



HAL
open science

Extraction-formulation de produits naturels issus du végétal dans des émulsions stables et conception de formulations sèches bioactives : Conception d'extrémulsion de curcumine

Alice Dall'Armellina

► To cite this version:

Alice Dall'Armellina. Extraction-formulation de produits naturels issus du végétal dans des émulsions stables et conception de formulations sèches bioactives : Conception d'extrémulsion de curcumine. Autre. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0284 . tel-03510348

HAL Id: tel-03510348

<https://theses.hal.science/tel-03510348v1>

Submitted on 4 Jan 2022

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 DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

École Doctorale N° 536
Sciences & Agrosciences

Spécialité / Discipline de doctorat :
Chimie

Laboratoire de Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles
Institut des Biomolécules Max Mousseron – UMR 5247

Présentée par
Alice Dall'armellina

**Extraction-formulation de produits naturels
issus du végétal dans des émulsions stables et
conception de formulations sèches bioactives**

Conception d'extrémulsion de curcumine

En vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences
Soutenue le 10 juin 2021

Composition du jury :

Dr. Grégory Chatel, Maître de conférences-HDR, Université de Savoie **Rapporteur**

Pr. Sophie Fourmentin, Professeur, Université Littoral Côte d'Opale **Rapporteur**

DR. Patrick Borel, Directeur de Recherche-INRAE, Aix-Marseille Université **Examineur**

Pr. Farid Chemat, Professeur, Avignon Université **Examineur**

Dr. Isabelle Texier-Nogues, Ingénieur chercheur, CEA Grenoble **Examinatrice**

Dr. Christine Contino-Pépin, Maître de conférences-HDR, Avignon Université **Directrice de thèse**

Mr. Mathias Letan, Responsable R&D et industrialisation, Entreprise Lyofal **Invité**

Mr. Olivier Rigaud, Président Directeur Général, Entreprise Corbion **Invité**

À mes parents et à mon frère,

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au laboratoire de Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles (CBSA) de l'Université d'Avignon, actuellement dirigée par la Dr Christine Contino-Pépin. Je remercie grandement l'entreprise Lyofal, dirigée par Medhi Nagaz, et la Région Provence Alpes Côtes d'Azur pour leur soutien financier qui a permis la réalisation de ce travail.

Je remercie vivement le Dr Grégory Chatel et le Pr Sophie Fourmentin pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs, les Prs Patrick Borel et Farid Chemat et le Dr Isabelle Texier-Nogues en tant qu'examineurs, Olivier Rigaud et Mathias Letan en tant qu'invité. Merci à vous tous de l'intérêt que vous avez manifesté à l'égard de ce travail. Je remercie également le Dr Claire Dufour pour les conseils prodigués durant mes comités de suivi de thèse et pour m'avoir permis de réaliser les expériences de granulométrie.

Je suis particulièrement reconnaissante envers ma directrice de thèse Christine Contino-Pépin qui m'a fait confiance et a su m'encourager tout au long de cette thèse. Elle m'a permis de découvrir le monde de l'entrepreneuriat ainsi que les collaborations avec des industriels *via* le brevet extrémulsions. Grâce à elle, cette expérience de thèse a été très enrichissante et m'a fait mûrir.

Je tiens à remercier grandement Mathias Letan et Charles Duval de l'entreprise Lyofal à Salon-de-Provence pour leur accueil, leur aide et leur apport scientifique au cours de ces travaux. Cette collaboration m'a donné l'occasion d'élargir mon champ de compétences, de prendre connaissance des contraintes industrielles et d'avoir une vision différente sur mon sujet de thèse.

Je souhaite également remercier le Pr Patrick Borel et le Dr Charles Desmarchelier de l'équipe C2VN à Marseille avec qui nous avons collaboré lors de ma dernière année de thèse. Les expériences réalisées dans leur équipe m'ont permis de m'initier aux tests cellulaires et aux modèles de digestion *in vitro*. Je suis ravie d'avoir pu étendre mon sujet de thèse jusqu'à l'étude de la bioaccessibilité de la curcumine encapsulée dans nos systèmes.

Merci également à Isabelle Bornard de l'équipe pathologie végétale INRA pour les images de microscopie électronique que nous avons pu obtenir sur les extrémulsions et pour son implication dans la recherche de solution afin d'améliorer leur qualité.

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr Carole Mathe De Souza, au Dr Louis Fagbohoun et à Mr Frédéric Thiebaut pour leur aide lors de la mise au point de la méthode d'analyse par chromatographie liquide haute performance des extraits de curcuma.

Je présente également mes remerciements à mes collègues : J-B, Valentin, Marine, Victoria, Grégory, Émilie, Noémie, Shiraz, Floriane et Maxence pour leur bonne humeur, leur humour et leur gentillesse qui ont rendu mes journées de travail rayonnantes malgré les aléas d'une thèse. Je souhaite remercier Pierre pour ses précieux conseils lors de mes comités de thèse, pour sa formation sur le logiciel Igor qui m'a été très utile ainsi que pour son aide à la résolution de tous mes problèmes informatiques. Et bien-sûr je ne pourrais oublier Stéphane qui a toujours été d'un grand soutien et d'une grande écoute. C'était un réel plaisir de travailler à tes côtés !

Toute ma reconnaissance va également aux anciens membres de l'équipe, Françoise Bonneteau, pour sa formation et ses connaissances précieuses sur la diffusion dynamique de la lumière, et Anaïs pour sa joie de vivre contagieuse.

J'ai particulièrement apprécié la compagnie des membres de mon bureau : Elodie, Valou, Adrien, Fatina, Louise, Marie et Milan qui ont fait de ces années de thèse une partie de plaisir et qui m'ont poussé à me surpasser ; des stagiaires et doctorants avec qui j'ai partagé de bons moments: Gaby, Léna, Cécile, Léa, Amandine, Harish, Antonija, Enrico, Hussein, Marta, Dario, Maxime, Maria, Mathias, Hamed, Honoré, Belmys, Aditya... ; des collègues du département de chimie : Delphine, Céline, Simon, Emmanuel,... ; Karine Olivier et Saad Merah, pour leur immense gentillesse, leur disponibilité et leur soutien.

Je souhaite bien-sûr remercier mes colocataires qui m'ont supporté pendant cette dernière année : Louise, Pierre, Léo et Aurélia (mention toute particulière à toi mon petit Lou : tu es ma rencontre la plus exceptionnelle) mais aussi mes amis des écuries et maintenant bien plus : Lucie (ma jumelle paraît-il), Charline et Valentin qui ont su être présent et me redonner le sourire quand je ressentais le besoin de m'évader ; ainsi que leurs parents Line, Philippe, Nathalie et Raymond. Je pense aussi aux très belles rencontres que j'ai faites à Avignon en dehors de la thèse et particulièrement John, Lulu et Tophy.

Merci à Anne Hurtebis pour ses corrections d'anglais réalisées avec rigueur.

Je remercie également Agathe, Julie, Claire, Léa, Eva, Pacco, Soraya, Léonie, Tommy, Quentin, Vince, Pauline, Bibi, Seb, Lionel, Elodie et Jérôme pour leurs soutiens.

Enfin mes parents qui m'ont apporté un soutien indescriptible et que je ne remercierai

jamais assez et bien-sûr mon petit frère qui a encore une fois joué le rôle de grand frère en me motivant quand il le fallait et en me faisant décompresser quand j'en avais le plus besoin.

Un immense merci à vous tous d'avoir été là pour moi.

Résumé

L'extraction de la curcumine à l'aide de solvants organiques toxiques et polluants ainsi que sa faible solubilité dans l'eau sont deux obstacles actuels qui limitent l'exploitation de cette ressource médicinale. À ce jour, l'extraction dans l'eau de la curcumine à partir de curcuma reste un défi. Le travail présenté ici résout ces deux problèmes par une stratégie simple, en une seule étape, basée sur l'utilisation des ultrasons. L'extraction de la curcumine, à partir de *C. longa*, combinée à l'encapsulation au sein de nanoémulsions appelées « extrémulsions », suivie de la lyophilisation des nanoémulsions chargées en curcumine, est décrite dans cette étude. Différents milieux d'extraction et paramètres de traitement ont été étudiés. Une sonde à ultrasons a été employée (en utilisant différentes variables telles que le temps de sonication effective, le rapport cyclique et l'intensité ultrasonore délivrée) pour développer cette technique en une étape, à base d'eau, afin d'extraire la curcumine directement du curcuma. La formulation et l'extraction optimales ont été obtenues en utilisant des gouttelettes huileuses composées de tributyrine et d'un mélange de triglycérides C₈-C₁₀ stabilisées par du TPGS 1000 dans l'eau. L'extraction de la curcumine à l'aide des extrémulsions a été comparée à l'extraction au Soxhlet dans l'acétone comme protocole conventionnel. Les extrémulsions ont permis d'obtenir un taux de recouvrement en curcumine de 63 %. De plus, la conservation des propriétés physico-chimiques des extrémulsions pendant le processus de lyophilisation a été étudiée. Des extrémulsions sèches avec une vitesse de redispersion rapide ont été obtenues avec succès après avoir optimisé les paramètres de lyophilisation. Les résultats de cette étude confirment l'intérêt de ce procédé innovant pour l'extraction et l'encapsulation dans l'eau d'un actif naturel lipophile comme la curcumine à partir de sa matrice d'origine, le tout en une seule étape. Cette étude apporte également une solution au problème de biodisponibilité de la curcumine, lié à son insolubilité dans l'eau, par le biais d'extrémulsions sèches de curcumine.

Mots clés : éco-extraction, nanoémulsions, curcumine, lyophilisation

Abstract

The use of polluting and toxic solvents for curcumin extraction and its low water solubility are major drawbacks limiting the exploitation of curcumin as medicinal resource. To date, water extraction of curcumin from turmeric remains a challenge. The work presented here solves both problems with a simple, one-step strategy based on the use of ultrasounds. The combined extraction and encapsulation of curcumin from *C. longa* using nanoemulsions, followed by freeze-drying of the curcumin-loaded nanoemulsions called extremulsions, has been reported in this study. Different extraction media and processing parameters were investigated. An ultrasonic probe was used (using different variables such as sonication time, duty cycle and ultrasonic intensity) to develop this one-step, water-based technique to extract curcumin directly from turmeric. Optimal formulation and extraction were achieved using oil droplets composed of tributyrin and a mixture of triglycerides C₈-C₁₀ stabilized with TPGS 1000 in water. The extraction of curcumin using extremulsions was compared to conventional Soxhlet-assisted extraction in acetone taken as reference yield (100%). Extremulsions afforded a 63% recovery rate of curcumin. In addition, the preservation of the physico-chemical properties (droplet size and size distribution) of extremulsions during the freeze-drying process was investigated. Dry extremulsions with a fast redispersion speed were successfully obtained after optimization of freeze-drying parameters. The results of this study demonstrate the potential of this original process combining in a single step solvent-free extraction and encapsulation of liposoluble natural products, and its efficient use for dual extraction and encapsulation of curcumin from turmeric. This study also provides a solution to the problem of bioavailability of curcumin, due to its low water solubility, through dry extremulsions of curcumin.

Keywords: eco-extraction, nanoemulsion, curcumin, freeze-drying

Table des matières

<i>Résumé</i>	1
<i>Abstract</i>	2
<i>Table des matières</i>	3
<i>Abréviations et acronymes</i>	7
<i>Introduction générale</i>	9
<i>Chapitre I : Généralités sur l'extraction de molécules bioactives, leur encapsulation dans des NEs et le séchage des NEs par lyophilisation</i>	15
1 Extraction de substances végétales bioactives : méthodes conventionnelles et méthodes innovantes	16
1.1 Molécules bioactives : Définition et classification	16
1.2 Importance de l'éco-extraction	17
1.3 Techniques d'extraction conventionnelle	18
1.3.1 Soxhlet	18
1.3.2 Macération	20
1.3.3 Hydrodistillation	20
1.4 Techniques d'extraction non conventionnelles	20
1.4.1 Extraction assistée par micro-ondes	21
1.4.2 Extraction par fluide supercritique	23
1.4.3 Extraction assistée par ultrasons	25
1.4.4 Extraction assistée par champ électrique pulsé	28
1.4.5 Extraction assistée par chauffage ohmique	29
1.4.6 Techniques d'extraction non-conventionnelles moins courantes	30
1.4.7 Conclusion sur les techniques d'extraction	31
2 Les nanoemulsions (NEs): propriétés, préparation et applications dans l'industrie agroalimentaire	32
2.1 Propriétés et stabilité des NEs	32

2.2	Techniques de préparation des NEs	36
2.2.1	Émulsification à basse énergie	37
2.2.2	Émulsification à forte énergie	38
2.3	Caractérisation des NEs	39
2.4	Application des NEs dans l'industrie agroalimentaire	41
3	Exemple d'encapsulation de molécule bioactive dans des NEs : la curcumine	43
3.1	Aspects généraux de la curcumine	43
3.2	Les principaux enjeux liés à l'administration de la curcumine	45
3.3	Stabilité et bioaccessibilité de la curcumine encapsulée dans des NEs	46
4	Lyophilisation des NEs	49
4.1	Cycle de lyophilisation	51
4.1.1	Congélation	51
4.1.2	Sublimation	52
4.1.3	Dessiccation	53
4.2	Cryo et lyoprotecteurs	54
4.3	Lyophilisation de NEs	56
4.4	Caractérisation du lyophilisat	57
4.4.1	Aspect macroscopique	57
4.4.2	Vitesse de reconstitution	57
4.4.3	Humidité résiduelle	58
4.4.4	Calorimétrie différentielle à balayage	58
4.4.5	Distribution en taille et potentiel zêta	59
4.4.6	Microscopie électronique	59
4.4.7	Teneur en principe actif	60
	<i>Objectifs de la thèse</i>	71
	<i>Chapitre II : Extrémulsions de curcumine : preuve de concept et étude de la composition idéale des formulations</i>	74
	One-pot solvent-free extraction and formulation of lipophilic natural products: application to the preparation of dry extracts-emulsions of curcumin called "extremulsions"	77

<i>Chapitre III : Extrémulsions de curcumine : étude des paramètres de traitement</i>	<i>109</i>
“Extremulsion” of curcumin from <i>Curcuma longa</i> – Improvement of concentration and stability via the ultrasound-assisted extraction conditions and the formulation composition.....	111
<i>Chapitre IV : Étude du séchage des extrémulsions par lyophilisation</i>	<i>137</i>
Effect of freeze-drying process and conditions on the stability of curcumin-loaded nanoemulsions	139
<i>Discussion générale</i>	<i>163</i>
<i>Conclusion</i>	<i>179</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>180</i>

Abréviations et acronymes

D _H	Diamètre hydrodynamique ou hydrodynamic diameter
DLS	Dynamic Light Scattering ou Diffusion dynamique de la lumière
DSC	Differential scanning calorimetry ou calorimétrie différentielle à balayage
DC	Duty cycle ou rapport cyclique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography ou Chromatographie liquide haute performance
Log	Logarithme
NE	Nanoémulsion
PDI	Indice de polydispersité ou polydispersity index
PEG	Poly éthylène glycol
pH	Potentiel hydrogène
T	Température
t	Temps
T _c	Température de collapse
TFA	acide trichloroacétique
Tg'	Température de transition vitreuse
TPGS	Tocophérol polyéthylène glycol succinate
t _R	Temps de rétention
US	Ultrasons
v/v	Rapport volumique
w/v	Rapport poids/volume
%	Pourcentage
i.e.	id est ; c'est-à-dire

Unités

°C	Degré Celsius
°	Degré
g/L, mg/L	Gramme/milli-gramme par litre
min	Minute
sec	Seconde
h	Heure
W	Watt
W/cm ²	Watt par centimètre carré
mL, µL	Milli-/microlitres
cm, mm, µm, nm	Centi/milli/micro/nanomètre
µg, mg, g	Micro/nanogrammes
rpm	Révolution par minute
G	Gravité unité
°C/min	Degré Celsius par minute
mg/mL, µg/mL, ng/mL	Milli/micro/nanogramme par millilitre
kHz	KiloHertz
J/g	Joule par gramme
g/mol	Gramme par mole

Introduction générale

L'extraction des produits naturels remonte aux civilisations antiques. Les extraits étaient des ingrédients de base dans la nutrition, l'esthétique et les rituels spirituels. Aujourd'hui, il n'existe pas un seul processus de production dans les industries de la parfumerie, des cosmétiques, de la pharmacie, de l'alimentation, des biocarburants, des matériaux ou de la chimie fine qui ne fasse pas appel à des procédés d'extraction (Chemat et al., 2017). Les techniques d'extraction solide-liquide conventionnelles telles que le Soxhlet ou la macération sont longues à mettre en œuvre et utilisent une grande quantité de solvants organiques. L'efficacité de ces techniques dépend principalement des solvants employés et ceux-ci sont choisis en fonction des propriétés du composé cible à extraire. Ils peuvent être chlorés comme le chloroforme ou non chlorés comme l'acétone et le méthanol. L'utilisation de ces solvants est problématique car ils sont inflammables, toxiques et, malgré leur élimination en fin de procédé, des résidus peuvent être présents dans les produits finaux commercialisés. Ces inconvénients ont poussé les chercheurs à étudier des techniques d'extraction alternatives, plus durables et qui limitent l'utilisation de solvants toxiques. La chimie verte, guidée par les douze principes proposés par Anastas et Warner, est à la base de ces préoccupations (Anastas and Warner, 1998). De plus, l'intérêt grandissant des consommateurs pour des alternatives plus vertes et des ingrédients plus naturels a suscité un engouement commercial vers ces voies d'extraction.

Ces dernières années, la demande des consommateurs a particulièrement changé dans le domaine de l'alimentation. Ceux-ci sont à la recherche de produits alimentaires plus naturels qui contribuent directement à leur santé. Les aliments n'ont plus seulement pour vocation d'apporter des nutriments ou de satisfaire la faim, ils ont aussi pour vocation de prévenir des maladies et d'améliorer le bien-être des consommateurs (Laura Domínguez Díaz et al., 2019). Des produits tels que les nutraceutiques (de la contraction entre nutrition et pharmaceutique) et les aliments fonctionnels (composés alimentaires qui offrent des avantages pour la santé humaine grâce à l'ajout de composants spécifiques) ont ainsi vu le jour. Les composants spécifiques de ces nouveaux produits sont des molécules bioactives, extraites des plantes, qui possèdent des propriétés pharmacologiques (Tringali, 2011). Néanmoins, l'emploi des molécules bioactives d'origine végétale reste limité en raison de leur instabilité dans les conditions physiologiques, qui implique une dégradation chimique et une transformation métabolique lors de la digestion et une faible biodisponibilité. Ainsi, le développement de systèmes permettant d'encapsuler, de protéger et de délivrer ces composés fonctionnels est

un enjeu actuel majeur. Aujourd'hui, la nanoencapsulation s'avère être une technique efficace et prometteuse en raison des caractéristiques intéressantes qu'apportent les nanoémulsions (NEs) telles que la petite taille de leurs gouttelettes, leur stabilité cinétique et leur aspect modulable (McClements et al., 2007).

Dans ce contexte, le développement de technologies nouvelles et innovantes pour extraire et encapsuler des composés bioactifs suscite un intérêt considérable. Les nouveaux procédés doivent être non seulement efficaces, mais aussi bon marché pour être considérés comme réalisables et compétitifs pour les industriels. Afin de réduire les coûts, les procédés intégrés, qui tendent à répondre à plusieurs problématiques en un nombre limité d'étapes, représentent une stratégie à privilégier face aux procédés isolés. Ainsi, la combinaison des technologies émergentes d'extraction et d'encapsulation permet de réduire le temps de traitement, la consommation de matières premières et la production de déchets afin d'obtenir des produits à haute valeur ajoutée avec une teneur élevée en composés cibles ayant une durée de conservation prolongée et une bio-accessibilité accrue (Santana and Macedo, 2019).

Dans ces travaux de thèse, nous proposons d'étudier la faisabilité et les limites de la combinaison d'une extraction assistée par ultrasons et de l'encapsulation dans des NEs de composés bioactifs lipophiles à partir de plantes. Le procédé d'extraction décrit est innovant et permet de répondre, en une seule étape, aux problématiques actuelles d'éco-extraction et de formulation. Il tend à répondre aux exigences de la chimie verte en remplaçant les solvants organiques par un mélange d'eau, d'huile et d'un tensioactif biocompatible dérivé du tocophérol approuvé par la « Food and Drug Administration » pour des applications alimentaires et thérapeutiques. A la suite de ce procédé, les formulations chargées en composés bioactifs sont qualifiées d'« extrémulsions » pour « extrait et émulsion ». Une étape supplémentaire de séchage des extrémulsions est proposée afin d'obtenir des poudres stables, facilement stockables et aisément dispersibles dans l'eau.

Le développement de ce procédé a été appliqué à la double extraction et encapsulation de la curcumine à partir de poudre de rhizome de curcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae). Traditionnellement utilisé comme épice ou colorant dans la cuisine indienne et asiatique, le curcuma est composé de trois curcuminoïdes. L'un d'entre eux, la curcumine, est une molécule bioactive présentant des propriétés médicinales précieuses telles que des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses et ayant un potentiel prometteur pour le traitement de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et de

Parkinson (Liu et al., 2016). Cependant, la teneur en curcumine des racines de curcuma n'est que de 2 à 8 %, d'où l'intérêt de l'extraction (Sharma et al., 2005). De plus, ses bénéfices santé sont limités par sa faible solubilité dans l'eau et son instabilité dans les conditions physiologiques qui entraînent sa transformation rapide via le métabolisme et une biodisponibilité très basse (Kunnumakkara et al., 2019). C'est pourquoi différentes stratégies ont été étudiées pour améliorer la stabilité *in vivo* et la solubilité dans l'eau de cette molécule. L'encapsulation dans des NEs se révèle être une des solutions les plus prometteuses (Zou et al., 2015).

Ce manuscrit se divise en 4 chapitres. Le premier chapitre est dédié au contexte général et basé sur l'étude des données de la littérature. Il dresse l'état de l'art des techniques d'extraction non-conventionnelles en présentant leurs avantages et inconvénients par rapport aux techniques conventionnelles. Les généralités sur les NEs et leurs applications liées à leur stabilité et leur aspect modulable y sont décrites ainsi que les généralités sur la curcumine et la lyophilisation des NEs. Les chapitres 2 à 4 concernent le développement du travail expérimental sous la forme de trois publications. En premier lieu, la preuve de concept du procédé appliqué à la curcumine ainsi que la détermination de la composition idéale de la formulation sont présentées (chapitre 2). Puis, le chapitre 3 décrit l'optimisation des paramètres de traitement ultrasonore, de pré- et post-traitement. Enfin, les paramètres permettant de préserver au mieux les caractéristiques physico-chimiques des extrémulsions au cours de leur transformation en poudres par lyophilisation ont été étudiés (chapitre 4). A la fin du manuscrit, une discussion générale confronte les résultats obtenus avec ceux de la littérature, et présente les limites et les perspectives envisageables du procédé proposé.

REFERENCES

- Anastas, P.T., Warner, J.C., 1998. Green chemistry: theory and practice. Oxford University Press, Oxford [England]; New York.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Kunnumakkara, A.B., Harsha, C., Banik, K., Vikkurthi, R., Sailo, B.L., Bordoloi, D., Gupta, S.C., Aggarwal, B.B., 2019. Is curcumin bioavailability a problem in humans: lessons from clinical trials. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 15, 705–733. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1650914>
- Laura Dominguez Diaz, Fernández-Ruiz, V., Camara, M., 2019. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1549–7852.
- Liu, W., Zhai, Y., Heng, X., Che, F.Y., Chen, W., Sun, D., Zhai, G., 2016. Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *Journal of Drug Targeting* 24, 694–702. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2016.1157883>
- McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J., 2007. Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science* 72, R109–R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- Santana, Á.L., Macedo, G.A., 2019. Challenges on the processing of plant-based neuronutraceuticals and functional foods with emerging technologies: Extraction, encapsulation and therapeutic applications. *Trends in Food Science & Technology* 91, 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.019>
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer, Cancer Chemoprevention - An Update on a Novel and Exciting Field of Oncology* 41, 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Tringali, C., 2011. Bioactive Compounds from Natural Sources : Natural Products as Lead Compounds in Drug Discovery. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b11196>
- Zou, L., Zheng, B., Liu, W., Liu, C., Xiao, H., McClements, D.J., 2015. Enhancing nutraceutical

bioavailability using excipient emulsions: Influence of lipid droplet size on solubility and bioaccessibility of powdered curcumin. *Journal of Functional Foods* 15, 72–83.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.044>

Chapitre I : Généralités sur l'extraction de molécules bioactives, leur encapsulation dans des NEs et le séchage des NEs par lyophilisation

Ce chapitre expose les techniques d'extraction existantes, conventionnelles ou non, et le principe d'éco-extraction afin de comprendre l'intérêt de développer un nouveau procédé d'extraction « vert ». Il vise aussi à décrire les NEs et leurs applications dans le domaine de l'industrie agroalimentaire et l'intérêt d'encapsuler les molécules bioactives dans ces systèmes en prenant l'exemple de la curcumine. Enfin, ce chapitre détaille les généralités sur la lyophilisation des NEs dans le but de comprendre en quoi ce procédé peut améliorer leur stabilité.

1 Extraction de substances végétales bioactives : méthodes conventionnelles et méthodes innovantes

L'histoire de l'utilisation des plantes par l'Homme est aussi ancienne que celle de l'humanité. A l'origine, les populations utilisaient les plantes pour leurs besoins nutritionnels puis, avec la découverte de leurs propriétés médicinales, elles ont été employées à des fins curatives. On trouve deux types de métabolites dans les plantes. Les métabolites primaires sont les substances destinées à la croissance et au développement des plantes tandis que les métabolites secondaires aident à la survie en leur permettant d'interagir avec leur environnement ("Introduction to ecological biochemistry, 4th Edition," 1994). Par exemple, les huiles essentielles qui sont des terpènes volatils peuvent permettre à la plante de repousser les herbivores et les insectes. Parmi tous les métabolites secondaires, certains ont un effet sur les systèmes biologiques et sont considérés comme bioactifs.

1.1 Molécules bioactives : Définition et classification

Par définition, les composés bioactifs d'origine végétale sont les métabolites secondaires des plantes qui ont des effets toxicologiques et pharmacologiques chez l'humain et l'animal (Suleria et al., 2019). Les molécules bioactives peuvent être classées d'un point de vue clinique, pharmacologique ou botanique mais, certains composés chimiquement apparentés peuvent, par exemple, avoir des résultats cliniques différents, ce qui complique leur classement. Il est donc préférable de les différencier en fonction des classes chimiques et des voies biochimiques. Selon Croteau *et al.* (Croteau et al., 2006) et Tiaz *et al.* (Taiz et al., 2014) les molécules bioactives d'origine végétale sont classées en trois catégories :

- Les terpènes et terpénoïdes (environ 25 000 composés) produits par les voies de l'acide mévalonique et du méthylérythritol phosphate (non mévalonique)
- Les alcaloïdes (environ 12 000 composés) produits par la voie de l'acide shikimique
- Les composés phénoliques (environ 8 000 composés) produits par la voie de l'acide malonique et de l'acide shikimique.

Les composés bioactifs comprennent un ensemble de molécules présentant une grande

diversité de fonctionnalités et de structures qui sont à la base du développement des additifs alimentaires, des aliments fonctionnels et des nutraceutiques (Vinatoru, 2001). Actuellement, de nombreux chercheurs et industriels sont impliqués dans la recherche de nouvelles molécules et l'étude de leurs propriétés afin de les valoriser dans l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique. Ces composés possèdent de nombreux bénéfices pour la santé tels que des activités anti-oxydantes, antimicrobiennes, anticancéreuses, analgésiques, anti-diarrhéiques et cicatrisantes (Brandt et al., 2004; Yeh et al., 2003). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 60% de la population mondiale a recours à des médicaments traditionnels à base de plantes pour les soins de santé primaires (Organisation mondiale de la santé). Ainsi, l'industrie agroalimentaire se focalise sur la fabrication et le développement de produits alimentaires fonctionnels et l'intérêt croissant des consommateurs pour les aliments « sains » fait le succès de ces nouveaux produits sur le marché.

1.2 Importance de l'éco-extraction

L'extraction est la première étape de toute étude de plantes médicinales. Il existe différentes techniques permettant d'extraire les substances bioactives présentes dans les plantes. Dans le cas de substances naturelles lipophiles, les techniques d'extraction conventionnelles nécessitent l'utilisation d'une grande quantité de solvant et des temps d'extraction longs, elles sont donc coûteuses et leur efficacité est conditionnée par les solvants employés qui sont pour la majorité issus du pétrole. Pour surmonter ces limitations, de nouvelles techniques non conventionnelles, également appelées techniques d'éco-extraction, ont vu le jour au cours des cinquante dernières années. L'ensemble de ces techniques sera détaillé par la suite et se base sur les six principes d'éco-extraction suivants (figure 1) (Chemat et al., 2018) :

- Privilégier l'utilisation de matière première renouvelable
- Privilégier l'usage de solvant alternatifs
- Générer des coproduits et non des déchets
- Réduire la consommation d'énergie
- Réduire le nombre d'opérations unitaires
- Privilégier la naturalité

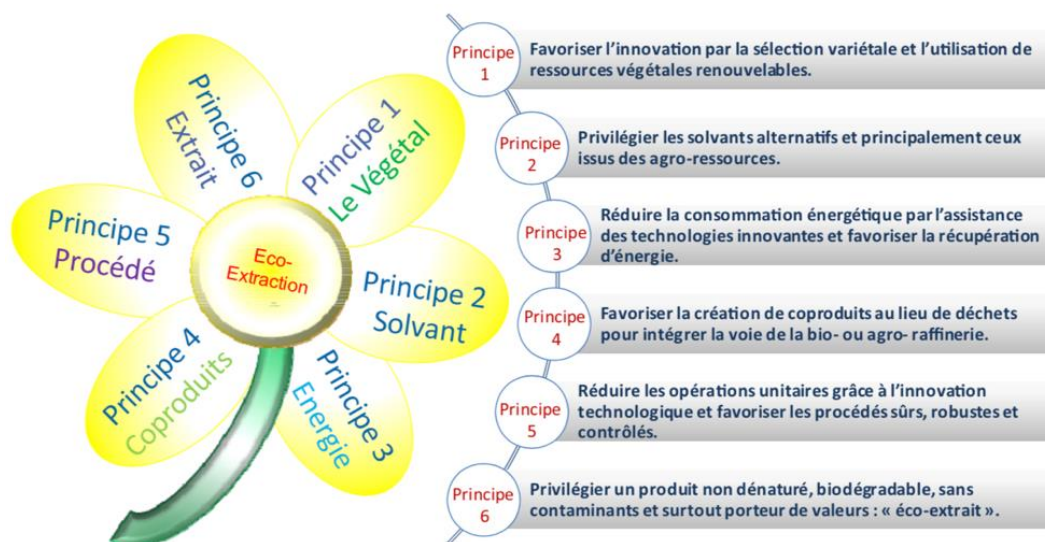


Figure 1: Les six principes de l'éco-extraction (Fabiano-Tixier and Culioli, 2013)

1.3 Techniques d'extraction conventionnelle

Les techniques conventionnelles pour l'extraction de molécules lipophiles à partir de plantes sont l'extraction par Soxhlet, la macération et l'hydrodistillation. Ces techniques utilisées depuis longtemps exigent l'utilisation de solvants organiques en grande quantité ce qui implique une étape d'évaporation du solvant, une durée et des températures d'extraction élevées qui peuvent entraîner la dégradation des composés thermolabiles. Ainsi, les extractions conventionnelles sont devenues les méthodes les moins utilisées dans l'industrie alimentaire en raison de leurs divers inconvénients et de leur impact sur l'environnement.

1.3.1 Soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une technique standard souvent utilisée comme référence pour apprécier l'efficacité des autres techniques d'extraction solide/liquide. Elle est plus performante que les autres techniques d'extraction conventionnelle excepté pour les composés sensibles à la chaleur (thermolabile). Cet atout fait que ce procédé est bien établi et utilisé depuis des années.

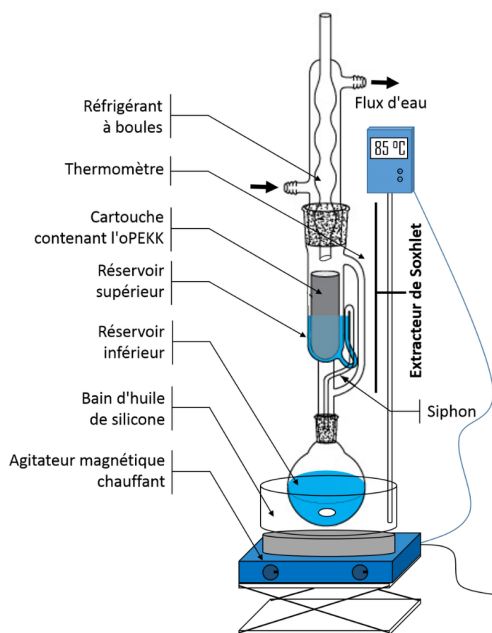


Figure 2: Schéma de principe de l'extraction par Soxhlet (Alexandre, 2017)

La matrice végétale est placée dans une cartouche en cellulose (figure 2) et le solvant dans un ballon. Celui-ci est chauffé à sa température d'ébullition puis condensé dans la cartouche. Lorsque le solvant atteint la même hauteur que le bras du siphon, il est chargé en molécule bioactive et se décharge de la cartouche pour retourner dans le ballon. Une fois dans le ballon, les molécules extraites et dissoutes (le soluté) sont séparées du solvant par distillation ce qui permet au soluté de rester dans le ballon tandis que le solvant est de nouveau condensé dans la cartouche contenant la matière végétale. Ces cycles sont répétés jusqu'à extraction complète du soluté.

