



HAL
open science

Influence de la formulation sur l'oxydation des huiles végétales en émulsion eau-dans-huile

Wafa Dridi

► **To cite this version:**

Wafa Dridi. Influence de la formulation sur l'oxydation des huiles végétales en émulsion eau-dans-huile. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Bordeaux; Université de Carthage (Tunisie), 2016. Français. NNT : 2016BORD0102 . tel-01376766

HAL Id: tel-01376766

<https://theses.hal.science/tel-01376766>

Submitted on 5 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

**DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ET DE L'UNIVERSITÉ DE CARTHAGE**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

ÉCOLE DOCTORALE « SCIENCES ET TECHNOLOGIE POUR L'INGÉNIEUR »

Par Wafa DRIDI

.....
**INFLUENCE DE LA FORMULATION SUR L'OXYDATION DES
HUILES VEGETALES EN EMULSION EAU-DANS-HUILE**
.....

SPÉCIALITÉ CHIMIE PHYSIQUE

Sous la direction de : Maud CANSELL et Mohamed GARGOURI
Co-directeurs : Fernando LEAL CALDERON et Wafa ESSAFI

Soutenue le 25 juin 2016

Membres du jury

| | | | |
|---------------------|--------------------------------------|-------------------|------------|
| M. HAMMAMI, Mohamed | Professeur | INRAP-Sidi Thabet | Président |
| M. ZARROUK, Mokhtar | Professeur | CBBC-Borj Cédria | Rapporteur |
| M. XENAKIS, Aris | Directeur de Recherche | IBM CB-Athènes | Rapporteur |
| M. JOFFRE, Florent | Responsable développement analytique | ITERG-Pessac | Examineur |

REMERCIEMENTS

Ce travail doctoral n'aurait jamais pu être réalisé sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la qualité humaine, la compétence scientifique et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase.

Cette thèse de doctorat a été réalisée en collaboration entre l'Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique (INRAP)-Technopole de Sidi Thabet (successivement au sein du Laboratoire des Substances Naturelles (LSN) et du Laboratoire Matériaux, Traitement et Analyse (LMTA)), et l'Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN) de Bordeaux.

Je tiens tout d'abord à remercier la direction de l'INRAP ainsi que la direction du CBMN de m'avoir accueillie dans leurs honorables établissements.

Qu'il me soit aussi permis de remercier le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS), l'INRAP et le CBMN pour leur soutien financier.

Je souhaite remercier également Mme Hajer Guissouma Helali, Directrice de l'Ecole Doctorale de l'INSAT, et Mr Thierry Toupance, Directeur de l'Ecole Doctorale des Sciences Chimiques de l'Université de Bordeaux.

Mes vifs remerciements s'adressent aux membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger mon travail. J'exprime ma reconnaissance à Monsieur Mohamed Hammami, Professeur à la Faculté de Médecine de Monastir et Directeur Général de l'INRAP-Sidi Thabet, d'avoir accepté de présider le jury de thèse. Je remercie Monsieur Mokhtar Zarrouk, Professeur et Directeur du Laboratoire de Biotechnologie de l'Olivier au Centre de Biotechnologie-Technopole de Borj-Cédria et Monsieur Aris Xenakis, Directeur de Recherche à l'Institute of Biology Medicinal Chemistry & Biotechnology, National Hellenic Research Foundation-Athènes, d'avoir accepté d'être rapporteurs. Bien évidemment, je remercie Monsieur Florent Joffre, Responsable développement analytique à l'Institut des Corps Gras ITERG-Pessac, d'avoir accepté d'être examinateur.

J'exprime ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Pr Mohamed Gargouri, Professeur à l'INSAT, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant de diriger ce travail

doctoral, pour ses qualités scientifiques et humaines, et l'intérêt qu'il a porté à ce travail. J'ai beaucoup apprécié votre soutien lors de la réalisation de ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent à ma co-directrice de thèse, Dr Wafa Essafi, Maître de Conférences à l'INRAP, pour avoir encadré ce travail avec beaucoup de compétence scientifique et d'enthousiasme et pour s'être rendue disponible tout au long de ce travail doctoral. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse dans les meilleures conditions possibles et du temps que vous m'avez consacré.

Je remercie également ma directrice de thèse, Pr Maud Cansell, Professeur à l'Université de Bordeaux, ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans votre compétence scientifique et votre grande disponibilité. Merci pour vos multiples conseils, remarques et encouragements et pour toutes les heures que vous avez consacré à diriger cette recherche et pour m'avoir guidé dans la bonne direction.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance à mon co-directeur de thèse, Pr Fernando Leal Calderon, Professeur à l'Université de Bordeaux. Merci pour le temps que vous m'avez consacré à chaque fois que j'ai sollicité votre aide, ainsi que pour vos multiples encouragements. Vos compétences scientifiques ont énormément contribué à ce travail. Je vous remercie également pour votre accueil chaleureux tout au long de mes séjours à Bordeaux.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent également à Mr Jean Toutain, Maître de Conférences, et Mr Alain Sommier, Ingénieur de recherche, à l'Institut de Mécanique et d'Ingénierie (I2M, CNRS UMR 5295, Pessac), pour leur contribution précieuse dans ce travail et pour leurs efforts consacrés à la mise en place et au bon fonctionnement de la technique de microcalorimétrie différentielle.

Mes remerciements seront incomplets si je n'en adressais pas à Mr Julien Monteil, ingénieur à l'Institut CBMN pour son aide précieuse que ce soit sur le plan humain, scientifique ou administratif. Un très grand merci pour ta grande disponibilité à chaque fois que j'ai sollicité ton aide.

Je remercie vivement Tiphaine Bardeau, doctorante au CBMN, de m'avoir initiée à la technique de CPG et Ines Mahouachi, ingénieur à l'INRAP, de m'avoir aidé à réaliser les mesures de la HPLC.

Je remercie également tout le personnel et étudiants de l'INRAP-Sidi Thabet et de l'Institut CBMN-Bordeaux pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Cette thèse m'a présenté aussi l'occasion de faire la connaissance de nombreuses personnes très agréables. Dounia, Fatima, Clément, Marie, Wifek, Sameh, Emilie et Mathilde. Merci de votre gentillesse, des beaux moments que nous avons partagé et de m'avoir soutenu dans mes moments difficiles.

Je voudrais remercier aussi, Mme Nabiha Bouzouita, Professeur à l'Ecole Supérieure des Industries Alimentaires de Tunis, qui m'a donné le goût de la recherche il y a déjà quelques années, et sans qui je ne me serais peut être pas orientée dans cette voie.

Enfin, je remercie de tout mon cœur mes parents qui ont tout sacrifié pour moi, Wassim, Wadie et tous mes proches. Merci pour votre soutien inconditionnel et vos encouragements.

A la mémoire de ma grand-mère, Fella

Glossaire

Abréviations

AA : Acide ascorbique

AGMI : Acide gras monoinsaturé

AGPI : Acide gras polyinsaturé

AGS : Acide gras saturé

ALA : Acide α -linoléique

AP : Palmitate d'ascorbyle

AMVN : 2,2'-Azobis (2,4-diMéthylValéroNitrile)

ANC : Apports nutritionnels conseillés

AOM : Active oxygen method

BSA : Albumine de sérum bovin

CasNa : Caséinate de sodium

CA : Acide caféique

CMC : Concentration micellaire critique

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

DSC : Calorimétrie différentielle à balayage

DHA : Acide docosahexaénoïque

DMG : Monoglycérides distillés

DTAB : Bromure de dodécyl triméthyl ammonium

DO : Densité optique

EPA : Acide eicosapentaénoïque

EMAG : Esters méthyliques d'acides gras

GTE : Extraits phénoliques aqueux de feuilles de thé vert

HLB : Balance hydrophile/lipophile

LA : Acide linoléique

LOOH : Hydroperoxyde

M : Métal

NaO : Oléate de sodium

OA : Acide oléique

OMW : Extraits phénoliques aqueux de déchets de mouture d'olive

OSI : Indice de stabilité oxydative

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PNNS : Programme National Nutrition Santé

PE : Extraits phénoliques aqueux de l'huile d'olive extra vierge

PGPR : Polyricinoléate de polyglycérol

rpm : Tours par minute

Span 20 : Monolaurate de sorbitane

Span 80 : Monooléate de sorbitane

Span 85 : Trioléate de sorbitane

SDS : Dodécyl sulfate de sodium

TOC : Tocophérol

Tween 20 : Polysorbate 20

Tween 80 : Polysorbate 80

WPI : Isolat de protéines sériques

Symboles

A : Acidité

A_D : Surface spécifique de la phase dispersée

C_p : Capacité thermique

C : Concentration molaire

C_i : la concentration molaire de l'ion i

D : Diamètre moyen des gouttelettes

D_{10} : Diamètre moyen en longueur

D_{20} : Diamètre moyen surfacique de l'ensemble des gouttes

D_{32} : Diamètre de Sauter

I : Force ionique

I_i : Indice d'iode

I_P : Indice de peroxyde

Kj : Kilojoules

m : Masse

P : Pression

P_O : Pression osmotique

Q_M : Flux de chaleur mesuré dissipé de la réaction chimique

R : Constante des gaz parfaits

T : Température

U_M : Voltage mesuré donné par la thermopile

V : Volume

V_m : Vitesse moyenne

V_i : Vitesse à l'instant i

z_i : Charge de l'ion i

α : Coefficient de calibration d'une thermopile

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure I.1. Abstractions possibles de l'hydrogène des liaisons C-H allyliques et bi-allyliques des acides gras insaturés (Erickson, 2002)..... | 5 |
| Figure I.2. Formation des diènes conjugués..... | 8 |
| Figure I.3. Formation d'un époxyde à partir d'un radical alkoxy (Schaich, 2005)..... | 9 |
| Figure I.4. Scission des radicaux alkoxy (Schaich, 2005). | 9 |
| Figure I.5. Représentation schématique des principales réactions impliquées dans l'oxydation des lipides (Schaich, 2005)..... | 11 |
| Figure I.6. Les trois étapes de l'oxydation radicalaire par la lipoxygénase (Kuhn et Thiele, 1999)..... | 14 |
| Figure I.7. Oxydation de l'atome de fer de la lipoxygénase au cours de la réaction catalytique (d'après Khün et Borchert, 2002)..... | 15 |
| Figure I.8. Représentation schématique de l'évolution cinétique des marqueurs de l'oxydation des lipides (Labuza, 1971)..... | 16 |
| Figure I.9. Effet de la température sur l'oxydation de l'huile de lin (Kamal Eldin et al., 2003). | 19 |
| Figure I.10. Représentation schématique de l'oxydation des lipides initiée par du fer ou du cuivre. | 21 |
| Figure I.11. Mécanisme de formation des 8-, 9-, 10- et 11- monohydroperoxydes à partir de l'acide oléique (Frankel, 2005e)..... | 22 |
| Figure I.12. Mécanisme de formation de 9- et 13- monohydroperoxydes à partir de l'acide linoléique (Frankel, 2005e ; Choe et Min, 2006). | 23 |
| Figure I.13. Mécanisme de formation des 9-, 12-, 13- et 16- monohydroperoxydes à partir de l'acide α -linoléique (Frankel, 2005e). | 24 |
| Figure I.14. Formation des composés secondaires d'oxydation à partir des monohydroperoxydes des acides oléique (A), linoléique (B) et α -linoléique (C) (Schaich, 2005)..... | 26 |
| Figure I.15. Différents types d'émulsions simples..... | 33 |
| Figure I.16. Représentation schématique des interfaces (Gibbs, 1931). | 34 |
| Figure I.17. Schéma du processus de coalescence. | 40 |
| Figure I.18. Murissement d'Ostwald..... | 41 |
| Figure I.19. Inhibition du Murissement d'Ostwald par solubilisation dans les gouttes d'une espèce de solubilité nulle dans la phase continue..... | 42 |
| Figure I.20. Principaux mécanismes de déstabilisation physique des émulsions (McClements et Weiss, 2005). | 43 |

| | |
|---|-----|
| Figure II.1. Les réactions possibles entre la p-anisidine et le malonaldéhyde (Shahidi et Zhong, 2005)..... | 65 |
| Figure II.2. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la préparation des émulsions eau-dans-huile..... | 67 |
| Figure II.3. Schéma de réarrangement des doubles liaisons au sein de l'acide linoléique au cours de l'oxydation (Frankel, 2005e)..... | 73 |
| Figure II.4. Courbe de l'absorbance à 233 nm en fonction de la concentration en PGPR. ... | 74 |
| Figure II.5. Schéma du microcalorimètre en coupe..... | 77 |
| Figure III.1. Flux de chaleur (W) pour un échantillon d'huile de cameline analysé dans des conditions isothermes (60 °C) dans une coupelle en cuivre sur une période de 24 heures ; A : Figure montrant les artefacts liés à la manipulation de l'échantillon ; B : Zoom sur l'axe du flux..... | 92 |
| Figure III.2. Superposition des mesures de l'enthalpie et de leurs moyennes (○) à différents temps pour l'huile de cameline analysée dans des conditions isothermes à 60 °C, dans des coupelles en cuivre..... | 93 |
| Figure III.3. Évolution de l'enthalpie en fonction du temps ; pour les huiles vierges de lin (●), cameline (●), colza (●) et olive (●), analysées dans des conditions isothermes au cours du temps à 60 °C, dans des coupelles en cuivre..... | 94 |
| Figure III.4. Corrélation entre la concentration en diènes conjugués et l'enthalpie de la réaction d'oxydation pour les huiles de lin vierge (■), cameline vierge (◆), colza vierge (▲) et raffinée (▲) et olive vierge (●), analysées dans des conditions isothermes à 60 °C, dans des coupelles en cuivre..... | 96 |
| Figure III.5. Evolution de l'enthalpie en fonction du temps pour l'huile de lin dans des conditions isothermes à 60 °C en fonction de la nature de la coupelle (cuivre (●) et aluminium(●))...... | 97 |
| Figure III.6. Corrélation entre l'oxydabilité et la teneur en acide α -linoléique, pour les différentes huiles vierges de lin, cameline, colza et olive, dans des conditions isothermes à 60 °C..... | 99 |
| Figure III.7. L'évolution de l'enthalpie d'oxydation au cours du temps pour l'huile de lin (A) et l'huile de cameline (B) dans des coupelles en cuivre, dans des conditions isothermes à différentes températures 40 °C (●), 60 °C (●) et 80 °C (●)..... | 101 |
| Figure III.8. Détermination de l'énergie d'activation pour l'huile de cameline (◆) et l'huile de lin (■) vierges..... | 102 |
| Figure III.9. Emulsion inverse eau-dans-huile de colza raffinée (1,5% de PGPR, 1,5% de DMG dans la phase lipophile), 40% eau (0,005 M FeSO ₄). A : Emulsion juste après préparation ; B : Emulsion après 10 heures de stockage à 25 °C..... | 109 |
| Figure III.10. Emulsion inverse eau-dans-huile de colza raffinée (2% de PGPR, 2% de DMG dans la phase lipophile), 40% phase aqueuse (0,1 M NaCl), juste après préparation. A : cliché de microscopie optique ; B : profil granulométrique..... | 110 |
| Figure III.11. Emulsion inverse eau-dans-huile de colza raffinée (1,5% de PGPR, 1,5% de DMG dans la phase lipophile), 40% phase aqueuse (0,1 M NaCl), après stockage à 25 °C. A : cliché de microscopie optique ; B : profil granulométrique..... | 110 |

- Figure III.12.** Emulsion inverse eau-dans-huile de colza raffinée (2% de PGPR, 2% de DMG dans la phase lipophile), 40% phase aqueuse (0,1 M NaCl), après stockage à 60 °C. A : cliché de microscopie optique ; B : profil granulométrique. 111
- Figure III.13.** Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, pour des expériences réalisées dans des flacons en verre fermés (symboles creux) et ouverts (symboles pleins), pour différentes huiles en phase continue stockées à 60 °C, et pour une émulsion inverse à base d'huile de colza raffinée stockée à 25 °C (40% phase aqueuse, 0,1 M NaCl et 0,005 M FeSO₄, 1,5% PGPR, 1,5% DMG) ; (émulsion (◆) ; huile de lin (■) ; huile de colza raffinée (▲) ; huile d'olive (●)). .. 114
- Figure III.14.** Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, pour les huiles d'olive (A), colza vierge (▲) et raffinée (●) (B), cameline (C), et lin (D), non agitées (symbole creux) et agitées (symbole plein) et stockées à 60 °C. 116
- Figure III.15.** Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, pour différentes concentrations en PGPR dans l'huile de colza raffinée, stockées à 60 °C ; (2% PGRP-2% DMG (◆) ; 1% PGPR (■) ; 2% PGPR (▲) ; 3% PGPR (x) ; 5% PGPR (x) ; 5% DMG (●) ; témoin (+)). 117
- Figure III.16.** Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 60 °C : pour les huiles de lin (■), de cameline (◆), de colza vierge (▲) et raffinée (▲) et d'olive (●) agitées (symboles pleins), et émulsionnées (40% eau, 0,1 M NaCl, 2% PGPR et 2% DMG) (symboles creux) (A) ; pour les émulsions contenant différents pourcentages de phase aqueuse (40% (■) ; 50% (●) et 60% (▲)) (0,1 M de NaCl, 2% PGPR et 2% DMG) dispersés dans l'huile de colza raffinée (B) et dans l'huile d'olive vierge (C). 119
- Figure III.17.** Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour différentes concentrations de sulfate de fer (0 M (■) ; 0,002 M (●) et 0,005 M (▲)) dans la phase aqueuse, (émulsions à base d'huile de colza raffinée, 0,1 M de NaCl, 40% phase aqueuse avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG). 122
- Figure III.18.** Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour deux émulsions contenant respectivement 0,005 M de chlorure de fer II (●) et III (○), (émulsions à base d'huile de colza raffinée, 0,1 M de NaCl, 40% phase aqueuse avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG). 124
- Figure III.19.** Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour deux émulsions contenant respectivement 0,005 M de sulfate de fer (○) et de sulfate de cuivre (●) dans les phases aqueuses, (émulsions à base d'huile de colza raffinée, 0,1 M de NaCl, 40% phase aqueuse avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG). 125
- Figure III.20.** Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour des émulsions contenant différents sels de fer (0,005 M) (chlorure de fer II (◆) ; sulfate de fer II (■) ; lactate de fer II (▲) et gluconate de fer II (●)) dans les phases aqueuses contenant 0,1 M de NaCl, (émulsions à base d'huile de colza raffinée avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG et 40% de phase aqueuse). 127
- Figure III.21.** Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour des émulsions contenant 0,005 M de FeSO₄, en présence du glucose (0,2 M (□) ; 0,4 M (■) et du chlorure de sodium 0,1 M (○)

; 0,2 M (●) comme molécules support, (émulsions à base d'huile de colza raffinée avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG et 40% phase aqueuse). 130

Figure III.22. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, pour différentes huiles émulsionnées : (A) formulées avec 2% PGPR et 2% DMG, la phase aqueuse contient 0,1 M NaCl et stockées à 60 °C ; (B) formulées avec 1,5% PGPR et 1,5% DMG, la phase aqueuse contient 0,1 M NaCl et 0,005 M FeSO₄ et stockées à 25 °C ; (huile de lin (■) ; cameline (◆); colza vierge (▲) et raffinée (▲) et olive (●)), les émulsions contiennent 40% de phase aqueuse. 132

Figure III.23. Corrélation entre l'oxydabilité et la teneur en acide α -linoléique (18:3 n-3), déterminée pour les émulsions inverses, formulées, avec 2% PGPR et 2% DMG, la phase aqueuse contient 0,1 M NaCl et stockées à 60 °C (●), et formulées avec 1,5% PGPR et 1,5% DMG ; la phase aqueuse contient 0,1 M NaCl et 0,005 M FeSO₄ et stockées à 25 °C (■). Les émulsions contiennent 40% de phase aqueuse. 133

Figure III.24. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 60 °C pour des émulsions à base d'huile de colza raffinée (40% de phase aqueuse, 0,1 M NaCl), en fonction de la concentration en PGPR dans la phase huileuse ((■) 2% ; 3% (●) ; (▲) 5%), en présence de 2% DMG. 135

Figure III.25. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour des émulsions à base d'huile de colza raffinée (40% d'eau, 0,1 M NaCl, 0,005 M de FeSO₄), en fonction de la concentration en PGPR dans la phase huileuse ((■) 1,5% ; 3% (●) ; (▲) 5%), en présence de 1,5% de DMG. 136

Figure III.26. A : Structure moléculaire du PGPR (Taylor, 2011) ; B : Schéma de l'orientation de deux molécules de PGPR adsorbées à l'interface huile-eau d'une émulsion inverse (Taylor, 2011). 137

Figure III.27. Flux de chaleur (A) en fonction du temps, pour une émulsion inverse à base d'huile de cameline dans des conditions isothermes (60 °C) dans une coupelle en cuivre. Emulsion inverse eau-dans-huile de cameline (2% de PGPR, 2% de DMG dans la phase lipophile), 40% de phase aqueuse (0,1 M NaCl) ; (B) zoom sur la zone d'intégration du flux. 140

Figure III.28. Evolution de l'enthalpie d'oxydation à 60 °C pour les huiles en phase continue ◆ et en émulsions inverses eau-dans-huile ■ (2% PGPR, 2% DMG, 40% eau 0,1 M NaCl) à base (A) d'huile de cameline ; (B) d'huile de lin. 142

Figure III.29. Corrélation entre la teneur en diènes conjugués et l'enthalpie d'oxydation à 60 °C pour les émulsions inverses eau-dans-huile (2% PGPR, 2% DMG, 40% eau 0,1 M NaCl) à base d'huile de cameline ■ et d'huile de lin ◆. 143

Figure III.30. Enthalpies d'oxydation en fonction de temps, pour les différentes émulsions inverses basées sur les huiles vierges d'olive (●), de colza (●), de cameline (●) et de lin (●) (2% de PGPR, 2% de DMG dans la phase lipophile, 40% de phase aqueuse (0,1 M NaCl)) à 60 °C. 144

Figure III.31. Corrélation entre l'oxydabilité et la teneur en n-3, pour les différentes huiles vierges de lin, cameline, colza et olive, en phase continue (■) et en émulsion inverse (●). Les émulsions contiennent 2% PGPR, 2% DMG, 40% de phase aqueuse, 0,1 M NaCl. 145

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I.1. Principales méthodes usuelles de caractérisation de l'oxydation des huiles. | 28 |
| Tableau I.2. Exemples de formulation d'émulsions inverses à visée alimentaire. | 36 |
| Tableau I.3. Présentation des principales études qui s'intéressent à l'oxydation des lipides dans les émulsions inverses. | 45 |
| Tableau II.1. Compositions des émulsions inverses formulées. | 68 |
| Tableau II.2. Concentrations des solutés utilisées et forces ioniques des phases aqueuses des différentes émulsions préparées. | 70 |
| Tableau II.3. Tableau récapitulatif des études d'oxydation réalisées. | 79 |
| Tableau III.1. Caractéristiques des huiles utilisées pour la formulation des émulsions inverses. | 86 |

Table des matières

| | |
|--|----------|
| Introduction Générale..... | 1 |
| I. Etude Bibliographique..... | 4 |
| 1. Oxydation des lipides | 5 |
| 1.1. Auto-oxydation..... | 6 |
| 1.1.1. Initiation..... | 6 |
| 1.1.2. Propagation | 7 |
| 1.1.3. Terminaison | 9 |
| 1.2. Photo-oxydation | 12 |
| 1.3. Oxydation enzymatique..... | 13 |
| 1.4. Aspect cinétique de l'oxydation des lipides | 15 |
| 1.5. Initiateurs de l'auto-oxydation | 17 |
| 1.5.1. L'oxygène | 17 |
| 1.5.2. La température | 17 |
| 1.5.3. Les métaux | 19 |
| 1.6. Formation et décomposition des hydroperoxydes : application aux acides oléique (18:1 n-9), linoléique (18:2 n-6) et α -linoléique (18:3 n-3) | 22 |
| 1.6.1. Formation des hydroperoxydes..... | 22 |
| 1.6.2. Décomposition des hydroperoxydes et produits secondaires formés | 24 |
| 1.7. Méthodes de suivi des produits d'oxydation..... | 27 |
| 1.7.1. Méthodes classiques | 27 |
| 1.7.2. Méthodes thermiques | 30 |
| 1.7.2.1. Principe de la DSC | 30 |
| 1.7.2.2. Avantages de l'utilisation de la DSC dans l'étude de l'oxydation des lipides | 31 |
| 2. Emulsions inverses : caractérisation de la stabilité physique et oxydative | 32 |
| 2.1. Généralités sur les interfaces | 33 |
| 2.1.1. Tension interfaciale γ | 33 |
| 2.1.2. Tensioactifs | 34 |
| 2.1.2.1. Le PGPR..... | 37 |
| 2.1.2.2. Les monoglycérides distillés | 37 |
| 2.2. Instabilité des émulsions | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2.1. | Sédimentation et crémage..... | 38 |
| 2.2.2. | Floculation | 39 |
| 2.2.3. | Coalescence | 39 |
| 2.2.4. | Mûrissement d'Ostwald..... | 40 |
| 3. | Oxydation des lipides dans les émulsions eau-dans-huile..... | 44 |
| 3.1. | Rôle de la nature de la phase lipidique..... | 49 |
| 3.2. | Rôle de la composition de la phase aqueuse | 49 |
| 3.3. | Rôle de la zone interfaciale eau-huile sur l'oxydation lipidique..... | 52 |
| II. | Matériel et Méthodes | 56 |
| 1. | Réactifs | 57 |
| 1.1. | Huiles | 57 |
| 1.2. | Tensioactifs lipophiles..... | 57 |
| 1.3. | Espèces encapsulées | 58 |
| 1.3.1. | Molécules support..... | 58 |
| 1.3.2. | Initiateurs d'oxydation | 58 |
| 1.4. | Autres réactifs | 59 |
| 2. | Caractérisation physicochimique des huiles..... | 60 |
| 2.1. | Indice de réfraction..... | 60 |
| 2.1.1. | Principe | 60 |
| 2.1.2. | Mode opératoire..... | 60 |
| 2.2. | Détermination de la composition en acides gras des huiles par chromatographie en phase gazeuse | 60 |
| 2.2.1. | Préparation des esters méthyliques d'acides gras | 60 |
| 2.2.2. | Conditions d'analyse..... | 61 |
| 2.3. | Détermination de la teneur en tocophérols des huiles par chromatographie liquide haute performance | 61 |
| 2.4. | Détermination de l'indice de peroxyde | 62 |
| 2.4.1. | Principe | 62 |
| 2.4.2. | Mode opératoire..... | 63 |
| 2.5. | Détermination de l'indice d'acide | 63 |
| 2.5.1. | Principe | 63 |
| 2.5.2. | Mode opératoire..... | 64 |
| 2.6. | Détermination de l'indice de para-anisidine | 64 |
| 2.6.1. | Principe | 64 |
| 2.6.2. | Mode opératoire..... | 65 |
| 3. | Préparation et caractérisation physique des émulsions inverses eau-dans-huile..... | 66 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3.1. | Formulation et préparation des émulsions inverses | 66 |
| 3.2. | Caractérisation physique des émulsions inverses..... | 70 |
| 3.2.1. | Microscopie optique | 70 |
| 3.2.2. | Diffusion statique de la lumière..... | 71 |
| 3.2.2.1. | Principe | 71 |
| 3.2.2.2. | Mode opératoire | 72 |
| 4. | Etude de l'oxydation des huiles en phase continue et en émulsion inverse | 72 |
| 4.1. | Conditions de vieillissement des huiles et des émulsions inverses | 72 |
| 4.2. | Mesure du vieillissement des huiles et des émulsions inverses | 73 |
| 4.2.1. | Mesure des diènes conjugués par la spectrophotométrie..... | 73 |
| 4.2.1.1. | Principe..... | 73 |
| 4.2.1.2. | Mode opératoire..... | 74 |
| 4.2.2. | Mesure de l'oxydation par calorimétrie différentielle | 75 |
| 4.2.2.1. | Principe..... | 75 |
| 4.2.2.2. | Dispositif expérimental | 76 |
| 4.2.2.3. | Mode opératoire..... | 77 |
| | Objectifs de l'étude..... | 80 |
| III. | Résultats et Discussion | 83 |
| 1. | Critères de choix et caractérisation des huiles végétales | 84 |
| 2. | Etude de l'oxydation des huiles en phase continue par microcalorimétrie | 90 |
| 2.1. | Introduction | 90 |
| 2.2. | Mesure de l'enthalpie d'oxydation des huiles en phase continue | 91 |
| 2.3. | Corrélation entre la teneur en diènes conjugués et l'enthalpie de la réaction d'oxydation..... | 95 |
| 2.4. | Influence de la nature de la coupelle sur l'oxydabilité de l'huile | 97 |
| 2.5. | Influence de la composition en acides gras des huiles sur leur oxydabilité..... | 98 |
| 2.6. | Influence de la température sur l'oxydation des huiles..... | 100 |
| 3. | Etude de l'oxydation des huiles dans les émulsions inverses eau-dans-huile | 104 |
| 3.1. | Formulation et caractérisation physique des émulsions inverses..... | 105 |
| 3.1.1. | Critères de choix des tensioactifs lipophiles..... | 106 |
| 3.1.2. | Critère de choix de la taille des gouttes | 106 |
| 3.1.3. | Critères de choix de la composition de la phase aqueuse | 107 |
| 3.1.4. | Etude de la stabilité physique des émulsions inverses..... | 108 |
| 3.2. | Etude de l'oxydation des émulsions inverses par la teneur en diènes conjugués... | 112 |
| 3.2.1. | Etudes préliminaires | 112 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3.2.1.1. | Influence de la quantité d'oxygène disponible..... | 112 |
| 3.2.1.2. | Influence de l'agitation de l'huile | 114 |
| 3.2.1.3. | Influence de l'ajout de tensioactifs lipophiles dans l'huile en phase continue | 117 |
| 3.2.1.4. | Influence de la fraction volumique d'eau dans l'huile..... | 118 |
| 3.2.2. | Influence de la composition de la phase aqueuse | 121 |
| 3.2.2.1. | Influence de la concentration en fer dans la phase aqueuse..... | 121 |
| 3.2.2.2. | Influence de l'état de valence de fer | 122 |
| 3.2.2.3. | Sulfate de fer versus sulfate de cuivre..... | 124 |
| 3.2.2.4. | Influence de la nature du contre-ion du fer | 126 |
| 3.2.2.5. | Influence de la nature et de la concentration de la molécule ou électrolyte support | 127 |
| 3.2.3. | Influence de la nature de l'huile | 131 |
| 3.2.4. | Influence de la concentration en PGPR | 134 |
| 3.3. | Etude de l'oxydation des émulsions inverses par microcalorimétrie..... | 139 |
| 3.3.1. | Mesure du flux de chaleur en fonction du temps..... | 139 |
| 3.3.2. | Corrélation entre les mesures de l'enthalpie et des diènes conjugués | 141 |
| 3.3.3. | Influence de la nature de l'huile | 143 |
| 3.3.4. | Corrélation entre la teneur en acide α -linoléique et l'oxydabilité des émulsions | 144 |
| | Conclusion et Perspectives..... | 146 |
| | Références Bibliographiques | 151 |
| | Annexes..... | 172 |

Introduction générale

Depuis plusieurs années maintenant, la famille des acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 est considérée comme essentielle en raison de ses fonctions physiologiques importantes. Parmi ces acides gras, l'acide α -linoléique (ALA, 18:3 n-3) tient une place particulière car l'organisme humain ne peut le synthétiser. On le qualifie d'acide gras indispensable. Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence les effets bénéfiques de l'ALA ou de ses métabolites supérieurs (acides eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) et docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) dans le développement nerveux et sensoriel des enfants (Innis, 1991 ; Simopoulos, 1991), dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Simopoulos, 1991; Nair et al., 1997 ; Shanthakumari et al., 2014 ; Bonafini et al., 2015), les troubles inflammatoires (Ziboh, 1996 ; Kelley et al., 1999 ; Hwang, 2000) et plus récemment les maladies neuro-dégénératives (Lukiw et Bazan, 2008 ; Féart et al., 2010). Les directives de l'Organisation Mondiale de la Santé suggèrent une consommation moyenne d'ALA de 0,5% de l'apport énergétique total ou de 1100 mg pour un régime de 2000 kcal/jour (Micha et al., 2014). Or, les données récentes d'une grande étude réalisée par le groupe d'experts en nutrition et maladies chroniques (NutriCoDE) dans 187 pays ont montré un faible niveau de consommation d'ALA dans la plupart des pays. Parmi les 135 pays ayant une carence en ALA, 61 avaient des apports inférieurs à 500 mg/jour, sensiblement en dessous des recommandations actuelles (Micha et al., 2014). Ce constat explique l'intérêt manifesté par l'industrie alimentaire pour l'enrichissement en AGPI n-3 de produits alimentaires de consommation courante (huiles combinées, margarines, pâtes alimentaires, jus de fruits ...).

Ces nouvelles formulations représentent un défi pour les industriels du secteur agroalimentaire, dans la mesure où les AGPI sont particulièrement sensibles à l'oxydation (Frankel, 2005a ; Shaich, 2005 ; Shahidi et Zhong, 2010). L'oxydation des lipides est un phénomène chimique qui provoque la dégradation des qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments. En effet, d'un point de vue sensoriel, l'oxydation conduit à l'apparition de composés volatils aux saveurs indésirables, rendant le produit non acceptable pour les consommateurs. D'un point de vue nutritionnel, l'oxydation des lipides peut conduire à une diminution de la teneur en AGPI. De plus, elle implique la production de molécules

nocives pour la santé (Halliwell et Gutteridge, 1990 ; Kubow, 1993 ; Ichinose et al, 2004). De manière générale, l'oxydation des lipides se produit en présence d'oxygène et peut être catalysée par plusieurs facteurs tels que la température, la lumière, les enzymes et les métaux de transition, facteurs qui peuvent intervenir au cours du procédé de fabrication du produit alimentaire ou de son stockage. Il s'avère que dans de nombreux produits alimentaires, les lipides se trouvent en milieu dispersé. Si l'oxydation des émulsions directes huile-dans-eau a été largement étudiée (Coupland et al., 1996 ; McClments et Decker, 2000 ; Waraho et al., 2011a et b), l'oxydation des émulsions inverses eau-dans-huile a suscité un intérêt beaucoup moins important.

Ce travail de thèse propose d'étudier l'oxydation des lipides, à travers la mesure des composés primaires d'oxydation, en phase continue et en émulsion inverse. A cette fin, différentes huiles alimentaires ont été choisies et différentes formulations d'émulsion ont été étudiées. Tout d'abord, la section « Etude bibliographique » présente les réactions d'oxydation des lipides en phase continue, les paramètres influençant cette oxydation et les méthodes classiquement utilisées pour le suivi des produits d'oxydation. Puis, après une présentation générale des émulsions, une analyse comparative de la littérature concernant l'oxydation en émulsion inverse est réalisée afin de mettre en évidence les paramètres de formulation influençant l'oxydabilité des lipides. La seconde partie détaille les matériels et méthodes utilisés dans ce travail de thèse. La troisième partie du manuscrit décrit les principaux résultats issus de notre étude et comprend deux chapitres. Le premier chapitre concerne les résultats de l'étude de l'oxydation des huiles en phase continue par une technique innovante, la microcalorimétrie différentielle. Celle-ci permet le suivi en temps réel de l'oxydation des lipides par la mesure de l'enthalpie de réaction. Le second chapitre présente et analyse l'influence de divers paramètres de formulation sur la cinétique d'oxydation des émulsions eau-dans-huile stabilisées par le polyricinoléate de polyglycérol (PGPR) et les monoglycérides distillés (DMG). La mesure de l'oxydation des émulsions inverses par microcalorimétrie différentielle sans étape de séparation préalable de la phase lipidique est détaillée. Les principales conclusions ainsi que les perspectives possibles de cette thèse sont finalement rassemblées dans la dernière partie de ce manuscrit.

I. Etude bibliographique

1. Oxydation des lipides

Le rancissement oxydatif des acides gras est un phénomène chimique, spontané, évolutif, irréversible et altératif. Il peut entraîner deux conséquences majeures :

- La dégradation des qualités nutritionnelles, sensorielles et physiques des aliments.
- Le développement de plusieurs pathologies, telles que des désordres intestinaux chroniques, l'artériosclérose, l'athérogenèse, les maladies neurodégénératives et divers types de cancer, si les produits issus de l'oxydation sont consommés pendant longtemps (Jessup et al., 2004 ; Cheng et Li, 2007 ; Guillén et Goicoechea, 2008).

L'oxydation se caractérise par l'attaque des acides gras insaturés portés par les molécules lipidiques (Figure I.1), par l'oxygène atmosphérique. Cette réaction implique :

- Un substrat : les acides gras insaturés avec des hydrogènes en positions allylique et bisallylique (Figure I.1), se trouvant généralement estérifiés au sein des triglycérides et des phospholipides qui sont les principales classes de lipides alimentaires.
- Un réactif : l'oxygène atmosphérique.

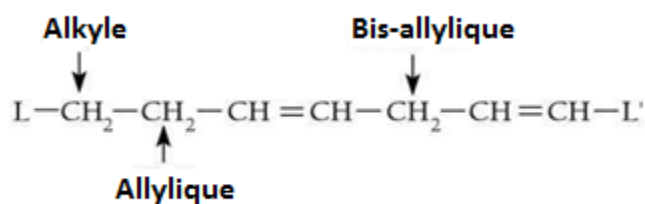


Figure I.1. Abstractions possibles de l'hydrogène des liaisons C-H allyliques et bi-allyliques des acides gras insaturés (Erickson, 2002).

Plusieurs facteurs peuvent influencer l'oxydation des lipides (Hsieh et Kinsella, 1989). Ils peuvent être classés en :

- Facteurs intrinsèques : composition en acides gras des lipides, présence d'espèces pro-oxydantes (ions métalliques, enzymes) ou d'antioxydants naturels (tocophérols).
- Facteurs extrinsèques : température, lumière, pression partielle en oxygène, présence de pro-oxydants exogènes.

L'oxydation des lipides, ou rancissement oxydatif des acides gras, est classiquement décomposée en trois étapes principales, initiation, propagation et terminaison, généralement décrites comme étant successives. L'oxydation lipidique peut être, selon le milieu et les initiateurs mis en jeu, le résultat de plusieurs voies réactionnelles :

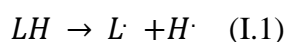
- L'auto-oxydation, initiée par la température, les ions métalliques, ou les radicaux libres correspondants à des lipides déjà oxydés.
- La photo-oxydation, initiée par la lumière UV en présence de photosensibilisateurs.
- L'oxydation enzymatique, catalysée par la lipoxygénase et la cyclooxygénase.

Dans ce qui suit, nous allons décrire les différentes voies d'oxydation, en insistant sur l'auto-oxydation.

1.1. Auto-oxydation

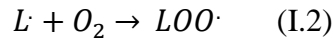
1.1.1. Initiation

L'initiation ou l'amorçage de l'oxydation correspond à la formation de radicaux lipidiques libres par rupture homolytique d'un atome d'hydrogène adjacent à une double liaison allylique ou bisallylique. L'initiation peut s'effectuer par action directe sur l'acide gras insaturé. Dans ce cas, le lipide LH perd un atome d'hydrogène pour former un radical libre $L\cdot$. Cette réaction se fait en présence d'un initiateur de l'oxydation.



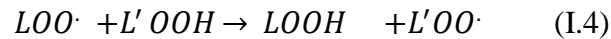
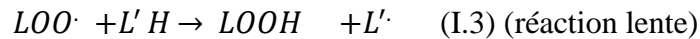
1.1.2. Propagation

Le radical alkyle L formé pendant l'amorçage primaire fixe très rapidement l'oxygène moléculaire à l'état normal (triplet) et forme un radical libre peroxyé instable (Min, 1998). En effet, l'oxygène triplet ne se fixe pas directement sur un composé lipidique natif, mais sur un composé radicalaire (Frankel, 2005b).



L'interaction du radical L avec l'oxygène O_2 nécessite une énergie d'activation très basse (Min et Boff, 2002), et la vitesse de la réaction est très élevée lorsque la teneur en oxygène n'est pas limitante (Ivanov, 1985), contrairement à la réaction directe des acides gras insaturés LH avec l'oxygène triplet peu actif qui nécessite une énergie d'activation très élevée (Gordon, 1990).

Le radical peroxyé $LOO\cdot$ peut arracher un hydrogène d'un acide gras insaturé $L'H$ et générer un hydroperoxyde $LOOH$ et un nouveau radical alkyle $L'\cdot$. Le nouveau radical $L'\cdot$ réagit avec l'oxygène et la séquence de réactions déjà décrite se reproduit.



Dans le cas des AGPI, la réaction est accompagnée d'un réarrangement électronique des doubles liaisons qui passent de la position non conjuguée à la position conjuguée ce qui produit les hydroperoxydes isomères contenant des liaisons diéniques et triéniques conjuguées (Figure I.2).

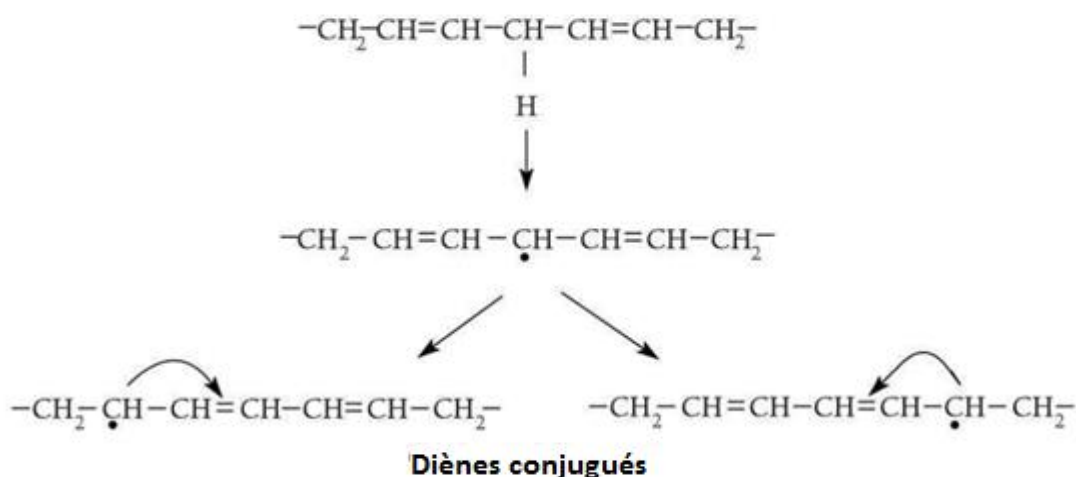
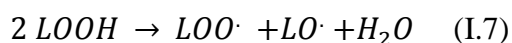
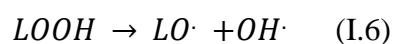
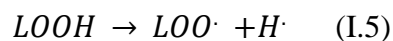


Figure I.2. Formation des diènes conjugués.

Etant instables, les hydroperoxydes peuvent subir diverses réactions dont une décomposition par scission homolytique de la liaison O-O, conduisant à deux nouveaux radicaux libres : les radicaux peroxydes $LOO\cdot$ et les radicaux alkoxydes $LO\cdot$ (Gordon, 1990 ; Frankel, 2005b).



Le radical $LO\cdot$ formé est beaucoup plus réactif que $LOO\cdot$. Il propage le phénomène d'oxydation en arrachant un atome d'hydrogène aux lipides et aux hydroperoxydes.



Le radical $LO\cdot$ peut aussi conduire à la formation d'un composé cyclique lorsqu'un atome d'hydrogène n'est pas immédiatement disponible, ce qui entraîne la formation d'une molécule possédant une fonction époxyde et un radical époxy-allylique (Figure I.3).

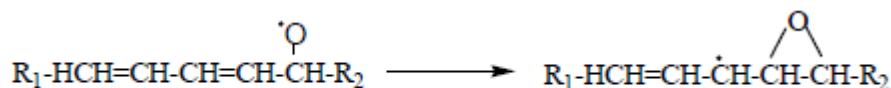


Figure I.3. Formation d'un époxyde à partir d'un radical alkoxy (Schaich, 2005).

La cyclisation des radicaux $LO\cdot$ a lieu à température ambiante, mais quand la température augmente, les réactions de scission et d'arrachement d'hydrogène sont favorisées. La scission subie par les radicaux alkoxyde correspond à une rupture de la liaison C-C en position α du carbone portant la fonction alkoxyde. Elle conduit à la formation d'un radical vinyle et d'un radical alkyle. Ces radicaux réagissent soit avec l'hydrogène, l'oxygène ou le radical hydroxyle, ce qui conduit à la formation de composés carbonylés tels que les aldéhydes, les cétones et les alcools (Figure I.4).

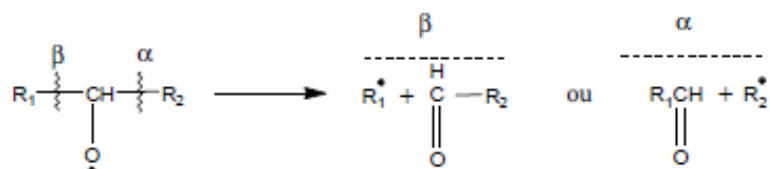
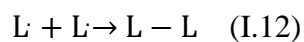
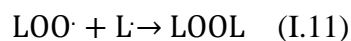


Figure I.4. Scission des radicaux alkoxydes (Schaich, 2005).

1.1.3. Terminaison

Le terme « terminaison » se réfère à un radical spécifique et non pas à la réaction globale (Schaich, 2005), car d'un point de vue pratique, la réaction d'oxydation lipidique ne s'arrête que lorsqu'il n'y a plus de doubles liaisons disponibles. La phase de terminaison correspond aux derniers stades de l'oxydation pendant lesquels les espèces radicalaires se recombinent pour former des produits non radicalaires, ce qui met fin aux cycles réactionnels.

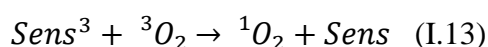


Cette phase implique la formation de composés de plus haut poids moléculaire.

En conclusion, l'oxydation met en jeu un ensemble de réactions simultanées et génère des composés multiples, plus ou moins stables. Si l'oxydation est classiquement décrite par les trois étapes successives, initiation, propagation et terminaison, le phasage de ces étapes est probablement plus complexe, car les composés secondaires d'oxydation, pourraient en réalité apparaître dès les premières étapes de l'oxydation des lipides, simultanément avec les composés primaires d'oxydation (Figure I.5) (Schaich, 2005).

1.2. Photo-oxydation

La photo-oxydation est une voie de peroxydation lipidique initiée par des substances photo-sensibilisatrices. La photo-oxydation correspond à la dégradation oxydative des lipides en présence d'oxygène, d'énergie lumineuse et de photo-sensibilisateurs (Choe et Min, 2006 ; Choe et Min, 2009 ; Shahidi et Zhong, 2010). Dans les aliments, les photo-sensibilisateurs sont des molécules telles que les hémoprotéines, la riboflavine ou d'autres pigments (Frankel, 2005c). En présence d'un photo-sensibilisateur, l'énergie lumineuse convertit l'oxygène triplet (3O_2) en oxygène singulet (1O_2), qui peut réagir directement sur les doubles liaisons insaturées des chaînes grasses (Hultin, 1994 ; Frankel, 2005c). En effet, dans son état fondamental, la molécule d'oxygène sous son état triplet est stable et incapable de réagir avec les acides gras insaturés. Les photo-sensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes (Frankel, 2005c). Selon le premier mécanisme, les molécules photosensibles réagissent dans leur état excité avec l'oxygène triplet auquel elles transfèrent leur énergie pour donner un oxygène singulet (I.13) (Frankel, 2005c). L'oxygène singulet est très réactif et peut attaquer les acides gras insaturés pour former les hydroperoxydes.



Dans un second mécanisme, la molécule photosensible dans son état excité agit comme les radicaux libres initiateurs et arrache un hydrogène de l'acide gras insaturé pour former un radical libre (I.14) qui est capable de réagir avec la molécule d'oxygène dans son état fondamental (Frankel, 2005c).



1.3. Oxydation enzymatique

L'oxydation des lipides se produit par voie enzymatique principalement par l'action de la lipoxygénase (Frankel, 2005d ; Choe et Min, 2009), la cyclooxygénase, la peroxydase et la polyphénol-oxydase. Cette oxydation se produit soit dans les tissus végétaux et animaux soit au niveau de la trituration des graines et des fruits (malaxage), soit dans l'huile (Decker, 2002 ; Erickson, 2002).

L'oxydation enzymatique qui se déroule en trois étapes consécutives (Kuhn et Thiele, 1999 ; Kuhn, 2000) est plus détaillée dans la Figure I.6.

La première étape de la catalyse consiste en l'abstraction stéréospécifique par l'enzyme d'un des deux atomes d'hydrogène du groupe méthylène central dans le système 1,4 (Z-Z) pentadiénique (Figure I.6) (Grechkin, 1998). C'est l'étape limitante de la catalyse, le radical allylique obtenu étant plus réactif que l'acide gras polyinsaturé de départ. Cette réaction conduit à la formation d'un radical organique dont les électrons sont délocalisés sur tout le système pentadiénique (Khün et al., 2002). Les lipoxygénases végétales attaquent uniquement le C11 prochiral de l'acide linoléique et de l'acide linoléique (Grechkin, 1998). Le proton méthylénique est capté par une molécule d'eau présente au niveau du site actif (Prigge et al., 1997). Dans une seconde étape, le radical allylique formé lors de la première étape subit une isomérisation (n+2) ou (n-2) selon la région du substrat accessible à l'atome de fer du site catalytique de l'enzyme (Figure I.6) (Grechkin, 1998). Au cours de la dernière étape, l'oxygène moléculaire vient se fixer sur le radical pentadiénique (Figure I.6) (Grechkin, 1998) pour former un radical hydroperoxyde.

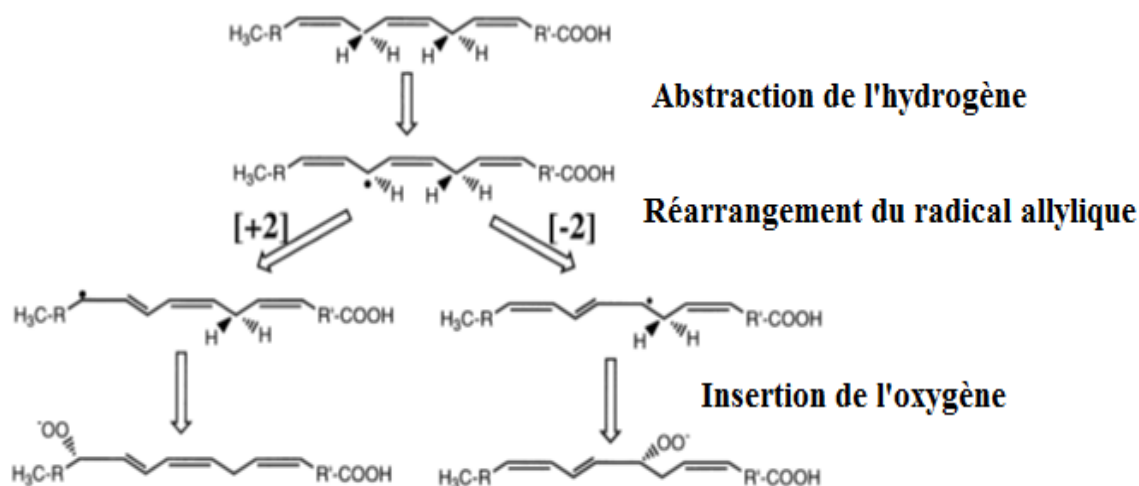


Figure I.6. Les trois étapes de l'oxydation radicalaire par la lipoxygénase (Kuhn et Thiele, 1999).

Parallèlement à ce mécanisme réactionnel, l'atome de fer du site actif de l'enzyme est impliqué dans un cycle d'oxydo-réduction (Figure I.7).

Dans la forme inactive des lipoxygénases, l'atome de fer est réduit (Fe^{2+}). L'oxydation de l'atome de fer sous sa forme ferrique (Fe^{3+}) est nécessaire pour que la catalyse commence. Puis, l'arrachement de l'hydrogène du groupement méthylène allylique conduit à la formation d'un radical pentadiényle et d'un proton (Figure I.7A).

Parallèlement à l'abstraction du proton, se produit l'abstraction d'un électron. L'électron réduit l'atome de fer sous sa forme Fe^{2+} . L'insertion d'une molécule d'oxygène génère un radical hydroperoxyde réduit en anion par l'oxydation simultanée de l'atome de fer sous sa forme ferrique (Figure I.7B). Un proton est capté pour former l'hydroperoxyde (Figure I.7C). L'enzyme est alors capable de recommencer un cycle de réaction.

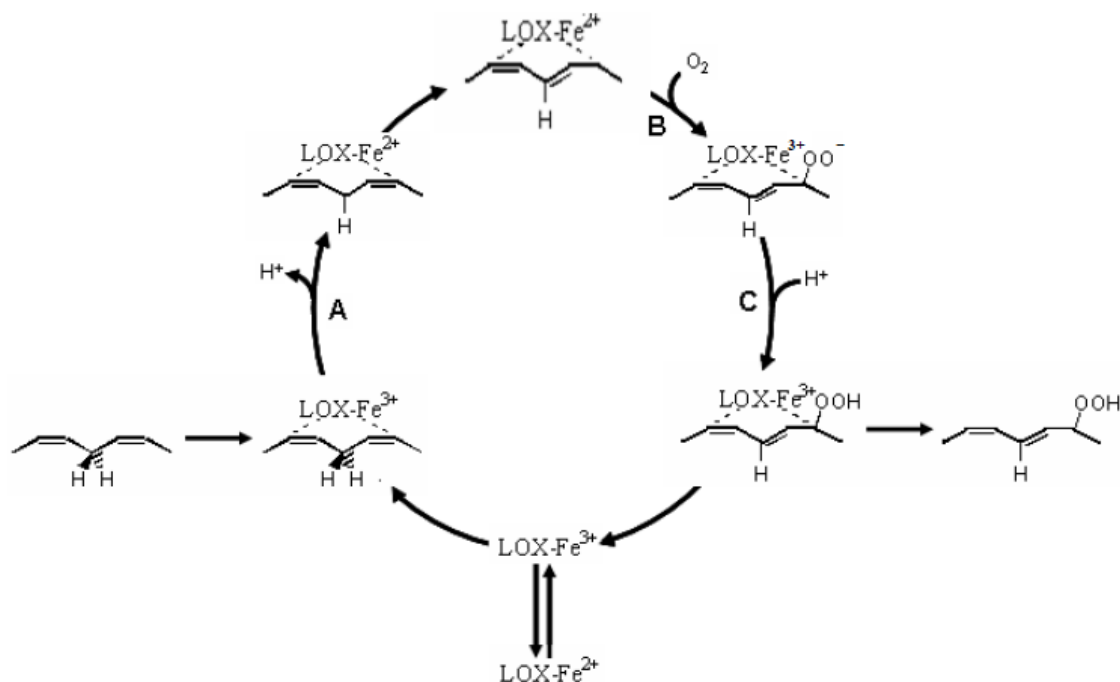


Figure I.7. Oxydation de l'atome de fer de la lipoxigénase au cours de la réaction catalytique (d'après Khun et Borchert, 2002).

L'oxydation enzymatique par la lipoxigénase a été employée dans plusieurs études afin de synthétiser des molécules aromatisantes à partir des huiles végétales riches en acides gras insaturés (Gargouri et Legoy, 1997 et 2002 ; Gargouri et al., 2008 ; Akacha et Gargouri, 2009 ; Kotti et al., 2010 ; Clodoveo et al., 2014 ; Hachicha et al., 2016). Les molécules aromatisantes sont des aldéhydes et des alcools tels que l'hexanal (Akacha et Gargouri, 2009) et les phénols volatils (Hachicha Hbaieb et al., 2016).

1.4. Aspect cinétique de l'oxydation des lipides

L'évolution cinétique de l'oxydation des lipides avec l'apparition/disparition des différents produits peut être décrite par plusieurs étapes (Figure I.8) :

① La phase de latence ou d'initiation pendant laquelle il y a une disparition progressive des antioxydants, la formation de radicaux libres en quantités faibles par réaction des acides gras insaturés et de l'oxygène. La durée de la phase d'initiation dépend de nombreux facteurs

comme la quantité d'antioxydants initialement présents dans la matrice, la présence de traces d'espèces pro-oxydantes ou de catalyseurs d'oxydation, l'état physique de la phase lipidique, etc.

② La formation de produits primaires d'oxydation tels que les hydroperoxydes.

