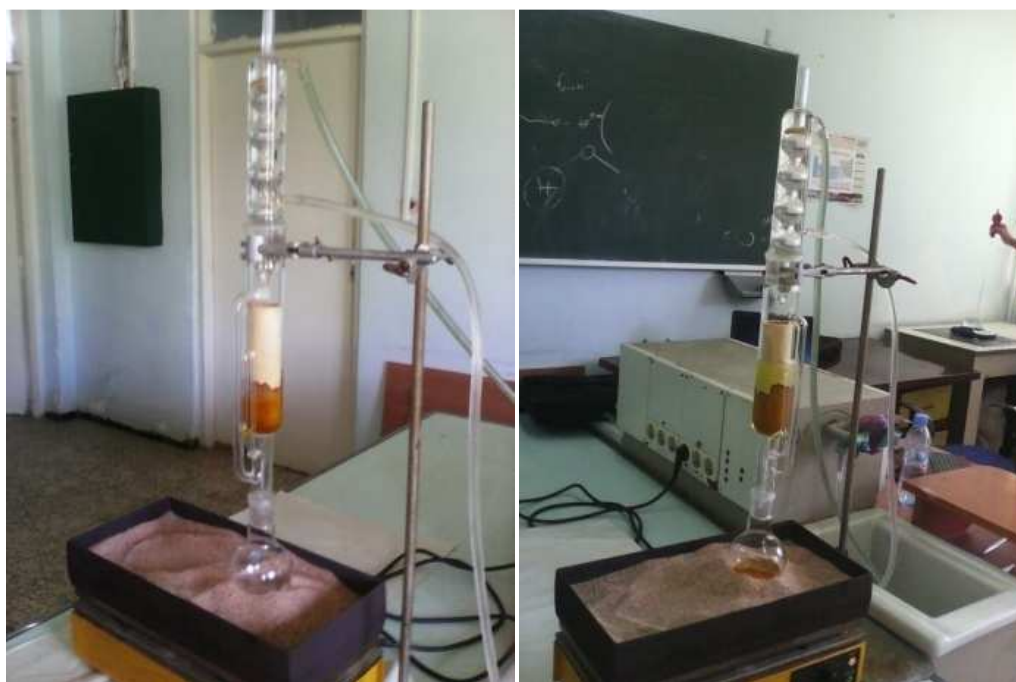


Figure 28. Extraction par soxhlet

A la fin de l'extraction, nous procédons à la récupération du solvant par distillation.

Les huiles extraites subissent un séchage à l'étuve portée à 80 °C, afin d'éliminer les traces de solvant. Cette opération dure jusqu'à obtention d'un poids constant.

1.2.2.3. Hydrodistillation

Le dispositif expérimental d'hydrodistillation utilisé dans notre travail est représenté par la figure 29. Une masse 10 g de la matière végétale sont introduites avec 150 ml d'eau distillée dans un ballon de 250 ml. Une fois mis en place, le ballon est baigné dans un cristalliseur contenant de l'huile de silicone. La source de chaleur utilisée est constituée d'une plaque chauffante.

L'huile essentielle extraite à partir des zestes d'oranges est entraînée par la vapeur d'eau. Le distillat (huile essentielle-vapeur d'eau) se condense au niveau du condenseur et est collecté dans un ballon à fond plat. La température d'extraction utilisée est celle de l'azéotropes ($T = 97.4\text{ }^{\circ}\text{C}$). La durée de l'extraction est estimée à 2h 30min, c'est-à-dire une fois qui ne reste plus dans le ballon qu'environ 50 % du volume initial de la solution. Nous ajoutons au distillat du chlorure de sodium (NaCl) qui consiste à rendre l'huile essentielle insoluble dans l'eau. Cette opération est suivie de l'ajout de 3 ml de cyclohexane au distillat. L'huile essentielle se distingue de l'hydrolat (eau aromatique) par sa différence de densité et de couleur. L'huile essentielle est récupérée par décantation à l'aide d'une ampoule à décanter dans un ballon. Les montages de distillat et décantation sont donnés par la figure 30.



Figure 29. Montage de l'extraction par hydrodistillation



Figure 30. Distillat et décantation

1.2.2.4. Rendement d'extraction

Le rendement de chacune des extractions utilisées est exprimé par rapport à la matière sèche est donné par l'expression suivante:

$$\rho = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

ρ : rendement par rapport à la matière sèche

m_1 : masse d'huile essentielle extraite

m_2 : masse de la prise d'essai (écorces d'orange)

1.2.3. Méthodes d'analyse

Les méthodes d'analyse utilisées sont les suivantes :

1.2.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'échantillon est dissout dans l'hexane. Cette solution est déposée en un point E (Echantillon) à environ 1 cm de la partie inférieure de la plaque qui est recouverte de gel de silice 60 G (phase stationnaire). A 1 cm environ du point E, se trouve l'échantillon de référence (limonène) dissout dans l'hexane. L'échantillon et la référence sont déposés sur la plaque à l'aide d'un cure dent.