La diffusion interne est l'étape limitante de cette technique d'extraction qui doit s'appliquer sur des solides secs avec de fines particules. Les avantages de cette extraction sont les suivants:

- Le recyclage du solvant permet un déplacement de l'équilibre de transfert.
- La température élevée permet l'augmentation des rendements.
- Elle ne nécessite pas de filtration post-extraction.
- Elle est simple à mettre en œuvre (avec peu d'équipement) et peu onéreuse.

Cependant, ce procédé implique des temps d'extraction longs et l'utilisation d'une quantité de solvants organiques importante ; les solvants sont souvent inflammables et toxiques. Ces conditions soulèvent des problématiques économiques et environnementales liées à cette

technique. Ajouté à cela, l'impossibilité d'accélérer l'extraction par agitation, l'étape d'évaporation du solvant post-extraction ainsi que la possible dégradation thermique des composés cibles poussent la recherche à développer des procédés d'extraction innovants permettant de surmonter et de contourner ces inconvénients.

1.3.2 Macération

La macération est une technique utilisée dans la fabrication du vin puis dans la recherche sur les plantes médicinales. Elle consiste à laisser tremper la matrice végétale avec un solvant dans un récipient bouché à température ambiante pendant trois jours tout en agitant fréquemment. Ce traitement permet de ramollir et de briser les parois cellulaires de la plante afin de libérer les molécules cibles. Le mélange est ensuite filtré ou pressé.

Cette technique d'extraction est la plus simple qui existe mais nécessite l'utilisation d'une très grande quantité de solvant.

1.3.3 Hydrodistillation

L'hydrodistillation est une technique employée pour extraire les huiles essentielles et les molécules bioactives des plantes. C'est un procédé très ancien qui consiste à distiller une solution aqueuse contenant un composé non miscible à l'eau. L'eau est chauffée dans un ballon puis se vaporise. La vapeur formée rompt les membranes végétales et emporte les molécules les plus volatiles. Elle est ensuite condensée et le mélange s'écoule du condenseur vers un récipient où la partie non miscible (huile et mélanges bioactifs) s'isole naturellement de l'eau (Silva et al., 2005). Cette technique est aussi appelée « entrainement à la vapeur » lorsque l'eau est apportée de l'extérieur.

1.4 Techniques d'extraction non conventionnelles

Certaines techniques d'extraction non conventionnelles, développées plus récemment, ont été introduites pour surmonter les limitations des techniques présentées précédemment. Le développement de ces méthodes non conventionnelles, à partir des six principes d'éco-extraction, a vu le jour au cours des cinquante dernières années. Selon Chemat et al., l'éco-

extraction est basée sur la découverte et la conception de procédés d'extraction permettant de réduire la consommation énergétique, mais aussi l'utilisation de solvants alternatifs et des ressources végétales renouvelables, tout en assurant la qualité et la sécurité des produits finis envers les opérateurs, les consommateurs et notre environnement (Chemat et al., 2018). Les nouvelles méthodes les plus fréquemment utilisées pour extraire les composés bioactifs des sources végétales sont les ultrasons, le chauffage ohmique, le chauffage par micro-ondes, le champ électrique pulsé et les fluides supercritiques (Suleria et al., 2019).

1.4.1 Extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques de propagation ayant une gamme de fréquence allant de 300 MHz à 300 GHz. Ce rayonnement ionisant pénètre les matières biologiques et crée un mouvement moléculaire des ions et une rotation des dipôles qui, dans le champ alternatif, entraîne une production de chaleur sans affectation de la structure moléculaire.

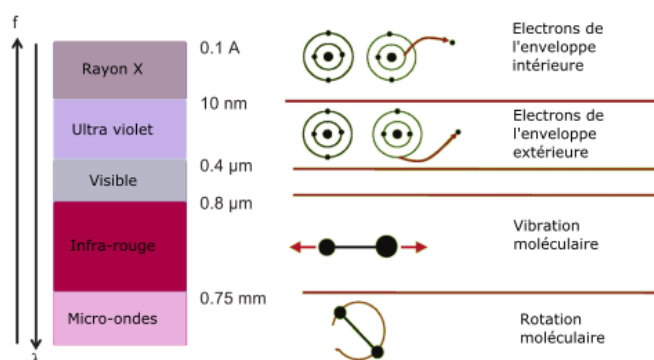


Figure 3: Spectre électromagnétique, adaptée de M. Letellier & H. Budzinski, Analysis, 1999, 27, 259.

Lors d'un chauffage conventionnel, la chaleur est transférée du milieu chauffant vers l'intérieur de l'échantillon. Lors d'un chauffage aux micro-ondes la chaleur est dissipée à l'intérieur du milieu irradié et ne se limite pas à la conductivité thermique, dans le cas des solides, et aux courants de convection, dans le cas des fluides. Le chauffage aux micro-ondes permet donc une augmentation de chaleur plus rapide qu'un chauffage classique dû à l'effet de chauffage volumétrique (Bousbia et al., 2009). Bien que les micro-ondes chauffent de manière volumétrique, il est connu que la répartition du champ électromagnétique n'est pas

homogène dans la matière irradiée. En effet, la distribution du champ électrique dépend de la géométrie de l'objet irradié et de ses propriétés diélectriques.

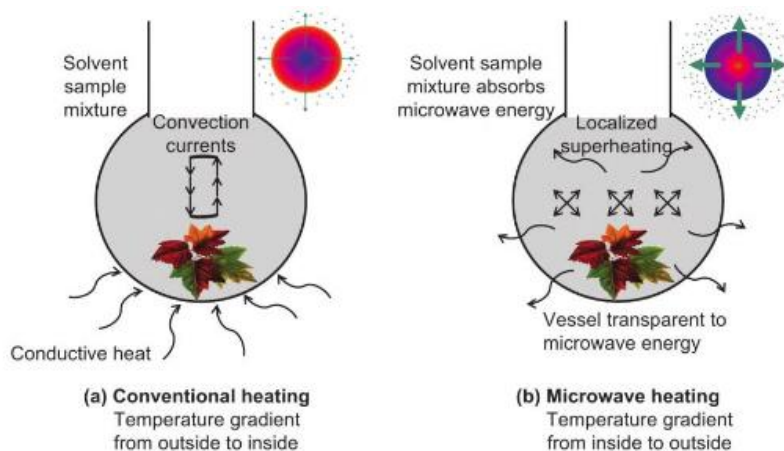


Figure 4: Représentation des deux modes de chauffage et gradients de température (a) par convection et (b) par l'énergie des micro-ondes (Rostagno and Prado, 2013)

L'extraction assistée par micro-ondes permet un transfert rapide d'énergie et de chaleur au solvant et à la matrice végétale. Les micro-ondes génèrent de la chaleur à divers endroits dans la matière irradiée et génèrent ainsi, avec une puissance suffisante, une quantité de vapeur. L'humidité piégée à l'intérieur de la matrice végétale génère une pression sur les parois cellulaires de la plante ce qui favorise leur fracture et la réduction de la résistance face au transfert du solvant, pur ou chargé en soluté. L'application des micro-ondes sur les molécules d'eau entraîne la rupture des cellules des parois végétales et ainsi la libération des molécules cibles (Zhang et al., 2011).

En comparaison avec les techniques conventionnelles, l'extraction assistée par micro-ondes permet une diminution des temps d'extraction et de la quantité de solvant. C'est aussi une technique plus acceptable pour l'extraction de composés thermolabiles (Azmir et al., 2013). De plus, elle se présente comme une réelle alternative car elle est rapide, facile d'utilisation et peu coûteuse.

1.4.2 Extraction par fluide supercritique

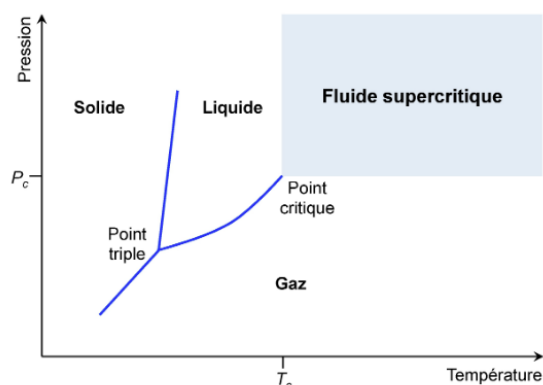


Figure 5: Diagramme de phase pression-température d'un fluide

L'état supercritique d'un fluide est obtenu lorsqu'un gaz est porté à une température supérieure à sa température critique et lorsqu'un liquide est comprimé au-delà de sa pression critique. La température critique est la température maximale d'un fluide en phase liquide, quelle que soit la pression. La pression critique est la pression au point critique. La spécificité des fluides supercritiques repose sur leurs propriétés physiques qui peuvent être modulées par une augmentation de la pression et/ou de la température au-delà des valeurs critiques. Leur densité est proche de celle des liquides donc leur pouvoir de solvation est proche de celui des liquides. Leur viscosité est proche de celle des gaz et inférieure à celle des liquides donc leur diffusivité est comprise entre celle des liquides et celle des gaz. Ces propriétés induisent une augmentation du transfert de masse entre les solutés et les fluides supercritiques et ainsi une puissance de dissolution plus élevée pour ces fluides comparée aux solvants classiques. Elles permettent aussi une sélectivité plus élevée, qui peut être ajustée en fonction des composés à extraire en modifiant la pression ou la température. Ces propriétés sont donc très avantageuses dans le domaine de l'extraction.

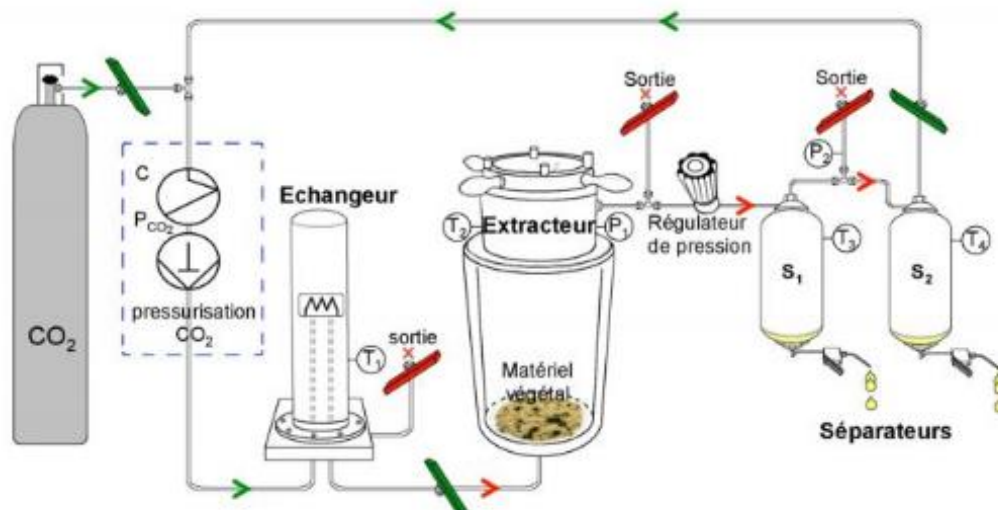


Figure 6: Schéma d'un extracteur au CO₂ supercritique (Technologies agro-industrielles team)

Une extraction par fluide supercritique consiste à placer la matière végétale dans un extracteur relié à des capteurs de température et de pression à l'entrée et à la sortie. L'extracteur est ensuite pressurisé avec le fluide à l'aide d'une pompe volumétrique afin de l'amener dans son état supercritique. Lorsque le fluide est amené à la pression et à la température souhaitées, il percole dans l'extracteur et extrait le soluté contenu dans la matrice. Le fluide et les composés extraits sont ensuite entraînés vers un séparateur. Les molécules cibles vont être fractionnées en diminuant le pouvoir de solvation du fluide. En diminuant sa pression et en augmentant sa température, le fluide va passer à l'état gazeux et le soluté, qui n'est plus solubilisé, est séparé par gravité. Jusqu'à trois séparateurs peuvent être installés en série pour fractionner les molécules de l'extrait. Ces molécules sont récupérées à l'aide de vannes sous les séparateurs et le fluide est régénéré et recyclé ou rejeté dans l'atmosphère (Sihvonen et al., 1999).

Le CO₂ supercritique est le fluide supercritique le plus utilisé puisqu'il a l'avantage d'avoir des températures et pressions critiques basses (31°C, 304K et 7,3 MPa). De plus, c'est un solvant inerte et ininflammable qui a une faible toxicité, une réactivité haute et qui est volatile à pression atmosphérique. Il est facilement disponible à faible coût et à des puretés très élevées (Rozzi and Singh, 2002). Le CO₂ supercritique est un solvant apolaire avec un pouvoir de solvation compris entre le pentane et le toluène. Le principal inconvénient de ce fluide est donc qu'il ne convient pas pour les molécules polaires. Cependant, l'ajout d'un co-solvant plus polaire comme l'éthanol ou le méthanol permet d'augmenter son pouvoir de

solubilisation vis à vis de ces molécules.

L'extraction par fluides supercritiques est une méthode attractive puisqu'elle permet de diminuer les temps d'extraction comparée aux méthodes conventionnelles, d'améliorer la sélectivité et d'éliminer le solvant après l'extraction par simple décompression (Danielski et al., 2007). L'absence ou la consommation limitée de solvant permet de produire un extrait sans solvant. L'extraction par fluide supercritique à basse température est adaptée à l'extraction de molécules thermosensibles. Cependant, cette technique est coûteuse et donc réservée pour l'extraction de produit à très haute valeur ajoutée.

1.4.3 Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons (US) implique l'utilisation d'US dans une gamme de fréquences allant de 20 kHz à 2000 kHz. A ces fréquences, les US vont générer des vibrations mécaniques dans les solides, les liquides et les gaz qui se propagent dans la matière *via* des cycles d'expansion/compression. Lors de ces cycles, des microbulles de cavitation vont se former dans les phases liquides puis accroître et osciller rapidement sous l'impulsion des ondes acoustiques. En fonction des conditions expérimentales (température, fréquence et intensité de l'onde ultrasonore incidente) et de la nature du milieu (viscosité, présence de gaz dissous...), les bulles générées peuvent croître progressivement et atteindre une taille critique au-delà de laquelle elles implosent pendant un cycle de compression en raison du changement de pression. Cette implosion des bulles est un phénomène violent au cours duquel une grande quantité d'énergie est libérée localement; des températures supérieures à 5000 °C et des pressions d'environ 500 MPa ont ainsi pu y être mesurées (Ötles, 2009). Ce phénomène extrême, appelé cavitation inertielle, crée des points chauds qui vont augmenter la réactivité du milieu et des microjets, associés à des contraintes de cisaillement impactant notablement le milieu environnant. Les microjets et phénomènes de cisaillement générés par la cavitation acoustique sont utilisés dans de nombreuses applications comme par exemple la sonochimie (Chatel, 2018), le nettoyage de surfaces métalliques ou encore l'extraction de composés végétaux. ("Sonochemistry," 1990) Les US sont utilisés pour d'autres applications comme le dégazage, le décapage, l'homogénéisation, l'émulsification encore dans le domaine biomédical comme pour la chirurgie (lithotripsie) ou l'imagerie avec agent de contraste (Li et al., 2020).

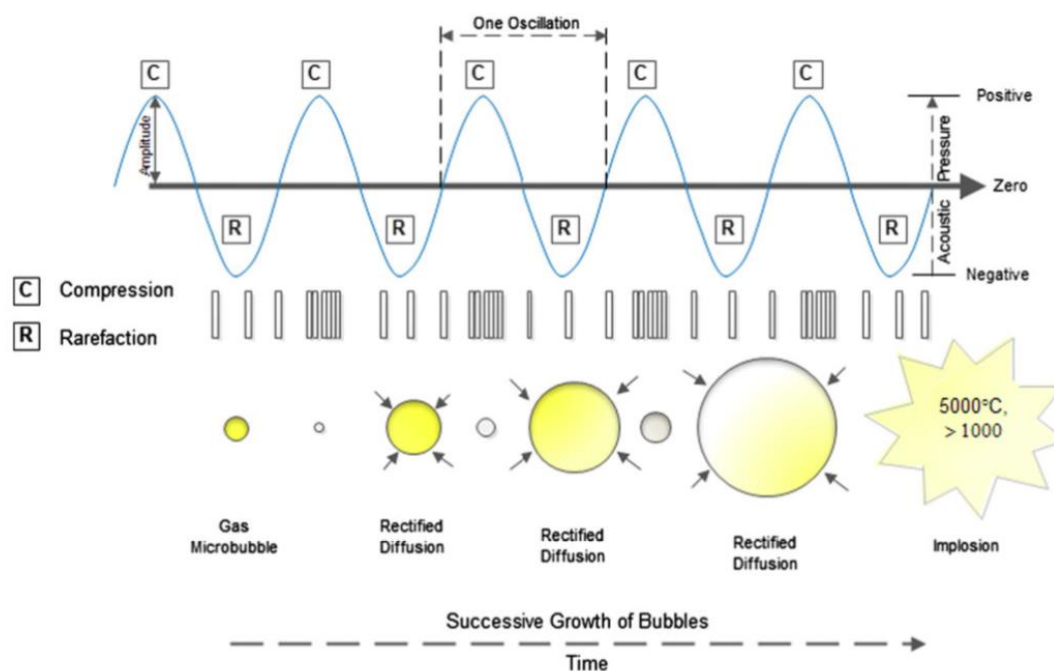


Figure 7: Représentation schématique de la croissance et de l'effondrement d'une microbulle dans le processus de cavitation acoustique (Abbas et al., 2013)

Les US impliquent des effets physiques et chimiques expliqués grâce à deux théories : la théorie des points chauds et la théorie électrique. La théorie des points chauds suppose que les hautes températures et pressions générées lors de l'effondrement des microbulles sont responsables de la rupture des liaisons moléculaires et de la formation de radicaux. La théorie électrique décrit des microdécharges produites par des champs électriques élevés générés par la déformation et la fragmentation des microbulles (Vorobiev and Chemat, 2013). Dans le cas de l'extraction assistée par US, l'implosion des microbulles va perturber les composants structurels et fonctionnels des cellules jusqu'au point de lyse cellulaire (Butz and Tauscher, 2002). La fracture de la surface solide des matrices végétales facilite la libération des composés extractibles, le transfert de masse et de chaleur et la diffusion.

Il existe deux appareils pour générer des US : le bain à US et la sonde ultrasonore. Le bain à US est utilisé pour disperser des solides dans un solvant car les US permettent de diminuer la taille des particules solides et ainsi d'augmenter leur solubilité. Cet appareil est aussi utilisé pour dégazer des solutions ou pour nettoyer des matériaux puisqu'il est plus facile à manipuler et plus économique que la sonde ultrasonore. L'inconvénient de cet appareil est qu'il délivre une intensité faible qui est atténuée par l'eau du bain (Romdhane et al., 1995). La sonde à US,

quant à elle, délivre une intensité sur une plus petite surface, elle est donc plus puissante. De plus, elle est immergée directement dans la solution ce qui limite l'atténuation de l'intensité dans le milieu. Cet appareil est donc particulièrement utilisé pour les petits volumes car les zones actives sont proches de l'émetteur. Cependant, dans ces conditions la température de l'échantillon doit être contrôlée car elle augmente plus rapidement.

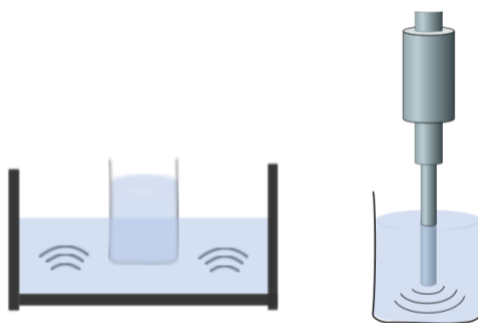


Figure 8: Schéma représentatif d'un bain à ultrasons à gauche et d'une sonde à ultrasons à droite

De nombreux facteurs influencent l'extraction assistée par US. Premièrement, les paramètres ultrasonores tels que la fréquence et le temps de sonication sont à ajuster. Les US de basses fréquences génèrent de plus grosses bulles que les hautes fréquences donc l'effondrement de ces bulles est plus violent et les températures et pressions locales générées sont plus élevées. Cependant, les US à haute fréquence provoquent plus d'effondrement par unité de temps (Nazarzadeh and Sajjadi, 2013). Deuxièmement, les paramètres liés à la matrice tels que la taille des particules, le taux d'humidité, l'affinité vis à vis du solvant doivent être étudiés afin d'optimiser le procédé. La diminution du taux d'humidité dans la matrice permet d'améliorer le contact solvant-solide. Le choix du solvant est dicté par la solubilité des extraits cibles, les interactions entre le solvant et la matrice, et l'intensité des phénomènes de cavitation des US dans le solvant.

L'extraction assistée par US est un procédé simple, efficace et peu coûteux. Ses avantages sont l'augmentation du rendement d'extraction et l'accélération de la cinétique par rapport aux extractions conventionnelles. Comme le Soxhlet, cette technique n'a pas de limite au niveau de la nature du solvant et permet ainsi l'extraction d'une large gamme de composés naturels. Les principaux inconvénients de cette technique sont l'impossibilité de renouveler le

solvant pendant le processus ainsi que les étapes de filtration et de rinçage après l'extraction (Tiwari, 2015). De plus, des difficultés de mise à l'échelle peuvent apparaître, liées à des conditions de traitement non uniforme puisque les ondes sont atténuées dans les échantillons à haute viscosité (Ojha et al., 2020).

1.4.4 Extraction assistée par champ électrique pulsé

L'extraction par champ électrique pulsé est un processus non thermique qui consiste à appliquer un champ électrique externe à une cellule vivante pendant une durée allant de quelques nanosecondes à plusieurs millisecondes (Chemat et al., 2017a). Le mécanisme n'est pas encore complètement élucidé mais on sait qu'il comporte quatre étapes basées sur la théorie de l'électrocompression de la membrane cellulaire :

- L'application du champ électrique engendre une augmentation du potentiel transmembranaire de la membrane cytoplasmique due à l'accumulation de charge sur les surfaces membranaires.
- L'attraction entre les charges de signes opposés accumulées de part et d'autre de la membrane cellulaire provoque une compression de cette dernière. Une force élastique tend à s'opposer à cette électrocompression.
- Lorsque les champs électriques pulsés appliqués dépassent une valeur critique, la force électrocompressive devient supérieure à la force élastique, on assiste alors à l'apparition de pores au niveau de la membrane cellulaire (électroporation réversible).
- L'augmentation de la durée et de l'intensité du traitement à une valeur critique (0,7-2,2V), entraîne une intensification de la perméabilisation et une destruction de la membrane cellulaire (électroporation irréversible).

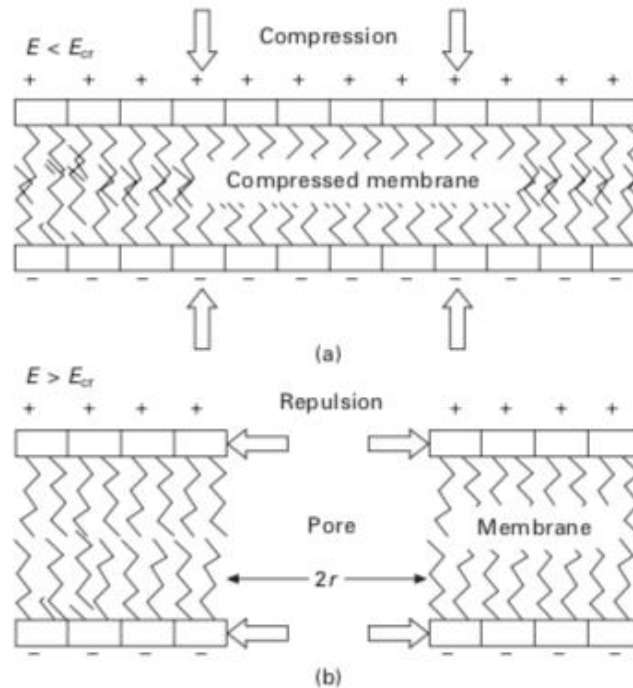


Figure 9 : Électroporation d'une membrane suite à l'application d'un champ électrique E . (a) La membrane est compressée due à l'attraction des charges électrique. (b) Lorsque le champ électrique excède une valeur critique ($E < E_{cr}$) le potentiel transmembranaire augmente jusqu'à un seuil et l'électroporation se produit (Vorobiev and Chemat, 2013).

Les champs électriques pulsés permettent l'augmentation des transferts de matière et sont utilisés en tant que prétraitement pour le pressage des jus à partir de divers fruits et légumes ou en combinaison avec l'extraction des biomolécules pour la valorisation de diverses matrices végétales (Vorobiev and Chemat, 2013).

1.4.5 Extraction assistée par chauffage ohmique

Le chauffage ohmique ou effet Joule est l'effet obtenu lorsqu'un courant électrique passe à travers un matériau de résistance. Dans le cas de l'extraction assistée par chaleur ohmique, l'application du champ électrique provoque une électrolocation des tissus cellulaires permettant une meilleure extraction des composés bioactifs. Contrairement au traitement par champ électrique pulsé, le chauffage ohmique consiste à appliquer au produit un champ électrique d'une intensité relativement faible ($E < 0.5 \text{ kV/cm}$) pendant une durée relativement longue ($t=10-10^2\text{s}$). Cette technique nécessite une cellule chauffante, des électrodes en

contact avec le matériau chauffé, une source d'alimentation en courant alternatif et une chambre de traitement. Selon la loi d'Ohm, la quantité de chaleur dissipée est proportionnelle à la tension appliquée et à la conductivité électrique du produit. Ainsi, les facteurs influençant ce procédé sont la conductivité électrique, l'intensité du champ, la taille des particules, la concentration ionique et les électrodes. La principale limite est la conductivité électrique qui est différente dans un matériau hétérogène et qui conduit à des différences de conversion du courant électrique en énergie thermique. L'extraction assistée par chaleur ohmique est surtout connue pour sa capacité à fournir un chauffage rapide, homogène et précis (Pereira et al., 2016).

1.4.6 Techniques d'extraction non-conventionnelles moins courantes

Ces dernières années, d'autres techniques d'extraction non conventionnelles ont été développées en s'attachant aux principes d'éco-extraction telles que l'extraction accélérée par solvant ou l'extraction micellaire décrites ci-dessous.

L'extraction accélérée par solvant, aussi appelée extraction par solvant chaud sous pression, est une technique qui utilise moins de solvant que la macération et l'extraction au Soxhlet. Le solvant (ou mélange de solvants) est porté à haute température afin d'accélérer le processus d'extraction et de maintenir le solvant à l'état liquide (Nn, 2015).

L'extraction micellaire, aussi appelée extraction au point trouble (en anglais Cloud Point Extraction), est une méthode alternative à l'extraction classique, plus respectueuse de l'environnement. Le solvant organique est remplacé par des tensioactifs en solution aqueuse qui solubilisent les composés hydrophobes à isoler dans le cœur de micelles lorsque leur concentration dépasse la concentration micellaire critique (CMC). L'extraction micellaire est utilisée pour séparer les composés de matrices complexes et pour déterminer les traces de métaux lourds ou de toxines dans les échantillons biologiques (Kiszkiel-Taudul et al., 2017).

De plus, la démultiplication des avantages des techniques d'extraction présentées précédemment a été étudiée en combinant ces techniques entre elles (Chemat et al., 2017b; Peng et al., 2017) mais aussi en les associant à l'utilisation de solvants verts comme le CO₂ supercritique, les liquides ioniques ou les solvants eutectiques profonds. Les solvants verts sont considérés comme des solvants alternatifs aux solvants organiques toxiques utilisés

habituellement car ils possèdent un pouvoir de solvatation élevé, ne sont ni toxiques ni inflammables et enfin sont biodégradables (Cao et al., 2018).

1.4.7 Conclusion sur les techniques d'extraction

Pour extraire une substance d'une matrice végétale, le choix de la technique à utiliser résulte d'un compromis entre l'efficacité, la reproductibilité et la praticité tout en considérant les coûts, le temps et l'impact écologique. De nos jours, le développement des techniques d'extraction s'ancre dans une démarche écologique. L'éco-extraction est un nouveau concept ayant pour but de protéger à la fois l'environnement et les consommateurs. Dans ce contexte, le concept d'extrait vert, ayant l'impact le plus faible possible sur l'environnement et dont le recyclage éventuel a été prévu, a aussi été introduit (Chemat et al., 2018). L'éco-extrait est naturel, de haute qualité, composé de molécules bioactives et possède des fonctionnalités importantes comme des propriétés colorantes, odorantes, antimicrobiennes, antioxydantes. Néanmoins, la plupart des substances bioactives extraites des matrices végétales sont instables et souffrent de dégradations lorsqu'elles sont exposées à des conditions défavorables (lumière, oxygène, humidité) ce qui réduit leur efficacité et leur activité biologique. De plus, elles sont principalement lipophiles et présentent une faible solubilité dans l'eau et une biodisponibilité limitée. Le développement de nanosystèmes pour l'encapsulation de ces composés bioactifs semble être un bon moyen de résoudre ces difficultés. Parmi les différents nanosystèmes mis au point, les nanoémulsions s'avèrent être des candidats de choix pour l'encapsulation de molécules lipophiles.

2 Les nanoémulsions (NEs): propriétés, préparation et applications dans l'industrie agroalimentaire

2.1 Propriétés et stabilité des NEs

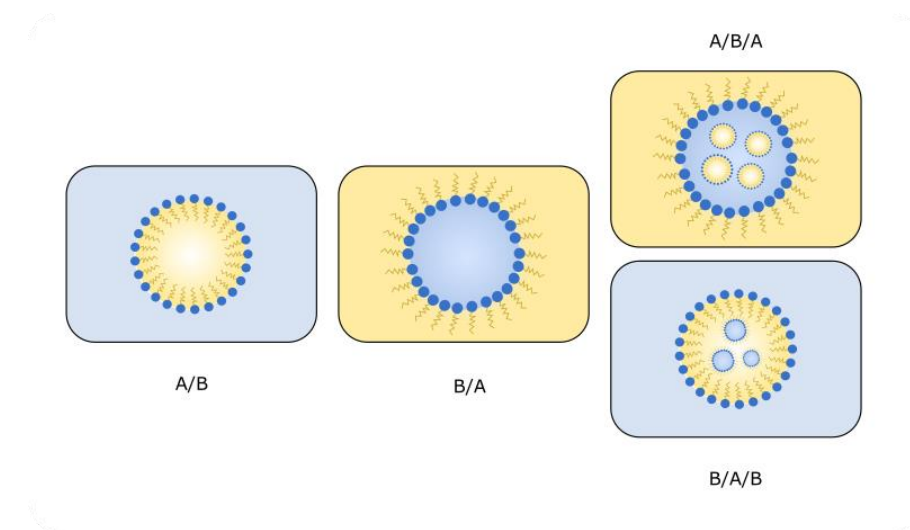


Figure 10: Différents types de systèmes émulsifiés

Les émulsions sont des dispersions colloïdales thermodynamiquement instables d'une phase A dans une phase B stabilisées le plus souvent par un tensioactif (les phases A et B étant non miscibles) (Saifullah et al., 2016). La structure la plus courante des émulsions est celle d'une multitude de gouttelettes de phase A dans une phase continue B et vice versa, mais on trouve également des émulsions multiples A/B/A ou B/A/B. On distingue donc une phase dispersée (les gouttelettes) et une phase continue (dans laquelle les gouttelettes diffusent). On parle d'émulsion eau dans huile E/H si la phase continue est une phase huileuse, et d'émulsion huile dans eau H/E si la phase continue est constituée d'une phase aqueuse.

Tableau 1 : Comparaison des propriétés physicochimiques et thermodynamiques de différents type d'émulsions (adapté de Gupta et al., 2016)

Type d'émulsion	Échelle du rayon des gouttelettes	Stabilité thermodynamique	Propriété optique
Macroémulsion	1-100 μm	Instable	Opaque/turbide
Nanoémulsion	20-200 nm	Instable	Translucide/turbide
Microémulsion	10-100 nm	Stable	Clair

La taille des gouttelettes a une influence sur la stabilité, les propriétés optiques et les diverses applications des émulsions. Celles-ci peuvent donc être classées en trois groupes selon la taille de leurs gouttelettes : macroémulsion, nanoémulsion et microémulsion (Tableau 1). Les macroémulsions sont composées de gouttelettes de taille comprise entre 1 et 100 μm et sont thermodynamiquement instables. Les NEs ont des gouttelettes de taille nanométrique (20 à 200 nm) et sont thermodynamiquement plus stables que les macroémulsions. Les microémulsions, qu'il est important de bien distinguer des NEs, sont des systèmes particuliers qui se forment spontanément et sont thermodynamiquement stables (Anton and Vandamme, 2011; McClements, 2012). Les NEs présentent cependant une grande stabilité cinétique.