③ La formation de produits secondaires par suite de la décomposition des hydroperoxydes, parmi lesquels les composés volatils d'oxydation, qui sont responsables de la dégradation de l'odeur des aliments oxydés ou des acides qui participent au développement du goût de rance.

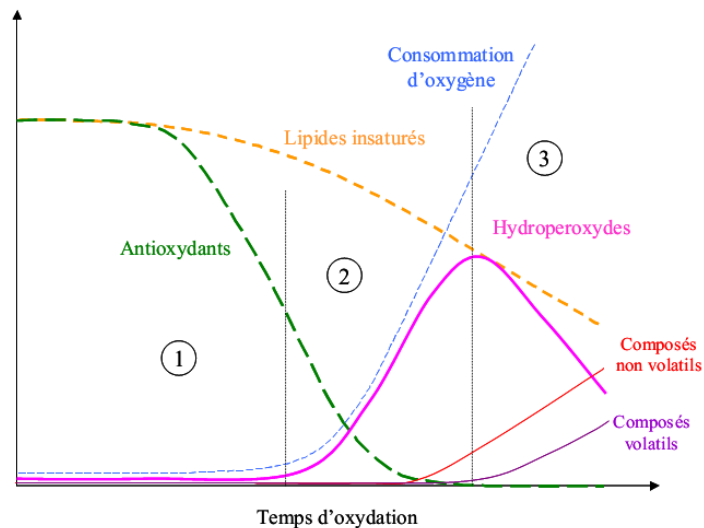


Figure I.8. Représentation schématique de l'évolution cinétique des marqueurs de l'oxydation des lipides (Labuza, 1971).

Le temps d'oxydation présenté dans la Figure I.8 dépend de nombreux paramètres tels que la nature de l'huile, la disponibilité d'oxygène, la température, etc.

1.5. Initiateurs de l'auto-oxydation

1.5.1. L'oxygène

L'influence de l'oxygène sur la vitesse de l'oxydation peut être décrite qualitativement et quantitativement. D'un point de vue qualitatif, la réaction d'oxydation en présence de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ est beaucoup plus rapide qu'en présence de l'oxygène triplet $^3\text{O}_2$ car l'oxygène singulet peut directement réagir avec les lipides alors que l'oxygène triplet réagit avec les radicaux lipidiques. D'un point de vue quantitatif, la quantité d'oxygène dissout dans l'huile est suffisante pour oxyder l'huile à une valeur de l'indice de peroxyde d'environ 10 meq/kg (Przybylski et Eskin, 1988). Il existe trois cas à distinguer afin de décrire l'influence de la concentration de l'oxygène sur la cinétique de l'oxydation (Labuza, 1971) :

- A des pressions partielles élevées en oxygène, l'oxygène n'est pas limitant, le taux d'oxydation dépend de la concentration du substrat, la phase de propagation est rapide et tous les radicaux libres se transforment en radicaux peroxydes, indépendamment de la concentration en oxygène.
- A des pressions partielles intermédiaires, l'influence de la pression partielle de l'oxygène est plus importante.
- Lorsque l'oxygène se trouve à de faibles pressions partielles, c-à-d que l'oxygène est limitant, Si la concentration du substrat est élevée, la vitesse d'oxydation dépend directement de la pression partielle d'oxygène et la concentration du substrat ne varie presque pas.

Le rapport surface/volume entre la phase lipidique et le récipient, ou l'interface lipides/air est aussi un paramètre à prendre en considération : plus ce rapport est important, plus l'oxydation est élevée (Tan et al., 2002 ; Kanavouras et al., 2005) et la vitesse de l'oxydation est moins dépendante de l'oxygène même si sa pression partielle est faible.

1.5.2. La température

La température est l'un des principaux facteurs impliqués dans l'oxydation des lipides au cours des procédés de transformation et de conservation des aliments. Par exemple, une étude de l'oxydation de 10 huiles végétales différentes à des températures entre 110 °C et 140

°C montre que l'oxydation lipidique est fortement corrélée à la température (Tan et al., 2001). En général, l'augmentation de la température entraîne une augmentation de la vitesse d'oxydation qui suit la loi d'Arrhenius (Sathivel et al., 2008) :

$$V = A \cdot e^{\frac{-E_a}{R.T}} \quad (I.15)$$

Avec V la vitesse de l'oxydation de l'huile ($J.g^{-1}.h^{-1}$) ; E_a l'énergie d'activation de la réaction de l'oxydation ($J.mol^{-1}$) ; A le facteur pré-exponentiel, ayant la même unité que la vitesse ($J.g^{-1}.h^{-1}$) ; R la constante des gaz parfaits ($8,314 J.mol^{-1}.K^{-1}$) et T la température (Kelvin).

L'arrachement de l'atome d'hydrogène par un $LOO\cdot$ est favorisé par les températures élevées. A température ambiante, la constante de vitesse d'arrachement de l'hydrogène par un radical peroxyde est inférieure à $1 M^{-1}.s^{-1}$ tandis qu'à 65 °C, elle est égale à $10^3-10^4 M^{-1}.s^{-1}$ (Ingold, 1969).

La Figure I.9 montre que la température influence à la fois la période d'induction et la teneur en hydroperoxydes. Ainsi, lorsque la température est basse ou modérée, la formation des produits d'oxydation est lente ce qui correspond à une phase d'induction longue (Velasco et Dobarganes, 2002). Šimon et Kolman (2001) montrent que l'élévation de température de 100 °C jusqu'à 125 °C permet de diminuer le temps d'induction d'environ 11 heures à moins de 2 heures pour l'huile de colza et de 7 heures à une heure pour l'huile de tournesol. Les produits d'oxydation qui apparaissent à ce stade sont principalement les hydroperoxydes et des composés volatils mineurs, en particulier des composés carbonylés. Au-dessus de 150 °C, la formation des hydroperoxydes est pratiquement absente car leur décomposition en produits secondaires devient très rapide et les composés polymériques se forment. Par exemple, l'oxydation du linoléate d'éthyle à 70 °C pendant 6 heures fait augmenter l'indice de peroxyde à 1777 meq/kg, alors qu'il n'atteint que 198 meq/kg après 10 minutes à 250 °C (Nawar, 1989).

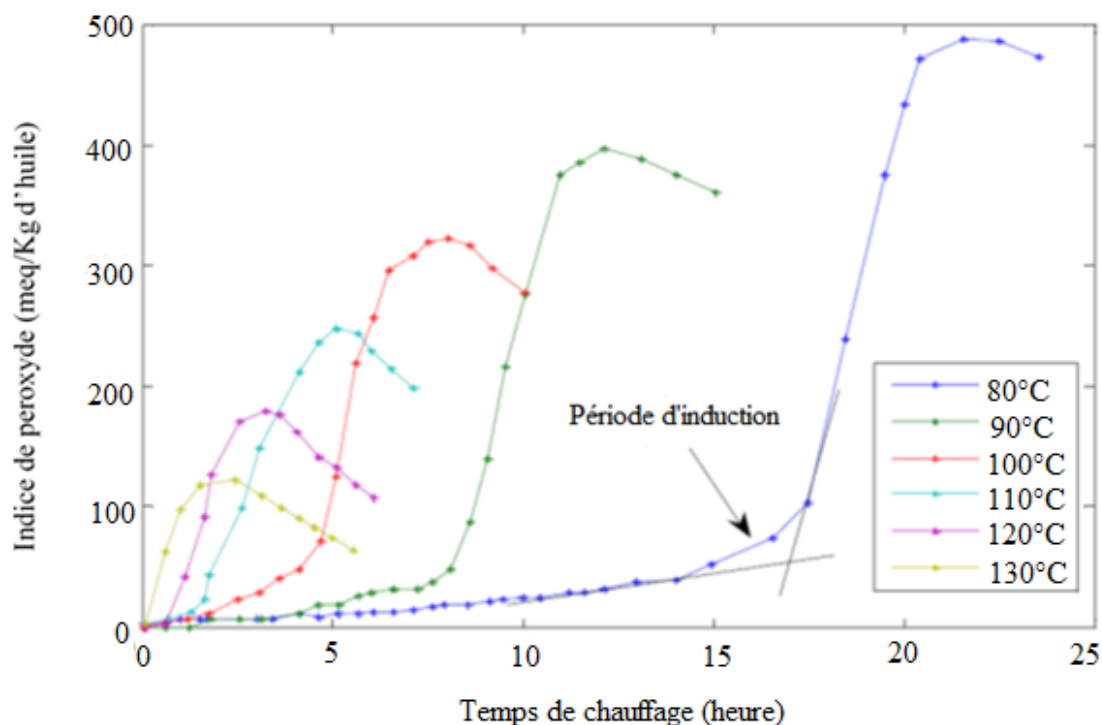


Figure I.9. Effet de la température sur l'oxydation de l'huile de lin (Kamal Eldin et al., 2003).

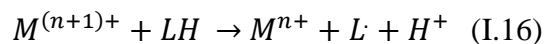
D'un point de vue pratique, diminuer la température est donc un bon moyen pour augmenter la durée de conservation des produits. On considère qu'il est nécessaire d'atteindre des températures de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour arrêter complètement l'oxydation car à une température de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ la formation de peroxydes reste possible (Ke et al., 1977).

1.5.3. Les métaux

Les métaux qui peuvent catalyser l'oxydation lipidique sont ceux capables de transférer un électron comme le cobalt, le fer, le cuivre, le manganèse, le magnésium et le vanadium. Les métaux qui s'oxydent par le transfert de deux électrons, tels que l'étain Sn^{2+} , ne peuvent pas catalyser l'oxydation (Schaich, 2005). L'initiation de l'oxydation lipidique par les métaux peut se faire par transfert d'électrons ou par formation de complexes de transition ou de complexes avec le peroxyde d'hydrogène qui catalysent l'auto-oxydation et la décomposition

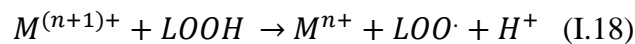
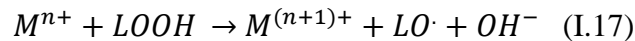
des hydroperoxydes par des réactions de type rédox. Les mécanismes et les vitesses de l'oxydation initiés par les métaux de transition sont déterminés par plusieurs facteurs tels que le potentiel d'oxydo-réduction, la présence d'agents chélatants, la phase de localisation du métal, et la disponibilité de l'oxygène ou des hydroperoxydes préformés. Les réactions décrites ci-dessous montrent la multiplicité des mécanismes possibles. Les ions métalliques peuvent provoquer la formation d'espèces radicalaires par les voies suivantes (Nawar, 1996 ; Frankel, 2005b ; Choe et Min, 2009) :

- L'attaque directe des acides gras insaturés :

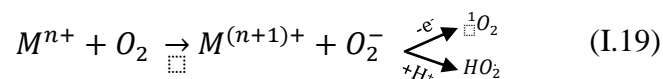


Cette réaction conduit à la formation d'un radical alkyle ($L\cdot$).

- La décomposition des hydroperoxydes :



- L'activation de l'oxygène moléculaire pour donner de l'oxygène singulet :



Selon ce mécanisme, les ions métalliques sont présents dans deux états de valence avec un potentiel rédox approprié. La réaction (I.17) est généralement plus rapide que la réaction (I.18) et le métal est principalement converti vers son état le plus oxydé, ce qui implique que la vitesse de la réaction en chaîne dépend de la réaction (I.19).

D'un point de vue cinétique, le cuivre est plus pro-oxydant que le fer vis-à-vis des huiles (Evans et al., 1951 ; Andersson et Lingnert, 1998). C'est une des raisons pour lesquelles la dose maximale de fer tolérée dans les huiles est supérieure à celle du cuivre (1,5 mg/kg de fer contre 0,1 mg/kg de cuivre, dans les huiles raffinés) (CODEX STAN 210-1999). Pour le fer, toujours vis-à-vis des huiles, l'activité catalytique du fer ferreux Fe^{2+} est plus importante que celle du fer ferrique Fe^{3+} . La Figure I.10 schématise les principales voies de formation de radicaux lipidiques en présence du fer et du cuivre dans ses deux états principaux de valence.

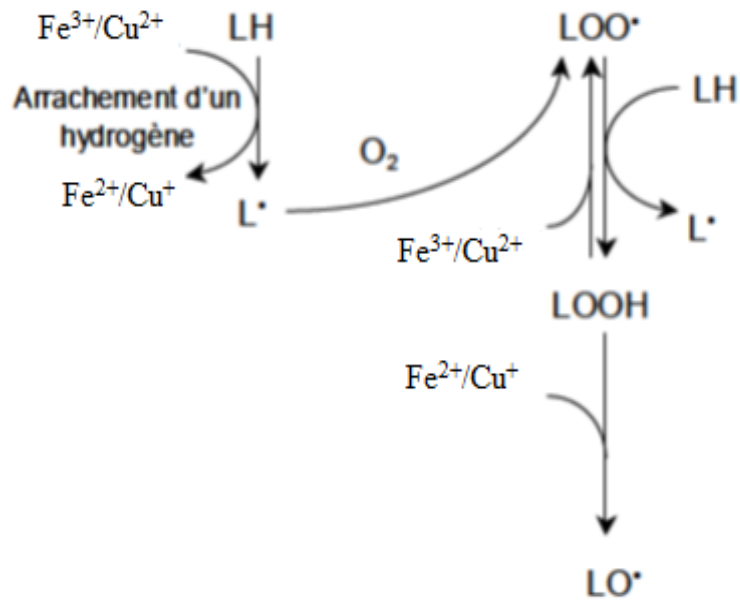


Figure I.10. Représentation schématique de l'oxydation des lipides initiée par du fer ou du cuivre.

En conclusion, les métaux sont des catalyseurs efficaces de l'oxydation même à l'état de traces (Frankel, 2005b). Ils peuvent exister naturellement dans les matrices alimentaires mais aussi provenir du matériel utilisé pendant la fabrication (si on n'utilise pas un matériel inoxydable) et le stockage des produits alimentaires (si le stockage ne se fait pas à l'abri de la lumière et à température contrôlée).

1.6. Formation et décomposition des hydroperoxydes : application aux acides oléique (18:1 n-9), linoléique (18:2 n-6) et α -linoléique (18:3 n-3)

Le type d'hydroperoxydes produits au cours de l'oxydation varie selon l'acide gras considéré (Frankel et al. 1977 ; Frankel et al., 1979 ; Frankel, 2005e). Dans la mesure où le travail de thèse porte sur des huiles végétales, nous allons détailler la formation des produits d'oxydation issus des trois acides gras majoritaires, i.e. acide oléique (18:1 n-9), acide linoléique (18:2 n-6) et acide α -linoléique (18:3 n-3), trouvés dans ces huiles.

1.6.1. Formation des hydroperoxydes

Dans le cas de l'acide oléique, l'initiation entraîne la libération d'un hydrogène en α , de la double liaison, qui se situe sur les carbones 8 ou 11, et donne deux radicaux allyliques. Par la suite, l'oxygène se fixe sur l'un des deux carbones terminaux de ces radicaux et les 8-, 9-, 10- et 11- monohydroperoxydes oléiques se forment (Figure I.11).

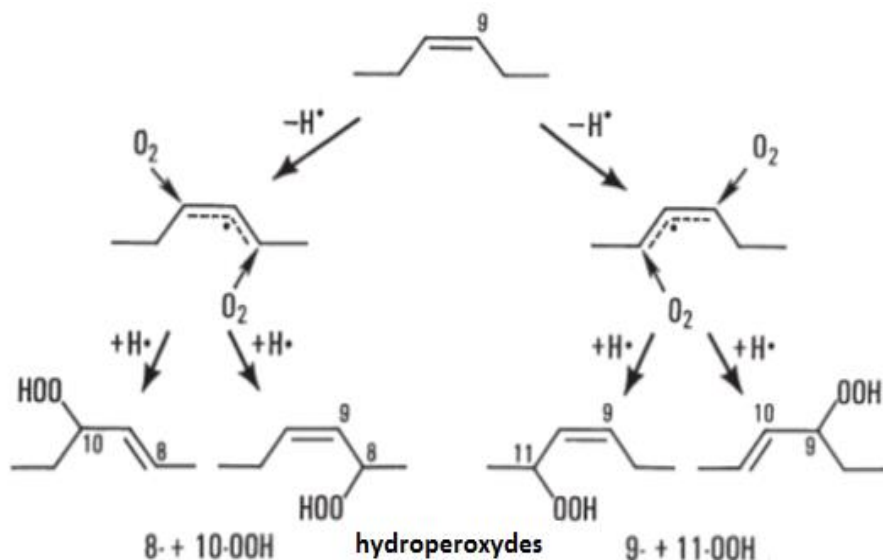


Figure I.11. Mécanisme de formation des 8-, 9-, 10- et 11- monohydroperoxydes à partir de l'acide oléique (Frankel, 2005e).

Les acides linoléique et α -linoléique présentent respectivement une et deux fonctions bisallyliques dans leur chaîne grasse insaturée, ce qui est favorable à l'arrachement d'un atome d'hydrogène (Frankel, 2005b). Dans le cas de l'acide linoléique, le départ d'hydrogène se fait essentiellement sur le carbone 11 et donne un radical pentadiényle. Ensuite, l'oxygène se fixe en positions 9 et 13 (Figure I.12). La réaction d'oxygène avec ce radical, au niveau des carbonnes 9 ou 13, conduit à la formation d'un mélange de deux hydroperoxydes conjugués :

- 9-hydroperoxy-trans-10, cis-12-octadécadiénoate (cis, trans-9-OOH)
- 9-hydroperoxy-trans-10, trans-12- octadécadiénoate (trans, trans-9-OOH)
- 13-hydroperoxy-cis-9, trans-11- octadécadiénoate (cis, trans-13-OOH)
- 13-hydroperoxy-trans-9, trans-11- octadécadiénoate (trans, trans-13-OOH)

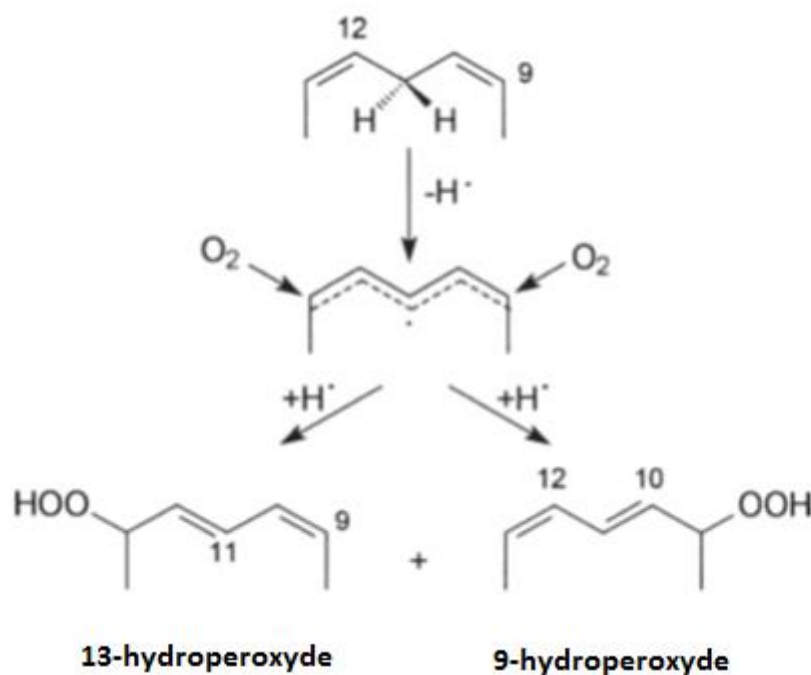


Figure I.12. Mécanisme de formation de 9- et 13- monohydroperoxydes à partir de l'acide linoléique (Frankel, 2005e ; Choe et Min, 2006).

Dans le cas de l'acide α -linoléique (C18:3 n-3), l'arrachement de l'hydrogène se fait principalement au niveau des carbonnes 11 et 14, et l'oxygène se fixe en positions 13 et 16 (Figure I.13). La fixation d'oxygène sur les carbonnes 9 et 13 ou 12 et 16, respectivement,

conduit à la formation d'un mélange d'hydroperoxydes conjugués contenant tous une double liaison isolée en configuration cis :

- 9-hydroperoxy-trans-10, cis-12, cis-15-octadécatriénoate (trans,cis,cis-9-OOH)
- 13-hydroperoxy-cis-9, trans-11, cis-15-octadécatriénoate (cis,trans,cis-13-OOH)
- 12-hydroperoxy-cis-9, trans-13, cis-15-octadécatriénoate (cis,trans,cis-12-OOH)
- 16-hydroperoxy-cis-9, cis-12, trans-14-octadécatriénoate (cis,cis,trans-16-OOH)

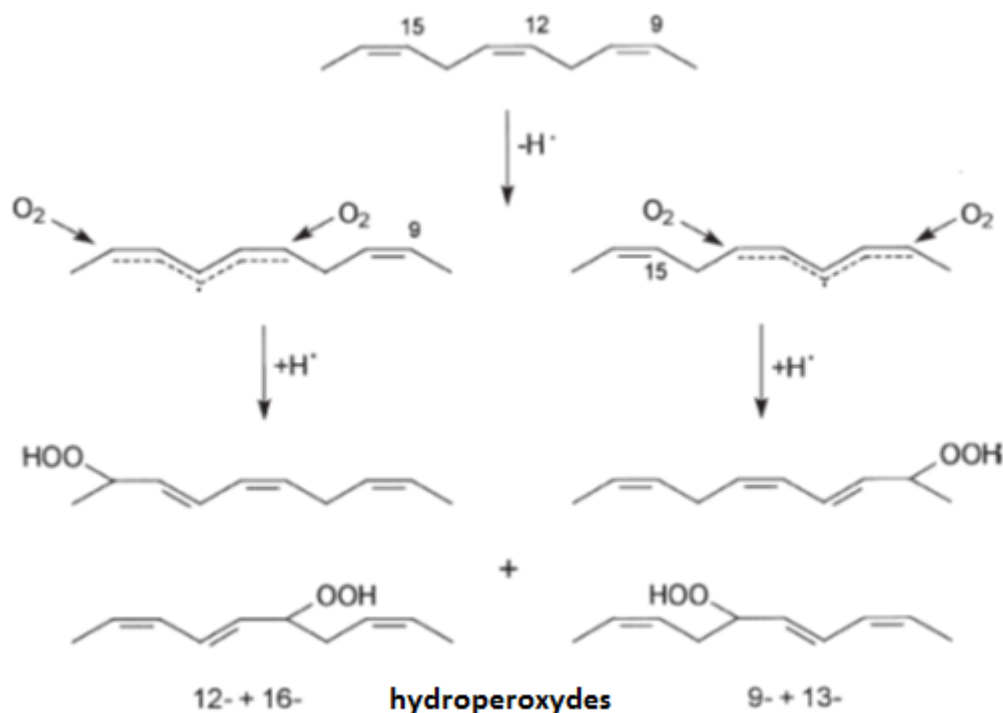
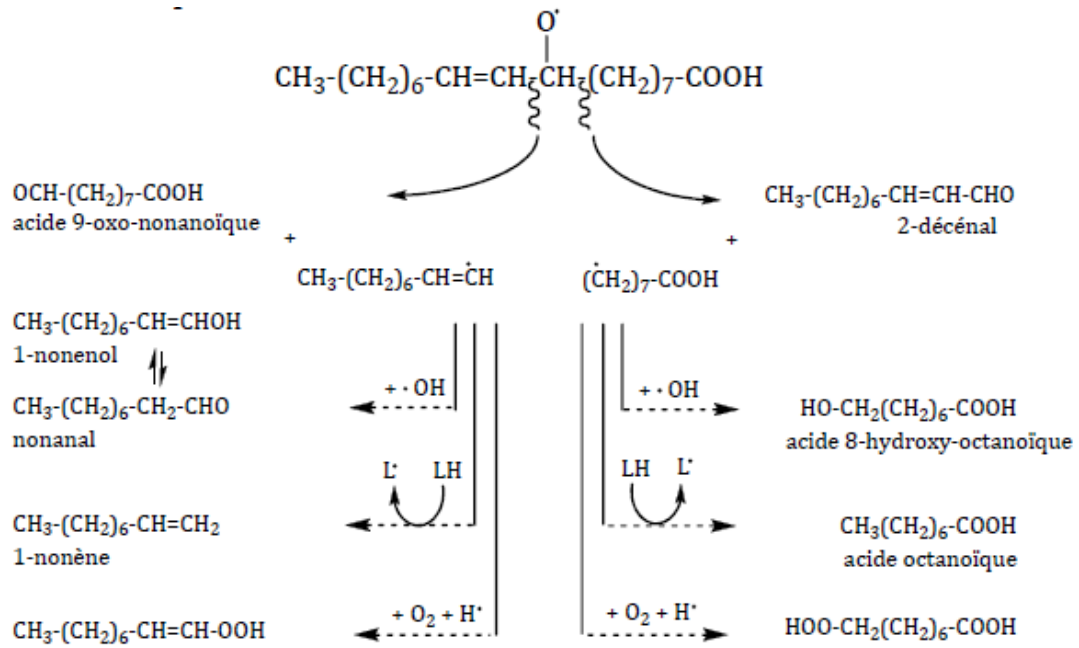


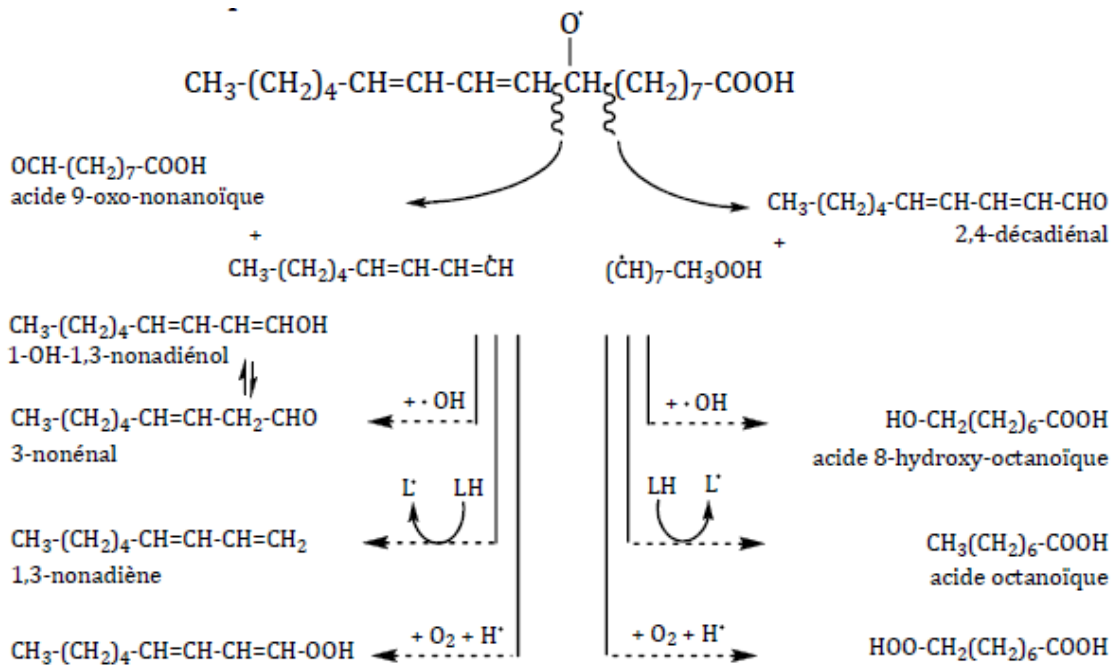
Figure I.13. Mécanisme de formation des 9-, 12-, 13- et 16- monohydroperoxydes à partir de l'acide α -linoléique (Frankel, 2005e).

1.6.2. Décomposition des hydroperoxydes et produits secondaires formés

En présence de métaux ou à des températures élevées, les hydroperoxydes se décomposent pour former des composés secondaires d'oxydation, qui sont responsables de la dégradation des qualités organoleptiques des aliments. La nature de ces composés dépend de l'acide gras initial, notamment son degré d'insaturation, du type d'hydroperoxyde formé et de la localisation de la rupture homolytique. Les composés secondaires qui se forment suite à la scission des hydroperoxydes des acides oléique, linoélique et α -linoléique sont présentés dans la Figure I.14.



A



B

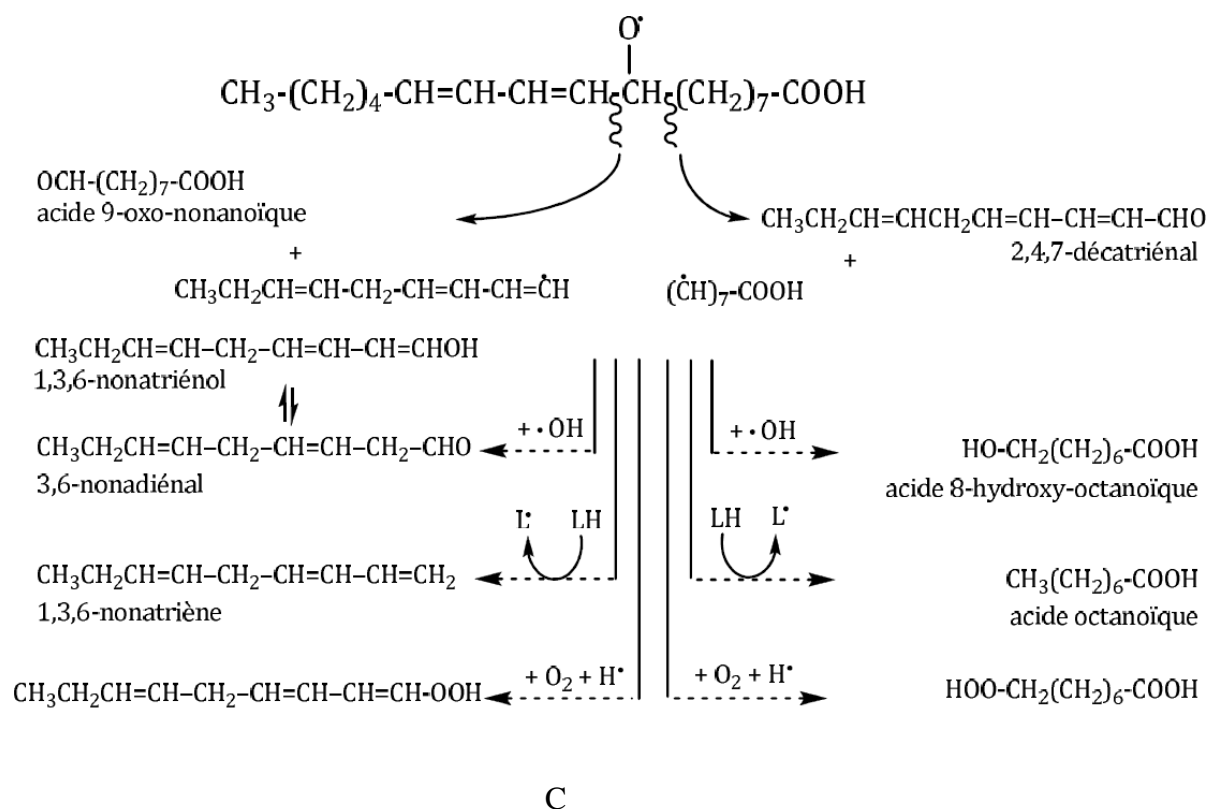


Figure I.14. Formation des composés secondaires d'oxydation à partir des monohydroperoxydes des acides oléique (A), linoléique (B) et α -linoléique (C) (Schaich, 2005).

1.7. Méthodes de suivi des produits d'oxydation

Il existe de nombreuses méthodes analytiques, chimiques et physiques, qui visent à mesurer l'oxydation lipidique. Les hydroperoxydes LOOH, qui sont des composés sans goût ni odeur, produits pendant l'étape de propagation de l'oxydation, sont les premiers produits suffisamment stables qui peuvent être suivis par les méthodes chimiques de mesure de l'oxydation. Dans les étapes ultérieures de l'oxydation, les concentrations des composés primaires diminuent car leurs taux de formation deviennent plus lents que leurs taux de décomposition, pour faire apparaître les produits secondaires d'oxydation. Étant donné que ces réactions peuvent générer des centaines de composés volatils et non volatils qui sont impossibles à mesurer simultanément, il est essentiel de disposer de plusieurs méthodes de caractérisation pour décrire qualitativement ou quantitativement l'oxydation. Les méthodes classiques du suivi des produits de l'oxydation sont chimiques ou physiques (Nawar, 1996 ; Shahidi et Zhong, 2005), mais il existe aussi les méthodes enzymatiques (Rejeb, 2010) et thermiques (Cross, 1969 ; Kowalski et al., 1997).

1.7.1. Méthodes classiques

Lors des études de cinétique d'oxydation des lipides, l'état d'avancement de la réaction peut être évalué par une grande variété de méthodes disponibles en fonction de l'information et de la précision recherchées et du substrat étudié. Les méthodes classiques largement utilisées dans l'étude de l'oxydation des lipides sont basées sur des analyses physiques ou chimiques. Elles comportent des analyses standardisées et d'autres dont l'utilisation nécessite une instrumentation spécifique et sophistiquée. Il est nécessaire de sélectionner l'analyse adéquate selon le produit à étudier. Le Tableau I.1 présente les principales méthodes citées dans la littérature (Nawar, 1996 ; Frankel 2005f, Shahidi et Zhong, 2005).

Tableau I.1. Principales méthodes usuelles de caractérisation de l'oxydation des huiles.

| Composé détecté | Principe de mesure | |
|--|--|--|
| Réactifs Perte des AGPI | Analyse par chromatographie en phase gazeuse pour déterminer la composition en acides gras Indice d'iode pour mesurer le nombre des insaturations des acides gras | |
| | Mesure de l'augmentation du poids gagné par la fixation de l'oxygène sur les acides gras Mesure de la réduction de la pression de l'oxygène par chromatographie en phase gazeuse couplée à l'espace de tête Technique de détection électrochimique | |
| Produits primaires de l'oxydation | Hydroperoxydes | Titration iodométrique (indice de peroxyde) Mesure de l'oxydation des ions ferreux en ions ferriques en présence du thiocyanate d'ammonium ou du xylénol orange Mesure basée sur la réaction stœchiométrique du tri-phénylphosphine (TPP) avec les hydroperoxydes et mesure de la bande d'absorption par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier Détection des produits chemiluminescents générés par la réaction des hydroperoxydes avec le luminol et le dichlorofluorescéine Détection de hydroperoxydes spécifiques par chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide |
| | Diènes et triènes conjugués | Mesure de l'absorption à 233 et 268 nm respectivement |
| | Radicaux libres | Mesure de la résonance paramagnétique électronique : absorption de l'énergie microonde par un échantillon placé dans un champs magnétique varié |

Tableau I.1. Principales méthodes usuelles de caractérisation de l'oxydation des huiles (suite).

| | Composé détecté | Principe de mesure |
|---|--|---|
| Produits secondaires de l'oxydation | Aldéhydes | Réaction colorée entre p-Méthoxyaniline et les composés aldéhydiques (principalement 2-alkénals et 2,4-alkadiénals) (indice de para-anisidine) |
| | Détermination des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique) | Réaction colorée de produits d'oxydation avec l'acide thiobarbiturique (malonaldéhyde, alkénals et alkadiénals) |
| | Acides organiques volatils | Formation d'acides à courte chaîne (acides formique et acétique) mesurée par la détermination de l'Indice de stabilité de l'huile |
| | Composés carbonylés totaux | Réaction colorée entre les composés carbonylés (aldéhydes et cétones) et le 2,4-dinitrophénylhydrazone pour donner les hydrazones analysés par spectrophotométrie |
| | Composés carbonylés volatils | Séparation et identification des aldéhydes à courte chaîne par chromatographie couplée à l'espace de tête |
| | Hydrocarbures | Chromatographie en phase gazeuse pour les hydrocarbures à courte chaîne (C1-C5) |
| Produits primaires et secondaires de l'oxydation | Indice d'oxydation totale Totox | $Totox = 2 I_p + I_{pA}$ |
| | Résonance magnétique nucléaire | Changement de l'environnement moléculaire du proton (1H) ou du carbone (13C) |

1.7.2. Méthodes thermiques

Les analyses chimiques de l'oxydation lipidique sont souvent basées sur l'utilisation de solvants qui peuvent être nocifs pour la santé et qui nécessitent un recyclage spécifique compte-tenu des contraintes environnementales. De plus, ces techniques sont souvent longues à mettre en œuvre si elles ne sont pas automatisées. Citons l'exemple de la mesure des produits primaires d'oxydation comme l'indice de peroxyde ou la concentration en diènes conjugués classiquement utilisée pour caractériser les stades précoces de l'oxydation. Ces déterminations utilisent, respectivement, du chloroforme et de l'hexane. Les analyses physiques pour mesurer l'oxydation des lipides nécessitent souvent l'utilisation d'appareillages à coût élevé (spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, spectroscopie infra rouge,...). Néanmoins, plusieurs études reportent l'utilisation de techniques thermo-analytiques pour déterminer l'état d'oxydation des huiles. En effet, l'oxydation implique un nombre de transitions exothermiques. La calorimétrie à balayage différentiel (DSC) est parmi les techniques thermiques qui peuvent être utilisées dans l'étude de l'oxydation lipidique.

1.7.2.1. Principe de la DSC

La DSC est basée sur la mesure de la différence de température (ΔT) qui s'établit entre le matériau qui réagit (l'échantillon) et le matériau inerte (la référence). En effet, lorsqu'un système subit une réaction de transformation sous l'effet d'un programme de chauffage ou de refroidissement, sa température évolue différemment de celle d'un matériau inerte à la chaleur. La différence de température (ΔT) est proportionnelle à la chaleur échangée au cours de la réaction :

$$Q = mC_p \Delta T \quad (I.20)$$

Avec Q la quantité de chaleur échangée (J) ; ΔT la différence de température (K) et C_p la capacité thermique massique ($J.K^{-1}.g^{-1}$).

1.7.2.2. Avantages de l'utilisation de la DSC dans l'étude de l'oxydation des lipides

La DSC permet le suivi en temps réel de l'oxydation et dans des conditions accélérées. Elle peut être utilisée en conditions isothermes et non isothermes, dans des conditions d'auto-oxydation ou de thermo-oxydation, en se basant sur le caractère exothermique des réactions d'oxydation (Cross, 1969 ; Kowalski et al., 1997 ; Tan et Man, 2002 ; Vittadini et al., 2003). La DSC est une méthode sensible, qui permet, en utilisant une petite masse d'huile, la mesure directe du flux de chaleur dégagé par la réaction chimique sans avoir besoin de préparation de l'échantillon de l'huile. La procédure expérimentale est simple et le temps d'analyse peut être réduit en cas d'application de températures élevées. D'après Hassel et al. (1976), les échantillons d'huile qui nécessitent 14 jours par la méthode AOM (active oxygen method), pourraient être étudiés en moins de 4 heures par DSC. De plus, l'utilisation de la DSC en mode non-isotherme permet la mesure des paramètres cinétiques de la loi d'Arrhenius tels que l'énergie d'activation, le facteur pré-exponentiel et la constante de vitesse de la réaction.

La DSC a été utilisée pour caractériser la stabilité oxydative des acides gras libres (Litwinienko et al., 1999 ; Ulkowski et al., 2005), de la lécithine (Ulkowski et al., 2005), d'huiles végétales pures (Kasprzycka-Guttman et al., 1995 ; Šimon et Kolman, 2001 ; Tan et al., 2002 ; Vecchio et al., 2009) ou en mélange (Thurgood et al., 2007). Elle a montré de bonnes corrélations avec les analyses chimiques (Cross, 1969 ; Kowalski et al., 1997 ; Tan et al., 2002 ; Vittadini et al., 2003) et avec l'indice de stabilité oxydative OSI mesuré par la méthode Rancimat (Tan et al., 2002 ; Arain et al., 2009 ; Pardauil et al., 2011).

Néanmoins, les appareillages de DSC actuellement disponibles sur le marché présentent des inconvénients : un investissement matériel avec un coût élevé et une utilisation pouvant être limitée par la capacité du volume de la cellule d'échantillonnage. De plus, si les dispositifs de DSC actuels permettent le contrôle de paramètres ayant une influence sur l'oxydation lipidique tels que la pression d'oxygène (Lopez-Beceiro et al., 2011 ; Ciemniowska-Zytkiewicz et al., 2014), ils ne permettent pas de jouer sur le rapport surface/volume de l'échantillon. Enfin, la plupart des DSC disponibles sur le marché ne sont pas capables de mesurer avec précision et sans dérive de la ligne de base des flux de l'ordre de quelques dizaines de microwatts (ordre de grandeur des puissances mises en œuvre dans les réactions d'oxydation).

2. Emulsions inverses : caractérisation de la stabilité physique et oxydative

La stabilité des émulsions est principalement déterminée par les propriétés de l'interface eau/huile formée. Cette stabilisation nécessite l'utilisation de molécules tensioactives qui, du fait de leur nature amphiphile, vont s'adsorber à l'interface et interagir avec la phase aqueuse. Ce chapitre présente, dans une première partie, les propriétés de tensioactifs, notamment celles de tensioactifs lipophiles tels que le polyricinoléate de polyglycérol (PGPR) et les monoglycérides distillés (DMG) utilisés dans la formulation des émulsions inverses alimentaires. Dans une deuxième partie, les grands principes de déstabilisation des émulsions sont décrits. La troisième partie est focalisée sur l'oxydation d'un type d'émulsion en particulier : les émulsions eau-dans-huile (E/H).

Emulsion : définition

Une émulsion est une dispersion colloïdale de deux liquides non miscibles dont l'un est dispersé dans l'autre liquide sous forme de gouttelettes et dont les interfaces sont recouvertes par des tensioactifs. La nature de la phase dispersée (nommée également discontinue ou interne) et celle de la phase continue (appelée aussi externe ou dispersante) permettent de définir deux types d'émulsions : les émulsions de type huile-dans-eau (H/E) où la phase dispersée est lipophile et la phase continue est hydrophile (Figure I.15), et les émulsions de type eau-dans-huile (E/H) (Figure I.15) où la phase dispersée est hydrophile et la phase continue est lipophile (Garti et Aserin, 1996).

Les émulsions sont des systèmes instables d'un point de vue thermodynamique. Elles peuvent être détruites pour donner de l'eau et de l'huile macroscopiquement séparées, sur des échelles de temps très variables allant de quelques minutes à plusieurs années et le rôle du formulateur est de retarder au maximum cette séparation de phases. Les systèmes présentant une stabilité d'ordre cinétique sont des systèmes métastables (Dickinson, 1996).

Généralement, la fraction volumique de la phase continue est plus importante. Lorsque la phase continue est minoritaire en volume (moins de 30 %), on parle d'émulsions concentrées (Brochette, 1999).

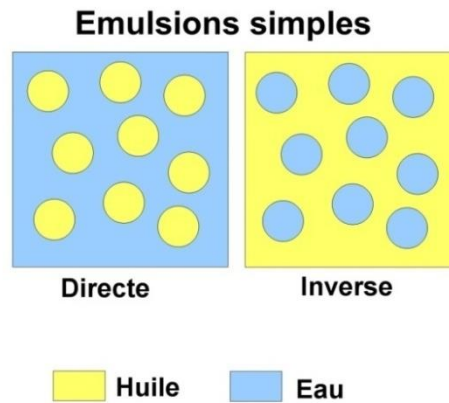


Figure I.15. Différents types d'émulsions simples.

2.1. Généralités sur les interfaces

Les émulsions sont des systèmes colloïdaux finement divisés caractérisés par l'interface développée entre deux milieux non miscibles, l'huile et l'eau. La formation de gouttelettes d'un liquide dans l'autre conduit à un accroissement de l'interface entre les deux phases et s'accompagne d'une augmentation de l'énergie libre totale du système. En effet, il existe une énergie associée au contact de deux phases non miscibles tel que l'huile et l'eau ou encore l'air et l'eau. Les propriétés de l'interface jouent un rôle fondamental dans l'évolution cinétique et les propriétés macroscopiques des émulsions.

2.1.1. Tension interfaciale γ

La coexistence de deux phases non miscibles à l'équilibre n'est possible que si l'interface de séparation est stable. Le traitement thermodynamique des surfaces et des interfaces a été introduit pour la première fois par Gibbs (Gibbs, 1931). L'interface est caractérisée par son énergie libre, F_s , associée à la formation d'une surface de contact A entre les deux phases :

$$F_s = \left(\frac{\delta F}{\delta A} \right) \cdot A = \gamma \cdot A \quad (\text{I.21})$$

La quantité notée γ , appelée tension interfaciale, représente l'énergie qu'il faut fournir au système pour augmenter d'une quantité δA une interface d'aire A . La tension interfaciale γ est indifféremment définie comme une énergie par unité de surface ou comme une force par unité de longueur.

L'interface réelle de séparation entre deux phases homogènes α et β possède une épaisseur non nulle : il s'agit de toute la zone qui est le siège de gradients de concentration. Le modèle d'interface de Gibbs remplace cette interface par une surface théorique d'épaisseur nulle (Figure I.16).

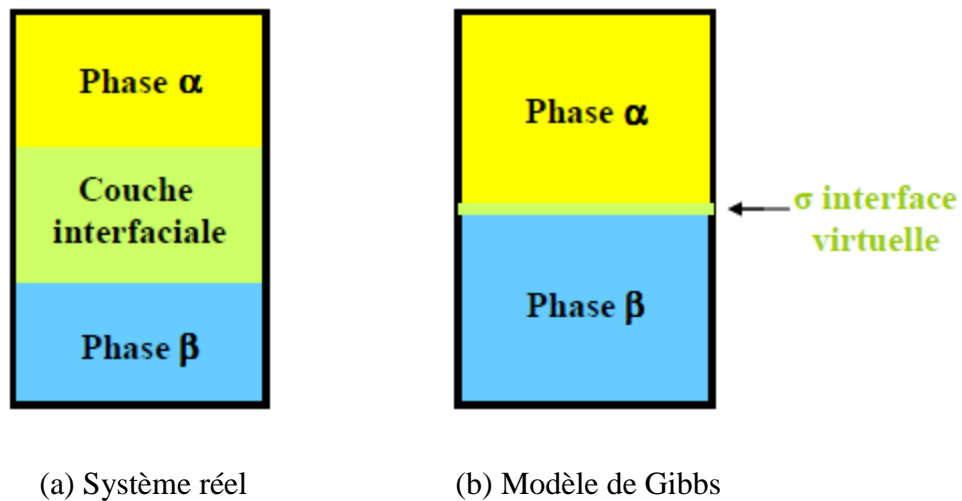


Figure I.16. Représentation schématique des interfaces (Gibbs, 1931).

2.1.2. Tensioactifs

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles qui abaissent la tension interfaciale entre deux milieux non miscibles. Ils présentent au sein d'une même entité deux parties de polarité différente : l'une à caractère hydrophile, l'autre à caractère hydrophobe. En milieu aqueux ou gras, selon leur affinité, les tensioactifs se rassemblent aux interfaces, en créant un film interfacial qui provoque la diminution de la tension interfaciale.

Selon le volume respectif de leur partie polaire et lipophile, les tensioactifs peuvent être solubles dans l'eau ou dans l'huile uniquement ou bien dans les 2 phases. Il existe une concentration seuil, appelée Concentration Micellaire Critique (CMC), correspondant à la limite de solubilité des tensioactifs sous forme de monomère dans la phase où ils sont

solubilisés. Au-delà de cette concentration, les molécules tensioactives s'auto assemblent dans le volume et forment des micelles, ou agrégats supramoléculaires.

Lorsqu'un mélange d'huile, de phase aqueuse et de tensioactif est agité, l'émulsion qui se forme préférentiellement est celle dont la phase continue solubilise le tensioactif, conformément à la règle empirique de Bancroft (Leal Calderon et al., 2007). Ainsi, l'émulsion préférentielle est de type H/E si le tensioactif est hydrosoluble et de type E/H si le tensioactif est liposoluble.

Parmi les tensioactifs lipophiles disponibles sur le marché, qui stabilisent les émulsions inverses (E/H) alimentaires, nous citerons le PGPR, les acides gras, les monoglycérides distillés DMG, les monooléates de sorbitan tels que les Span 20, 40, 60, 80 et 85, et la lécithine.

Tous ces émulsifiants sont couramment utilisés dans l'industrie alimentaire (Cottrell et Van Peij, 2014), cosmétique et pharmaceutique (Wendel, 2000 ; Tadros, 2005). Parmi les émulsifiants lipophiles de grade alimentaire, la lécithine, composée d'un mélange de phospholipides, est d'origine naturelle (Dickinson, 1993). Elle peut être de provenance végétale ou animale. Les monooléates de sorbitan sont des émulsifiants monomériques non ioniques synthétiques. En particulier, le monooléate de sorbitan (Span 80) est obtenu à partir d'une réaction entre le sorbitol et les acides gras. Il est utilisé principalement dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique, ainsi que dans l'industrie alimentaire.

Le Tableau I.2 présente quelques exemples de formulation d'émulsions inverses à visée alimentaire.

Tableau I.2. Exemples de formulation d'émulsions inverses à visée alimentaire.

| Phase huileuse | Emulsifiant liposoluble | Espèce solubilisé dans la phase aqueuse | Référence |
|--|--|---|--------------------------|
| Huile de soja | PGPR | Chlorure de magnésium | Zhu et al. (2016) |
| Huile de colza/huile de colza hydrogénée | Monostéarate de glycérol GMS, Monooléate de glycérol GMO et PGPR | Chlorure de sodium | Nadin et al. (2014) |
| Huile de soja et hexadécane | PGPR, Span 80 et lécithine | - | Ushikubo et Cunha (2014) |
| Huile de tournesol | PGPR/DMG | Saccharose ou mélange de saccharose/CaCl ₂ | Amadei et al. (2014) |

Dans ce qui suit, nous allons nous intéresser particulièrement au PGPR et DMG, utilisés dans notre étude.

2.1.2.1. Le PGPR

Le PGPR est un agent émulsifiant lipophile oligomérique obtenu par estérification partielle des acides gras de l'huile de ricin avec le polyglycérol (Wilson et al., 1998 ; Bastida-Rodríguez, 2013). Il est très utilisé dans la formulation des émulsions eau-dans-huile à base d'huiles végétales (Benichou et al., 2001 ; Márquez et al., 2010 ; Yi et al., 2014 ; Amadei et al., 2014 ; Gülseren et al., 2014). Il est plus efficace pour stabiliser les émulsions, comparé à d'autres tensioactifs lipophiles tels le Span 80 (Taylor, 2011). Il est couramment utilisé seul ou avec la lécithine dans des produits alimentaires tels que le chocolat pour réduire la viscosité et modifier les propriétés d'écoulement du produit (Wilson et Smith, 1998).

Néanmoins, compte-tenu de son origine synthétique, un programme d'évaluation de la sécurité sanitaire du PGPR a été réalisé à la fin des années 50 afin de déterminer si ce tensioactif présentait des risques pour la santé des consommateurs (Bastida-Rodríguez, 2013). Ce programme intégrait des tests de toxicité, des études de reproduction, de métabolisme, des

tests de cancérogénicité chez les rats et les souris et des évaluations cliniques chez l'Homme. Aucune preuve d'interférence du PGPR avec le métabolisme lipidique normal (qui se réfère aux processus impliquant la synthèse et la dégradation des lipides dans les cellules), la croissance des tissus, ou leur reproduction n'a été apportée. Les études chez l'Homme n'ont montré aucun effet indésirable sur son métabolisme (fonctionnement du foie et des reins, et la balance lipidique (l'équilibre entre les ingestions et l'oxydation des lipides)) pour des doses ingérées allant jusqu'à 10 g de PGPR par jour. Ainsi, il a été conclu que l'utilisation de PGPR dans les émulsions ou dans les chocolats ne constitue pas un danger pour la santé humaine. Le PGPR a obtenu le statut « généralement reconnu comme sain » (GRAS : Generally Recognized As Safe) de l'agence américaine des produits alimentaires et médicaux (FDA). Plus récemment, la dose journalière admissible du PGPR a été fixée à 7,5 mg/kg de poids corporel et par jour par le Comité d'experts FAO/OMS sur les additifs alimentaires (JECFA) en 1974 et par le Comité scientifique de l'alimentation (EC/SCF) en 1979. En 1992, le Comité consultatif d'experts sur les aliments en Angleterre (UK-FAC) a estimé que l'apport journalier de PGPR ne devait pas excéder 2,64 mg/kg de poids corporel (Wilson et al., 1998).

2.1.2.2. Les monoglycérides distillés

Les monoglycérides distillés sont dérivés de l'hydrolyse partielle de matières grasses d'origine végétale ou animale. Les monoglycérides sont présents naturellement en très faibles pourcentages dans les huiles végétales, mais ceux qui sont utilisés comme émulsifiants alimentaires sont produits artificiellement (Dickinson, 1993). La production industrielle de monoglycérides a commencé au milieu des années 1930 (Krog, 1992). Ces tensioactifs, sont largement utilisés dans la fabrication de la margarine, des viennoiseries et des produits boulangers. Par ailleurs, un certain nombre d'études reportent leur utilisation en association avec le PGPR pour la stabilisation des émulsions inverses (Benichou et al., 2001 ; Amadei, et al., 2014). Les DMG étant nettement moins performants que le PGPR pour la stabilisation des émulsions. La quantité maximale des monoglycérides dans les aliments n'est pas limitée par la réglementation sauf pour les préparations pour nourrissons et les compléments alimentaires pour nourrissons et enfants en bas âge où ils ne doivent pas dépasser 4000 mg/kg et 5000 mg/kg, respectivement.

2.2. Instabilité des émulsions

Les principaux mécanismes qui peuvent contribuer à l'instabilité d'une émulsion sont les suivants : sédimentation et crémage ; floculation ; coalescence et mûrissement d'Ostwald.

2.2.1. Sédimentation et crémage

Le phénomène de sédimentation ou crémage est dû au déplacement des gouttelettes d'une émulsion en raison de la différence de masse volumique entre les gouttelettes et la phase continue, et conduit à la formation d'une couche concentrée au-dessus (crémage, cas des systèmes H/E) ou au-dessous (sédimentation, cas des systèmes E/H) de l'émulsion.

Ce phénomène conduit dans un premier temps à l'établissement d'un gradient vertical de concentration de gouttelettes, mais, par la suite, une limite distincte peut apparaître entre une couche de gouttelettes concentrée et une couche appauvrie en gouttelettes. En général, le crémage/sédimentation sont réversibles dans la mesure où la répartition initiale des gouttelettes dans la phase dispersante peut être restaurée par une agitation douce (Brochette, 1999).

La vitesse de déplacement d'une gouttelette isolée en milieu newtonien est donné par la loi de Stokes :

$$V = \frac{D^2(\rho_c - \rho_d)g}{18\eta_c} \quad (\text{I.22})$$

V étant la vitesse de crémage/sédimentation (ms^{-1}), D le diamètre de la gouttelette (m), $(\rho_c - \rho_d)$ la différence de masse volumique entre les deux phases (kg.m^{-3}), η_c la viscosité newtonienne de la phase continue (Pa.s) et g l'accélération de la pesanteur (m.s^{-2}).

La loi de Stokes montre qu'il existe trois façons d'inhiber le crémage dans une émulsion diluée : réduire la taille moyenne des gouttelettes, diminuer la différence de masse volumique entre les phases ou augmenter la viscosité de la phase continue (Jeantet et al., 2006).

2.2.2. Flocculation

Le phénomène de flocculation consiste en une agrégation des gouttelettes due à des interactions attractives, les gouttelettes restant toutefois individualisées (Figure I.20). Les gouttelettes restent très proches les unes des autres sur une période prolongée, sans qu'il y ait pour autant rupture du film interfacial qui les sépare (Jeantet et al., 2006).

La flocculation peut être due aux forces de Van der Waals, d'origine dipolaire. Cette attraction est à courte portée et se manifeste lorsque l'épaisseur du film liquide qui sépare les gouttelettes est inférieure à environ 10 nm. L'attraction devient infiniment attractive si les surfaces sont au contact. L'une des fonctions de l'agent tensioactif est de générer une répulsion entre les surfaces à longue portée capable d'empêcher le contact des surfaces et donc l'agrégation irréversible des gouttes.

La flocculation peut avoir aussi comme origine les forces de déplétion, notamment lorsque la phase continue contient des macromolécules amphiphiles ou des micelles de tensioactif en excès. Les micelles/macromolécules sont à la fois plus petites et plus nombreuses que les gouttes d'émulsion. Ces espèces se comportent ainsi comme un gaz dont la pression (pression osmotique) s'exerce sur la surface des gouttes. Lorsque 2 gouttes sont suffisamment proches, les micelles/macromolécules ne peuvent plus s'intercaler dans le film liquide qui les sépare, et il se crée une zone de pression non compensée à l'origine d'une interaction attractive dite de déplétion ou de volume exclu. Cette attraction est d'autant plus forte que les micelles/macromolécules sont nombreuses.