Cette plaque est introduite dans un b cher (Figure 31) contenant l'éluant (la phase mobile) qui est constitué, d'un mélange binaire de deux solvants qui sont : le cyclohexane et l'éther avec des proportions volumiques de 50 % (Figure 32). Le niveau de l'éluant ne dépasse pas

0.5 cm du bord inférieur de la plaque, la phase mobile migre de bas en haut par capillarité le long de la phase stationnaire entraînant les constituants de l'échantillon. Une fois que le solvant atteint la ligne de front (1 cm du bord supérieur de la plaque chromatographique, nous retirons la plaque du bécher, puis nous la séchant à l'air libre et à l'étuve à 40 °C. Pour la révélation, nous utilisons une solution de permanganate de potassium (KMnO_4) de concentration 3 g/l. Nous introduisons la plaque dans la solution de KMnO_4 qui nous séchons ensuite à l'air libre. Après cela, les différents constituants apparaissent sous forme de taches. Pour caractériser la position du limonène sur la plaque nous calculons le rapport frontale R_f qui est défini par l'expression suivante :

$$R_f = \frac{dx}{ds}$$

Où

dx: distance parcourue par le composé à partir de la ligne de dépôt

ds: distance parcourue par le solvant à partir de la ligne de dépôt

Cette démarche est effectuée pour toutes les huiles essentielles extraites par les trois procédés.

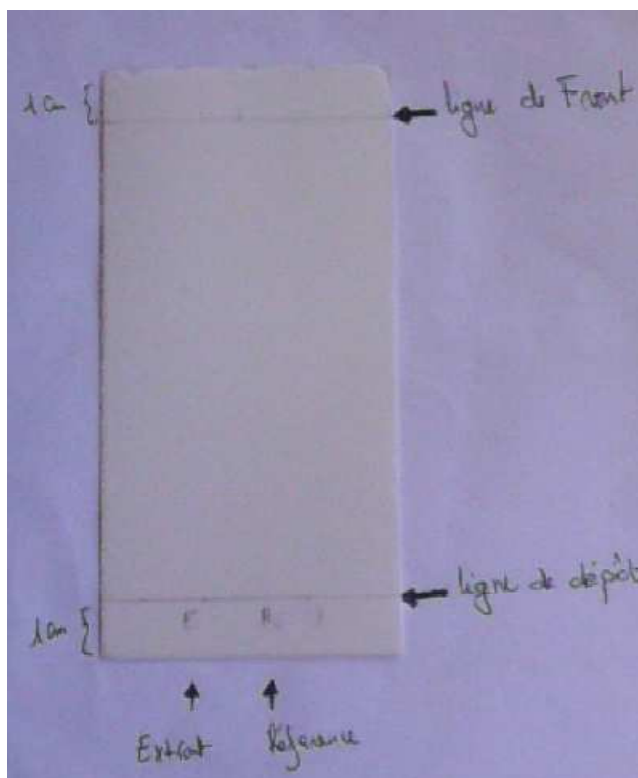


Figure 31. Plaque CCM



Figure 32. Eluant

1.2.3.2- UV-Visible

Les échantillons d'huile et le limonène pur ont été dissouts dans le cyclohexane (C_6H_{12}) et introduits dans des cellules en quartz de 1 cm d'épaisseur. Les mesures de l'absorbance ont été enregistrées sur un appareil UV/Visible de marque Shimadzu 1601PC.

1.2.4-Mesure de l'indice de réfraction

La détermination de l'indice de réfraction des huiles essentielles obtenues par les différents procédés d'extraction est effectuée selon la norme Afnor NF T 75-112.

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence (θ_i) et le sinus de l'angle de réfraction (θ_r) d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante. La longueur d'onde spécifiée ou de référence est $\lambda = (589.3 \pm 0.3)$ nm et la température de référence est de 20°C. L'indice de réfraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre de marque Schmidt Hensch (Figure 33).

Mode opératoire

Les principales étapes de la détermination de l'indice de réfraction d'un composé chimique donné sont :

- Orienter le prisme du réfractomètre vers la lumière
- Utiliser un bain thermostaté afin d'effectuer les analyse à température constante.
- Etalonner le réfractomètre en utilisant l'éthanol absolu à 20 °C.

- Placer l'échantillon pour essai dans le réfractomètre, attendre que la température soit stable, prendre ensuite la mesure.
- La relation utilisée pour déterminer l'indice de réfraction d'un composé chimique à une température donnée est la suivante :

$$n^{20} = n^t + 0.00045(t-20)$$

n^t : la valeur lue, obtenue à la température t à laquelle a été effectuée la détermination

n^{20} : indice de réfraction

0.00045 : facteur de corrélation

t : température à laquelle la mesure est effectuée



Figure 33. Réfractomètre

Chapitre 4

Les méthodes d'extraction

2.1. Teneur en matières volatiles

La teneur en matières volatiles des zestes d'orange soumis aux différentes extractions est 6.47%. Cette valeur représente la moyenne de trois déterminations.

2.2. Extraction de l'huile essentielle

2.2.1. Extraction à reflux total

a) Effet de la température du bain

Les valeurs des rendements de l'extraction de l'huile essentielle à partir des zestes d'orange obtenues en faisant varier la température sont données dans la figure 34.