Les macroémulsions et les NEs offrent aussi une turbidité différente. En effet, en fonction de la taille des gouttelettes, la diffusion de la lumière qui les traverse est plus ou moins importante. Les gouttelettes dont les dimensions sont similaires à la longueur d'onde de la lumière ($d \approx \lambda$) dispersent fortement la lumière. Les gouttelettes de taille micrométrique impliquent donc des émulsions avec un aspect blanc laiteux tandis que les gouttelettes de l'ordre du nanomètre présentent un aspect translucide ($d \ll \lambda$).

Parmi les différents types d'émulsions, les NEs H/E sont, actuellement, les plus couramment utilisées dans l'industrie alimentaire (McClements and Li, 2010).

La stabilité est un paramètre particulièrement important pour de nombreuses applications et pour le stockage des émulsions. Or, les émulsions tendent spontanément à minimiser la surface entre les deux phases non miscibles et donc à se déstabiliser. Ce sont des systèmes en équilibre mais thermodynamiquement instables qui ont tendance à se déstabiliser au cours du temps en raison d'un certain nombre de mécanismes physico-chimiques, tels que la

séparation gravitationnelle (sédimentation et crémage), la floculation, la coalescence et le murissement d'Ostwald. Certains reposent sur l'agrégation des gouttelettes et la gravitation, et sont réversibles ; d'autres sont reliés à une évolution de la taille des gouttes, et sont irréversibles (Gupta et al., 2016).

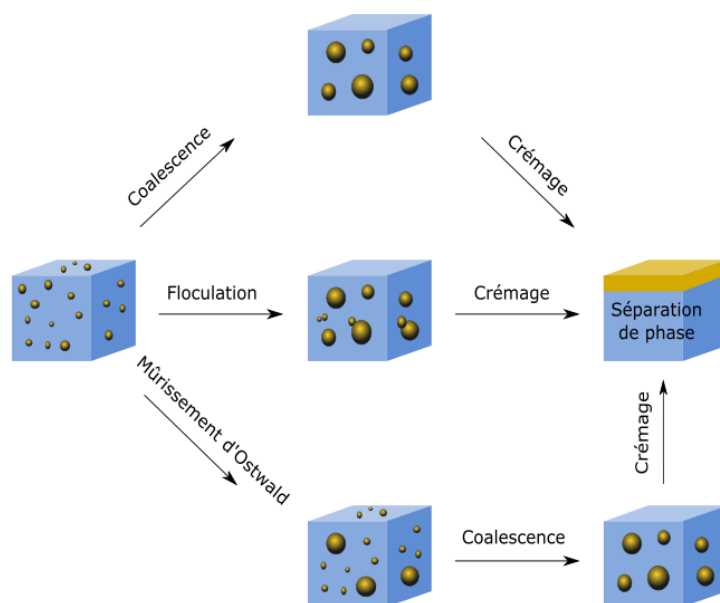


Figure 11: Schéma de différents mécanismes de déstabilisation des NEs, adapté de (Gupta et al., 2016)

La **sédimentation** et le **crémage** sont deux phénomènes réversibles de séparation de phase basés sur la densité relative des phases dispersées et continues. Les gouttelettes montent sous l'effet de la flottabilité dans le cas du crémage et se déposent dans le cas de la sédimentation. Il s'agit de la forme d'instabilité des émulsions la plus couramment observée. Dans le cas des NEs, les gouttelettes sont suffisamment petites pour que le mouvement Brownien prédomine sur les forces gravitationnelles, ce qui permet aux gouttelettes d'être maintenues en suspension (McClements, 2015). Les NEs ne sont donc pas sujettes au crémage ou à la sédimentation lors du stockage.

L'agrégation des gouttelettes est induite par des interactions attractives entre celles-ci, ce qui entraîne une séparation gravitationnelle. Lorsque deux gouttelettes se rapprochent puis entrent en collision, il y a **floculation**, si les forces de répulsion intermoléculaires sont suffisamment fortes pour maintenir les gouttelettes détachées à une petite distance d'équilibre, ou **coalescence**, si la membrane interfaciale se rompt. Lors de la coalescence, les

gouttelettes fusionnent pour donner une gouttelette plus grosse. L'évolution de la taille des gouttelettes peut se faire de façon homogène (les gouttelettes grossissent à la même vitesse et la distribution en taille reste monomodale) ou hétérogène conduisant à une distribution plurimodale de la taille des gouttelettes qui induit une séparation de phase. L'agrégation des gouttelettes peut entraîner un changement d'aspect des émulsions qui deviennent plus ou moins troubles et homogènes. Dans les NEs la floculation est naturellement empêchée par la stabilisation stérique (Tadros et al., 2004). De plus, dans ces systèmes, l'épaisseur de la couche de tensioactif est plus importante par rapport au rayon des gouttelettes ce qui tend à rendre les gouttelettes indéformables et les fluctuations de surface impossibles. Le phénomène de coalescence est donc évité (Tadros et al., 2004) .

Le **murissement d'Ostwald** est défini par la croissance des plus grosses gouttelettes au détriment des plus petites par diffusion moléculaire. En raison de la pression de Laplace, le potentiel chimique de la phase dispersée est plus élevé dans les petites gouttelettes que dans les grandes (Thomson, 1872), ce qui fournit la force motrice pour la diffusion moléculaire des petites vers les grandes gouttelettes. Ce phénomène est irréversible et celui qui a lieu le plus couramment dans le cas des NEs. Il existe un certain nombre de facteurs influençant le murissement d'Ostwald, tels que la solubilité et le coefficient de diffusion de la phase dispersée dans la phase dispersante, la taille et composition des gouttelettes et la tension interfaciale. Comme la diffusion moléculaire se produit lorsque les molécules de la phase dispersée se déplacent à travers la phase continue, la diminution de la solubilité de l'huile dans la phase aqueuse est la méthode la plus efficace pour retarder ou empêcher le murissement d'Ostwald dans les NEs H/E (Saifullah et al., 2016).

Ainsi, la stabilité des NEs n'existe que parce que les mécanismes physiques décrits ci-dessus qui conduisent normalement à la démixtion des phases dispersées et continues, peuvent être ralentis ou inhibés.

Une NE type est classiquement formée à partir d'une phase aqueuse, d'une phase huileuse et d'un tensioactif. Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles qui s'adsorbent à l'interface huile-eau et apportent une stabilisation stérique, électrostatique ou les deux. De plus, ils permettent d'augmenter la stabilité thermodynamique des NEs en diminuant la

tension interfaciale (“The relationship of structure to properties in surfactants. IV. Effectiveness in surface or interfacial tension reduction,” 1976). Les gouttelettes peuvent également être stabilisées par des particules. Les émulsions formées à l’aide de cette technique sont appelées émulsions de Pickering (Marefati et al., 2013). Lors de la préparation des NEs, la taille des gouttelettes résulte de la rupture puis de la renaissance de celles-ci. Le taux de rupture doit toujours excéder celui de la renaissance afin d’obtenir une diminution de la taille des gouttelettes. L’ajout d’un tensioactif permet ainsi de stabiliser les gouttelettes nouvellement formées en diminuant la tension interfaciale et en les empêchant de se recombinaison par coalescence interfaciale. L’énergie libre du système est diminuée par suppression de la zone interfaciale ce qui induit une augmentation de la stabilité cinétique. Le mûrissement d’Ostwald, principal mécanisme de déstabilisation des NEs, peut être contrôlé grâce à une sélection appropriée du tensioactif (Taylor, 1998). Le choix du tensioactif influence donc la taille et la stabilité des gouttelettes mais aussi la toxicité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique.

2.2 Techniques de préparation des NEs

En règle générale, les NEs sont obtenues en formant des macroémulsions dont les gouttes sont ensuite affinées (Gupta et al., 2016). Il existe différentes méthodes de préparation des NEs classées en fonction de leur apport énergétique et des outils utilisés. On parle de méthodes à basse énergie et de méthodes à haute énergie.

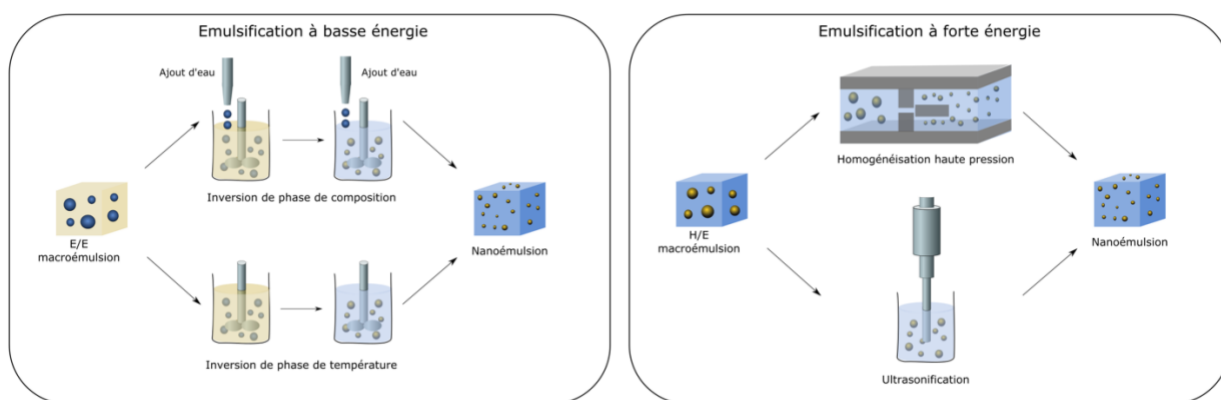


Figure 12: Schéma des techniques d’émulsification à basse et haute énergie pour la préparation de NEs H/E

2.2.1 Émulsification à basse énergie

Les techniques d'émulsification, qui requièrent peu d'énergie, les plus courantes sont les suivantes : l'émulsification spontanée, l'inversion de phase de composition ou de température (Piorkowski and McClements, 2014). Les NEs sont obtenues quand le système subit une inversion de phase en modifiant la température ou la concentration de l'émulsion afin de diminuer la tension interfaciale.

- L'émulsification spontanée

La formation spontanée d'une émulsion ou d'une NE, est obtenue lorsque deux liquides non miscibles, qui ne sont pas en équilibre, sont mélangés à une certaine température sans qu'un apport d'énergie externe soit nécessaire. Le mouvement d'un composant miscible à l'eau (alcool amphiphile ou tensioactif) de la phase organique à la phase aqueuse va provoquer la formation spontanée de gouttelettes en augmentant l'aire interfaciale entre l'huile et l'eau et la turbulence interfaciale. Ce phénomène est appelé l'effet ouzo (Ganachaud and Katz, 2005). L'émulsification est dite spontanée car sans agitation les deux liquides mélangés ne sont pas à l'équilibre. Dans l'industrie pharmaceutique, les systèmes préparés grâce à cette méthode sont appelés système de délivrance de principe actif auto émulsifiant (Self emulsifying drug delivery system (SEDDS) ou self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS)) (Singh et al., 2017).

- Émulsification par inversion de phase de composition

Une macroémulsion H/E est préparée à température ambiante puis diluée lentement avec de l'eau. Au cours de la dilution, le système passe par un point d'inversion de phase où l'émulsion E/H se transforme en émulsion H/E (Gupta et al., 2016). A ce point, la tension interfaciale de l'interface huile et eau est très faible et de petites gouttelettes peuvent être formées sans apport d'énergie. Le changement de phase est provoqué par l'enthalpie libre du système et entraîne une inversion spontanée des tensioactifs.

- Émulsification par inversion de phase de température

Une macroémulsion E/H est préparée à une température supérieure à la température d'inversion de phase du mélange huile/eau/tensioactif. Lorsque la température du système est diminuée jusqu'à la température ambiante, le mélange passe par la température d'inversion de phase où se produit la transformation de l'émulsion E/H à H/E. Cette technique est basée sur la variation de solubilité des tensioactifs non ioniques par rapport à certains changements de température (Gutiérrez et al., 2008). Lorsque la température est élevée, la tête des tensioactifs est déshydratée et la solubilité dans la phase aqueuse est diminuée. A basse température, la tête du tensioactif non ionique est fortement humidifiée et plus soluble dans la phase aqueuse.

2.2.2 Émulsification à forte énergie

Les techniques de préparation des NEs à forte énergie nécessitent l'utilisation de dispositifs mécaniques capables de générer des forces perturbatrices suffisamment intenses pour rompre les phases. Les différents équipements employés sont les dispositifs ultrasonores à hautes fréquences, l'homogénéiseur haute pression et le microfluidiseur.

Les **techniques ultrasonores** utilisent des ondes à haute énergie (20 kHz à 100 MHz) qui créent des turbulences, dues au phénomène de cavitation, qui vont régir la formation des NEs. Les turbulences sont induites par la formation puis l'effondrement de microbulles. L'effondrement des microbulles entraîne des microjets de liquide à l'interface de deux phases non miscibles. Ces turbulences localisées produisent des forces de cisaillement intenses qui favorisent la rupture des gouttelettes et le mélange des phases. Comparée aux techniques conventionnelles, l'émulsification par ultrasons présente de nombreux avantages tels que la formation de gouttelettes plus petites et d'émulsion avec une distribution en taille plus étroite, la formation d'émulsions plus stables, une consommation en énergie et en tensioactifs plus faible et des coûts de production plus bas. Cependant, la mise à l'échelle reste un enjeu majeur (Abbas et al., 2013).

L'**homogénéisation haute pression** se base sur le fait de soumettre une émulsion grossière à une pression très élevée et sur son passage à travers un espace étroit (quelques micromètres) entre un stator fixe et un rotor en mouvement. Les grosses gouttelettes se divisent ainsi en plus petites puisqu'elles sont soumises à une contrainte d'allongement et de cisaillement extrême. Le processus est répété jusqu'à ce que la taille des gouttelettes devienne constante (Singh et al., 2017).

La **microfluidisation** est basée sur le pompage de macroémulsions à travers des microcanaux variant axialement. Les gouttelettes subissent une contrainte de cisaillement élevée sur la longueur des microcanaux et se divisent pour former des gouttelettes plus petites. Comme pour l'homogénéiseur haute pression, la microfluidisation nécessite plusieurs passages pour que la taille des gouttes devienne constante. Les coûts de production de cette technique sont très largement supérieurs aux autres procédés et il s'est avéré moins pratique en ce qui concerne la contamination du matériel et le traitement aseptique (Maa and Hsu, 1999). Ces inconvénients expliquent son utilisation limitée à l'échelle industrielle (Couffin and Delmas, 2013).

2.3 Caractérisation des NEs

Il existe diverses techniques de détermination de la taille des NEs : les techniques de microscopies, les techniques de diffraction et diffusion de la lumière, les techniques hydrodynamiques (fractionnement par écoulement de champ, chromatographie par perméation de gel, ultracentrifugation et sédimentation centrifuge) ainsi que la technique du compteur Coulter.

Les techniques de microscopie sont utilisées pour déterminer la morphologie, la structure lamellaire, les caractéristiques de surface, la taille et la stabilité des NEs. Il existe la microscopie optique, la microscopie électronique à coloration négative, à cryo-transmission, à balayage, la microscopie confocale et la microscopie à sonde à balayage.

Les techniques de diffraction et de diffusion de la lumière permettent de mesurer instantanément la distribution en taille d'un grand nombre de particules dans un échantillon aqueux, et sont plus appropriées que les techniques de microscopie pour mesurer la distribution en taille des NEs. La technique la plus connue est la diffusion dynamique de la

lumière (DLS) (Mozafari et al., 2007) (également appelée PCS - Photon Correlation Spectroscopy en anglais). La mesure de la taille des particules se base sur la fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée. Si une petite particule est éclairée par une source lumineuse telle qu'un laser, la particule diffuse la lumière dans toutes les directions. Lorsqu'un écran est placé à proximité de la particule, il est éclairé par la lumière diffusée. Si l'on remplace la particule par des milliers de particules stationnaires, l'écran présente alors des mouchetures : des zones de lumière vive et des zones sombres où aucune lumière n'est détectée. En pratique, les particules en suspension dans un liquide ne sont jamais stationnaires. Elles sont constamment en mouvement en raison du mouvement brownien. Le mouvement brownien est le mouvement des particules dû à leur collision aléatoire avec les molécules du liquide qui les entoure. La DLS se base sur le fait que les petites particules se déplacent rapidement et les grandes particules se déplacent plus lentement. La relation entre la taille d'une particule et sa vitesse due au mouvement brownien est définie par l'équation de Stokes-Einstein (Équation 1).

$$D = k_B T / 6\pi\mu R_0 \text{ Eq. 1}$$

Où D est le coefficient de diffusion, μ la viscosité du solvant, R_0 le rayon du soluté, k_B la constante de Boltzmann et T la température en Kelvin (Rangamani and Iyengar, 2007).

Lorsque les particules se déplacent, l'addition de phase constructive et destructive de la lumière diffusée entraîne la fluctuation de l'intensité lumineuse. Le taux de fluctuation est mesuré puis la taille des particules est calculée.

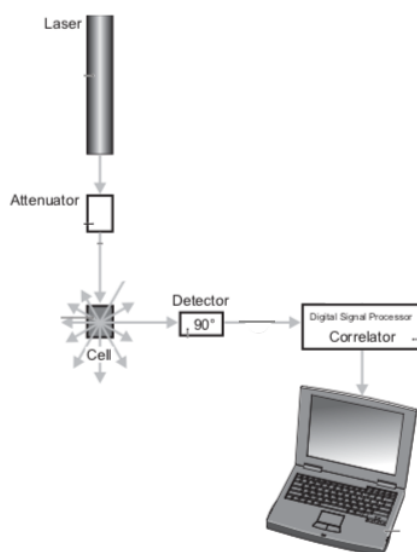


Figure 13 : Schéma de la mesure de taille par diffusion dynamique de la lumière (Malvern instrument, 2003)

Lors de la caractérisation de la distribution en taille des particules par DLS, un paramètre est couramment utilisé pour définir la gamme de taille des NEs, on le nomme "indice de polydispersité" (PDI). Le terme "polydispersité" (ou "dispersité" comme recommandé par l'UICPA) est utilisé pour décrire le degré de non-uniformité de la distribution de taille des particules ("Dispersity or Polydispersity is a key parameter for GPC SEC," 2017). Le PDI est un nombre sans dimension calculé à partir de l'analyse des cumulants. Les valeurs de PDI supérieures à 0,7 indiquent que l'échantillon présente une distribution granulométrique très large et qu'il n'est probablement pas adapté à l'analyse par la technique de DLS. Les valeurs inférieures ou égales à 0,2 sont le plus souvent considérées comme acceptables dans la pratique pour les NEs (Clarke, 2013).

2.4 Application des NEs dans l'industrie agroalimentaire

Comme détaillé précédemment, la taille des gouttelettes des NEs peut être modulée pour ajuster l'apparence des NEs afin qu'elles aient un aspect laiteux ou plutôt translucide. Les NEs peuvent également être optimisées afin d'avoir une stabilité à long terme (quelques mois à plusieurs années). Elles ont l'avantage d'être relativement moins sensibles aux changements de dilution, de température et de pH que les microémulsions. Ces propriétés rendent les NEs attrayantes dans diverses industries, notamment dans les secteurs de l'alimentation et des cosmétiques. Elles sont aussi employées dans l'industrie pharmaceutique et pour la délivrance de principes actifs mais dans cette section, nous allons nous focaliser sur les applications dans l'industrie agroalimentaire.

Le développement des NEs dans le domaine de l'alimentation a récemment pris de l'ampleur. L'objectif est d'employer les NEs comme un système capable d'encapsuler, de protéger et de délivrer des composants alimentaires fonctionnels tels que les vitamines, les arômes, les colorants, les antioxydants, les conservateurs et les nutraceutiques (McClements et al., 2007). Les NEs ont été utilisées principalement dans le développement de certains aliments ou boissons afin d'enrichir la biodisponibilité de ces composants fonctionnels et de contribuer à la stabilité des aliments qui les contiennent.

Les NEs sont utilisées dans ce domaine principalement pour leur capacité à encapsuler des composants alimentaires fonctionnels lipophiles. L'encapsulation de composants lipophiles permet de :

- Faciliter leur manipulation et leur incorporation dans des matrices alimentaires,
- Optimiser leur biodisponibilité en améliorant leurs propriétés (augmentation de la solubilité et de l'absorption à travers les cellules),
- Contrôler le taux de molécules libérées et leur localisation,
- Augmenter leur stabilité en les protégeant contre des dégradations chimiques et/ou métaboliques après administration orale.

De nombreuses études ont montré que plus les substances bioactives lipophiles étaient encapsulées dans des gouttelettes de petite taille plus leur biodisponibilité était augmentée (Acosta, 2009; Kesisoglou et al., 2007). Les explications données suite à ces résultats sont les suivantes :

- La surface de contact des petites gouttelettes étant plus grande elles sont digérées plus rapidement par les enzymes et les composants qu'elles contiennent sont donc libérés plus rapidement.
- Les petites gouttelettes peuvent pénétrer la couche qui recouvre les cellules épithéliales du petit intestin ce qui augmente leur temps de résidence et les rapproche du site d'absorption.
- Les petites gouttelettes peuvent être transportées directement à travers la couche cellulaire de l'épithélium par un mécanisme paracellulaire ou transcellulaire.
- La solubilité dans l'eau des composants lipophiles est d'autant plus grande que la taille des gouttelettes est petite. Ainsi, leur absorption peut être améliorée lorsque la taille des gouttelettes est abaissée.

Les avantages de l'utilisation des NEs dans l'alimentation cités précédemment ont mené à l'étude pratique de l'encapsulation de substances bioactives dont voici quelques exemples d'application.

Les arômes et les colorants utilisés dans les aliments possèdent des fonctions aldéhyde, cétone et ester qui les rendent sujets à des dégradations oxydatives ou photolytiques. Leur encapsulation dans des NEs les protège de ces effets délétères et améliore leur durée de conservation. Par exemple, le β -carotène, qui est un précurseur de la vitamine A utilisé comme colorant naturel et antioxydant dans l'industrie agroalimentaire, est facilement dégradé par la lumière, la chaleur et l'oxygène. *Modeiros et al.* ont encapsulé des caroténoïdes extraits du melon de Canteloupe dans des NEs H/E et étudié la solubilité dans l'eau, puis ils

ont incorporé ces NEs dans des yaourts et étudié la stabilité de la couleur (Medeiros et al., 2019). Ils ont montré que l'encapsulation du β -carotène dans des NEs H/E de gélatine améliore sa solubilité dans l'eau et son incorporation dans des matrices alimentaires, et que les yaourts colorés grâce à ces NEs avaient une couleur stable jusqu'à 60 jours contrairement à l'extrait brut.

Les huiles essentielles de plantes présentent des activités antimicrobiennes contre les agents pathogènes d'origine alimentaire. Cependant, leur incorporation dans des matrices alimentaires est limitée à cause de leur hydrophobicité. Sugumar *et al.* ont par exemple, montré que des NEs d'huile essentielle d'orange inhibent l'altération du jus de pomme par *Saccharomyces cerevisiae* et que ce type d'émulsion peut être utilisé pour la conservation naturelle d'aliments ou de boissons (Sugumar et al., 2016).

Les NEs ont aussi été employées pour l'encapsulation de nutraceutiques comme le resvératrol, un polyphénol naturel retrouvé dans les myrtilles, les framboises et la peau du raisin. Davidov-Pardo et McClements ont montré que l'encapsulation du resvératrol dans des NEs composées d'huile de pépin de raisin a permis d'augmenter sa stabilité face à la dégradation de la lumière ultraviolette (Davidov-Pardo and McClements, 2015).

3 Exemple d'encapsulation de molécule bioactive dans des NEs : la curcumine

3.1 Aspects généraux de la curcumine

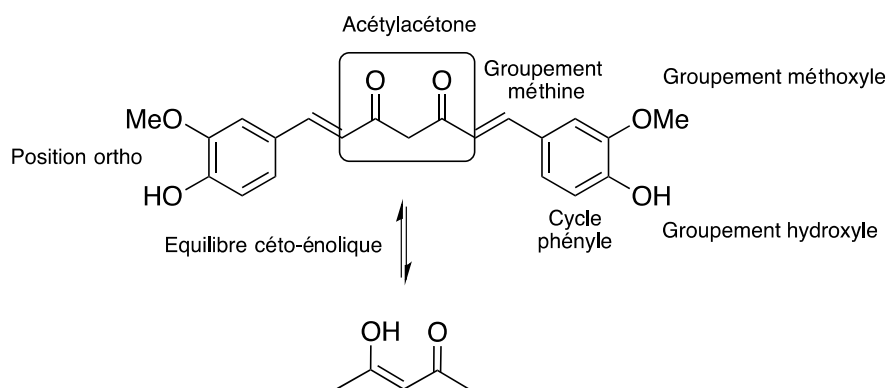


Figure 14: Structure de la curcumine

La curcumine est un composé polyphénolique présent naturellement dans les rhizomes de Curcuma. Le curcuma est une épice largement répandue et principalement utilisée dans la cuisine indienne et dans la médecine indienne et chinoise. La couleur jaune caractéristique du curcuma est due à des pigments naturels que l'on appelle les curcuminoïdes (3 à 5% en masse). Ils sont au nombre de 4 : la curcumine qui représente 77 % des curcuminoïdes, la déméthoxy-curcumine (17%), bis-déméthoxy-curcumine (3%) et la cyclocurcumine (3%). La teneur en curcumine d'un rhizome est donc très faible (2-8%) (Sharma et al., 2005). La curcumine est une molécule à faible poids moléculaire (368,37 g/mol) composée de deux cycles aromatiques substitués par un groupement méthoxyle et un groupement hydroxyle en position ortho l'un de l'autre (figure 14). Les cycles aromatiques sont reliés par une chaîne carbonée comprenant deux groupements carbonyles en α et β . La curcumine existe sous trois formes tautomères, deux isomères dans une forme céto-énolique équilibrée et une forme β dicétone. Dans des conditions neutres, voire légèrement acides, la forme céto de la curcumine domine tandis que dans des conditions alcalines, la forme énolique l'emporte.

La curcumine est une molécule relativement hydrophobe avec un coefficient de partage octanol/eau ($\log P$) de 3,2. La valeur de son $\log P$ étant assez élevée, la curcumine est un composé pratiquement insoluble dans l'eau (11 ng/mL à température ambiante à pH 5) (Tønnesen et al., 2002). Elle est néanmoins très soluble dans les solvants polaires comme le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'acétone, le méthanol, l'éthanol (par ordre de solubilité décroissant). C'est une molécule sensible aux températures élevées, à la lumière, aux pH extrêmes, à l'humidité et à l'oxygène. La dégradation de la curcumine se fait par la partie dicétone qui peut participer à des réactions d'addition nucléophile réversibles et irréversibles (réaction de Michael), d'hydrolyse, de dégradation et des réactions enzymatiques (Priyadarsini, 2014). En général, la dégradation chimique de la curcumine en solution conduit à la formation d'une série de composés, tels que le trans-6-(4'-hydroxy-3'-méthoxyphényl)-2,4-dioxo-5-hexéanal, la vanilline, l'acide férulique et le féruloylméthane (Typek et al., 2019).

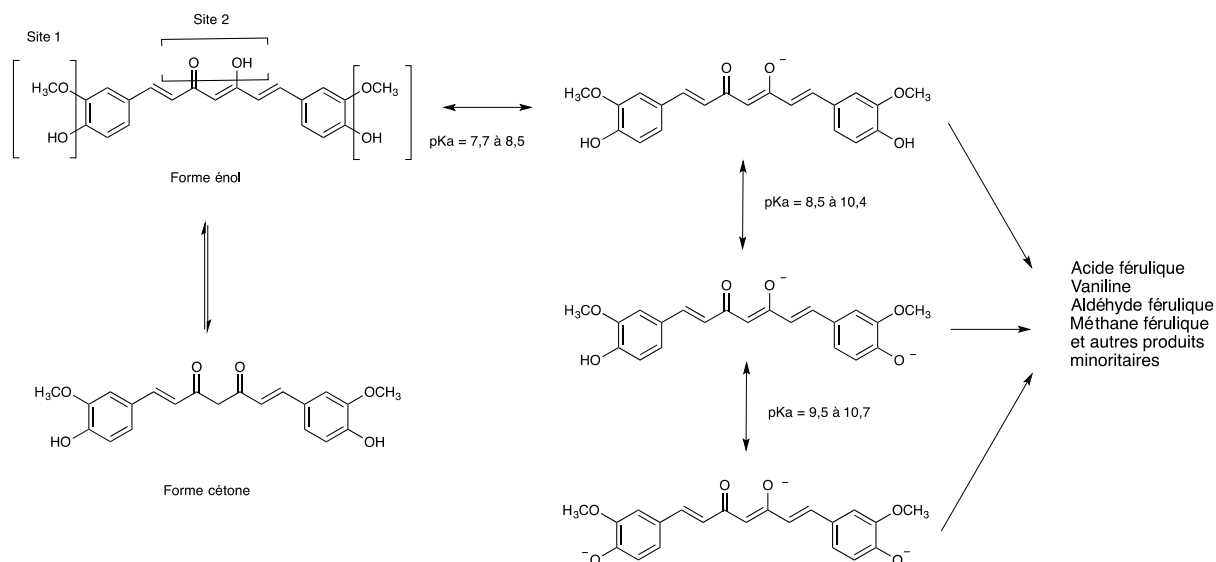


Figure 15: Tautomérie céto-énonol, équilibres prototropiques et produits de dégradation de la curcumine (Priyadarsini, 2014)

3.2 Les principaux enjeux liés à l'administration de la curcumine

Ces dernières décennies, ce composé polyphénolique a présenté un intérêt considérable car il possède beaucoup de fonctionnalités pharmaceutiques et biologiques. Il peut être utilisé en tant qu'arôme (gout amer), conservateur ou colorant naturel, et comme antioxydant dans des boissons ou aliments. Certaines études ont aussi exploré l'utilisation de la curcumine pour la prophylaxie et le traitement d'état inflammatoire, de maladies neurodégénératives, cardiovasculaires ou auto-immunes ou de troubles gastro-intestinaux. L'étude des activités anticancéreuses de la curcumine a mis en évidence des arguments en faveur de son utilisation dans la prévention et le traitement de certaines tumeurs (Maheshwari et al., 2006).

Cependant, malgré ces bénéfices pharmacologiques, l'absorption de la curcumine dans le corps humain est limitée. Les difficultés d'absorption de la curcumine sont liées à sa nature lipophile qui induit une faible solubilité dans l'eau, à son instabilité chimique, à sa sensibilité à la photo-dégradation et à sa transformation métabolique très élevée qui induit une faible bio-accessibilité orale. En effet, il existe un consensus scientifique qui affirme que la curcumine administrée oralement a une faible biodisponibilité. La biodisponibilité de la curcumine est déterminée par sa bio-accessibilité.

La bio-accessibilité d'une molécule bioactive est définie par la quantité initialement ingérée qui est solubilisée par le fluide gastro-intestinal dans une forme qui peut ensuite être absorbée par les cellules épithéliales. Pour exercer ses activités biologiques, la curcumine doit être bio-accessible puis être absorbée par les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal et ensuite être transportée dans la circulation systémique. Ainsi, la faible solubilité dans l'eau, l'instabilité aux pH physiologiques et la faible biodisponibilité orale de la curcumine limitent son utilisation pour des applications industrielles. Afin de contourner ces limitations, l'encapsulation de la curcumine dans des nano-systèmes semble être une approche efficace. Plus particulièrement, les NEs H/E semblent être des systèmes très appropriés pour améliorer la stabilité et la biodisponibilité de la curcumine au vu de sa haute hydrophobicité et de la composition principalement aqueuse de l'organisme.

3.3 Stabilité et bioaccessibilité de la curcumine encapsulée dans des NEs

Dans les NEs, la curcumine est protégée de la phase aqueuse qui provoque sa dégradation chimique puisqu'elle se situe à l'intérieur des gouttelettes d'huile ou à l'interface huile-eau dû au groupement polaire qui la constitue. Zheng et al. ont comparé la stabilité chimique de la curcumine incorporée dans une solution aqueuse de DMSO et une émulsion H/E (Zheng et al., 2018). Ces deux formulations de la curcumine ont été incubées pendant 14 jours à 55°C à pH 3 et 7. A pH 3 et 7 ; la dégradation de la curcumine mesurée par changement de couleur au cours du temps était significativement plus importante dans la solution aqueuse de curcumine que dans l'émulsion après 14 jours de stockage. Cette étude confirme l'efficacité des émulsions à protéger la curcumine des dégradations chimiques en limitant ses interactions avec les substances réactives présentes en solution.