Lorsque les gouttes de l'émulsion sont stabilisées et couvertes par des chaînes polymériques, la flocculation peut se produire par ajout d'un solvant dans la phase continue, ce qui modifie les interactions entre les chaînes. Dans ce cas, les interactions chaînes-chaînes sont plus favorables que les interactions chaîne-solvant, ce qui donne lieu à une interaction attractive entre couches adsorbées.

2.2.3. Coalescence

La coalescence est la fusion de deux ou plusieurs gouttelettes d'émulsion pour former une seule gouttelette de plus grande taille. Il s'agit donc d'un phénomène de dégradation

ultime des émulsions. Cette forme de déstabilisation est plus sévère que le crémage et la floculation, qui sont toutes deux réversibles (Brochette, 1999).

Généralement, la coalescence se produit quand les gouttelettes sont au contact pendant un laps de temps prolongé au sein d'une couche de crème ou sédiment ou dans tout autre état d'agrégation (Figure I.17). La rupture du film interstitiel a lieu lorsque son épaisseur devient inférieure à une épaisseur critique. La coalescence débute par la formation d'un canal entre les gouttes sous l'effet des fluctuations ou ondulations de la surface induites par l'agitation thermique. Le canal s'agrandit et un processus de relaxation de forme se produit jusqu'à atteindre la surface minimale correspondant à la sphère unique. La formation du canal est l'étape cinétiquement déterminante de ce processus. Elle est thermiquement activée (le phénomène s'accélère avec la température), ce qui traduit l'existence d'une énergie d'activation (barrière d'énergie à franchir).

La déformation ou les fluctuations qui conduisent à la rupture du film est ralentie par des phénomènes de viscoélasticité de surface pour lesquels les propriétés physicochimiques de l'émulsifiant et sa concentration jouent un rôle capital. Cette rupture du film est favorisée par un diamètre important des gouttes (entraînant une surface de contact importante), une faible répulsion entre les gouttelettes et une faible tension interfaciale (Jeantet et al., 2006).

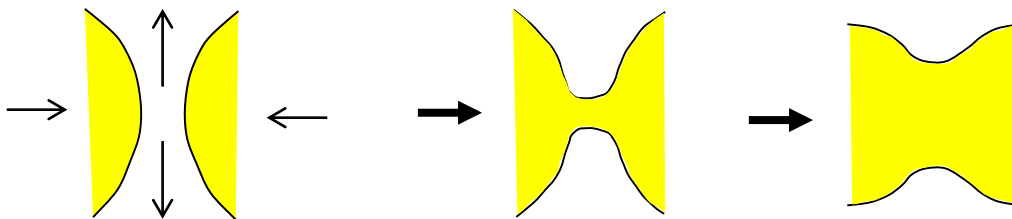


Figure I.17. Schéma du processus de coalescence.

2.2.4. Mûrissement d'Ostwald

Le mûrissement d'Ostwald est une instabilité qui résulte de la tension interfaciale γ entre les deux milieux non miscibles. La différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur d'une goutte sphérique de rayon R , appelée pression de Laplace, P_L , est égale à :

$$P_L = \frac{2\gamma}{R} \quad (\text{I.23})$$

La pression étant supérieure dans les gouttes de faible rayon, la matière diffuse spontanément des plus petites gouttes vers les plus grosses (Figure I.18). Le mûrissement d'Ostwald se traduit donc par la diminution du diamètre des petites gouttes jusqu'à leur disparition complète et par l'augmentation du diamètre des plus grosses. Au cours du temps t , le diamètre moyen des gouttes évolue selon une loi de croissance du type $R \propto t^{1/3}$. De ce fait, le processus s'auto ralentit. En pratique, le mûrissement d'Ostwald devient très lent dès que le diamètre moyen des gouttes dépasse $1 \mu\text{m}$. Lors de ce processus, la distribution de taille des gouttes devient étroite (Kabalnov et al., 1987 et 1990).

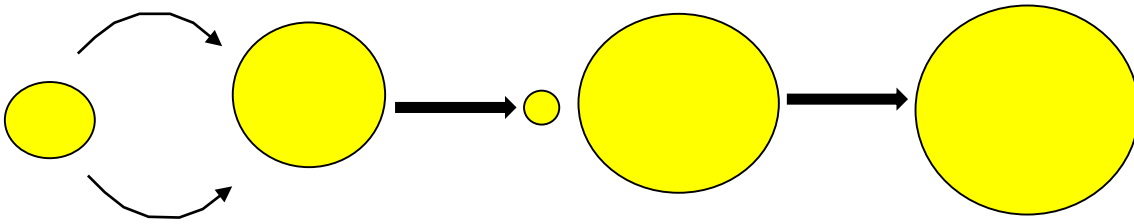


Figure I.18. Mûrissement d'Ostwald.

Il est possible de limiter, voire de stopper complètement, le mûrissement d'Ostwald en ajoutant dans la phase dispersée une espèce totalement insoluble dans la phase continue. Par exemple, dissoudre un sel ou un sucre dans la phase aqueuse d'une émulsion de type E/H permet d'atteindre cet objectif. La diffusion de l'espèce la plus soluble (eau) en raison du différentiel de pression de Laplace entraîne une augmentation de la pression osmotique dans les gouttes de faible diamètre et au contraire une diminution dans les gouttes de plus grande taille. Le différentiel de pression osmotique induit par cette migration provoque un contre-flux (l'eau diffuse des gouttes les plus grosses vers les plus petites) qui compense le mûrissement d'Ostwald (Davis et al., 1981; Kabalnov et al., 1987 ; Aronson et Petko, 1993). Le principe est schématisé sur la Figure 1.19. Pour inhiber totalement le mûrissement d'Ostwald dès la fabrication, il suffit que la pression osmotique dans la phase aqueuse soit du même ordre de grandeur que la pression de Laplace moyenne des gouttes.

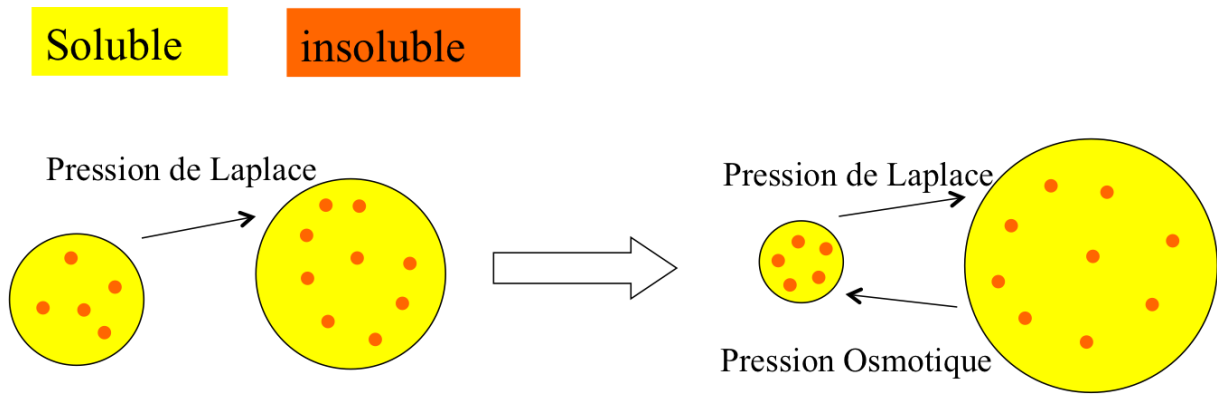


Figure I.19. Inhibition du Mûrissement d'Ostwald par solubilisation dans les gouttes d'une espèce de solubilité nulle dans la phase continue.

Il a été observé que la présence du soluté dans la phase aqueuse des émulsions E/H a un effet stabilisant vis à vis non seulement du mûrissement d'Ostwald mais aussi de la coalescence. En effet, l'augmentation de la pression osmotique dans le volume des gouttes a tendance à désolvater les têtes polaires des molécules de tensioactif à l'interface huile/eau. Ce phénomène dit de « salting out » entraîne une réduction de la surface par tête-polaire permettant l'obtention d'une monocouche à la fois plus dense et plus rigide susceptible de ralentir la coalescence (Aronson et Petko, 1993).

Le schéma I.20 ci-dessous résume les différentes instabilités pouvant se produire au sein d'une émulsion.

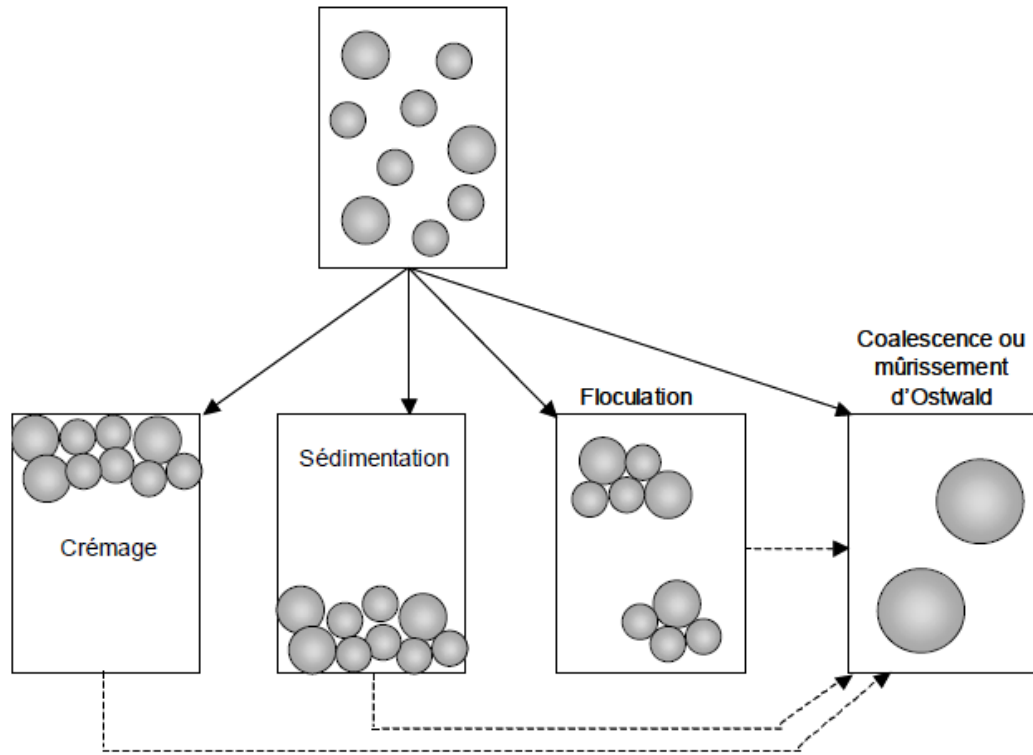


Figure I.20. Principaux mécanismes de déstabilisation physique des émulsions (McClements et Weiss, 2005).

3. Oxydation des lipides dans les émulsions eau-dans-huile

Bien que l'oxydation des lipides dans les émulsions mette en jeu les mêmes réactions que celles qui se produisent en phase continue, les cinétiques d'oxydation sont différentes, à cause des propriétés de l'interface des gouttelettes de l'émulsion et du partage des pro-oxydants, antioxydants et substrats oxydables entre la phase huile, la phase eau et l'interface de l'émulsion (McClements et Decker, 2000). Il existe dans la littérature de très nombreuses études et revues traitant de l'oxydation des lipides en émulsions directes (McClements et Decker, 2000 ; Frankel, 2005g ; Waraho et al., 2011a et b ; Berton et al., 2012). Or, dans de nombreux aliments (margarine, beurre, ...), la fraction lipidique est sous forme de phase continue contenant des gouttelettes aqueuses dispersées. Il est donc important de connaître et de maîtriser l'oxydation des lipides en émulsions inverses. La partie qui suit montre que l'oxydation des lipides au sein des émulsions inverses eau-dans-huile a été très peu étudiée, puisque nous n'avons répertorié que 13 articles traitant de ce sujet (recherche Scopus avec les mots clés « water in oil emulsion oxidation »). Le tableau I.3 présente les différents travaux qui seront discutés dans ce paragraphe.

Tableau I.3. Présentation des principales études qui s'intéressent à l'oxydation des lipides dans les émulsions inverses.

| Nature de l'huile | Emulsifiants | | Phase aqueuse | | Mesure de l'oxydation | Effet de l'émulsification | Référence | |
|---------------------------------------|------------------------------|---|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|--|--|-------------------------|
| | Nature | Composition | Composition | Diamètre des gouttes | | | | Fraction volumique |
| Huile d'olive | - | - | Eau distillée | Non précisé | 3% | Indice de peroxyde ; Teneur en polyphénols | Oxydation retardée | Ambrosone et al., 2002 |
| Huile d'olive | - | - | Eau distillée | $0,71 < D_{32} < 8,2 \mu\text{m}$ | 1,5% | Indice de peroxyde | Oxydation retardée | Ambrosone et al., 2006a |
| Huile d'olive | - | - | Eau distillée | Non précisé | 1,5% ; 3% ou 5% | Indice de peroxyde | Oxydation retardée jusqu'à une fraction volumique d'eau de 2% | Ambrosone et al., 2006b |
| Huile d'olive | Span 20 ; Span 80 ou Span 85 | 1% ou 5% | Eau distillée | $1 < D < 2 \mu\text{m}$ | 3% | Indice de peroxyde | Oxydation retardée | Ambrosone et al., 2007 |
| Huile d'olive | - | - | Solution AA 0 ppm < CAA < 8000 ppm | $1 < D_{10} < 4 \mu\text{m}$ | 3% | Indice de peroxyde | L'AA diminue l'oxydation des émulsions en fonction de sa concentration. L'activité antioxydante de l'AA pour $A_D \geq 0,9 \mu\text{m}^{-1}$ | Mosca et al., 2008a |
| Trioléate de glycérol +/- AP (80 ppm) | NaO/OA | 0,5% de NaO/OA (20/80 mol/mol %) +/- Span 85 (1% _m) | Solution AA 0 ppm < CAA < 5000 ppm | $2,4 < D_{10} < 4,9 \mu\text{m}$ | 3% | Indice de peroxyde | le palmitate d'ascorbyle, le span 85 et l'encapsulation de l'AA diminuent l'oxydation dans l'émulsion | Mosca et al., 2008b |

Tableau I.3. Présentation des principales études qui s'intéressent à l'oxydation des lipides dans les émulsions inverses (suite).

| Nature de l'huile | Emulsifiants | | Phase aqueuse | | Fraction volumique | Mesure de l'oxydation | Effet de l'émulsification | Référence |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------------|---|----------------------|--------------------|-----------------------|--|---------------------------|
| | Nature | Composition | Composition | Diamètre des gouttes | | | | |
| Formulation commerciale | | | Eau distillée et désionisée (3816 g) ; Acide citrique (2,5 g) ; Sel (170 g) ; Babeurre en poudre (10 g) ; Alginate de sodium (25 g) ; CasNa (50g) | | 40% | | L'émulsion témoin s'oxyde plus que l'émulsion commerciale ; Les émulsions enrichies en métaux s'oxydent plus que l'émulsion témoin ; Les métaux oxydent les émulsions selon la cinétique suivante : $Fe^{3+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$ | Stathopoulos et al., 2009 |
| Formulation témoin | Mélange d'huiles végétales 5860 g | DMG 60g | Eau distillée et désionisée (5975 g) ; k-carraghénane (25 g) | Non précisé | 50% | Indice de peroxyde | | |
| Formulation enrichie en métaux | | | Eau distillée et désionisée (5975 g) ; k-carraghénane (25 g) ; Un des métaux suivants : $FeCl_3$ (0,3 ; 1,5 ; 3 ; 7,5 ou 15 mM) ; $ZnCl_2$ (0,3 ; 1,5 ; 3 ; 7,5 ou 15 mM) ; $CuCl_2(H_2O)_2$ (0,08 ; 0,4 ; 0,8 ; 4 ; 10 ou 20 mM) | | 50% | | | |

Tableau I.3. Présentation des principales études qui s'intéressent à l'oxydation des lipides dans les émulsions inverses (suite).

| Nature de l'huile | Emulsifiants | | Phase aqueuse | | Mesure de l'oxydation | Effet de l'émulsification | Référence | |
|--|---------------------------|---------------------|---|--|-----------------------|---|--|---------------------|
| | Nature | Composition | Composition | Diamètre des gouttes | | | | Fraction volumique |
| Huile d'olive + (AMVN : 0,2 ; 0,4 ou 0,8% _m) | Mélange Span 80/Tween 80 | 0,7 % | Eau distillée ou Solution d'acide ascorbique (1000 et 2100 ppm) | 1,2 <D ₂₀ <2mm varie selon la teneur en AMVN en émulsion | 0,7 % | Teneur en hydroperoxydes (spectroscopie de fluorescence) | Oxydation favorisée en absence d'acide ascorbique et retardée en présence de l'acide ascorbique | Mosca et al., 2010 |
| Huile de tournesol | Mono glycérides distillés | 1% | Tampon acétate (0,1 M) ; +/- BSA (0,2%) ; +/- CA (5 mmol/kg d'émulsion) | Non précisé | 20% | Indices de peroxyde et de p-anisidine ; teneurs en hexanal et en composés volatils totaux | La présence de BSA dans l'émulsion possède un effet antioxydant, cet effet augmente en présence de CA | Conde et al., 2011 |
| Huile d'olive + (AMVN : 0,05 ; 0,1 ou 0,2% m) | Mélange Span 80/Tween 80 | 0,8%/0,7 % | PE ; GTE ; OMW ou CA | Non précisé | 0,7% | Teneur en hydroperoxydes (spectroscopie de fluorescence) | L'oxydation suit l'ordre suivant : Emulsion PE> Emulsion OMW> Emulsion GTE> Emulsion CA >Emulsion témoin | Mosca et al., 2013a |
| Huile de noix | PGPR | 0,5 g/100 g d'huile | Tampon phosphate + DTAB ; SDS ; Tween 20 ou WPI de concentrations respectives : 0,1-0,2% _m ; 0,1-0,2% _m ; 0,1% _m et 0,05-0,2% _m de l'émulsion | 0,2 <D< 0,4 μm | 2% | Indice de peroxyde ; Teneur en hexanal (GC-SPME) | Oxydation favorisée | Yi et al., 2014 |

D : diamètre moyen des gouttelettes ; D_{10} : diamètre moyen en longueur ; D_{20} : diamètre moyen surfacique de l'ensemble des gouttes ; D_{32} : diamètre de Sauter ; A_D : surface spécifique de la phase dispersée (μm^{-1}) ; AA : acide ascorbique ; AP : palmitate d'ascorbyle ; NaO : oléate de sodium ; OA : acide oléique ; CA : acide caféique ; PE : extraits phénoliques aqueux de l'huile d'olive extra vierge ; GTE : extraits phénoliques aqueux de feuilles de thé vert ; OMW : extraits phénoliques aqueux de déchets de mouture d'olive ; BSA : albumine de sérum bovin ; WPI : Isolat de protéines sériques ; CasNa : caséinate de sodium ; SDS : dodécyl sulfate de sodium ; DTAB : dodécyl bromure de triméthyl ammonium ; Tween 20 : polysorbate 20 ; Tween 80 : polysorbate 80 ; Span 20 : monolaurate de sorbitane ; Span 80 : monooléate de sorbitane ; Span 85 : trioléate de sorbitane ; DMG : monoglycérides distillés ; PGPR : polyricinoléate de polyglycérol ; AMVN : 2,2'-Azobis (2,4-diMéthylValéroNitrile).

3.1. Rôle de la nature de la phase lipidique

Bien que la nature de la phase lipidique constitue un paramètre primordial dans l'étude de l'oxydation des émulsions inverses, les travaux réalisés se sont limités à quelques huiles et se sont peu intéressés à la comparaison de différentes huiles en émulsion inverse. Les études intéressées à l'oxydation des émulsions inverses se sont focalisées principalement sur l'huile d'olive (Ambrosone et al. (2002 ; 2006a ; 2006b ; 2007) ; Mosca et al. (2008a ; 2010 ; 2013a)). Il y a aussi le trioléate de glycérol (Mosca et al., 2008b), l'huile de tournesol (Conde et al., 2011) et l'huile de noix (Yi et al., 2014). Certains travaux ont étudié l'effet de la solubilisation d'un antioxydant liposoluble (Mosca et al., 2008b) ou d'un radical pro-oxydant liposoluble 2,2'-Azobis(2,4-diMéthylValeroNitrile) (AMVN) (Mosca et al., 2010 et 2013a) dans la phase lipidique des émulsions inverses. Mosca et al. (2008b) ont montré que pour une émulsion inverse de trioléate de glycérol stabilisée par un mélange d'oléate de sodium et d'acide oléique et contenant 3% de solution aqueuse d'acide ascorbique (5000 ppm), la présence du palmitate d'ascorbyle, dérivé lipophile de l'acide ascorbique, de concentration égale à 80 ppm, diminue l'oxydation mesurée par l'indice de peroxyde. Selon cette étude, le palmitate d'ascorbyle réagit avec les radicaux libres dès leur formation dans la phase huileuse et se montre plus efficace que l'acide ascorbique de la phase aqueuse qui a besoin de plus de temps pour intervenir étant donné qu'il est encapsulé dans les gouttelettes d'eau. D'autre part, Mosca et al. (2010 et 2013a) ont montré que l'oxydation des émulsions inverses eau-dans-huile d'olive stabilisées par un mélange Span 80/Tween 80, augmente proportionnellement à la concentration du radical pro-oxydant lipophile AMVN dans la phase huileuse pour des quantités de 0,2 ; 0,4 et 0,8%_m (Mosca et al., 2010) et de 0,05 ; 0,1 et 0,2%_m (Mosca et al., 2013a). L'oxydation a été suivie par la mesure de la teneur en hydroperoxydes par spectroscopie de fluorescence. Ceci montre que l'oxydation des émulsions inverses pourrait être contrôlée en premier lieu par le contrôle de la composition de sa phase lipidique.

3.2. Rôle de la composition de la phase aqueuse

La plupart des émulsions alimentaires possèdent une phase aqueuse relativement complexe contenant un grand nombre d'ingrédients comme des sels, des oses, des polysaccharides, des protéines, etc. qui peuvent avoir un effet pro- ou antioxydant. En plus de sa composition, le rôle de la phase aqueuse sur l'oxydation d'une émulsion peut être lié à

différents paramètres chimiques tels que le pH et la force ionique ou physiques comme la taille des gouttes ou la fraction volumique de la phase aqueuse. Ces derniers déterminent l'aire interfaciale de l'émulsion, ils seront traités dans le paragraphe traitant de l'interface.

Théoriquement, Fritsch (1994) a suggéré que les émulsions eau-dans-huile s'oxydent à la même vitesse que les huiles continues, étant donné que la surface de l'huile est exposée directement à l'oxygène atmosphérique. Par contre, McClements et Decker (2000) supposent que les pro-oxydants ou antioxydants, situés dans les gouttelettes d'eau ou à l'interface eau/huile, peuvent influencer l'oxydation des émulsions inverses. Les études de l'oxydation des émulsions inverses se sont surtout intéressées à la dispersion de l'eau distillée et au rôle de l'encapsulation des antioxydants et des pro-oxydants.

Ambrosone et al. (2002 ; 2006a ; 2006b ; 2007) ont montré que l'eau distillée diminue l'oxydation des émulsions inverses même à un faible pourcentage. Par contre, le suivi de l'évolution des hydroperoxydes par spectroscopie de fluorescence (Mosca et al., 2010) a montré que la dispersion de 0,7% d'eau distillée dans l'huile d'olive favorise l'oxydation en présence du radical pro-oxydant lipophile AMVN à des concentrations différentes (0,2 ; 0,4 et 0,8%_m).

Concernant l'encapsulation des antioxydants, Mosca et al., (2008a et b) ont montré que l'encapsulation de l'acide ascorbique dans la phase aqueuse d'une émulsion inverse diminue l'oxydation par rapport à une émulsion sans acide ascorbique, pour des émulsions eau-dans-huile d'olive (Mosca et al., 2008a) et eau-dans-trioléate de glycérol stabilisée par un mélange oléate de sodium/acide oléique (Mosca et al., 2008b). L'oxydation est mesurée par l'indice de peroxyde. Cette stabilité oxydative augmente avec la concentration de la vitamine C pour des concentrations entre 50 et 8000 ppm (Mosca et al., 2008a) et entre 900 et 5000 ppm (Mosca et al., 2008b). Plus récemment, la même équipe a élargi le spectre des antioxydants étudiés (extraits phénoliques aqueux de l'huile d'olive extra vierge PE, feuilles de thé vert GTE, déchets de mouture d'olive OMW et acide caféique CA) sur l'oxydation des émulsions eau-dans-huile d'olive stabilisées par un mélange Span 80/Tween 80. Le suivi de l'évolution des hydroperoxydes par spectroscopie de fluorescence a montré que tous les extraits antioxydants retardent l'oxydation en présence du radical pro-oxydant AMVN et que leur efficacité dépend de leur degré d'amphiphilicité, d'où l'ordre suivant PE > OMW > GTE > CA. L'extrait aqueux de polyphénols venant de l'huile d'olive PE est le plus intéressant grâce à son activité interfaciale lui permettant d'exercer un double rôle : stabilisation chimique des lipides par son

activité antioxydante et stabilisation physique de l'émulsion contre la séparation de phases (Mosca et al., 2013a).

Aussi, Conde et al. (2011) ont étudié l'effet de la dispersion de l'acide caféique CA, connu pour son activité antioxydante, dans la phase aqueuse d'une émulsion eau-dans-huile de tournesol stabilisée par 1% de monoglycérides distillés, avec ou sans l'ajout de l'albumine de sérum bovin BSA (0,2%). La mesure des indices de peroxyde, de p-anisidine et de la teneur en hexanal et en composés volatils totaux a montré que l'encapsulation de l'acide caféique améliore la stabilité oxydative des émulsions.

L'encapsulation des molécules pro-oxydantes a été étudiée par Stathopoulos et al. (2009) qui ont examiné l'effet de la présence du zinc, cuivre, et fer sur l'oxydation des produits tartinables à faible teneur en graisse à base d'un mélange d'huiles végétales. La mesure de l'indice de peroxyde a montré que l'encapsulation de ces métaux en présence du k-carraghénane (25 g) augmente l'oxydation par rapport au témoin. Les émulsions s'oxydent dans l'ordre suivant : $Fe^{3+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$, pour des concentrations des ions dans le produit final entre 0,3 et 15 mM pour le fer, entre 0,08 et 20 mM pour le cuivre et entre 0,3 et 7,5 mM pour le zinc. L'émulsion commerciale (Eau distillée et désionisée (3816 g) ; Acide citrique (2,5 g) ; Sel (170 g) ; Babeurre en poudre (10 g) ; Alginate de sodium (25 g) ; Caséinate de sodium (50g)) était plus stable que le témoin (Eau distillée et désionisée (5975 g) ; k-carraghénane (25 g)) vis-à-vis de l'oxydation.

Une autre étude a mis en évidence le rôle de la charge des tensioactifs hydrophiles solubilisés dans les phases aqueuses des émulsions eau-dans-huile de noix (Yi et al., 2014). L'oxydation est mesurée par l'indice de peroxyde et par mesure de la teneur en hexanal. Dans cette étude, la stabilisation des gouttelettes est assurée principalement par le PGPR, ce qui permet aux tensioactifs hydrophiles d'être dans la phase aqueuse. L'ajout de dodécyl sulfate de sodium (SDS) anionique dans la phase aqueuse réduit l'oxydation, suggérant que le SDS est capable de former des micelles de charge négative qui attirent les métaux de transition qui pourraient être présents dans la phase aqueuse, diminuant leur concentration à l'interface eau-huile. La présence de monolaurate de sorbitan polyoxyéthylène (Tween 20), n'a pas d'influence sur l'oxydation, sa structure non ionique ne lui permet pas d'attirer ou de repousser les métaux de transition de la phase aqueuse. L'isolat de protéines sériques WPI diminue l'oxydation, ce qui s'explique par son activité antioxydante dans la phase aqueuse en chélatant les métaux de transition et à l'interface eau-huile en piégeant les radicaux libres par les acides

aminés aromatiques et à groupement sulfhydryle. Le bromure de dodécyl triméthyl ammonium DTAB (non alimentaire), cationique, augmente l'oxydation des lipides probablement en repoussant les métaux de transition tels que le fer de la phase aqueuse vers l'interface eau-huile. Outre l'effet de chaque émulsifiant hydrophile de manière individuelle, on note aussi des effets de combinaison. Ainsi, la présence simultanée de protéines sériques et de DTAB dans la phase aqueuse élimine l'effet pro-oxydant de DTAB. De même, la combinaison de protéines sériques et de SDS améliore l'activité antioxydante de ce dernier (Yi et al., 2014).

Dans la même étude, le rôle du pH de la phase aqueuse de l'émulsion inverse a été mis en évidence montrant que l'augmentation du pH de 3 à 7 favorise l'oxydation. Ceci est expliqué par la faible solubilité du fer dans l'eau à pH 7 entraînant sa précipitation à l'interface eau-huile. De plus, à pH 7, les acides gras libres naturellement présents dans l'huile sont chargés négativement ce qui leur permettrait d'interagir avec les métaux de transition à l'interface. En revanche, à pH 3, la solubilité du fer dans l'eau est beaucoup plus élevée. De plus, à ce pH 3, les acides gras sont protonés, ils interagissent moins avec le fer et donc l'émulsion s'oxyde moins. Il est intéressant de noter qu'en présence d'un isolat de protéines sériques WPI dans la phase aqueuse, l'augmentation du pH entraîne la diminution de l'oxydation. En effet, quand le pH de la phase aqueuse est supérieur au pH isoélectrique du WPI (5,1), les protéines sont chargées négativement ce qui augmente leur pouvoir chélatant vis-à-vis des métaux de transition.

3.3. Rôle de la zone interfaciale eau-huile sur l'oxydation lipidique

L'interface est un endroit clé pour le contrôle des réactions d'oxydation lipidique. En effet, l'interface constitue le lieu de rencontre entre les acides gras des triglycérides, les produits d'oxydation pouvant être amphiphiles, les piègeurs de radicaux libres et les espèces pro-oxydantes, comme les ions métalliques, solubilisées dans la phase aqueuse (Yi et al., 2014). La nature de l'interface influence la localisation et la réactivité de ces différentes espèces moléculaires. Ainsi, en raison de la relative polarité des hydroperoxydes, ces molécules présentes dans l'huile s'alignent sur la zone interfaciale de l'émulsion inverse eau-dans-huile d'olive (Ambrosone et al., 2006a), dirigeant le radical peroxyde vers la phase aqueuse (Mosca et al., 2008b). L'orientation des hydroperoxydes sur la région interfaciale influence l'accessibilité de ces molécules durant l'oxydation. De plus, leur positionnement à

l'interface eau-huile peut provoquer le déplacement d'une partie des tensioactifs initialement présents pour stabiliser les gouttelettes. Cette compétitivité entre les différents composés tensioactifs peut influencer la composition de la couche interfaciale et par conséquent la cinétique de l'oxydation (Ambrosone et al., 2007). Un autre exemple montrant l'importance de la zone interfaciale concerne l'oxydation des émulsions inverses eau-dans-huile d'olive stabilisées par un mélange Span 80/Tween 80 (Mosca et al., 2013a). Cette étude montre que la réaction entre les antioxydants de la phase aqueuse et les radicaux lipidiques se produit à l'interface eau-huile. En effet, l'activité antioxydante est liée aux propriétés amphiphiles des antioxydants hydrosolubles utilisés (extraits phénoliques aqueux de l'huile d'olive extra vierge PE, de feuilles de thé vert GTE, et de déchets de mouture d'olive OMW). Enfin, l'interface eau-huile d'une émulsion inverse eau-dans-huile d'olive contenant un radical lipophile pro-oxydant (AMVN), stabilisée par le Tween 80 et le Span 80, semble agir comme une zone d'accumulation des radicaux libres de la phase continue ce qui accélère la cinétique d'oxydation par rapport aux huiles continues (Mosca et al., 2010).

Si l'interface permet de faciliter ou de freiner les échanges de molécules (antioxydants, métaux pro-oxydants, radicaux lipidiques, ...) entre les deux phases, on comprend aisément que ces propriétés sont déterminées par les tensioactifs qui la composent en termes qualitatifs (taille, charge, HLB) et quantitatifs (concentration). Par exemple, Ambrosone et al. (2007) ont montré une corrélation, pour des esters de sorbitane et d'acides gras (Span), entre la HLB de l'émulsifiant et son pouvoir antioxydant. En effet, pour des émulsions eau-dans-huile d'olive, plus le Span est hydrophobe (HLB plus élevée), plus son effet antioxydant est élevé. Mosca et al. (2008b) ont montré que l'activité antioxydante de l'acide ascorbique encapsulé dans une émulsion eau-dans trioléate de glycérol stabilisée par 0,5% d'un mélange acide oléique/oléate de sodium peut être améliorée en ajoutant 1% de Span 85.

Outre l'effet de chaque émulsifiant de manière individuelle, on note aussi des effets synergiques entre émulsifiants (Conde et al., 2011). En effet, l'ajout de 0,2% de l'albumine de sérum bovin BSA à une émulsion eau-dans-huile de tournesol stabilisée par 1% de monoglycérides distillés diminue l'oxydation primaire mesurée par l'indice de peroxyde. Même en absence de l'acide caféique, la BSA dissout dans la phase aqueuse se localise à l'interface eau-huile et diminue l'oxydation. En présence de l'acide caféique (5 mmol/kg d'émulsion), la BSA forme un complexe avec cette molécule en l'attirant à l'interface eau-huile ce qui permet d'améliorer son activité antioxydante. La mesure de l'indice de p-anisidine et des teneurs en hexanal et en composés volatils totaux montre que la BSA permet de même

de diminuer l'oxydation secondaire en absence de l'acide caféique, mais son action semble être freinée en présence de l'acide caféique car dans ce cas la BSA n'a pas montré d'action sur l'évolution des aldéhydes mesurée par l'indice de p-anisidine. Toujours en présence de l'acide caféique, l'action antioxydante de BSA ne commence qu'à partir du 36^{ème} jour de stockage pour la teneur en hexanal et du 21^{ème} jour pour la teneur en composés volatils.

Quelques études traitent de l'influence de l'aire interfaciale sur l'intensité ou la vitesse d'oxydation des lipides en émulsion inverse. Elles convergent toutes vers le même constat : plus la surface développée par les gouttelettes est importante, plus l'oxydation des lipides est favorisée (en conditions pro-oxydantes) ou diminuée (en conditions antioxydantes). Ceci est relié à une interaction accrue entre les substrats lipidiques et les autres molécules impliquées dans les mécanismes réactionnels. Cela a été montré pour des émulsions inverses eau-dans-huile d'olive contenant un radical lipophile pro-oxydant AMVN, stabilisée par le Tween 80 et le Span 80 (Mosca et al., 2010). Dans cette étude, la vitesse initiale V_0 de l'oxydation augmente avec la diminution du diamètre moyen surfacique D_{20} (défini par l'équation I.25) de 1 mmol.g⁻¹.s⁻¹ pour 1,8 mm à 9 mmol.g⁻¹.s⁻¹ pour 1,4 mm, ce qui correspond à une augmentation de l'aire interfaciale de 72 %. D'autre part, le diamètre des gouttelettes diminue en augmentant la concentration du radical pro-oxydant AMVN dans l'huile avant la dispersion de l'eau. En effet, les radicaux peroxyde générés par le radical pro-oxydant AMVN, de plus de leur caractère plus amphiphile que les molécules lipidiques initiales qui les génèrent, possèdent un moment dipolaire plus élevé que celui des radicaux peroxyde qui pourraient se produire en présence d'un indicateur hydrophile et donc ces radicaux possèdent une activité interfaciale qui influence la taille des gouttes.

Mosca et al. (2010) ont défini le diamètre moyen surfacique D_{20} de l'ensemble des gouttes comme suit :

$$D_{20} = \frac{A_s}{\pi N} \quad (\text{I.25})$$

Avec N le nombre total des gouttelettes dispersées, A_s la surface totale de contact eau-huile.

Néanmoins, certaines études font état d'une surface seuil (Ambrosone et al., 2006a ; Mosca et al., 2008a). Mosca et al. (2008a) ont montré que l'activité antioxydante de l'acide ascorbique encapsulé dans une émulsion eau-dans-huile d'olive ne prend place qu'à partir

d'une quantité interfaciale seuil de la phase dispersée. Vu la polydispersité de l'émulsion étudiée, le paramètre A_D , indiquant la surface spécifique de la phase dispersée a été introduit (I.26).

$$A_D = \frac{6}{D_{32}} \quad (\text{I.26})$$

Avec D_{32} diamètre de Sauter (volume/surface).

A partir d'une valeur A_D égale à $0,9 \mu\text{m}^{-1}$, la vitesse initiale de la formation des hydroperoxydes proche de $7 \text{ meq.Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$, commence à diminuer pour atteindre à peu près $3,75 \text{ meq.Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour A_D proche de $2,25 \mu\text{m}^{-1}$. L'activité antioxydante de l'acide ascorbique augmente donc avec l'augmentation de l'aire interfaciale qui constitue la zone de contact entre les anions ascorbate et la phase lipidique. Les anions ascorbate encapsulés agissent en synergie avec les α -tocophérols de l'huile d'olive qui se mettent à l'interface eau-huile grâce à leur propriétés interfaciales. Ils régénèrent les radicaux tocophéroxyl à leur forme réduite (Mosca et al., 2008a). Les anions ascorbate agissent aussi sur les radicaux peroxy et les hydroperoxydes qui peuvent se situer à l'interface eau-huile grâce à leur nature amphiphile.

Aussi, Ambrosone et al. (2006a) ont montré l'existence d'une corrélation entre l'indice de peroxyde et l'aire interfaciale de la phase dispersée de l'émulsion eau-dans-huile d'olive. L'oxydation est retardée par la dispersion d'eau pour les fractions volumiques d'eau distillée inférieures à 2%. Pour des fractions entre 2% et 5%, l'effet antioxydant de l'émulsification diminue progressivement à cause de la déstabilisation des émulsions (sédimentation, coalescence) due à l'absence de tensioactifs ajoutés et donc plus le pourcentage d'eau augmente moins l'émulsion est stable. En effet, la stabilité de ces émulsions est assurée par les molécules tensioactives naturellement présentes dans l'huile d'olive et par les hydroperoxydes qui se forment durant les 4-8 premières heures de l'oxydation, ce qui permet de retarder la déstabilisation des émulsions par rapport aux émulsions non oxydées. A mesure que l'oxydation avance, l'efficacité des hydroperoxydes dans la stabilisation de l'émulsion diminue. Ceci montre qu'il est important de maîtriser la stabilité physique des émulsions au cours de l'étude de leur stabilité oxydative.

II. Matériel et Méthodes

1. Réactifs

1.1. Huiles

Les huiles végétales suivantes ont été utilisées en l'état (en phase continue) ou pour la formulation des émulsions inverses :

- Huile d'olive vierge (Elbarka, Ksar Said, Tunisie).
- Huile de colza vierge (Vigean, Clion-sur-Indre, France) et raffinée (Fleur de Colza, Lesieur, France).
- Huile de cameline vierge (Bioplanète, Bram, France).
- Huile de lin vierge (Bioplanète, Bram, France).

1.2. Tensioactifs lipophiles

Deux tensioactifs liposolubles ont été utilisés pour la formulation des émulsions inverses :

- Le Polyricinoléate de polyglycérol (voir formule Annexe 1) : cet émulsifiant lipophile non ionique est fourni par Palsgraad (Juelsminde, Danemark). Sa masse molaire moyenne est égale à 1766 g.mol^{-1} d'après le fournisseur. Dans la nomenclature européenne des additifs alimentaires, le PGPR est référencé E476. Il est obtenu par l'estérification partielle d'acides gras d'huile de ricin avec du polyglycérol.
- Les Monoglycérides distillés (voir formule Annexe 1) : cet émulsifiant lipophile est fourni par Palsgraad (Juelsminde, Danemark) (masse molaire moyenne d'environ 370 g.mol^{-1} calculée à partir de la composition). Les monoglycérides sont obtenus à partir de l'huile de tournesol. Dans la nomenclature européenne des additifs alimentaires, les DMG sont référencés E471.

1.3. Espèces encapsulées

1.3.1. Molécules support

Le NaCl ou le glucose sont utilisés afin d'assurer une meilleure stabilité physique des émulsions inverses eau-dans-huile et, dans le cas du NaCl, maintenir la même force ionique dans les formulations en présence des différents sels de fer.

- Le Chlorure de sodium (NaCl), de masse molaire 58,44 g.mol⁻¹, (pureté ≥ 99%), a été fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Le D(+)- Glucose monohydraté, de formule C₆H₁₂O₆·H₂O, de masse molaire 198,17 g.mol⁻¹, a été fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).

1.3.2. Initiateurs d'oxydation

Afin d'accélérer l'oxydation des lipides, des sels de fer ou de cuivre sont solubilisés dans la phase aqueuse des émulsions inverses.

- Fer : le fer est encapsulé sous cinq formes :
 - Sulfate de fer II heptahydraté (FeSO₄·7H₂O) (pureté ≥ 97%), de masse molaire 278,01 g.mol⁻¹, fourni par VWR Chemicals (Leuven, Belgique).
 - Chlorure de fer II (FeCl₂) (pureté = 98%), de masse molaire 126,75 g.mol⁻¹, fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
 - Chlorure de fer III (FeCl₃) (pureté ≥ 98%), de masse molaire 162,2 g.mol⁻¹, fourni par Merck Millipore (Darmstadt, Allemagne).
 - Gluconate de fer hydraté ((C₆H₁₁O₇)₂Fe·xH₂O, voir formule en Annexe 1) de masse molaire 446,14 g.mol⁻¹ (base anhydre), fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
 - Lactate de fer hydraté ([CH₃CH(OH)COO]₂Fe·xH₂O, voir formule en Annexe 1) (pureté ≥ 98% par rapport à la matière sèche), de masse molaire 233,99 g.mol⁻¹ (base anhydre), fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Cuivre : Sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄·5H₂O) de masse molaire 249,69 g.mol⁻¹, fourni par VWR Chemicals (Leuven, Belgique).

1.4. Autres réactifs

- Dodécane : huile hydrocarbure linéaire ($C_{12}H_{26}$) de pureté 99%, fournie par Acros Organics (New Jersey, USA), sa masse molaire est de $170,34 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Monooléate de sorbitan ou Span 80 : tensioactif lipophile non ionique ($C_{24}H_{44}O_6$) de masse moléculaire $428,60 \text{ g.mol}^{-1}$, fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Iotect : indicateur coloré fourni par VWR Chemicals (Leuven, Belgique).
- Solution de boron trifluoride-méthanol (BF_3) dans le méthanol à 14% (poids/v) (Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne).
- Acide acétique glacial (CH_3COOH) (pureté = 99%), fourni par Xilab (Bruges, France).
- Iodure de Potassium (KI) fourni par Analar Normapur (Leuven, Belgique).
- Thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) en solution de normalité 0,1N, fourni par Scharlau (Barcelone, Espagne).
- Hexane de qualité analytique (pureté $\geq 96\%$), fourni par Xilab (Bruges, France) et de grade HPLC fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Isopropanol de grade HPLC : fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- p-Anisidine ($CH_3OC_6H_4NH_2$) (pureté $\geq 99\%$), fournie par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Hydroxyde de potassium (KOH) de pureté $\geq 85\%$, sa masse molaire est de $56,11 \text{ g.mol}^{-1}$, fourni par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Ethanol de pureté 96%, fourni par Xilab (Bruges, France).
- Oxyde diéthylique, fourni par Sharlau (Barcelone, Espagne).
- Phénolphtaléine fournie par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Chloroforme de qualité analytique fourni par Sharlau (Barcelone, Espagne).
- Standards d'esters méthyliques d'acides gras (EMAG) fournis par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).
- Standards de tocophérols α , β , γ et δ (voir formules Annexe 1) fournis par Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).

2. Caractérisation physicochimique des huiles

A réception, les huiles sont aliquotées dans des petits flacons en verre et stockées au congélateur à -18 °C afin de s'affranchir d'une évolution éventuelle des huiles au cours de l'étude.

2.1. Indice de réfraction

2.1.1. Principe

L'indice de réfraction caractérise le phénomène de réfraction, qui entraîne le changement de direction de la lumière au passage d'un milieu à un autre (lois de Snell-Descartes). L'indice de réfraction d'un milieu transparent est défini par le rapport entre la vitesse de propagation de la lumière dans le vide, et sa vitesse dans ce milieu. Dans la pratique, l'indice de réfraction d'une substance est mesuré par rapport à l'air. L'indice de réfraction dépend de la longueur d'onde λ de la lumière incidente, et de la température à laquelle la mesure est réalisée.

2.1.2. Mode opératoire

Les mesures sont réalisées avec un réfractomètre de paillasse Optech, à 20 °C. L'échantillon est placé sur un prisme de verre éclairé par une source de lumière. L'indice de réfraction du liquide étant inférieur à celui du verre du prisme, il existe dans le prisme une zone totalement obscure. Après un réglage de la netteté de la ligne de séparation entre les deux zones (claire et obscure), l'indice de réfraction est lu dans le réfractomètre.

2.2. Détermination de la composition en acides gras des huiles par chromatographie en phase gazeuse

2.2.1. Préparation des esters méthyliques d'acides gras

Les esters méthyliques d'acides gras EMAG sont obtenus par trans-méthylation des huiles en présence de BF₃ (Morrison et Smith, 1964). L'huile est solubilisée dans 0,5 mL d'hexane et 1 mL d'une solution de trifluorure de bore à 14% dans le méthanol (poids/v).

Après fermeture hermétique des tubes, la trans-méthylation des échantillons est réalisée dans un bain d'huile à 100 °C pendant 60 min. Après refroidissement et ajout d'1 mL d'eau, les esters méthyliques d'acides gras sont extraits trois fois par 2 mL d'hexane. L'ensemble des phases organiques est concentré puis lavé par 1 mL d'eau distillée. Les esters méthyliques d'acides gras contenus dans la phase organique finale sont stockés à -20 °C en attente de leur analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

2.2.2. Conditions d'analyse

Le système de CPG (GC 2010 plus, Shimadzu, Kyoto, Japon) comprend une colonne capillaire BPX 70 (60-m long, 0,25- μ m épaisseur du film, 0,25-mm diamètre interne, SGE). L'injecteur est à une température de 250 °C. Un détecteur à ionisation de flamme est maintenu à 280 °C. Le gaz vecteur est l'azote (débit = 32,9 mL.min⁻¹). Le volume de solution injecté varie de 1 à 3 μ L en mode split (rapport de fuite = 1/50). Le programme de température appliqué est le suivant : la température de la colonne augmente de 150 °C jusqu'à 200 °C à une vitesse de 1,3 °C.min⁻¹, maintenue pendant 20 min à 200 °C, puis augmentée de nouveau de 200 °C jusqu'à 235 °C à une vitesse de 10 °C.min⁻¹ et finalement maintenue pendant 23 min à 235 °C. Les données sont recueillies et intégrées par un système d'intégration v2.4 solution de GC (Shimadzu). La durée d'analyse d'un échantillon est de 90 minutes. Les esters méthyliques des acides gras sont séparés suivant leur point d'ébullition et leur polarité. L'identification des différents esters méthyliques d'acides gras est réalisée en se référant à un mélange standard d'EMAG. Chaque échantillon est analysé au moins deux fois. L'écart-type entre deux injections est inférieur à 2%.

2.3. Détermination de la teneur en tocophérols des huiles par chromatographie liquide haute performance

La composition des huiles en tocophérols est déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ISO 9936:2012. Les échantillons (2 g d'huile/25 mL d'hexane) sont analysés par un système de chromatographie en phase liquide Agilent L1200 (Santa Clara, CA, USA) équipé d'un système de distribution de solvant G1311A Quat Pompe, un injecteur (modèle G1329A) de capacité 20 μ L et d'un logiciel d'analyse, Agilent ChemStation. Une colonne (250×2 mm ; 5 μ m) YMC-Pack SIL (YMC Co, LTD, Kyoto, Japon) est utilisée avec

de l'isopropanol dans l'hexane (0,5: 99,5, v/v) comme phase mobile. Le système opère en mode isocrate à un flux de débit de 0,3 mL.min⁻¹. Les tocophérols sont séparés en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. Le détecteur de fluorescence (Agilent série 1100) est fixé à 290 nm pour la longueur d'onde d'excitation et à 330 nm pour la longueur d'onde d'émission.

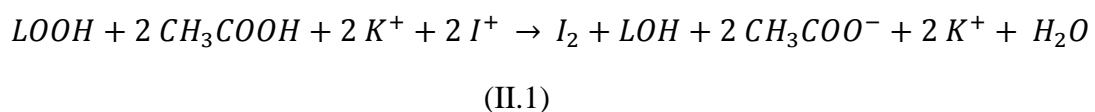
La quantification des tocophérols est basée sur une méthode standard externe. Les standards de tocophérols (α -, β -, γ - et δ -tocophérol) sont mélangés en solution dans l'hexane (0,1 mg.mL⁻¹) et injectés dans les mêmes conditions chromatographiques que les échantillons d'huile. Chaque échantillon est analysé au moins deux fois. L'écart-type entre deux injections est inférieur à 2%.

2.4. Détermination de l'indice de peroxyde

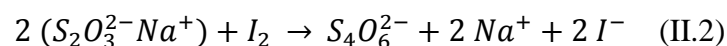
2.4.1. Principe

Les hydroperoxydes (LOOH) sont les produits primaires de l'oxydation lipidique. L'indice de peroxyde (I_p) est défini comme étant le nombre de microgrammes d'oxygène actif des peroxydes contenus dans un kilogramme de corps gras. Il est déterminé selon la norme française NF EN ISO 3960.

La réaction suivante a lieu entre les hydroperoxydes et les ions iodure I⁻ :



L'iode libéré est titré par le thiosulfate de sodium, selon la réaction suivante :



La quantité formée de di-iode est proportionnelle à celle des hydroperoxydes initialement présents (Shahidi et Wanasundara, 2002).

2.4.2. Mode opératoire

La méthode consiste à dissoudre 2 g d'huile dans 10 mL de chloroforme et 15 mL d'acide acétique, auquel on ajoute une solution aqueuse saturée récemment préparée d'iodure de potassium. Le mélange est agité et posé à l'abri de lumière pendant 5 min. La réaction est arrêtée par ajout de 75 mL d'eau distillée et une pincée d'Iotect (indicateur coloré). La titration de l'iode libéré se fait par une solution titrée de thiosulfate de sodium 0,01N. Tous les réactifs sont préalablement privés d'oxygène par barbotage d'azote. Un essai à blanc est réalisé en parallèle pour vérifier l'absence d'oxygène dans les réactifs.

L'indice de peroxyde, exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme d'huile, est calculé par la formule suivante :

$$I_p = (V_1 - V_0) \times \frac{T}{m} \times 1000 \quad (\text{II.3})$$

Avec V_1 volume en mL de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisée pour l'essai ;
 V_0 volume en mL de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc ;
T normalité exacte de la solution titrée de thiosulfate de sodium et m masse en g de la prise d'essai.

Chaque échantillon d'huile en phase continue ou extraite des formulations d'émulsion inverse est analysé au moins deux fois.

2.5. Détermination de l'indice d'acide

2.5.1. Principe

L'indice d'acide (I_A) correspond à la teneur en acides gras libres contenus dans l'huile. Cette caractéristique rend compte de l'état de dégradation (hydrolyse et oxydation) d'une huile. L'indice d'acide est la quantité d'hydroxyde de potassium en milligramme nécessaire pour neutraliser l'acidité contenue dans 1 gramme de corps gras. La détermination de cet indice est réalisée suivant la norme NF EN ISO 660. Cet indice d'acide peut être exprimé aussi en acidité oléique.

2.5.2. Mode opératoire

Une masse d'huile (0,5 g) est dissoute dans un mélange en parties égales d'oxyde diéthylique et d'alcool éthylique (20 mL du mélange solvant éthanol/oxyde diéthylique). Les acides gras libres présents sont dosés par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 0,01 N en présence de la phénolphtaléine (solution de 10 g.L⁻¹ dans l'éthanol à 95%). L'indice d'acide est donné par la formule :

$$I_A = \frac{N_{KOH} \times V_{KOH} \times M_{KOH}}{m_{huile}} \quad (\text{II.4})$$

Avec M_{KOH} masse molaire de l'hydroxyde de potassium en g.mol⁻¹ ; V_{KOH} volume en mL de la solution titrée d'hydroxyde de potassium ; N_{KOH} normalité exacte de la solution titrée d'hydroxyde de potassium et m_{huile} masse en g de la prise d'essai.

Chaque échantillon d'huile en phase continue ou extraite des formulations d'émulsion inverse est analysé au moins deux fois.

2.6. Détermination de l'indice de para-anisidine

2.6.1. Principe

L'indice de para-anisidine (I_{pA}) est déterminé selon la méthode NF EN ISO 6885 afin de quantifier la teneur en composés aldéhydiques (produits secondaires de l'oxydation des huiles). Les produits formés après la réaction de la p-anisidine et les aldéhydes sont détectés dans une solution acétique à 350 nm (Figure II.1).

On note que cette méthode n'est pas adaptée aux huiles d'olive.

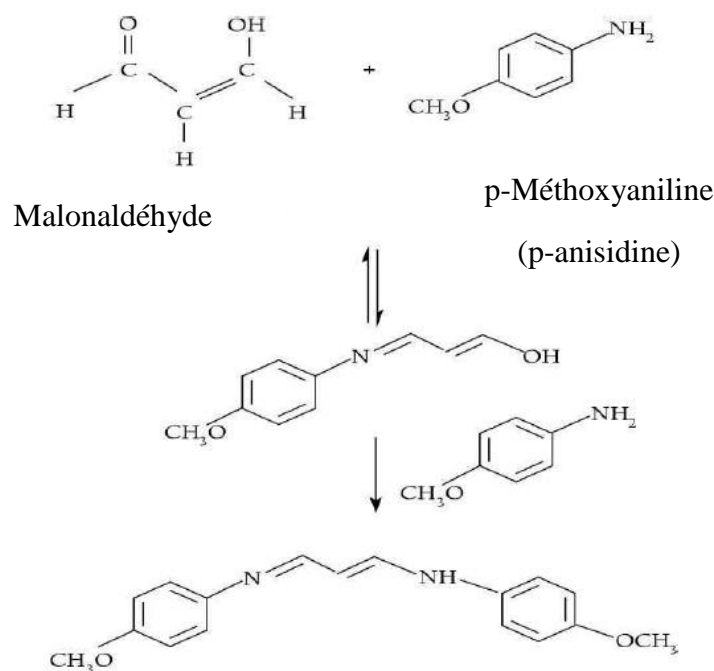


Figure II.1. Les réactions possibles entre la p-anisidine et le malonaldéhyde (Shahidi et Zhong, 2005).

2.6.2. Mode opératoire

Une masse connue de l'échantillon d'huile (0,5 à 4,0 g) est dissoute dans l'hexane dans une fiole jaugée de 25 mL. On mesure l'absorbance de la solution à 350 nm contre un témoin de solvant. On pipette 5 mL de la solution de l'échantillon dans un premier tube à essai et 5 mL de solvant dans un second tube à essai. On ajoute exactement 1 mL de la solution acétique de p-anisidine dans chaque tube à essai. Après 10 minutes, on mesure l'absorbance du contenu des deux tubes à essai à 350 nm en utilisant comme témoin une cuve remplie avec le mélange hexane et solution de p-anisidine. L'indice de p-anisidine est donné par la formule :

$$I_{pA} = \frac{(25 \times (1,2 A_s - A_b))}{m} \quad (\text{II.5})$$

Avec A_s absorbance de l'huile solubilisée dans l'hexane après réaction avec la solution de p-anisidine ; A_b absorbance de l'huile solubilisée dans l'hexane et m la masse, en g, de la prise d'essai.

Chaque échantillon d'huile en phase continue ou extraite des formulations d'émulsion inverse est analysé au moins deux fois.

3. Préparation et caractérisation physique des émulsions inverses eau-dans-huile

3.1. Formulation et préparation des émulsions inverses

Les émulsions inverses eau-dans-huile sont formulées en phase concentrée. Le principe repose sur le fait que, lorsqu'une émulsion est soumise à un cisaillement, les gouttes qui la constituent se déforment. Si l'intensité du cisaillement appliqué est suffisante pour compenser la pression de Laplace qui s'oppose à la déformation, elles se fragmentent en plusieurs gouttelettes (Taylor, 1934).