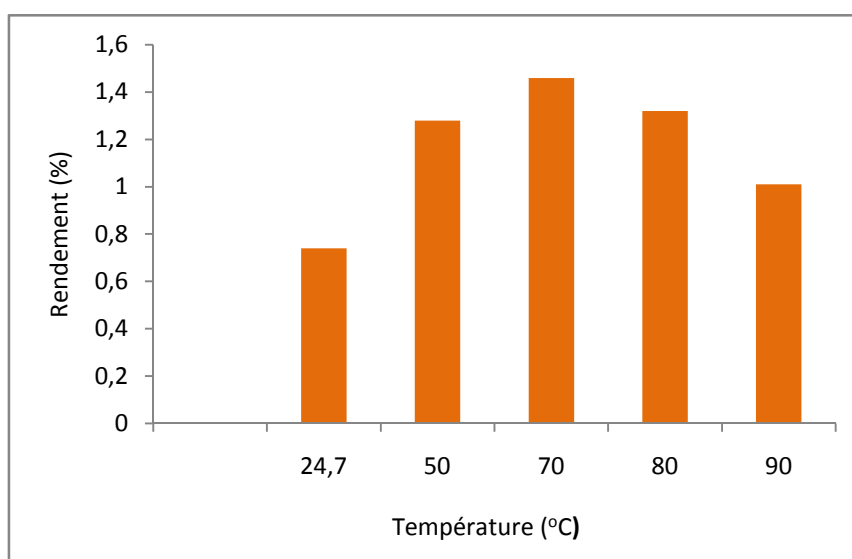


Figure 34. Effet de la température sur le rendement de l'extraction à reflux total

D'après la figure 34, le rendement de l'extraction de l'huile essentielle à partir des zestes d'orange augmente de manière significative avec la température, jusqu'à l'obtention d'une valeur limite (maximale) qui est de 1.41 %. La température correspondante à ce résultat est de 70 °C (température optimale de l'extraction). Le passage de la température ambiante (24.7 °C) jusqu'à la température optimale (70 °C) engendre une variation du rendement qui est de 97.3 %. Pour des valeurs de température supérieure à 70 °C, le rendement de l'extraction diminue. Cette diminution pourrait être attribuée à la dégradation de l'huile essentielle à des températures élevées.

b) Effet du temps de contact

Les valeurs du rendement de l'extraction de l'huile essentielle dans un réacteur à reflux en fonction du temps de contact sont données dans la figure 35.

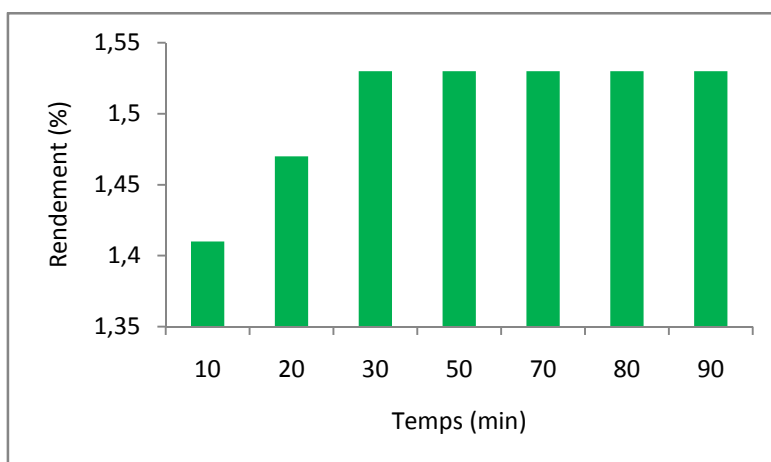


Figure 35. Influence du temps de contact sur le rendement d'extraction

Les résultats consignés dans la figure 35 montrent une augmentation du rendement de l'extraction de l'huile essentielle avec le temps de contact. A partir d'une durée d'extraction de 30 min, le rendement devient constant (1,53 %). Ce temps de 30 min constitue la valeur optimale de la durée de l'extraction. Pour les temps de contact 10 min et 30 min, la variation du rendement de l'extraction observée est 8,51%.

c) Effet du rapport liquide-solide (L/S)

Les valeurs des rendements de l'huile essentielle sont données dans la figure 36

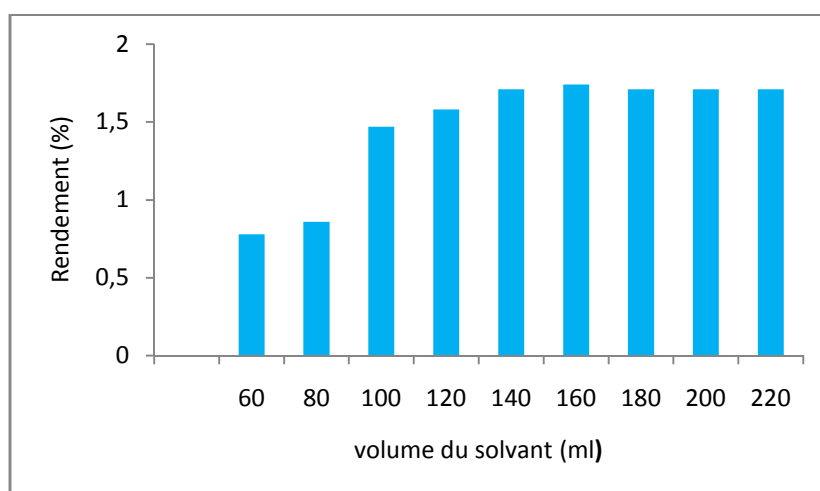


Figure 36. Evaluation du rendement en fonction du volume de solvant

D'après les résultats donnés par la figure 36, le rendement de l'extraction croit fortement avec le volume du solvant utilisé jusqu'à l'obtention d'un palier. Le volume optimal de solvant est dans ce cas 140 ml. Le rendement en huile essentielle correspondant à cette valeur est de 1.71%.