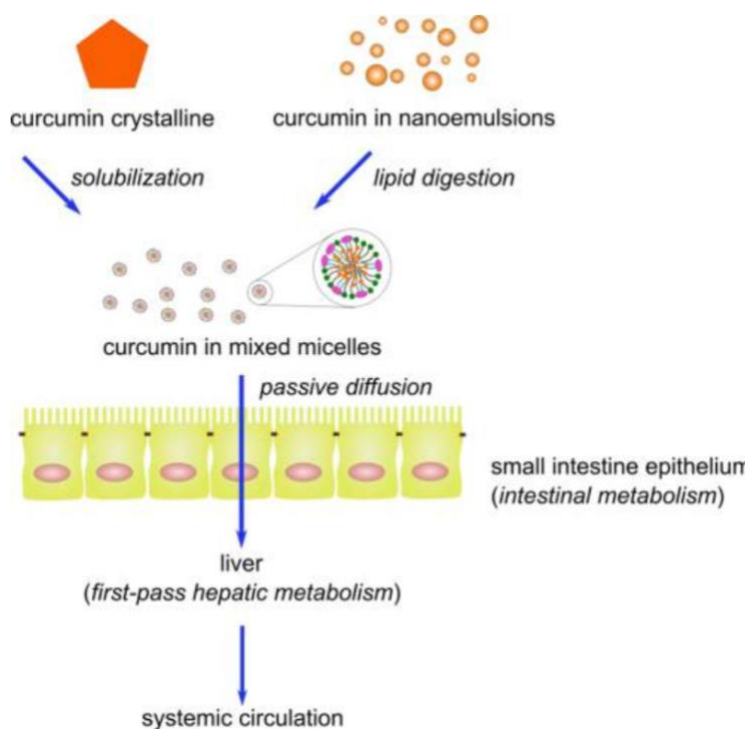


Figure 16: Schéma de l'absorption et du métabolisme de curcumine non formulée (cristalline) et de curcumine encapsulée dans des NEs (Yu and Huang, 2012)

Afin d'évaluer la bio-accessibilité de la curcumine encapsulée dans des NEs, des modèles de digestion *in vitro* peuvent être utilisés. Ils sont composés de trois étapes successives : la phase orale, la phase gastrique puis la phase du petit intestin. Pour imiter l'étape orale, les NEs sont incubées dans un fluide salivaire obtenu à partir de mucine et d' α -amylase à un pH proche de la neutralité pendant un temps fixe et à la température du corps (37 °C). L'étape gastrique implique l'ajout de sels, d'acides et d'enzymes digestives à un pH acide pendant un temps fixe, toujours à 37 °C. L'étape intestinale implique l'ajout d'un extrait de bile, de pancréatine et d'une solution d'électrolytes à un pH neutre voir alcalin (6,5-7,5) pendant un temps fixe, toujours à 37 °C (Park et al., 2019; Sarkar et al., 2009).

La digestion des gouttelettes d'huile des NEs, contenant des lipides tels que les triacylglycérols, génère des acides gras libres et des monoacylglycérols. Les produits de la digestion des lipides (i.e. les acides gras libres) générés par la lipolyse de l'huile peuvent former des colloïdes tels que les micelles mixtes. Ces micelles mixtes sont capables de solubiliser la curcumine dans leur cœur hydrophobe et, si elles sont suffisamment petites, de la transporter à travers la couche de mucus des cellules épithéliales (Zhang and McClements, 2016). La fraction de curcumine contenue dans la phase de micelles mixtes après la digestion des lipides peut être utilisée pour quantifier sa bio-accessibilité (Ahmed et al., 2012). Par conséquent,

la bio-accessibilité de la curcumine est influencée par de nombreux facteurs comme la nature de la phase huileuse, la taille des gouttes et les interactions entre la curcumine et le tensioactif qui stabilise les gouttelettes.

Ahmed *et al.* ont montré que la nature et les propriétés chimiques des acides gras libres générés par la digestion des huiles influencent la solubilisation et le transport de la curcumine et sa bio-accessibilité (Ahmed et al., 2012). Les micelles d'acides gras à longues chaînes (générés par des triacylglycérols à longues chaînes) ont un cœur hydrophobe plus volumineux que les acides gras à chaînes courtes et solubilisent donc plus facilement la curcumine.

Pinheiro *et al.* ont montré que la nature du tensioactif a une influence sur la bio-accessibilité de la curcumine (Pinheiro et al., 2013). En fonction de la nature du tensioactif, la surface des gouttelettes dans le système digestif peut être plus ou moins altérée et la capacité des enzymes digestives à se lier à la surface des gouttelettes peut être différente. Pendant une digestion simulée, l'addition d'enzymes digestives, les changements de pH, les forces ioniques ou de cisaillement liées aux phénomènes d'agrégation, de coalescence ou de floculation entraînent l'augmentation de la taille des gouttelettes des NEs. Cette augmentation est liée à une diminution de la surface spécifique disponible pour l'interaction avec les enzymes digestives. Dans ces conditions, les NEs stabilisées par des tensioactifs non-ioniques sont plus stables que celles stabilisées par des tensioactifs ioniques. Les tensioactifs non-ioniques avec une partie hydrophile polyoxyéthylène permettent une répulsion stérique ce qui ralentit la croissance des gouttelettes. A un instant T, les gouttelettes des NEs stabilisées par les tensioactifs non ioniques étant plus petites que celles stabilisées par des tensioactifs ioniques, leur surface spécifique est plus grande, et donc plus disponible pour des liaisons avec les sels biliaires et les lipases. Ainsi, la nature du tensioactif de NEs encapsulant la curcumine a une influence sur la bio-accessibilité.

L'activité pharmacologique de la curcumine encapsulée dans des NEs a été étudiée dans le cadre d'essais biologiques *in vitro* et *in vivo*. Les NEs présentent des avantages par rapport aux solutions de curcumine pour un large éventail d'applications. En effet, de nombreuses études montrent que les techniques de nanoencapsulation améliorent les propriétés fonctionnelles de la curcumine, notamment les activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Guan et al., 2017; Onodera et al., 2015; Shah et al., 2016). De plus, un avantage supplémentaire de l'utilisation des NEs comme système d'encapsulation des

substances bioactives lipidiques comme la curcumine est qu'elles peuvent être séchées. La transformation des NEs en poudre permet d'accroître leur stabilité à long terme, de faciliter leur transport, leur utilisation et leur stockage.

4 Lyophilisation des NEs

La lyophilisation est un procédé qui est largement utilisé pour le séchage et la stabilisation de produits pharmaceutiques tels que les virus, les vaccins, les protéines, les peptides ou de systèmes colloïdaux tels que les liposomes, les nanoparticules, les NEs. En effet, l'instabilité chimique (hydrolyse) et physique (agrégation/fusion) d'un échantillon due à la présence d'eau dans celui-ci est un obstacle majeur pour son utilisation. Le principe de la lyophilisation consiste donc à extraire l'eau contenu dans un échantillon. Pour cela la majeure partie de l'eau présente dans celui-ci est convertie en glace et les solutés en solide cristallin ou amorphe. Lyophiliser permet ainsi d'améliorer la stabilité et de faciliter la manipulation d'un échantillon. Comparé au séchage par atomisation, ce procédé est réalisé à basse température et peut donc être employé pour les composés thermolabiles. Cependant, il s'agit d'un processus long qui nécessite une consommation d'énergie importante et relativement coûteuse, et donc privilégié pour des produits ayant une haute valeur ajoutée.

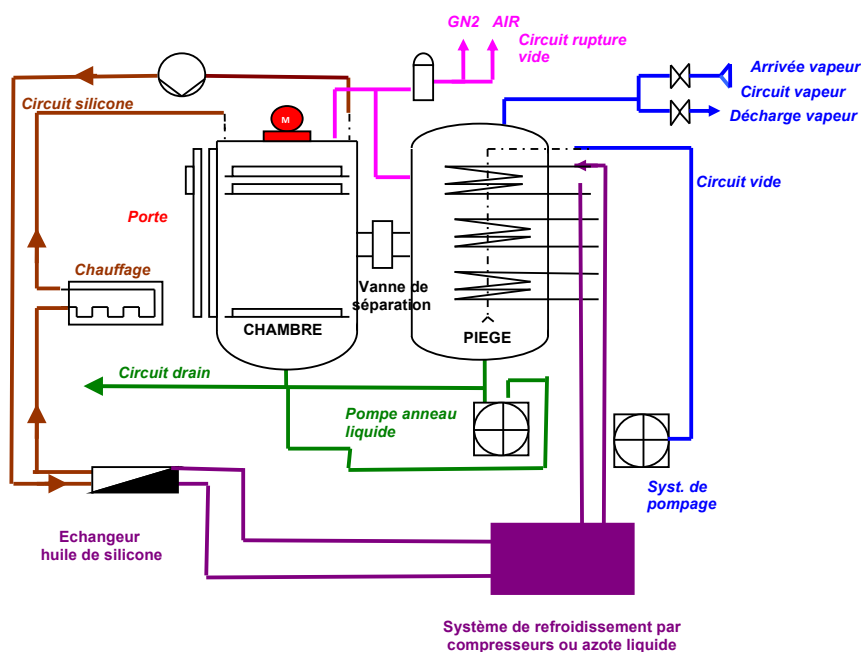


Figure 17 : Schéma d'un lyophilisateur

Il existe différents types d'équipements : les lyophilisateurs dits « de paillasse » et les lyophilisateurs de laboratoire. Un lyophilisateur de laboratoire est généralement constitué d'une chambre contenant les échantillons à lyophiliser, d'un condenseur qui sert à piéger la vapeur d'eau, d'un système de pompage et d'un système de refroidissement. La chambre est une enceinte composée d'étagères et équipée de manière à atteindre un niveau de vide acceptable. Le condenseur capture la vapeur d'eau de la même manière qu'une pompe à vide et peut être situé à l'intérieur ou à l'extérieur de la chambre. La pompe à vide est située après le condenseur et atteint des pressions entre 50 et 500 μBar . Le groupe froid refroidit par compresseur ou azote liquide et entraîne une forte consommation énergétique.

Un cycle de lyophilisation est principalement composé de trois étapes successives :

- la congélation
- la sublimation
- la dessiccation

Tout d'abord, l'échantillon est refroidi jusqu'à ce qu'il soit complètement solidifié. Si cette étape est réalisée dans le lyophilisateur, la température de l'étagère est abaissée. Ensuite, l'étape de sublimation commence lorsque la pression est diminuée à des valeurs au-dessous de la pression de vapeur de la glace et que la température de l'étagère est augmentée de manière à compenser la chaleur latente perdue par la sublimation de la glace. Cette étape se termine lorsque la température du produit devient positive. La dernière étape est la dessiccation de l'échantillon. L'eau résiduelle va se désorber et traverser l'échantillon sec au travers des pores correspondant à l'espace occupé par les cristaux de glace ayant sublimé.

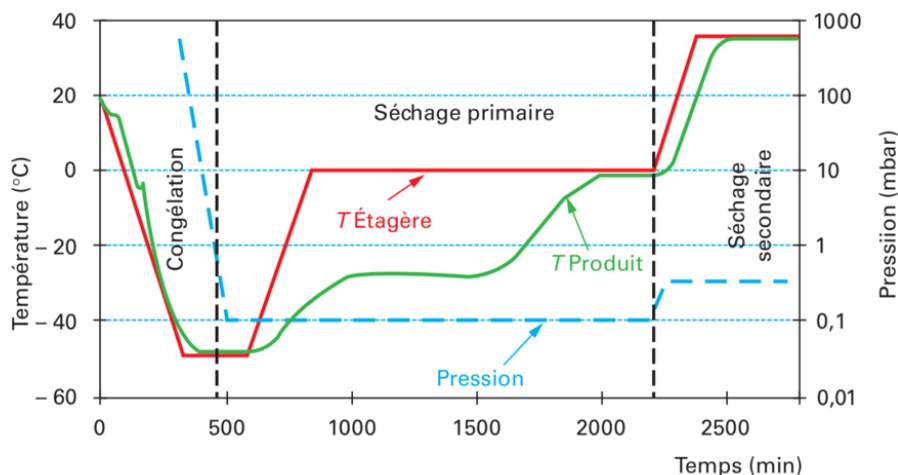


Figure 18: diagramme d'un cycle de lyophilisation : (1) Congélation, (2) mise sous vide, (3) étape de sublimation avec remontée graduelle en température pour extraire la totalité de l'eau du produit, (4) retour à la pression atmosphérique (Hedoux, 2013)

4.1 Cycle de lyophilisation

4.1.1 Congélation

La première étape du procédé de lyophilisation des NEs consiste à solidifier la suspension liquide en la refroidissant. Cette étape peut être réalisée dans le lyophilisateur ou à l'extérieur en plongeant l'échantillon dans de l'azote liquide. L'optimisation de la vitesse de congélation est une étape cruciale puisque ce paramètre impacte la taille des cristaux de glace formés. En effet, selon le type de cristaux formés, les propriétés physiques des échantillons peuvent être modifiées et leur stabilité impactée. La congélation rapide entraîne la formation de plus petits cristaux et une plus grande surface spécifique que la congélation lente. La contrainte mécanique appliquée sur les particules est donc plus faible dans le cas de la congélation rapide (Searles et al., 2001). Une congélation rapide correspond en général à une vitesse de congélation de 1°C/min.

L'impact de la congélation sur les propriétés physiques des produits en fait une étape critique. Afin d'optimiser le procédé, il est important de déterminer les températures critiques des échantillons à lyophiliser : la température de transition vitreuse à l'état congelé T_v' , ou T_g'

en anglais pour « glass » (température à laquelle un matériau amorphe passe d'un état visqueux à un état vitreux), et la température eutectique pour les échantillons qui forment un eutectique (un mélange de solides cristallins qui présente les mêmes caractéristiques physiques qu'un corps pur). L'état vitreux est un état solide ayant une structure amorphe. Cet état résulte d'un figeage rapide d'une matière liquide rendant impossible sa cristallisation (Descamps, 2017). Ainsi, afin d'assurer la solidification totale de l'échantillon, sa congélation doit être réalisée à une température plus basse que la T_g' de ce même échantillon congelé et amorphe. Il est important de rester en dessous de ces températures critiques lors du procédé de lyophilisation afin de ne pas entraîner une désorganisation structurale des produits et de conserver leur intégrité.

4.1.2 Sublimation

Lorsque les échantillons sont entièrement congelés, l'étape suivante du cycle de lyophilisation consiste à sublimer la glace formée. La sublimation des cristaux de glace se produit en quatre étapes :

- 1- La chaleur est transférée de l'étagère à la solution congelée,
- 2- La glace sublime et la vapeur d'eau formée traverse la portion sèche de produit jusqu'à la surface de l'échantillon,
- 3- La vapeur d'eau est transférée de la surface du produit à la chambre du condenseur,
- 4- La vapeur d'eau se condense dans le condenseur.

La sublimation est l'étape la plus longue et la plus onéreuse du procédé de lyophilisation et celle qui permet d'éliminer la majeure partie de l'eau (85 à 95%). Différents paramètres opératoires influencent la vitesse de sublimation et peuvent être optimisés afin de réduire la durée de cette étape.

La glace est sublimée de la surface de l'échantillon vers le bas. De cette manière, la vapeur d'eau sublimée est éliminée par diffusion à travers les pores de la portion sèche de l'échantillon. La diffusivité étant liée à la taille des pores, la congélation rapide qui forme des cristaux et des pores plus petits entraîne un transfert de masse plus difficile ce qui augmente

la durée de cette étape.

La sublimation est une réaction endothermique. L'énergie fournie au produit par les étagères permet la sublimation de la glace. Cependant, les étagères ne doivent pas être amenées à une température excessive car la température du produit risquerait de dépasser la température de collapse (T_c) qui est la température maximale que le produit puisse atteindre sans perturbation lors de la sublimation. Les produits lyophilisés chauffés au-dessus de leur T_c pendant l'étape de lyophilisation perdent leur structure macroscopique et s'effondrent.

4.1.3 Dessiccation

La troisième étape, l'étape de dessiccation aussi appelée séchage secondaire, consiste à éliminer l'eau résiduelle qui n'a pas été transformée en glace durant l'étape de congélation. Le produit est chauffé légèrement au-dessus de la température ambiante (20 à 50 °C) ce qui entraîne la désorption de l'eau contenue dans la matrice vitreuse formée durant la congélation. Cette étape est souvent très courte (quelques heures) et ne nécessite donc pas d'optimisation pour réduire son coût. Cependant, de la même manière que lors du premier séchage, le paramètre limitant la vitesse de dessiccation est la surface spécifique. Les échantillons soumis à une congélation rapide possèdent de nombreux petits cristaux avec une surface spécifique large ce qui favorise la désorption de l'eau et réduit la perturbation de la structure bicouche (Wang et al., 2012).

La transition entre la fin du séchage primaire et le début du séchage secondaire est très importante, spécialement pour les produits amorphes. Dans la mesure où le produit renferme un degré d'humidité significatif, il y a risque de collapse (contraction du lyophilisat sur lui-même) si le produit est chauffé plus rapidement que la vitesse d'évaporation de l'eau résiduelle.

Cette étape est indispensable car un taux d'humidité résiduelle important a pour conséquence d'amoindrir la stabilité des produits durant leur stockage. La concentration massique en eau résiduelle varie typiquement entre 0,5 et 3 % en fin de lyophilisation. Les techniques usuelles pour mesurer le taux d'humidité résiduelle du produit, sont la titration selon la méthode Karl Fisher, l'analyse thermique gravimétrique, ou la spectroscopie infrarouge.

La réhydratation du produit amorphe doit être faite avec précaution car une addition trop

rapide d'eau pourrait détruire la structure poreuse et entraîner un effondrement du produit. Afin de protéger la structure du produit lors du cycle de cette étape des cryoprotecteurs ou des lyoprotecteurs peuvent être utilisés.

4.2 Cryo et lyoprotecteurs

La lyophilisation est un procédé qui peut déstabiliser les suspensions colloïdales telles que les NEs, principalement lors des étapes de congélation et de dessiccation qui peuvent générer beaucoup de désorganisation. En effet, lors de la congélation des échantillons, il y a une séparation de phase entre la glace formée et la solution hautement concentrée en gouttelettes. Cette étape induit un rapprochement des gouttelettes et possiblement leur agrégation ou leur fusion de façon irréversible (Abdelwahed et al., 2006a). De plus, les cristaux de glace formés exercent un stress mécanique sur les gouttelettes conduisant à leur déstabilisation. Afin d'empêcher la déstabilisation des NEs, des excipients particuliers peuvent être ajoutés à la formulation avant la congélation. On en distingue deux catégories :

- Les cryoprotecteurs qui sont efficaces contre le stress lié à la congélation,
- Les lyoprotecteurs qui sont efficaces contre le stress lié à la déshydratation au cours de l'étape de dessiccation et lors du stockage à sec.

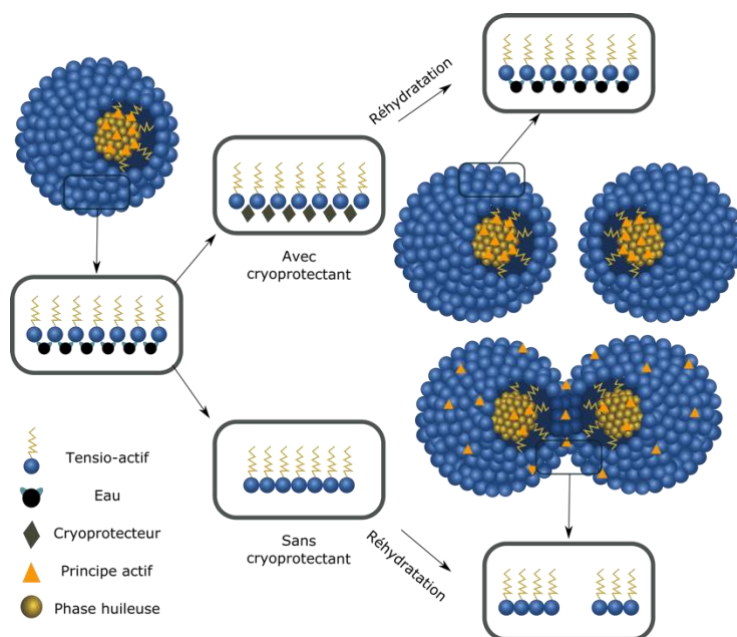


Figure 19: Effet de la lyophilisation sur les réarrangements des tensioactifs, la taille des

gouttelettes et la fuite du principe actif, adapté de (Morais et al., 2016)

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer leurs mécanismes de protection :

- L'hypothèse de remplacement de l'eau qui consiste à considérer que les liaisons hydrogène entre les têtes polaires des tensioactifs et l'eau serait remplacées par des liaisons hydrogène avec les groupement hydroxyles des cryoprotecteurs (Zhang et al., 2008).
- L'hypothèse de la vitrification consiste à considérer que l'interaction entre les groupements hydroxyles du cryoprotecteur avec les molécules d'eau et les groupements polaires des tensioactifs à la surface des gouttelettes augmente la viscosité de la solution. La mobilité et par conséquent la cristallisation de la glace en sont ainsi ralenties limitant le stress mécanique appliqué sur les gouttelettes (Sussich et al., 2001).
- L'hypothèse de formation d'un mélange eutectique qui se base sur le fait que les cryoprotecteurs contiennent de multiples groupements hydroxyle et peuvent former un eutectique avec l'eau menant à la formation de solides amorphes ou de cristaux de glace imparfait. La formation de cet eutectique conduit à une inhibition des dommages mécaniques liés à l'expansion des cristaux de glace lors de la congélation (Zhang et al., 2008).
- L'hypothèse de maintien de l'organisation spatiale par l'immobilisation des gouttelettes dans une matrice vitreuse ce qui prévient leur agrégation et les protège du stress mécanique induit par les cristaux de glace (Abdelwahed et al., 2006b).

Concernant la température de transition vitreuse, elle peut s'exprimer sous forme de deux températures critiques mesurables par DSC, appelées T_g et T_g' correspondant respectivement au début et à la fin de la transition. Dans la littérature c'est souvent la T_g' qui est rapportée comme température critique. Le passage de l'état de liquide visqueux à l'état vitreux se produit lorsque la T_g' est atteinte. La T_g' correspond au passage à l'état de solide sec et la T_g à l'état congelé. Les cryoprotecteurs ayant une valeur de T_g' élevée par rapport à la température ambiante sont donc de bons candidats pour stabiliser les produits lors du stockage en évitant le processus de recristallisation (Zhang et al., 2008). Parmi les cryoprotecteurs les plus utilisés, et les plus efficaces, figurent les sucres, les polyols, et certains polymères. De nombreux sucres comme les mono-, di- ou polysaccharides ont été employés pour stabiliser des systèmes colloïdaux (PIKAL, 1999). Toutefois, il semblerait que les cryoprotecteurs de faible masse moléculaire comme le tréhalose ou le glucose puissent mieux

préserver le maintien de la taille des gouttelettes au cours du cycle de lyophilisation (Choi et al., 2007). Les disaccharides sont particulièrement employés puisqu'ils sont à la fois cryo- et lyoprotecteurs et qu'ils ont des T_g' élevées. Dans cette famille de sucres, le tréhalose est présenté dans la littérature comme étant un des cryoprotecteurs les plus efficaces puisqu'il présente une faible réactivité chimique et qu'il a une faible hygroscopie, ce qui lui facilite la formation de liaisons hydrogène avec la surface des gouttelettes, contribuant ainsi à leur stabilisation pendant la lyophilisation (Crowe et al., 1996).

Il est préférable de réaliser une étude préliminaire de congélation/décongélation avant la lyophilisation afin de sélectionner le cryoprotecteur le plus approprié.

4.3 Lyophilisation de NEs

Les NEs lyophilisées doivent posséder certaines caractéristiques pour être considérées comme conformes :

- La préservation des caractéristiques physico-chimiques avant et après le cycle de lyophilisation,
- Un lyophilisat élégant,
- Un temps de reconstitution court,
- Une distribution en taille faible ou non-modifiée,
- Une concentration en principe actif identique à la solution de départ,
- Un taux d'humidité résiduelle acceptable,
- Une stabilité sur le long terme.

Pour obtenir un produit de haute qualité, il est important de contrôler la formulation et le procédé de lyophilisation selon les paramètres suivants :

- La nature du cryoprotecteur qui engendre différents mécanismes de protection (détaillés dans la section précédente).
- La concentration en cryoprotecteur (idéalement entre 5 et 20 %) puisque leur action de protection est maximale à une concentration spécifique.
- La nature (revêtement de la cavité interne) et la forme des flacons contenant la NE à

lyophiliser puisqu'une haute surface spécifique et une épaisseur minimale garantissent une meilleure sublimation.

- Le modèle de lyophilisateur car certains permettent de contrôler tous les paramètres (pression, température) en fonction des différentes étapes du cycle et d'autres non.
- La nature du tensioactif puisqu'elle impacte les interactions avec le principe actif et avec le cryoprotecteur et les réarrangements qui se font pendant la lyophilisation et la réhydratation.
- Les caractéristiques de solubilité du principe actif qui vont déterminer sa capacité à fuir les gouttes pendant le cycle de lyophilisation et la réhydratation.

4.4 Caractérisation du lyophilisat

Après avoir lyophilisé les NEs, il est important de caractériser les formulations sèches pour vérifier la conformité du lyophilisat, de valider le bon déroulement du processus de lyophilisation et, si nécessaire pouvoir l'optimiser.

4.4.1 Aspect macroscopique

En premier lieu, il est important d'évaluer l'intégrité macroscopique du produit lyophilisé. Les caractéristiques visuelles telles que la couleur, la densité, l'uniformité, la mise en évidence d'effondrement ou de collapse doivent être décrites. Un lyophilisat idéal ne doit pas présenter de signe d'effondrement ou de collapse en comparaison avec son volume initial. Une perte au niveau de la structure du lyophilisat est souvent liée à un taux d'humidité résiduelle trop élevé ou à un dépassement des températures critiques lors de la lyophilisation (Rey, 2016).

4.4.2 Vitesse de reconstitution

La réhydratation des NEs lyophilisées se fait avec un volume d'eau identique à celui perdu pendant la lyophilisation et la vitesse de reconstitution est rapporté dans la littérature comme un paramètre à prendre en considération. En général, les produits lyophilisés sont reconstitués rapidement. Si ce n'est pas le cas, c'est un indicateur d'un possible collapse ou

d'une fusion du produit lyophilisé lors de la reconstitution. Plusieurs méthodes existent afin de re-suspendre les NEs après la réhydratation tel que l'agitation manuelle, l'agitation au vortex ou au bain à ultrasons.

4.4.3 Humidité résiduelle

Les propriétés thermiques et structurelles des produits lyophilisés sont largement impactées par l'humidité résiduelle qu'ils contiennent. Par exemple, la T_g' varie en fonction du taux d'humidité d'un échantillon, aussi plusieurs T_g' peuvent exister pour un même échantillon. Moins il y a d'humidité résiduelle dans le lyophilisat plus la T_g' de l'échantillon est élevée. Il est donc important de maintenir une humidité résiduelle faible (i.e. T_g' élevée) afin d'assurer sa bonne stabilité lors du stockage. La sublimation retire 85 à 95 % de l'humidité du produit ; la désorption ou dessiccation secondaire permet de diminuer l'humidité résiduelle à un taux très faible. L'étude des isothermes de désorption de l'eau est réalisée afin de déterminer l'hygroscopie du produit final mais aussi d'évaluer ainsi l'efficacité de l'étape de dessiccation. La méthode la plus commune pour mesurer l'humidité résiduelle d'un produit lyophilisé est la titration Karl Fisher. Le principe de cette méthode est de mesurer l'oxydation du dioxyde de soufre par le diiode en présence d'eau. Dans le cas de la méthode volumétrique à injection directe, l'échantillon contenant l'iode est ajoutée à l'aide d'une burette. Dans le cas de la méthode coulométrique, l'iode est généré dans la cellule de réaction à l'aide d'une électrode. En général, la quantité d'eau résiduelle ainsi mesurée ne doit pas dépasser 1% en masse (Hedoux, 2013).

4.4.4 Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie étudie le comportement thermique d'un échantillon en analysant ses variations énergétiques en fonction de la température. La calorimétrie différentielle à balayage évalue les transferts d'énergie d'un échantillon en fonction des changements de température. Cette technique est souvent utilisée pour déterminer les transitions de phase et pour évaluer à quelle température elles se produisent. La calorimétrie différentielle à balayage est particulièrement utile pour observer les transitions de phase qui se produisent à la suite des interactions entre les cryoprotecteurs et les tensioactifs mais aussi pour mesurer la T_g'

des échantillons lyophilisés. Il est important de connaître la T_g' des échantillons lyophilisés afin de les stocker à une température inférieure pour éviter la déstabilisation des gouttelettes suite à la cristallisation du cryoprotecteur (Dulieu and Bazile, 2005).

4.4.5 Distribution en taille et potentiel zêta

Après reconstitution, la taille des gouttelettes des NEs peut être mesurée par diffusion dynamique de la lumière. La conservation du diamètre hydrodynamique moyen des gouttes après réhydratation est une bonne indication du succès du cycle de lyophilisation. En général, on calcule le ratio de la taille des gouttelettes avant et après lyophilisation. Un ratio proche de 1 indique une bonne conservation de la taille des gouttelettes tandis qu'un ratio avec une valeur élevée indique une fusion ou une agrégation des gouttelettes (Moretton et al., 2012). L'indice de polydispersité doit aussi être vérifié après la lyophilisation et comparé à la valeur obtenue avant lyophilisation afin d'évaluer la conservation de la distribution en taille des gouttelettes des NEs.

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entoure quand elle est en suspension ou en solution. La mesure du potentiel zêta après le cycle de lyophilisation est une bonne méthode pour évaluer l'influence du cycle de lyophilisation sur la stabilité des NEs. Ce potentiel traduit l'intensité de répulsion ou d'attraction électrostatique entre les gouttelettes. Un potentiel zêta élevé en valeur absolue induit des interactions électrostatiques répulsives plus élevées et donc une stabilité colloïdale.

La mesure du potentiel zêta peut aussi être utilisée pour étudier les interactions entre le cryoprotecteur et la surface des gouttelettes (Abdelwahed et al., 2006b).

4.4.6 Microscopie électronique

La microscopie électronique est une technique essentielle pour observer la morphologie des NEs liquides (microscopie électronique à transmission) ou sèches (microscopie électronique à balayage) puisqu'elle apporte des informations sur la taille, la forme, la stabilité et la structure interne des gouttelettes. Cette technique peut donc permettre d'observer des modifications de la structure du produit, comme le collapse et l'agrégation des gouttelettes suite à la lyophilisation. La microscopie électronique à transmission et la microscopie électronique à

balayage sont les deux techniques les plus communément utilisées pour l'observation des NEs puisqu'elles permettent d'obtenir des informations sur la structure interne des gouttelettes et sur la topographie de l'échantillon respectivement (Klang et al., 2012).

4.4.7 Teneur en principe actif

Dans le cas de NEs chargées en molécule bioactive, la teneur en principe actif doit aussi être mesurée avant et après le procédé de lyophilisation afin de détecter une éventuelle fuite des gouttelettes. Les molécules de principe actif qui ont fui des gouttelettes peuvent être éliminées par chromatographie sur colonne, ultracentrifugation, chromatographie par exclusion de taille, dialyse ou ultrafiltration. La charge de principe actif restante dans les gouttelettes après le cycle de lyophilisation peut ensuite être quantifiée par des techniques analytiques telles que la spectroscopie UV/visible, de résonance paramagnétique électronique, de fluorescence et la chromatographie liquide haute performance (Maherani et al., 2011). Les principes actifs lipophiles sont moins susceptibles à la fuite passive hors des gouttelettes que les principes actifs hydrophiles ou amphiphiles (Chen et al., 2010).