On prépare dans un premier temps une émulsion inverse constituée de 80% de phase aqueuse (contenant du chlorure de sodium ou du glucose) dispersée dans 20% d'un mélange lipophile (huile + tensioactifs lipophiles). Cette grande fraction de gouttelettes est adoptée pour profiter de la haute viscosité du système, permettant d'atteindre des contraintes de cisaillement élevées, même à des vitesses d'écoulement relativement faibles (Mabille et al., 2000). Dans toutes les formulations, le chlorure de sodium ou le glucose sont dissous dans l'eau afin d'inhiber les phénomènes de déstabilisation tels que le mûrissement d'Oswald (Kabalnov, 2001) et la coalescence (Aronson et Petko, 1993). Dans certains cas, un deuxième électrolyte pro-oxydant est incorporé pour étudier l'influence de la nature d'une espèce pro-oxydante sur l'oxydation des huiles.

L'émulsification est réalisée à température ambiante en incorporant progressivement l'eau dans la phase grasse à l'aide d'une ampoule à brome, tout en agitant le mélange à l'aide d'un homogénéisateur (RZR 2102 control Z Heidolph, Schwabach, Allemagne) équipé d'une hélice en inox à 4 pales de diamètre 5 cm, à une vitesse de rotation comprise entre 700 et 1000 rpm, selon la composition de l'émulsion et le diamètre des gouttelettes visé (Figure II.2). Le temps de cisaillement varie entre 15 et 20 minutes. L'émulsion inverse est ensuite diluée avec l'huile pour obtenir 40% de phase aqueuse interne et 60% de phase grasse.

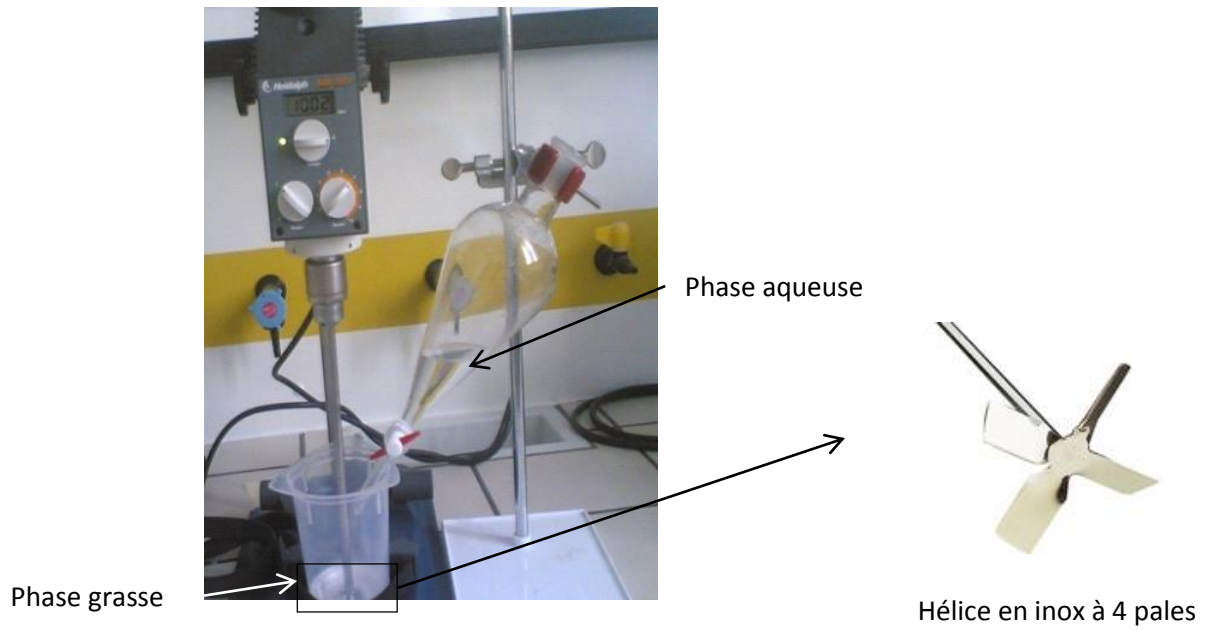


Figure II.2. Schéma du dispositif expérimental utilisé pour la préparation des émulsions eau-dans-huile.

Le Tableau II.1 présente l'ensemble des formulations réalisées ainsi que les conditions d'homogénéisation appliquées.

Tableau II.1. Compositions des émulsions inverses formulées.

| N° | Composition initiale de la phase aqueuse | | Composition initiale de la phase huileuse | Tensioactifs | | Vitesse de cisaillement (rpm) | |
|----|--|---|---|--------------|---------------------|-------------------------------|--------------------|
| | Régulateur osmotique | Pro-oxydant | | Huile | % PGPR ^c | | % DMG ^c |
| | | | | | | | |
| 1 | NaCl (0,1 M) | - | Huile de colza raffinée | 2 | 2 | 920 | |
| 2 | NaCl (0,1 M) | - | Huile de colza raffinée | 3 | 2 | 840 | |
| 3 | NaCl (0,1 M) | - | Huile de colza raffinée | 5 | 2 | 700 | |
| 4 | NaCl (0,1 M) | - | Huile de colza vierge | 2 | 2 | 920 | |
| 5 | NaCl (0,1 M) | - | Huile d'olive vierge | 2 | 2 | 920 | |
| 6 | NaCl (0,1 M) | - | Huile de lin vierge | 2 | 2 | 920 | |
| 7 | NaCl (0,1 M) | - | Huile de cameline vierge | 2 | 2 | 920 | |
| 8 | NaCl (0,1 M) | - | Huile de colza raffinée | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 9 | NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | Huile de colza raffinée | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 10 | NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | Huile de colza raffinée | 3 | 1,5 | 890 | |
| 11 | NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | Huile de colza raffinée | 5 | 1,5 | 750 | |
| 12 | NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | Huile de colza vierge | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 13 | NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | Huile d'olive vierge | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 14 | NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | Huile de cameline vierge | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 15 | NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | Huile de lin vierge | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 16 | NaCl (0,1 M) | C ₁₂ H ₂₂ FeO ₁₄ (0,005 M) ^a | Huile de colza raffinée | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 17 | NaCl (0,1 M) | C ₆ H ₁₀ FeO ₆ (0,005 M) ^b | Huile de colza raffinée | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 18 | NaCl (0,1 M) | FeCl ₂ (0,005 M) | Huile de colza raffinée | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 19 | NaCl (0,1 M) | FeCl ₃ (0,005 M) | Huile de colza raffinée | 1,5 | 1,5 | 1000 | |
| 20 | NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,002 M) | Huile de colza raffinée | 1,5 | 1,5 | 1000 | |

^a Gluconate ferreux ; ^b Lactate ferreux ; ^c %_m dans la phase huileuse

La stabilité morphologique des émulsions formulées et la stabilité en poids (absence d'évaporation à 25 °C et 60 °C) ont été contrôlées au cours de l'étude.

La pression osmotique, P_o , de la phase aqueuse qui influence la stabilité des émulsions, est calculée à partir de l'approximation des gaz parfaits (loi de van 't Hoff) :

$$P_o = RT(\sum C_i) \quad (\text{II.6})$$

Où $(\sum C_i)$ est la somme des concentrations de toutes les espèces solubilisées dans l'eau (incluant les molécules neutres, les cations et les anions), R la constante des gaz parfaits (8,314 J.K⁻¹) et T la température absolue.

Il importe aussi dans certains cas de maîtriser la force ionique, I , de la phase aqueuse :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2 \quad (\text{II.7})$$

Avec C_i la concentration molaire de l'ion i et z_i sa charge.

Les valeurs adoptées dans les différentes expériences sont présentées dans le Tableau II.2.

Tableau II.2. Concentrations des solutés utilisées et forces ioniques des phases aqueuses des différentes émulsions préparées.

| Composition initiale de la phase aqueuse | | $\sum C_i$ (M) | Force ionique I (M) |
|--|--|----------------|---------------------|
| Régulateur osmotique | Pro-oxydant | | |
| NaCl (0,1 M) | - | 0,200 | 0,100 |
| NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,002 M) | 0,204 | 0,108 |
| NaCl (0,1 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | 0,210 | 0,120 |
| NaCl (0,1 M) | CuSO ₄ (0,005 M) | 0,210 | 0,120 |
| NaCl (0,1 M) | C ₁₂ H ₂₂ FeO ₁₄ ^a (0,005 M) | 0,215 | 0,115 |
| NaCl (0,1 M) | C ₆ H ₁₀ FeO ₆ ^b (0,005 M) | 0,215 | 0,115 |
| NaCl (0,1 M) | FeCl ₂ (0,005 M) | 0,215 | 0,115 |
| NaCl (0,1 M) | FeCl ₃ (0,005 M) | 0,220 | 0,130 |
| NaCl (0,2 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | 0,410 | 0,220 |
| Glucose (0,2 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | 0,210 | 0,020 |
| Glucose (0,4 M) | FeSO ₄ (0,005 M) | 0,410 | 0,020 |

^a gluconate de fer ; ^b lactate de fer

3.2. Caractérisation physique des émulsions inverses

3.2.1. Microscopie optique

La microscopie optique est une technique pertinente pour l'étude des systèmes colloïdaux dont la taille des gouttes à observer est supérieure à 350 nm. Dans le cas des émulsions inverses, elle permet d'évaluer la taille moyenne des gouttes et d'identifier certaines instabilités telles que la coalescence.

La visualisation directe de gouttes d'eau juste après la préparation des émulsions inverses et au cours des suivis d'oxydation, est réalisée en utilisant un microscope optique (Leica DM 2500P ; Olympus BX-51, équipé d'un objectif à immersion d'huile×100 (Zeiss, Allemagne)) et une caméra numérique pour capturer les images. Les images sont traitées par un logiciel Leica IM50 afin d'estimer la taille moyenne des gouttes.

3.2.2. Diffusion statique de la lumière

3.2.2.1. Principe

La distribution granulométrique des émulsions est un paramètre essentiel pour la caractérisation initiale de la taille des gouttes ainsi que pour l'étude de leur stabilité dans le temps. Dans le cas d'une mesure par diffusion statique de la lumière, cette distribution des diamètres est déduite de l'interaction entre un ensemble de particules et le faisceau laser incident, par l'analyse de la tache de diffraction du faisceau. Lorsqu'un élément de matière est soumis à un rayonnement lumineux, certains rayons interagissent avec le moment dipolaire des molécules. Ces molécules sont alors excitées et répondent au champ électromagnétique par une oscillation de leur densité électronique. Chaque molécule se comporte alors comme un petit dipôle oscillant qui rayonne dans tout l'espace un champ électromagnétique diffusé : c'est le phénomène de diffusion du rayonnement.

En général, les échantillons ne sont pas monodisperses, mais sont constitués d'un mélange de gouttes de diamètres différents : chaque goutte diffuse la lumière, ce qui se traduit par un diagramme de diffusion, caractéristique de son diamètre d_i . L'intensité diffusée mesurée correspond donc à la somme des facteurs de forme pondérée par la fraction volumique des gouttes de diamètre d_i . C'est en faisant coïncider le facteur de forme expérimental avec le facteur de forme théorique (issu de la théorie de Mie et nécessitant la connaissance des indices de réfraction des phases continues et dispersées) que la distribution granulométrique de l'échantillon peut être déterminée.

Une grandeur caractéristique est le diamètre moyen en volume ou $d_{4,3}$:

$$d_{4,3} = \frac{\sum_i V_i d_i}{\sum_i V_i} = \frac{\sum_i \varphi_i d_i^4}{\sum_i \varphi_i d_i^3} \quad (\text{II.8})$$

Où V_i et φ_i sont respectivement le volume et la fraction volumique des gouttes de diamètre d_i .

Un indicateur de polydispersité de l'émulsion, le coefficient de l'uniformité en volume U_v , est défini par :

$$U_v = \frac{1}{\bar{d}} \frac{\sum_i V_i |\bar{d} - d_i|}{\sum_i V_i} \quad (\text{II.9})$$

Où \bar{d} est le diamètre médian de la distribution (50% en volume de la distribution possède un diamètre inférieur ou égal à \bar{d}).

Les émulsions dont le diamètre de gouttelettes est de $1\mu\text{m}$ sont considérées comme monodisperses quand l'uniformité en volume U_v est inférieure ou égale à 25%.

3.2.2.2. Mode opératoire

L'appareil utilisé est un granulomètre laser (Coulter LS 230 : Beckman Coulter, Paris, France ou un Malvern Mastersizer 2000 : Malvern, Royaume Uni) doté d'un système de mesure des diamètres par diffusion statique de la lumière. Les échantillons d'émulsions inverses sont dilués au préalable 10 fois avec une solution de dodécane contenant 0,5%_m de monooléate de sorbitane (Span 80), pour éviter tout phénomène de coalescence. La cellule de mesure est remplie avec cette solution de dodécane contenant 1% de Span 80, et un faible volume d'échantillon est introduit sous agitation douce. Les mesures sont réalisées à température ambiante. La distribution de tailles des différentes émulsions formulées est caractérisée par le diamètre moyen en volume, $d_{4,3}$, en appliquant la théorie de Mie.

4. Etude de l'oxydation des huiles en phase continue et en émulsion inverse

4.1. Conditions de vieillissement des huiles et des émulsions inverses

L'oxydation des lipides est suivie sur les huiles brutes ou formulées en émulsion inverse eau-dans-huile. Les suivis sont réalisés selon deux protocoles :

- Dans les flacons en verre stockés à 25 ou 60 °C ; des échantillons de 8 g d'une huile ou d'une émulsion inverse sont stockés dans l'obscurité, dans des flacons fermés. La capacité totale de flacon de 26 g garantit que l'oxygène est en excès pendant les expériences.
- Au sein du microcalorimètre, dans des coupelles en cuivre ou en aluminium à différentes températures (40, 60 et 80 °C).

Dans le cas des émulsions inverses, l'analyse chimique de l'huile nécessite une phase de séparation. La phase huileuse est obtenue par centrifugation de l'émulsion inverse (30 min/14000 rpm, MiniSpin Plus, Brumath, France).

4.2. Mesure du vieillissement des huiles et des émulsions inverses

Le suivi de l'oxydation des huiles et des émulsions inverses a été réalisé par deux méthodes :

- Méthode chimique : mesure des diènes conjugués par spectrophotométrie.
- Méthode thermique : mesure de l'enthalpie de l'oxydation par microcalorimétrie différentielle.

4.2.1. Mesure des diènes conjugués par la spectrophotométrie

4.2.1.1. Principe

L'oxydation des acides gras polyinsaturés s'accompagne d'un réarrangement des doubles liaisons qui passent en position conjuguée (Figure II.3). Les diènes conjugués (DC) présentent un pic d'absorption dans l'ultra-violet avec un maximum aux environs de 233 nm (Corongiu et Milia, 1983 ; Shahidi et Zhong, 2005).

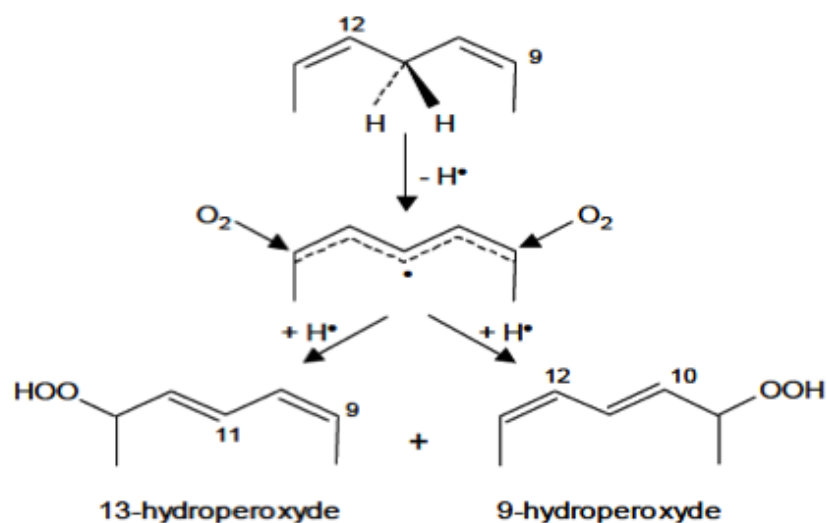


Figure II.3. Schéma de réarrangement des doubles liaisons au sein de l'acide linoléique au cours de l'oxydation (Frankel, 2005e).

4.2.1.2. Mode opératoire

Les prélèvements d'huile en phase continue ou préalablement extraite des émulsions inverses sont pré-pesés, puis dissouts dans l'hexane de manière à obtenir une concentration lipidique finale qui assure une mesure de l'absorbance dans la plage linéaire de spectrophotomètre. La solution lipidique est immédiatement placée dans une cellule de quartz (Hellma, chemin optique : 10 mm) contre un blanc constitué d'hexane. Un balayage est réalisé en mode absorbance entre 200 et 300 nm par spectrophotomètre à double faisceau Hitachi (U-2810). Les diènes conjugués sont quantifiés par leur absorbance (densité optique (DO) à 233 nm. Afin de prendre en compte le facteur de dilution imposé par les conditions de mesure, la DO mesurée à 233 nm est normalisée par la masse de lipides (mg) par unité de volume de solution (mL).

Le PGPR absorbe la lumière à 233 nm, d'où la nécessité de soustraire cette absorbance au cours des mesures des diènes conjugués dans les échantillons contenant le PGPR. Pour cela, une courbe étalon a été réalisée (Figure II.4).

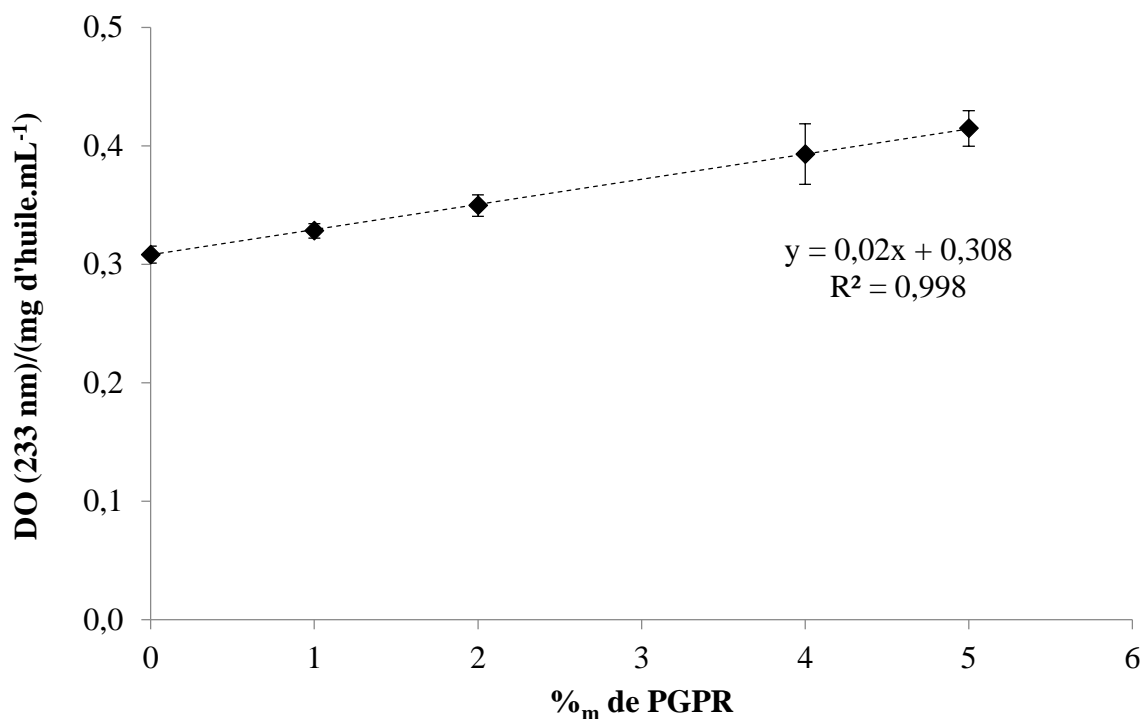


Figure II.4. Courbe de l'absorbance à 233 nm en fonction de la concentration en PGPR.

4.2.2. Mesure de l'oxydation par calorimétrie différentielle

Le laboratoire CBMN dispose d'un microcalorimètre conçu à l'Institut de Mécanique et d'Ingénierie (I2M, CNRS UMR 5295, Pessac) permettant le suivi en temps réel des réactions exothermiques telles que les réactions d'oxydation par la mesure du flux d'énergie libéré (Garcia-Darras, 2012). La géométrie de l'échantillon (zone interfaciale entre la phase lipidique et l'air) grâce à des coupelles de diamètres différents et la nature du contenant (cuivre ou aluminium) peuvent être choisies. Trois échantillons peuvent être analysés en même temps grâce à la mise en parallèle des thermopiles.

4.2.2.1. Principe

Le principe de la mesure est basé sur celui de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Lorsqu'une réaction d'oxydation se produit au niveau d'une coupelle échantillon, à l'intérieur de la chambre, le flux de chaleur différentiel varie entre la référence (coupelle vide) et l'échantillon. Cette variation permet d'obtenir des informations relatives à la cinétique de cette réaction de dégradation. Les éléments Peltier génèrent alors une tension de sortie proportionnelle à cette différence de flux conformément à la conversion de l'énergie thermique en une tension thermoélectrique (effet Peltier). La tension thermoélectrique est à son tour convertie en une puissance électrique, grâce à un coefficient de calibration préalablement calculé lors de l'étalonnage des éléments. L'intégration de la puissance dans le temps permet d'obtenir une énergie qui, divisée par la masse initiale de l'échantillon présent dans la coupelle, conduit à la valeur de l'enthalpie ΔH de la réaction (en $J.h^{-1}.g^{-1}$).

Au préalable, pour chaque élément Peltier, il est nécessaire de déterminer le coefficient de calibration ($W.V^{-1}$) spécifique à chaque température. Ce coefficient est déterminé durant l'opération de calibration décrite en Annexe 2. A partir du voltage mesuré avec les thermopiles et du coefficient de calibration déterminé à différentes températures, le flux de chaleur quantitatif est déduit à l'aide de la relation suivante :

$$Q_M = \alpha U_M \quad (II.10)$$

Avec Q_M (W) le flux de chaleur mesuré dissipé de la réaction chimique ; U_M (V) le voltage mesuré donné par la thermopile et α ($W.V^{-1}$) le coefficient de calibration.

4.2.2.2. Dispositif expérimental

Le microcalorimètre conçu à l'I2M (Figure II.5, Alain Sommier et Jean Toutain) est constitué par les parties suivantes :

- Un système de pilotage de la température et d'acquisition des données : la programmation réalisée sous Labview qui permet de contrôler les conditions expérimentales (température, temps). Les expériences sont réalisées en mode isotherme avec une température régulée à 0,01 °C. L'acquisition des données se fait toutes les 2 secondes.
- Une boîte contenant les échantillons à analyser : Il s'agit d'une plaque métallique d'aluminium, sur laquelle sont disposées les 4 cellules de mesure contenant chacune un élément Peltier. Chaque élément Peltier est isolé par du liège. Le téflon entourant les cavités permet un nettoyage plus facile des cellules.
- La plaque métallique d'aluminium, est utilisée en raison de sa bonne conductivité thermique, ce qui aboutit à une excellente stabilité thermique globale de la boîte contenant les coupelles.
- Les éléments Peltier sont reliés au système d'acquisition par des thermocouples, ces derniers sont connectés en parallèle et permettent de mesurer, en temps réel, et de manière indépendante, la température des coupelles. Le flux de chaleur est mesuré par les thermopiles selon le gradient de température généré par la réaction chimique et la température imposée.
- Les coupelles sont en cuivre ou en aluminium, elles contiennent les échantillons à étudier. Une d'entre elles est une coupelle témoin. L'appareil peut donc contenir jusqu'à trois échantillons différents. L'ensemble du dispositif est placé dans une boîte en liège afin de l'isoler des variations thermiques extérieures.

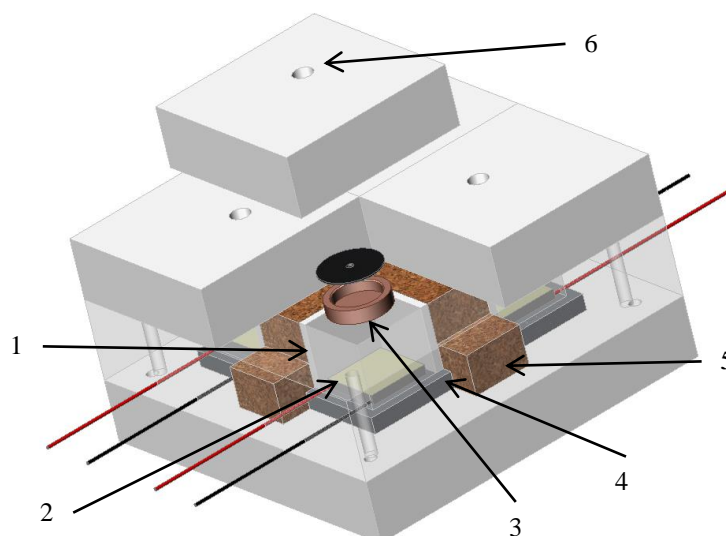


Figure II.5. Schéma du microcalorimètre en coupe.

(1) Chambre de réaction, (2) thermopile, (3) coupelle de l'échantillon, (4) plaque métallique, (5) la mousse d'isolation thermique, (6) rainure pour l'injection de l'échantillon.

4.2.2.3. Mode opératoire

Le suivi de l'oxydation sur des huiles en phase continue ou en émulsion inverse est réalisé en mode isotherme. Le dispositif expérimental est tout d'abord stabilisé en température pendant au moins 1 heure, jusqu'à obtention d'un signal électrique constant en μV .

Les échantillons, pré-pesés dans des seringues de 2 mL en plastique et préchauffés à la température T égale à $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ au-dessus de la température d'étude pendant 15 mn, sont injectés manuellement dans les coupelles préalablement placées sur les thermopiles. A cet instant, l'acquisition du flux dégagé par les réactions d'oxydation est réalisée. Après un temps variant entre 2 heures et 24 heures, l'échantillon est prélevé. L'intégration du flux rapporté à la masse de l'échantillon permet d'obtenir la valeur de l'enthalpie de la réaction en fonction du temps. Le dispositif expérimental permet de retirer une coupelle à un temps donné sans perturber la mesure sur les autres coupelles qui peuvent donc correspondre à des temps de suivi différents.

Dans le cas des huiles en phase continue, chaque échantillon est analysé en parallèle par la mesure des diènes conjugués.

Le Tableau II.3 présente un récapitulatif des suivis de l'oxydation réalisés sur les huiles en phase continue et émulsionnées durant le travail.

L'analyse et l'exploitation des différentes courbes seront présentés dans le chapitre Résultats et Discussion.

Tableau II.3. Tableau récapitulatif des études d'oxydation réalisées.

| Type de l'huile | Traitement réalisé | Durée du suivi (h) | Réceptacle contenant l'échantillon | Technique de suivi de l'oxydation | T °C du suivi | Objectifs |
|--------------------------------------|--|----------------------------------|--|---|----------------|--|
| Huiles d'olive vierge | En phase continue | 24 | Coupelles en cuivre | Spectrophotométrie + Microcalorimétrie différentielle | 60 °C | - Corrélation entre la teneur en diènes conjugués et l'enthalpie de la réaction d'oxydation des huiles en phase continue - Influence de la nature de l'huile sur l'enthalpie d'oxydation des huiles en phase continue |
| Huile de colza vierge | | | | | | |
| Huile de colza raffinée | | | | Microcalorimétrie différentielle | 40 °C 80 °C | - Influence de la température sur l'enthalpie d'oxydation des huiles en phase continue |
| Huile de cameline vierge | | | | | | |
| Huiles de cameline et de lin vierges | | | | | | |
| Huile de lin vierge | Coupelles en aluminium | Microcalorimétrie différentielle | - Influence de la nature de la coupelle sur l'enthalpie d'oxydation de l'huile en phase continue | | | |
| Huiles d'olive et de colza vierges | Emulsification | 8 | Coupelles en cuivre | Spectrophotométrie + Microcalorimétrie différentielle | 60 °C | - Corrélation entre la teneur en diènes conjugués et l'enthalpie de la réaction d'oxydation des huiles en émulsion inverse - Influence de la nature de l'huile sur l'enthalpie d'oxydation des huiles en émulsion inverse |
| Huiles de cameline et de lin vierges | | | | | | |
| Huiles d'olive vierge | En phase continue ; Agitation ; Emulsification | 72 | Flacons en verre | Spectrophotométrie | 25 °C 60 °C | - Influence des paramètres de formulation sur l'oxydation des lipides en émulsion inverse |
| Huile de colza vierge | | | | | | |
| Huile de colza raffinée | | | | | | |
| Huile de cameline vierge | | | | | | |
| Huile de lin vierge | | | | | | |

Objectifs de l'étude

Si l'étude bibliographique a mis en évidence la complexité des réactions d'oxydation des lipides, elle a aussi fait apparaître l'importance de quantifier et de maîtriser la formation des produits primaires d'oxydation tels que les hydroperoxydes. En effet, suivre ces produits ou mieux en retarder leur apparition permet de connaître, voire d'allonger la durée de vie des huiles. La détermination de la teneur en hydroperoxy-acides gras d'une huile passe classiquement par l'indice de peroxydes (IP). Cette méthode dont la mise en œuvre est longue et fastidieuse, donne des résultats discontinus et requiert l'utilisation de solvants organiques potentiellement toxiques. L'un des objectifs de ce travail de thèse est de **mettre au point une méthode de dosage de ces produits primaires d'oxydation, rapide, sensible, sans solvant, permettant un suivi de l'oxydation en continu**. Nous avons utilisé la microcalorimétrie différentielle, technique expérimentale innovante basée sur la mesure de l'enthalpie de l'oxydation lipidique, puisque les réactions d'oxydation sont exothermiques. Nous cherchons à corréliser la mesure de l'enthalpie à une technique classique, la mesure des diènes conjugués par spectrophotométrie à 233 nm dans les huiles en phase continue. Cette approche expérimentale est ensuite appliquée aux émulsions inverses avec l'objectif de suivre l'oxydation des lipides in situ, sans extraction de la phase lipidique.

De plus, nous avons constaté que très peu d'études s'intéressent à l'oxydation des lipides en milieu dispersé. Par ailleurs, certains résultats peuvent paraître contradictoires. Or, les émulsions inverses eau-dans-huile constituent la base de produits alimentaires tels que les margarines. L'un des objectifs de thèse est donc de **déterminer si l'oxydation des lipides en phase continue suit la même cinétique d'oxydation que les lipides émulsionnés**. Pour avoir une vision exhaustive, nous avons choisi de travailler avec 4 huiles vierges (olive, colza, cameline et lin) de composition variée en ALA (entre 0,7% pour l'huile d'olive et 57,3% pour l'huile de lin), ainsi qu'une huile de colza vierge et une huile raffinée.

Tout comme pour les émulsions directes, les émulsions inverses sont des milieux complexes caractérisées par la présence d'une phase lipidique, d'une phase aqueuse et d'une interface qui constitue une zone de contact entre les deux phases non miscibles. Les différentes phases ainsi que l'interface peuvent intégrer des composés pro-oxydants ou antioxydants. Le dernier objectif de cette thèse est donc de mieux **comprendre l'influence des paramètres de formulation des émulsions inverses sur l'oxydation des lipides**. Nous proposons d'atteindre cet objectif à travers deux volets :

- L'étude de l'oxydation des lipides en émulsion inverse, à 60 °C, en absence de molécules pro-oxydantes ;
- L'étude de l'oxydation des lipides en émulsion inverse, à 25 °C, en présence de diverses espèces pro-oxydantes hydrosolubles à base de fer ou de cuivre.

A travers les différentes études, nous aborderons l'influence de la nature de la phase huileuse, de la concentration en sulfate de fer, de la nature des sels de fer, de la nature et la concentration de la molécule ou électrolyte support dans la phase aqueuse, et de la nature de l'interface eau-huile en variant la concentration des émulsifiants. Afin de pouvoir interpréter les résultats, une attention particulière est portée à l'impact du phénomène d'agitation au moment de la préparation des émulsions et à la stabilité physique des émulsions au cours de la période d'étude.

L'objectif final de ce travail de thèse est de donner des clés de formulation aux industriels de l'agroalimentaire utilisant des huiles en phase dispersée inverse et souhaitant prévenir ou retarder les phénomènes d'oxydation, inhérents au procédé de fabrication ou de stockage. Ces études s'intègrent, plus largement, dans le développement des aliments fonctionnels riches en AGPI n-3 répondant aux critères nutritionnels et sensoriels ciblés.

III. Résultats et Discussion

1. Critères de choix et caractérisation des huiles végétales

Les huiles végétales choisies pour la formulation des émulsions inverses permettent de faire varier la teneur en acides gras insaturés, notamment celle de l'acide α -linoléique (18:3 n-3). Les huiles étudiées sont reconnues pour leurs bénéfices pour la santé, notamment l'huile de colza (Przybylski et al., 2005) et l'huile d'olive (Boskou et al., 2006). L'huile de lin a été autorisée dans l'alimentation française sous forme d'huile vierge en juillet 2010 (décret NOR : ECEC0911344A du J.O. du 21 juillet 2010). L'huile de cameline est moins connue du grand public mais possède également une composition en AGPI qui la rend nutritionnellement intéressante (Zubr, 2009). Ces deux huiles, caractérisées par une richesse en ALA (18:3 n-3) font l'objet d'un intérêt croissant afin de les intégrer dans les régimes alimentaires (Raczyk et al., 2016), compte-tenu de la déficience en ALA de l'alimentation actuelle (apports nutritionnels conseillés (ANC) 2010, Anses). En ce qui concerne l'huile d'olive, son intérêt nutritionnel réside dans sa teneur en acide oléique, polyphénols et tocophérols. Les huiles utilisées au cours de ce travail de thèse sont des huiles vierges, c'est à dire obtenues par des procédés mécaniques, sauf dans le cas de l'huile de colza, où nous avons utilisé soit de l'huile vierge soit de l'huile raffinée.

La composition en acides gras des lipides totaux des huiles utilisées est présentée dans le Tableau III.1. Nous observons une richesse des huiles de lin et de cameline en AGPI (respectivement, 72,5% et 57,9% des acides gras totaux) notamment en acide α -linoléique (18:3 n-3) (respectivement, 57,3% et 35,1% des acides gras totaux), conformément à ce qui a été observé dans d'autres études (Budin et al., 1995 ; Zubr, 2009 ; Raczyk et al., 2016). L'huile de cameline contient près de 13,6% d'acide 11- eicosénoïque ou gadoléique (20:1 n-9), comme reporté par Budin et al. (1995) et Raczyk et al. (2016). Comme attendu, les huiles de colza vierge et raffinée ont des compositions en acides gras très proches, dont 90% répartis entre les acides oléique, linoléique et α -linoléique. Cette composition est conforme au Codex Alimentarius (Codex STAN 210-1999) et proche des compositions citées dans plusieurs études (Anderson et Lingnert, 1998 ; Roman et al., 2013). Leur teneur en ALA supérieure à 5% les classe comme des huiles linoléiques au même titre que les huiles de cameline et de lin. Par ailleurs, le raffinage qui vise à éliminer des constituants délétères pour la qualité de l'huile (pigments, acides gras libres, produits d'oxydation, pesticides) n'a pas d'impact

significatif sur la composition en acides gras. L'huile d'olive est très riche en acide gras monoinsaturé (> 50% des acides gras totaux) principalement représenté par l'acide oléique (18:1 n-9). La composition en acides gras de l'huile d'olive est conforme à celle du Codex Alimentarius (STAN 33-1981) et aux compositions de plusieurs variétés d'huile d'olive tunisiennes (Krichene et al., 2010). Enfin, on remarque que les huiles étudiées ont toutes des teneurs très faibles en acide érucique (22:1 n-9), variant entre 0,1% et 1,2%. Cet acide gras est jugé impropre à la consommation humaine et sa teneur dans les huiles ne doit pas dépasser 2% (Przybylski et al., 2005).

Tableau III.1. Caractéristiques des huiles utilisées pour la formulation des émulsions inverses.

| Acide gras (% en poids) | Huile de colza raffinée | Huile de colza vierge | Huile d'olive vierge | Huile de cameline vierge | Huile de lin vierge |
|--|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------|
| 16:0 | 4,4 | 4,5 | 15,6 | 5,8 | 5,3 |
| 16:1(n-7) | 0,2 | 0,2 | 1,7 | 0,0 | 0,0 |
| 18:0 | 1,3 | 1,4 | 2,0 | 2,6 | 3,6 |
| 18:1(n-9) | 58,9 | 59,9 | 59,5 | 13,5 | 17,6 |
| 16:1 (n-7) | 2,9 | 2,8 | 2,7 | 0,7 | 0,6 |
| 18:2 (n-6) | 19,9 | 19,5 | 16,1 | 20,5 | 15,0 |
| 18:3 (n-3) | 9,5 | 8,6 | 0,7 | 35,1 | 57,3 |
| 20:0 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 1,3 | 0,1 |
| 20:1 (n-9) | 1,2 | 1,0 | 0,2 | 13,6 | 0,1 |
| 20:2 (n-6) | 0,7 | 0,9 | 1,1 | 0,2 | 0,0 |
| 20:3 (n-6) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 2,0 | 0,0 |
| 21:0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 0,0 |
| 22:1 (n-9) | 0,5 | 0,2 | 0,0 | 2,3 | 0,0 |
| Autres ^a | 0,1 | 0,4 | 0,0 | 0,8 | 0,3 |
| Σ AGS ^b | 6,2 | 6,7 | 18,0 | 11,5 | 9,1 |
| Σ AGMI ^b | 63,7 | 64,3 | 64,1 | 30,6 | 18,4 |
| Σ AGPI ^b | 30,1 | 29,0 | 18,0 | 57,9 | 72,5 |
| Σ n-6 AGPI ^b | 20,6 | 20,4 | 17,2 | 22,8 | 15,2 |
| Σ n-3 AGPI ^b | 9,5 | 8,6 | 0,7 | 35,1 | 57,3 |
| Teneur en tocophérol (mg/100 g d'huile) | | | | | |
| α-tocophérol | 9,9 | 7,4 | 14,9 | 1,3 | 0,5 |
| β-tocophérol | 3,3 | 2,8 | 0,5 | 0,5 | 4,3 |
| γ-tocophérol | 14,7 | 16,9 | 1,1 | 13,6 | 23,9 |
| δ-tocophérol | 0,8 | 0,8 | 0,1 | 1,1 | 0,8 |
| Tocophérols totaux | 28,7 | 27,9 | 16,6 | 16,5 | 29,5 |
| Indice de peroxyde (meq.kg ⁻¹ d'huile) | 0,5 | 3,8 | 3 | 2,8 | 2,5 |
| Indice d'acide | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,4 | 0,3 |
| Indice de para- anisidine | 0,2 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | 0,4 |

^aAutres : représente les acides gras dont la contribution est inférieure à 1%.

^bΣ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras monoinsaturés ; Σ n-3 AGPI : somme des acides gras polyinsaturés de la série n-3 ; Σ n-6 AGPI : somme des acides gras polyinsaturés de la série n-6.

La composition en tocophérols des huiles utilisées est présentée dans le Tableau III.1. Les tocophérols (regroupés sous la dénomination de vitamine E) sont les antioxydants des huiles végétales (Kiokias et al., 2008 ; Seppanen et al., 2010). Leur activité antioxydante est due à la possibilité de donner leur hydrogène phénolique aux radicaux lipidiques libres retardant ainsi les réactions de propagation (Burton et Inglood, 1981 ; Seppanen et al., 2010). Bien que l' α -tocophérol ait longtemps été reconnu comme un important antioxydant, il a été démontré que les autres formes de la vitamine E ont aussi des effets anti-radicalaires, notamment le γ -tocophérol (Jiang et al., 2001 ; Frankel, 2005h ; Seppanen et al., 2010). L'activité antioxydante des tocophérols dépend de leur concentration, des matrices étudiées (huiles, graisses, produits alimentaires) et des protocoles utilisés pour la mettre en évidence (méthodes de caractérisation, température testée) (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996 ; Frankel, 2005h ; Seppanen et al., 2010). A forte concentration, dans les huiles végétales, c'est souvent la forme γ qui présente le plus fort pouvoir antioxydant par rapport à la forme α du fait que cette dernière peut participer à des réactions secondaires pro-oxydantes (Eldin et Appelqvist, 1996 ; Frankel, 2005h ; Seppanen et al., 2010). L' α -tocophérol est la forme majoritaire de la vitamine E dans l'huile d'olive utilisée dans cette étude avec une teneur de 150 mg.kg^{-1} . Cette valeur est intermédiaire par rapport à celles reportées pour d'autres huiles d'olive : 96 mg.kg^{-1} (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996), 120 mg.kg^{-1} (Kim et al., 2008) et 392 mg.kg^{-1} (De Leonardis et Macciola, 2012). Elle est aussi en accord avec l'étude de plusieurs variétés tunisiennes d'huile d'olive reportant des teneurs en α -tocophérol entre 160 et 378 mg.kg^{-1} (Krichene et al., 2010). L'huile de lin vierge utilisée est particulièrement riche en γ -tocophérol. La teneur déterminée (239 mg.kg^{-1}) est cohérente avec celles d'autres huiles de lin : 200 mg.kg^{-1} (Przybylski, 2005), 329 mg.kg^{-1} (Couedelo, 2011), entre 430 et 575 mg.kg^{-1} (Gunstone et Harwood, 1994) et 588 mg.kg^{-1} (Kamal-Eldin, 2006). Le Codex Alimentarius fixe la teneur en α -tocophérol dans l'huile de colza entre 100 et 386 mg.kg^{-1} et celle de γ -tocophérol entre 189 et 753 mg.kg^{-1} . Nos valeurs sont légèrement inférieures pour ces deux formes de vitamine E pour les huiles de colza vierge et raffinée par rapport à celles du Codex Alimentarius. La forme prépondérante de la vitamine E dans l'huile de cameline est le γ -tocophérol avec une valeur en accord avec celle mesurée par Budin et al. (1995).

Afin d'évaluer la qualité des huiles utilisées pour la formulation des émulsions inverses, nous avons mesuré certaines caractéristiques chimiques : indice de peroxyde, indice de para-anisidine et indice d'acide (Tableau III.1). L'indice de peroxyde, qui indique la teneur en peroxydes et hydroperoxydes, produits primaires de l'oxydation des huiles, est l'un des indicateurs de qualité les plus courants des graisses et huiles (Antolovich et al., 2001 ; Ruíz et al., 2001 ; Van Der Merwe et al., 2003 ; Yildiz et al., 2003). C'est un paramètre qui rend compte de l'historique de l'échantillon et qui peut aussi être prédictif de la durée de vie d'une huile. Un certain nombre de méthodes ont été développées pour la détermination de l'indice de peroxyde, dont la méthode iodométrique standardisée (norme française NF EN ISO 3960 NF EN ISO 3960). Cette méthode s'applique à tous les corps gras d'origine animale et végétale, aux acides gras et à leurs mélanges pour des indices de peroxyde compris entre 0 et 30 milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme. Les valeurs de l'indice de peroxyde pour les différentes huiles utilisées sont conformes aux recommandations du Codex Alimentarius, (<15 meq.kg⁻¹ pour les huiles vierges et <10 meq.kg⁻¹ pour les huiles raffinées). Comme la teneur en hydroperoxydes diminue dans la phase secondaire de l'oxydation (cf § I.1.2.2), un faible indice de peroxyde n'est pas nécessairement un critère de qualité. Il est donc important de combiner cet indice avec la mesure des produits secondaires de l'oxydation pour connaître l'état réel de l'oxydation de l'huile. Ceci a été réalisé en mesurant l'indice de para-anisidine, qui détecte la présence des composés aldéhydiques non volatils générés lors de la décomposition des hydroperoxydes. Cette méthode basée sur une réaction colorée entre le p-méthoxyaniline (anisidine) et les aldéhydes constitue un indicateur fiable du rancissement des huiles (Van Der Merwe et al., 2003). L'indice de para-anisidine est bien corrélé à la teneur totale des substances volatiles (Doleschall et al., 2002). Contrairement à l'indice de peroxyde ou à l'indice d'acide, il n'y a pas de valeur normative indiquée dans le Codex Alimentarius. Selon les auteurs, une huile doit avoir un indice de para-anisidine inférieur à 10 (Marina et al., 2009), voir même à 2 (Subramaniam et al., 2000). Les huiles utilisées dans ce travail de thèse ont toutes un indice de para-anisidine inférieur à 1. Nous pouvons donc les considérer comme étant de « bonne » qualité. L'indice d'acide indique la teneur en acides gras libres dans l'huile. L'origine des acides gras libres est multiple. Ils peuvent être issus de l'hydrolyse enzymatique et chimique dans les fruits et graines, de l'hydrolyse chimique des huiles au cours du stockage ou d'un process. Ce sont aussi des produits d'oxydation secondaire. Ils sont donc des constituants naturels des huiles vierges. Leur présence peut entraîner l'apparition de saveurs indésirables dans les produits alimentaires. Ils sont éliminés au cours de l'étape de neutralisation du procédé de raffinage des huiles. Le Codex Alimentarius limite l'indice

d'acide à 4 mg de KOH par g d'huile pour les huiles végétales vierges et à 0,6 mg de KOH par g d'huile pour les huiles végétales raffinées. Dans le cas de l'huile d'olive, l'indice d'acide, calculé par rapport à l'acide oléique, est utilisé comme un critère de base pour classer les différentes catégories d'huile d'olive (Régulation Européenne 1989/2003). Toutes les huiles utilisées satisfont les critères de qualité vis-à-vis de cet indice. L'huile d'olive est qualifiée de vierge extra car son indice d'acide est inférieur à 0,8 mg de KOH par g d'huile.

2. Etude de l'oxydation des huiles en phase continue par microcalorimétrie

2.1. Introduction

L'étude de la peroxydation des lipides dans les produits alimentaires peut être abordée sous deux angles :

- L'état d'oxydation des lipides présents dans l'aliment, ce qui est un indicateur de sa qualité ;
- La prédiction de l'oxydation, liée à la durée de conservation de l'aliment.

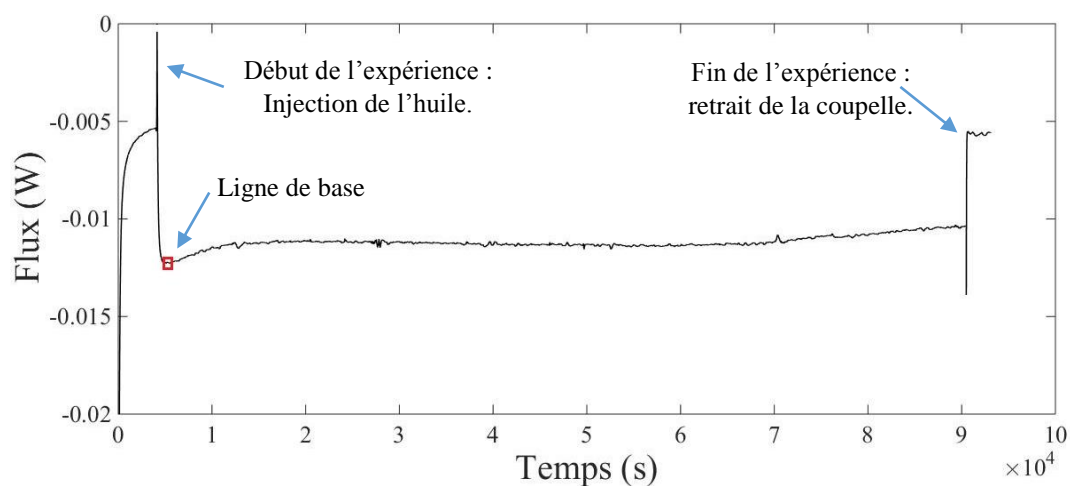
Le microcalorimètre utilisé dans ce travail de thèse est conçu pour mesurer l'enthalpie dissipée durant le processus d'oxydation, en temps réel, sur 3 échantillons simultanément, avec une sensibilité élevée (Garcia-Darras, 2012). Il constitue une alternative simple et rapide pour comparer plusieurs échantillons d'huile à la fois, tout en s'affranchissant de l'utilisation de solvants organiques. Plusieurs versions de l'appareil ont été développées en collaboration étroite avec le laboratoire I2M visant à améliorer sa fiabilité et sa sensibilité.

L'étude de l'oxydation des huiles en phase continue consiste à mesurer le flux de chaleur dégagé par le processus d'oxydation pendant des temps variables (entre 2 h et 24 h), en mode isotherme. Pour chaque temps étudié, les échantillons sont analysés en parallèle pour leur teneur en diènes conjugués à partir de la densité optique mesurée à 233 nm, normalisée par la concentration des lipides. Les diènes conjugués apparaissent généralement durant la formation des hydroperoxydes à partir des acides gras insaturés, en raison du réarrangement des doubles liaisons. Ces diènes absorbent à la longueur d'onde spécifique de 233 nm (White, 1995). La mesure des diènes est plus rapide que la mesure de l'indice de peroxyde, plus simple, et nécessite moins de réactifs chimiques et un volume d'échantillon plus petit. De plus, une excellente corrélation entre la mesure des diènes conjugués et l'indice de peroxyde a été démontrée (Shahidi et al., 1994 ; Wanasundara et al., 1995 ; Marmesat et al., 2009).

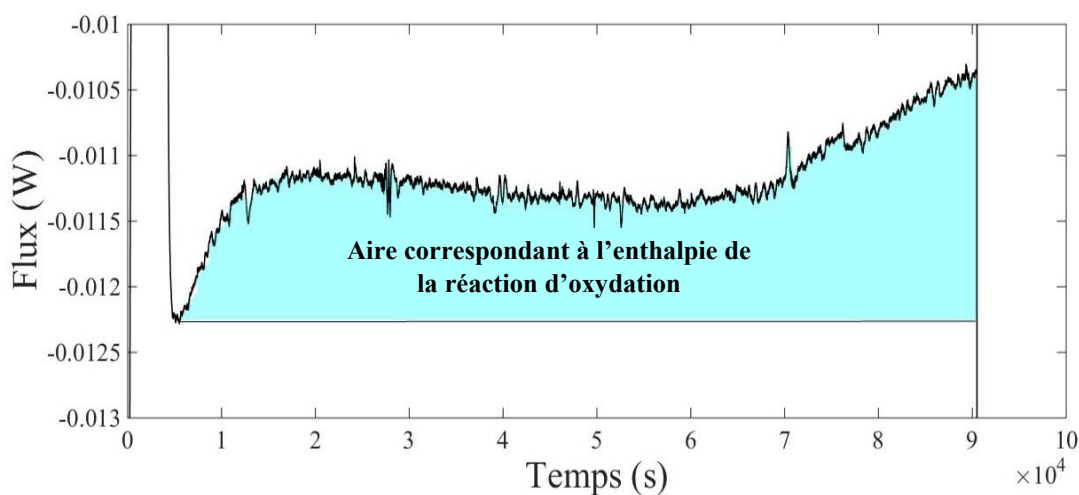
2.2. Mesure de l'enthalpie d'oxydation des huiles en phase continue

La Figure III.1A représente une courbe typique du flux de chaleur mesuré au cours du temps pour un échantillon de 0,5 g d'huile de cameline, analysé pendant 24 h à 60 °C. L'échantillon d'huile est préchauffé à la température étudiée avant son incorporation dans la coupelle. On note deux événements thermiques de forte amplitude qui correspondent à l'injection de l'huile dans la coupelle en début d'expérience et au retrait de la coupelle en fin d'expérience.

L'introduction de l'échantillon perturbe fortement le signal en raison de la variation de capacité calorifique induit par la présence d'huile. Le signal augmente dans un premier temps, puis diminue jusqu'à atteindre un minimum. La valeur de ce minimum est adoptée pour la ligne de base. La Figure III.1B montre un zoom de la courbe du flux de chaleur en faisant abstraction des 2 artefacts liés à la manipulation de l'échantillon.



A



B

Figure III.1. Flux de chaleur (W) pour un échantillon d'huile de cameline analysé dans des conditions isothermes (60 °C) dans une coupelle en cuivre sur une période de 24 heures ; A : Figure montrant les artefacts liés à la manipulation de l'échantillon ; B : Zoom sur l'axe du flux.

Le flux de chaleur consiste en la sommation des termes source relatifs à l'ensemble des réactions chimiques impliquées durant le temps étudié, chaque terme source étant égal au produit du taux de conversion multiplié par l'enthalpie des réactions. Les flux mesurés au cours du temps permettent de calculer des valeurs d'enthalpie de réaction par intégration du signal de flux de chaleur en fonction du temps, en rapportant à la masse d'huile introduite.

Chaque courbe permet donc de déduire : 1) l'enthalpie totale de la réaction pour le temps total étudié et 2) l'enthalpie à un temps donné (inférieur au temps total de l'expérience).

La Figure III.2 présente pour l'huile de cameline, les courbes d'enthalpie obtenues pour des temps d'expériences variant de 2 heures à 24 heures. Les courbes se superposent ce qui montre la reproductibilité des mesures. Par exemple, à $t = 8$ heures, l'enthalpie d'oxydation est égale à $208 \pm 13 \text{ J.g}^{-1}$ et correspond à une moyenne de 5 points. Les coefficients de variation varient entre 2,4% pour $t = 20$ heures et 15,4% pour $t = 2$ heures.

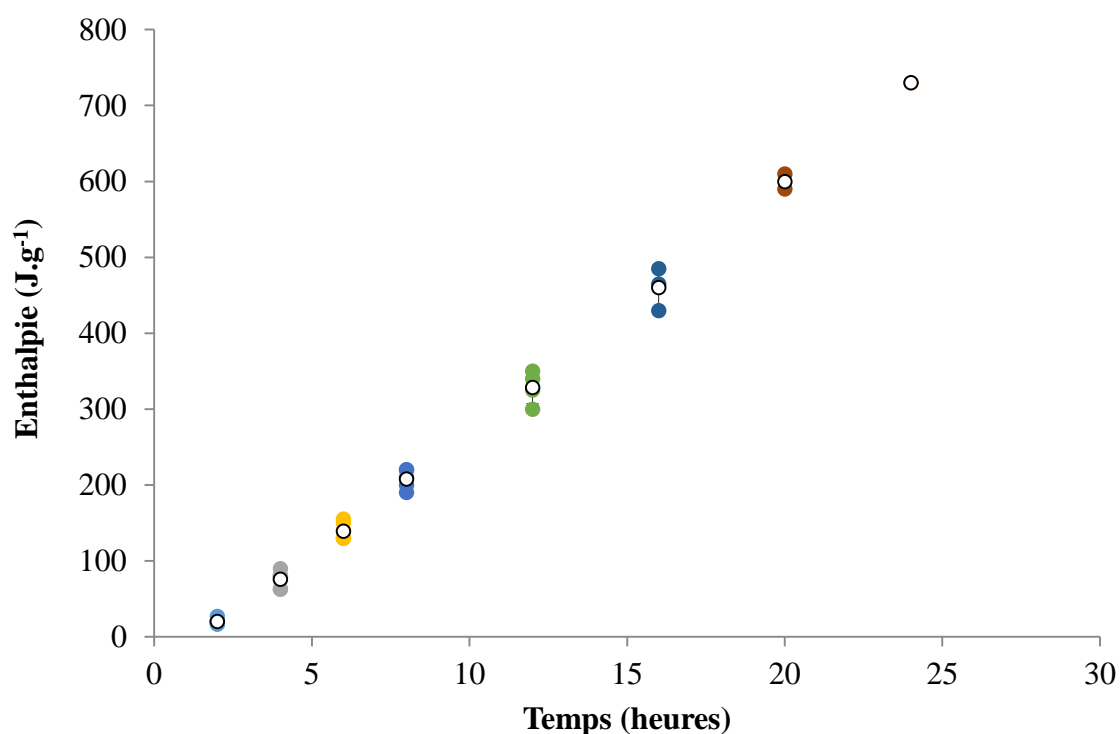


Figure III.2. Superposition des mesures de l'enthalpie et de leurs moyennes (○) à différents temps pour l'huile de cameline analysée dans des conditions isothermes à 60 °C, dans des coupelles en cuivre.

Cette approche est appliquée pour chaque type d'huile. A titre d'exemple, la Figure III.3 présente l'enthalpie de la réaction d'oxydation sur 24 heures pour les différentes huiles. Il apparaît que la méthode permet de discriminer les différentes huiles. La discussion des résultats en fonction de la composition chimique des huiles sera présentée au § III.2.4.