Lorsque le volume du solvant croit de 60 ml à 140 ml, nous observons une variation du rendement de 125%.

Conclusion

D'après cette étude paramétrique, les conditions optimales obtenues de l'extraction sont :

- Température: 70 °C
- Temps de contact: 30 min
- Rapport L/S: 7ml/g

2.2.2. Extraction dans un soxhlet

Le rendement obtenu par ce procédé d'extraction pour une durée de 6 h est 2.43 %. Comme cette extraction est épuisante, le rendement obtenu est maximum. Cette valeur est largement supérieure à celle obtenue (0.95%) dans le cas de l'extraction du limonène à partir des écorces sèches de citron par Lopresto et al (2014). Ces auteurs ont utilisé l'hexane comme solvant à la température de 68 °C. La durée de l'extraction est de 4 h. La différence de rendement constatée peut être due à la nature de l'agrupe utilisé et à la durée de l'extraction.

2.2.3. Hydrodistillation

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle obtenu par hydrodistillation à partir des écorces d'orange est de 0.43 %. Ce rendement est obtenu au bout d'une durée de 2 h 30 min.

L'huile essentielle récupérée est incolore et présente une odeur caractéristique de l'orange. Cette valeur du rendement est très inférieure à celle obtenue par Atti-Santos et al. (2000) dans le cas de l'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles des limes. Ces auteurs ont obtenu un rendement de 2.5 % pour une durée de 2 h30 min. Cette différence avec nos résultats peut être expliquée par la nature de l'espèce d'agrupe utilisée (Rega et al., 2003) et par le choix de la période de récolte (Kelen et Tepe, 2008).

D'après Verkiari et al. (2002), le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, le séchage et la méthode d'extraction employée, sont des facteurs qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement.

2.2.4. Etude comparative entre les trois méthodes d'extraction utilisées

Les résultats de l'étude comparative entre les trois méthodes d'extraction du limonène utilisées sont donnés par la figure 37.

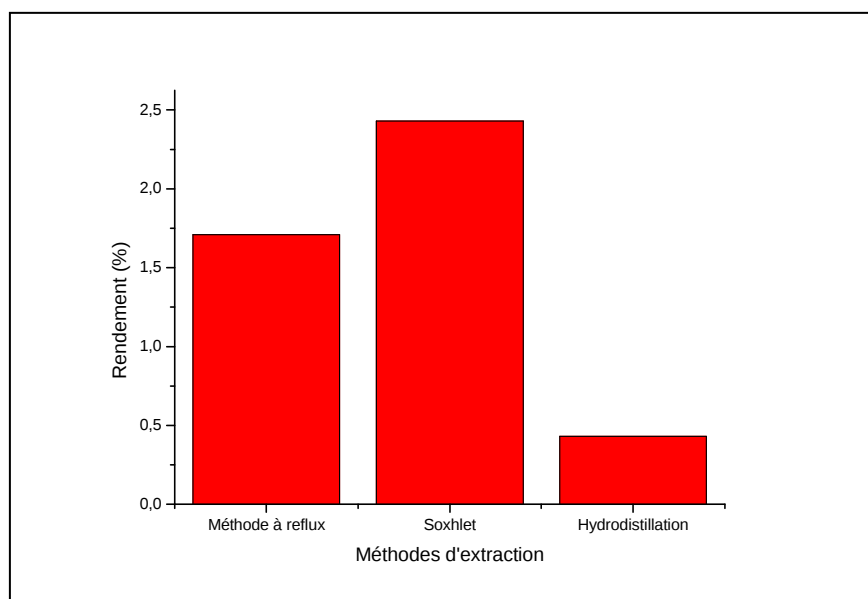


Figure 37. Rendement en huile essentielle en fonction du procédé utilisé

La figure 37 montre que comparativement aux méthodes à reflux total et hydrodistillation, le procédé qui permet l'obtention d'un meilleur rendement en huile essentielle à partir des zestes d'orange est l'extraction au soxhlet qui est une extraction épuisante.

Par rapport à l'hydrodistillation, l'extraction à reflux total permet l'obtention d'un meilleur rendement en huile essentielle.

Les résultats obtenus par les trois méthodes sont respectivement: 0.43 % (hydrodistillation), 1.71 % (méthode à reflux total) et 2.43 % (méthode au soxhlet).

Les huiles essentielles d'écorces d'oranges extraites par les méthodes à reflux et soxhlet ont un aspect huileux visqueux, de couleur jaune orangé, contrairement à celle obtenue par hydrodistillation qui est très fluide avec une couleur transparente. Toutes les huiles extraites ont une odeur caractéristique et fruitée d'écorces d'orange.

L'aspect des huiles essentielles obtenues par les différentes méthodes d'extraction est donné par la figure 38.