REFERENCES

- Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., Zhang, X., 2013. An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions. *Food Eng Rev* 5, 139–157. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9066-3>
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Fessi, H., 2006a. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. *International Journal of Pharmaceutics* 309, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.003>
- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., 2006b. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1688–1713. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Acosta, E., 2009. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 14, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.002>
- Ahmed, K., Li, Y., McClements, D.J., Xiao, H., 2012. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry* 132, 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.039>
- Alexandre, M., 2017. Optimization of mechanical behavior of PEKK / Carbon fibers structural composites by PEKK oligomers sizing.
- Anton, N., Vandamme, T.F., 2011. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm Res* 28, 978–985. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0309-1>
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering, SI: Extraction and Encapsulation* 117, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bousbia, N., Abert Vian, M., Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2009. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry* 114,

- 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.106>
- Brandt, K., Christensen, L.P., Hansen-Møller, J., Hansen, S.L., Haraldsdottir, J., Jespersen, L., Purup, S., Kharazmi, A., Barkholt, V., Frøkiær, H., Kobæk-Larsen, M., 2004. Health promoting compounds in vegetables and fruits: A systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trends in Food Science & Technology*, NFIF part 2 15, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.003>
- Butz, P., Tauscher, B., 2002. Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International* 35, 279–284. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00197-1)
- Cao, J., Chen, L., Li, M., Cao, F., Zhao, L., Su, E., 2018. Two-phase systems developed with hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for simultaneously extracting various bioactive compounds with different polarities. *Green Chemistry* 20, 1879–1886. <https://doi.org/10.1039/C7GC03820H>
- Chatel, G., 2018. How sonochemistry contributes to green chemistry? *Ultrasonics Sonochemistry*, SI: ESS-15, 2016, Istanbul 40, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.029>
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2018. Les six principes de l'éco-extraction du végétal 19.
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017a. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 41, 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017b. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chen, C., Han, D., Cai, C., Tang, X., 2010. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *Journal of Controlled Release* 142, 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024>
- Choi, M.J., Briançon, S., Bazile, D., Royere, A., Min, S.G., Fessi, H., 2007. Effect of Cryoprotectant and Freeze-Drying Process on the Stability of W/O/W Emulsions. *Drying Technology* 25, 809–819. <https://doi.org/10.1080/07373930701370183>
- Clarke, S., 2013. Development of hierarchical magnetic nanocomposite materials for

- biomedical applications (doctoral). Dublin City University.
- Couffin, A.-C., Delmas, T., 2013. Vecteurs lipidiques en tant que nanomédicaments 28.
- Croteau, R., Ketchum, R.E.B., Long, R.M., Kaspera, R., Wildung, M.R., 2006. Taxol Biosynthesis and Molecular Genetics. *Phytochem Rev* 5, 75–97. <https://doi.org/10.1007/s11101-005-3748-2>
- Crowe, L.M., Reid, D.S., Crowe, J.H., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal* 71, 2087–2093. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)
- Danielski, L., Campos, L.M.A.S., Bresciani, L.F.V., Hense, H., Yunes, R.A., Ferreira, S.R.S., 2007. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 46, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.05.004>
- Davidov-Pardo, G., McClements, D.J., 2015. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Food Chemistry* 167, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.082>
- Descamps, M., 2017. États amorphe et vitreux des composés moléculaires et pharmaceutiques - Propriétés générales 31.
- Dispersity or Polydispersity is a key parameter for GPC SEC, 2017. . Materials Talks. URL <https://www.materials-talks.com/blog/2017/10/23/polydispersity-what-does-it-mean-for-dls-and-chromatography/> (accessed 2.25.20).
- Dulieu, C., Bazile, D., 2005. Influence of Lipid Nanocapsules Composition on Their Aptness to Freeze-Drying. *Pharm Res* 22, 285–292. <https://doi.org/10.1007/s11095-004-1196-0>
- Fabiano-Tixier, A.-S., Culioli, G., 2013. Chimie des substances naturelles et chimie de l'environnement.
- Ganachaud, F., Katz, J.L., 2005. Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices. *ChemPhysChem* 6, 209–216. <https://doi.org/10.1002/cphc.200400527>
- Guan, Y., Zhou, S., Zhang, Y., Wang, J., Tian, Y., Jia, Y., Sun, Y., 2017. Therapeutic effects of curcumin nanoemulsions on prostate cancer. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [Med. Sci.]* 37, 371–378. <https://doi.org/10.1007/s11596-017-1742-8>
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S., 2016. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter* 12, 2826–2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>

- Gutiérrez, J.M., González, C., Maestro, A., Solè, I., Pey, C.M., Nolla, J., 2008. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 13, 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.005>
- Hedoux, A., 2013. Lyophilisation de produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques. *Techniques de l'ingénieur* 19.
- Introduction to ecological biochemistry, 4th Edition: J. B. Harborne, Academic Press, London, 1993. pp. 318+xiv. ISBN 0-12-324686-5. £20.00, 1994. . *Biochemical Systematics and Ecology* 22, 765. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(94\)90064-7](https://doi.org/10.1016/0305-1978(94)90064-7)
- Kesisoglou, F., Panmai, S., Wu, Y., 2007. Application of Nanoparticles in Oral Delivery of Immediate Release Formulations. *Current Nanoscience* 3, 183–190. <https://doi.org/10.2174/157341307780619251>
- Kiszek-Taudul, I., Starczewska, B., Karpińska, J., Kasabuła, M., 2017. Application of Micellar Extraction for Isolation of Famotidine from Aqueous Samples Prior to its Chromatographic Determination. *Journal of Surfactants and Detergents*. <https://doi.org/10.1007/s11743-017-2003-3>
- Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., Hofer, F., 2012. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron* 43, 85–103. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>
- Li, J., Xi, A., Qiao, H., Liu, Z., 2020. Ultrasound-mediated diagnostic imaging and advanced treatment with multifunctional micro/nanobubbles. *Cancer Letters* 475, 92–98. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.028>
- Maa, Y.-F., Hsu, C.C., 1999. Performance of Sonication and Microfluidization for Liquid–Liquid Emulsification. *Pharmaceutical Development and Technology* 4, 233–240. <https://doi.org/10.1081/PDT-100101357>
- Maherani, B., Arab-Tehrany, E., R. Mozafari, M., Gaiani, C., Linder, M., 2011. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience* 7, 436–452. <https://doi.org/10.2174/157341311795542453>
- Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., Srimal, R.C., 2006. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences, NATURECEUTICALS (NATURAL PRODUCTS), NUTRACEUTICALS, HERBAL BOTANICALS, AND PSYCHOACTIVES: DRUG DISCOVERY AND DRUG-DRUG INTERACTIONS* 78, 2081–2087. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.007>

- Malvern instrument, 2003. Making measurements - A tutorial, in: Zetasizer Nano Series User Manual. Malvern Instruments Ltd., United Kingdom.
- Marefati, A., Rayner, M., Timgren, A., Dejmek, P., Sjö, M., 2013. Freezing and freeze-drying of Pickering emulsions stabilized by starch granules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 436, 512–520. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.07.015>
- McClements, D.J., 2015. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, Third Edition. CRC Press.
- McClements, D.J., 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 8, 1719–1729. <https://doi.org/10.1039/C2SM06903B>
- McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J., 2007. Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science* 72, R109–R124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- McClements, D.J., Li, Y., 2010. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science* 159, 213–228. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.06.010>
- Medeiros, A.K. de O.C., Gomes, C. de C., Amaral, M.L.Q. de A., Medeiros, L.D.G. de, Medeiros, I., Porto, D.L., Aragão, C.F.S., Maciel, B.L.L., Morais, A.H. de A., Passos, T.S., 2019. Nanoencapsulation improved water solubility and color stability of carotenoids extracted from Cantaloupe melon (*Cucumis melo* L.). *Food Chemistry* 270, 562–572. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.099>
- Morais, A.R. do V., Alencar, É. do N., Xavier Júnior, F.H., Oliveira, C.M. de, Marcelino, H.R., Barratt, G., Fessi, H., Egito, E.S.T. do, Elaissari, A., 2016. Freeze-drying of emulsified systems: A review. *International Journal of Pharmaceutics* 503, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.047>
- Moretton, M.A., Chiappetta, D.A., Sosnik, A., 2012. Cryoprotection–lyophilization and physical stabilization of rifampicin-loaded flower-like polymeric micelles. *J. R. Soc. Interface.* 9, 487–502. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0414>
- Mozafari, M.R., Reed, C.J., Rostron, C., 2007. Prospects of anionic nanolipoplexes in nanotherapy: Transmission electron microscopy and light scattering studies. *Micron, Microscopy in Nanobiotechnology* 38, 787–795. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.06.007>

- Nazarzadeh, E., Sajjadi, S., 2013. Thermal Effects in Nanoemulsification by Ultrasound. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 9683–9689. <https://doi.org/10.1021/ie4003014>
- Nn, A., 2015. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation 4, 6.
- Ojha, K.S., Aznar, R., O'Donnell, C., Tiwari, B.K., 2020. Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 122, 115663. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115663>
- Organisation mondiale de la santé, n.d. OMS | Biodiversité [en ligne] [WWW Document]. WHO. URL <https://www.who.int/globalchange/ecosystems/biodiversity/fr/> (accessed 3.7.21).
- Onodera, T., Kuriyama, I., Andoh, T., Ichikawa, H., Sakamoto, Y., Lee-Hiraiwa, E., Mizushina, Y., 2015. Influence of particle size on the in vitro and in vivo anti-inflammatory and anti-allergic activities of a curcumin lipid nanoemulsion. *International Journal of Molecular Medicine* 35, 1720–1728. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2186>
- Ötleş, S. (Ed.), 2009. *Handbook of food analysis instruments*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Park, H.R., Rho, S.-J., Kim, Y.-R., 2019. Solubility, stability, and bioaccessibility improvement of curcumin encapsulated using 4- α -glucanotransferase-modified rice starch with reversible pH-induced aggregation property. *Food Hydrocolloids* 95, 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.012>
- Peng, L.-Q., Cao, J., Du, L.-J., Zhang, Q.-D., Xu, J.-J., Chen, Y.-B., Shi, Y.-T., Li, R.-R., 2017. Rapid ultrasonic and microwave-assisted micellar extraction of zingiberone, shogaol and gingerols from gingers using biosurfactants. *Journal of Chromatography A* 1515, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.092>
- Pereira, R.N., Rodrigues, R.M., Genisheva, Z., Oliveira, H., de Freitas, V., Teixeira, J.A., Vicente, A.A., 2016. Effects of ohmic heating on extraction of food-grade phytochemicals from colored potato. *LWT* 74, 493–503. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.074>
- PIKAL, JM., 1999. Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage : the relative importance of the thermodynamics stabilization and glassy state relaxation dynamics. *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products* 161–198.
- Pinheiro, A.C., Lad, M., Silva, H.D., Coimbra, M.A., Boland, M., Vicente, A.A., 2013. Unravelling the behaviour of curcumin nanoemulsions during in vitro digestion: effect of the

- surface charge. *Soft Matter* 9, 3147–3154. <https://doi.org/10.1039/C3SM27527B>
- Piorkowski, D.T., McClements, D.J., 2014. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids, Special Issue: A Festschrift in honour of Professor Eric Dickinson* 42, 5–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.009>
- Priyadarsini, K.I., 2014. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules* 19, 20091–20112. <https://doi.org/10.3390/molecules191220091>
- Rangamani, P., Iyengar, R., 2007. Modelling spatio-temporal interactions within the cell. *J Biosci* 32, 157–167. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0014-3>
- Rey, L., 2016. *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. CRC Press.
- Romdhane, M., Gourdon, C., Casamatta, G., 1995. Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor. *Ultrasonics* 33, 221–227. [https://doi.org/10.1016/0041-624X\(94\)00023-I](https://doi.org/10.1016/0041-624X(94)00023-I)
- Rostagno, M.A., Prado, J.M., 2013. *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Royal Society of Chemistry.
- Rozzi, N.L., Singh, R.K., 2002. Supercritical Fluids and the Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1, 33–44. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00005.x>
- Saifullah, Md., Ahsan, A., Shishir, M.R.I., 2016. Production, stability and application of micro- and nanoemulsion in food production and the food processing industry, in: *Emulsions*. Elsevier, pp. 405–442. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804306-6.00012-X>
- Sarkar, A., Goh, K.K.T., Singh, R.P., Singh, H., 2009. Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids, 9th International Hydrocolloids Conference* 23, 1563–1569. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.10.014>
- Searles, J.A., Carpenter, J.F., Randolph, T.W., 2001. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90, 860–871. <https://doi.org/10.1002/jps.1039>
- Shah, B.R., Zhang, C., Li, Y., Li, B., 2016. Bioaccessibility and antioxidant activity of curcumin

- after encapsulated by nano and Pickering emulsion based on chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Food Research International* 89, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.022>
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer, Cancer Chemoprevention - An Update on a Novel and Exciting Field of Oncology* 41, 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Sihvonen, M., Järvenpää, E., Hietaniemi, V., Huopalahti, R., 1999. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science & Technology* 10, 217–222. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00049-7)
- Silva, L.V., Nelson, D.L., Drummond, M.F.B., Dufossé, L., Glória, M.B.A., 2005. Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International, Third International Congress on Pigments in Food* 38, 1087–1096. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.025>
- Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K., Chourasia, M.K., 2017. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 252, 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
- Sonoelectrochemistry, 1990. . *Ultrasonics* 28, 333–337. [https://doi.org/10.1016/0041-624X\(90\)90041-L](https://doi.org/10.1016/0041-624X(90)90041-L)
- Sugumar, S., Singh, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2016. Nanoemulsion of orange oil with non ionic surfactant produced emulsion using ultrasonication technique: evaluating against food spoilage yeast. *Appl Nanosci* 6, 113–120. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0412-z>
- Suleria, H.A.R., Barrow, C., Barrow, C., 2019. *Bioactive Compounds from Plant Origin : Extraction, Applications, and Potential Health Benefits*. Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9780429029288>
- Sussich, F., Skopec, C., Brady, J., Cesàro, A., 2001. Reversible dehydration of trehalose and anhydrobiosis: from solution state to an exotic crystal? *Carbohydrate Research* 334, 165–176. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00189-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00189-6)
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C., 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science, Emulsions, From Fundamentals to Practical Applications* 108–109, 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>

- Technologies agro-industrielles team, n.d. CO₂ supercritique [WWW Document]. tai team. URL <http://tai-team.fr/fr/equipement/co2-supercritique> (accessed 3.7.21).
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M., Murphy, A., 2014. *Plant Physiology and Development*, 6e ed. Sinauer Associates, Incorporated, USA.
- Taylor, P., 1998. Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 75, 107–163. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00035-9)
- The relationship of structure to properties in surfactants. IV. Effectiveness in surface or interfacial tension reduction, 1976. *Journal of Colloid and Interface Science* 56, 320–327. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(76\)90257-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(76)90257-5)
- Thomson, W., 1872. 4. On the Equilibrium of Vapour at a Curved Surface of Liquid. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 7, 63–68. <https://doi.org/10.1017/S0370164600041729>
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, Green Extraction Techniques* 71, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Tønnesen, H.H., Másson, M., Loftsson, T., 2002. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *International Journal of Pharmaceutics* 244, 127–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00323-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00323-X)
- Typek, R., Dawidowicz, A.L., Wianowska, D., Bernacik, K., Stankevič, M., Gil, M., 2019. Formation of aqueous and alcoholic adducts of curcumin during its extraction. *Food Chemistry* 276, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.006>
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 8, 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
- Vorobiev, E., Chemat, F., 2013. Principles of physically assisted extractions and applications in the food, beverage and nutraceutical industries, in: *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*. Elsevier, pp. 71–108. <https://doi.org/10.1533/9780857090751.1.71>
- Wang, W., Chen, M., Chen, G., 2012. Issues in Freeze Drying of Aqueous Solutions. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 20, 551–559. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60218-8](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60218-8)

- Yeh, G.Y., Eisenberg, D.M., Kaptchuk, T.J., Phillips, R.S., 2003. Systematic Review of Herbs and Dietary Supplements for Glycemic Control in Diabetes. *Diabetes Care* 26, 1277–1294. <https://doi.org/10.2337/diacare.26.4.1277>
- Yu, H., Huang, Q., 2012. Improving the Oral Bioavailability of Curcumin Using Novel Organogel-Based Nanoemulsions. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5373–5379. <https://doi.org/10.1021/jf300609p>
- Zhang, H.-F., Yang, X.-H., Wang, Y., 2011. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, Special section: Recent developments in food science and technology in Japan 22, 672–688. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.07.003>
- Zhang, L., Liu, L., Qian, Y., Chen, Y., 2008. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 750–759. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.12.003>
- Zhang, R., McClements, D.J., 2016. Enhancing nutraceutical bioavailability by controlling the composition and structure of gastrointestinal contents: Emulsion-based delivery and excipient systems. *Food Structure* 10, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2016.07.006>
- Zheng, B., Peng, S., Zhang, X., McClements, D.J., 2018. Impact of Delivery System Type on Curcumin Bioaccessibility: Comparison of Curcumin-Loaded Nanoemulsions with Commercial Curcumin Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 66, 10816–10826. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03174>

Objectifs de la thèse

L'extraction de composés bioactifs naturels à partir de plantes par des techniques respectueuses de l'environnement et leur encapsulation dans des systèmes capables de les protéger et de les délivrer à dose efficace dans l'organisme sont deux enjeux majeurs de ces dernières années. C'est pourquoi le but de cette thèse est de développer un procédé qui combine l'éco-extraction et la formulation de molécules bioactives dans un milieu principalement composé d'eau, les NEs, grâce à la technologie ultrasonore.

Différents paramètres sont à étudier afin de proposer des extraits-émulsions ou « extrémulsions » stables et suffisamment concentrées en actifs cibles et ainsi de proposer un procédé viable et compétitif. Afin d'atteindre ce but les objectifs suivants ont été envisagés lors de ces travaux de thèse :

- 1) l'obtention d'extrémulsions monodisperses (Indice de polydispersité (PDI) <0,3 (de préférence <0,2))
- 2) l'obtention de gouttelettes d'environ 100 nm,
- 3) l'obtention d'un taux de recouvrement proche de 100% comparé à l'extraction dite « de référence » au Soxhlet.

Nous avons donc suivi ces objectifs en appliquant ce procédé à de la poudre de rhizome de *Curcuma longa* et nous nous sommes focalisés sur les caractéristiques physico-chimiques des extrémulsions et sur l'efficacité d'extraction de cette technique pour évaluer ses performances. Les extrémulsions ont été étudiées en termes de distribution en taille des gouttelettes grâce à la diffusion dynamique de la lumière et en taux d'extraction grâce à une quantification de la curcumine par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Afin d'évaluer l'efficacité du procédé d'extraction, un taux de recouvrement a été exprimé à partir du taux d'extraction obtenu par la technique « extrémulsion » comparé au taux d'extraction obtenu par Soxhlet. L'extraction de la curcumine à partir du *Curcuma longa* dans l'acétone par la technique du Soxhlet a été utilisée comme référence ; le taux d'extraction obtenu étant considéré comme le 100%. Une importance particulière a été accordée au PDI des NEs car, comme expliqué dans le chapitre 1, il permet d'évaluer la dispersité et donc la stabilité cinétique des extrémulsions qui est un paramètre important à prendre en compte pour des applications alimentaires par exemple.

Dans le chapitre 2 et 3 l'application du procédé proposée sur l'extraction et la formulation simultanée de la curcumine à partir de *Curcuma longa* a été établie (figure 1). En premier lieu, la composition idéale de la formulation extractante-encapsulante a été déterminée (chapitre

2) puis l'impact des paramètres liés au traitement a été évalué (chapitre 3) dans le but d'obtenir des extrémulsions stables et riches en curcumine. En troisième lieu, la stabilisation des extrémulsions grâce au procédé de lyophilisation a été étudiée afin d'obtenir des extrémulsions sèches riches en curcumine, facilement redispersibles et conservant leurs propriétés physico-chimiques après réhydratation.

Les questions de recherche auxquelles nous avons voulu répondre grâce à ces travaux sont les suivantes :

- Quels sont les impacts de la nature et de la proportion des constituants des NEs ainsi que des paramètres du pré-traitement, du traitement et du post-traitement sur la distribution en taille des gouttelettes et sur le taux d'extraction de la curcumine ?
- Quels sont les impacts des paramètres de lyophilisation sur l'obtention d'extrémulsions sèches conformes aux solutions dont elles sont issues ?

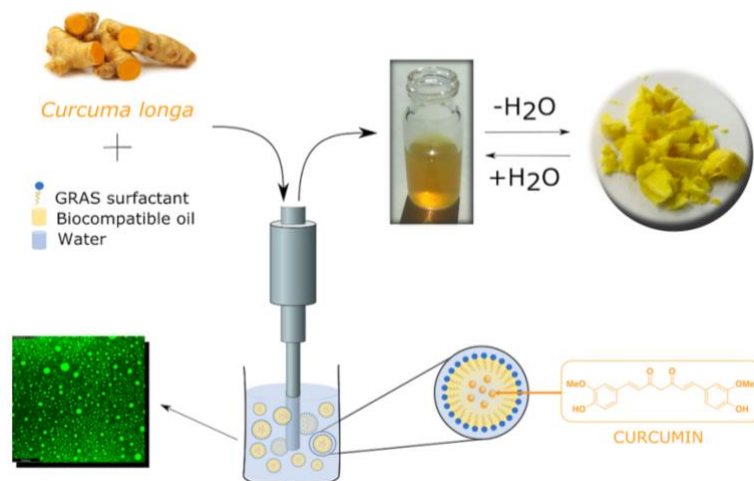


Figure 1 : Illustration schématique du procédé développé dans cette thèse

Chapitre II : Extrémulsions de
curcumine : preuve de concept et étude
de la composition idéale des
formulations

De nombreuses études ont montré les bénéfices pharmacologiques de la curcumine ainsi que sa faible biodisponibilité. Ces recherches ont souligné l'intérêt d'extraire cette molécule bioactive et de l'encapsuler dans des systèmes capables de la protéger et de la délivrer en concentration suffisante dans la circulation générale. C'est pourquoi, nous avons exploré la possibilité d'extraire et d'encapsuler la curcumine à partir de rhizome de *Curcuma longa* en une seule étape puis d'en produire des formulations sèches par lyophilisation. Le but de cette première étude est de prouver la faisabilité du procédé d'extraction/formulation « one-pot » et d'aboutir à des poudres conformes aux propriétés des solutions dont elles sont issues en utilisant un lyophilisateur de paillasse.

Dans un premier temps, des tests de solubilité de la curcumine pure commerciale dans différentes huiles ont été menés afin de trouver la nature de l'huile la plus appropriée pour extraire la curcumine à partir de sa matrice végétale et l'encapsuler dans des nanogouttelettes huileuses. Ces expériences ont déterminé que la tributyrine était le meilleur candidat.

Dans un second temps, des émulsions « blanches » ont été préparées à partir de curcumine pure avec différentes proportions de tributyrine et d'un tensioactif dérivé de la Vitamine E, le TPGS-1000 ou le TPGS-750M, afin de définir les ratios menant à des NEs monodisperses et stables dans le temps. L'ajout d'un deuxième corps gras plus hydrophobe dans la phase huileuse s'est avéré nécessaire.

Dans un troisième temps, les proportions préalablement déterminées sur les émulsions blanches ont été appliquées à l'extraction et à la formulation de la curcumine et l'impact de la position de la tige à US dans le milieu d'extraction a également été étudié. Pour finir, les extrémulsions répondant aux objectifs de dispersité en taille des nanogouttelettes et de taux d'extraction ont été lyophilisées. Par conséquent, ces travaux ont permis de déterminer la nature des huiles et du tensioactif, ainsi que leurs proportions, à privilégier pour l'obtention d'extrémulsions de curcumine stables en solution et conduisant à des poudres conformes aux solutions de départ.

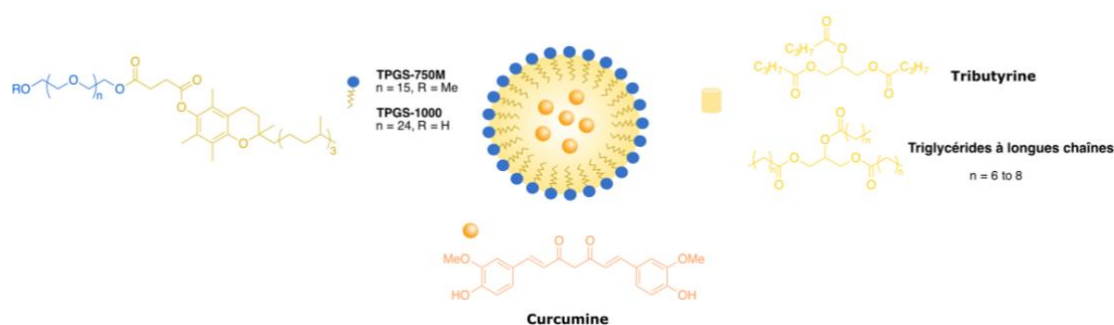


Figure 1 : Illustration schématique des constituants des gouttelettes d'extrémulsion

Dans ce chapitre, j'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées.

A l'heure actuelle, les travaux réalisés ont donné lieu à :

- "Green extraction of curcumin in stable emulsions and design of bioactive dry formulations" Dall'armellina A., Desgranges S., Letan M., Duval C., Contino-Pépin C, The 4th International Symposium on Green Chemistry (13-17 Mai **2019**) La Rochelle, France. (Présentation orale)

- « Formulation de nanogouttes enrichies en curcumine extraite du Curcuma longa à l'aide d'ultrasons » Dall'armellina A., Desgranges S., Letan M., Duval C., Contino-Pépin C, 5ièmes Journées Scientifiques Ultrasons et Procédés (19-21 Mai **2019**) Orange, France. (Présentation orale)

- "Green extraction of curcumin in stable emulsions and design of bioactive dry formulations" Dall'armellina A., Desgranges S., Letan M., Duval C., Contino-Pépin C, 26^{ème} journée de la chimie (26 avril 2019), Nice (Communication par affiche)

- "Green extraction of curcumin in stable emulsions and design of bioactive dry formulations" Dall'armellina A., Desgranges S., Letan M., Duval C., Contino-Pépin C, l'école thématique « les outils du génie chimique pour la conception de procédés durables » (du 8 au 13 septembre 2019), Banyuls (Communication par affiche)

- « Procédé d'extraction de substances d'intérêt », Contino-Pépin Christiane, Desgranges Stéphane, Dall'armellina Alice, Duval Charles, (novembre **2019**) WO 2020/109418 (Brevet)

L'ensemble des résultats de ce chapitre a donné lieu à une publication sous forme de « Full paper » au journal Green Chemistry (Dall'armellina et al. 2021) (Figure 2).

Cite this: *Green Chem.*, 2021, **23**,
8891**One-pot solvent-free extraction and formulation
of lipophilic natural products: from curcuma to
dried formulations of curcumin†**Alice Dall'armellina,^a Mathias Letan,^b Charles Duval^b and
Christiane Contino-Pépin^{*a}

Figure 2 : Publication n°1

One-pot solvent-free extraction and formulation of lipophilic natural products: from curcuma to dried formulations of curcumin.

Alice Dall'armellina,^a Mathias Letan,^b Charles Duval,^b and Christiane Contino-Pépin^{*a}^a Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, Institut des Biomolécules Max Mousseron,
UMR 5247, Avignon Université, 84911 Avignon, France.^b Société Lyofal (Synerlab group), Salon de Provence, France.^{*} Corresponding author: christine.pepin@univ-avignon.fr

Abstract

A new environmentally friendly process for the efficient extraction and formulation of lipophilic bioactive compounds from plants has been successfully developed. This study describes the application of this ultrasound-assisted technique to the simultaneous encapsulation and extraction of curcumin from *Curcuma longa* in a medium essentially composed of water with the addition of biocompatible oil and surfactant. The resulting curcuminoids-loaded emulsion was called “extremulsion” for extract-emulsion. The composition of the extractant medium and ultrasonic parameters were studied to obtain optimal extremulsions in terms of droplet size, stability and curcumin-loading. Extremulsions comprising droplets with diameter on the order of 100 nm were obtained with a curcumin recovery rate up to 87% compared to the conventional Soxhlet-assisted extraction in acetone. Their stability during the freeze-drying step has been studied in order to obtain a curcumin-loaded formulation easily stored and ready for use. Extremulsions did not show significant alteration in droplet size and composition after freeze-drying and rehydration.

Introduction

Nowadays, there is a growing interest for natural bioactive compounds from consumers, from industry, as well as from the scientific community. Bioactive molecules from bioresources, in particular plant-derived natural products, provide unlimited opportunities for the development of new drugs, food additives, perfume or cosmetic components (Li and Vederas, 2009),(Mohammadinejad et al., 2015),(Pistollato et al., 2015). The appeal of natural products is particularly relevant in the field of food and cosmetics for which they are considered, sometimes wrongly, as safe and health-promoting ingredients. This “green” awareness concerns not only the nature and source of bioactive compounds but also the environmental issues ascribed to their extraction from natural matrices.

Traditional extraction processes usually combine time and energy-consuming steps with the use of harmful and polluting volatile organic solvents. Within the framework of Green Chemistry principles (Anastas and Warner, 1998), large efforts have been exerted over the years to limit these drawbacks, in particular to minimize or simply abolish the use of petrochemical solvents to extract natural products. Although alternatives to the use of organic solvents, like green solvents derived from biomass, supercritical fluids, deep eutectic solvents or ionic liquids (Cao et al., 2018),(Jin et al., 2016), have emerged these last decades with the so-called concept of “green extraction”(Chemat et al., 2012), there is still a huge need to develop less complex and costly extracting techniques with low environmental impact (Chemat et al., 2020). Moreover, once extracted, natural bioactive compounds often need to be solubilized in an adequate formulation for final medicinal, cosmetic or food application.

The latter formulation consists in encapsulating or carrying systems devoted to protect and deliver bioactive compounds to their physiological target (Liu et al., 2019). In the field of food, encapsulation can also provide advantages in converting liquid samples into easily handled powders masking unpleasant organoleptic properties, improving stability or preserving flavor and aroma content (Inês Dias et al., 2015).

Water appears as a green extracting solvent of choice not only for safety and environmental concerns but also for easiness of separation and recovery of organic targeted compounds by precipitation (Filly et al., 2016). Nevertheless, many bioactive compounds of high added value are poorly water soluble which hampers their efficient extraction in water. Those lipophilic

natural products are instead soluble in oils or in colloidal solutions. According to the requirements of the green extraction concept, we have recently developed a new solvent-free method allowing efficient extraction and formulation of lipophilic natural compounds from plants in a water/oil solution through a one-pot ultrasound (US)-assisted process. In order to stabilise the oil droplets, a biocompatible surfactant derived from tocopherol is introduced in the medium during the process resulting in a bioactive emulsion called “extremulsion” for “extract-emulsion”. Our objective is to obtain optimal extremulsions in terms of droplet size, stability and natural product loading that can be freeze-dried to give a powder enriched with lipophilic active molecules. A simple water addition enables the recovery of the parent emulsion with limited changes in droplet size and composition.

To the best of our knowledge, extremulsion is a new process combining extraction and emulsification in a single step and resulting in dry formulations which may be considered as very attractive “easy to store and ready to use” ingredients for a wide range of industrial applications. The proof of concept was made on the dual extraction/formulation of curcumin from the powdered rhizome of turmeric (*Curcuma longa L.*, Zingiberaceae). The dried roots of this plant traditionally used as a spice and colouring agent in Indian and Asian cuisine are also considered as very interesting health products on account of their medicinal properties including antioxidant, anti-inflammatory, anti-parasitic, anti-mutagenic, anticancer, angiogenesis inhibition, hepatoprotective, antimicrobial and antiviral activities (Anand et al., 2008). Due to its low molecular weight and lipophilic nature, curcumin is able to cross the blood brain barrier and as such is reported to have therapeutic potential for neurodegenerative disorders such as Alzheimer’s and Parkinson’s disease (Maheshwari et al., 2006). Although it has a wide range of possible health benefits, curcumin is not yet recognized as a pharmacological drug due to its very low solubility in water (11 ng/ml at room temperature) and rapid metabolic degradation which strongly limits its bioavailability even when administrated at high oral doses (Sun et al., 2012). Among all the strategies investigated to overcome these stability and solubility issues, curcumin-loaded formulations where the molecule is encapsulated into emulsion-based delivery systems appear to be the most promising solutions. Curcumin-loaded emulsions, where curcumin is in an encapsulated form, are seemingly the most promising solutions to overcome stability and solubility issues, especially for food application. Although encapsulation of curcumin in a variety of delivery systems has been widely investigated (Gomez-Estaca et al., 2012), the one-pot extraction and

formulation of curcumin in an oil-in-water (O/W) nanoemulsion has, to our knowledge, never been reported so far to our knowledge.

In this work, we combine in a single step, the ultrasound-assisted extraction of curcumin from *Curcuma longa* in water and its ultrasound-triggered encapsulation in oil nanodroplets stabilized with a vitamin-E derived surfactant. We first explored the solubility of commercially available pure curcumin in different oils and used the best oil candidate to produce optimized emulsions in terms of droplet size and size distribution. The conditions leading to the best blank emulsions were then applied to the extraction of natural curcumin from *Curcuma longa*. The achieved extremulsions were also freeze-dried to provide stable formulations of curcumin. Finally, the “greenness” profile of our approach was assessed using the CHEM21 Metrics Toolkit

Materials and methods

Plant material

To perform the study on the same batch of matrix, 1 kg of dried *Curcuma longa* powder was purchased from the firm Herbier du Diois (Chatillon-en-Diois, France).

Chemicals

Curcumin standard (>99.5%, HPLC grade), used for HPLC calibration, curcumin (>65%, from *Curcuma longa*), used for solubility tests, D- α -Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, tributyrin (98%), tripropionin (97%), triacetin (99%), tributyl-o-acetylcitrate, acetonitrile (HPLC grade), acetone (99,8%), trifluoroacetic acid and trehalose were purchased from Sigma-Aldrich. Squalene was purchased from Alfa Aesar. Triethyl citrate was purchased from Vertellus. Trihexyl-o-acetylcitrate was purchased from Chem Service. α -Tocopherol was purchased from Acros. Jojoba oil was purchased from Safic Alca. Soy oil was provided by Lyofal (Synerlab group, Salon de Provence, France). Long chain triglycerides (Suppocire NB), propylene glycol monocaprylate (Capryol 90) and medium chain triglycerides (Labrafac CC) were kindly provided by Gattefosse (Saint-Priest, France).

General procedure for curcumin solubilization in different oils

An excess amount of curcumin (2 mg) was suspended in 400 μ L of different oils. Solutions were shaken at room temperature through a vortex for 20 seconds and then placed in an ultrasonic bath for 5 minutes. Each saturated solution was then centrifuged for 30 minutes at 4000 rpm, a fraction of the supernatant was collected, diluted 100 times with acetonitrile and filtered through a 0.2 μ m syringe filter. The filtered solution was then analyzed by HPLC using the protocol described in the section dedicated to curcumin quantification. All samples were made in triplicates and each sample was eluted by HPLC three times.