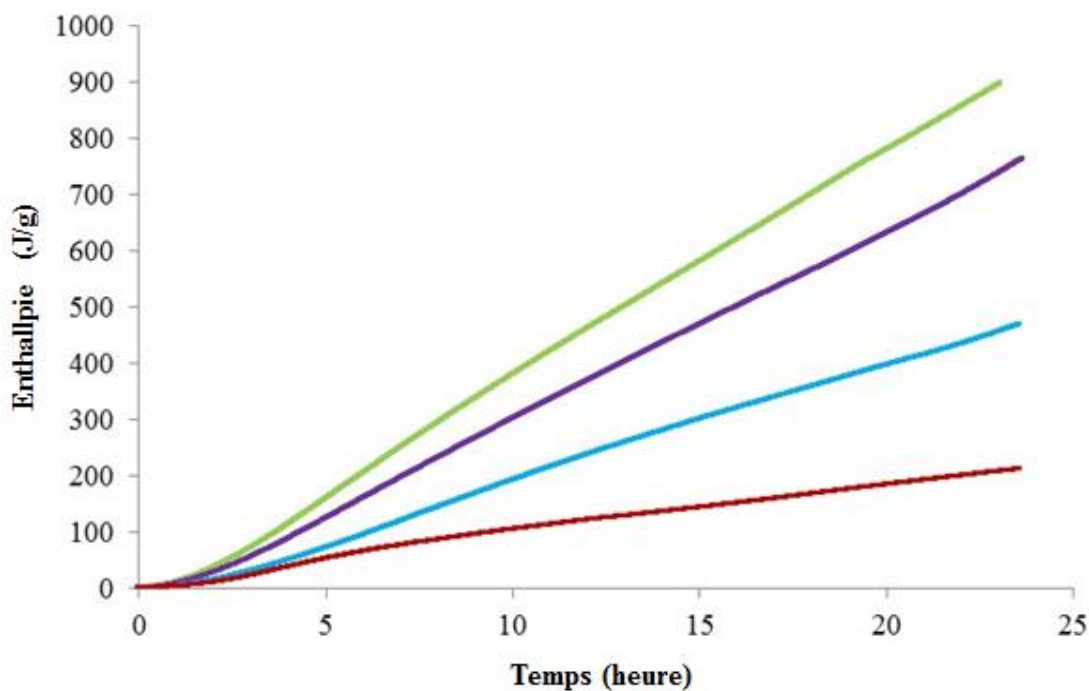


Figure III.3. Évolution de l'enthalpie en fonction du temps ; pour les huiles vierges de lin (●), cameline (●), colza (●) et olive (●), analysées dans des conditions isothermes au cours du temps à 60 °C, dans des coupelles en cuivre.

D'après la Figure III.3, l'évolution de l'enthalpie au cours du temps pour les différentes huiles présente 2 régimes : un premier régime de courte durée (1h30) caractérisé par une évolution lente du signal enthalpique, correspondant à la période d'induction, suivi d'un deuxième régime bien plus long de tendance quasi-linéaire. Les courbes peuvent être modélisées par des droites avec des coefficients R^2 très proches de 1 ($R^2=0,99$ pour les différentes huiles). La pente de ces droites caractérise l'oxydabilité des huiles. Comme nous le verrons ultérieurement, le signal peut dans certains cas s'écarter considérablement de la linéarité. Afin de se doter d'un critère général, indépendant de l'allure des courbes, l'oxydabilité de l'huile sera déterminée en calculant la vitesse moyenne d'oxydation V_m égale à la moyenne des dérivées locales de l'enthalpie, V_i , pendant le temps de mesure égal à 24 heures (§ III.2.4).

On calcule les dérivées locales V_i comme suit :

$$V_i = \frac{dH}{dt} = \lim_{t_{i+1} \rightarrow t_i} \frac{H_{i+1} - H_i}{t_{i+1} - t_i} \quad (\text{III.2.1})$$

L'intervalle de temps entre deux mesures ($t_{i+1} - t_i$) étant très faible (entre 1,5 et 2 secondes), nous avons adopté la définition suivante :

$$V_i = \frac{H_{i+1} - H_i}{t_{i+1} - t_i} \quad (\text{III.2.2})$$

La vitesse moyenne d'oxydation est calculée comme suit :

$$V_m = \frac{\sum V_i}{i} \quad (\text{III.2.3})$$

Vu que les courbes à 60 °C sont quasi linéaires comme le montre la Figure III.3, V_m est égale à la pente de la courbe de l'enthalpie en fonction du temps.

2.3. Corrélation entre la teneur en diènes conjugués et l'enthalpie de la réaction d'oxydation

Afin de savoir à quel type de réaction d'oxydation correspondent les courbes obtenues, nous avons analysé les échantillons en fin d'expérience pour leur teneur en diènes conjugués qui sont des produits primaires d'oxydation. La Figure III.4 montre que l'enthalpie de la réaction d'oxydation mesurée entre 2 heures et 24 heures est fortement corrélée à la concentration en diènes conjugués mesurée aux mêmes temps pour les différentes huiles étudiées, cameline, olive, colza vierge et raffinée et lin (respectivement, $R^2 = 0,98$; $0,93$; $0,99$; $0,99$ et $0,95$). Ce résultat confirme que le microcalorimètre développé au laboratoire est une technique suffisamment sensible et précise pour suivre en continu les réactions précoces d'oxydation des huiles.

A notre connaissance, il n'existe aucune étude antérieure visant à corréliser la teneur en diènes conjugués et l'enthalpie de réaction. Notre étude a été rendue possible grâce à la sensibilité du microcalorimètre utilisé, capable de mesurer des variations de flux thermiques de quelques milliwatts (Figure III.1) et de tenir la ligne de base pendant plusieurs jours sans altérer la qualité de mesure, contrairement aux appareils de DSC classiques. En revanche,

certaines études corrélient le temps d'induction mesuré par DSC sous pression d'air et l'indice de peroxyde (Kowalski et al., 1997) ou la teneur en radicaux libres formés dans les premiers stades de l'oxydation, mesurée par résonance paramagnétique électronique (Velasco et al., 2004).

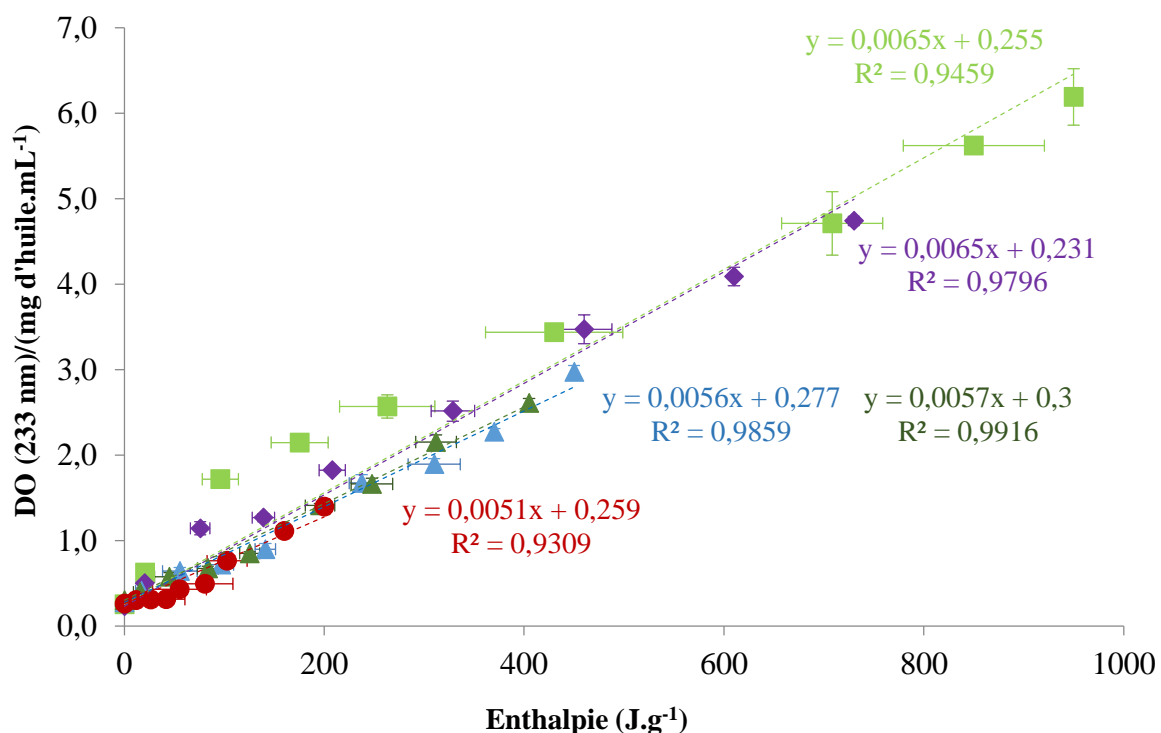


Figure III.4. Corrélation entre la concentration en diènes conjugués et l'enthalpie de la réaction d'oxydation pour les huiles de lin vierge (■), cameline vierge (◆), colza vierge (▲) et raffinée (▲) et olive vierge (●), analysées dans des conditions isothermes à 60 °C, dans des coupelles en cuivre.

2.4. Influence de la nature de la coupelle sur l'oxydabilité de l'huile

Afin de tester l'influence de la coupelle sur la mesure de l'enthalpie, nous avons comparé la cinétique d'oxydation de l'huile de lin dans des coupelles en cuivre et en aluminium. Le cuivre est connu pour être un catalyseur efficace de l'oxydation des lipides (Bealdle, 1950 ; Andersson et Lingnert, 1998 ; Subramanian et al., 2000 ; Choe et Min, 2006), contrairement à l'aluminium (Stohs et Bagchi, 1995).

La Figure III.5 montre l'évolution de l'enthalpie d'oxydation au cours du temps. La cinétique d'oxydation est plus rapide dans la coupelle en cuivre que dans celle en aluminium. Ce résultat conforme à la littérature justifie notre choix de travailler dans des coupelles en cuivre afin d'accélérer la cinétique de l'oxydation lipidique. Par ailleurs, d'un point de vue technique, la conductivité thermique élevée du cuivre ($400 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$) par rapport à celle de l'aluminium ($209,3 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$) permet un suivi plus précis des flux de chaleur dégagés.

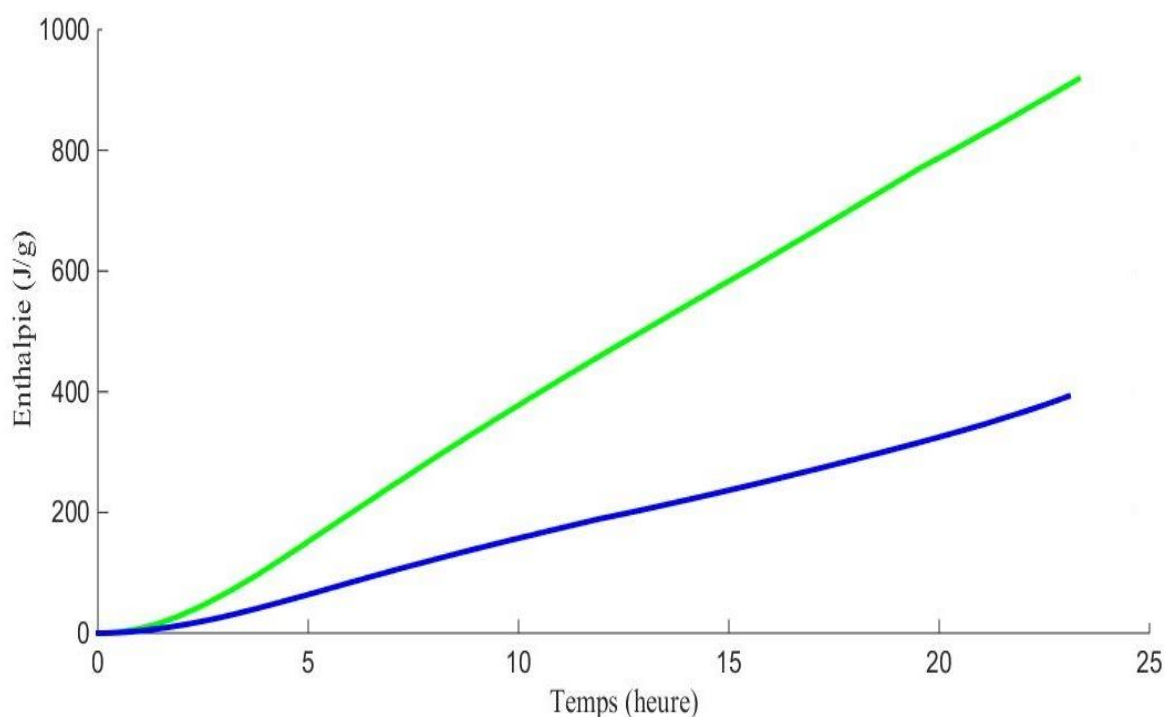


Figure III.5. Evolution de l'enthalpie en fonction du temps pour l'huile de lin dans des conditions isothermes à 60 °C en fonction de la nature de la coupelle (cuivre (●) et aluminium(●)).

2.5. Influence de la composition en acides gras des huiles sur leur oxydabilité

Pour chaque huile, l'oxydabilité de l'huile est déterminée à partir de la Figure III.3, par la vitesse moyenne de l'enthalpie calculée selon la méthode définie dans le paragraphe III.2.2. Elle est exprimée en $J.g^{-1}.h^{-1}$.

Il existe une forte corrélation positive entre l'oxydabilité de l'huile ($J.g^{-1}.h^{-1}$) et la teneur en acide α -linoléique ($R^2 = 0,94$) comme le montre la Figure III.6. Compte tenu de la forme des courbes obtenues à 60 °C et des temps d'analyse longs devant la phase d'induction, il est possible de considérer que le régime est linéaire : dans ce cas $R^2 = 0,95$. Identiquement, Kamal-Eldin (2006) a reporté pour les germoplasmes de soja une corrélation positive entre l'évolution de l'indice de peroxyde à 60 °C et le nombre moyen de doubles liaisons ($R^2 = 0,81$) et la teneur en acide α -linoléique ($R^2 = 0,85$). L'augmentation de la vitesse d'oxydation avec la teneur en acide α -linoléique peut être interprétée en considérant que les AGPI n-3 ont le plus haut indice de 'pont méthylène', c'est à dire un nombre moyen de 'positions de méthylène diallylique' plus élevé, qui les rend plus susceptibles à l'oxydation (Shahidi et Zhong, 2010). Inversement, une teneur en acide oléique importante augmente la résistance comme le montre une corrélation négative entre l'évolution de l'indice de peroxyde à 60 °C et la teneur de l'huile de germoplasmes de soja en acide oléique ($R^2 = -0,82$) (Kamal-Eldin, 2006). Ce résultat a aussi été obtenu pour les huiles d'arachide (O'Keefe et al., 1993), de maïs (Warner et Knowlto, 1997) et de colza (Petukhov et al., 1999).

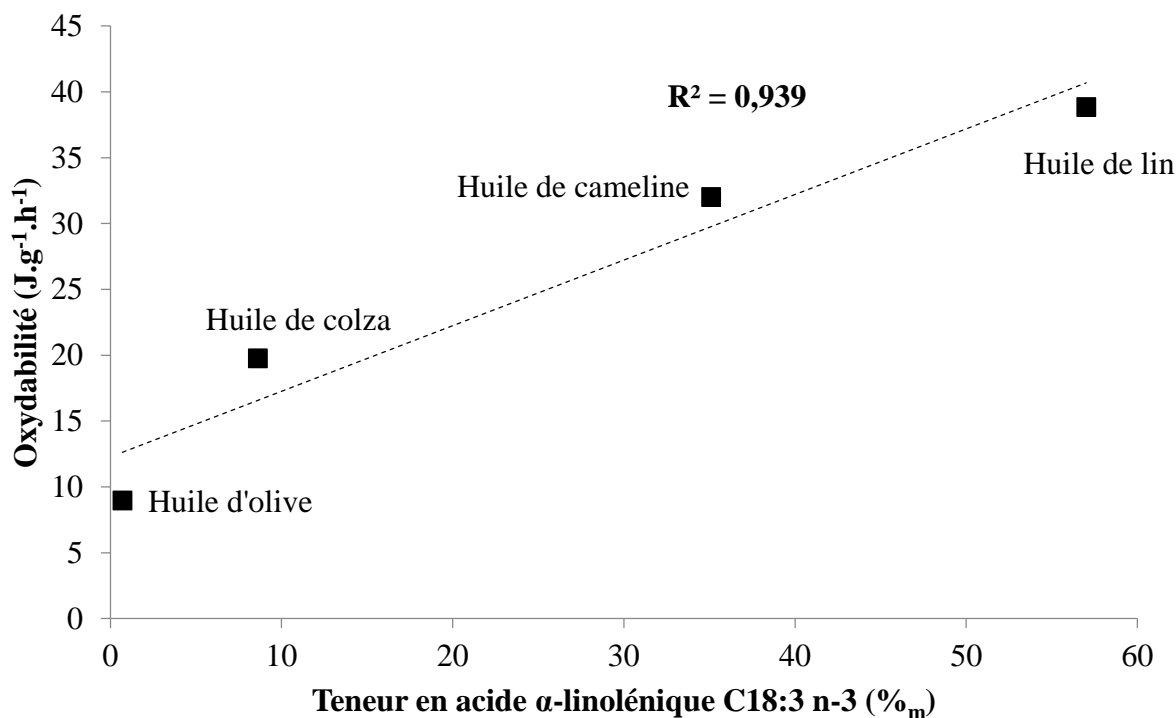


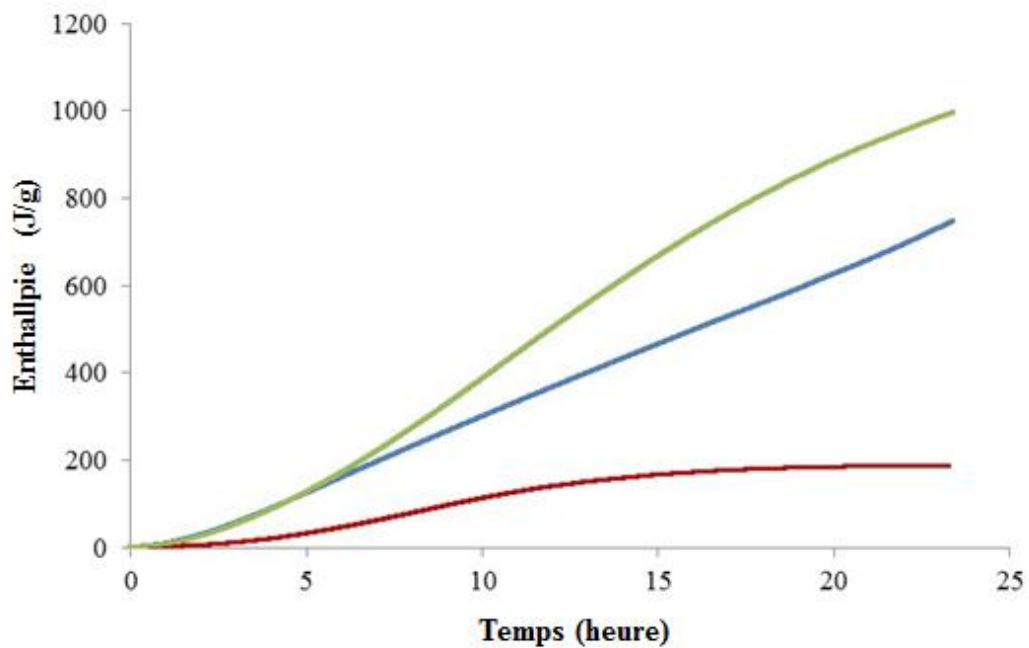
Figure III.6. Corrélation entre l'oxydabilité et la teneur en acide α -linoléique, pour les différentes huiles vierges de lin, cameline, colza et olive, dans des conditions isothermes à 60 °C.

D'autres études ont montré une relation entre l'oxydation des huiles et leurs compositions en acides gras. Raczyk et al. (2016) ont montré à l'aide des techniques Rancimat et DSC que l'huile de cameline (teneur en AGPI n-3 entre 57,10% et 57,95%) est plus résistante à l'oxydation que l'huile de lin (teneur en AGPI n-3 entre 65,26% et 76,35%). De même, des mesures par DSC et Rancimat ont montré que les huiles de grenadille (82,76% d'AGPI) et de graines d'hévéa (88,91% d'AGPI) ont des temps d'induction plus courts que ceux de l'huile de buriti (67,16% d'AGPI) (Pardauil et al., 2011). Les huiles de pépins de raisin, soja, carthame et tournesol ($I_{\text{iode}} > 130$ g de $I_2/100$ g d'huile) présentent des temps d'induction significativement plus courts que ceux pour l'huile de noix de coco, l'oléine de palme raffiné ou l'huile de noyau de palme ($I_{\text{iode}} < 57$ g de $I_2/100$ g d'huile) (Tan et al., 2002). Néanmoins, pour l'huile de sésame, connue pour sa richesse en acides gras insaturés ($I_{\text{iode}} = 109$ g de $I_2/100$ g d'huile), le temps d'induction est comparable aux huiles contenant des taux plus faibles d'acides gras insaturés. Ce résultat est attribué à la présence des antioxydants endogènes de l'huile de sésame (sésamol et sésaminol), en plus des tocophérols (Yoshida, 1994). De même,

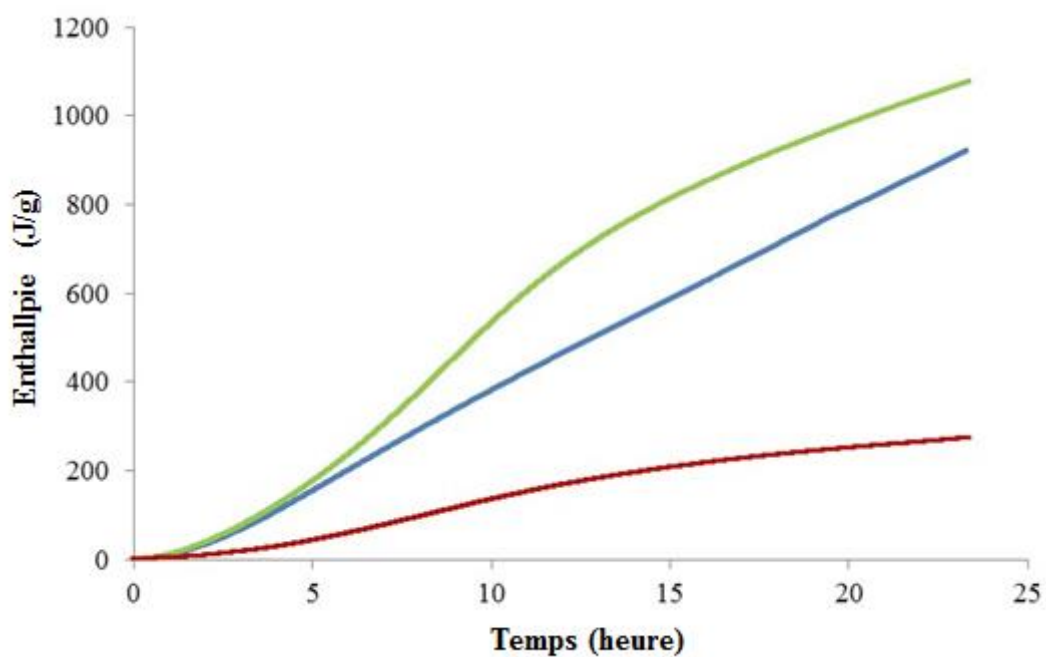
Thurgood et al. (2007) ont montré que la vitesse d'oxydation de l'huile de soja et de la matière grasse laitière en mélange augmente avec le pourcentage des acides gras insaturés.

2.6. Influence de la température sur l'oxydation des huiles

Les Figures III.7A et B représentent l'évolution de l'enthalpie d'oxydation à trois températures comprises entre 40 et 80 °C, pour l'huile de lin et l'huile de cameline, respectivement, dans des coupelles en cuivre. L'augmentation de la température de consigne s'accompagne d'une augmentation de l'enthalpie mesurée.



A



B

Figure III.7. L'évolution de l'enthalpie d'oxydation au cours du temps pour l'huile de lin (A) et l'huile de cameline (B) dans des coupelles en cuivre, dans des conditions isothermes à différentes températures 40 °C (●), 60 °C (●) et 80 °C (●).

Bien que ne disposant que de 3 points expérimentaux, nous avons estimé l'énergie d'activation mise en jeu au cours de la réaction d'oxydation en utilisant la loi d'Arrhenius :

$$V_m = A. e^{\frac{-E_a}{R.T}} \quad (\text{III.2.4})$$

Avec V_m la vitesse moyenne de l'oxydation de l'huile ($\text{J.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ; E_a l'énergie d'activation de la réaction de l'oxydation (J.mol^{-1}) ; A le facteur pré-exponentiel, ayant la même unité que la vitesse ($\text{J.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ; R la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) et T la température (Kelvin).

La Figure III.8 représente la relation entre le logarithme de la vitesse moyenne d'oxydation V_m ($\text{J.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et le rapport $\frac{1}{RT}$. Le tracé permet de déterminer l'énergie d'activation pour les huiles de cameline et de lin, qui correspond à la pente de la courbe.

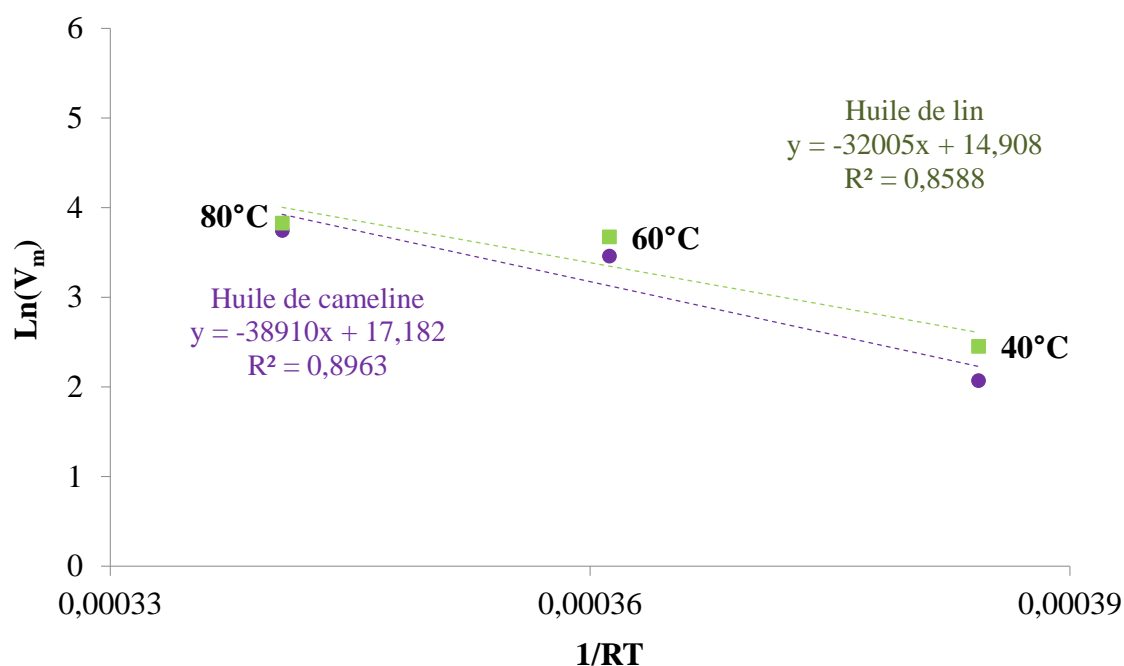


Figure III.8. Détermination de l'énergie d'activation pour l'huile de cameline (◆) et l'huile de lin (■) vierges.

Aux incertitudes expérimentales près, les énergies d'activation des 2 huiles sont comparables et de l'ordre de $35 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour les 2 huiles. Les valeurs d'énergie d'activation obtenues peuvent être comparées avec celles des acides gras : entre 56 et $62 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour l'acide α -linoléique et, 50 à $73 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ pour l'acide linoléique (selon les conditions expérimentales) (Adachi et al., 1995 ; Litwinienko, 2001). Une étude réalisée sur de l'huile de lin reporte une énergie d'activation de formation des hydroperoxydes de $73,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ et de décomposition des hydroperoxydes de $75,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Litwinienko, 2001). On remarque que les valeurs d'énergie d'activation que nous avons obtenues sont nettement inférieures à celles reportées dans la littérature. Ce résultat pourrait s'interpréter par l'effet catalytique du cuivre des coupelles, réduisant l'énergie d'activation de l'étape d'initiation conduisant à la formation des radicaux libres (Jadhav et al., 1996).

En conclusion, le microcalorimètre utilisé dans ce travail constitue une alternative simple et rapide pour comparer plusieurs échantillons d'huile à la fois, à différentes températures, et qui permet de discriminer les différentes huiles, tout en s'affranchissant de l'utilisation de solvants organiques. Les enthalpies d'oxydation mesurées sont bien corrélées à la mesure des diènes conjugués qui apparaissent durant la formation des hydroperoxydes à partir des acides gras insaturés. Les résultats obtenus montrent une forte corrélation positive entre la teneur en acide α -linoléique et l'oxydabilité de l'huile.

3. Etude de l'oxydation des huiles dans les émulsions inverses eau-dans-huile

L'étude de l'oxydation est réalisée sur des émulsions inverses (Eau-dans-Huile) formulées selon le procédé détaillé dans la partie Matériel et Méthodes (cf § II.3.1). Les différentes émulsions étudiées permettent de mettre en évidence et de discuter l'influence des paramètres suivant sur l'oxydation :

- **Composition de la phase aqueuse interne** : plusieurs études sur les émulsions directes ont noté le rôle antioxydant de diverses molécules de la phase aqueuse externe comme les polysaccharides (Chen et al., 2010) ou les agents chélatants (Guzun-Cojocar et al., 2011). En revanche, dans le cas des émulsions inverses où l'eau est dispersée, l'impact de la composition de phase aqueuse est peu étudié (cf § I.3). Dans ce travail de thèse, l'influence de la composition de la phase aqueuse est abordée par la variation de nature des agents chélatants, des molécules ou électrolytes supports et de l'état de valence de fer.
- **Nature de l'huile** : l'intérêt industriel accordé aux émulsions inverses enrichies en lipides d'intérêt nutritionnel tels que les acides gras polyinsaturés de la série n-3 a fait apparaître de nouveaux défis dans le contrôle de l'oxydation de produits tels que les margarines. Dans notre cas, les huiles utilisées ont des teneurs en AGPI n-3 variant de 0,7% pour l'huile d'olive à 57,3% pour l'huile de lin.
- **Composition de l'interface** : c'est un paramètre clé dans le contrôle de l'oxydation des émulsions. Il a été très largement étudié pour les émulsions directes (McClements et Decker, 2000 ; Kiokias et Oreopoulou, 2006 ; Mora-Gutierrez et al., 2010 ; Gudipati et al., 2010 ; Waraho et al., 2011a ; Berton et al., 2011a et b ; Kargar et al., 2011 et 2012 ; Berton et al., 2012 ; Charoen et al., 2012 ; Berton et al., 2013 ; Mosca et al., 2013b). Une fois encore, très peu d'études se sont intéressées au rôle de la région interfaciale dans l'oxydation des émulsions inverses (cf § I.3). Dans ce travail de thèse, l'influence de la composition de l'interface est abordée par la variation de la teneur en PGPR en absence et en présence du sulfate de fer.

- **Fraction volumique de phase dispersée** : l'influence du pourcentage d'eau dispersée dans l'huile a été étudiée par Ambrosone et al. (2002 et 2006a) pour de faibles pourcentages (1,5, 3 et 5%). Dans notre étude nous allons étudier l'effet du pourcentage de la fraction volumique de 40% à 60%.

D'autres paramètres peuvent influencer l'oxydabilité des huiles telle que la taille des gouttes dispersées. Dans le cas des émulsions directes, l'augmentation du diamètre pourrait augmenter l'oxydation (Lethuaut et al., 2002 ; Nakaya, 2005) comme elle pourrait être sans impact (Shimada et al., 1996 ; Osborn et Akoh, 2004 ; Kargar et al., 2011). Dans notre étude, nous avons choisi de travailler avec des diamètres de gouttelettes d'eau dispersées dans l'huile fixes.

La variation de la taille des gouttelettes pour une concentration donnée de tensioactifs fait varier la répartition des tensioactifs entre l'interface et les micelles. Ainsi, la diminution de la taille implique une augmentation de l'aire interfaciale avec plus de tensioactifs à l'interface et moins de tensioactifs libres dans la phase huileuse. Or, la présence de composés amphiphiles libres en phase continue peut modifier les cinétiques d'oxydation lipidique (Chaiyasit et al., 2007). L'influence de la quantité de tensioactifs lipophiles sur l'oxydation a été donc étudiée séparément.

3.1. Formulation et caractérisation physique des émulsions inverses

L'oxydation des huiles en milieu dispersé est dépendante des paramètres structuraux (taille et dispersité des gouttes, fraction volumique, ..) (cf § I.2). De plus, des émulsions instables physiquement sont des systèmes dont les propriétés interfaciales varient, notamment en termes de concentration des molécules tensio-actives en interaction avec l'huile, pouvant aussi moduler les réactions d'oxydation (cf § I.2). Afin de s'affranchir de ces variations, nous avons choisi des tensioactifs qui seuls ou en mélange sont connus pour stabiliser les émulsions inverses et une composition de phase aqueuse limitant le mûrissement d'Ostwald. Les critères de stabilité physique choisis sont un maintien de la taille des gouttes, évalué par la mesure du diamètre moyen des gouttes d'eau et leur distribution par granulométrie et des observations par microscopie optique. Nous faisons l'hypothèse que si ces critères n'évoluent pas au cours du temps de l'étude des émulsions, la composition de l'interface ne varie pas de manière significative.

Pour notre étude, la stabilité physique doit être maintenue sur une période de 72 h, à une température de 60 °C, correspondant, respectivement, au temps le plus long et à la température la plus élevée appliquée.

3.1.1. Critères de choix des tensioactifs lipophiles

Les émulsions inverses étudiées sont formulées en utilisant un mélange de tensioactifs lipophiles : le PGPR et les DMG. Compte-tenu des restrictions citées dans le paragraphe I.2.1.2, l'élimination totale ou partielle du PGPR des produits alimentaires est envisagée. Dans ce contexte, nous avons examiné la possibilité de remplacer tout ou une partie du PGPR par un autre tensioactif qui serait aussi efficace pour la stabilisation des émulsions inverses, peu cher et acceptable en termes réglementaires. Le choix s'est orienté vers les monoglycérides distillés qui est plus toléré dans les aliments (cf § I.2.1.2), dérivés de l'hydrolyse partielle de matières grasses d'origine végétale. Ces tensioactifs, sont largement utilisés dans la fabrication de la margarine et des viennoiseries. Par ailleurs, un certain nombre d'études reportent leur utilisation en association avec le PGPR pour la stabilisation des émulsions inverses (Benichou et al., 2001 ; Amadei, et al., 2014). Les DMG étant nettement moins performants que le PGPR pour la stabilisation des émulsions, un compromis doit être trouvé en termes de proportions relatives de ces 2 tensioactifs.

3.1.2. Critère de choix de la taille des gouttes

La diminution du diamètre d'une émulsion augmente la surface totale de contact entre l'huile et l'eau. En se basant uniquement sur ce constat, la diminution du diamètre des émulsions devrait augmenter l'oxydation des lipides (McClements et Decker, 2000). A notre connaissance, les seules études réalisées sur l'influence de la taille des gouttelettes d'une émulsion sur l'oxydation des lipides concernent les émulsions directes huile-dans-eau. Les résultats obtenus sont contradictoires.

Certaines études montrent que la stabilité oxydative d'une émulsion diminue quand la taille des gouttelettes augmente. Cela a été montré pour une émulsion à base d'huile de tournesol stabilisée par de l'albumine et pour des tailles de gouttes variant de 0,5 µm à 30 µm aux stades précoces de l'oxydation et quand l'oxygène n'est pas le facteur limitant (Lethuaut

et al., 2002) ou des émulsions à base d'huile de soja ou d'huile de poisson, stabilisées par des sucroesters et pour des tailles de gouttes de 0,8 μm à 12,8 μm (Nakaya, 2005).

Plusieurs autres études montrent que le diamètre des gouttes de l'émulsion n'influence pas l'oxydation des lipides. On peut citer l'exemple des émulsions à base d'huile de soja, stabilisées par différents polysaccharides, avec des diamètres de gouttes entre 7 μm et 21 μm (Shimada et al., 1996). Osborn et Akoh (2004) ont obtenu le même résultat pour des émulsions (acide caprylique + huile de colza)-dans-eau. Plus récemment, Kargar et al. (2011) ont montré que pour des émulsions directes huile de tournesol-dans-eau stabilisées par le caséinate de sodium et le Tween 20, la taille des gouttes n'a pas d'effet sur l'oxydation.

Les résultats obtenus semblent très dépendants de la formulation des émulsions et des conditions expérimentales (produits d'oxydation mesurés, quantité d'oxygène disponible), ce qui pourrait expliquer l'absence de tendance nette concernant l'influence de la taille des gouttes. Dans le cadre de ce travail de thèse, ce paramètre est gardé constant avec une cible de 1 μm pour le diamètre moyen des gouttelettes d'eau dans l'huile.

3.1.3. Critères de choix de la composition de la phase aqueuse

Il est important d'utiliser une molécule ou un électrolyte support dans la phase aqueuse afin d'assurer la stabilité physique des émulsions eau-dans-huile. En effet, une émulsion inverse à base uniquement d'eau distillée ne présente pas de stabilité physique. La présence de soluté dans les gouttelettes internes est nécessaire afin d'inhiber les phénomènes de déstabilisation tels que le mûrissement d'Ostwald (Kabanov, 2001) et la coalescence (Aronson et Petko, 1993). Dans notre étude, le choix s'est porté sur le chlorure de sodium et le glucose, car ces molécules sont largement ajoutés aux émulsions alimentaires commercialisées en tant qu'ingrédients conservateurs (i.e., chlorure de sodium) (Henney et al., 2010 ; Liem et al., 2011) ou édulcorants (i.e., glucose et fructose) (Welsh et Cunningham, 2011). La pression osmotique des solutions aqueuses a ainsi été maintenue constante sur l'ensemble des expériences.

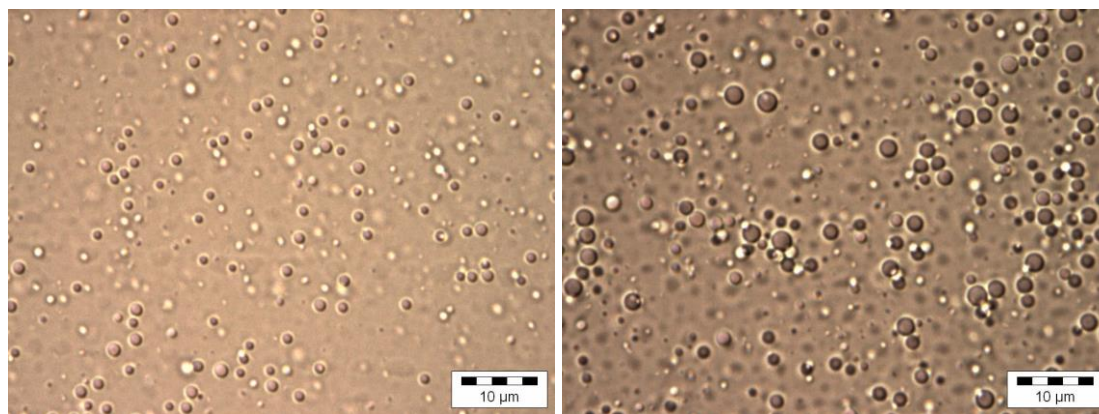
Nous avons aussi fait varier la nature de la phase aqueuse interne en ajoutant du fer sous forme de sulfate, de chlorure, de gluconate ou de lactate ou du cuivre sous forme de sulfate. Le choix d'incorporer du fer se justifie par son importance nutritionnelle en tant qu'oligoélément minéral essentiel. Habituellement consommé sous forme de sulfate de fer, sa déficience peut causer la réduction des performances mentale et physique chez l'individu (Walter et al., 1997 ; Halterman et al., 2001). Il est donc important d'enrichir les aliments afin de couvrir les besoins et éviter les carences alimentaires en fer, notamment (Walter et al., 2004 ; Huma et al., 2007). Bien que les carences en cuivre chez l'Homme soient moins fréquentes que celle en fer, le cuivre est un élément essentiel dans tous les systèmes biologiques (Stern et al., 2007). C'est pourquoi nous l'avons aussi testé. En contre partie, comme nous l'avons mentionné, le fer et le cuivre sont des catalyseurs de l'oxydation lipidique (cf § I.5.3).

3.1.4. Etude de la stabilité physique des émulsions inverses

Sur la base des critères de choix discutés précédemment, nous avons choisi d'étudier des émulsions inverses formulées avec :

- Un mélange 1:1 (% en poids de PGPR et de DMG), ce pourcentage a été sélectionné comme meilleur compromis pour limiter la teneur en PGPR tout en maintenant la stabilité des émulsions ;
- Un diamètre moyen des gouttes d'eau centré sur 1 μm , étant entendu que plus les gouttes sont fines, plus l'émulsion est stable physiquement. D'autre part, il s'agit d'une taille couramment rencontrée dans les émulsions alimentaires ;
- Une composition de phase aqueuse contenant un électrolyte ou une molécule support (chlorure de sodium ou glucose) et, éventuellement, des molécules pro-oxydantes (à savoir différents sels de fer ou de cuivre).

Dans un premier temps, on note l'importance de la pression osmotique des gouttelettes d'eau, évoquée précédemment, sur la stabilité physique. En effet, en absence du chlorure de sodium, et en présence de 0,005 M de FeSO_4 uniquement, nous remarquons une augmentation significative du diamètre moyen des gouttes de l'émulsion inverse au bout de quelques heures de stockage (Figure III.9), vraisemblablement en raison du mûrissement d'Ostwald.



A

B

Figure III.9. Emulsion inverse eau-dans-huile de colza raffinée (1,5% de PGPR, 1,5% de DMG dans la phase lipophile), 40% eau (0,005 M FeSO_4). A : Emulsion juste après préparation ; B : Emulsion après 10 heures de stockage à 25 °C.

La Figure III.10A ci-dessous représente un cliché microscopique typique d'une émulsion eau-dans-huile, préparée à base d'huile de colza raffinée, juste après préparation. La phase aqueuse contient cette fois du NaCl à 0,1 M. Les gouttes d'eau sont distribuées d'une façon homogène dans la phase huileuse avec un diamètre moyen des gouttes centré sur 1 μm (Figure III.10B). Cette distribution de taille est maintenue après 72 heures de stockage à 25 °C (Figures III.11A et III.11B) et à 60 °C (Figures III.12A et III.12B).

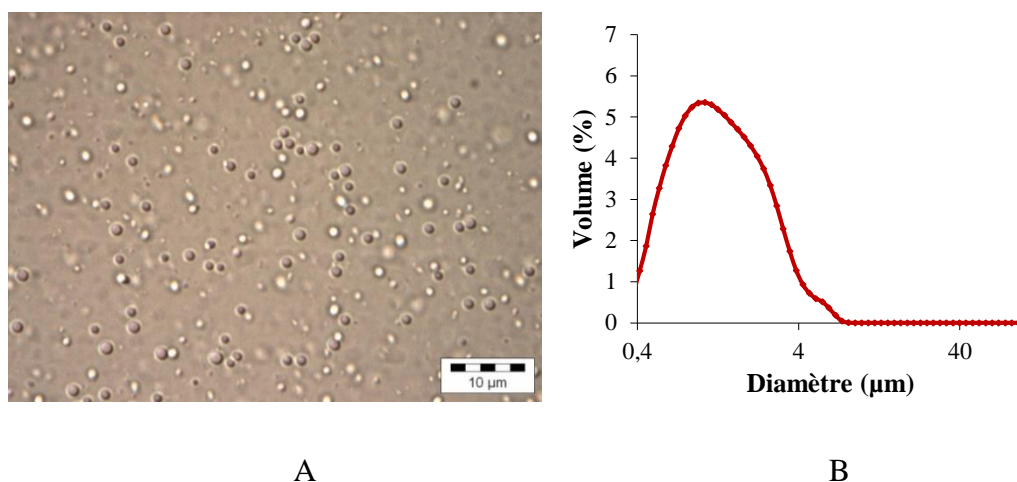


Figure III.10. Emulsion inverse eau-dans-huile de colza raffinée (2% de PGPR, 2% de DMG dans la phase lipophile), 40% phase aqueuse (0,1 M NaCl), juste après préparation.

A : cliché de microscopie optique ; B : profil granulométrique.

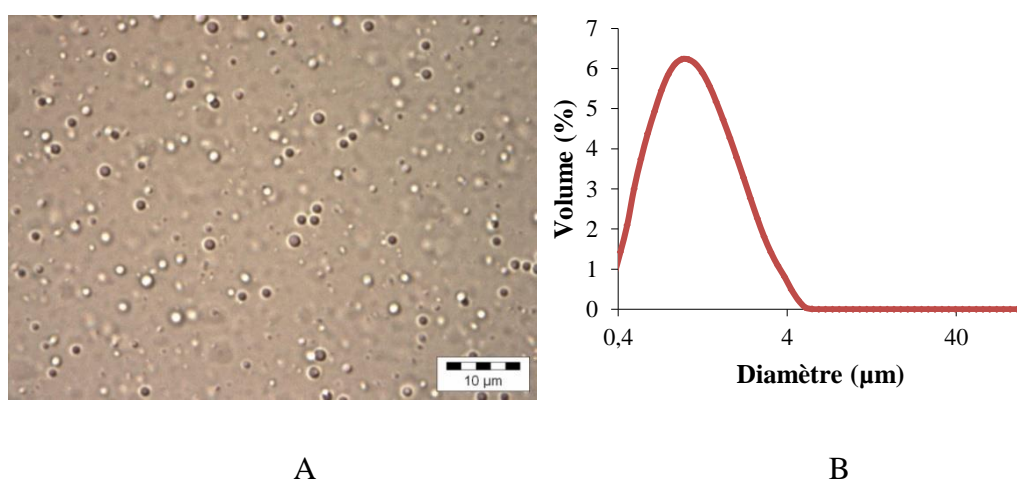


Figure III.11. Emulsion inverse eau-dans-huile de colza raffinée (1,5% de PGPR, 1,5% de DMG dans la phase lipophile), 40% phase aqueuse (0,1 M NaCl), après stockage à 25 °C.

A : cliché de microscopie optique ; B : profil granulométrique.

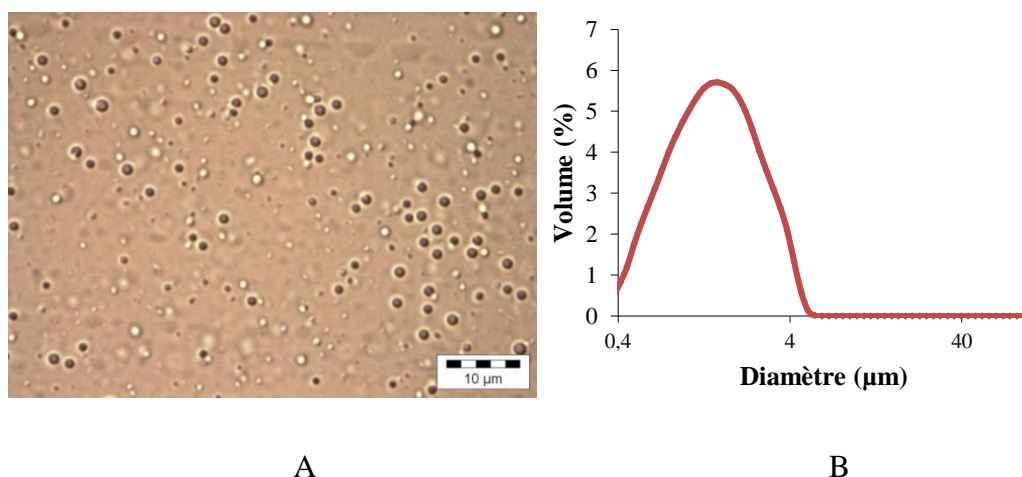


Figure III.12. Emulsion inverse eau-dans-huile de colza raffinée (2% de PGPR, 2% de DMG dans la phase lipophile), 40% phase aqueuse (0,1 M NaCl), après stockage à 60 °C.

A : cliché de microscopie optique ; B : profil granulométrique.

On note qu'il est possible de diminuer la quantité de tensioactifs à 1,5% pour chaque émulsifiant lorsque la température de stockage est abaissée à 25 °C. Si les tensioactifs ne sont pas présents en quantité suffisante pour stabiliser les gouttelettes, l'émulsion peut se déstabiliser par coalescence (McClements et Weiss, 2005). De plus, la fréquence de collisions est un phénomène thermiquement activé (i.e. soumis à une barrière d'énergie) et donc l'augmentation de température a tendance à l'accélérer.

Il est intéressant de noter que le comportement de l'émulsion inverse à base d'huile de colza raffinée est retrouvé de manière similaire pour toutes les huiles vierges, utilisées dans ce travail de thèse. Cela sous-entend que les composés tensioactifs naturellement présents dans les huiles vierges (mono et di glycérides, phospholipides, acides gras libres, hydroperoxydes) (Choe et Min, 2006), qui en plus peuvent être de nature différente en fonction des huiles (olive, colza ...) ne perturbent pas la stabilisation du film interfacial entre les gouttelettes par le PGPR et les DMG.

3.2. Etude de l'oxydation des émulsions inverses par la teneur en diènes conjugués

Au cours de cette étude, les échantillons sont stockés pendant 72 heures à 25 °C ou 60 °C, à l'obscurité dans des flacons en verre. La température de suivi de l'oxydation dépend de la composition de la phase aqueuse de l'émulsion inverse :

- Pour les émulsions dont l'oxydation est étudiée à 60 °C, la phase aqueuse contient du chlorure de sodium et le facteur activant l'oxydation est la température.
- Pour les émulsions dont l'oxydation est étudiée à 25 °C, la phase aqueuse contient du chlorure de sodium et des métaux de transition (des sels de fer ou de cuivre) pro-oxydants.

Certaines phases aqueuses contiennent du glucose (0,2 M ou 0,4 M) qui, étant une molécule électriquement neutre, ne contribue pas à la force ionique. Il sera ainsi possible d'évaluer l'influence de la force ionique sur l'effet pro-oxydant du sulfate de fer, selon que la solution support contiendra du glucose ou du NaCl.

L'étude de l'oxydation des huiles émulsionnées est réalisée par la mesure de la teneur en diènes conjugués comme précédemment réalisée sur les huiles vierges et raffinées en phase continue. Au niveau expérimental, cela nécessite une centrifugation préalable afin de séparer la phase huileuse et la phase aqueuse. La présence de PGPR perturbe la mesure des diènes car il absorbe à 233 nm, d'où la nécessité de soustraire son absorbance au cours des mesures (cf § II.4.2.1 du Matériel et Méthodes).

3.2.1. Etudes préliminaires

3.2.1.1. Influence de la quantité d'oxygène disponible

La réaction d'oxydation lipidique est basée sur la fixation de l'oxygène sur une chaîne aliphatique insaturée. Or, nous avons choisi d'étudier l'oxydation dans des flacons en verre fermés, notamment pour éviter les phénomènes d'évaporation dans le cas de l'étude des émulsions inverses. Il est donc important de s'assurer que l'oxygène n'est pas le facteur limitant de la réaction d'oxydation. En effet, dans ce cas, il est possible d'observer une éventuelle modification des cinétiques, pouvant se substituer à l'effet des paramètres de

formulation sur la peroxydation des échantillons. L'importance de la quantité d'oxygène disponible a été reportée dans plusieurs études (Maté et al., 1996 ; Andersson et Lingnert, 1998 ; Fujisaki et al., 2000) et que la réduction de la teneur en oxygène est un moyen efficace pour retarder l'oxydation lipidique (McClements et Decker, 2000 ; Choe et Min, 2006 ; Chen et al., 2011).

La Figure III.13 présente les cinétiques d'oxydation de 3 huiles en phase continue stockées à 60 °C et d'une émulsion inverse stockée à 25 °C, à travers la mesure de la teneur en diènes conjugués. Quels que soient les systèmes étudiés, il n'y a pas de différence significative entre les courbes obtenues avec des flacons ouverts et des flacons fermés. Ce résultat suggère que, dans nos conditions expérimentales, l'oxygène n'est pas le facteur limitant des réactions d'oxydation. D'après McClements et Decker (2000), l'oxygène est environ trois fois plus soluble dans les huiles que dans l'eau, et donc il y a toujours une quantité d'oxygène suffisante dans l'huile pour assurer l'oxydation des lipides, à moins que des conditions spécifiques aient été adoptées pour l'éliminer (ex : bullage à l'azote). En plus de l'oxygène soluble dans l'huile, il y a aussi l'oxygène présent dans la phase gaz du flacon. La suite de cette étude sera donc réalisée avec des flacons fermés.

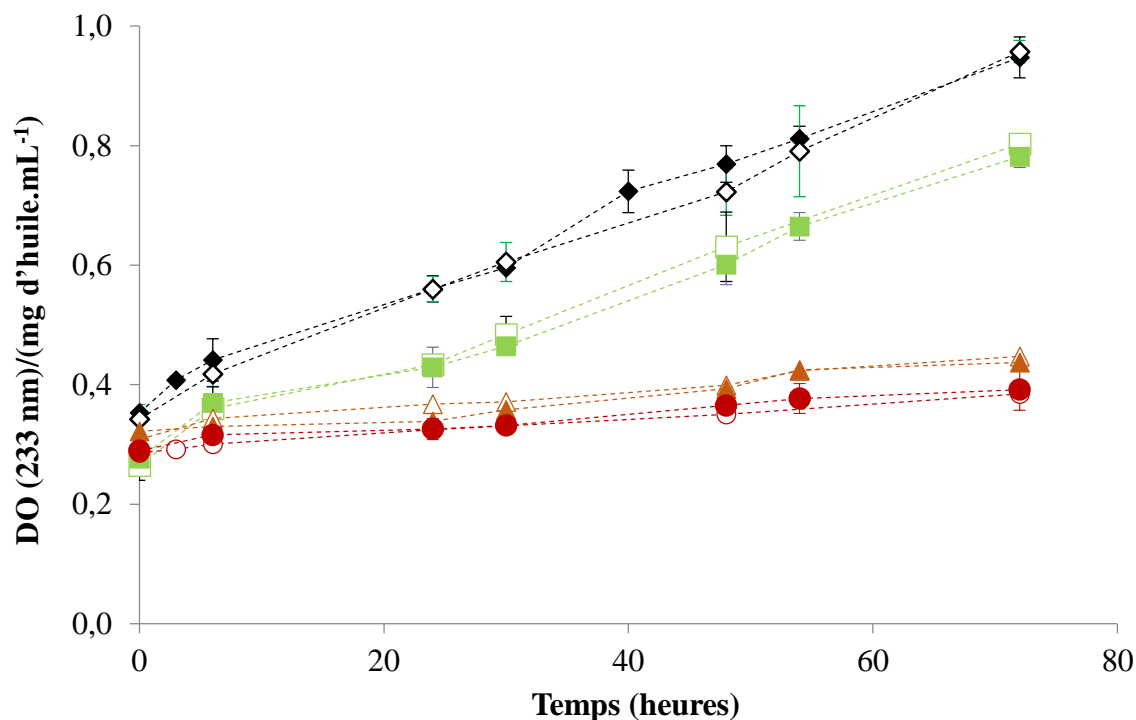


Figure III.13. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, pour des expériences réalisées dans des flacons en verre fermés (symboles creux) et ouverts (symboles pleins), pour différentes huiles en phase continue stockées à 60 °C, et pour une émulsion inverse à base d'huile de colza raffinée stockée à 25 °C (40% phase aqueuse, 0,1 M NaCl et 0,005 M FeSO₄, 1,5% PGPR, 1,5% DMG) ; (émulsion (◆) ; huile de lin (■) ; huile de colza raffinée (▲) ; huile d'olive (●)).