Méthode à reflux

Soxhlet

Hydrodistillation

Figure 38. Aspect des huiles essentielles obtenues par les différentes méthodes d'extraction

2.3. Analyses physico-chimiques

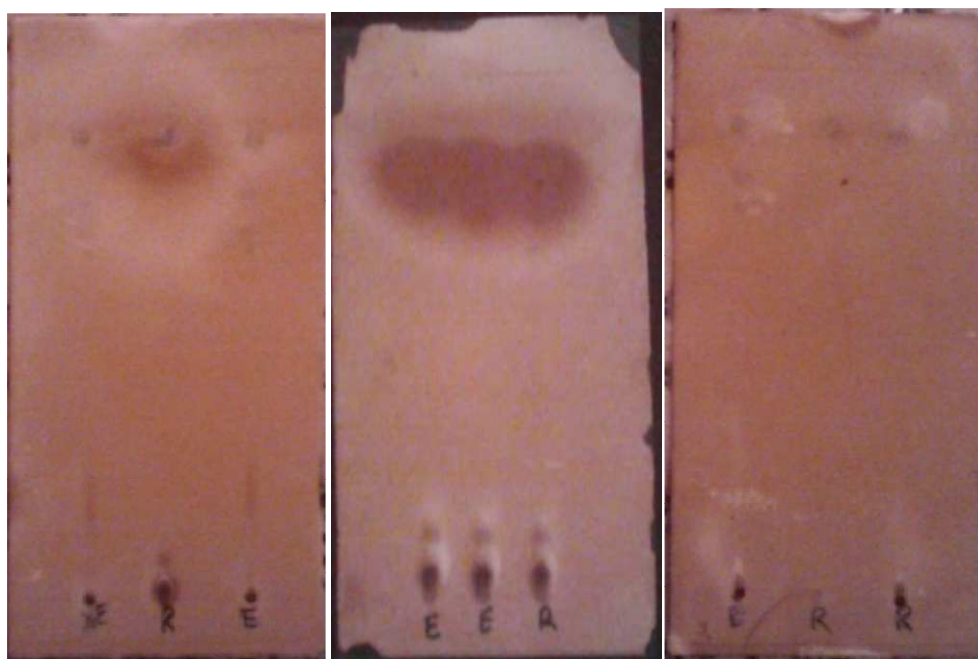
Les analyses physico-chimiques utilisées pour caractériser les huiles essentielles obtenues par les différents procédés d'extraction sont:

2.3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse par CCM (Figure 39) montre que les huiles essentielles extraites à partir des zestes d'orange sont constituées de limonène ($R_f = 0.93$ pour la méthode à reflux total et 0.82 pour la méthode au soxhlet) et d'autres composés non identifiés. Le rapport frontal du limonène identifié est le même que celui du limonène constituant la référence. La tache intense correspondante au limonène sur le chromatogramme laisse supposer que celui-ci constitue le composé majoritaire. Parmi les composés non identifiés, nous pouvons penser au citral qui est responsable de la couleur jaune orangée de l'huile essentielle obtenue par ces deux méthodes.

L'analyse CCM de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation montre la présence d'une seule tache ayant un rapport frontal identique à celui du limonène pur ($R_f = 0.79$). L'absence d'autres taches que celle du limonène montre que notre huile extraite est composée seulement du limonène.

Les chromatogrammes correspondants aux différents extraits sont illustrés par la figure 39.



a) Extrait au soxhlet b) Extrait par hydrodistillation c) Extrait à reflux

Figure 39. Chromatogrammes

2.3.2. UV-Visible

Les spectres UV-Visible des huiles extraites par les trois méthodes (reflux total, soxhlet et hydrodistillation) et celui du limonène pur sont donnés par les figures 40, 41, 42 et 43.

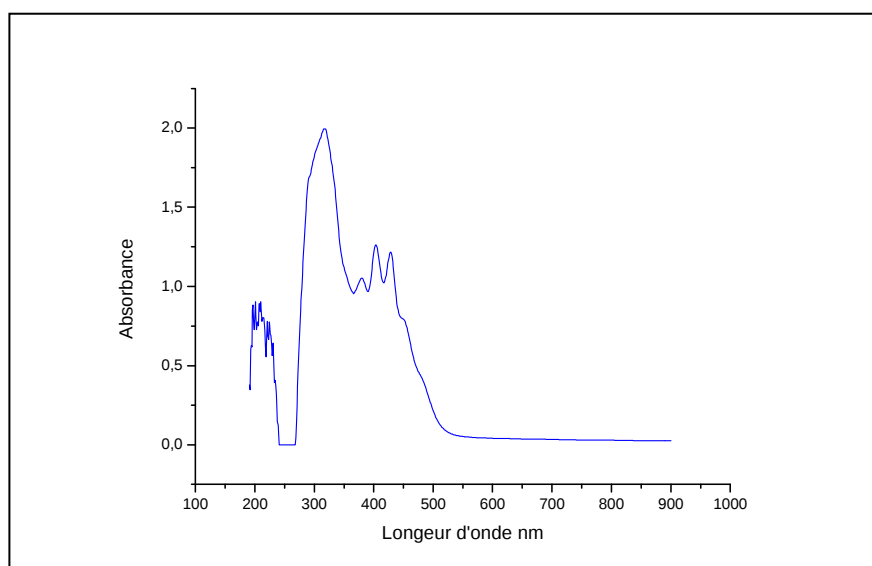


Figure 40. Spectre UV/Visible de l'huile essentielle extraite par la méthode à reflux total