General procedure for preparation of blank emulsions

A variable amount of oily phase (50, 100, 200 mg) was brought into contact with 2 mL of TPGS 1000 or TPGS 750M in water at the appropriate concentration (10, 20, 30 mg/mL). Emulsification was performed using a high-power ultrasonic device (Bioblock Scientific Vibracell 75043, 13-mm diameter sonotrode) with a titanium horn immersed in the solution. Pulsed ultrasound (15 US cycles, 8 sec on/59 sec off, duty cycle 11.94 %, total sonication time of 2 minutes) was applied at 20 kHz frequency using 60% maximum amplitude (450W). The solution was cooled with an ice bath during the complete sonication process. Each blank emulsion condition was prepared in triplicates.

Soxhlet extraction

Extraction was performed using a Soxhlet apparatus which consists of a 50 mL distillation flask, an extraction thimble holder and a condenser. The *Curcuma longa* powder was placed in the thimble holder which is brought in contact with the condensed fresh solvent from the distillation flask. During extraction experiments, 100 mg of *Curcuma longa* powder was placed in the thimble and 50 mL of acetone was used as a solvent. Soxhlet extraction was performed for 30 min at 56 °C in three replicates. Solvent was evaporated under reduce pressure and the sample was solubilized with 5 mL of acetonitrile, filtered and analyzed using HPLC. The

resulting yield of 6.56 mg of pure curcumin per gram of dried *Curcuma longa* during Soxhlet extraction was considered as the maximum yield (100%) and all experimental values were compared with this maximum content of curcumin in the source.

General procedure for preparation of extremulsions

100 mg of *Curcuma longa* powder were brought into contact with the appropriate amount of tributyrin oil supplemented by medium or long chain triglycerides and 2 mL of TPGS 1000 in water at 30 g/L. Extremulsions were prepared in triplicates using a high-power ultrasonic device (Bioblock Scientific Vibracell 75043, 13-mm diameter sonotrode) with a titanium horn immersed in the solution. Pulsed ultrasound (15 US cycles, 8 sec on/59 sec off, duty cycle 11.94 %, total sonication time of 2 minutes) was applied at 20 kHz frequency using 60% maximum amplitude (450W). The solution was cooled with an ice bath during the complete sonication process. After sonication, the ultrasonic probe was washed with milliQ water and the rinsing water was added to the emulsion. The remaining plant material was removed by centrifugation at 1100 G for 1 minute. The supernatant (macroscopically free of solid particles) was put in a volumetric flask, topped off with milliQ water and stored in dark conditions at 4°C.

Extremulsions were either analyzed as fresh solutions or aliquoted in 2 mL batches, supplemented with trehalose in order to reach a final trehalose concentration of 65.2 mg/mL, and placed in a freezer (12h) before being freeze-dried overnight.

Characterization of extremulsions

The drop size distribution of extremulsions was analyzed by dynamic light scattering (DLS) using a Nano-S Nanosizer (Malvern Instrument). The extremulsion, diluted by 10 in milliQ water, was placed in a 45 μ L quartz tank and subjected to 10 measurements of 10 seconds each. The hydrodynamic diameter was obtained by averaging the results of the 10 measurements. The measurements were made at an angle of 173° using a laser with a wavelength of 633 nm. Results were reported as the average diameter (Z-average) and polydispersity index (PDI).

Curcumin quantification

HPLC analysis was performed on a LC system comprising a quaternary pump (LC-20AD), a degasser (DGU-20A3) and a SPD- M20A photodiode array (PDA) detector (Shimadzu®, Kyoto, Japan). Chromatographic separation was carried out with a Kinetex Biphenyl (100 Å, 4,6*100 mm, 2,6 µm) purchased from Phenomenex® (Torrance, United-States). A linear gradient of A (water containing 0.1% trifluoroacetic acid) and B (acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid) was used with an elution gradient as follows (v/v): 0 min, B 37%; 10 min, B 50%; 15min, B 100% maintained for 10 min. The detection wavelength was 420 nm. The injection volume was 5.0 µL. Data acquisition and analysis were performed by using a Shimadzu® Controller Module (CBM-20A Prominence) coupled to a computer with Shimadzu® LC Solution software. The method presented linearity over the range from 1 to 100 µg/mL ($R^2=0.9977$). The calibration curve was constructed by the dilution of curcumin analytical standard (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany) with acetonitrile to provide the desired concentrations (1.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0 and 100.0 µg/mL) followed by injection into the HPLC system. Each concentration solution was made in triplicate and eluted three times. Samples were directly dissolved in acetonitrile and filtered through nylon membrane filter (0.2 µm) before injection.

The curcumin concentration was then assessed using the calibration curve.

Extraction rate of curcumin from turmeric (mg/g of *C. longa*) was calculated as follows (eqn (1)):

$$\text{Extraction rate} = \frac{m_{cur}}{m_{turm}} \text{ mg/g of } C. longa \quad (1)$$

Where m_{cur} is the mass of curcumin extracted (mg) and m_{turm} is the mass of turmeric (mg).

The recovery rate was calculated as below (eqn (2)):

$$\text{Recovery rate} = \frac{m_{extr}}{m_{sox}} \times 100 \% \quad (2)$$

Where m_{extr} is the curcumin mass from extremulsion extraction (g) and m_{sox} is the curcumin mass from Soxhlet extraction (g).

Results and discussion

Blank Emulsions (BE)

In order to improve the curcumin extraction rate in O/W solutions, which is closely correlated to the loading capacity of oil droplets, the solubility of curcumin dispersed in twelve oils eligible for food or pharmaceutical formulations was evaluated by HPLC (Figure 1). To do so, monophasic solubility tests were performed on commercially available curcumin suspended in various oil phases. Lipids of different composition and molecular weights were investigated, like triacylglycerols (triglycerides C8-C10, tributyrin, tripropionin, triacetin) and citric acid derivatives (trihexyl-O-acetylcitrate, tributyl-O-acetylcitrate, triethyl citrate). We also investigated two vegetable oils (Jojoba and Soy oil), squalene (an animal- or vegetable-derived triterpene) and tocopherol which is a fat-soluble vitamin (vitamin-E) that, in our case, constitutes the lipophilic head of the surfactant coating the droplet surface. In the case of tocopherol, we assumed that the structural similarity may improve the oil/surfactant affinity and, as a consequence, the emulsion stability.

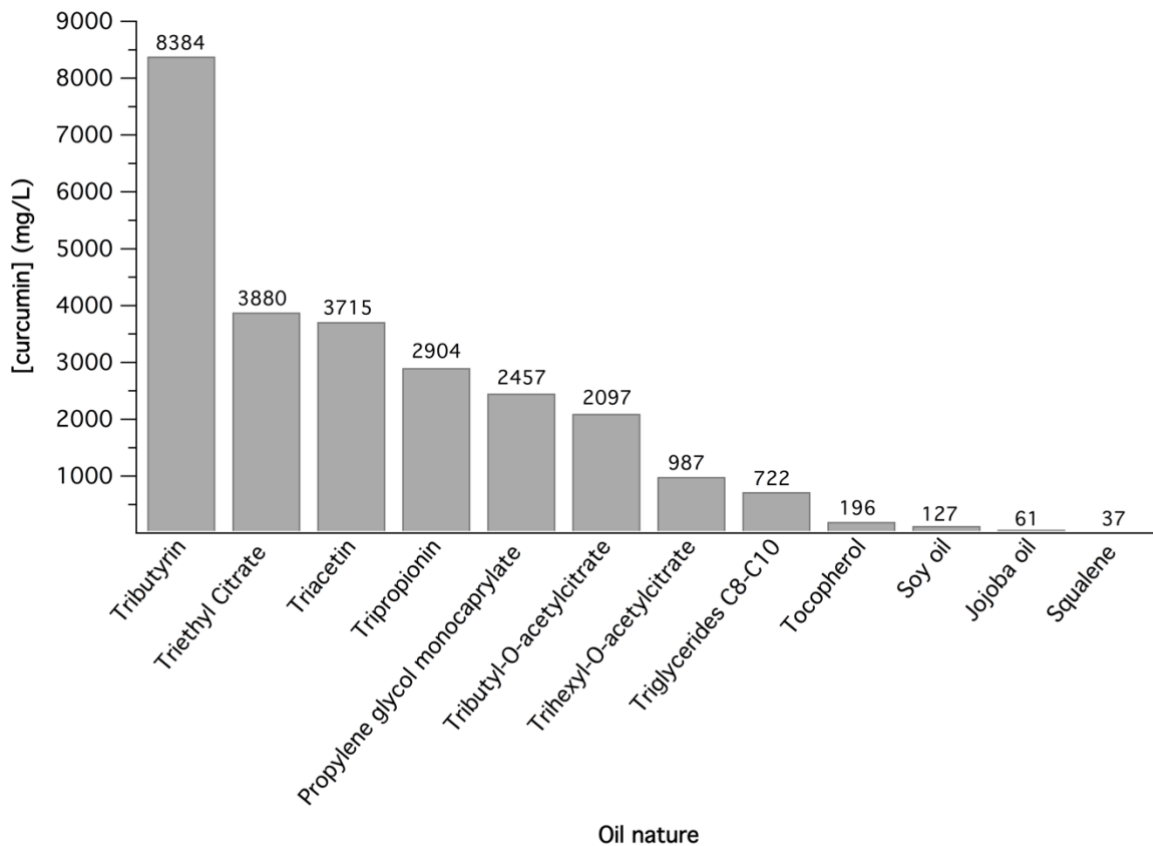


Figure 3: Solubility (mg/mL) of curcumin in various oils

Among the twelve tested oils, greater curcumin solubilization was achieved in Tributyrin (TB). According to literature, the quantity of curcumin that can be solubilized in the oily phase is inversely proportional to the average molecular weight of the latter (Ahmed et al., 2012). Short chain triglycerides (SCT) have more polar groups (oxygens) per unit mass than long chain triglycerides (LCT). Therefore, SCT present more dipole–dipole interactions between their polar groups and curcumin molecules, thereby favoring curcumin solubilization. However, as shown by Kunz *et al.* through COSMO-RS calculations, curcumin mainly consists of a non-polar surface leading to Van-Der-Waals interactions with solvents (Degot et al., 2021.) Also, even though TB has the highest molecular mass among the investigated SCT (triacetin, tripropionin, triethyl citrate) its longer aliphatic chains probably allows a better curcumin solubility. Therefore, TB was selected as the oily phase for the following experiments.

Regarding the emulsion preparation, it is possible to disperse oil in water with energy input to the mixture. However, the resulting droplets are not stable in water over time, unless an

emulsifier is added in the medium that will adsorb at the O/W interface and reduce the interfacial tension. In our case, we added a shell resulting from the self-assembly of a synthetic commercial surfactant widely used as a water-soluble vitamin-E formulation. Tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) is a GRAS (Generally Recognized As Safe)-listed surfactant because it is a biodegradable conjugate of the lipophilic antioxidant α -tocopherol (vitamin-E) and polyethylene glycol (known to confer stealth properties to drug carriers) through a succinic spacer. TPGS is FDA-approved as a water-soluble vitamin-E nutritional supplement and safe pharmaceutical adjuvant for drug formulation (Yan et al., 2007). TPGS surfactants endowed with PEG moieties of two different lengths were investigated (TPGS 750M and TPGS 1000) in order to study the impact of the PEG chain on the droplet mean diameter.

Depending on the intended application it is possible to tune the appearance of emulsions to range from transparent to milky white by controlling the size of oil droplets. The latter being mainly connected to the level of energy input, to the nature and concentration of surfactant and to the O/W ratio. With respect to the size range, polydispersity and stability of oil droplets, emulsions will be referred as macro- (mean diameter~1-100 μm), nano- (mean diameter~20-500 nm) or microemulsions (mean diameter~10-100 nm) (Gupta et al., 2016). Unlike the spontaneously formed microemulsions which are thermodynamically stable, macro- and nanoemulsions are both thermodynamically unstable. Because of the small size of droplets, nanoemulsions (NEs) are however kinetically stable over long time scales (Aswathanarayan and Vittal, 2019). NEs are also less sensitive to physical and chemical changes compared to microemulsions, which are systems in equilibrium whose stability is very dependent to the system composition and temperature (McClements, 2012). NEs are made of spherical nanodroplets exhibiting a high oil/water surface area to volume ratio which, in the case of liposoluble nutritional payloads such as curcumin or β -carotene, can improve the digestibility owing to a higher degree of lipolysis (Teng et al., 2015),(Araiza-Calahorra et al., 2018). In our case, we assumed NEs would be less likely to be destabilized during the step of freeze-drying as a consequence of the high Laplace pressure inside the droplets. The aforementioned properties made NEs very attractive formulations for the design of curcumin-loaded extremulsions.

Table 1: Effect of blank emulsions composition (surfactant type and concentration *versus* TB amount) on the mean droplet diameter D_H (Z-average diameter) and PDI. (average of triplicate experiments, DLS data analyzed by the technique of cumulants)

Surfactant	[Surfactant] (mg/mL)	m_{TB} (mg)		
		200	100	50
TPGS 1000	10	X	X	X
	20	X	X	X
	30	✓	✓/X	X
TPGS 750M	10	X	X	X
	20	X	X	X
	30	X	X	X
✓ (small droplets, monodisperse NE)		$D_H \leq 300$ nm, PDI < 0.20		
✓/X (small droplets, limited PDI)		$D_H \leq 300$ nm, PDI < 0.25		
X (rejected conditions)		PDI > 0.30		

In an attempt to prepare optimal NEs in terms of droplet size and size distribution, a first screening of different TB amounts in combination with different concentrations of both surfactants was carried out in absence of turmeric (Table 1). Samples were considered polydisperse when PDI was higher than 0.20. Conditions leading to smallest droplet size (less than 300 nm in diameter) and limited PDI (below 0.25) were adopted for the following extraction-emulsification assays. Only two samples, referred as **BE1** and **BE5** in Table 2, matched with this pre-requisite. For the preparation of blank emulsions, the sonotrode tip was adjusted until it was 2 mm below the surface, at the middle or at 2 mm from the bottom of the vial ($\Phi = 2.5$ cm). Only the last tip location gave acceptable results (size and polydispersity) so the tip was kept at the bottom of the vial for all the blank emulsion series. All the samples prepared with TPGS 750M were polydisperse, as the PDI was larger than 0.30 (Table 1), so this surfactant was discarded for the rest of the study. The combination of TPGS 1000 (30 mg/mL) and TB (200 mg) (*i.e.* **BE1** of Table 2) achieved the best result leading to nanodroplets of 214.6 nm in diameter (Z-average diameter) with a low polydispersity index of 0.14. DLS experiments conducted by Contin analysis also confirmed the monomodal droplet distribution and acceptable polydispersity (Figure 2).

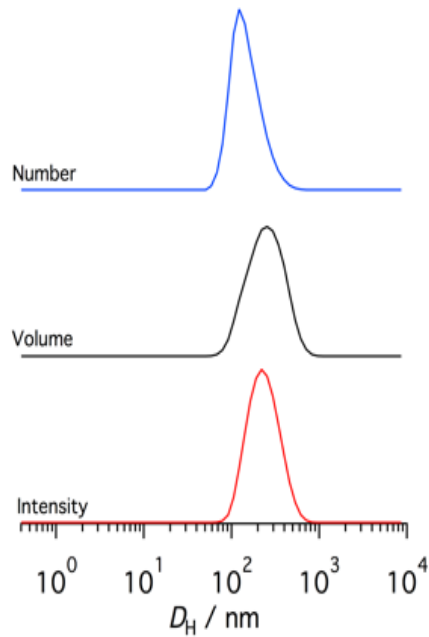


Figure 4: Hydrodynamic size distribution of the best combination (30 mg/mL of TPGS and 200 mg of TB) estimated by Contin analysis

The DLS analysis of the latter NE showed rapid droplet growth and polydispersity increase over time. This NE destabilization can be ascribed to the relatively high water-solubility of TB which is prone to Ostwald ripening (OR). OR is a process whereby larger droplets grow at the expense of smaller ones due to molecular diffusion of oil molecules through the continuous aqueous phase separating the droplets (Taylor, 1998). Previous studies have shown that OR can be greatly delayed by mixing water-soluble oils with water-insoluble oils through an entropy of mixing effect that counteracts the imbalance of droplet size effect (Li et al., 2009),(Wooster et al., 2008). In order to limit OR, two mixtures of saturated fatty acids of different chain lengths were added to TB in several proportions: the first one is an oil containing a mixture of medium-chain triglycerides (MCT) C8 to C10 and the second one is a waxy mixture of LCT C10 to C18 (Table 2).

Table 2: Effect of dispersed phase composition on the mean droplet diameter (Z-average diameter) and PDI of blank emulsions (BE). (average of triplicate experiments, DLS data analysed by the technique of cumulants)

Sample	m _{TB} (mg)	m _{MCT C8-C10} (oil) (mg)	m _{LCT C10-C18} (wax) (mg)	Average hydrodynamic diameter (nm)	PDI
BE1	200	0	0	214.6 ± 13.0	0.14
BE2	175	0	0	203.3 ± 4.6	0.19
BE3	175	0	25	149.6 ± 14.3	0.12
BE4	175	25	0	144.6 ± 3.6	0.11
BE5	100	0	0	163.3 ± 7.8	0.23
BE6	85	0	15	77.0 ± 7.4	0.15
BE7	85	15	0	72.3 ± 1.6	0.16

According to the results of the previous NEs screening (Table 1) the amount of dispersed phase (pure TB or MCT-LCT/TB mixture) was fine-tuned from 200 to 100 mg while the concentration of TPGS 1000 and the volume of water were kept constant at respectively 30 mg/mL and 2 mL. As shown on Table 2, the droplet size tended to reduce with the decrease of dispersed phase (from 200 mg for **BE1**, 175 mg for **BE2**, then to 100 mg for **BE5**). Moreover, the best droplet size reduction was achieved when a mixed dispersed phase was used (for **BE3**, **BE4**, **BE6** and **BE7**), reaching a mean diameter of 77.0 nm and 72.3 nm for blank emulsions **BE6** and **BE7** respectively.

The stability of some of the previous blank emulsions, stored at 4°C in the dark, was followed over time by DLS measurements (Cumulant analysis). As expected, MCT/TB or LCT/TB mixed NEs appeared to be more stable than those containing pure TB as oily phase. Blank emulsions **BE1** and **BE2**, containing pure TB underwent rapid destabilization (PDI > 0.25 after 4 hours) while the more promising blank emulsions, *i.e.* **BE6** and **BE7**, respectively containing 15 mg of LCT or MCT, remained stable after long-term storage as shown in Table 3.

Table 3: DLS follow of droplet hydrodynamic diameter D_H for blank emulsion BE1, BE2 and BE6 stored at 4°C in the dark during 3 months and BE7 stored at 4°C in the dark during 4 months (assessed by Cumulant analysis)

	T + 3 months		T + 4 months	
	D_H (nm)	PDI	D_H (nm)	PDI
BE1 and BE2*		>0.3		
BE6	90.5	0.19		
BE7			170.2	0.13

*PDI > 0.25 after 4 hours

The evolution over time of blank emulsion **BE7** was also daily followed by DLS through Contin analysis (Figures 3A and 3B) and by the technique of cumulants (Figure S4 of SI). The incorporation of water-insoluble fatty acids in the lipid droplets clearly delayed the OR effect with limited droplet growth after 4 months of storage (Figure 3A). This mixed formulation also appeared to be particularly stable upon dilution with water. Indeed, the droplet diameter of blank emulsion **BE7** remained fairly unchanged after several dilution steps (Figure 3B).

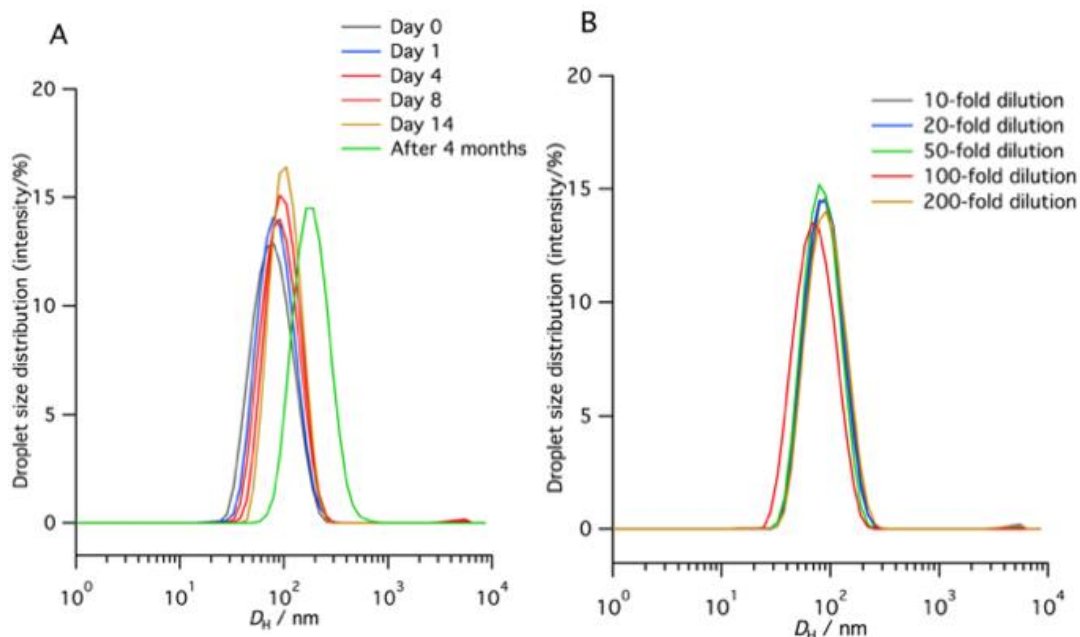


Figure 5: A) DLS follow of droplet hydrodynamic diameter D_H for blank emulsion BE7 stored at 4°C in the dark during 4 months (estimated by Contin analysis); (B) DLS analysis of blank emulsion BE7 (at Day 4 after preparation) upon different dilutions in water (DLS measurements were carried out just after dilution)

It is worth noting that these nanoemulsions **BE6** and **BE7** with droplet mean diameters below 100 nm, low PDI and stable upon dilution constitute very attractive tools for food applications (giving rise to perfectly translucent solutions) or as drug delivery systems for cancer treatment as they can take advantage of the so-called enhanced permeability retention effect (EPR) associated to tumor growth.

Extremulsions

These conditions optimized on blank emulsions (100 mg of pure or mixed oily phase; TPGS 1000 at 30 mg/mL and 2 mL of water) were then applied to extract curcumin from *Curcuma longa*.

Each extraction experiment used 100 mg of *Curcuma longa* dry powder. Droplet mean diameter and size distribution were estimated by DLS analysis and extraction rates (expressed as the mass of recovered curcumin per gram of extracted turmeric) were quantified by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the supernatant after centrifugation of crude extracts. Extraction batch experiments [1,2]; [3,4] and [5,6] were performed according to the composition of blank emulsions **BE6**, **BE7** and **BE5**, respectively (Table 4). A strong increase in droplet polydispersity was observed for extremulsions **1**, **3** and **5** where the sonotrode tip horn was placed in the same position as for blank emulsions, *i.e.* at the bottom of the cylindrical vial containing the extraction medium. The curcumin recovery rate for these extremulsions **1**, **3** and **5** was of 50%, 73% and 55%, respectively. In all cases the conventional Soxhlet-assisted extraction in acetone was taken as reference yield (100%) (Figure 4). When the ultrasound tip was positioned at the middle of the solution, a polydispersity decrease was observed (PDI < 0.30) for samples **2** and **4**. For the latter samples, the position adjustment of the tip also allowed small droplets with mean diameters of respectively 109.8 and 113.6 nm combined to increased recovery rates of 87 and 76%. Curcumin quantification was achieved by HPLC at 420 nm and at this wavelength curcumin represents 36% of total pic area for sample **4** per example (Table S1). In comparison, curcumin represents 39 % of total pic area at 420 nm in the Soxhlet extract experiment. Extraction recoveries of sample **2** and **4** are consistent with those reported by other authors using non-conventional extracting techniques. In comparison, Wakte *et al.* obtained 69.36% of curcumin recovery rate from *Curcuma longa* by supercritical carbon dioxide extraction, over an extraction period of 240 to

300 minutes (using 10% of ethanol as modifier) while our solvent-free extremulsion process yielded recovery rates of 76 to 87% for samples **4** and **2** in only 2 minutes of total sonication time (Wakte et al., 2011). This comparison highlights the “green profile” of our process which is not only a solvent-free extraction/formulation method but it is also straightforward and very efficient in a reduced experiment time scale.

Table 4: Effect of dispersed phase composition and US probe position on the mean droplet diameter (Z-average) and PDI of extremulsions (average of triplicate experiments, DLS data analyzed by the technique of cumulants):

Sample (extremulsion)	m _{TB} (mg)	m _{MCT C8-C10} (oil) (mg)	m _{LCT C10-C18} (wax) (mg)	m _{C. longa} (mg)	US tip position	D _H (nm)	PDI
BE6	85	0	15	-	bottom	77.0 ± 7.4	0.15
1	85	0	15	100	bottom	n/a	> 0.3
2	85	0	15	100	middle	109.8 ± 2,6	0.25
BE7	85	15	0	-	bottom	72.3 ± 1.6	0.16
3	85	15	0	100	bottom	n/a	> 0.3
4	85	15	0	100	middle	113.6 ± 5.6	0.26
BE5	100	0	0	-	bottom	163.3 ± 7.8	0.23
5	100	0	0	100	bottom	n/a	> 0.3
6	100	0	0	100	middle	n/a	> 0.3

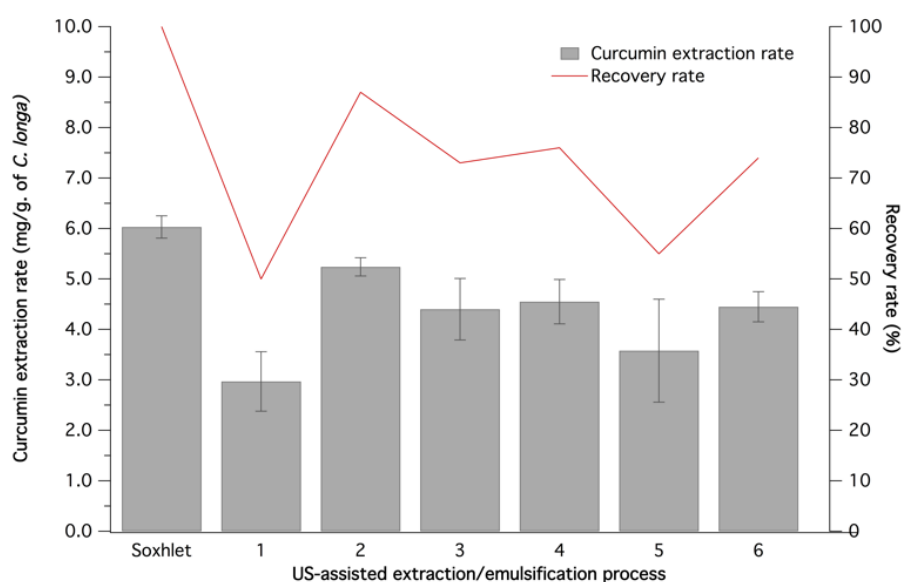


Figure 6: Grey bars: Curcumin extraction rate (mg of extracted curcumin/g of *C. longa*) (average of triplicate experiments); Red line: Curcumin recovery rate of samples 1 to 6 compared to that obtained for equivalent amount of *Curcuma longa* through conventional Soxhlet-assisted extraction in acetone.

In parallel, the emulsion improvements in terms of droplet size reduction and curcumin loading linked to the US-tip position adjustments can probably be ascribed to a better acoustic field delivery into the solution. It results in higher applied mechanical stress, leading better medium mixing, associated to a stronger interaction between the cloud of cavitation bubbles and the curcuma powder (Romdhane and Gourdon, 2002). Nevertheless, for the same US-tip position, a polydisperse emulsion was achieved for experiment **6** with however, an acceptable recovery rate of 74 %. This result confirms the usefulness of the MCT/TB or LCT/TB mixture to limit the polydispersity as previously observed for blank emulsions. The droplet size evolution of the best candidates, *i.e.* extremulsions **2** and **4**, stored in dark conditions at 4°C, was followed by DLS. While sample **2** showed a large increase in dispersity over time, the hydrodynamic diameter and polydispersity index of extremulsion **4** remained unchanged after 10 days ($D_H = 110.8$ nm and PDI = 0.22, data not shown). Besides, triglyceride oil combined to tributyrin in the droplet core seems to better delay extremulsions ripening than addition of triglyceride wax. Confocal microscopy analysis of sample **4** after 15 days in the dark, clearly shows dispersed fluorescent spots corresponding to curcumin-loaded droplets (Figure 5).

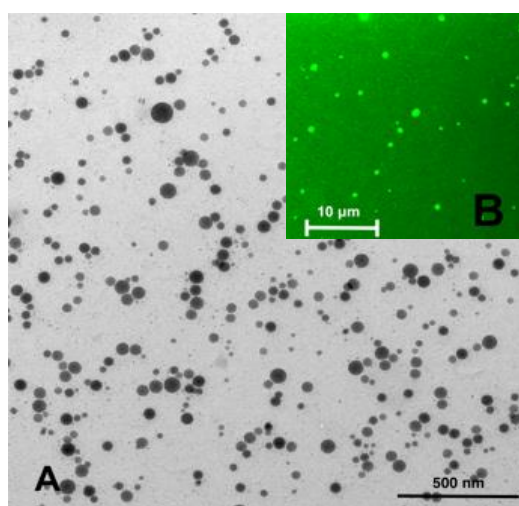


Figure 7: TEM picture of sample 4 at day 0 (A) and confocal microscopy image after 15 days of storage at 4°C in the dark (B)

Dry formulations

Aside from the development of a one-pot extraction-formulation process avoiding the use of organic solvents, another goal of the present study was to produce dry formulations allowing easier and improved conditions of use, storage, transport or safe processing. Despite all the benefits offered by nanoemulsions for drug or nutraceutical encapsulation and delivery, they remain metastable colloids prone to inexorable destabilisation. This instability, mainly due to Ostwald ripening, and to a lesser extent to droplet coalescence, results in a slow leakage of the droplet cargo over time. Moreover, the significant amount of water surrounding the oil droplets can promote microbial development detrimental to the quality of the product, in particular for food applications. Hydrolysis of triglycerides can also occur despite the internal location of the oil constituting the droplet core.

In order to increase their long-term stability and facilitate extremulsion handling, a freeze-drying strategy was explored. In the case of curcumin-loaded extremulsions this process appears particularly relevant since it is performed at low temperature hence preventing the risk of thermal degradation of curcumin that could arise with other drying processes like spray-drying.

However, during the freeze-drying cycle a destabilization of extremulsions can occur. The risk of nanoemulsion disorganization is particularly high during the freezing step of the cycle in which droplets concentrate in the remaining water and can aggregate and irreversibly coalesce (Morais et al., 2016). This phenomenon can lead to an increase in droplet size and polydispersity along with a curcumin leakage from droplets. This nanoemulsion damage can be prevented by adding a cryoprotectant to the formulation whose main role would be to reduce the mechanical stress exerted by ice crystals at the droplet surface. Among the most often used cryoprotectants for nanoemulsion freeze-drying, we selected trehalose, which is reported in the literature to provide high protective effect as other low molecular weight cryoprotectants (Li et al., 2008),(Choi et al., 2007).

The same process was implemented to dehydrate extremulsions **2** and **4**: after the sonication cycle, the crude extract was centrifuged, trehalose was then added at a concentration of 6.5 % (w/v) to the aliquoted supernatant. A slow freezing was conducted overnight in a freezer before the freeze-drying step. Thereafter, the frozen emulsion was freeze-dried in the dark during 16h using a benchtop freeze-dryer (vacuum of 70 μ bar). A yellow freeze-dried cake was

recovered and stored at 4°C in dark conditions before size analysis. Assuming that only water was eliminated during the drying process (no oil leakage), the same volume of lost water was added to each dry aliquot prior to DLS measurements. Droplet re-suspension was achieved by manual shaking.

Table 5: DLS and HPLC analysis (mean droplet diameter (Z-average diameter), PDI and curcumin recovery rate) of extremulsions **2** and **4** before dehydration (parent emulsion) and after resuspension in water (rehydrated emulsion). (average of triplicate experiments, DLS data analysed by the technique of cumulants)

Sample (extremulsion)	D _H parent emulsion (nm)	PDI parent emulsion	D _H rehydrated emulsion (nm)	PDI rehydrated emulsion	Curcumin recovery rate (rehydrated emulsion) (%)
2	109.8 ± 2,6	0.25	n/a	> 0.3	72 ± 1 %
4	113.6 ± 5.6	0.26	148.1 ± 1.5	0.25	76 ± 1 %

DLS analysis revealed that extremulsion 2 was more likely to destabilization, i.e. droplet coalescence (Moretton Marcela A. et al., 2012), during freeze-drying (Table 5). Indeed, the corresponding rehydrated emulsion became polydisperse (PDI > 0.30), while resuspended droplets from dry sample 4 exhibited an acceptable polydispersity index of 0.25 and slightly growth to reach a hydrodynamic diameter of 148.1 nm. This difference of formulation stability towards freeze-drying may be ascribed to the droplet core composition. According to the work of Marefati et al (Marefati et al., 2015), our result is somehow surprising as droplets of extremulsion 2, made of a mixture of TB with LCT C10-C18 oil, solid at room temperature, are expected to shrink less than droplets with a liquid oily core upon freezing as it is the case for extremulsion 4. One possible explanation is that the destabilization of sample 2 arises from the formation of oil crystals in the droplet core, prone to penetrate in the liquid region of other droplets during their cryo-concentration leading to coalescence. Actually, although any oil layer was macroscopically observed at the top of each resuspended emulsion, for extremulsion 2 a partial creaming of the rehydrated emulsion probably occurs giving rise to a loss of about 15 % of curcumin in the bulk phase collected for HPLC analysis.