3.2.1.2. Influence de l'agitation de l'huile

L'émulsification est réalisée à l'aide d'un homogénéisateur qui applique un cisaillement bien défini, assurant la dispersion de l'eau dans la phase lipophile. Cette opération n'est pas réalisée sous flux d'azote, et donc de l'oxygène peut être incorporé pendant la formation de l'émulsion, ce qui peut favoriser la peroxydation des lipides. Afin de distinguer l'impact du procédé d'émulsification utilisé lors de notre étude de celui des paramètres de formulation, sur l'oxydation de l'huile, les huiles en phase continue sont soumises à une agitation (15 minutes) à l'air libre. La Figure III.14 montre que, pour un temps donné, la concentration en diènes conjugués pour les huiles agitées est toujours légèrement supérieure, mais toutefois de manière

statistiquement significative, à celle des huiles non agitées quelle que soit l'huile utilisée. Ainsi, malgré la courte durée du temps d'agitation (15 minutes), l'oxygène incorporé dans l'ensemble de l'échantillon favorise l'oxydation des huiles. Ce résultat contredit celui d'Ambrosone et al. (2006b) qui ont observé que l'indice de peroxyde de l'huile d'olive vierge ne varie pas après un processus de 45 min d'agitation par Ultra Turrax. Horn et al. (2012) ont aussi montré que l'oxydation des émulsions directes d'huile de foie de morue-dans-eau stabilisées par le caséinate de sodium n'est pas affectée par l'homogénéisation (microfluidiseur et homogénéisateur à deux étages), alors que le type d'équipement utilisé pour l'homogénéisation influence significativement l'oxydation quand les émulsions sont stabilisées par les protéines sériques. Dans ce cas, les émulsions préparées en utilisant l'homogénéisateur à deux étages s'oxydent plus que celles préparées avec le microfluidiseur. Malgré ce résultat, les émulsions inverses étudiées dans ce travail de thèse n'ont pas été réalisées sous flux d'azote.

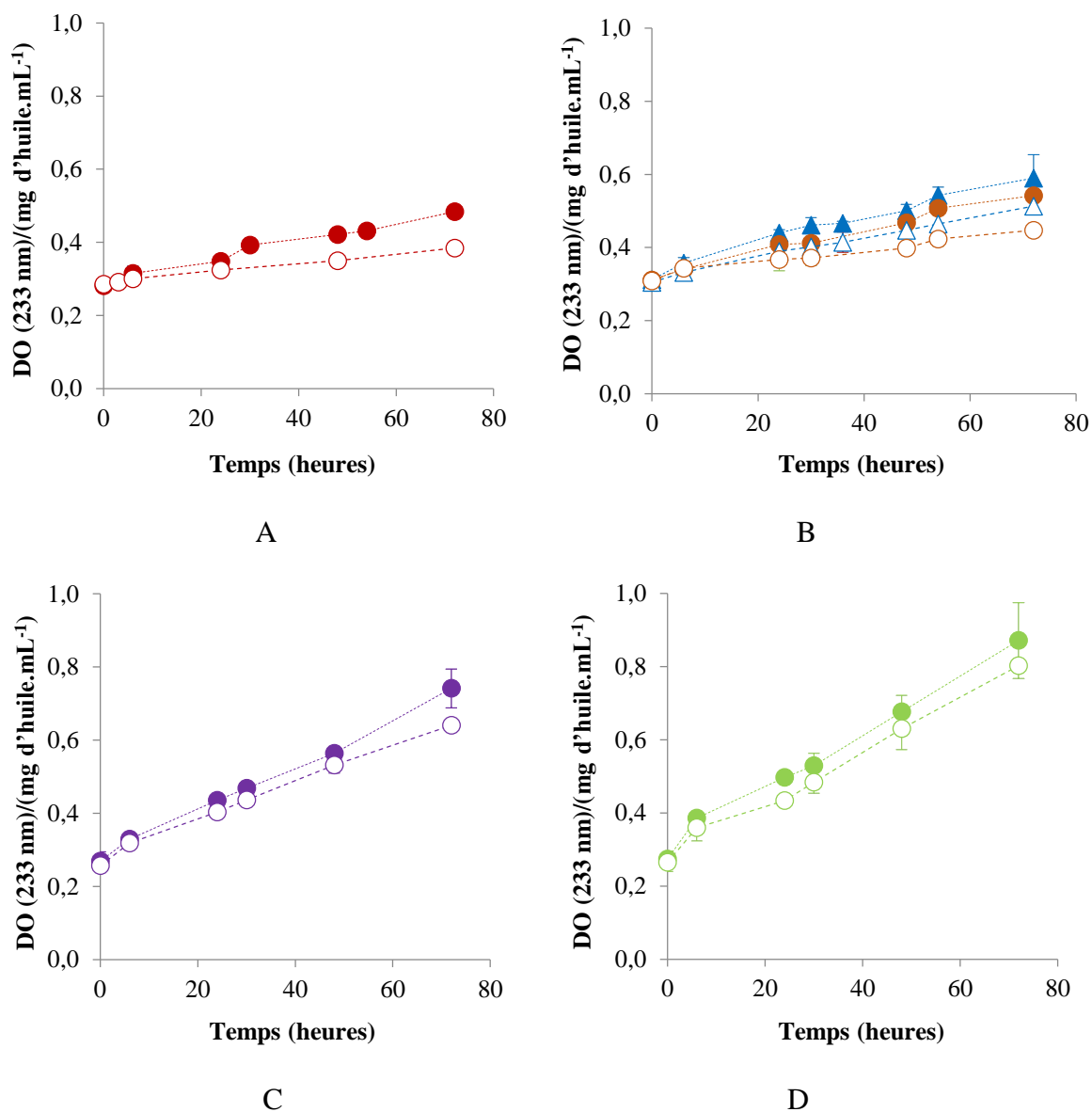


Figure III.14. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, pour les huiles d'olive (A), colza vierge (▲) et raffinée (●) (B), cameline (C), et lin (D), non agitées (symbole creux) et agitées (symbole plein) et stockées à 60 °C.

3.2.1.3. Influence de l'ajout de tensioactifs lipophiles dans l'huile en phase continue

La Figure III.15 montre que l'incorporation des tensioactifs lipophiles PGPR et DMG à différentes concentrations dans l'huile de colza raffinée en phase continue n'influence pas l'oxydation des lipides. Alors qu'aucune étude ne s'est intéressée à l'effet du PGPR sur l'oxydation de l'huile, quelques études ont étudié l'effet des monoglycérides. Les mono et diglycérides saturés et insaturés possèdent une activité pro-oxydante dans l'huile de soja purifiée (Mistry et Min, 1988).

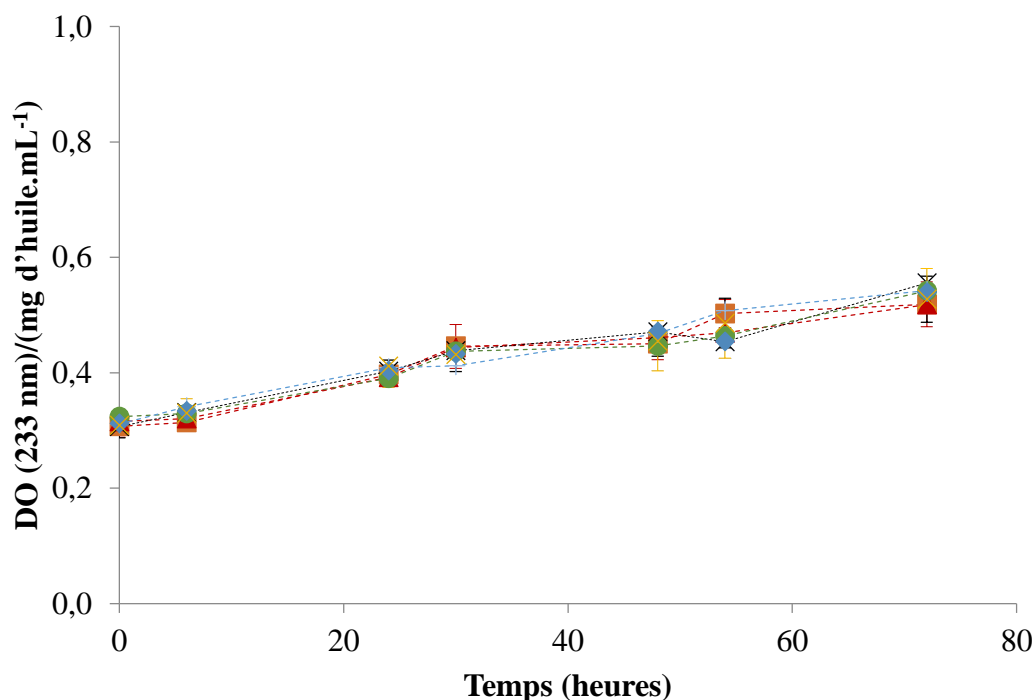


Figure III.15. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, pour différentes concentrations en PGPR dans l'huile de colza raffinée, stockées à 60 °C ; (2% PGRP-2% DMG (◆) ; 1% PGPR (■) ; 2% PGPR (▲) ; 3% PGPR (x) ; 5% PGPR (x) ; 5% DMG (●) ; témoin (+)).

3.2.1.4. Influence de la fraction volumique d'eau dans l'huile

L'influence de la fraction volumique est étudiée sur la plage 0 à 60% pour des émulsions inverses à base de différentes huiles, stockées à 60 °C (Figure III.16A, B et C, respectivement).

Les Figures III.16A et B comparent, pour différentes huiles, la cinétique d'oxydation des systèmes en phase continue (ayant préalablement été agités pendant 15 minutes) et en émulsion inverse (contenant 40% d'eau avec 0,1 M NaCl). Quelle que soit l'huile utilisée, l'introduction de gouttelettes d'eau à une fraction volumique de 40% ne modifie pas de manière significative la cinétique d'oxydation sur la période de temps étudiée. Selon Fritsh (1994), ce résultat résulterait du fait que seule la surface de l'huile est exposée directement à l'oxygène dans les émulsions eau-dans-huile, de sorte que la présence d'eau n'influencerait pas l'oxydation de l'huile. Aussi, l'augmentation du pourcentage d'eau dispersée dans la phase huileuse de l'émulsion à 50% et 60% n'a pas d'effet sur la cinétique d'oxydation, pour les huiles de colza raffinée et d'olive vierge (Figure III.16C).

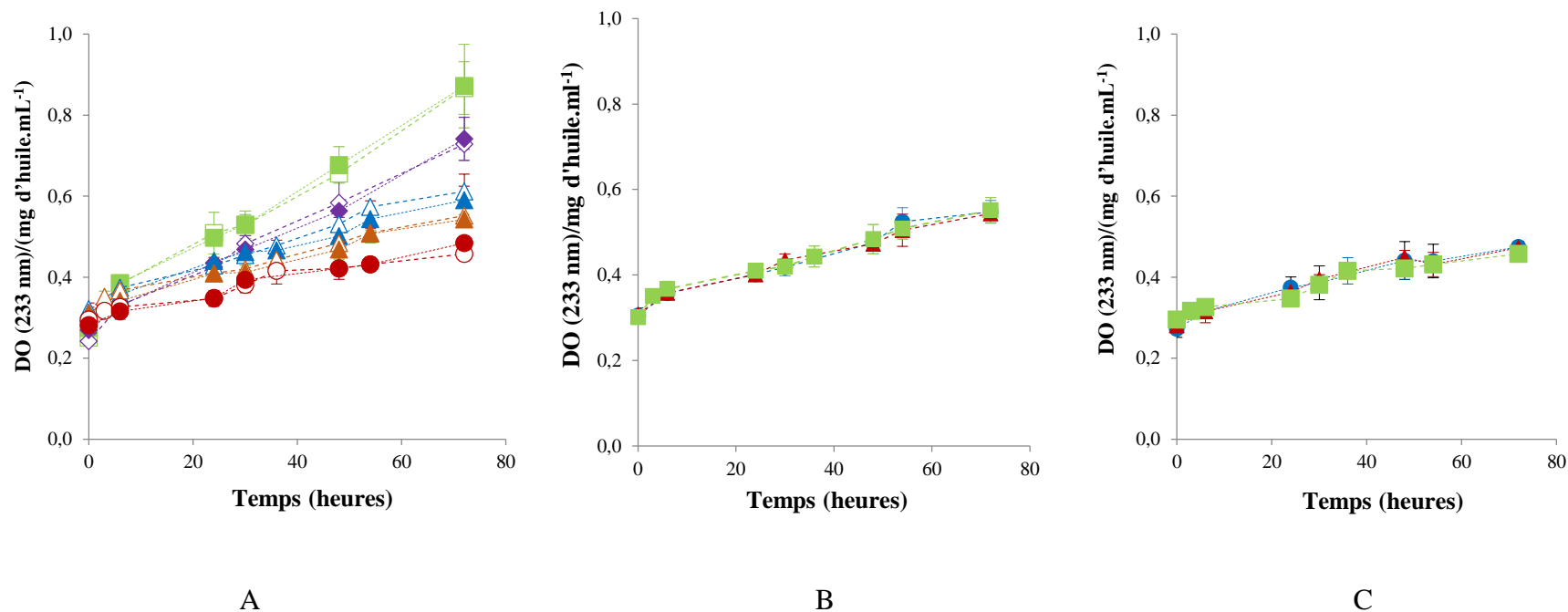


Figure III.16. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 60 °C : pour les huiles de lin (■), de cameline (◆), de colza vierge (▲) et raffinée (▲) et d'olive (●) agitées (symboles pleins), et émulsionnées (40% eau, 0,1 M NaCl, 2% PGPR et 2% DMG) (symboles creux) (A) ; pour les émulsions contenant différents pourcentages de phase aqueuse (40% (■) ; 50% (●) et 60% (▲)) (0,1 M de NaCl, 2% PGPR et 2% DMG) dispersés dans l'huile de colza raffinée (B) et dans l'huile d'olive vierge (C).

Nos résultats ne sont pas en accord avec d'autres études montrant une influence de la teneur en eau. Même si les résultats des études de la littérature sont contradictoires, toutes les interprétations reposent sur le fait que les hydroperoxydes sont des composés dotés d'une activité interfaciale, ce qui les fait accumuler à l'interface eau-huile des émulsions (Ambrosone et al., 2007 ; Mosca et al., 2008 et 2013a). D'une part, Ambrosone et al. (2002 et 2006a) montrent que l'incorporation de faibles pourcentages d'eau (1,5 ; 3 et 5%) dans l'huile, diminue l'oxydation de l'huile d'olive vierge, suivie par l'indice de peroxyde et la teneur en polyphénols, jusqu'à une fraction volumique d'eau égale à 2%. Les émulsions sont formées sans ajout de tensioactifs lipophiles et des composés mineurs tels que le tyrosol et le hydroxytyrosol présents dans l'huile d'olive permettent de stabiliser l'émulsion. Dans ce cas, l'accumulation des hydroperoxydes à la surface eau-huile de l'émulsion diminuerait leur accessibilité comme réactifs des réactions de propagation. A l'inverse, Yi et al. (2014) indiquent que l'oxydation dans une émulsion eau-dans-huile à base d'huile de noix, stabilisée à l'aide de PGPR et contenant 2% d'eau (solution tampon phosphate à 20 mM) est plus importante que dans une huile brute de même nature. L'accumulation des hydroperoxydes à l'interface eau-huile favoriserait leur interaction avec les composés pro-oxydants hydrosolubles (naturellement présents dans cette étude). De même, Mosca et al. (2010) ont constaté que l'oxydation des émulsions eau-dans-huile d'olive stabilisées par des tensioactifs non ioniques (Span 80 et Tween 80) est plus marquée que pour les huiles en phase continue, pour des systèmes stockés à 40 °C et contenant un radical lipophile (2,2'-Azobis (2,4-diMéthylValéroNitrile), AMVN) comme agent pro-oxydant. Dans cette étude, la zone interfaciale eau-huile agirait comme une zone d'accumulation des radicaux libres présents dans l'huile. Nous pouvons néanmoins remarquer que, dans les deux dernières publications, l'augmentation de l'oxydation observée pourrait être liée au procédé d'émulsification mais cette vérification n'a pas été faite.

Dans notre cas, on peut envisager deux hypothèses pour expliquer le résultat obtenu :

- Le mélange PGPR-DMG ne permet pas l'accumulation des hydroperoxydes à l'interface eau-huile de l'émulsion. Nous reviendrons sur l'organisation de ces tensioactifs aux interfaces (§ III.3.2.4).
- Les hydroperoxydes s'accumulent à l'interface stabilisée par le mélange PGPR/DMG, mais restent accessibles comme substrat d'oxydation de la même façon que dans les huiles en phase continue.

Dans la suite de notre étude, les émulsions inverses ont été formulées avec une fraction volumique d'eau de 40%.

3.2.2. Influence de la composition de la phase aqueuse

Dans cette partie, nous nous intéressons à l'encapsulation de métaux de transition (fer et cuivre) avec un double objectif :

- Evaluer l'impact de l'encapsulation de ces molécules pro-oxydantes hydrosolubles sur l'oxydation des huiles en émulsion inverse.
- Préconiser une forme d'apport du fer dans le cadre des stratégies d'enrichissement d'aliments à base d'émulsions inverses comme les margarines.

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet de l'encapsulation du fer, sur l'oxydation des lipides dans des émulsions directes (Choi et al., 2009 ; Guzun-Cojocar et al., 2011 ; Gupta et al., 2015). A notre connaissance, la seule étude réalisée avec des émulsions inverses contenant du fer ou du cuivre est celle de Stathopoulos et al. (2009) qui a étudié l'effet de l'encapsulation du zinc, cuivre, et fer sur l'oxydation des produits tartinables à faible teneur en graisse à base d'un mélange d'huiles végétales. La mesure de l'indice de peroxyde a montré que l'encapsulation de ces métaux augmente l'oxydation en fonction de la concentration de l'ion métallique, selon l'ordre suivant $Fe^{3+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$ (cf § I.3.2).

3.2.2.1. Influence de la concentration en fer dans la phase aqueuse

Les études sont menées à la température constante de 25 °C afin de ne pas coupler l'effet de la formulation et de la température. La Figure III.17 présente l'influence de la concentration en sulfate ferreux encapsulé dans les gouttes aqueuses des émulsions à base d'huile de colza raffinée : plus la concentration en fer encapsulé est élevée, plus l'oxydation des lipides est importante. Ce résultat suggère que les tensioactifs présents à l'interface n'empêchent pas le contact des ions ferreux Fe^{2+} avec les molécules lipidiques de la phase continue. Charoen et al. (2012) ont observé une tendance similaire dans les émulsions directes huile de son de riz-dans-eau, Guzun-Cojocar et al. (2011) pour des émulsions huile de colza-dans-eau et Kargar et al. (2011) pour des émulsions huile de tournesol-dans-eau. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer ce résultat : soit une solubilisation partielle du sulfate ferreux dans la phase huileuse (à l'état moléculaire ou dans des micelles de tensioactifs) ou une facilité d'accès des

ions métalliques pro-oxydants à l'interface eau-huile, à proximité immédiate du substrat lipidique.

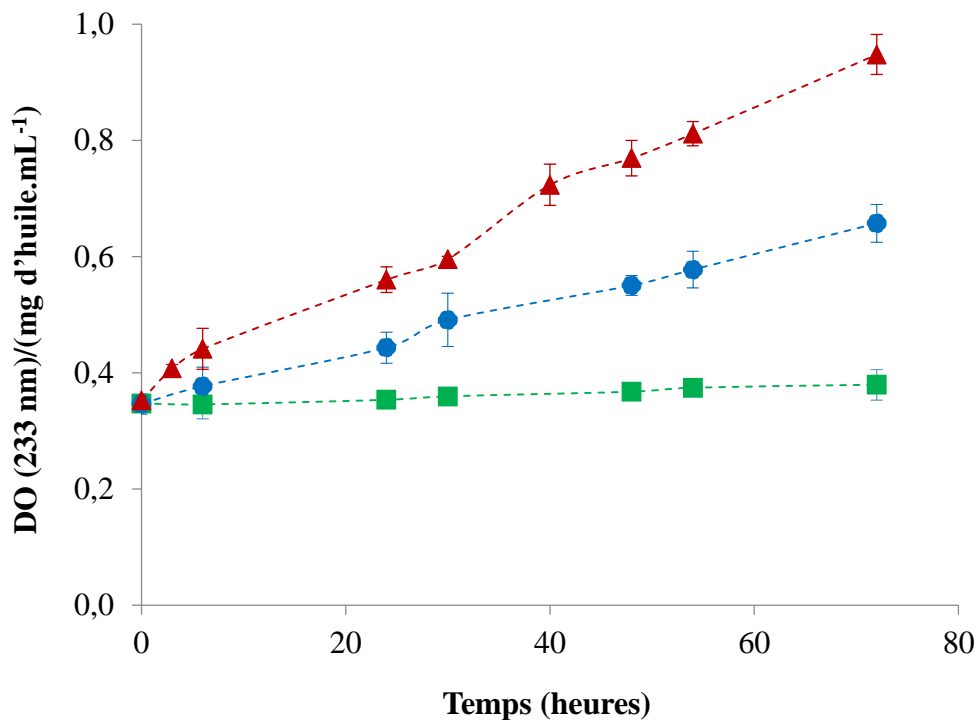


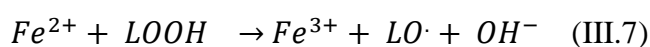
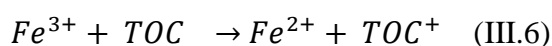
Figure III.17. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour différentes concentrations de sulfate de fer (0 M (■) ; 0,002 M (●) et 0,005 M (▲)) dans la phase aqueuse, (émulsions à base d'huile de colza raffinée, 0,1 M de NaCl, 40% phase aqueuse avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG).

3.2.2.2. Influence de l'état de valence de fer

Des solutions de chlorure ferreux et ferrique à la même concentration ($5 \cdot 10^{-3}$ M) sont utilisées pour la formulation d'émulsions à base d'huile de colza raffinée, afin d'étudier l'impact de l'état de valence du fer. La force ionique des gouttes aqueuses est similaire pour les deux émulsions et fixée principalement grâce à l'électrolyte support (0,1 M NaCl). L'évolution de la teneur en diènes conjugués dans les deux systèmes, pendant 72 heures à 25 °C, est comparable, quelle que soit la charge des ions fer encapsulés dans la phase aqueuse

(Figure III.18). En revanche, certaines études réalisées sur l'acide linoléique en émulsion dans l'eau contenant des ions de fer à une concentration égale à $3,3 \cdot 10^{-3}$ M, à pH 7, montrent que l'activité catalytique du Fe^{2+} est plus importante que celle du Fe^{3+} (Wills, 1965). De même O'Brien (1969) a montré que l'ion ferreux (Fe^{2+}) est beaucoup plus efficace pour décomposer les hydroperoxydes d'acide linoléique dispersés dans l'eau que l'ion ferrique (Fe^{3+}).

D'après Chen et al. (2011), les α -tocophérols présents dans l'huile ont l'aptitude de réduire les ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} selon la réaction (III.6) :



Dans les émulsions eau-dans-huile, les α -tocophérols présents dans l'huile peuvent se mettre à l'interface eau-huile grâce à leurs propriétés interfaciales (Mosca et al., 2008a).

Ceci pourrait identiquement expliquer notre résultat, sachant que les phases huileuses utilisées par Wills (1965) et O'Brien (1969) étaient purifiées et donc ne contenaient pas de tocophérols.

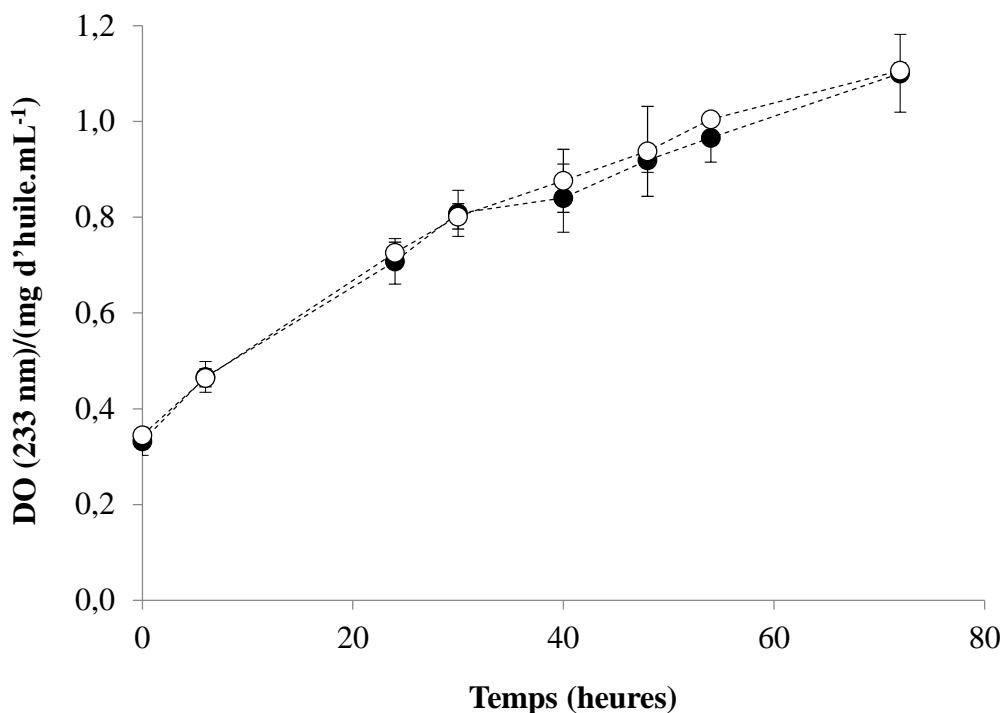
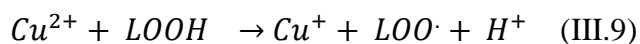
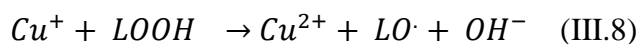


Figure III.18. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour deux émulsions contenant respectivement 0,005 M de chlorure de fer II (●) et III (○), (émulsions à base d'huile de colza raffinée, 0,1 M de NaCl, 40% phase aqueuse avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG).

3.2.2.3. Sulfate de fer versus sulfate de cuivre

Tout comme le fer, le cuivre catalyse la décomposition des hydroperoxydes comme suit :



D'après la Figure III.19, l'encapsulation de sulfate de cuivre conduit à la même cinétique d'oxydation que celle observée avec le sulfate de fer. Ce résultat n'est pas en accord avec les données existantes de la littérature qui indiquent que le cuivre est plus pro-oxydant que le fer vis-à-vis des huiles (Evans et al., 1951 ; Andersson et Lingnert, 1998). C'est une des raisons

pour lesquelles la dose maximale de fer tolérée dans les huiles est supérieure à celle du cuivre (1,5 mg/kg de fer contre 0,1 mg/kg de cuivre, dans les huiles raffinés) (CODEX STAN 210-1999). Hegenauer et al. (1979) ont montré que le sulfate de fer est plus efficace que le sulfate de cuivre dans l'oxydation des émulsions homogénéisées huile-dans-lait. De même, le cuivre est beaucoup moins efficace que le fer à décomposer les hydroperoxydes d'acide linoléique (O'Brien, 1969). Cependant, pour des émulsions d'acide linoléique dans l'eau contenant des ions métalliques à une concentration égale à $3,3 \cdot 10^{-3}$ M, à pH 7 (Wills, 1965), l'activité catalytique du cuivre Cu^{2+} est plus importante que celle du fer Fe^{2+} . Dans notre cas, on notera toutefois que la force ionique fixée principalement par l'électrolyte support (NaCl) est bien plus élevée que dans les études précédentes, ce qui a vraisemblablement pour conséquence d'atténuer les écarts liés aux différences de taille et de polarisabilité des ions.

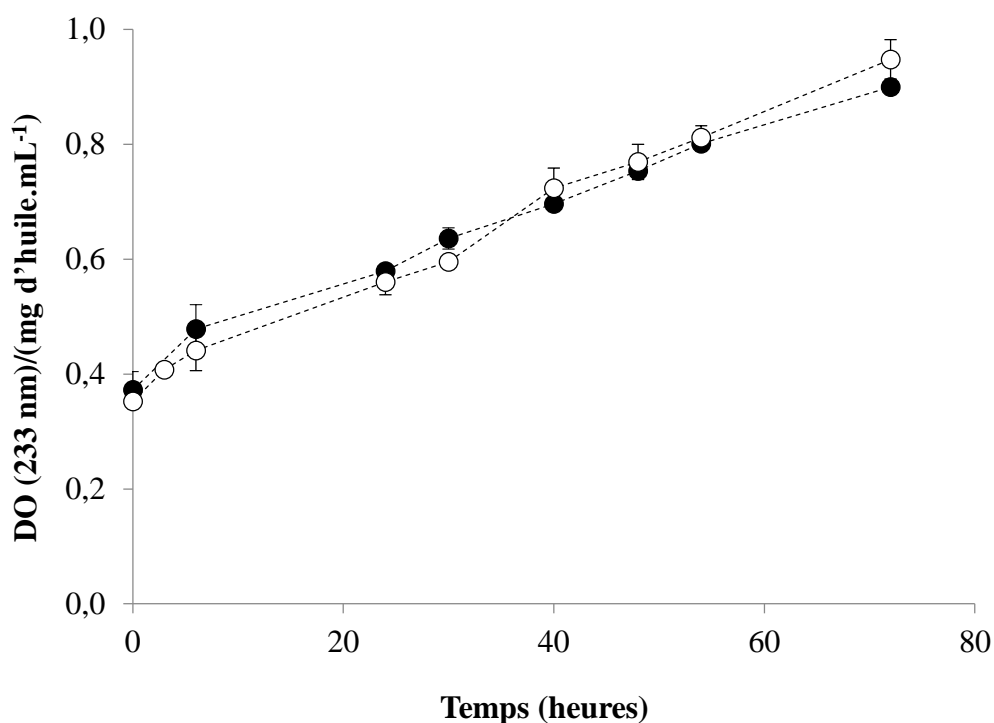


Figure III.19. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour deux émulsions contenant respectivement 0,005 M de sulfate de fer (○) et de sulfate de cuivre (●) dans les phases aqueuses, (émulsions à base d'huile de colza raffinée, 0,1 M de NaCl, 40% phase aqueuse avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG).

3.2.2.4. Influence de la nature du contre-ion du fer

L'oxydation est étudiée pour des émulsions eau-dans-huile à base d'huile de colza raffinée, et des phases aqueuses contenant des sels de fer différents, à la même concentration de 0,005 M, en présence de 0,1 M de chlorure de sodium, afin de maintenir la même pression osmotique et une force ionique comparable. Dans cette série d'expériences, la charge du fer est constante (+2) ce qui nous permet d'explorer l'influence de la nature du contre-ion.

D'après la Figure III.20, la vitesse d'oxydation suit la hiérarchie suivante : chlorure ferreux > sulfate ferreux > lactate ferreux > gluconate ferreux. Si l'on considère le chlorure ferreux et le sulfate ferreux, notre résultat est en accord avec une étude préalable sur du lait émulsifié enrichi en chlorure ferreux ou en sulfate ferreux (Hegenauer et al., 1979). On remarquera que la vitesse d'oxydation suit l'ordre des solubilités limites : 5,4 Mol.L⁻¹ pour le chlorure ferreux et 1,7 Mol.L⁻¹ pour le sulfate ferreux (sel heptahydraté). La solubilité limite d'un sel reflète le niveau d'interaction des espèces : elle est d'autant plus faible que l'attraction des ions de signe contraire est forte. Ainsi, nos résultats tendent à montrer que le pouvoir pro-oxydant des ions ferreux est plus important lorsqu'ils sont fortement dissociés. Cette interprétation est confortée par le comportement en présence de contre-ions dotés d'un pouvoir fortement chélatant vis à vis de Fe²⁺ tels que les ions lactate et gluconate où l'on observe que la cinétique d'oxydation est fortement ralentie (Smith et Martell, 1975). Guzun-Cojocar et al. (2011) ont identiquement montré que les formes chélatées du fer (NaFe-EDTA et bisglycinate ferreux) oxydent moins les émulsions huile de colza-dans-eau que le sulfate ferreux. De même, Hegenauer et al. (1979) ont mis en évidence le rôle des chélatants dans la diminution de l'oxydation dans des émulsions homogénéisées huile-dans-lait en comparant plusieurs chélatants de fer (fructose, EDTA, lactobionate, citrate et nitrilotriacétate).

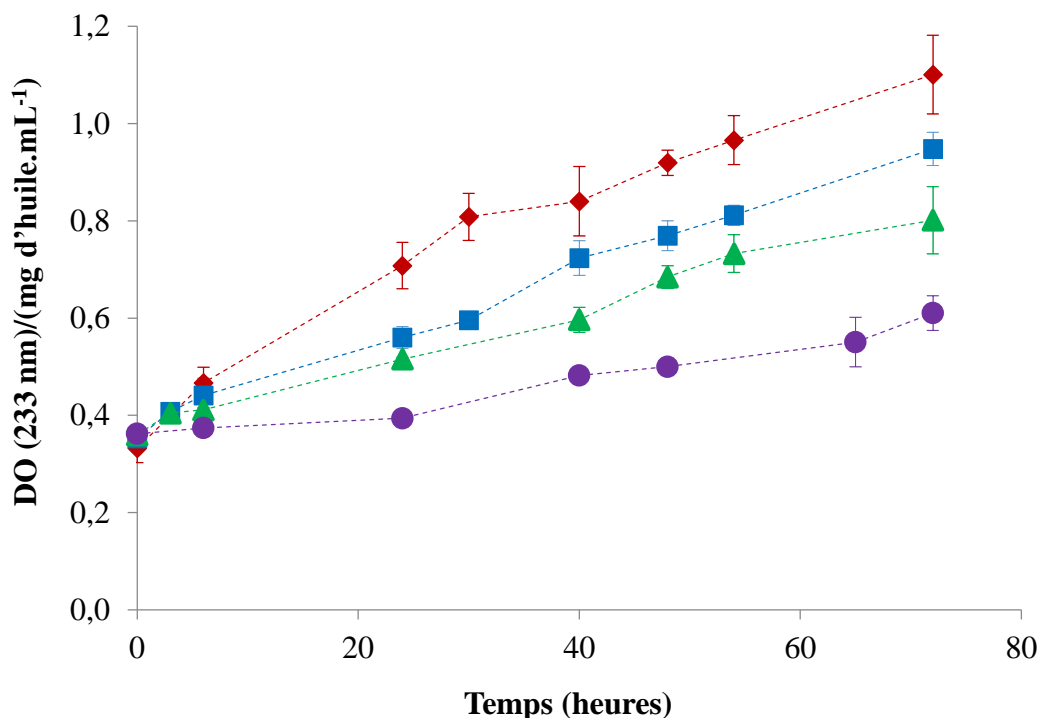


Figure III.20. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour des émulsions contenant différents sels de fer (0,005 M) (chlorure de fer II (♦) ; sulfate de fer II (■) ; lactate de fer II (▲) et gluconate de fer II (●)) dans les phases aqueuses contenant 0,1 M de NaCl, (émulsions à base d'huile de colza raffinée avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG et 40% de phase aqueuse).

3.2.2.5. Influence de la nature et de la concentration de la molécule ou électrolyte support

Les émulsions alimentaires commercialisées contiennent souvent dans la phase aqueuse des ingrédients tels que des sels ou des sucres, utilisés en tant que conservateurs pour augmenter la durée de vie du produit (i.e., chlorure de sodium) (Henney et al., 2010 ; Liem et al., 2011) ou pour améliorer les propriétés sensorielles du produit fini (i.e., glucose et fructose) (Welsh et Cunningham, 2011). Toutefois, ces ingrédients peuvent influencer l'oxydation des lipides en agissant soit comme des pro-oxydants ou des antioxydants en fonction de leurs propriétés chimiques, ainsi que leur interaction avec les autres espèces moléculaires impliquées dans la réaction d'oxydation des lipides (McClements et Decker, 2000).

Dans notre étude, le chlorure de sodium est utilisé comme molécule support dans la phase aqueuse afin d'assurer la stabilité physique des émulsions eau-dans-huile (cf § III.3.1.3). La Figure III.21 montre que l'augmentation de la concentration du chlorure de sodium de 0,1 M à 0,2 M en présence de sulfate de fer, s'accompagne d'une augmentation de l'oxydation lipidique. Ainsi, dans le cas des émulsions eau-dans-huile, il semble que le chlorure de sodium favorise l'oxydation. En revanche, Mei et al. (1998a) ont constaté que la présence du NaCl (entre 8,6 mM et 173 mM) réduit l'oxydation catalysée par le fer (50 μM de FeCl_3) dans les émulsions huile de maïs-dans-eau (pH 6,5), stabilisée par le SDS (tensioactif anionique), alors qu'elle est sans effet quand l'émulsion est stabilisée par le Brij 35 (tensioactif non ionique) ou le DTAB (tensioactif cationique). Il faut noter qu'à sa concentration la plus élevée (173 mM), le chlorure de sodium était plus de 10 fois plus abondant que le tensioactif et plus de 3000 fois plus abondant que le fer. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces résultats (Mei et al., 1998a et b) :

- Les ions Na^+ entrent en compétition avec le fer pour se fixer à l'interface de l'émulsion (chargée négativement en présence du SDS). La très forte concentration du NaCl utilisée en comparaison avec celle du fer fait que l'interface est saturée en ions Na^+ et les ions Fe^{2+} ne peuvent plus accéder aux lipides.
- Du fait de la teneur élevée en Cl^- , un complexe de chlorure de fer pourrait se former, diminuant l'accessibilité du fer à l'interface ainsi que la possibilité d'interaction électrostatique avec le SDS stabilisant les gouttelettes.
- En présence de DTAB, de charge positive, il n'y aurait pas de fixation du fer à l'interface du fait des forces de répulsion électrostatique entre le fer et le DTAB.
- Dans le cas du Brij 35, la fixation de cations au niveau de l'interface n'est également pas favorisée en raison du caractère non ionique de ce tensioactif.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Mei et al. (1998b) et Cui et al. (2015). Mei et al. (1998b) ont étudié l'effet du chlorure de sodium sur l'oxydation des émulsions huile de saumon-dans-eau stabilisées par le SDS. À pH 3, en présence des ions Fe^{2+} à une concentration égale à 500 μM , une concentration de NaCl égale à 17 mM n'a pas d'effet sur l'oxydation. Des concentrations de NaCl de 87 mM et 170 mM, augmentent l'oxydation des émulsions contenant le fer Fe^{2+} . Cette augmentation de l'oxydation pourrait être due, d'après les auteurs à l'aptitude des ions chlorure à augmenter l'activité catalytique de fer ou à la

réduction de l'épaisseur de la double couche interfaciale qui facilite le contact entre le fer et les lipides.

Aussi, Cui et al. (2015) ont montré que l'oxydation des émulsions huile de maïs-dans-eau stabilisées par le Tween 20 à pH 7, augmente en présence du NaCl (entre 0,6 et 1,6% de l'émulsion). D'après les auteurs, la contradiction à propos de l'impact du NaCl dans les deux études (Mei et al., 1998a et Cui et al., 2015) s'explique par le fait que Cui et al. (2015) ont utilisé une huile de maïs sans éliminer ses α -tocophérols ; le fer dégrade les α -tocophérols, et le chlorure de sodium favorise cette dégradation, alors que dans le cas de Mei et al. (1998a), l'huile de maïs est débarrassée de ses α -tocophérols, ce qui fait disparaître le rôle du chlorure de sodium dans l'oxydation.

Dans notre cas, l'augmentation de la force ionique des gouttes due à la présence de NaCl, pourrait favoriser le contact à l'interface eau-huile entre les ions du fer et les lipides par contraction de la double couche. La double couche, selon le modèle de Stern, décrit la distribution spatiale des charges à la surface d'une particule colloïdale. En effet, les gouttes de l'émulsion sont chargées du fait de l'ionisation partielle des têtes polaires des tensioactifs. Les ions présents dans la phase continue de même signe que la surface (co-ions) s'en écartent alors que les ions de signe contraire (contre-ions) sont attirés.

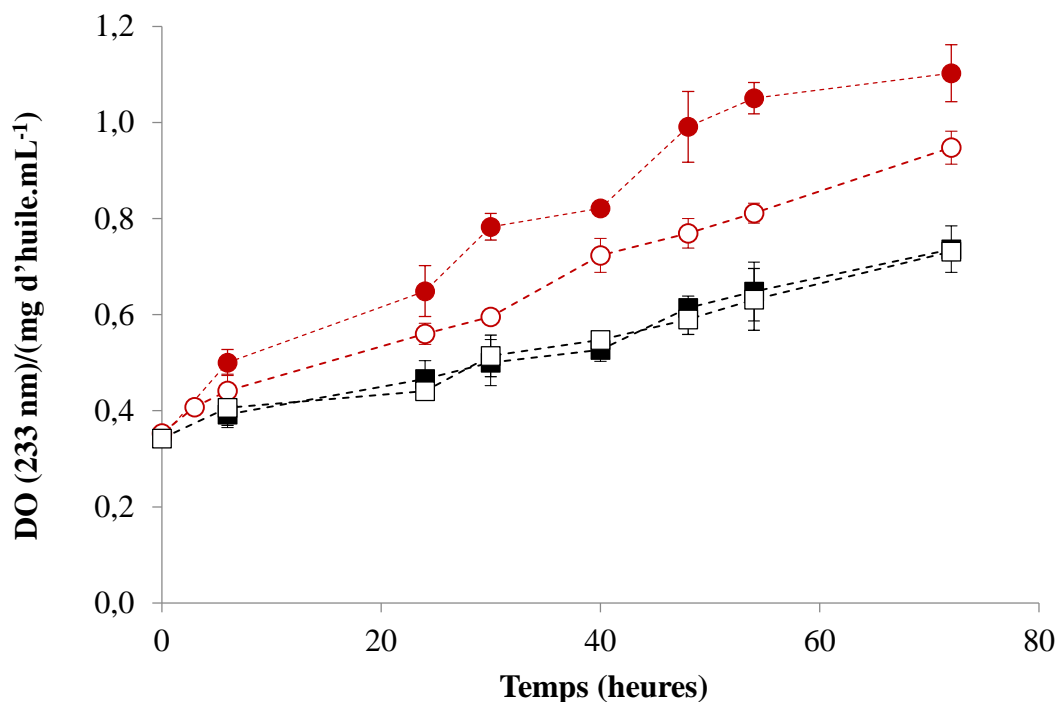


Figure III.21. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour des émulsions contenant 0,005 M de FeSO₄, en présence du glucose (0,2 M (□) ; 0,4 M (■) et du chlorure de sodium 0,1 M (○) ; 0,2 M (●) comme molécules support, (émulsions à base d'huile de colza raffinée avec 1,5% de PGPR et 1,5% de DMG et 40% phase aqueuse).

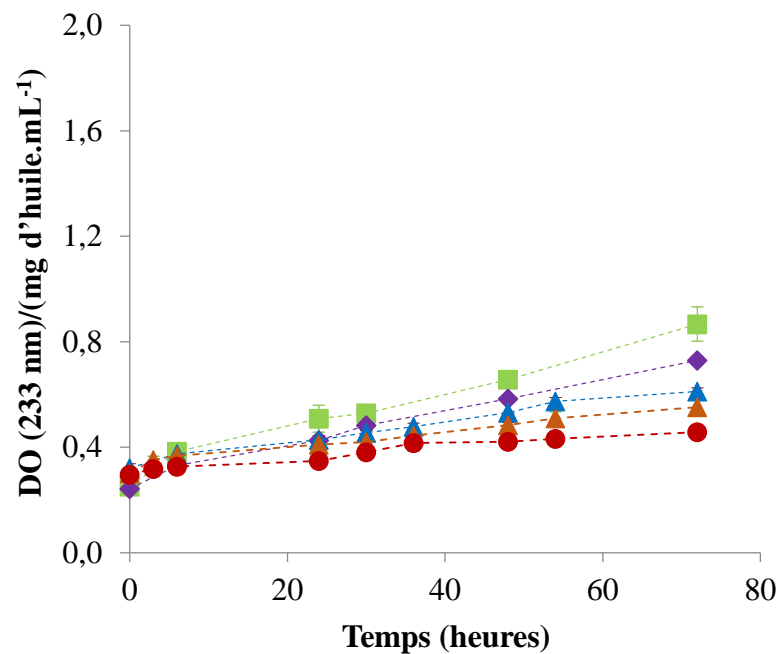
Nous avons également remplacé le chlorure de sodium par du glucose. Pour les deux concentrations utilisées (0,2 M et 0,4 M, qui correspondent respectivement aux mêmes pressions osmotiques assurées par 0,1 M et 0,2 M de NaCl), l'oxydation des émulsions inverses est similaire et inférieure à celle observée en présence du chlorure de sodium. S'agissant d'une molécule électriquement neutre, le glucose ne modifie pas la force ionique de la solution qui est dans ce cas quasi-nulle (Tableau II.2 du Matériel et Méthodes) et n'a donc aucun impact sur la cinétique d'oxydation. Ainsi, en jouant sur la force ionique des gouttelettes, il serait possible de moduler les phénomènes d'oxydation des lipides.

3.2.3. Influence de la nature de l'huile

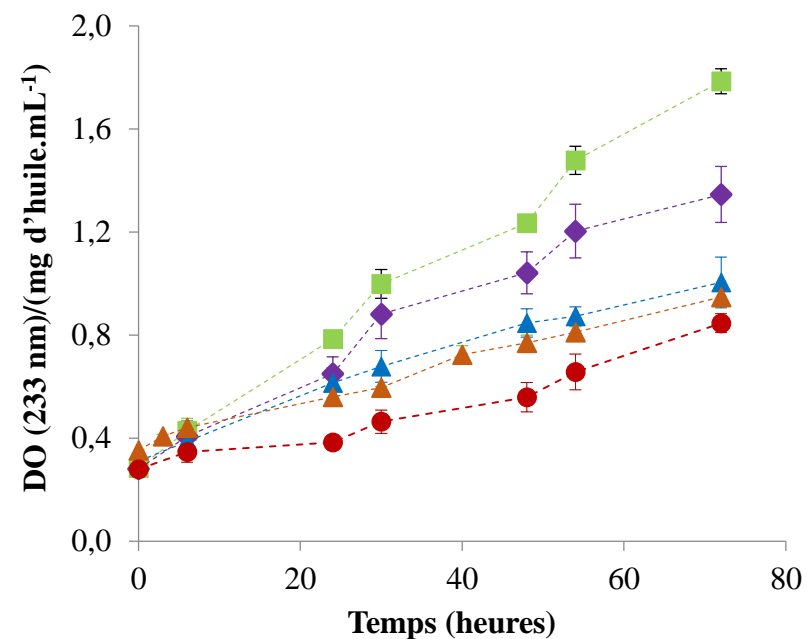
Les émulsions inverses eau-dans-huile constituent la base de plusieurs produits, tels que les margarines. Dans l'optique du développement des produits enrichis en AGPI n-3, il est intéressant de connaître l'influence de la nature de l'huile utilisée dans la formulation sur l'oxydation lipidique. Nous avons montré (§ III.2.4) que l'oxydation des huiles en phase continue, à 60 °C, dépendait principalement de leur teneur en acide α -linoléique (18:3 n-3). Ce résultat est aussi obtenu pour les huiles ayant juste subi une étape d'agitation à l'homogénéisateur à hélice (Annexe 3).

La Figure III.22, présente l'évolution de la teneur en diènes conjugués sur 72 h pour des émulsions inverses stockées à 60 °C (Fig. III.3.15A) ou à 25 °C, en présence de sulfate de fer (Fig. III.3.15B). Pour ces deux systèmes, on retrouve la hiérarchie déjà observée pour les huiles en phase continue (partie III.2), à savoir : huile de lin > huile de caméline > huile de colza > huile d'olive. Ce résultat montre que l'oxydation est influencée de la même manière par la composition de la phase grasse dans les huiles et dans les émulsions inverses : l'oxydation augmente avec la teneur en AGPI. Un résultat similaire a été obtenu dans le cas des émulsions doubles huile-dans-eau-dans-huile : l'huile de tournesol et l'huile de palme s'oxydent moins que les huiles riches en acides gras de la série n-3 (huile de caméline et de poisson), en lien avec leur teneur en acides gras insaturés (O'Dwyer et al., 2013).

Nous remarquons aussi que l'huile de colza raffinée est légèrement moins sensible à l'oxydation que l'huile de colza vierge (Figures III.22A et B). Ceci est cohérent avec le fait que, dans l'industrie des huiles, l'étape de raffinage est classiquement appliquée pour éliminer les espèces pro-oxydantes telles que des acides gras libres, des composés polaires et oxydés (Farhoosh et al., 2009).



A



B

Figure III.22. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, pour différentes huiles émulsionnées : (A) formulées avec 2% PGPR et 2% DMG, la phase aqueuse contient 0,1 M NaCl et stockées à 60 °C ; (B) formulées avec 1,5% PGPR et 1,5% DMG, la phase aqueuse contient 0,1 M NaCl et 0,005 M FeSO₄ et stockées à 25 °C ; (huile de lin (■) ; cameline (◆); colza vierge (▲) et raffinée (▲) et olive (●)), les émulsions contiennent 40% de phase aqueuse.

En assimilant les cinétiques d'oxydation sur les premières heures à des droites, il est possible de déterminer une pente correspondant à l'oxydabilité des huiles en émulsion inverse. La Figure III.23 présente la pente des différentes droites en fonction de la teneur en acide α -linoléique. Cette représentation permet de mettre en évidence la corrélation de l'oxydation lipidique avec la composition en acides gras des huiles en présence et en absence d'ions pro-oxydants.

Ces résultats ont déjà été discutés dans le paragraphe III.2.4.

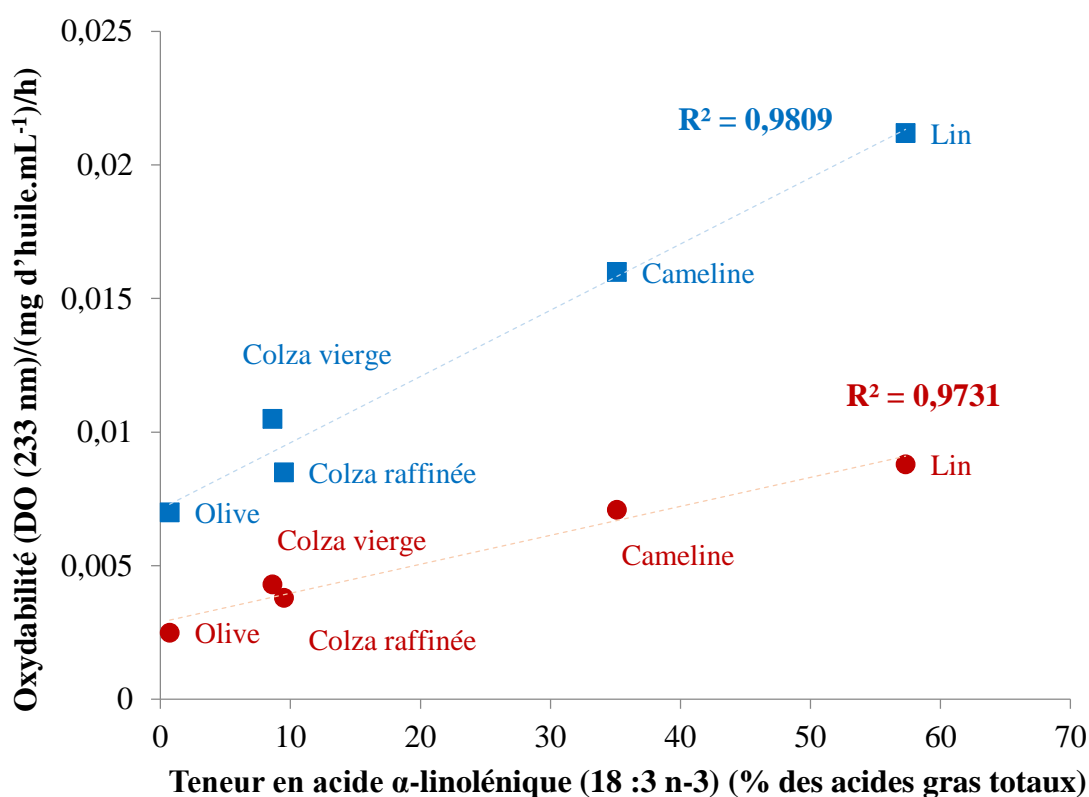


Figure III.23. Corrélation entre l'oxydabilité et la teneur en acide α -linoléique (18:3 n-3), déterminée pour les émulsions inverses, formulées, avec 2% PGPR et 2% DMG, la phase aqueuse contient 0,1 M NaCl et stockées à 60 °C (●), et formulées avec 1,5% PGPR et 1,5% DMG ; la phase aqueuse contient 0,1 M NaCl et 0,005 M FeSO₄ et stockées à 25 °C (■). Les émulsions contiennent 40% de phase aqueuse.

3.2.4. Influence de la concentration en PGPR

L'oxydation des lipides dans les émulsions directes peut être fortement influencée par la composition de l'interface (Decker, 1998, McClements et Decker, 2000). Nous avons montré précédemment (§ III.3.2.1.3) que l'incorporation des tensioactifs lipophiles à différentes concentrations (entre 1% et 5% pour le PGPR et entre 2% et 5% pour le DMG) dans l'huile de colza raffinée en phase continue n'affecte pas l'oxydation des lipides. Dans le but d'étudier l'influence des tensioactifs lipophiles à l'interface eau-huile sur l'oxydation lipidique, nous avons fait varier le rapport PGPR/DMG dans la phase huileuse. Dans la suite, nous supposons que la variation du rapport PGPR/DMG dans la phase huileuse (volume) se répercute, au moins de façon partielle, au niveau de la composition de l'interface.

La Figure III.24 montre qu'une augmentation de la quantité de PGPR de 2 à 5% n'a pas d'influence sur la formation des diènes conjugués, pour les émulsions eau-dans-huile à base d'huile de colza raffinée et ne contenant que du chlorure de sodium (0,1 M de NaCl) dans la phase aqueuse, stockées à 60 °C. La concentration volumique étant très supérieure à la CMC du tensioactif, estimée à 0,51% (Marzé, 2009), la composition de l'interface est invariante dans la gamme de concentration explorée. Rappelons que la CMC est la concentration seuil qui correspond à la limite de solubilité des tensioactifs sous forme de monomère dans la phase où ils sont solubilisés. Au-delà de cette concentration, les molécules de l'agent tensioactif se rassemblent en micelles, ou agrégats supramoléculaires.

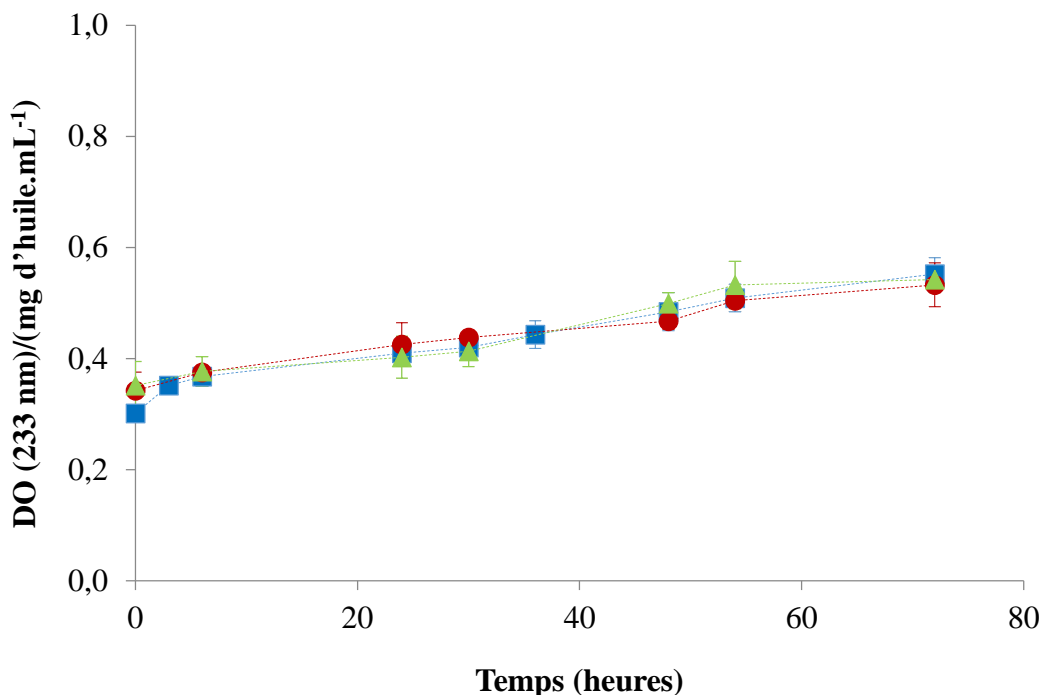


Figure III.24. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 60 °C pour des émulsions à base d'huile de colza raffinée (40% de phase aqueuse, 0,1 M NaCl), en fonction de la concentration en PGPR dans la phase huileuse ((■) 2% ; 3% (●) ; (▲) 5%), en présence de 2% DMG.