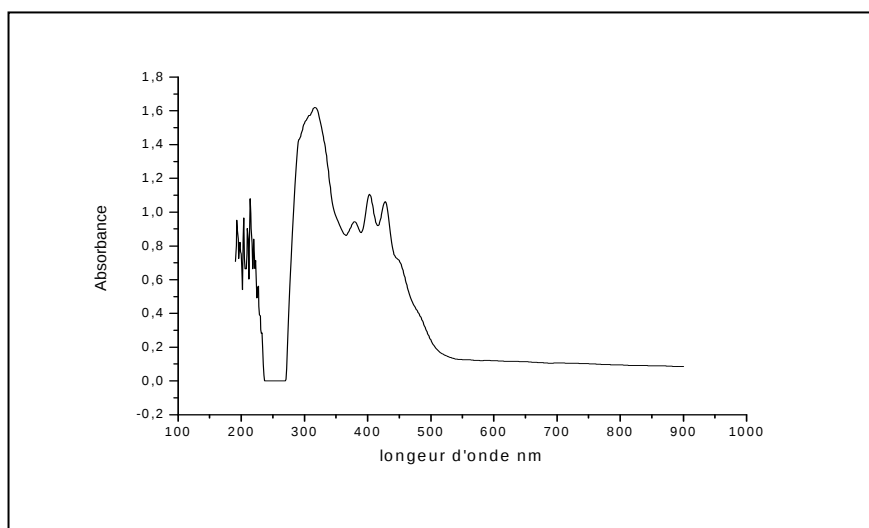


Figure 41. Spectre UV-Visible de l'huile essentielle extraite au soxhlet

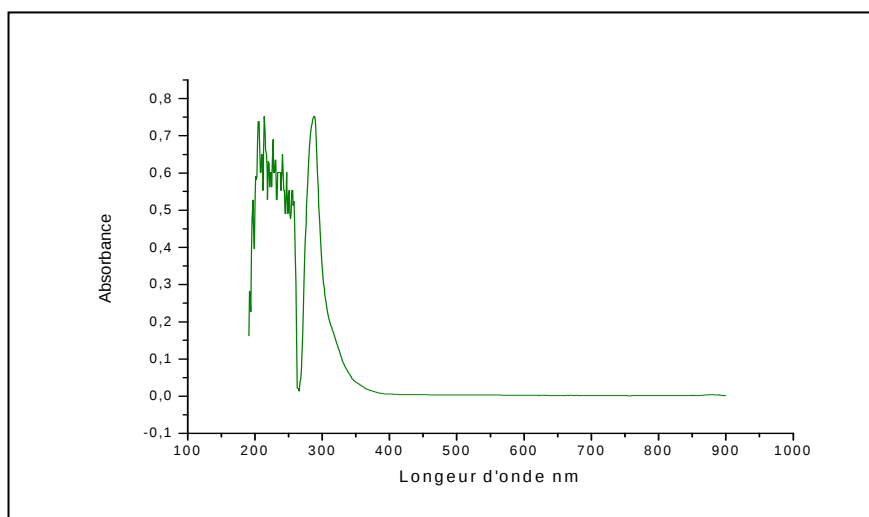


Figure 42. Spectre UV-Visible de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation

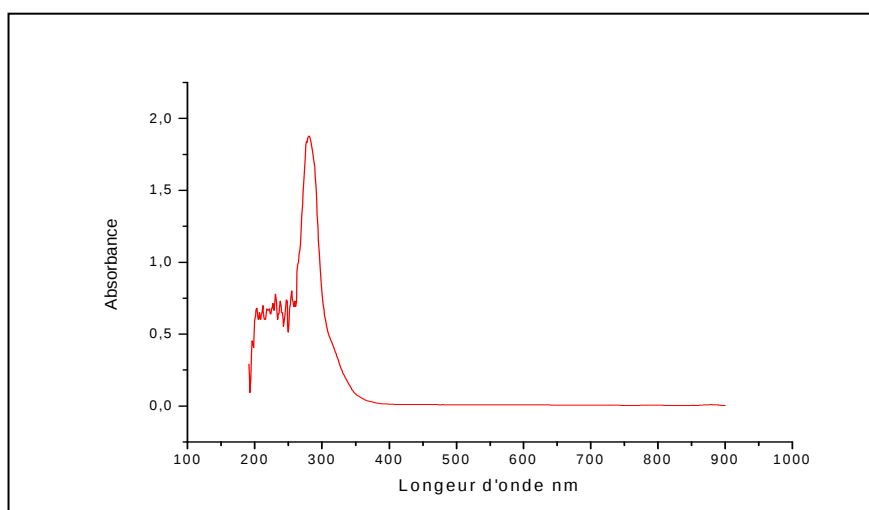


Figure 43. Spectre UV-Visible du limonène pur

Les spectres UV-Visible des huiles essentielles extraites dans les réacteurs à reflux et soxhlet (Figures 40 et 41) sont composés de plusieurs bandes. Parmi celles-ci, la plus importante est située dans l'UV proche; les autres se trouvent dans le domaine du visible.