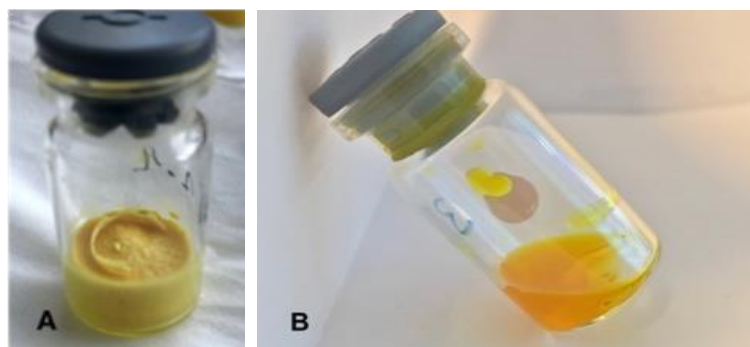


Figure 8: Picture of freeze-dried (A) and corresponding rehydrated (B) extremulsion 4
Greenness profile

The greenness profile of extremulsion process was assessed using the CHEM21 metrics toolkit designed by Robert McElroy et al.³⁴ As extremulsion is a one-pot extraction/formulation technology, a step of US-assisted curcumin encapsulation was performed after Soxhlet extraction in order to provide a comparable “baseline” method. The two extraction/formulation techniques (applied to extremulsion samples 2 and 4 compared to Soxhlet extraction followed by US-assisted formulation) were evaluated according to key parameters covered by the metrics toolkit.

It is noteworthy that these parameters meet the six principles of green extraction proposed by Chemat et al :⁷

- a) Sample mass (Principle 1): mass of plant material per analysis (in g).
- b) Solvent (Principle 2): nature and mass of solvent required to extract the starting raw material.

Compared to the conventional Soxhlet extraction performed in acetone, extremulsion technology can be considered as a solvent-free process as no organic solvents are involved. However, in the CHEM21 metrics toolkit all the extracting medium is considered as a “solvent” which incidence on safety, health, and environment (SHE) is taken into account referring to the CHEM21 solvent guide.³⁵ The latter solvent guide ranks solvents in three categories (recommended, problematic or hazardous) based on a hazard-driven score combining physicochemical criteria (boiling and flash points) and hazard statements extracted from Safety Data Sheets. This methodology, has been applied to the solvents used in the two

extraction/formulation techniques (Table 6). Although tributyrin and MCT C8-C10 constituting the oily core of droplets are ranked by default as “problematic” due to their high boiling points, the impact of such parameter should be underestimated, as in the final curcumin formulations oils are neither removed nor recovered. Acetone, used for Soxhlet extraction, is considered as recoverable and recyclable after evaporation under reduced pressure using a rotary evaporator.

Table 6: Classification of solvents employed in this comparative study according to the Chem21 Solvent Guide.

Solvent assessment			
Water	Tributyrin	MCT C ₈ -C ₁₀ (Labrafac CC)	Acetone

Recommended	Problematic
-------------	-------------

c) Energy (Principle 3): energy consumption (in kW.h) for each method from the starting material to the sample to be analyzed by HPLC. Energy consuming steps include ultrasound and centrifugation in the case of extremulsion samples, versus Soxhlet extraction and solvent evaporation for the baseline method. As seen in Table S3 the extremulsion technique is approximately 14 times less energy-consuming than the two-steps baseline method.

d) Waste (Principle 4): in the case of extremulsion process the only “waste” generated is the remaining plant material. This final wet residue is biodegradable and can also be reused to extract other natural products of interest. In comparison, for the baseline method, acetone has to be added to the waste balance. Although acetone can be recovered by evaporation and condensation, it is usually not recycled in academic laboratories.

e) Process (Principle 5): If we compare the total process duration (in hour) from the starting Curcuma longa powder to the final curcumin formulation to be analyzed, the experiment time is divided by 4 in the case of extremulsion process which is also impacting the energy spent.

f) Product recovery (Principle 6): In order to evaluate the two methods efficiency, one can compare the mass of extracted curcumin (in mg) from the same amount of plant material (in

g). This value, also called extraction rate, is reported in Figure 4 for each sample (see samples 2, 4 and Soxhlet). As Soxhlet extraction performed in refluxing acetone is considered to be the most efficient method to extract the maximum of curcumin available in the plant material, we can also compare the Curcumin recovery rates (in %) also reported in Figure 4. All these metrics should be considered holistically.

Conclusions

As a conclusion, we provide in this study an original process combining in a single step solvent-free extraction and encapsulation of liposoluble natural products. In our opinion, this “two-in-one” technology perfectly fits with the principles of green chemistry postulated by Anastas (Anastas and Warner, 1998) and extended to green extraction by Chemat *et al.* (Chemat *et al.*, 2012). Indeed, it allows to efficiently extract and formulate lipophilic natural products in a minimal number of steps and in a very short time (only 2 minutes of total sonication time) thus limiting the energy consumption. Moreover, at the end of the process the only produced waste is the remaining plant “cake” removed by centrifugation which is itself perfectly bio-degradable.

The freeze-drying of the achieved extract-emulsions, so-called “extremulsions”, provide long shelf-life bioactive powders easy to store and to use after simple rehydration. This novel concept was applied to the extraction/encapsulation of curcumin in oil nanodroplets stabilized with a vitamin-E derived surfactant. Curcumin-loaded extremulsions present extraction rates close to those obtained with conventional method of Soxhlet extraction in acetone. Playing on the nature and concentration of surfactant, oil composition of the emulsion and sonication conditions we obtained very interesting nanoemulsions exhibiting limited polydispersity, high curcumin loading and stable over time and during the final freeze-drying step. Among the explored conditions, extremulsion **4** appeared to be a good candidate for future optimization as it was stable over time as “fresh” emulsion and exhibited very moderate changes in droplets size and curcumin loading after re-hydration of its freeze-dried form. For food applications this combination of curcumin with oil in redispersible dry formulations appear as a very attractive way not only to avoid curcumin degradation but also to improve its dispersibility and intestinal absorption after oral administration.

In an ecologic target, we hope that this new process will succeed in replacing the actual

conventional extraction techniques. The advantage of this technological progress is that it could be used in several fields as pharmaceutical, cosmetical and nutraceutical industry. With the emergence of “do it yourself” cosmetics, these easy to store and ready to use dry formulations might be very attractive ingredients.

Starting from this first proof-of-concept study, further investigations are currently in progress in order to fine-tune experimental conditions (turmeric to extraction mixture ratio, surfactant fraction, US parameters....) leading to optimal droplets size, dispersity and payload.

Author contributions

Alice Dall’armellina – experimental, investigation, methodology, validation, visualization, writing – original draft, writing – review & editing. Christiane Contino-Pépin – investigation, methodology, project administration, resources funding acquisition, conceptualization, supervision, validation, visualization, writing – original draft, writing – review & editing. Mathias Letan – conceptualization, funding acquisition, resources. Charles Duval – conceptualization, funding acquisition, resources.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Region Sud and Lyofal company (Salon de Provence) for funding the PhD thesis grant of A. Dall’armellina. This study was conducted with the financial support of the European Regional Development Fund, the French Government, the Sud Provence-Alpes-Côte d'Azur Region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon. We also thank Isabelle Bornard (INRAE, Avignon) for TEM and confocal analysis.

Supplementary information

Fig. S1: Structure of curcumin

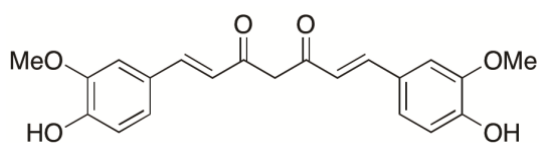


Fig. S2: Structures of Vitamin-E based TPGS 750M and TPGS-1000 surfactants

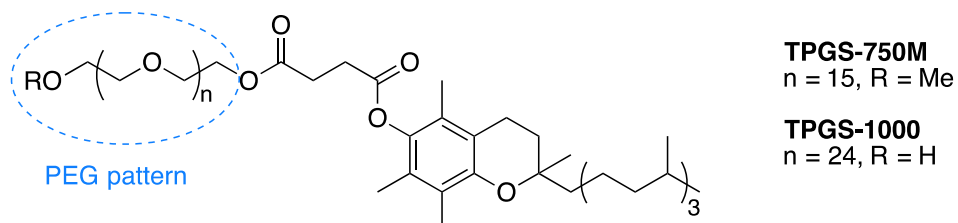


Fig. S3: (A) Curcumin standard solution of 50 ppm chromatogram; (B) Sample 4 chromatogram with a: bisdemethoxycurcumin, b: demethoxycurcumin and c: curcumin; (C) Soxhlet chromatogram at 420 nm

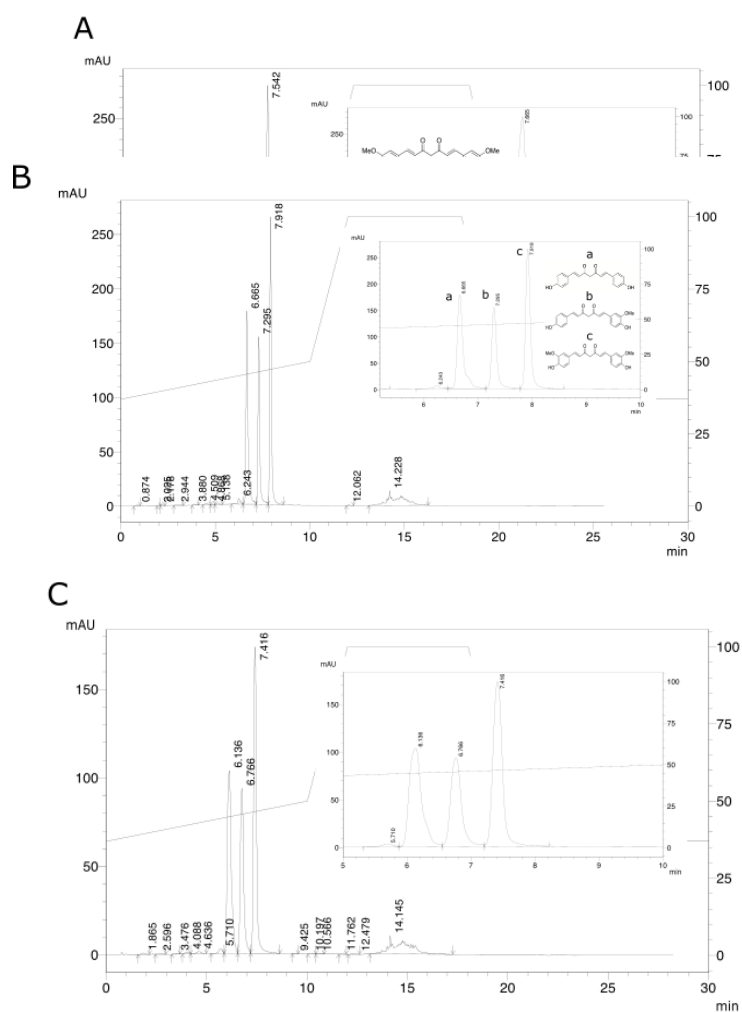


Fig. S4 Proportion (%) of curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin) in the Soxhlet extract (Fig. S3-C) and in extremulsion (sample 4, Fig. S3-B) assessed by HPLC analysis at 420 nm.

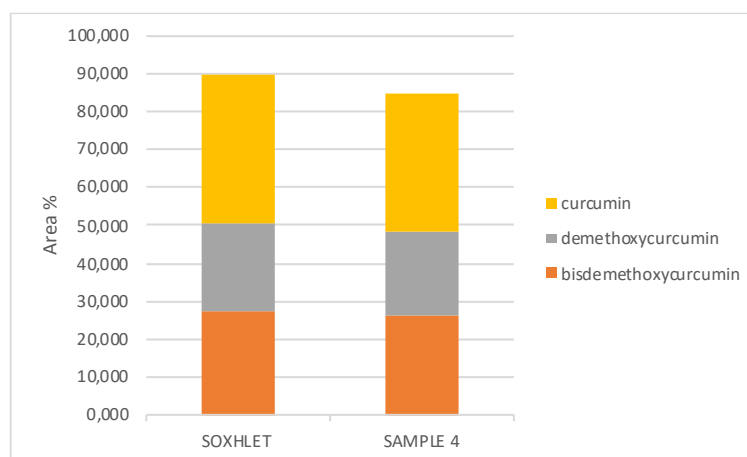


Table S1 Detail of area percentages of curcuminoids from Fig. S4.

% Area	curcumin	demethoxycurcumin	bisdemethoxycurcumin
Soxhlet	39.07	23.43	27.22
Sample 4	36.19	21.70	26.51

Table S2 DLS follow of droplet hydrodynamic diameter D_H for blank emulsion BE7 stored at 4°C in the dark during 4 months (estimated by Cumulant analysis)

	D_H (nm)	PDI
Day 0	78,6	0,14
Day 1	81,9	0,15
Day 4	84,9	0,14
Day 8	91,9	0,12
Day 14	97,1	0,11
After 4 months	170,2	0,13

In order to evaluate the greenness profile of both techniques the following procedure were carried out. The baseline method “Soxhlet + formulation” was achieved applying the extremulsion process (for curcumin encapsulation) after Soxhlet extraction. The Soxhlet extraction was carried out as described in the “material and methods” section. Then, after acetone evaporation, the dry extract was used instead of the 100 mg *Curcuma longa* matrix as described in the general procedure for preparation of extremulsion and brought into contact with 85 mg of tributyrin and 15 mg of triglycerides C₈-C₁₀.

In order to measure the energy consumption, a power meter PM01 (NingBo Cowell Electronic Technology Co., Zhejiang, China) was used at each step of the procedure using energy. For the Soxhlet extraction the power meter was used to measure the consumption of the heating mantle and of the rotary evaporator. The energy consumption of the vane pump was calculated as the input power (198 W) multiplied by the time of use (24 minutes). For the extremulsion procedure the power meter was used to measure the consumption of the ultrasound generator and of the centrifuge.

Comparative results using CHEM 21 metrics toolkit of both techniques (baseline method and extremulsion for sample **2** and **4**) can be seen in Table S3.

For the following assessments we have followed the method of R. A. Milescu et al,³⁶ who applied the CHEM21 metrics toolkit, which was mainly designed for reactions in organic chemistry, to compare the sustainability and greenness profile of two methods of extraction of natural products.

As extremulsion method is not a “classical chemical reaction”, the reaction mass efficiency (RME) corresponds to the mass of curcumin extracted over mass of initial biomass calculated as follows (eqn (1)):

$$RME = \frac{\text{mass of isolated product}}{\text{total mass of reactants}} \times 100 \quad (1)$$

The process mass intensity (PMI) is a metric allowing to assess efficiency of the entire process (eqn (2)):

$$PMI = \frac{\text{total mass in a process}}{\text{mass of product}} \quad (2)$$

Results are expressed in g.g^{-1} *i.e.* mass inputs per g of product. In our case, PMI is displaying an overall mass input per g of curcumin in the final formulations. As we consider extraction, PMI reaction has been renamed PMI biomass as this is g of plant material required to give a g of curcumin loading in the final formulations.

Table S3 Comparative results of the extremulsion technique (samples **2** and **4**) and of the “baseline” method (Soxhlet extraction followed by US-formulation of the extract)

	Baseline method: Soxhlet + formulation	Sample 2	Sample 4
Type of solvent	Acetone + water + oils	Water + oils	Waters + oils
Raw material	<i>Curcuma longa</i>	<i>Curcuma longa</i>	<i>Curcuma longa</i>
Sample mass (g)	0.1	0.1	0.1
Solvent quantity (mL)	41.56	2.26	2.26
Solid to solvent ratio (g/mL)	$2.4 \cdot 10^{-3}$	0.044	0.044
Temperature (°C)/ Time of extraction	56°C/30 min	0°C/2min	0°C/2min
Total process duration (h)	1.18	0.28	0.28
Energy consumption (kWh)	0.36	0.025	0.025
RME (%)	0.68	0.52	0.46
Extraction yield (mg/ g de C. longa)	6.8	5.2	4.6
PMI biomass (g/g)	147	192.3	217.4
PMI solvents (g/g)	60231.9	4038.5	4666.7
total PMI (g/g)	60378.9	4230.8	4884.1
Product mass (g)	$0.69 \cdot 10^{-3}$	$0.52 \cdot 10^{-3}$	$0.455 \cdot 10^{-3}$
Type of extraction + formulation	Double stage (single result)	Single stage (triplicate)	Single stage (triplicate)

REFERENCES

- Ahmed, K., Li, Y., McClements, D.J., Xiao, H., 2012. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food Chemistry* 132, 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.039>
- Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., 2008. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Letters* 267, 133–164. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.025>
- Anastas, P.T., Warner, J.C., 1998. *Green chemistry: theory and practice*. Oxford University Press, Oxford [England]; New York.
- Araiza-Calahorra, A., Akhtar, M., Sarkar, A., 2018. Recent advances in emulsion-based delivery approaches for curcumin: From encapsulation to bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology* 71, 155–169. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.009>
- Aswathanarayan, J.B., Vittal, R.R., 2019. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. *Front. Sustain. Food Syst.* 3. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00095>
- Cao, J., Chen, L., Li, M., Cao, F., Zhao, L., Su, E., 2018. Two-phase systems developed with hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents for simultaneously extracting various bioactive compounds with different polarities. *Green Chemistry* 20, 1879–1886. <https://doi.org/10.1039/C7GC03820H>
- Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G., 2012. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chemat, F., Vian, M.A., Fabiano-Tixier, A.-S., Nutrizio, M., Jambrak, A.R., S. Muneke, P.E., M. Lorenzo, J., J. Barba, F., Binello, A., Cravotto, G., 2020. A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry* 22, 2325–2353. <https://doi.org/10.1039/C9GC03878G>
- Choi, M.J., Briançon, S., Bazile, D., Royere, A., Min, S.G., Fessi, H., 2007. Effect of Cryoprotectant and Freeze-Drying Process on the Stability of W/O/W Emulsions. *Drying Technology* 25, 809–819. <https://doi.org/10.1080/07373930701370183>
- Degot, P., Huber, V., Hofmann, E., Hahn, M., Touraud, D., Kunz, W., 2021. Solubilization and extraction of curcumin from *Curcuma Longa* using green, sustainable, and food-

- approved surfactant-free microemulsions. *Food Chemistry* 336, 127660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127660>
- Filly, A., Fabiano-Tixier, A.S., Louis, C., Fernandez, X., Chemat, F., 2016. Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. *Comptes Rendus Chimie* 19, 707–717. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.01.018>
- Gomez-Estaca, J., Balaguer, M.P., Gavara, R., Hernandez-Munoz, P., 2012. Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. *Food Hydrocolloids* 28, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.11.013>
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S., 2016. Controlling and predicting droplet size of nanoemulsions: scaling relations with experimental validation. *Soft Matter* 12, 1452–1458. <https://doi.org/10.1039/C5SM02051D>
- Inês Dias, M., R. Ferreira, I.C.F., Filomena Barreiro, M., 2015. Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food & Function* 6, 1035–1052. <https://doi.org/10.1039/C4FO01175A>
- Jin, W., Yang, Q., Huang, B., Bao, Z., Su, B., Ren, Q., Yang, Y., Xing, H., 2016. Enhanced solubilization and extraction of hydrophobic bioactive compounds using water/ionic liquid mixtures. *Green Chemistry* 18, 3549–3557. <https://doi.org/10.1039/C6GC00584E>
- Li, F., Wang, T., He, H.B., Tang, X., 2008. The properties of bufadienolides-loaded nano-emulsion and submicro-emulsion during lyophilization. *International Journal of Pharmaceutics* 349, 291–299. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.08.011>
- Li, J.W.-H., Vederas, J.C., 2009. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science* 325, 161–165. <https://doi.org/10.1126/science.1168243>
- Li, Y., Le Maux, S., Xiao, H., McClements, D.J., 2009. Emulsion-Based Delivery Systems for Tributyrin, a Potential Colon Cancer Preventative Agent. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9243–9249. <https://doi.org/10.1021/jf901836f>
- Liu, Y., Qiao, Z., Liu, W., Hou, Z., Zhang, D., Huang, L., Zhang, Y., 2019. Oleic acid as a protein ligand improving intestinal absorption and ocular benefit of fucoxanthin in water through protein-based encapsulation. *Food Funct.* 10, 4381–4395. <https://doi.org/10.1039/C9FO00814D>

- Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., Srimal, R.C., 2006. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences, NATURECEUTICALS (NATURAL PRODUCTS), NUTRACEUTICALS, HERBAL BOTANICALS, AND PSYCHOACTIVES: DRUG DISCOVERY AND DRUG-DRUG INTERACTIONS* 78, 2081–2087. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.007>
- Marefati, A., Sjöö, M., Tingren, A., Dejmek, P., Rayner, M., 2015. Fabrication of encapsulated oil powders from starch granule stabilized W/O/W Pickering emulsions by freeze-drying. *Food Hydrocolloids* 51, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.022>
- McClements, D.J., 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 8, 1719–1729. <https://doi.org/10.1039/C2SM06903B>
- Mohammadinejad, R., Karimi, S., Iravani, S., Varma, R.S., 2015. Plant-derived nanostructures: types and applications. *Green Chem.* 18, 20–52. <https://doi.org/10.1039/C5GC01403D>
- Morais, A.R. do V., Alencar, É. do N., Xavier Júnior, F.H., Oliveira, C.M. de, Marcelino, H.R., Barratt, G., Fessi, H., Egito, E.S.T. do, Elaissari, A., 2016. Freeze-drying of emulsified systems: A review. *International Journal of Pharmaceutics* 503, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.047>
- Moretton Marcela A., Chiappetta Diego A., Sosnik Alejandro, 2012. Cryoprotection–lyophilization and physical stabilization of rifampicin-loaded flower-like polymeric micelles. *Journal of The Royal Society Interface* 9, 487–502. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0414>
- Pistollato, F., Giampieri, F., Battino, M., 2015. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food and Chemical Toxicology* 75, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.11.004>
- Romdhane, M., Gourdon, C., 2002. Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal* 87, 11–19. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(01\)00206-6](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(01)00206-6)
- Sun, M., Su, X., Ding, B., He, X., Liu, X., Yu, A., Lou, H., Zhai, G., 2012. Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin. *Nanomedicine (Lond)* 7, 1085–1100. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.80>
- Taylor, P., 1998. Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 75, 107–163. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(98\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(98)00035-9)
- Teng, Z., Xu, R., Wang, Q., 2015. Beta-lactoglobulin-based encapsulating systems as emerging

- bioavailability enhancers for nutraceuticals: a review. *RSC Adv.* 5, 35138–35154. <https://doi.org/10.1039/C5RA01814E>
- Wakte, P.S., Sachin, B.S., Patil, A.A., Mohato, D.M., Band, T.H., Shinde, D.B., 2011. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology* 79, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.03.010>
- Wooster, T.J., Golding, M., Sanguansri, P., 2008. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir* 24, 12758–12765. <https://doi.org/10.1021/la801685v>
- Yan, A., Von Dem Bussche, A., Kane, A.B., Hurt, R.H., 2007. Tocopheryl polyethylene glycol succinate as a safe, antioxidant surfactant for processing carbon nanotubes and fullerenes. *Carbon* 45, 2463–2470. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.08.035>

Chapitre III : Extrémulsions de
curcumine : étude des paramètres de
traitement

L'utilisation des ultrasons pour l'extraction est devenue plus courante au cours des dernières décennies en raison de ses avantages notoires. Les techniques d'extraction conventionnelles et certaines autres nouvelles techniques d'extraction sont associées à plusieurs inconvénients, tels que des coûts, une consommation en énergie, un rejet en CO₂ et une consommation en solvants organiques toxiques élevés. L'extraction assistée par ultrasons quant à elle, est respectueuse de l'environnement, facile à utiliser et ne nécessite qu'un faible investissement par rapport à d'autres techniques d'extraction innovantes comme l'extraction par fluide supercritique.

Basée sur les paramètres optimisés lors de la première étude, cette seconde étude s'est focalisée sur l'impact des paramètres de traitement sur le taux d'extraction en curcumine ainsi que sur la distribution en taille des gouttelettes. Dans ce chapitre, différents paramètres opératoires tels que la puissance ultrasonore, le temps d'extraction, le ratio matrice/solution extractrice, l'ajout d'une étape de pré-traitement et les paramètres de post-traitement ont été explorés avec l'intention d'augmenter le taux d'extraction en curcumine et de diminuer la distribution en taille des extrémulsions. Le post-traitement a pour but d'éliminer les résidus de matrice à la suite de l'extraction et consiste en une étape de centrifugation. Cette étape doit être étudiée attentivement puisqu'une mauvaise élimination des résidus de matrice peut fausser le taux d'extraction et la distribution en taille de gouttelettes par la présence de particules. Lors de l'extraction, un ratio solide/liquide élevé altère le transfert de masse mais l'économie de matière première nécessite d'optimiser ce ratio au maximum. L'étude d'optimisation du post-traitement a été réalisée en parallèle de l'augmentation du ratio matrice/solvant puisque les paramètres de centrifugation à appliquer dépendent de la quantité de matrice ajoutée initialement. Cette seconde étude, nous a permis d'optimiser le procédé en termes de consommation de matière première, de tensioactif et de puissance ultrasonore en aboutissant à des extrémulsions monodisperses ($PDI < 0,2$) avec un taux de recouvrement élevé.

Dans ce chapitre j'ai réalisé les expériences de préparation des extrémulsions, leur caractérisation en DLS ainsi que leur analyse en HPLC. L'analyse granulométrique des extrémulsions à l'aide d'un analyseur de taille de particules par diffraction laser Mastersizer 2000 a été réalisée par le Dr. Stéphane Desgranges et les analyses statistiques ont été réalisées par le Dr Jean-Baptiste Mazzitelli.

Ce chapitre sera soumis prochainement dans le ChemSusChem.

“Extremulsion” of curcumin from *Curcuma longa* – Improvement of concentration and stability via the ultrasound-assisted extraction conditions and the formulation composition

Alice Dall’armellina^a, Stéphane Desgranges^a, Jean-Baptiste Mazzitelli^a and Christiane Contino-Pépin^{*a}

^a*Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, Avignon Université, 84911 Avignon, France.*

** Corresponding author: christine.pepin@univ-avignon.fr*

Abstract

Curcumin was extracted from *Curcuma longa* applying ultrasound in a medium composed of food-agreed oils, a bio-based surfactant and water. The extracted lipophilic compound was encapsulated in nanosized colloidal system called “extremulsions” for extract and emulsion. Based on a previous study, where the optimal oily phase composition and surfactant nature were determined, the treatment parameters and the formulation composition were investigated in order to improve the extraction yield and the nanoemulsion stability. The water volume, the matrix amount and the post-treatment conditions appeared to have a significant impact on the mean droplets diameter, the polydispersity index and the curcumin recovery rate.

Introduction

Nowadays, many researchers and industrialists are interested in the discovery of new eco-friendly techniques for extracting bioactive compounds from natural sources. Extraction is the primary step in medicinal plant research with a significant impact on the final product and an important role in the production of food additives, functional foods, and nutraceuticals. Conventional extraction techniques such as liquid-liquid or solid-liquid extraction, Soxhlet extraction, maceration and hydrodistillation, are related to a high energy consumption, high CO₂ emissions, the consumption of toxic organic solvents, solvent residues in the extract and degradation of heat-sensitive bioactive compounds. Whereas the application of alternative extraction techniques, such as ultrasounds (US), microwaves, high pressure, pulsed electric field, supercritical fluids and others, is more welcoming due to the reduced environmental burden. Advantages of alternative extraction techniques are less use of organic solvents, low working temperatures, short duration and improved quality and yield of the compounds of interest for the supercritical fluids' extraction. The potential of US technology for the clean and environmentally friendly extraction of molecules from a series of natural sources has been widely reported (Tiwari, 2015). US is a more versatile and cost-effective technology compared to traditional techniques as it reduces the consumption of time, energy and expensive organic solvents.(Ameer et al., 2017) In addition, it requires minimal space, is less complex than other new process and can be extended to a wide range of starting material and targeted bioactive compound, provided that parameters are optimized for the specific matrix, including solvent type, solvent to solid ratio, temperature, power and frequency of the US beam.

The food and pharmaceutical industries are trying to manufacture and develop new functional foods defined as a product in which bioactive molecules are incorporated to formulate aliments with specified function like promoting good health or preventing diseases such as cancer. Growing consumer interest in healthier food is driving the success of this new category of food products on the market. As a main bioactive compound of turmeric (*Curcuma longa*), curcumin has been increasingly used to develop new functional foods. Curcumin is a natural low-molecular-weight polyphenolic compound extracted from the rhizome of turmeric (Sharma et al., 2005). In the last few decades, curcumin has gained significant

research attention owing to its wide range of health-promoting properties, such as anti-tumour, anti-inflammatory, anticarcinogenic, and antioxidant activities (Ak and Gülçin, 2008; Fujisawa et al., 2004; Selvam et al., 2005). However, curcumin represents less than 6% of the wet weight of turmeric and also shows extremely low water solubility, limiting its incorporation in functional foods (Goel et al., 2008). Moreover, curcumin is a lipophilic compound with limited distribution in physiological fluids. Its rapid *in vivo* metabolization and excretion from the body, as well as its poor stability under alkaline pH conditions, reduce the bioavailability of curcumin (Gupta et al., 2012)(Leung et al., 2008). Chakravarty *et al.* and Račková *et al.* showed less pronounced anticancer and anti-inflammatory effects for curcumin alone compared to whole turmeric, suggesting that curcuminoids and other turmeric constituents operate synergistically (Chakravarty et al., 2009),(RAČKOVÁ et al., 2009). Therefore, it would be preferable to develop formulations containing turmeric extract rather than pure curcumin ones, but the problems of bioaccessibility, water solubility and stability at high pH remain to be resolved.

In order to overcome these difficulties and improve the oral bioavailability of curcumin, the design of a delivery system, able to prevent its degradation during the extraction process and storage, could facilitate its integration in various food products (Anand et al., 2008; Ezhilarasi et al., 2013). Zhang & McClements reported that emulsions can be good curcumin delivery system candidates (Zhang and McClements, 2016). There are mainly two emulsion-based curcumin delivery systems: excipient emulsion systems and emulsion-based delivery systems. The first approach involves the co-ingestion of a curcumin-free emulsion with a curcumin-rich food, the bioactive compound being transferred from the food to the oil droplets. The second approach involves the encapsulation of curcumin in an oil-in-water emulsion which allows it to be ingested on its own. Researchers have been keenly interested to the second one.

Our group has recently developed a new green process combining the solvent-free US-based extraction of curcumin from *Curcuma longa* to its encapsulation in oil-in-water nanoemulsions. The resulting curcumin-loaded extracts/emulsions were so-called “extremulsions”. To evaluate the efficiency of this innovative technology for curcumin extraction, Soxhlet extraction in acetone was considered as the reference method and the extraction yields were compared to it. In order to allow a wide range of applications, like functional foods, cosmetics or nutraceuticals, our goal was to obtain a stable monodisperse nanoemulsion (polydispersity index (PDI) < 0.2) with curcumin-loaded droplets around 100

nm in hydrodynamic diameter (D_H) and a curcumin recovery rate close to 100 %.

The main variables affecting the US-assisted extraction efficiency and formulation include the processing conditions (type of reactor, operating temperature, pre-treatment step, ratio of extracting medium to raw material, US cycle, sonication time, US power) (Tiwari, 2015) and the composition of the emulsion (nature and concentration of oils, surfactant and water).

In a preliminary study, the emulsion composition in terms of oily phase and surfactant nature was fine-tuned (Dall'armellina et al., 2021). Among the lipids used, a mix of tributyrin and medium chain triglyceride oils has been identified as an efficient extracting medium toward turmeric and TPGS 1000 appeared to be the best surfactant candidate. In this study, we report an optimization of the process in regard to pre- and post-treatment, water volume, raw material to extracting medium ratio, surfactant amount, and US parameters based on the starting conditions reported in the preliminary study (Figure 1).