En présence du sulfate de fer dans la phase aqueuse, l'augmentation des fractions de PGPR de 1,5 à 3% diminue l'oxydation lipidique (Figure III.25). Ce résultat suggère que le PGPR à l'interface serait plus efficace pour protéger les lipides des espèces pro-oxydantes encapsulées. Il contribuerait à la formation d'une couche interfaciale agissant comme une barrière physique engendrée par les parties polaires des chaînes oligomériques qui sont plus volumineuses que dans les molécules de DMG. Néanmoins, on observe un effet seuil de cette organisation puisque l'augmentation de la proportion de PGPR à 5% n'améliore pas la stabilité oxydative par rapport à ce qui est observé à 3%.

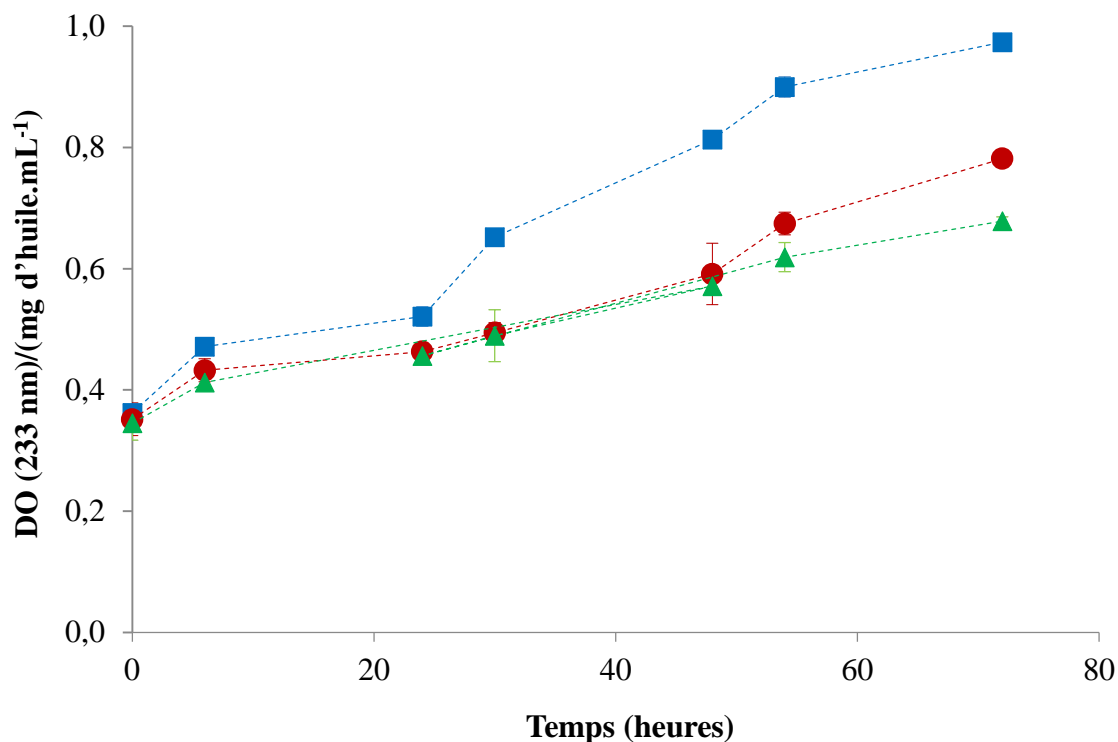
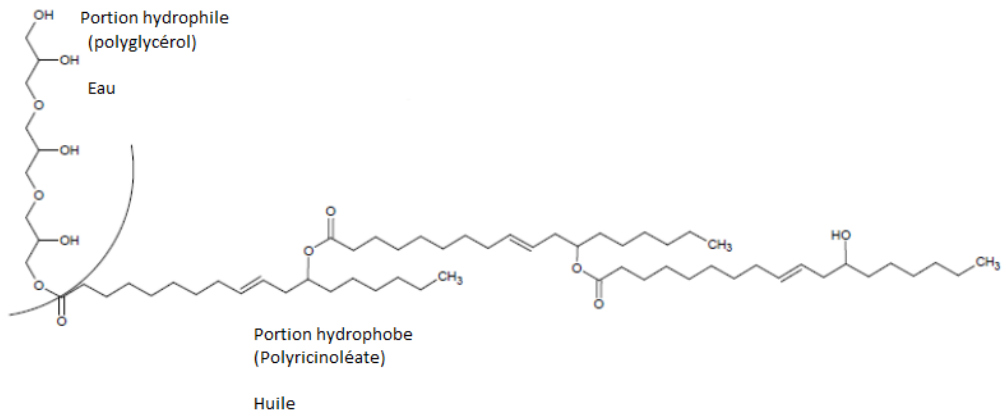
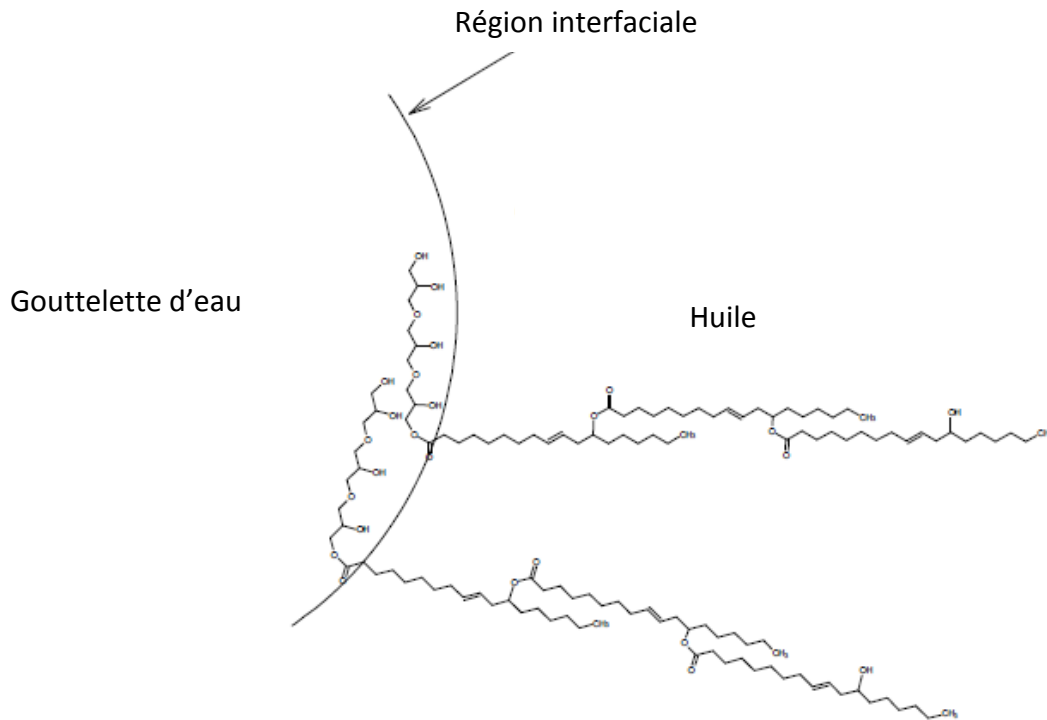


Figure III.25. Evolution de la teneur en diènes conjugués (densité optique normalisée par la concentration en lipides) au cours du temps, à 25 °C pour des émulsions à base d'huile de colza raffinée (40% d'eau, 0,1 M NaCl, 0,005 M de FeSO₄), en fonction de la concentration en PGPR dans la phase huileuse ((■) 1,5% ; 3% (●) ; (▲) 5%), en présence de 1,5% de DMG.

La Figure III.26A montre la structure amphiphile du PGPR qui lui permet de s'organiser aux interfaces (Figure III.26B), cette organisation étant à l'origine de la formation de la barrière physique entre le fer et les lipides.



A



B

Figure III.26. A : Structure moléculaire du PGPR (Taylor, 2011) ; B : Schéma de l'orientation de deux molécules de PGPR adsorbées à l'interface huile-eau d'une émulsion inverse (Taylor, 2011).

On peut donc supposer que le mélange de PGPR et de DMG forme une barrière physique qui empêche le contact entre le fer et les lipides. L'augmentation de la teneur en PGPR augmenterait l'épaisseur moyenne de cette barrière. En effet, l'épaisseur de l'interface dépend de la taille de l'émulsifiant et la conformation des parties hydrophile et lipophile (Waraho et al., 2011a). Dans ce contexte, Silvestre et al. (2000) ont montré que la stabilité oxydative d'une émulsion huile de saumon-dans-eau stabilisée par le tensioactif Brij 700 est plus importante que celle stabilisée par le tensioactif Brij 76. En effet, la partie hydrophile du Brij 700 est 10 fois plus volumineuse que celle du Brij 76.

D'autre part, l'augmentation de la concentration en tensioactif peut augmenter le nombre de micelles dans la phase lipidique pouvant emprisonner les hydroperoxydes et donc diminuer les réactions de propagation. C'est ce qui est suggéré par Nuchi et al. (2002) dans le cas d'une émulsion huile de maïs-dans-eau stabilisée par le Brij 76. Une étude réalisée sur des émulsions huiles dans eau d'acide linoléique et stabilisées par du Tween 20 montre qu'il y a un retard à l'oxydation quand la concentration de l'émulsifiant est supérieure à la concentration micellaire critique CMC (Ponginebbi et al., 1999). Il y aurait formation de micelles mixtes contenant l'acide linoléique, ce qui permettrait une dilution du substrat et/ou le remplacement de l'acide linoléique à l'interface, le rendant moins accessible à une attaque radicalaire. Cette hypothèse est peu probable dans notre cas car l'augmentation de la proportion de PGPR à 5%, qui implique normalement l'augmentation du nombre de micelles présentes, n'améliore pas la stabilité oxydative par rapport à ce qui est observé avec 3%.

Au paragraphe III.3.2.1.3 nous avons déjà démontré que l'incorporation des tensioactifs lipophiles PGPR et DMG à différentes concentrations dans l'huile de colza raffinée en phase continue n'avait pas d'influence sur la vitesse d'oxydation. Ce résultat confirme que les micelles n'interviennent pas dans l'oxydation.

Ainsi, l'oxydation des lipides dans les émulsions inverses eau-dans-huile stabilisées par un mélange PGPR/DMG passerait plutôt par des réactions à l'interface eau-huile. L'ensemble des résultats obtenus s'interpréterait donc en termes d'accessibilité des ions métalliques pro-oxydants à l'interface eau-huile, à proximité immédiate du substrat lipidique.

3.3. Etude de l'oxydation des émulsions inverses par microcalorimétrie

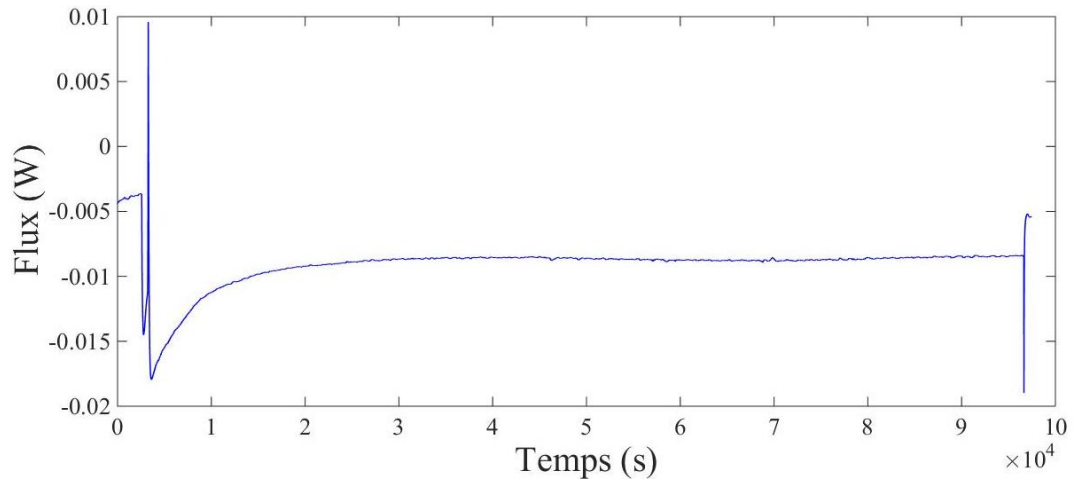
L'étude de l'oxydation des lipides en émulsion nécessite en général une étape de séparation des phases, préalable à l'analyse des produits d'oxydation. Il en résulte des temps d'analyse relativement longs et, éventuellement, des réactions d'oxydation parasites dues à l'étape d'extraction si toutes les précautions ne sont pas prises. Ainsi, il serait intéressant de disposer d'une méthode de caractérisation de l'oxydation sans phase d'extraction et sans utilisation de solvant organique.

Il existe quelques méthodes directes de l'oxydation des lipides en émulsion comme le dosage des aldéhydes volatils par CPG couplée à l'espace de tête (Berton, 2011) ou le Rancimat (Raikos et al., 2014). Dans cette partie, nous nous sommes donc attachés à étudier l'oxydation des lipides en émulsion inverse en utilisant la microcalorimétrie. Les émulsions étudiées contiennent 40% de phase aqueuse (0,1 M NaCl), les tensioactifs lipophiles PGPR et DMG sont chacun présents à 2%.

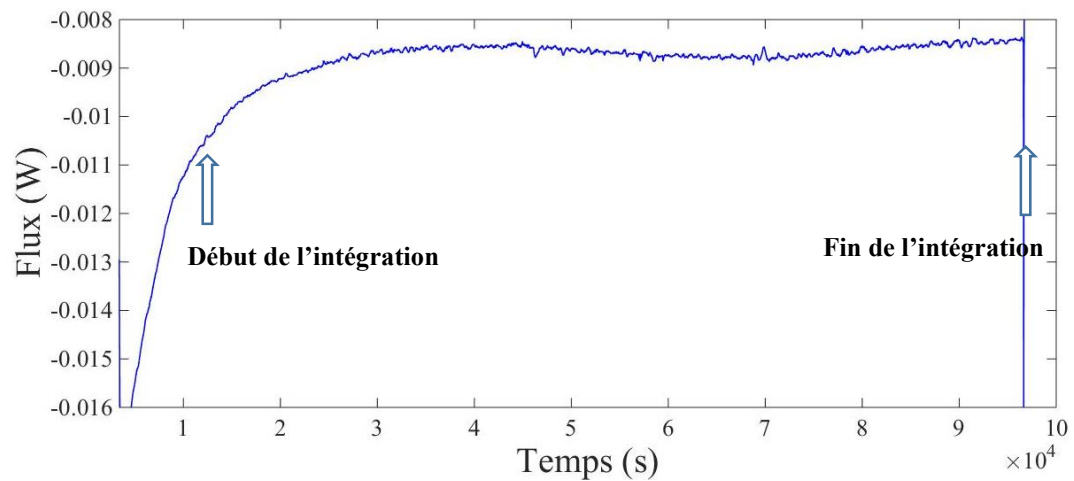
3.3.1. Mesure du flux de chaleur en fonction du temps

L'étude de l'oxydation des émulsions inverses se fait à 60 °C dans les coupelles en cuivre au sein du microcalorimètre. A cette température, l'évaporation d'eau pourrait modifier sensiblement les phénomènes d'oxydation. Or, une étude menée avec des coupelles en cuivre fermées montre que l'oxygène devient le facteur limitant (Annexe 4). Les coupelles utilisées dans cette étude resteront donc ouvertes. Nous avons choisi de faire un suivi de l'oxydation sur 8 heures seulement afin de limiter l'évaporation de la phase aqueuse (<10 % de la masse totale de l'émulsion).

La Figure III.27 montre l'évolution du flux de chaleur au cours du temps. L'allure de la courbe diffère de celle correspondant aux huiles en phase continue (Figure III.1). En effet, elle est caractérisée par une période de stabilisation du signal, suite à l'injection de l'émulsion, qui n'existait pas dans le cas des huiles en phase continue, ce qui est probablement dû à la présence des gouttes d'eau dispersée dans l'huile qui apportent une plus forte inertie thermique (capacité calorifique de $4,18 \text{ J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour l'eau versus $2 \text{ J.g}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour les triglycérides).



A



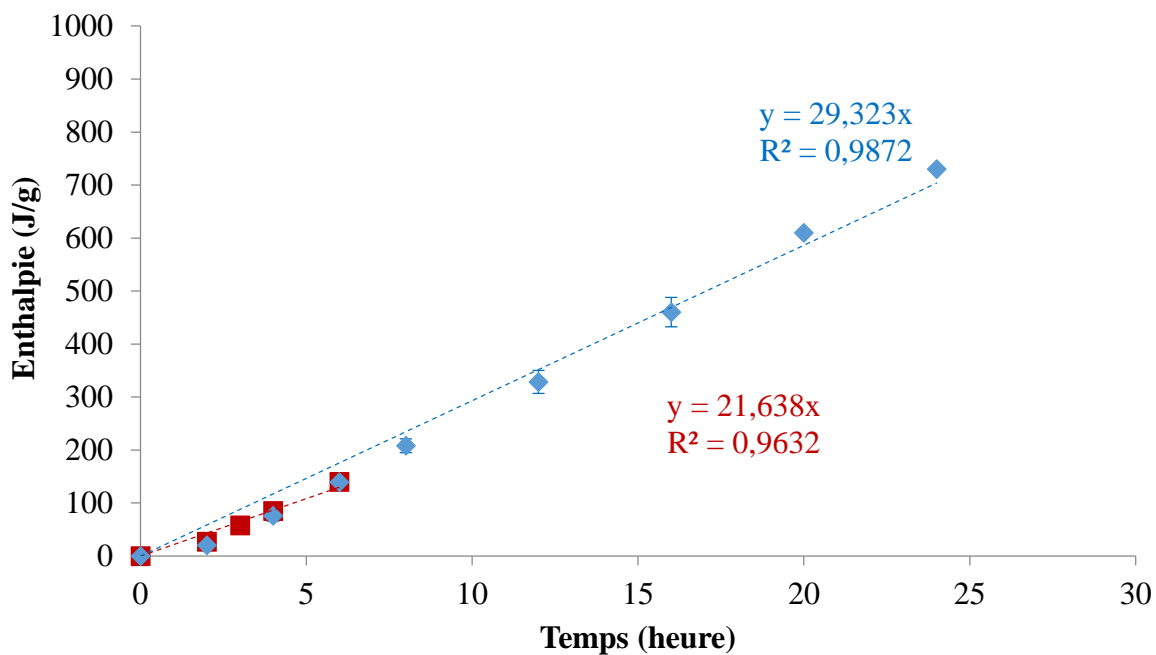
B

Figure III.27. Flux de chaleur (A) en fonction du temps, pour une émulsion inverse à base d'huile de cameline dans des conditions isothermes (60 °C) dans une coupelle en cuivre. Emulsion inverse eau-dans-huile de cameline (2% de PGPR, 2% de DMG dans la phase lipophile), 40% de phase aqueuse (0,1 M NaCl) ; (B) zoom sur la zone d'intégration du flux.

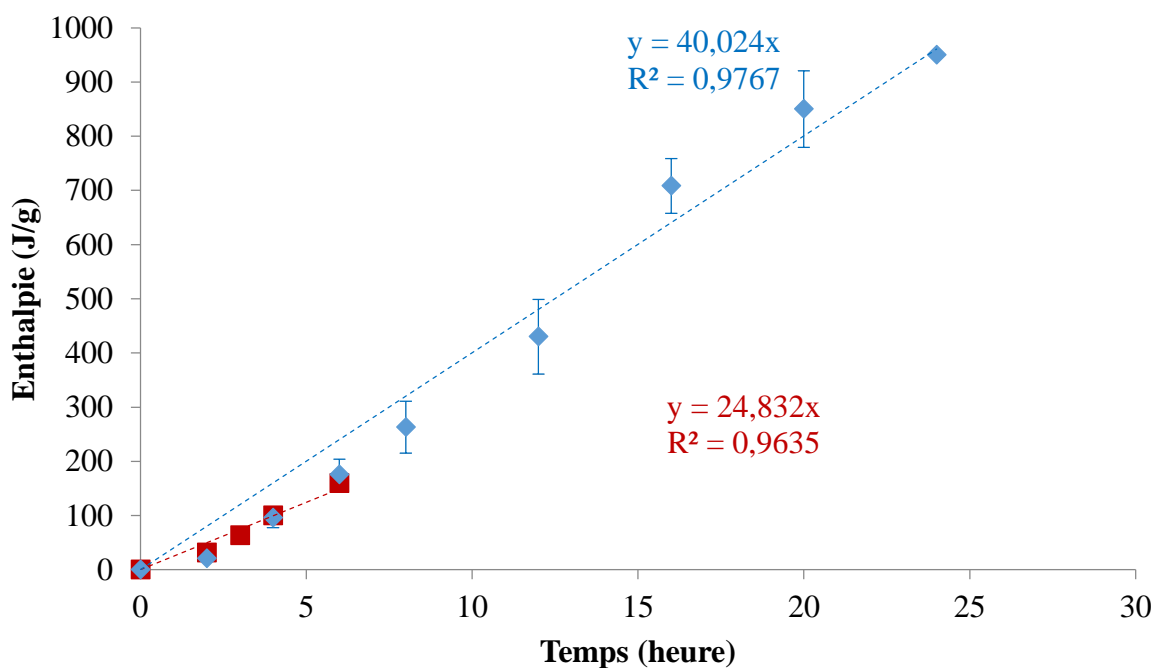
Pour s'affranchir de cette période de stabilisation, qui fausse le calcul de l'enthalpie, nous avons décidé de négliger l'énergie libérée au cours des 2 premières heures. En effet, dans le cas des huiles en phase continue, les enthalpies moyennes de l'oxydation des huiles les plus oxydables sont de $20,1 \pm 3,1 \text{ J.g}^{-1}$ et $20,6 \pm 4,9 \text{ J.g}^{-1}$, respectivement pour la cameline et le lin. Ces valeurs sont considérées comme négligeables par rapport aux enthalpies moyennes après 8 heures à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ($208 \pm 13 \text{ J.g}^{-1}$ et $263 \pm 47,8 \text{ J.g}^{-1}$, respectivement). Ainsi, pour le calcul des enthalpies des huiles en émulsion, l'intégrale du signal est prise entre 2 et 8 heures.

3.3.2. Corrélation entre les mesures de l'enthalpie et des diènes conjugués

Les figures III.28A et B représentent la superposition de l'évolution de l'enthalpie de l'oxydation des huiles continues et en émulsion dans le cas de l'huile de cameline et de lin, respectivement. On remarque que, pour les deux huiles étudiées, les droites représentant l'enthalpie en fonction du temps, correspondant aux émulsions, se superposent avec celles obtenues pour les huiles en phase continue.



A



B

Figure III.28. Evolution de l'enthalpie d'oxydation à 60 °C pour les huiles en phase continue ◆ et en émulsion inverse eau-dans-huile ■ (2% PGPR, 2% DMG, 40% eau 0,1 M NaCl) à base (A) d'huile de cameline ; (B) d'huile de lin.

La corrélation entre la teneur en diènes conjugués mesurés par spectrophotométrie à 233 nm (sur la phase grasse après centrifugation) et la mesure de l'enthalpie d'oxydation par microcalorimétrie est établie pour deux émulsions à base d'huiles de cameline et de lin (Figure III.29). Ainsi, la microcalorimétrie permet bien le suivi de l'oxydation primaire des huiles en émulsion inverse.

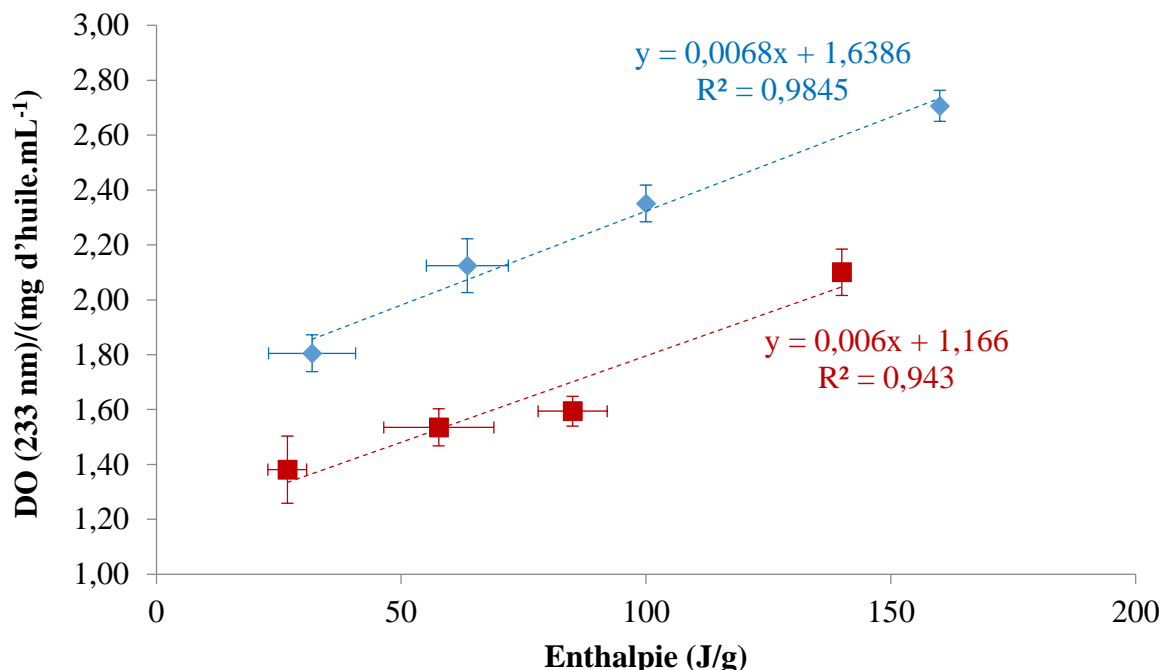


Figure III.29. Corrélation entre la teneur en diènes conjugués et l'enthalpie d'oxydation à 60 °C pour les émulsions inverses eau-dans-huile (2% PGPR, 2% DMG, 40% eau 0,1 M NaCl) à base d'huile de cameline ■ et d'huile de lin ◆.

3.3.3. Influence de la nature de l'huile

La figure III.29 présente l'enthalpie mesurée au cours du temps pour des émulsions inverses à base de différentes huiles. Les mesures d'enthalpie permettent de classer les huiles dans l'ordre suivant : Lin > cameline > colza > olive. Ainsi, la microcalorimétrie permet de différencier les huiles et conduit au même ordre que celui relevé par la teneur en diènes conjugués (§ III.3.2.6).

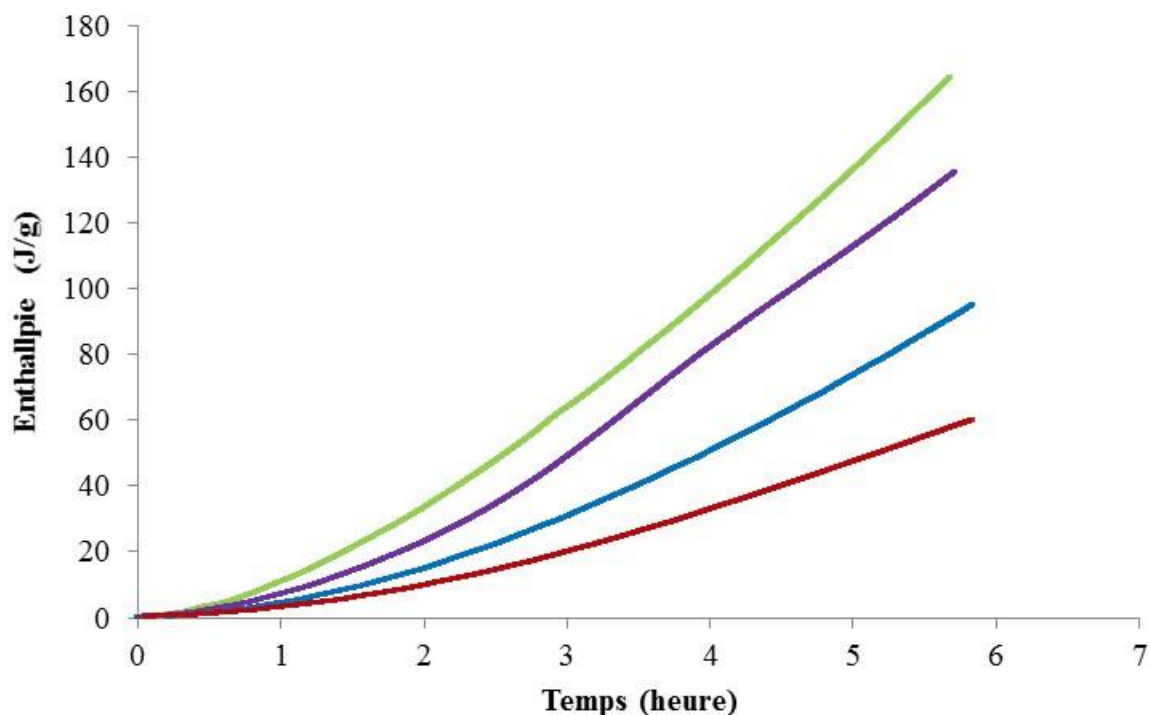


Figure III.30. Enthalpies d'oxydation en fonction de temps, pour les différentes émulsions inverses basées sur les huiles vierges d'olive (●), de colza (●), de cameline (●) et de lin (●) (2% de PGPR, 2% de DMG dans la phase lipophile, 40% de phase aqueuse (0,1 M NaCl)) à 60 °C.

3.3.4. Corrélation entre la teneur en acide α -linoléinique et l'oxydabilité des émulsions

La Figure III.30 montre que l'oxydabilité des huiles en émulsion inverse évaluée par microcalorimétrie est proportionnelle à la teneur en acide α -linoléinique. Ce résultat déjà démontré dans le cas des huiles en phase continue peut donc être généralisé aux émulsions inverses. Les pentes des deux droites de corrélation sont proches (0,31 pour les émulsions et 0,32 pour les huiles).

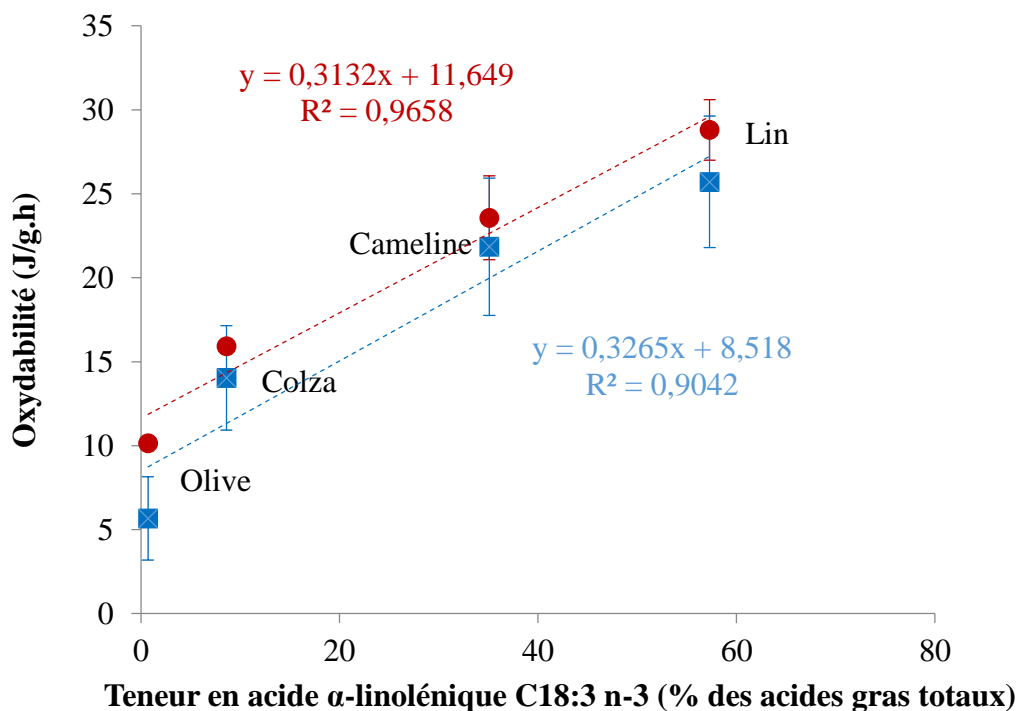


Figure III.31. Corrélation entre l'oxydabilité et la teneur en n-3, pour les différentes huiles vierges de lin, cameline, colza et olive, en phase continue (■) et en émulsion inverse (●). Les émulsions contiennent 2% PGPR, 2% DMG, 40% de phase aqueuse, 0,1 M NaCl.

En conclusion, il est possible de comparer l'oxydabilité des huiles en émulsion inverse directement sans étape d'extraction préalable. Cette approche est particulièrement intéressante pour faire un screening rapide de l'impact des paramètres de formulation de l'émulsion sur l'oxydation. La microcalorimétrie permet donc de suivre l'oxydation des huiles aussi bien en phase continue, qu'en émulsion, avec tous les avantages qu'elle peut présenter (directe, sans étape de séparation, sans utilisation de solvant organique,...).

Conclusion et Perspectives

L'oxydation lipidique entraîne une dégradation de la qualité sensorielle et nutritionnelle des émulsions alimentaires. De nombreux travaux se sont intéressés à l'étude de l'oxydation des lipides en émulsion directe. En revanche, peu d'études ont été consacrées à l'oxydation des lipides dans les émulsions inverses eau-dans-huile, bien qu'elles constituent la base de produits alimentaires de consommation courante tels que les margarines. De plus, la plupart des travaux réalisés sur l'oxydation des émulsions mettent en œuvre des techniques de suivi de l'oxydation des lipides nécessitant l'utilisation des solvants organiques potentiellement dangereux. Par ailleurs, dans le cas des émulsions, une étape de séparation des phases de l'émulsion, préalable à l'analyse, est requise. Il en résulte des temps d'analyse relativement longs et, éventuellement, des réactions d'oxydation parasites dues à l'étape d'extraction si toutes les précautions ne sont pas prises.

L'un des objectifs de ce travail de thèse était donc de mieux caractériser le phénomène d'oxydation des lipides en phase continue et en émulsion inverse, en développant une technique expérimentale innovante basée sur la mesure de l'enthalpie de l'oxydation lipidique : la microcalorimétrie différentielle. Le microcalorimètre utilisé est un dispositif qui permet le suivi en temps réel des réactions d'oxydation en mode isotherme. Il est constitué de thermopiles qui mesurent le flux de chaleur dissipé par les réactions chimiques. Le montage réalisé au laboratoire permet de réaliser des mesures simultanées sur des échantillons différents (parallélisation). Les enthalpies mesurées sont très bien corrélées à la formation de produits primaires d'oxydation (diènes conjugués mesurés par spectrophotométrie UV à 233 nm). La méthode permet de comparer l'oxydabilité de différentes huiles. Par ailleurs, sur les 4 huiles étudiées, cette oxydabilité est liée à leur teneur en acide α -linoléique (18:3 n-3). L'appareil permettant de travailler à différentes températures, il est possible de calculer les énergies d'activation des réactions d'oxydation. Enfin, en se plaçant dans des conditions expérimentales où l'évaporation de l'eau est négligeable, le dispositif permet un suivi de l'oxydation des lipides en émulsion inverse. En conclusion, cette technique est particulièrement intéressante pour faire un screening rapide des huiles en phase continue ou des paramètres de formulation des huiles en émulsion inverse.

Différentes émulsions inverses eau-dans-huile ont été formulées, avec 40% de phase dispersée sous forme de gouttelettes de 1 μm de diamètre. La stabilité physique a été assurée par une proportion de PGPR-DMG égale à 2%/2% à 60 °C et 1,5%/1,5% à 25 °C. Les études ont été réalisées dans des conditions où l'oxygène n'était pas le facteur limitant des réactions d'oxydation impliquées. En l'absence de molécules pro-oxydantes dans la phase aqueuse, l'oxydation des lipides dans les émulsions est légèrement plus prononcée que dans l'huile seule. Ce résultat serait lié à l'agitation plutôt qu'à la présence d'une phase aqueuse. Cette hypothèse est étayée par le fait que la variation du pourcentage de phase aqueuse dispersée de 0 à 60% pour des émulsions inverses à base d'huile de colza raffinée et d'huile d'olive vierge, stockées à 60 °C, n'a pas d'effet sur la cinétique d'oxydation, pour les deux huiles. Ainsi, en l'absence d'espèces pro-oxydantes solubles dans l'eau, la contribution de l'interface dans le processus d'oxydation lipidique est négligeable. On suppose donc que les hydroperoxydes restent accessibles comme substrats d'oxydation de la même façon dans les huiles en phase continue ou en milieu dispersé. On trouve dans les deux cas, l'influence prépondérante de la teneur en AGPI n-3 sur l'oxydabilité, indépendamment de la présence de composés mineurs dans les huiles vierges.

Nous avons fait varier plusieurs paramètres de formulation des émulsions inverses pour étudier leur impact sur l'état d'avancement de l'oxydation par suivi de l'évolution des diènes conjugués, à 25 °C et à 60 °C. L'influence de la nature de l'huile vierge conduit à la hiérarchie suivante : huile de lin > huile de caméline > huile de colza > huile d'olive. De plus, l'huile de colza raffinée est légèrement moins sensible à l'oxydation que l'huile de colza vierge, ce qui pourrait être dû à l'élimination d'espèces pro-oxydantes telles que des acides gras libres, des composés polaires et oxydés suite au raffinage.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'encapsulation du sulfate de fer dans des émulsions à base d'huile de colza raffinée. Ce choix avait un double objectif : évaluer l'impact d'une molécule pro-oxydante sur l'oxydation des lipides en émulsion inverse et évaluer les possibilités d'enrichissement d'un aliment sachant que les carences en fer ont des impacts importants sur la santé humaine (Walter et al., 1997 ; Halterman et al., 2001) et que l'enrichissement constitue un moyen efficace pour lutter contre ce déficit (Huma et al., 2007 ; Guzun-Cojocar et al., 2011). Plus la concentration en fer (sulfate de fer) encapsulé est élevée, plus l'oxydation des lipides est importante. Ce résultat suggère que les tensioactifs lipophiles

présents à l'interface eau-huile de l'émulsion n'empêchent pas le contact des ions ferreux Fe^{2+} avec les molécules lipidiques de la phase continue. A ce stade, cette observation peut être expliquée soit par une solubilisation partielle du sulfate ferreux dans la phase huileuse soit par une facilité d'accès des ions métalliques pro-oxydants à l'interface eau-huile, à proximité immédiate du substrat lipidique. L'état de valence du fer ou le remplacement du fer par du cuivre n'a pas d'impact significatif sur la cinétique d'oxydation. En revanche, il est possible de contrôler l'action pro-oxydante du fer II en jouant sur la nature du contre-ion (poids moléculaire, pouvoir chélatant). D'autres espèces de la phase aqueuse telles que le NaCl, influencent l'oxydation des lipides. Plus la force ionique de la phase aqueuse est élevée, plus l'oxydation est rapide. Ce résultat suggère que l'interaction entre les lipides et les ions ferreux à l'interface est facilitée par contraction de la double couche électrochimique. Dans le cadre du Programme National Nutrition Santé (PNNS) visant à diminuer les quantités de sel dans les formulations, on peut donc préconiser une substitution au moins partielle du sel par du glucose dont la présence n'impacte pas la force ionique (si tant est que les propriétés organoleptiques ne soient pas affectées). L'ensemble des résultats obtenus met en évidence le rôle primordial de l'interface en présence de molécules pro-oxydantes hydrosolubles. On peut supposer que le mélange de PGPR et de DMG forme une barrière physique qui empêche le contact entre le fer et les lipides. Augmenter la proportion de PGPR dans le mélange tensioactif conduit au ralentissement de l'oxydation. Le PGPR contribuerait à la formation d'une couche interfaciale agissant comme une barrière physique des parties polaires des chaînes oligomériques qui sont plus volumineuses que celles des molécules de DMG. L'augmentation de la teneur relative en PGPR augmenterait l'épaisseur de cette barrière.

L'ensemble de ce travail de thèse montre que l'oxydation des lipides en émulsion inverse pour une huile donnée peut être contrôlée par la composition de la phase aqueuse et de l'interface eau-huile.

Plusieurs pistes de recherche peuvent être proposées afin d'approfondir la compréhension du phénomène d'oxydation dans les émulsions inverses et de développer des formulations plus stables vis-à-vis de l'oxydation. Compte-tenu du rôle de l'interface, une caractérisation plus fine de celle-ci (avec par exemple le dosage des tensioactifs présents et de leur conformation) permettrait de conforter certaines hypothèses avancées dans ce travail. Il serait intéressant aussi de faire varier la fraction de gouttes à concentration constante en pro-

oxydant dans la phase aqueuse ou en maintenant la quantité totale de pro-oxydant constante ce qui donnerait des informations intéressantes sur le rôle des interfaces.

Au niveau nutritionnel, si l'utilisation d'ions chélatants permet de réduire les effets pro-oxydants du fer, il faudra s'assurer que le fer reste biodisponible pour l'organisme. Un travail d'application mené sur des produits alimentaires réels tels que les margarines serait intéressant. Au niveau technologique, le microcalorimètre doit aussi faire ses preuves sur des huiles encore plus insaturées comme les huiles de poisson. Une analyse fine des courbes obtenues à des températures autres que 60 °C pourrait permettre de caractériser d'autres réactions d'oxydation que celle conduisant aux diènes conjugués. L'étude de l'oxydation des lipides pourrait être complétée par l'influence de la géométrie de l'échantillon et de l'aire interfaciale entre la phase lipidique et l'air, en utilisant différentes tailles et formes de coupelles. Enfin, une adaptation de l'appareillage pour minimiser les phénomènes d'évaporation est à envisager si on souhaite étendre cette technique à l'étude des émulsions huile-dans-eau.

Références bibliographiques

- Adachi, S., Tatsuji I., & Ryuichi M. 1995. « Autoxidation Kinetics for Fatty Acids and Their Esters ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72 (5): 547-51.
- Adhvaryu, A., Erhan S. Z., Liu Z. S., & Perez J. M. 2000. « Oxidation kinetic studies of oils derived from unmodified and genetically modified vegetables using pressurized differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance spectroscopy ». *Thermochimica Acta* 364 (1–2): 87-97.
- Akacha, N., & Gargouri M. 2009. « Enzymatic synthesis of green notes with hydroperoxide-lyase from olive leaves and alcohol-dehydrogenase from yeast in liquid/gas reactor ». *Process Biochemistry* 44 (10): 1122-27.
- Amadei, D., Chatzidaki M. D., Devienne J., Monteil J., Cansell M., Xenakis A., & Leal-Calderon F. 2014. « Low shear-rate process to obtain transparent W/O fine emulsions as functional foods ». *Food Research International* 62 (août): 533-40.
- Ambrosone, L., Angelico R., Cinelli G., Di Lorenzo V., & Ceglie A. 2002. « The Role of Water in the Oxidation Process of Extra Virgin Olive Oils ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79 (6): 577-82.
- Ambrosone, L., Mosca M., & Ceglie A. 2006a. « Oxidation of water emulsified olive oils ». *Food Hydrocolloids* 20 (7): 1080-86.
- Ambrosone, L., Cinelli G., Mosca M., & Ceglie A. 2006b. « Susceptibility of Water-Emulsified Extra Virgin Olive Oils to Oxidation ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83 (2): 165-70.
- Ambrosone, L., Mosca M., & Ceglie A. 2007. « Impact of edible surfactants on the oxidation of olive oil in water-in-oil emulsions ». *Food Hydrocolloids* 21 (7): 1163-71.
- Andersson, K., & Lingnert H. 1998. « Influence of Oxygen and Copper Concentration on Lipid Oxidation in Rapeseed Oil ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75 (8): 1041-46.
- Antolovich, M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S., & Robards K. 2002. « Methods for Testing Antioxidant Activity ». *Analyst* 127 (1): 183-98.
- Arain, S., Sherazi S. T. H., Bhangar M. I., Talpur F. N., & Mahesar S.A. 2009. « Oxidative stability assessment of Bauhinia purpurea seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat methods ». *Thermochimica Acta* 484 (1–2): 1-3.

- Aronson, M. P., & Petko M. F. 1993. « Highly Concentrated Water-in-Oil Emulsions: Influence of Electrolyte on Their Properties and Stability ». *Journal of Colloid and Interface Science* 159 (1): 134-49.
- Bastida-Rodriguez, J. 2013. « The Food Additive Polyglycerol Polyricinoleate (E-476): Structure, Applications, and Production Methods ». *International Scholarly Research Notices* 2013, 2013 (janvier): e124767.
- Benichou, A., Aserin A., & Garti N. 2001. « Polyols, High Pressure, and Refractive Indices Equalization for Improved Stability of W/O Emulsions for Food Applications ». *Journal of Dispersion Science and Technology* 22 (2-3): 269-80.
- Berton, C. 2011. « Construction raisonnée d'interfaces pour protéger les lipides émulsionnés contre l'oxydation ». Thèse soutenue à la Faculté des sciences et des techniques de l'Université de Nantes, Octobre 2011. 364 p.
- Berton, C., Genot C., & Ropers M. H. 2011a. « Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions ». *Journal of Colloid and Interface Science* 354 (2): 739-48.
- Berton, C., Ropers M. H., Viau M., & Genot C. 2011b. « Contribution of the Interfacial Layer to the Protection of Emulsified Lipids against Oxidation ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (9): 5052-61.
- Berton, C., Ropers M. H., Bertrand D, Viau M., & Genot C. 2012. « Oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilised with protein or surfactant emulsifiers in various oxidation conditions ». *Food Chemistry* 131 (4): 1360-69.
- Berton-Carabin, C., Genot C., Gaillard C., Guibert D., & Ropers M. H. 2013. « Design of interfacial films to control lipid oxidation in oil-in-water emulsions ». *Food Hydrocolloids* 33 (1): 99-105.
- Bonafini, S., Antoniazzi F., Maffei C., Minuz P., & Fava C. 2015. « Beneficial effects of ω -3 PUFA in children on cardiovascular risk factors during childhood and adolescence ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators, Eicosanoids and related compounds*, 120 (juillet): 72-79.
- Boskou D., Blekas G., & Tsimidou M. 2006. « Olive oil composition ». In *Olive Oil: Chemistry and Technology*, edited by Boskou D., AOCS Publishing, Illinois : 41-72.

- Budin, J. T., Breene W. M., & Putnam D. H. 1995. « Some Compositional Properties of Camelina (camelina Sativa L. Crantz) Seeds and Oils ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72 (3): 309-15.
- Burton, G. W., & Ingold K. U. 1981. « Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro ». *Journal of the American Chemical Society* 103 (21): 6472-77.
- Brochette, P. 1999. « Émulsification : Elaboration et étude des émulsions ». *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés 2 J2150: J2150.1-J2150.22*.
- Chaiyasit, W., Elias R. J., McClements D. J., & Decker E. A. 2007. « Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47 (3): 299-317.
- Charoen, R., Jangchud A., Jangchud K., Harnsilawat T., Decker E. A., & McClements D. J. 2012. « Influence of interfacial composition on oxidative stability of oil-in-water emulsions stabilized by biopolymer emulsifiers ». *Food Chemistry* 131 (4): 1340-46.
- Chen, B., McClements D. J., & Decker E. A. 2010. « Role of Continuous Phase Anionic Polysaccharides on the Oxidative Stability of Menhaden Oil-in-Water Emulsions ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (6): 3779-84.
- Chen, B., McClements D. J., & Decker E. A. 2011. « Minor Components in Food Oils: A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51 (10): 901-16.
- Cheng, Z., & Li Y. 2007. « What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update ». *Chemical Reviews* 107 (3): 748-66.
- Choe, E., & Min D. B. 2006. « Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5 (4): 169-86.
- Choe, E., & Min D. B. 2009. « Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8 (4): 345-58.
- Choi, S. J., Decker E. A., & McClements D. J. 2009. « Impact of iron encapsulation within the interior aqueous phase of water-in-oil-in-water emulsions on lipid oxidation ». *Food Chemistry* 116 (1): 271-76.

- Ciemniewska-Żytkiewicz, H., Ratusz K., Bryś J., Reder M., & Koczoń P. 2014. « Determination of the Oxidative Stability of Hazelnut Oils by PDSC and Rancimat Methods ». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 118 (2): 875-81.
- Clodoveo, M. L., Hachicha Hbaieb R., Kotti F., Mugnozza G., & Gargouri M. 2014. « Mechanical Strategies to Increase Nutritional and Sensory Quality of Virgin Olive Oil by Modulating the Endogenous Enzyme Activities ». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13 (2): 135-54.
- Conde, E., Gordon M. H., Moure A., & Dominguez H. 2011. « Effects of caffeic acid and bovine serum albumin in reducing the rate of development of rancidity in oil-in-water and water-in-oil emulsions ». *Food Chemistry* 129 (4): 1652-59.
- Corongiu, F. P., & Milia A. 1983. « An Improved and Simple Method for Determining Diene Conjugation in Autoxidized Polyunsaturated Fatty Acids ». *Chemico-Biological Interactions* 44 (3): 289-97.
- Cottrell, T., & Van Peij J. 2014. « Sorbitan Esters and Polysorbates ». In *Emulsifiers in Food Technology*, edited by Norn V., John Wiley & Sons, Ltd, Oxford : 271-96.
- Couedelo, L. 2011. « Biodisponibilité nutritionnelle de systèmes colloïdaux riches en acides gras polyinsaturés : études in vivo et in vitro ». Thèse soutenue à l'Université de Bordeaux 1, Novembre 2011. 205 p.
- Coupland, J. N., Zhu Z., Wan H., McClements D. J., Nawar W. W., & Chinachoti P. 1996. « Droplet Composition Affects the Rate of Oxidation of Emulsified Ethyl Linoleate ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73 (6): 795-801.
- Cross, C. K. 1970. « Oil Stability: A DSC Alternative for the Active Oxygen Method ». *Journal of the American Oil Chemists Society* 47 (6): 229-30.
- Cui, L., Cho H. T., McClements D. J., Decker E. A., & Park Y. 2016. « Effects of salts on oxidative stability of lipids in Tween-20 stabilized oil-in-water emulsions ». *Food Chemistry* 197, Part B (avril): 1130-35.
- Davis, S. S., Round H. P., & Purewal T. S. 1981. « Ostwald ripening and the stability of emulsion systems: an explanation for the effect of an added third component ». *Journal of Colloid and Interface Science* 80 (2): 508-11.
- Decker, E. A. 1998. « Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability ». *Trends in Food Science & Technology* 9 (6): 241-48.

- De Leonardis, A., & Macciola V. 2012. « Heat-Oxidation Stability of Palm Oil Blended with Extra Virgin Olive Oil ». *Food Chemistry* 135 (3): 1769-76.
- Dickinson, E. 1993. « Towards more natural emulsifiers ». *Trends in Food Science & Technology* 4 (10): 330-34.
- Dickinson, E. 1996. « Les Emulsions ». In : *Les colloïdes alimentaires*. Masson, Paris : 85-127.
- Doleschall, F., Kemeny Z., Recseg K., & Kövari K. 2002. « A New Analytical Method to Monitor Lipid Peroxidation during Bleaching ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (1): 14-18.
- Decker E. A. 2002. « Antioxidant Mechanisms ». In *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Food Science and Technology, edited by Akoh C. C., & Min D. B., Marcel Dekker, Inc, New York : 517-542.
- Evans, C. D., Schwab A. W., Moser H. A., Hawley J. E., & Melvin E. H. 1951. « The Flavor Problem of Soybean Oil. VII. Effect of Trace Metals ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 28 (2): 68-73.
- Erickson M. C. 2002. « Lipid Oxidation of Muscle Foods ». In *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Food Science and Technology, edited by Akoh C. C., & Min D. B., Marcel Dekker, Inc, New York : 365-411.
- Farhoosh, R., Einafshar S., & Sharayei P. 2009. « The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils ». *Food Chemistry* 115 (3): 933-38.
- Féart C., Samieri C., & Barberger Gateau P. 2010. « Diet and Alzheimer's disease : new evidence from epidemiological studies ». In *Recent Advances on Nutrition and the Prevention of Alzheimer's Disease*, edited by Ramassamy C., & Bastianetto S., Transworld Research Network, Trivandrum : 19-40.
- Frankel, E. N., Neff W. E., & Bessler T. R. 1979. « Analysis of Autoxidized Fats by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: V. Photosensitized Oxidation ». *Lipids* 14 (12): 961-67.
- Frankel, E. N., Neff W. E., Rohwedder W. K., Khambay B. P. S., Garwood R. F., & Weedon B. C. L. 1977. « Analysis of Autoxidized Fats by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: I. Methyl Oleate ». *Lipids* 12 (11): 901-7.
- Frankel, E. N. 2012a. « Chapter 8 - Control of oxidation ». In *Lipid Oxidation*, edited by Frankel E. N., Oily Press Lipid Library Series. Woodhead Publishing, Cambridge : 187-208.

- Frankel, E. N. 2012b. « Chapter 1 - Free radical oxidation ». In *Lipid Oxidation*, edited by Frankel E. N., Oily Press Lipid Library Series. Woodhead Publishing, Cambridge : 15-24.
- Frankel, E. N. 2012c. « Chapter 3 - Photooxidation of unsaturated fats ». In *Lipid Oxidation*, edited by Frankel E. N., Oily Press Lipid Library Series. Woodhead Publishing, Cambridge : 51-66.
- Frankel, E. N. 2012d. « Chapter 11 - Foods ». In *Lipid Oxidation*, edited by Frankel E. N., Oily Press Lipid Library Series. Woodhead Publishing, Cambridge : 299-354.
- Frankel, E. N. 2012e. « Chapter 2 - Hydroperoxide formation ». In *Lipid Oxidation*, edited by Frankel E. N., Oily Press Lipid Library Series. Woodhead Publishing, Cambridge : 25-50.
- Frankel, E. N. 2012f. « Chapter 5 - Methods to determine extent of oxidation ». In *Lipid Oxidation*, edited by Frankel E. N., Oily Press Lipid Library Series. Woodhead Publishing, Cambridge : 99-127.
- Frankel, E. N. 2012g. « Chapter 10 - Oxidation in multiphase systems ». In *Lipid Oxidation*, edited by Frankel E. N., Oily Press Lipid Library Series. Woodhead Publishing, Cambridge : 259-97.
- Frankel, E. N. 2012h. « Chapter 9 - Antioxidants ». In *Lipid Oxidation*, edited by Frankel E. N., Oily Press Lipid Library Series. Woodhead Publishing, Cambridge : 209-58.
- Fritsch, C. W. 1994. « Lipid oxidation – the other dimensions ». *Inform*, 5, 423-436.
- Fujisaki, M., Mohri S., Endo Y., & Fujimoto K. 2000. « The Effect of Oxygen Concentration on Oxidative Deterioration in Heated High-Oleic Safflower Oil ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77 (3): 231-34.
- Garcia Darras, C. 2012. « Conception et développement d'un microcalorimètre pour l'étude de l'oxydation d'une huile végétale ». Thèse soutenue à l'Université de Bordeaux 1, Mai 2012. 148 p.
- Gargouri, M., & Legoy M. D. 1997. « Bienzymatic reaction for hydroperoxide production in a multiphasic system ». *Enzyme and Microbial Technology* 21 (2): 79-84.
- Gargouri, M., & Legoy M. D. 2002. « A Two-Enzyme System for the Transformation of Unsaturated Oils to 9(S)-Hydroperoxy Fatty Acids ». *Biotechnology Letters* 24 (11): 915-18.
- Garti, N., & Aserin A. 1996. « Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants ». *Advances in Colloid and Interface Science* 65 (mai): 37-69.
- Gibbs J. W., 1931. « Thermodynamics ». In : *The Collected Works of J. Willard Gibbs*, Longman's Editions, New-York : 301-305.