Nous pouvons dire que cette bande intense correspond au limonène, ceci, par comparaison au spectre UV-Visible de ce composé pur (Figure 43). Parmi les composés correspondant aux autres bandes, nous suspectons le citral.

Le spectre UV-Visible de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation (Figure 42) est composé d'une seule bande qui est celle du limonène, ceci par comparaison avec le spectre de ce composé pur (Figure 43).

2.4. Indice de réfraction

L'indice de réfraction dépend de la composition chimique de l'huile essentielle. Il mesure l'ensemble des actions exercées par les différents constituants de la matière sur la lumière.

Les valeurs de l'indice de réfraction de nos extraits par les méthodes à reflux, soxhlet et l'hydrodistillation sont respectivement : 1.4730 ,1.4738 ,1.4739. Ces valeurs sont comprises dans le domaine de l'indice de réfraction du limonène [1.4700-1.478] donné par la norme AFNOR. D'après ces résultats, les huiles essentielles extraites à partir des écorces d'orange sont constituées principalement du limonène.

Conclusion

Au vu des résultats obtenus, les meilleurs rendements en huile essentielle correspondent aux extractions au soxhlet (2.43 %) et à reflux total (1.71%).

Parmi les trois procédés utilisés, c'est l'hydrodistillation qui conduit au plus faible rendement en huile essentielle (0.43 %).

Les conditions optimales de l'extraction du limonène par la méthode à reflux sont: température = 70 °C, temps de contact = 30 min et le rapport Liquide-Solide (L/S) = 7 ml/g.

L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des huiles essentielles extraites par les méthodes à reflux et soxhlet montrent qu'en plus du limonène, d'autres composés non identifiés sont présents. Toutefois, le limonène demeure le composé majoritaire (tache obtenue sur la plaque plus intense). Cette analyse montre que l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation est composée uniquement de limonène.

L'analyse par UV-Visible de ces mêmes huiles essentielles confirme les résultats obtenus par CCM, c'est-à-dire la présence du limonène comme composé majoritaire des huiles essentielles obtenues par la méthode à reflux et soxhlet. Tandis que l'huile essentielle extraite par hydrodistillation est composée seulement du limonène.

Les valeurs de l'indice de réfraction de nos extraits par les méthodes à reflux, soxhlet et l'hydrodistillation sont respectivement : 1.4730 , 1.4738 , 1.4739. Ces valeurs sont comprises dans le domaine de l'indice de réfraction du limonène [1.4700-1.478]. D'après ces résultats, les huiles essentielles extraites à partir des écorces d'orange sont constituées principalement du limonène. Ces résultats sont en accords avec ceux obtenus par les méthodes (UV-Visible, CCM).

Il est important de compléter et d'approfondir cette recherche en procédant à l'étude des points suivants :

- ✓ Etude de l'extraction par micro-onde du limonène à partir des écorces entières et du flavedo de l'orange.
- ✓ Etude de l'extraction du limonène à partir de différentes variétés d'oranges.
- ✓ Caractérisation des huiles essentielles extraites par différentes techniques (reflux total, soxhlet, hydrodistillation,...) à l'aide des analyses physico-chimiques suivantes: infrarouge, (IR), chromatographie en phase gazeuse (CPG), chromatographie en phase liquide (HPLC) et résonnance magnétique nucléaire (RMN).

*Références
bibliographiques*

Association française de Normalisation, NF T-75- 111, 112. « Huiles essentielles ». Paris, France.

Association des producteurs Algériens de Boisson. **2013**. Symposium sur la valorisation des produits agricoles dans les boissons.

Atti Santos A.N, Rassato M, Atti Serafini L, Cassel E, Moyna P. **2005**. Extraction of Essential Oils from Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by Hydrodistillation and Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Brazilian Archives of Biology and Technology*, **48**, (1), 155-160

Attaway J.A, Wolford R.W, Edwards G. **1962**. Isolation and identification of volatile carbonyl components from orange essence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **10**, 102 – 104.

Bardeau F. **2009**. Les huiles essentielles. Découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Edition lanore, 315.

Bégin D, Guérin M. **2010**. La substitution de solvant par le d-limonène. Université de Montréal. Faculté de médecine du travail et d'hygiènes de milieu.

Bousbia N. **2011**. Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Thèse de doctorat: Chimie. Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

Bruneton J. **1999**. Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. 3^{ème} édition, Paris, Tec et Doc.

Chemat S, Lagha A, Ait Amar H ,chemat f. 2003. Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrasoni. Sonochemi*, **11**, 5-8.

Di Giacomo A, Rapisarda P, Safina G. **1992**. Les produits dérivés de l'industrie des agrumes. Station expérimental industriel dérivé des agrumes. Italie.

FAO. **2012**. Citrus fruit Fresh and processed. Annual statistics. CCP: CI/ST/2012.

Fauchere J.L, Avril J.L. **2002**. Bactériologie générale et médicale. Edition. Ellipses. Paris, 365.

Funk & Wagnalls. **2004**. Encyclopédie britannique Funk & Wagnalls.