- Gordon, M. H. 1990. « The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro ». In *Food Antioxidants*, edited by Hudson B. J. F., Elsevier Applied Food Science Series, London & New York : 1-18.
- Grechkin, A. 1998. « Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway ». *Progress in Lipid Research* 37 (5): 317-52.
- Gudipati, V, Sandra S., McClements D. J., & Decker E. A. 2010. « Oxidative Stability and in Vitro Digestibility of Fish Oil-in-Water Emulsions Containing Multilayered Membranes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (13): 8093-99.
- Guillén, M. D., & Goicoechea E. 2008. « Toxic Oxygenated α,β -Unsaturated Aldehydes and their Study in Foods: A Review ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48 (2): 119-36.
- Gülseren, İ., & Corredig M. 2014. « Interactions between polyglycerol polyricinoleate (PGPR) and pectins at the oil–water interface and their influence on the stability of water-in-oil emulsions ». *Food Hydrocolloids*, Food Colloids 2012: Creation and Breakdown of Structure, 34 (janvier): 154-60.
- Gunstone, F. D., & Harwood J. L. 2007. « Occurrence and Characterisation of Oils and Fats ». In *The Lipid Handbook*, edited by Gunstone F. D., Harwood J. L., & Dijkstra A. J., CRC Press, Boca Raton : 37-141.
- Gupta, C., Chawla P., Arora S., Tomar S. K., & Singh A. K. 2015. « Iron microencapsulation with blend of gum arabic, maltodextrin and modified starch using modified solvent evaporation method – Milk fortification ». *Food Hydrocolloids* 43 (janvier): 622-28.
- Guzun-Cojocar, T., Koev C., Yordanov M., Karbowski T., Cases E., & Cayot P. 2011. « Oxidative stability of oil-in-water emulsions containing iron chelates: Transfer of iron from chelates to milk proteins at interface ». *Food Chemistry* 125 (2): 326-33.
- Hachicha Hbaieb, R., Kotti F., Gargouri M., Msallem M., & Vichi S. 2016. « Ripening and Storage Conditions of Chétoui and Arbequina Olives: Part I. Effect on Olive Oils Volatiles Profile ». *Food Chemistry* 203 (juillet): 548-58.
- Halliwell, B., & Gutteridge J. M. 1990. « Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease: An Overview ». *Methods in Enzymology* 186: 1-85.
- Halterman, J. S., Kaczorowski J. M., Aligne C. A., Auinger P., & Szilagy P. G. 2001. « Iron Deficiency and Cognitive Achievement among School-Aged Children and Adolescents in the United States ». *Pediatrics* 107 (6): 1381-86.

- Hassel, R. L. 1976. « Thermal Analysis: An Alternative Method of Measuring Oil Stability ». *Journal of the American Oil Chemists Society* 53 (5): 179-81.
- Hegenauer, J., Saltman P., Ludwig D., Ripley L., & Bajo P. 1979. « Effects of supplemental iron and copper on lipid oxidation in milk. 1. Comparison of metal complexes in emulsified and homogenized milk ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27 (4): 860-67.
- Henney, J. E., Taylor C. L., & Boon C. S. 2010. *Strategies to Reduce Sodium Intake in the United States*, edited by institute of medicine of The National Academies, Washington : 506 p.
- Horn, A. F., Nielsen N. S., Jensen L. S., Horsewell A., & Jacobsen C. 2012. « The choice of homogenisation equipment affects lipid oxidation in emulsions ». *Food Chemistry* 134 (2): 803-10.
- Hsieh, R. J., & Kinsella J. E. 1989. « Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids : Mechanisms, Products, and Inhibition with Emphasis on Fish ». In *Advances in Food and Nutrition Research*, edited by Kinsella J. E., Academic Press. 33: 233-341.
- Hultin, H. O. 1994. « Oxidation of Lipids in Seafoods ». In *Seafoods : Chemistry, Processing Technology and Quality*, edited by Shahidi F., & Richard Botta J. R., Springer Science+Business Media, Surrey : 49-74.
- Huma, N., Rehman S. U., Anjum F. M., Murtaza M. A., & Sheikh M. A.. 2007. « Food Fortification Strategy-Preventing Iron Deficiency Anemia : A Review ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47 (3): 259-65.
- Hwang, D. 2000. « Fatty Acids and Immune Responses-a New Perspective in Searching for Clues to Mechanism ». *Annual Review of Nutrition* 20 (1): 431-56.
- Ichinose, T., Nobuyuki S., Takano H., Abe M., Sadakane K., Yanagisawa R., Ochi H., Fujioka K., Lee K.-G., & T. Shibamoto. 2004. « Liver Carcinogenesis and Formation of 8-Hydroxy-Deoxyguanosine in C3H/HeN Mice by Oxidized Dietary Oils Containing Carcinogenic Dicarbonyl Compounds ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 42 (11): 1795-1803.
- Ingold, K. U. 1969. « Peroxy radicals ». *Accounts of Chemical Research* 2 (1): 1-9.
- Innis, S. M. 1991. « Essential Fatty Acids in Growth and Development ». *Progress in Lipid Research* 30 (1): 39-103.

- Ivanov, I. I. 1985. « A relay model of lipid peroxidation in biological membranes ». *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine* 1 (4): 247-53.
- Jadhav S. J., Nimbalkar S. S., Kulkarni A. D., & Madhavi D. L., 1996. « Lipid oxidation in biological and food systems ». In : *Food antioxidants, Technological, Toxicological and Health Perspectives*, edited by Madhavi D. L., Deshpande S. S., & Salunkhe D. K., Marcel Dekker, Inc, New York : 5-64.
- Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., & Brulé G., 2006. « Opérations de stabilisation physicochimique ». In : *Science des aliments, 1: Stabilisation biologique et physico-chimique*, Tec & Doc Lavoisier Editions, Paris : 305-310.
- Jessup, W., Kritharides L., & Stocker R. 2004. « Lipid Oxidation in Atherogenesis: An Overview ». *Biochemical Society Transactions* 32 (1): 134-38.
- Jiang, Q., Christen S., Shigenaga M. K., Ames B. N. 2001. « Gamma-Tocopherol, the Major Form of Vitamin E in the US Diet, Deserves More Attention ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 74 (6): 714-22.
- Kabalnov, A. S., Pertzov A. V., & Shchukin E. D. 1987. « Ostwald ripening in emulsions ». *Journal of Colloid and Interface Science* 118 (2): 590-97.
- Kabalnov, A. S, Makarov K. N, Pertzov A. V, & Shchukin E. D. 1990. « Ostwald ripening in emulsions ». *Journal of Colloid and Interface Science* 138 (1): 98-104.
- Kabalnov, A. 2001. « Ostwald Ripening and Related Phenomena ». *Journal of Dispersion Science and Technology* 22 (1): 1-12.
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist L. Å. 1996. « The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols ». *Lipids* 31 (7): 671-701.
- Kamal-Eldin, A., Mäkinen, M., & Lampi, A. 2003. « The challenging contribution of hydroperoxides to the lipid oxidation mechanism ». In *Lipid oxidation pathways*, Edited by Kamal-Eldin A., AOCS Press, Illinois : 1-36.
- Kamal-Eldin, A. 2006. « Effect of Fatty Acids and Tocopherols on the Oxidative Stability of Vegetable Oils ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 108 (12): 1051-61.
- Kanavouras, A., A. Cert, & Hernandez R. J. 2005. « Oxidation of Olive Oil under Still Air ». *Food Science and Technology International* 11 (3): 183-89.

- Kargar, M., Spyropoulos F., & Norton I. T. 2011. « The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions ». *Journal of Colloid and Interface Science* 357 (2): 527-33.
- Kargar, M., Fayazmanesh K., Alavi M., Spyropoulos F., & Norton I. T. 2012. « Investigation into the potential ability of Pickering emulsions (food-grade particles) to enhance the oxidative stability of oil-in-water emulsions ». *Journal of Colloid and Interface Science* 366 (1): 209-15.
- Kasprzycka-Guttman, T., & Jarosz-Jarszewska M. 1995. « Specific heats and kinetic parameters of thermo-oxidative decomposition of peanut oil ». *Thermochimica Acta* 250 (1): 197-205.
- Ke, P. J., Ackman R. G., Linke B. A., & D. M. Nash. 1977. « Differential Lipid Oxidation in Various Parts of Frozen Mackerel ». *International Journal of Food Science & Technology* 12 (1): 37-47.
- Kelley, D. S., Taylor P. C., Nelson G. J., Schmidt P. C., Ferretti A., Erickson K. L., Yu R., Chandra R. K., & B. E. Mackey. 1999. « Docosahexaenoic Acid Ingestion Inhibits Natural Killer Cell Activity and Production of Inflammatory Mediators in Young Healthy Men ». *Lipids* 34 (4): 317-24.
- Kim, H., Kim S. G., Choi Y., Jeong H. S., & Lee J. 2008. « Changes in Tocopherols, Tocotrienols, and Fatty Acid Contents in Grape Seed Oils during Oxidation ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 85 (5): 487-89.
- Kiokias, S., & Oreopoulou V. 2006. « Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 7 (1-2): 132-39.
- Kiokias, S., Varzakas T., & Oreopoulou V. 2008. « In Vitro Activity of Vitamins, Flavonoids, and Natural Phenolic Antioxidants Against the Oxidative Deterioration of Oil-Based Systems ». *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48 (1): 78-93.
- Kotti, F., Jaziri K., Arab F., Mater Y., Sifi S., Fares N., Hammami M., & Gargouri M. 2010. « Lipoxygenase: Optimization of Extraction and Evaluation of its Contribution to Virgin Olive Oil Aroma ». *Food Biotechnology* 24 (1): 95-105.
- Kowalski, B., Ratusz K., Miciula A., & Krygier K. 1997. « Monitoring of rapeseed oil autoxidation with a pressure differential scanning calorimeter ». *Thermochimica Acta* 307 (2): 117-21.

- Krichene, D., Allalout A., Mancebo-Campos V., Salvador M. D., Zarrouk M., & Fregapane G. 2010. « Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions ». *Food Chemistry* 121 (1): 171-77.
- Krog, N. 1992. « The Role of Low-Polar Emulsifiers in Protein-Stabilized Food Emulsions ». In *Emulsions : A Fundamental and Practical Approach*, edited by Sjöblom J., NATO ASI Series 363, Bergen : 61-74.
- Kubow, S. 1993. « Lipid Oxidation Products in Food and Atherogenesis ». *Nutrition Reviews* 51 (2): 33-40.
- Kuhn, H., & Thiele B. J. 1999. « The diversity of the lipoxygenase family: Many sequence data but little information on biological significance ». *FEBS Letters* 449 (1): 7-11.
- Kuhn, H. 2000. « Structural Basis for the Positional Specificity of Lipoxygenases ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 62 (3): 255-70.
- Labuza, T. P., & Dugan L. R. 1971. « Kinetics of lipid oxidation in foods ». *C R C Critical Reviews in Food Technology* 2 (3): 355-405.
- Leal-Calderon, F., Schmitt V., & Bibette J. 2007. *Emulsion Science: Basic Principles*. Springer Science & Business Media.
- Lethuaut, L., Métro F., & Genot C. 2002. « Effect of Droplet Size on Lipid Oxidation Rates of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Protein ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79 (5): 425-30.
- Liem, D. G., Miremadi F., & Keast R. S. J. 2011. « Reducing Sodium in Foods: The Effect on Flavor ». *Nutrients* 3 (6): 694-711.
- Litwinienko, G. 2001. « Autooxidation of Unsaturated Fatty Acids and Their Esters ». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 65 (2): 639-46.
- López-Beceiro, J., Artiaga R., Gracia C., Tarrío-Saavedra J., Naya S., & Mier J. L. 2010. « Comparison of Olive, Corn, Soybean and Sunflower Oils by PDSC ». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 104 (1): 169-75.
- Lukiw, W. J., & Bazan N. G. 2008. « Docosahexaenoic Acid and the Aging Brain ». *Journal of Nutrition* 138 (12): 2510-14.

- Mabille, C., Schmitt V., Gorria P., Leal Calderon F., Faye V., Deminière B., & Bibette J. 2000. « Rheological and Shearing Conditions for the Preparation of Monodisperse Emulsions ». *Langmuir* 16 (2): 422-29.
- Mabrouk, A. F., & Dugan Jr L. R. 1961. « Kinetic Investigation into Glucose-, Fructose, and Sucrose-Activated Autoxidation of Methyl Linoleate Emulsion ». *Journal of the American Oil Chemists Society* 38 (12): 692-95.
- Mabrouk, A. F. 1964. « The Kinetics of Methyl Linoleate Emulsion Autoxidation in the Presence of Polyhydroxy Compounds ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 41 (4): 331-34.
- Marina, A. M., Che Man Y. B., Nazimah S. A. H., & Amin I. 2009. « Chemical Properties of Virgin Coconut Oil ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 86 (4): 301-7.
- Marmesat, S., Morales A., Velasco J., Ruiz-Mendez M. V., & Dobarganes M. C. 2009. « Relationship between Changes in Peroxide Value and Conjugated Dienes during Oxidation of Sunflower Oils with Different Degree of Unsaturation ». *Grasas Y Aceites* 60 (2): 155-60.
- Márquez, A. L., Medrano A., Panizzolo L. A., & Wagner J. R. 2010. « Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate ». *Journal of Colloid and Interface Science* 341 (1): 101-8.
- Marze, S. 2009. « Relaxation Processes of PGPR at the Water/Oil Interface Inferred by Oscillatory or Transient Viscoelasticity Measurements ». *Langmuir* 25 (20): 12066-72.
- Maté, J. I., Saltveit M. E., & Krochta J. M. 1994. « Effect of Oxygen Concentration and Relative Humidity on the Rancidity Process of Walnuts and Peanuts ». *HortScience* 29 (5): 537-537.
- McClements, D. J., & Decker E. A. 2000. « Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems ». *Journal of Food Science* 65 (8): 1270-82.
- McClements, D. J., & Weiss J. 2005. « Lipid Emulsions ». In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, edited by Shahidi F., John Wiley & Sons, Inc, New Jersey : 457-502.
- Mei, L., McClements D. J., Wu J., & Decker E. A. 1998a. « Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl ». *Food Chemistry* 61 (3): 307-12.
- Mei, L., Decker E. A., & McClements D. J. 1998b. « Evidence of Iron Association with Emulsion Droplets and Its Impact on Lipid Oxidation ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (12): 5072-77.

- Min D. B., & Boff J. M. 2002. « Lipid Oxidation of Edible Oil ». In *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Food Science and Technology, edited by Akoh C. C., & Min D. B., Marcel Dekker, Inc, New York : 353-364.
- Mistry, B. S., & Min. D. B. 1988. « Prooxidant Effects of Monoglycerides and Diglycerides in Soybean Oil ». *Journal of Food Science* 53 (6): 1896-97.
- Mora-Gutierrez, A., Attaie R., & Farrell H. M. 2010. « Lipid Oxidation in Algae Oil-in-Water Emulsions Stabilized by Bovine and Caprine Caseins ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (8): 5131-39.
- Morrison, W. R., & Smith L. M. 1964. « Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol». *Journal of Lipid Research* 5 (4): 600-608.
- Mosca, M., Ceglie A., & Ambrosone L. 2008a. « Antioxidant dispersions in emulsified olive oils ». *Food Research International* 41 (2): 201-7.
- Mosca, M., Ceglie A., & Ambrosone L. 2008b. « Biocompatible Water-in-Oil Emulsion as a Model to Study Ascorbic Acid Effect on Lipid Oxidation ». *The Journal of Physical Chemistry. B* 112 (15): 4635-41.
- Mosca, M., Ceglie A., & Ambrosone L. 2010. « Lipid Oxidation in Water-in-Olive Oil Emulsions Initiated by a Lipophilic Radical Source ». *The Journal of Physical Chemistry B* 114 (10): 3550-58.
- Mosca, M., Diantom A., Lopez F., Ambrosone L., & Ceglie A. 2013a. « Impact of Antioxidants Dispersions on the Stability and Oxidation of Water-in-Olive-Oil Emulsions ». *European Food Research and Technology* 236 (2): 319-28.
- Mosca, M., Cuomo F., Lopez F., & Ceglie A. 2013b. « Role of emulsifier layer, antioxidants and radical initiators in the oxidation of olive oil-in-water emulsions ». *Food Research International* 50 (1): 377-83.
- Nadin, M., Rousseau D., & Ghosh S. 2014. « Fat crystal-stabilized water-in-oil emulsions as controlled release systems ». *LWT - Food Science and Technology* 56 (2): 248-55.
- Nair, S. S. D., Leitch J. W., Falconer J., & Garg. M. L. 1997. « Prevention of Cardiac Arrhythmia by Dietary (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids and Their Mechanism of Action ». *The Journal of Nutrition* 127 (3): 383-93.

- Nakaya, K., Ushio H., Matsukawa S., Shimizu M., & Ohshima T. 2005. « Effects of Droplet Size on the Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions ». *Lipids* 40 (5): 501-7.
- Nawar, W. W. 1989. « Thermal Decomposition of Lipids ». In *Thermal Generation of Aromas*, ACS Symposium Series 409. American Chemical Society, 409: 94-104.
- Nawar W. W. 1996. « Lipids ». In *Food Chemistry*, edited by Fennema O. R., CRC Press, Madison : 225-319.
- Nuchi, C. D., Hernandez P., McClements D. J., & Decker E. A. 2002. « Ability of Lipid Hydroperoxides to Partition into Surfactant Micelles and Alter Lipid Oxidation Rates in Emulsions ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (19): 5445-49.
- O'Brien, P. J. 1969. « Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. Decomposition of a lipid peroxide by metal ions, heme compounds, and nucleophiles ». *Canadian Journal of Biochemistry* 47 (5): 485-92.
- O'Dwyer, S. P., O'Beirne D., Eidhin D. N., & O'Kennedy B. T. 2013. « Effects of sodium caseinate concentration and storage conditions on the oxidative stability of oil-in-water emulsions ». *Food Chemistry* 138 (2-3): 1145-52.
- O'Keefe, S. F., Wiley V. A., & Knauft D. A. 1993. « Comparison of Oxidative Stability of High- and Normal-Oleic Peanut Oils ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70 (5): 489-92.
- Osborn, H. T., & Akoh C. C. 2004. « Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions ». *Food Chemistry* 84 (3): 451-56.
- Pardauil, J. J., Souza L. K., Molfetta F. A., Zamian J. R., Filho G. N., & Da Costa C. E. 2011. « Determination of the Oxidative Stability by DSC of Vegetable Oils from the Amazonian Area ». *Bioresource Technology* 102 (10): 5873-77.
- Petukhov, I., Malcolmson L. J., Przybylski R., & Armstrong L. 1999. « Frying Performance of Genetically Modified Canola Oils ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76 (5): 627-32.
- Ponginebbi, L., Nawar W. W., & Chinachoti P. 1999. « Oxidation of Linoleic Acid in Emulsions: Effect of Substrate, Emulsifier, and Sugar Concentration ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76 (1): 131-38.

- Prigge, S. T., Boyington J. C., Faig M., Doctor K. S., Gaffney B. J., & Amzel L. M. 1997. « Structure and mechanism of lipoxygenases ». *Biochimie* 79 (11): 629-36.
- Przybylski, R., & Eskin N. A. M. 1988. « A Comparative Study on the Effectiveness of Nitrogen or Carbon Dioxide Flushing in Preventing Oxidation during the Heating of Oil ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 65 (4): 629-33.
- Przybylski, R. 2005. « Flax Oil and High Linolenic Oils ». In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, edited by Shahidi F., John Wiley & Sons, Inc, New Jersey : 281-301.
- Przybylski, R., Mag T., Eskin N. A. M., & McDonald B. E. 2005. « Canola Oil ». In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, edited by Shahidi F., John Wiley & Sons, Inc, New Jersey : 61-121.
- Raczyk, M., Popis E., Kruszewski B., Ratusz K., & Rudzińska M. 2016. « Physicochemical Quality and Oxidative Stability of Linseed (*Linum Usitatissimum*) and Camelina (*Camelina Sativa*) Cold-Pressed Oils from Retail Outlets ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 118 (5): 834-39.
- Raikos, V., Neacsu M., Morrice P., & Duthie G. 2014. « Physicochemical Stability of Egg Protein-Stabilised Oil-in-Water Emulsions Supplemented with Vegetable Powders ». *International Journal of Food Science & Technology* 49 (11): 2433-40.
- Rejeb, I, Monser L, & Gargouri M. 2010. « New Analytical Method Using Coupled Enzymes for Determination of Polyunsaturated Fatty Acid Content in Olive Oil ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162 (6): 1536-46.
- Roman, O., Heyd B., Broyart B., Castillo R., & Maillard M. N. 2013. « Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions ». *LWT - Food Science and Technology* 52 (1): 49-59.
- Ruíz, A., Ayora Cañada M. J., & Lendl B. 2001. « A Rapid Method for Peroxide Value Determination in Edible Oils Based on Flow Analysis with Fourier Transform Infrared Spectroscopic Detection ». *The Analyst* 126 (2): 242-46.
- Sathivel, S., Huang J., & Prinyawiwatkul W. 2008. « Thermal properties and applications of the Arrhenius equation for evaluating viscosity and oxidation rates of unrefined pollock oil ». *Journal of Food Engineering* 84 (2): 187-93.

- Schaich, K. M. 2005. « Lipid Oxidation : Theoretical Aspects ». In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, edited by Shahidi F., John Wiley & Sons, Inc, New Jersey : 269-354.
- Schantz, B., & Rohm H. 2005. « Influence of lecithin–PGPR blends on the rheological properties of chocolate ». *LWT - Food Science and Technology* 38 (1): 41-45.
- Seppanen, C. M., Song Q., & Saari Csallany A. 2010. « The Antioxidant Functions of Tocopherol and Tocotrienol Homologues in Oils, Fats, and Food Systems ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87 (5): 469-81.
- Shahidi, F., Wanasundara U., & Brunet N. 1994. « Oxidative stability of oil from blubber of harp seal (*Phoca groenlandica*) as assessed by NMR and standard procedures ». *Food Research International* 27 (6): 555-62.
- Shahidi, F., Wanasundara U. N. 2002. « Methods for Measuring Oxidative Rancidity in Fats and Oils ». In *Food Lipids : Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. Food Science and Technology, edited by Akoh C. C., & Min D. B., Marcel Dekker, Inc, New York : 465-487.
- Shahidi, F., & Zhong Y. 2005. « Lipid Oxidation: Measurement Methods ». In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, edited by Shahidi F., John Wiley & Sons, Inc, New Jersey : 357-385.
- Shahidi, F., & Zhong Y. 2010. « Lipid Oxidation and Improving the Oxidative Stability ». *Chemical Society Reviews* 39 (11): 4067-79.
- Shantakumari, N., Ali Eldeeb R., Abdelzaher Mabrouk Ibrahim S., Sreedharan J., & Otoum S. 2014. « Effect of PUFA on patients with hypertension : A hospital based study ». *Indian Heart Journal* 66 (4): 408-14.
- Shimada, K., Okada H., Matsuo K., & Yoshioka S. 1996. « Involvement of Chelating Action and Viscosity in the Antioxidative Effect of Xanthan in an Oil/Water Emulsion ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 60 (1): 125-27.
- Silvestre, M. P., Chaiyasit W., Brannan R. G., McClements D. J., & Decker E. A. 2000. « Ability of Surfactant Headgroup Size to Alter Lipid and Antioxidant Oxidation in Oil-in-Water Emulsions ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (6): 2057-61.
- Šimon, P., & Kolman L. 2001. « DSC Study of Oxidation Induction Periods ». *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 64 (2): 813-20.
- Simopoulos, A. P. 1991. « Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease and in Growth and Development ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 54 (3): 438-63.

- Sims, R. J., Fioriti J. A., & Trumbetas J. 1979. « Effect of Sugars and Sugar Alcohols on Autoxidation of Safflower Oil in Emulsions ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56 (8): 742-45.
- Smith, R. M & Martell, A. E. 1975. « Critical stability constants ». Plenum Press (3rd ed.), New York and London.
- Stathopoulos, C. E., Chockchaisawasdee S., Doyle J., O'Kennedy B. T., & Mounsey J. S. 2009. « Effect of Mineral Fortification on Textural and Oxidative Stability of Reduced-Fat Spreads ». *International Journal of Food Properties* 12 (2): 368-78.
- Stern, B. R., Solioz M., Krewski D., Aggett P., Aw T. C., Baker S., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C., Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., & Starr T. 2007. « Copper and Human Health: Biochemistry, Genetics, and Strategies for Modeling Dose-Response Relationships ». *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 10 (3): 157-222.
- Stohs, S. J., & Bagchi D. 1995. « Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions ». *Free Radical Biology and Medicine* 18 (2): 321-36.
- Subramanian, R., Nandini K. E., Sheila P. M., Gopalakrishna A. G., Raghavarao K. S. M. S., Nakajima M., Kimura T., & Maekawa T. 2000. « Membrane Processing of Used Frying Oils ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77 (3): 323-28.
- Tadros, T. F. 2005. « Surfactants in Personal Care and Cosmetics ». In *Applied Surfactants : Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim : 399-432.
- Tan, C. P., Che Man Y. B., Selamat J., & Yusoff M. S. A. 2001. « Application of Arrhenius Kinetics to Evaluate Oxidative Stability in Vegetable Oils by Isothermal Differential Scanning Calorimetry ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78 (11): 1133-38.
- Tan, C. P, & Che Man Y. B. 2002. « Recent developments in differential scanning calorimetry for assessing oxidative deterioration of vegetable oils ». *Trends in Food Science & Technology* 13 (9–10): 312-18.
- Tan, C. P., Che Man Y. B., Selamat J., & Yusoff M. S. A. 2002. « Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods ». *Food Chemistry* 76 (3): 385-89.

- Taylor, G. I. 1934. « The Formation of Emulsions in Definable Fields of Flow ». *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 146 (858): 501-23.
- Taylor, M. S. 2011. « Stabilisation of Water-in-Oil Emulsions to Improve the Emollient Properties of Lipstick ». Thèse soutenue à l'Université de Birmingham, Janvier 2011. 144 p.
- Thurgood, J., Ward R., & Martini S. 2007. « Oxidation kinetics of soybean oil/anhydrous milk fat blends: A differential scanning calorimetry study ». *Food Research International* 40 (8): 1030-37.
- Ulkowski, M., Musialik M., & Litwinienko G. 2005. « Use of Differential Scanning Calorimetry to Study Lipid Oxidation. 1. Oxidative Stability of Lecithin and Linolenic Acid ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (23): 9073-77.
- Ushikubo, F. Y., & Cunha R. L. 2014. « Stability mechanisms of liquid water-in-oil emulsions ». *Food Hydrocolloids, Food Colloids 2012: Creation and Breakdown of Structure*, 34 (janvier): 145-53.
- Van der Merwe, G. H., du Plessis L. M., & Taylor J. R. N. 2004. « Changes in Chemical Quality Indices during Long-Term Storage of Palm-Olein Oil under Heated Storage and Transport-Type Conditions ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84 (1): 52-58.
- Vecchio, S., Cerretani L., Bendini A., & Chiavaro E. 2009. « Thermal Decomposition Study of Monovarietal Extra Virgin Olive Oil by Simultaneous Thermogravimetry/Differential Scanning Calorimetry: Relation with Chemical Composition ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (11): 4793-4800.
- Velasco, J., & Dobarganes C. 2002. « Oxidative Stability of Virgin Olive Oil ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (9-10): 661-76.
- Velasco, J., Andersen M. L., & Skibsted L. H. 2004. « Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry ». *Food Chemistry* 85 (4): 623-32.
- Vittadini, E., Lee J. H., Frega N. G., Min D. B., & Vodovotz Y. 2003. « DSC Determination of Thermally Oxidized Olive Oil ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80 (6): 533-37.

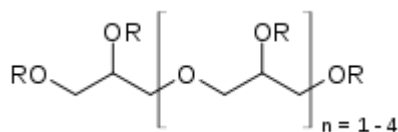
- Walter, T., Olivares M., F. Pizarro, & Muñoz C. 1997. « Iron, Anemia, and Infection ». *Nutrition Reviews* 55 (4): 111-24.
- Walter, T., Pizarro F., Abrams S. A., & Boy E. 2004. « Bioavailability of Elemental Iron Powder in White Wheat Bread ». *European Journal of Clinical Nutrition* 58 (3): 555-58.
- Wanasundara, U. N., Shahidi F., & Jablonski C. R. 1995. « Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidative stability of canola and soybean oils ». *Food Chemistry* 52 (3): 249-53.
- Wanasundara, P. K. J. P. D., & Shahidi F. 2005. « Antioxidants: Science, Technology, and Applications ». In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, edited by Shahidi F., John Wiley & Sons, Inc, New Jersey : 431-489.
- Waraho, T., McClements D. J., & Decker E. A. 2011a. « Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions ». *Trends in Food Science & Technology* 22 (1): 3-13.
- Waraho, T., McClements D. J., & Decker E. A. 2011b. « Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions ». *Food Chemistry* 129 (3): 854-59.
- Warner, K., & Knowlton S. 1997. « Frying Quality and Oxidative Stability of High-Oleic Corn Oils ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (10): 1317-22.
- Welsh, J. A., & Cunningham S. A. 2011. « The Role of Added Sugars in Pediatric Obesity ». *Pediatric Clinics of North America*, Update in Childhood and Adolescent Obesity, 58 (6): 1455-66.
- Wendel, A. 2000. « Lecithin ». In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, Inc. 1-17.
- White P. J. 1995. « Conjugated Diene, Anisidine Value, and Carbonyl Value Analyses ». In *Methods to Assess Quality and Stability of Oils and Fat-Containing Foods*. edited by Warner K., & Eskin M., AOCS Publishing, Illinois : 159-178.
- Wills, E. D. 1965. « Mechanisms of lipid peroxide formation in tissues Role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 98 (2): 238-51.
- Wilson, R., Van Schie B. J., & Howes D. 1998. « Overview of the Preparation, Use and Biological Studies on Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR) ». *Food and Chemical Toxicology: An*

International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association 36 (9-10): 711-18.

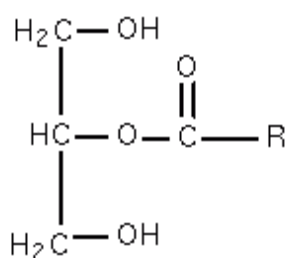
- Yamauchi, R., Goto Y., Kato K., & Ueno Y. 1984. « Prooxidant Effect of Dihydroxyacetone and Reducing Sugars on the Autoxidation of Methyl Linoleate in Emulsions ». *Agricultural and Biological Chemistry* 48 (4): 843-48.
- Yi, J., Zhu Z., McClements D. J., & Decker E. A. 2014. « Influence of Aqueous Phase Emulsifiers on Lipid Oxidation in Water-in-Walnut Oil Emulsions ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (9): 2104-11.
- Yildiz, G, Wehling R. L., & Cuppett S. L. 2003. « Comparison of Four Analytical Methods for the Determination of Peroxide Value in Oxidized Soybean Oils ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80 (2): 103-7.
- Yoshida, H. 1994. « Composition and Quality Characteristics of Sesame Seed (*Sesamum Indicum*) Oil Roasted at Different Temperatures in an Electric Oven ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65 (3): 331-36.
- Zhu, Q., Wu F., Saito M., Tatsumi E., & Yin L. 2016. « Effect of magnesium salt concentration in water-in-oil emulsions on the physical properties and microstructure of tofu ». *Food Chemistry* 201 (juin): 197-204.
- Ziboh, V. A. 1996. « The Significance of Polyunsaturated Fatty Acids in Cutaneous Biology ». *Lipids* 31 Suppl (mars): S249-53.
- Zubr, J. 2009. « Camelina oil in human nutrition ». *Agro Food industry hi-tech* 20 (4): 22-28.

Annexes

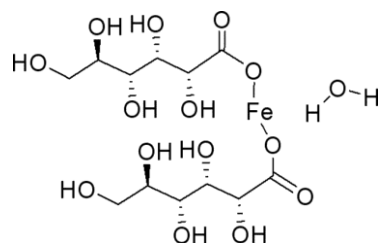
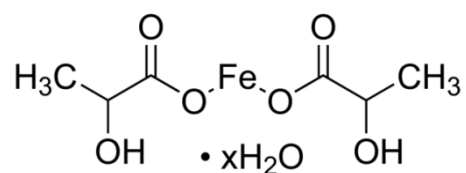
Annexe 1. Formules chimiques

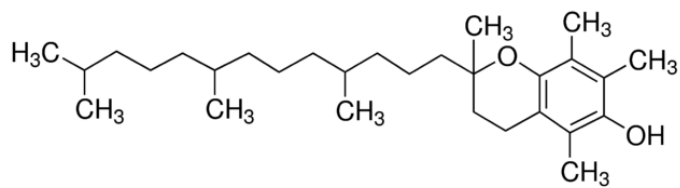


Polyricinoléate de polyglycérol

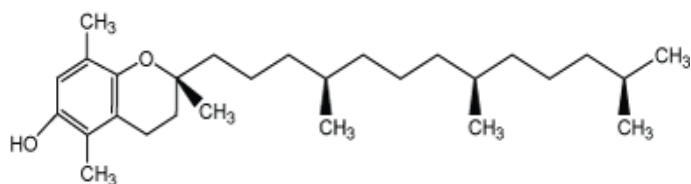


Monoglycérides distillés

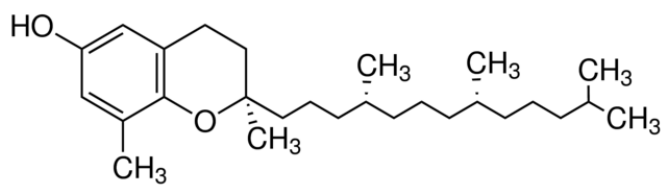
Gluconate de fer hydraté $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7)_2\text{Fe}\cdot x\text{H}_2\text{O}$ Lactate de fer hydraté $[\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO}]_2\text{Fe}\cdot x\text{H}_2\text{O}$



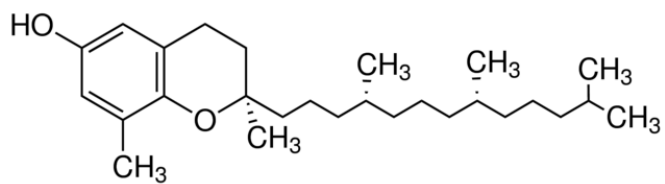
A



B



C



D

Standards de tocophérols α (A) , β (B), γ (C) et δ (D).

Annexe 2. Calibration du microcalorimètre

La procédure de calibration consiste en l'injection d'une puissance connue $P(t)$ dissipée par effet Joule sur la face supérieure du capteur. Considérant le signal obtenu S^m mesuré par la thermopile correspondante et le signal S^b qui définit la ligne de base (la tension mesurée lorsque $P=0$). On définit alors :

$$S = S^m - (\alpha S^b + b) \quad (1)$$

L'ensemble des expériences réalisées permettent d'identifier, pour chaque température, la valeur des paramètres τ , S_b et α .

S est représentative de $P(t)$. Dans cette équation, α est une constante proche de 1 et b correspond à un offset entre les deux thermopiles. Nous faisons la grande hypothèse que S est gouvernée par l'équation différentielle suivante :

$$\tau \frac{dS}{dt} + S = \alpha P(t) \quad (2)$$

τ (s) est le temps de réponse caractéristique de la cellule de mesure et α (V/W) sont respectivement le temps et le gain de la cellule de mesure (gain du capteur). Etant donné que l'on connaît $P(t)$, la réponse dynamique peut être calculée par la formule de Laplace :

$$L(S) = \frac{\alpha L(P)}{1 + p\tau} \quad (3)$$

Dans cette équation, $L(S)$, $L(P)$ sont les transformées de Laplace de S et $P(t)$ et p la variable de Laplace. Dans ce travail, $P(t)$ est une fonction en forme d'escaliers (Figure 1).

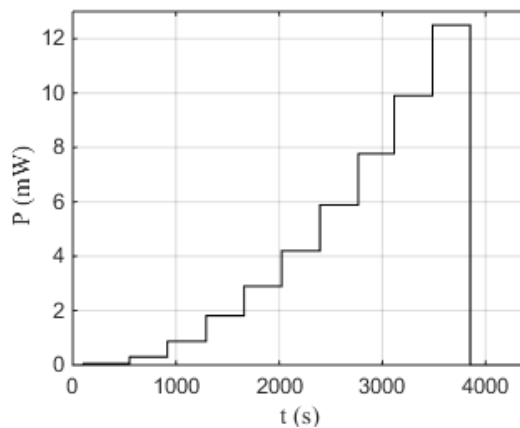


Figure 1. Puissance injectée dans la coupelle.

Les résultats obtenus sont les suivants :

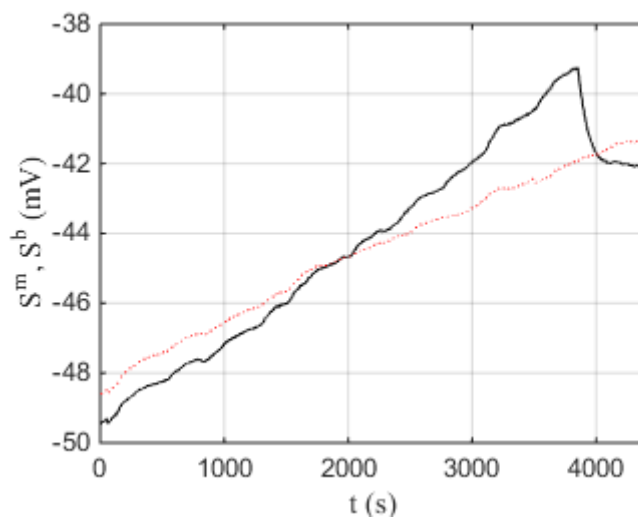


Figure 2. Ligne de base S^b (-), signal de la coupelle de l'échantillon S^m (-).

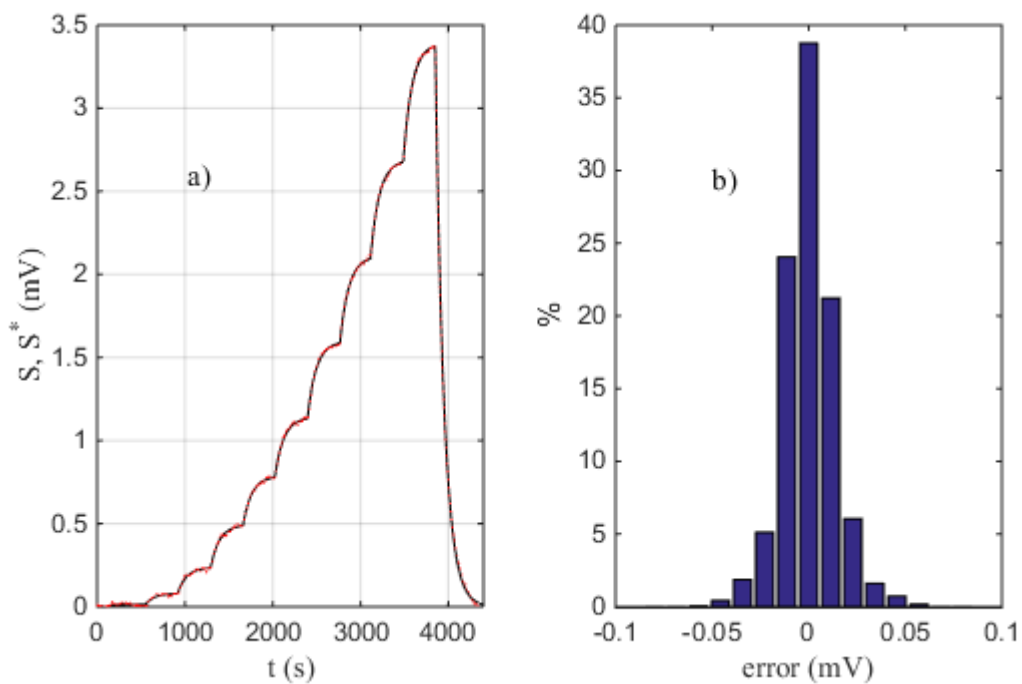


Figure 3. a) solution exacte de l'équation (2) S^* (-), signal corrigé S après optimisation (-) ; b) distribution de l'erreur.

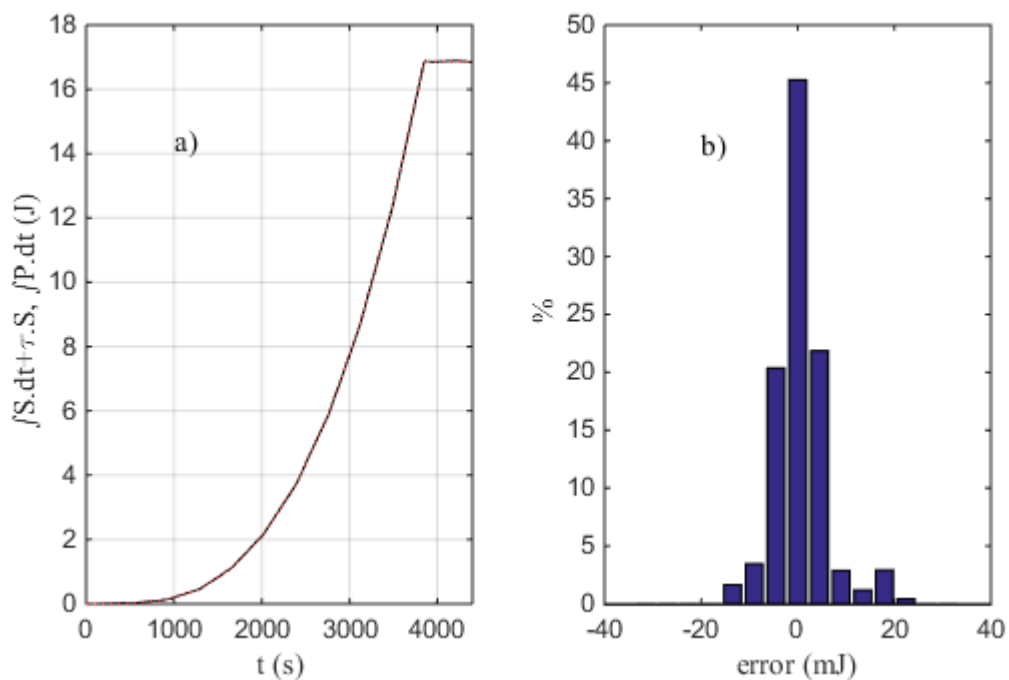
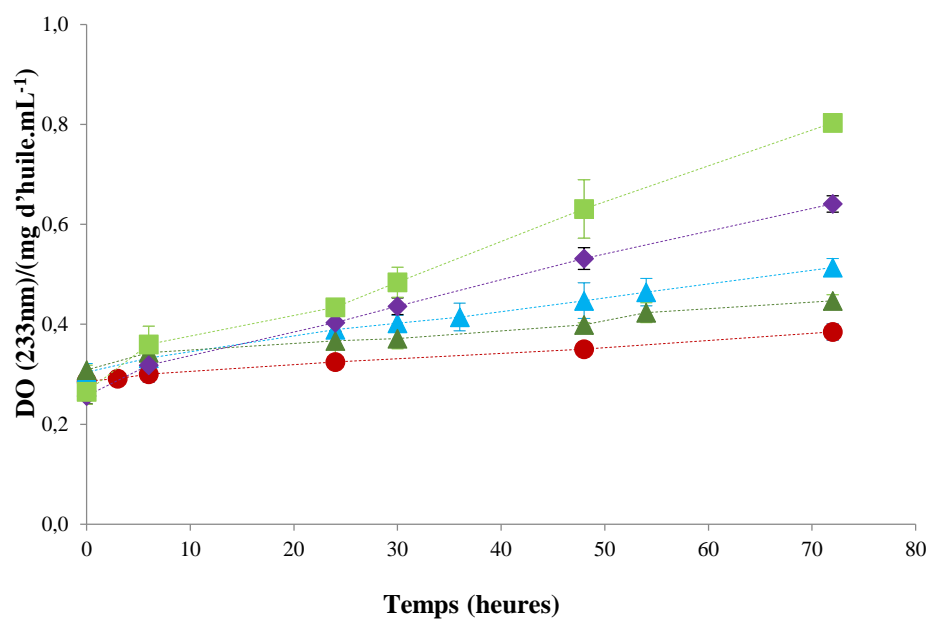
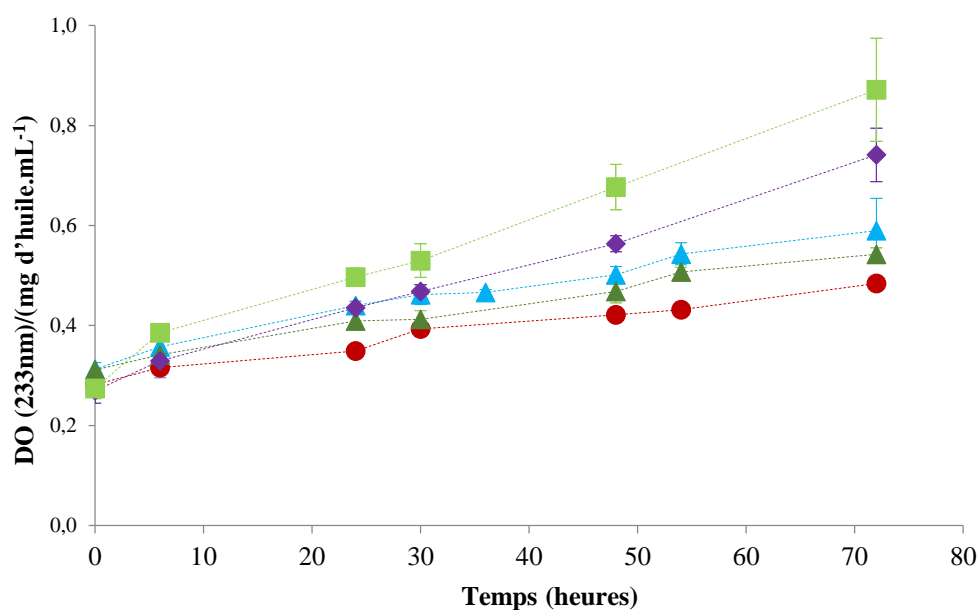


Figure 4. a) valeurs exactes de l'énergie dégagée en fonction du temps (-), valeurs résultant de l'intégration de S (-) ; b) distribution de l'erreur.

Annexe 3. Evolution de la densité optique normalisée en fonction du temps à 60 °C pour différentes huiles brutes et agitées



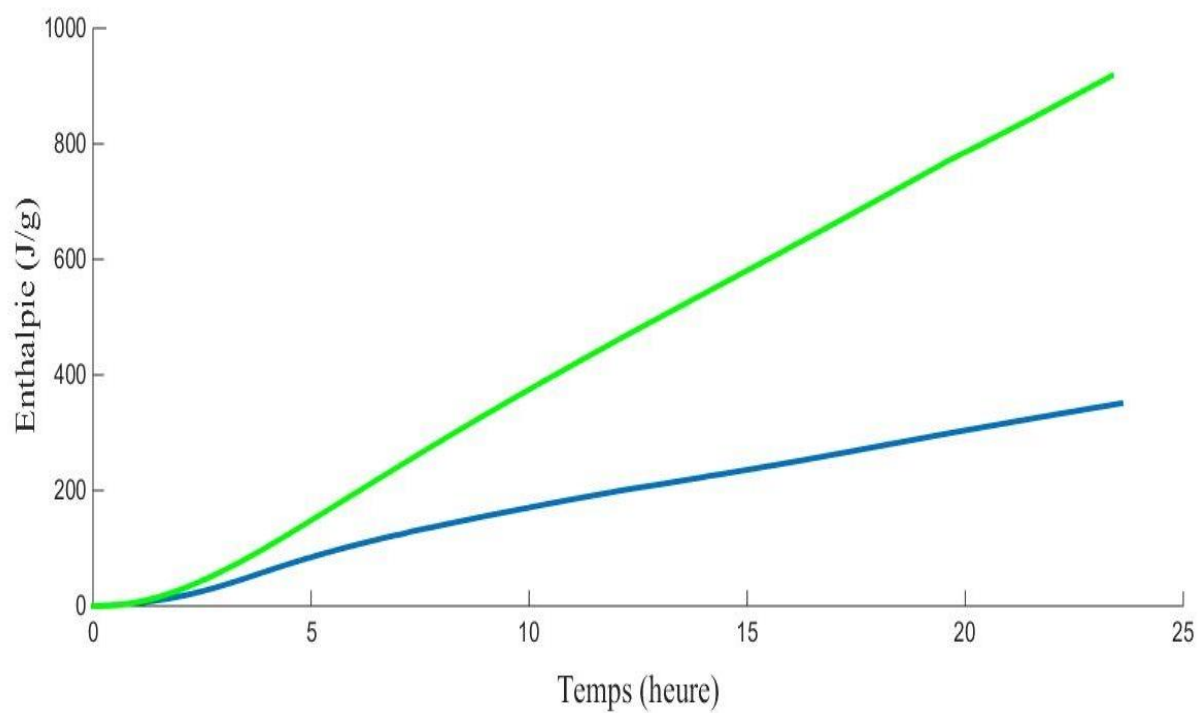
A



B

Evolution de la densité optique normalisée en fonction du temps à 60° C pour différentes huiles brutes (A) et agitées (B) : lin vierge (■), cameline vierge (◆), colza vierge (▲) et raffinée (▲) et olive vierge (●) (mesures réalisées dans des conditions isothermes à 60 °C, dans des coupelles en cuivre).

Annexe 4. Evolution de l'enthalpie en fonction de la disponibilité de l'oxygène dans la coupelle en cuivre



Evolution de l'enthalpie en fonction du temps pour l'huile de lin dans des conditions isothermes à 60° C dans des coupelles en cuivre (sans couvercle (●) et avec couvercle (●)).

Production scientifique

Publications dans les journaux scientifiques avec comité de lecture

-Characterization of lipid oxidation in plant oils by micro-calorimetry.

W. Dridi, J. Toutain, A. Sommier, W. Essafi, M. Gargouri, F. Leal-Calderon, M. Cansell.
Food Chemistry, (2016), **197**, Part A (avril): 709-13.

-Influence of formulation on the oxidative stability of water-in-oil emulsions.

W. Dridi, W. Essafi, M. Gargouri, F. Leal-Calderon, M. Cansell.
Food Chemistry, (2016), **202** (juillet): 205-11.

Communications lors de congrès

- **Communications orales**

-JIB 2015, Les 14^{èmes} Journées Internationales de Biotechnologie, (Djerba, Tunisie, 20-24 Décembre 2015),

W. Dridi, J. Toutain, A. Sommier, W. Essafi, M. Gargouri, F. Leal Calderon, M. Cansell,
Etude directe de l'oxydation des émulsions eau-dans-huile par calorimétrie différentielle.

-JSI INAT 2015, Les 3^{èmes} Journées Scientifiques de l'Institut National de l'Agronomie de Tunisie, (Tunis, Tunisie, 27-28 Mai 2015),

W. Dridi, W. Essafi, M. Cansell, M. Gargouri, F. Leal Calderon,
Effet de la composition de la phase aqueuse sur l'oxydation des émulsions eau-dans-huile.

-JIB 2014, Les 13^{èmes} Journées Internationales de Biotechnologie, (Hammamet, Tunisie, 20-24 Décembre 2014),

W. Dridi, J. Toutain, A. Sommier, W. Essafi, M. Gargouri, F. Leal Calderon, M. Cansell,
Analyse de composés primaires d'oxydation des huiles végétales à l'aide d'une technique innovante basée sur la microcalorimétrie.

-CIP1 2014, Workshop Chimie Industrielle et Procédés (Hammamet, Tunisie, 17-19 Mars 2014),

W. Dridi, W. Essafi, M. Gargouri, M. Cansell, F. Leal Calderon,
Etude du profil oxydatif des émulsions inverses alimentaires.

- **Communications par affiche**

-12th Euro Fed Lipid Congress, (Montpellier, France, 14-17 Septembre 2014),

W. Dridi, J. Toutain, A. Sommier, W. Essafi, F. Leal Calderon, M. Cansell,
Novel technique based on differential calorimetry analysis for the evaluation of primary oxidation compounds in vegetable oils.

-ATSB 2013, Le 24^{ème} Forum International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie, (Sousse, Tunisie, 25-28 Mars 2013),

W. Dridi, W. Essafi, M. Gargouri, M. Cansell, F. Leal Calderon,
Study of emulsified lipids oxidation.

- JIB 2012, Les 11^{èmes} Journées Internationales de Biotechnologie, (Mahdia, Tunisie, 19-22 Décembre 2012),

W. Dridi, M. Gargouri, F. Leal Calderon, M. Cansell, W. Essafi,
Etude de l'oxydation des lipides dans les émulsions.

Communications orales lors de journées scientifiques

-Journée Doctorale du Laboratoire de Matériaux, Traitement et Analyse LMMA, (Tunis, Tunisie, 1 Décembre 2015),

W. Dridi, W. Essafi, M. Gargouri, F. Leal Calderon, M. Cansell,
Etude de l'oxydation des lipides émulsionnés.

-17^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences Chimiques, (Bordeaux, France, 16 Avril 2015),

W. Dridi, W. Essafi, M. Gargouri, F. Leal Calderon, M. Cansell,
Oxydation des émulsions eau-dans-huile : Impact de la composition de la phase aqueuse et de la nature de l'interface eau/huile.

Titre : Influence de la formulation sur l'oxydation des huiles végétales en émulsion eau-dans-huile

Résumé :

L'oxydation des lipides est un phénomène chimique qui provoque la dégradation des qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments. Cette oxydation dépend de plusieurs paramètres (température, lumière, présence de métaux de transition, présence d'enzymes, état de dispersion des lipides ...) qu'il est important de maîtriser notamment au cours du procédé de fabrication du produit alimentaire ou de son stockage. Dans ce contexte, l'oxydation des lipides a été étudiée, à travers la mesure des composés primaires d'oxydation, en phase continue et en émulsion eau-dans-huile. Différentes huiles alimentaires présentant des taux variés en acide α -linoléinique (18:3 n-3) ont été choisies. Différentes formulations d'émulsion ont été étudiées (composition de l'interface en polyricinoléate de polyglycérol (PGPR)/monoglycérides distillés, présence de métaux pro-oxydants, d'espèces chélatantes). En revanche, la fraction volumique de phase aqueuse (40%) et le diamètre des gouttelettes d'eau (1 μm) sont maintenus constants. Parallèlement, une méthode de dosage rapide et innovante basée sur la microcalorimétrie différentielle a été mise au point pour un suivi en continu des cinétiques d'oxydation. Pour les 4 huiles végétales étudiées en phase continue et en émulsion, l'oxydabilité est liée à leur teneur en acide α -linoléinique, avec la hiérarchie suivante : huile de lin > huile de caméline > huile de colza > huile d'olive. Plus la concentration en molécules pro-oxydantes (sulfate de fer) dans la phase aqueuse est élevée, plus l'oxydation des lipides est importante. L'état de valence du fer et le remplacement du fer par du cuivre n'ont pas d'impact significatif sur la cinétique d'oxydation. En revanche, il est possible de contrôler l'action pro-oxydante du fer II en jouant sur la nature du contre-ion (poids moléculaire, pouvoir chélatant) ou sur la proportion de PGPR utilisée pour stabiliser les émulsions. L'ensemble des résultats obtenus suggère que les tensioactifs lipophiles présents à l'interface eau-huile n'empêchent pas l'interaction des ions pro-oxydants avec les molécules lipidiques de la phase continue mais que leur organisation à l'interface module l'oxydation des lipides.

Mots clés : Oxydation, huile insaturée, émulsion inverse, calorimétrie, spectrophotométrie, corrélation.

Title : Influence of formulation on vegetable oils oxidation in water-in-oil emulsions

Abstract :

Oxidation is ubiquitous in lipids and causes degradation of organoleptic and nutritional qualities of foods. Lipid oxidation depends on various parameters (temperature, light, transition metals, lipid dispersion state ...) that have to be controlled during food processing and storage. In this context, lipid oxidation was followed by measuring the content of primary oxidation products, for lipids in bulk phase and in water-in-oil emulsions. Different edible oils were chosen for their contents of α -linolenic acid (18: 3 n-3). Emulsions were formulated at varying polyglycerol polyricinoleate (PGPR)/distilled monoglycerides concentration ratios (surfactant ratio), with or without the presence of pro-oxidant metals or chelators. In all experiments, the aqueous volume fraction (40%) and the droplet mean diameter (1 μ m) remained constant. Besides this study, an innovative and rapid method based on differential microcalorimetry was developed for monitoring the kinetics of lipid oxidation. The oxidability of the studied oils was related to their content in α -linolenic acid according the following order: linseed oil > camelina oil > rapeseed oil > olive oil. The rate of lipid oxidation increased with the iron sulfate concentration in the water phase. The iron valence or the replacement of iron by copper had no significant impact on the oxidation kinetics. However, both the chemical nature of the counter ion (molecular weight, chelating power) and the proportion of PGPR used to stabilize the emulsions were influential factors. On the whole, our results suggest that surfactants at the water-oil interface do not prevent pro-oxidant species to interact with lipids in the continuous phase but that their organization at the interface is a key parameter for controlling lipid oxidation.

Keywords : Oxydation, insaturated oil, inverse emulsion, calorimetry, spectrophotometry, correlation.

Unités de recherche

- **Institut de Chimie & Biologie des Membranes & des Nano-objects CBMN - CNRS**
UMR 5248, Allée Geoffroy Saint Hilaire 33600 Pessac, France.
- **Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique INRAP -**
Technopole de Sidi Thabet, Sidi Thabet 2020, Ariana, Tunisie.