URL:<http://www.Funkandwagnalls.com>

Guimaraes R, Barros L, Barreira J.C.M, Sousa M.J, Carvalho A.M, Ferreira I.C.F.R. **2010**. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. Journal of Food Chemistry .Toxico, **48**, 99-106.

Hernandez-Ochoa L.R. **2005**. Substitution de solvant et matière active de synthèse par combiné solvant/actif d'origine végétale. Thèse de Doctorat. Institut National polytechniques de Toulouse.

<http://www.exchem.fr/limonene>

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

Hunter G.L.K & Brogden W.B. **1965**. Analysis of terpene and sesquiterpene hydrocarbon in some citrus oils. Journal of Food Science. **30**, 383 – 387.

IRTA. **1994**. Alternatives to Chlorinated Solvents in Cleaning Applications. Institute for Research and Technical Assistance, Santa Monica.

Journées Méditerranéennes sur l'Agrumiculture. Situation actuelle et perspectives. Université Hassiba Benbouali de Chlef 9-11 Décembre **2014**.

Karlberg A.T, Lindell B. **1993**. Limonene. Arbete Och Hälsa , **35** ,207-246

Kellen M, Tepe B. **2008**. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three Salvia species from Turkish flora. Bioresource Technology, **99**, 2839-2845

Kimball D.A. **1999**. Citrus processing. A complete guide. Second edition, Aspen Publication inc.435.

Lucchesi M.E. **2005**.Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes: Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles . Thèse de Doctorat : chimie : Université de la Réunion

Lopersto C.G, Petrillo F, Casazza A.A, Aliakbarian. Perego P. CalabroV. **2014**. A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction. Journal Of Separation and Purification Technology,137, 13-20

Marrouf A, Tremblin G. **2009**. Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences.

Moshonas M.G; Shaw P.E. **1979**. Composition of essence oil from overripe oranges. Journal of Agricultural Food Chemistry, **27**, 1337-1339

Padrini F, Lucheroni M.T. **1996**. Le grand livre des huiles essentielles.Ed.de Vecchi.

Peyron L. **2002**.Production of bitter orange neroli and petitgrain oils. Edition Taylor and Francis, 642.

Pibiri M.C. **2005**.Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat. Polytechnique Fédéral de Lausanne.

Rega B, Fournier N, Guichard E,Russel R. **2003**. Citrus flavour. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **48**, 3280-3285.

Rehman S.U, Hussein S, Nawaz H, Mushtaq A.M, Murtaza M.A, Rizvi A.j. **2007**. Inhibitory effect of citrus peel essential oils on the microbial growth of bread. Pakistanian Journal of Nutrition,**6**,(6), 558-561

Rossi Y. E, Palacios S.M. **2013**. Fumigant toxicity of *Citrus sinensis* essential oil on *Musca domestica* L. adults in the absence and presence of a P450 inhibitor, *Acta Tropica* **127** 33– 37.

Singh A.K, Dikshit A, Dixit S.M. **1983**. Fungitoxic properties of essential oil of *mentha arvensis* var *peppermint*. *Perfumer and flavorist*, 55-58.

Spiegel-Roy P, Goldschmidt E.E. **1996**. *Biology of Citrus*. 1ère édition. Edition Cambridge University Press. 239.

Stanley W.L, Ikeda R.M, Vannier S.H, Rolle I.A. **1961**. Determination of the relative concentration of the major aldehydes in lemon, orange and grapefruit oils by gas chromatography. *Journal of Food Science*, **26**, 43-48.

Stanley W.L. 1962. *Citrus oils: analytical methods and compositional characteristics*. Intern. Fruchtsaft-Union, Ber. Wiss. Tech. Komm, **4**, 91-103.

Tapiero H.K.D, Tew K.D, Nguyen B.G, Mathé V. **2002**. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother*, **56**, 200-207.

USDA. **2010**. *World Horticultural Trade*. Trade data edition, URL <http://www.fas.usda.gov/ustrade>.

Vartiainen E. Kulmala M. Ruuskanen T.M. Taipale R. Rinne J., Vehkamäki H. **2006**. *Atmos. Env.*, **40**, 7882.

Vekiari S.A, Protopapadakis E.F, Papadopoulou P, Papanicoleon D, Panou C et Vamvakias M. **2002**. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of the lemon variety. *Journal of Agriculture and food chemistry*, **5**, (1), 147-153.

Von Burg R. **1995**. Toxicology Update. Limonene. *Journal of Applied Toxicology*, **15**, (6), 495-499.

Références bibliographiques

Wallace L, Nelson W, Ziegenfus R, Pellizzari E, Michael, L, Whitmore R, Zelon, H, Hartwell T, Perritt R, Westerdahl D. **1991**. The Los Angeles team study: personal exposures, indoor-outdoor air concentrations, and breath concentrations of 25 volatile organic compounds. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, **1**, (2), 157-192.

Webber H.J, Reuther W, Batchelor L.D. **1967**. The citrus Industry, volume 1 : History, world distribution, botany and varieties. Edition, University of California Press.

Yang C.S, Chung J.Y, Yang G.Y, Chhabra . **2000**. Lee, Tea and Tea Polyphenols in Cancer Prevention, Symposium: Diet, Natural Products and Cancer Prevention: Progress and Promise. American Society for Nutritional Sciences.