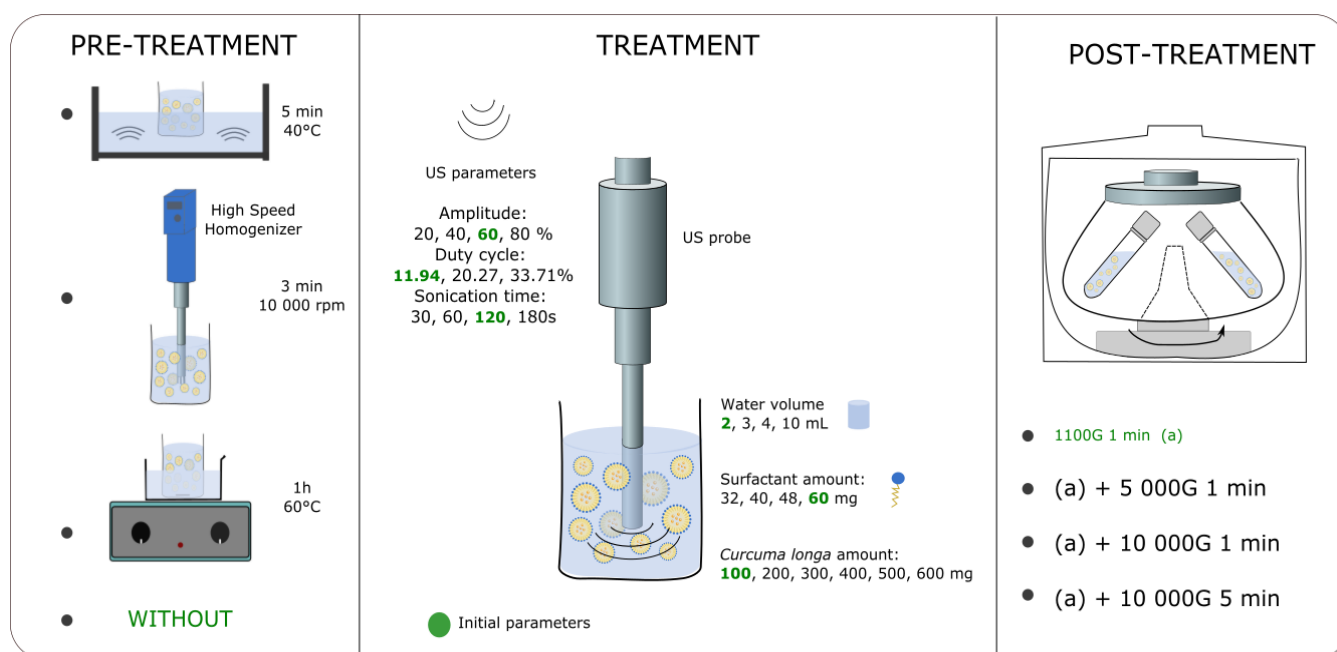


Figure 1: Scheme of the procedure and conditions investigated in the present study (conditions corresponding to the previous study in green)

Material and methods

Plant material

For this study 1 kg of dried *Curcuma longa* powder was purchased from the firm Herbier du Diois (Chatillon-en-Diois, France) in order to perform the study with the same matrix batch.

Chemicals

Curcumin standard (>99.5%), D- α -Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, Tributyrin (98%), acetonitrile (HPLC grade), acetone (99.8%) and trifluoroacetic acid, trehalose and mannitol were purchased from Sigma-Aldrich. Long chain triglycerides (Suppocire NB) and medium chain triglycerides (Labrafac CC) were provided by Gattefosse (Saint-Priest, France).

Soxhlet extraction

100 mg of *Curcuma longa* powder was placed in a thimble which is brought in contact with 50 mL of condensed fresh acetone from the distillation flask. Soxhlet extraction was performed for 30 min at 56 °C in three replicates. Acetone was evaporated under reduce pressure and samples were solubilized with 5.0 mL of acetonitrile, filtered on 0.2 μ m membrane filter and analyzed using the procedure described in the section curcumin quantification. The resulting yield of 6.56 mg of pure curcumin per gram of dried *Curcuma longa* during Soxhlet extraction was considered as the maximum yield (100%) and all experimental values were compared with this maximum content of curcumin in the source.

General procedure for preparation of extremulsions

The appropriate amount of *Curcuma longa* powder was brought into contact with the oily phase composed of 85 mg of tributyrin and 15 mg of medium chain triglycerides. The aqueous phase was a TPGS 1000 solution in water with a specified volume and concentration. A coarse emulsion was prepared mixing the oily and aqueous phases using a vortex. When a pre-treatment was applied, it was applied to the coarse emulsion. Then, extremulsions were

prepared using a high-power ultrasonic device. After sonication, the ultrasonic probe was washed with milliQ water and the rinsing water was added to the emulsion. Unless otherwise specified, the resulting curcumin-loaded emulsion was then centrifuged for 1 minute at 1 100 G. The supernatant volume was adjusted to 5 mL with milliQ water in a volumetric flask. After preparation, all extremulsions were stored at 4°C. Each extremulsion condition was prepared in triplicates.

Pre-treatment procedure

In the case of pre-treatment with high-speed homogenizer (HSH), the coarse emulsion was homogenized for three minutes at 10,000 rpm with a high-speed homogenizer (PT-MR 3100, Polytron) while being cooled by an ice bath. In the case of maceration as a pre-treatment, the coarse emulsion was stirred for 1 hour in a water bath at 60°C. In the case of pre-treatment with an ultrasonic bath (US bath), the coarse emulsion was sonicated for 5 minutes in an ultrasonic cleaner (3510E-DTH, Branson) at 40°C.

Ultrasonication

Extremulsions were prepared using an ultrasonic homogenizer (Bioblock Scientific Vibracell 75043, total input power = 450W) A constant frequency of 20 kHz was applied and a cylindrical titanium sonotrode (model CV33, 13 mm in diameter) was immersed in the solution placed at 9 mm from the bottom of the vial. Unless otherwise stated, general US conditions applied were as follows: pulsed US (15 US cycles, 8 sec on/59 sec off, duty cycle 11.94 %), effective sonication time of 120 sec, acoustic intensity of 203.4 W/cm². The solution was cooled with an ice bath during the complete sonication process.

Acoustic intensity

The generated acoustic intensity from the sonotrode with a *r* radius and a *P* input power was calculated as below (Shahavi et al., 2015):

$$I = \frac{P}{\pi r^2}$$

In this study the input power was of 20, 40, 60 or 80% of the total input power (450W) thus corresponding to 30, 180, 270 and 360 W, respectively. Based on the equation above, acoustic intensities were 67.8, 135.6, 203.4, 271.2 W/cm² for input powers varying from 30 to 360W.

Characterization of extremulsions

The droplets size distribution was analyzed by dynamic light scattering (DLS) using a Nano-S Nanosizer (Malvern Instrument). The extremulsion sample, diluted by 10 in milliQ water, was placed in a 45 μ L quartz tank and subjected to 10 measurements of 10 seconds each. The D_H was obtained by averaging the results of the 10 measurements. The measurements were made at an angle of 173° using a laser with a wavelength of 633 nm. Results were reported as D_H and PDI.

For the post-treatment conditions optimization, the particle size distribution was assessed using a Mastersizer 2000 laser diffraction particle size analyser (Malvern Instruments, Orsay, France) equipped with Hydro2000S as sample dispersion unit (A) mod using the Mie light scattering theory. The refractive indices used were 1.438 for the oily phase (tributyryn/medium chain triglycerides) and 1.333 for the dispersant (water). Several drops of the extremulsion were added with a stirring of 500 rpm to the sample dispersion unit. The Mie theory was used to determine the volume weighted mean diameter $D[3,2]$ and the span was calculated as $(D_{i90}-D_{i10})/D_{i50}$. D_{i90} is the diameter at which 90% of the sample's volume is comprised of droplets with a diameter less than this value. D_{i10} is the diameter at which 10% of the sample's volume is comprised of droplets with a diameter less than this value. Mie theory was used to determine the D_{i50} (the intensity-basis median value).

Curcumin quantification

HPLC analysis was performed on an Alliance Waters system (e2695) with a 2998 photodiode array (PDA) detector. Chromatographic separation was carried out with a Kinetex Biphenyl (100 Å, 4.6*100 mm, 2.6 μ m) purchased from Phenomenex® (Torrance, United-States). A linear gradient of A (water containing 0.1% trifluoroacetic acid) and B (acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid) was used with an elution gradient as follows (v/v): 0 min, B 37%; 10 min, B 50%; 15min, B 100% maintained for 10 min. The detection wavelength was 420 nm.

The injection volume was 5.0 μL . Data acquisition and analysis were performed by using Empower TM3 software. The method presented linearity over the range from 1 to 100 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2=0.9977$). The calibration curve was constructed by the dilution of curcumin standard (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany) with acetonitrile to provide the desired concentrations (1.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0 and 100.0 $\mu\text{g/mL}$) followed by injection into the HPLC system. Samples were directly dissolved in acetonitrile and filtered through nylon membrane filter (0.2 μm). The chromatographic retention times of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin were 6.213 ± 0.005 , 5.683 ± 0.005 , 5.193 ± 0.004 min, respectively.

The curcumin concentration in the sample solutions was assessed with the aid of a calibration curve. Extraction rate of curcumin from turmeric (mg/g of *C. longa*) was calculated following equation (1):

$$\text{Extraction rate [mg/g of } C. longa] = \frac{m_{cur}[\text{mg}]}{m_{turm}[\text{mg}]} \quad (1)$$

Where m_{cur} is the mass of curcumin extracted and m_{turm} is the mass of turmeric.

The recovery rate was calculated as below (equation (2)):

$$\text{Recovery rate [\%]} = \frac{m_{extr}[\text{g}]}{m_{sox}[\text{g}]} \times 100 \quad (2)$$

Where m_{extr} is the curcumin mass from extremulsion extraction and m_{sox} is the curcumin mass from Soxhlet extraction.

Statistical analysis

All measurements of D_H , PDI, $D[3,2]$, span and curcumin extraction rate and recovery rate were performed in triplicate using freshly prepared extremulsions, and were reported as calculated means and standard deviations (mean \pm SD). Shapiro-Wilk tests were performed to verify the normality of the data. Kruskal-Wallis non-parametric test or anova parametric test were realized in accord to the normality. Tukey post-hoc tests were added to defined statistical groups. All statistical results were expressed with $p < 0.05$.

Results and discussion

Starting conditions

A preliminary study varying extremulsions' preparation parameters (surfactant nature and concentration, nature and amount of oily phase) have been performed leading to the best candidate starting from 100 mg of *Curcuma longa* formulated with 100 mg of dispersed phase (made of a (85/15) mixture of tributyrin/medium chain C₈-C₁₀ triglycerides w/w) and 2 mL of an aqueous solution of TPGS 1000 at 30 g/L. The process without pre-treatment produced an extremulsion with droplet mean D_H of 113.6 nm, a PDI of 0.26 and a curcumin recovery rate of 76 %. The main features (composition, droplet size and loading) and conditions of preparation of this optimal formulation are presented on Table 1.

Table 1: Starting conditions of corresponding sample 1

Sample	1
Pre-treatment	without
$m_{\text{TPGS 1000}}$ (mg)	60
Water volume (mL)	2
$m_{\text{Curcuma longa}}$ (mg)	100
$m_{\text{Tributyrin}}$ (mg)	85
$M_{\text{Medium chain triglycerides}}$ (mg)	15
Centrifugation speed (G)	1 100
Centrifugation time (min)	1
Amplitude (%)	60
Duty cycle (%)	11.94
Sonication time (s)	120

Herein, based on these previous optimum conditions, we report the impact of pre- and post-treatment conditions, of US parameters, and of water, surfactant and matrix proportions on both droplet size, PDI and recovery rate of extremulsions. Experiments were performed by varying experimental parameters one at a time while all other variables remained fixed. The starting conditions described in Table 1 being used as control. Optimal conditions were identified as those that afforded the lowest PDI firstly, the highest recovery rate of the target compound secondly and the lowest D_H thirdly. PDI corresponds to the size distribution of droplets. In other words, it measures the dispersity of nanoemulsions. It is an important factor

used to evaluate the stability of a nanoemulsions (Preetz et al., 2010).

Impact of a pre-treatment addition

Preparation of more environmentally friendly formulations is related to the concept of saving resources by optimizing extraction conditions and/or introducing new processes. Combination of two or more techniques, which may have complementary or additional roles, can lead to an overall increase in extraction efficiency (Ojha et al., 2020). Several pre-treatment techniques have been applied to plant materials prior to extraction to help enhancing the extractability of bioactive compounds through plant structure modification like chemical pre-treatments (acid and alkaline treatments), physical treatments (microwave heating, pulsed-electric field, US treatment) and biological pre-treatments (enzymatic treatment). Sahne *et al.* described the effect of an enzymatic pre-treatment step to enhance curcumin extraction (Sahne et al., 2017). The yield improvement with this additional step was about 60% for 2h at 25°C but it involved a drying step of 12h before extraction.

As limited information is available on the impact of sample treatment prior to extraction on the extractability of curcumin from *Curcuma longa*, the effects of selected pre-treatment methods, namely, HSH, US bath and maceration and subsequent US-assisted extraction were investigated. The selection of pre-treatment techniques was limited to conditions with low increase in the overall process time, *i.e.* no more than one hour of additional time. First of all, a dispersing pre-treatment step, 3 minutes of HSH at 10 000 rpm, was applied before the US cycle. This pre-treatment step allowed to noticeably decrease the D_H of droplets, probably because the homogenizer produced a coarse emulsion, or premix, that US refined (Singh et al., 2017) (Table 2). In the case of five minutes of US bath, the D_H wasn't significantly different but the PDI was slightly reduced. Sample **4**, after one hour of maceration at 60°C showed a significant increase of the D_H and the PDI was also slightly reduced.

Table 2: Extremulsion D_H and PDI (DLS data analyzed by the technique of cumulants) with different pre-treatment steps

Sample	Pre-treatment	Temperature (°C)	D_H (nm)	PDI
1	without		113.6 ± 5.6 ^b	0.26 ^a
2	HSH (3 min)	Ice bath	84.8 ± 2.4 ^c	0.25 ^a
3	US bath (5 min)	40	112.5 ± 6.0 ^b	0.24 ^b
4	Maceration (1h)	60	121.0 ± 4.1 ^a	0.23 ^b

Different letters in the same row indicate a significant difference at $p < 0.05$ (n=3)

Constant parameters are $m_{\text{Curcuma longa}}$ (100 mg), $m_{\text{Tributyrin}}$ (85 mg), $m_{\text{Medium chain triglycerides}}$ (15 mg), water volume (2 mL), $m_{\text{TPGS 1000}}$ (60 mg), centrifugation speed (1 100 G), centrifugation time (1 min), amplitude (60 %), duty cycle (11.94 %) and sonication time (120 s) (see table 1).

The influence of a dispersing pre-treatment step on the recovery rate is shown in Figure 2. Considering the standard deviations, the addition of a dispersion step to the US-assisted extraction did not lead to a significant increase in the recovery rate with low impact on droplet size. Not only a pre-treatment step may involve a loss of curcumin from a device to another, but it is also time and energy consuming. Although sample **2** exhibits improved recovery rate and decreased D_H , HSH requires a threefold minimal extracting volume compared to the use of US tip alone (control condition), thus involving more surfactant solution and increased processing cost. None of the three pre-treatment techniques led to a significant improvement compared to the proof of concept, which is a one-pot process. As a consequence, this study has not been further developed and the addition of a pre-treatment step wasn't retained for the rest of the study.

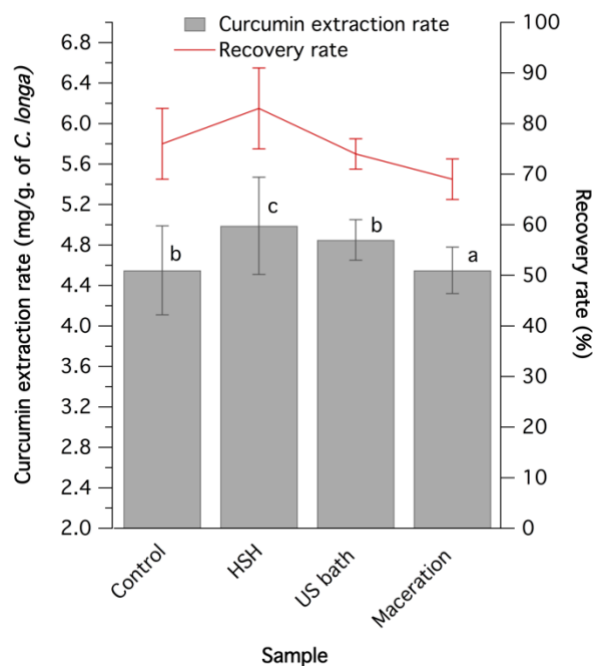
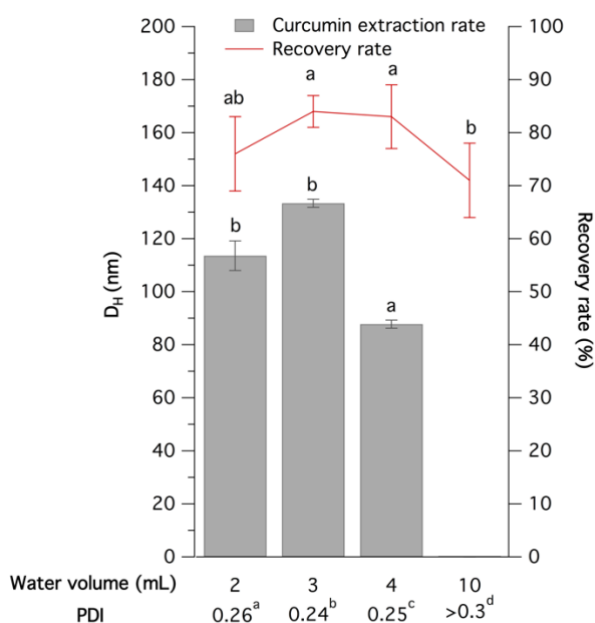


Figure 2: Effect of different pre-treatment steps on the curcumin extraction rate and the recovery rate (calculation details in the section “curcumin quantification”)

Optimization of the water volume

For the whole study, the proportion of surfactant *versus* dispersed phase was kept constant and equal to 60 mg of TPGS 1000 for 100 mg of TB/ C₈-C₁₀ mixture, *i.e.* a ratio of 3/5 w/w. The water volume optimization was carried out as presented in Figure 3. The evolution of curcumin recovery rate and droplet D_H (average size assessed by DLS) were followed for variable total water volumes ranging from 2 to 10 mL. D_H of samples presenting a PDI superior to 0.3 were not included in the graph. Indeed, PDI is a dimensionless measure of the width of the size distribution calculated by the DLS instrument. Samples were considered monodisperse when PDI was below 0.2 while PDI value superior to 0.3 traduce a multimodal distribution (Stetefeld et al., 2016). Size distribution curve was reported in Supporting Information (Figure S1). Addition of water in the system up to 3 mL led to a slightly increase in recovery rate with no significant change in D_H and PDI values. Experiment with 4 mL of water led to a significant size reduction (loss of 25.8 nm in diameter) while maintaining the recovery rate at its highest value around 83%. Finally, increasing the water volume up to 10 mL led to a drastic increase of the nanoemulsion polydispersity (D_H was not relevant as PDI>0.3) and reduction of the curcumin recovery rate. The latter drop in recovery rate can probably be ascribed to a degradation of curcumin due to enhanced energy of cavitation delivered in the

middle which viscosity declines with water addition. Moreover, the water/surfactant ratio reached a limit where surfactant concentration was probably not sufficient to form oil droplets with a control of the size. This screening shows that the lowest D_H and highest recovery rate were obtained for an optimal water volume of 4 mL (corresponding to a TPGS 1000 concentration of 15 g/L), so this volume was set for the rest of the study.



Constant parameters are $m_{Curcuma\ longa}$ (100 mg), $m_{Tributyrin}$ (85 mg), $m_{Medium\ chain\ triglycerides}$ (15 mg), $m_{TPGS\ 1000}$ (60 mg), centrifugation speed (1 100 G), centrifugation time (1 min), amplitude (60 %), duty cycle (11.94 %), sonication time (120 s) and without pre-treatment (see table 1).

Figure 3: Effect of water volume on the D_H and recovery rate

Optimization of the raw material ratio and post-treatment conditions

In this new extraction process, the raw material amount is directly correlated with the applied post-extraction treatment. The more the quantity of raw material, the higher the speed or time of centrifugation will have to be to ensure minimal remaining solid particles and nanoemulsion polydispersity. Thus, the post-processing parameters were optimized in parallel with the quantity of raw material. The post-treatment consists of the removal of matrix residues after US extraction through a centrifugation step. Poor elimination of matrix material can impact curcumin quantification and emulsion dispersity. The extraction rate may indeed be over-expressed because of a second extraction occurring during HPLC sample preparation.

For this study, we first investigated the impact of a further post-treatment on the droplet

size and dispersity compared to previous conditions (a). The centrifugation speed and then its duration were increased and applied on an extremulsion with 400 mg of raw material. The centrifugation speed was increased from 1 100 G to 10 000 G for centrifugation times ranging from 1 to 5 minutes. For each experimental condition extremulsions were analysed by DLS to assess the D_H and PDI and by HPLC for the curcumin recovery rate (Table 3). In parallel, as DLS is not the technique of choice for detection of large particles, the removal of residual matrix particles was monitored by laser diffraction using a Mastersizer 2000 granulometer (Figures 4A, 4B and 4C). With the latter particle size analyzer, the average particle size was calculated according to the Mie Theory and the span was used to express the width of distributions. In other words, a small span value indicates a narrow particle size distribution.

Table 3: Effect of the time and speed of centrifugation on the curcumin recovery rate (assessed by HPLC); D_H and PDI index (both assessed by DLS); $D[3,2]$ and SPAN (both assessed by laser diffraction) of extremulsions

Centrifugation speed (G)	Centrifugation time (min)	DLS		Laser diffraction analyzer		Recovery rate (%)
		PDI	D_H (nm)	span	$D[3,2]$ (nm)	
1 100 (a)	1	> 0.3		4.805	-	63 ± 6
(a) + 5 000	1	0.24	89.5 ± 5.0	2.847	-	63 ± 1
(a) + 10 000	1	0.22	92.5 ± 10.5	1.718	-	63 ± 2
(a) + 10 000	5	0.18	91.5 ± 8.5	1.349	79	63 ± 6

Constant parameters are $m_{Curcuma\ longa}$ (400 mg), $m_{Tributyrin}$ (85 mg), $m_{Medium\ chain\ triglycerides}$ (15 mg), water volume (4 mL), $m_{TPGS\ 1000}$ (60 mg), amplitude (60 %), duty cycle (11.94 %), sonication time (120 s) and without pre-treatment (see table 1).

Results of DLS analysis presented in Table 3 indicate that increasing the centrifugation speed from 1 100 G to 10 000 G drastically decreases the PDI and has respectively either small or no effect on the D_H and curcumin recovery rate. Figures 4A, 4B and 4C present the distribution in particle size, assessed by laser diffraction, for centrifugation speeds of 1 100 G, 5 000 G and 10 000 G respectively. Clearly, this analysis by particle tracking shows that the centrifugation step was not optimized for this amount of raw material. Although the presence of droplets of around 100 nm was confirmed (Figure 4), micron-sized particles remaining from matrix material were also observed. The span showed the decrease in dispersity with the increase in centrifugation speed and time (Table 3). Increasing the speed of centrifugation from 1 100 G

to 10 000 G allowed to significantly decrease these residual particles affording a bimodal distribution at 10 000 G. Then, for a given centrifugation speed (10 000 G), the centrifugation time was increased from 1 to 5 minutes. As indicated in Table 3, increasing the centrifugation time allows to decrease the PDI with no change in the D_H and curcumin recovery rate. Moreover, the granulometer analysis presented in Figure 4D, indicates that increasing the centrifugation time to 5 minutes allowed to eliminate the second population at around $1\mu\text{m}$.

Applying this optimized post-treatment parameter (centrifugation at 10 000 G for 5 minutes) while keeping constant the water volume (4 mL) and surfactant/dispersed phase ratio (3/5 w/w), the influence of growing raw material amounts in the medium was investigated. As shown in Table 4, increasing the *Curcuma longa* quantities slightly increased the D_H from 77.5 nm to 99.0 nm associated to a drastic reduction of the extraction recovery rate above 500 mg of matrix. This is accompanied by a substantial fall in the total amount of extracted curcumin which reaches a minimal value of 1.38 mg starting from 600 mg of matrix in 4 mL of medium. One possible explanation is that when the matrix/extracting mixture ratio becomes too high, the medium becomes too charged in matrix powder and the delivered ultrasonic intensity is insufficient. This is in good agreement with the importance of diluting extremulsions as already described for the optimization of the water volume. A second interpretation could be that, although the temperature of the medium is balanced with an ice bath, it can increase with the addition of *Curcuma longa* and lead to a degradation of curcumin. The PDI decreased to 0.18 by increasing the raw material amount until 400 mg, then it significantly enhanced for further addition of raw material over 500 mg. The best raw material/extracting medium ratio was achieved for 400 mg of matrix as it afforded monodisperse nanoemulsions ($\text{PDI} < 0.2$) with droplet D_H below 100 nm and acceptable recovery rate ($63 \pm 6\%$). The greater the deviation from this determined ratio, the lower the curcumin recovery. In this study the main objective was to obtain stable extremulsions over time the lowest PDI was therefore prioritized over the highest recovery rate. As a consequence, 400 mg of raw material and 5 minutes of centrifugation at 10 000 G as post-treatment were fixed for the rest of the study.

Table 4: Effect of the raw material quantity on the curcumin recovery rate (HPLC data), D_H and polydispersity index (DLS data) of the extremulsion

$m_{C. longa}$ (mg)	Pdl	D_H (nm)	Recovery rate (%)	$m_{curcumin}$ (mg)
100	0.22 ^b	77.5 ± 1.3 ^e	98 ± 2 ^a	0.67
200	0.20 ^c	87.3 ± 16.5 ^{cd}	83 ± 8 ^b	1.09
300	0.20 ^c	86.1 ± 7.7 ^d	79 ± 4 ^b	1.56
400	0.18 ^d	91.5 ± 8.5 ^{bc}	63 ± 6 ^c	1.62
500	0.18 ^{cd}	95.0 ± 7.3 ^{ab}	55 ± 3 ^d	1.80
600	0.25 ^a	99.0 ± 1.6 ^b	35 ± 5 ^e	1.38

Different letters in the same row indicate a significant difference at $p < 0.05$ (n=3)

Constant parameters are $m_{Tributyrin}$ (85 mg), $m_{Medium\ chain\ triglycerides}$ (15 mg), water volume (4 mL), $m_{TPGS\ 1000}$ (60 mg), centrifugation speed (1 100 G then 10 000 G), centrifugation time (1 then 5 min), amplitude (60 %), duty cycle (11.94 %), sonication time (120 s) and without pre-treatment (see table 1).

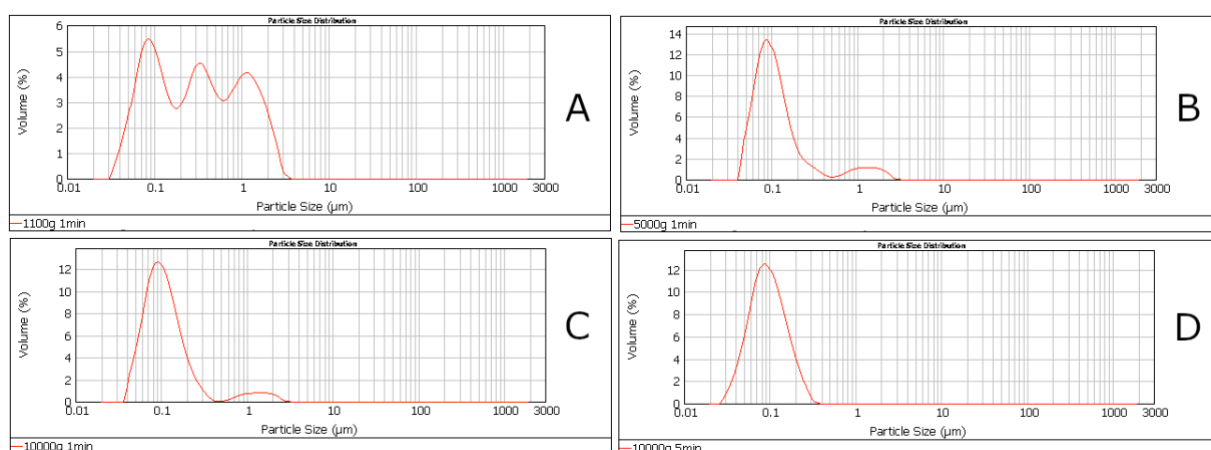


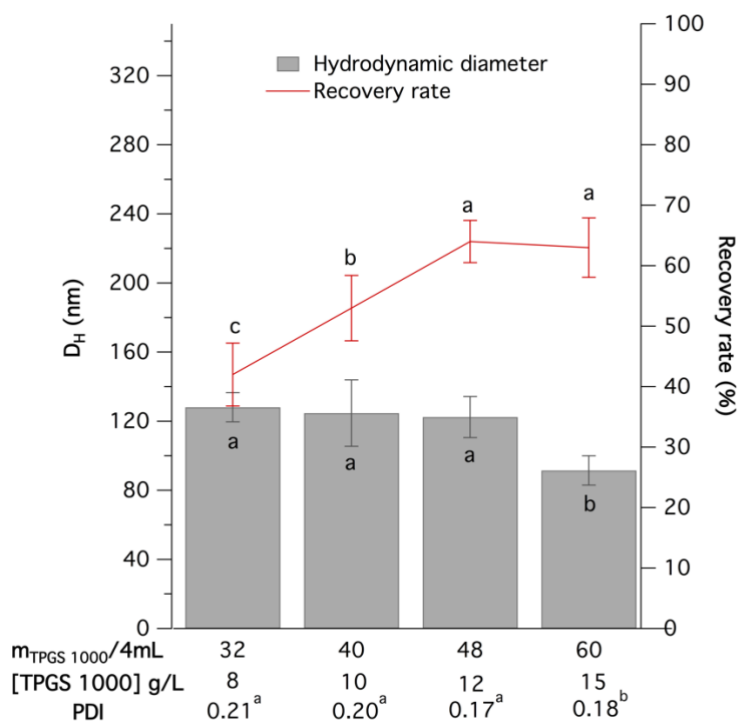
Figure 4: Particle size distribution of extremulsion at different post-treatments assessed using a Mastersizer 2000 laser diffraction particle size analyser (A: 1 100 G 1 min; B: 5 000 G 1 min; C: 10 000 G 1 min; D: 10 000 G 5min)

Influence of the surfactant concentration

In nanoemulsions, final droplet size is the result of an equilibrium between droplet disruption and re-coalescence. Upon size reduction, newly formed droplets tend to re-coalesce as they are thermodynamically unstable and due to incomplete surfactant-covering of fresh interface. Surfactants are able to absorb onto the created interface thus whilst

lowering the interfacial tension to stabilize the newly formed droplets. According to this so-called “Gibbs-Marangoni effect”, if an excess of surfactant is employed final droplet size is only dictated by droplet disruption rate thus ensuring the obtention of a fine emulsion (Singh et al., 2017).

In the present study, the surfactant amount in 4 mL of extracting medium was varied in the range from 32 to 60 mg (*i.e.* from 8 g/L to 15 g/L) at fixed dispersed phase amount of 100 mg. As shown in Figure 5, increasing the surfactant concentration from 8 g/L to 15 g/L resulted in droplet size from 128.1 nm to 91.5 nm. In addition, decrease in the PDI from 0.21 to 0.18 was observed which indicates that extremulsion prepared beyond the optimum surfactant fraction (15 g/L) were less prone to Ostwald ripening. The curcumin recovery rate increased proportionally to the surfactant concentration to reach a threshold of 63 % for 12 g/L. Although a droplet size reduction (from 122.4 nm to 91.5 nm) was achieved with growing surfactant concentrations from 12 g/L to 15 g/L, the curcumin recovery rate remained unchanged and even initiated a slight decrease. As a consequence, a further increase in surfactant fraction was not explored over 15 g/L as it might be detrimental for both health and cost concern. This result is somehow surprising, as even though the oil volume fraction remains unchanged, the addition of TPGS 1000 results in an increase in the number of small droplets in solution thus increasing the oil/water interface for the same oil volume. Above a certain concentration, addition of TPGS favours the enrichment of the medium in TPGS micelles themselves prone to solubilise curcumin in their hydrophobic core. The droplet D_H and PDI being respectively below 100 nm and 0.2, a TPGS 1000 concentration of 15 g/L was used in the subsequent study. The composition of extremulsions having been optimized, the rest of the study focused on the optimization of US parameters.



Constant parameters are $m_{Curcuma\ longa}$ (400 mg), $m_{Tributyrin}$ (85 mg), $m_{Medium\ chain\ triglycerides}$ (15 mg), water volume (4 mL), centrifugation speed (1 100 G then 10 000 G), centrifugation time (1 then 5 min), amplitude (60 %), duty cycle (11.94 %), sonication time (120 s) and without pre-treatment (see table 1).

Figure 5: Influence of the surfactant fraction of extremulsions with a water volume of 4 mL on the D_H and the curcumin recovery rate

Optimization of US parameters

Selection of adequate conditions of US parameters is necessary to optimize the droplet size distribution and to avoid undesirable degradation of final extracts.

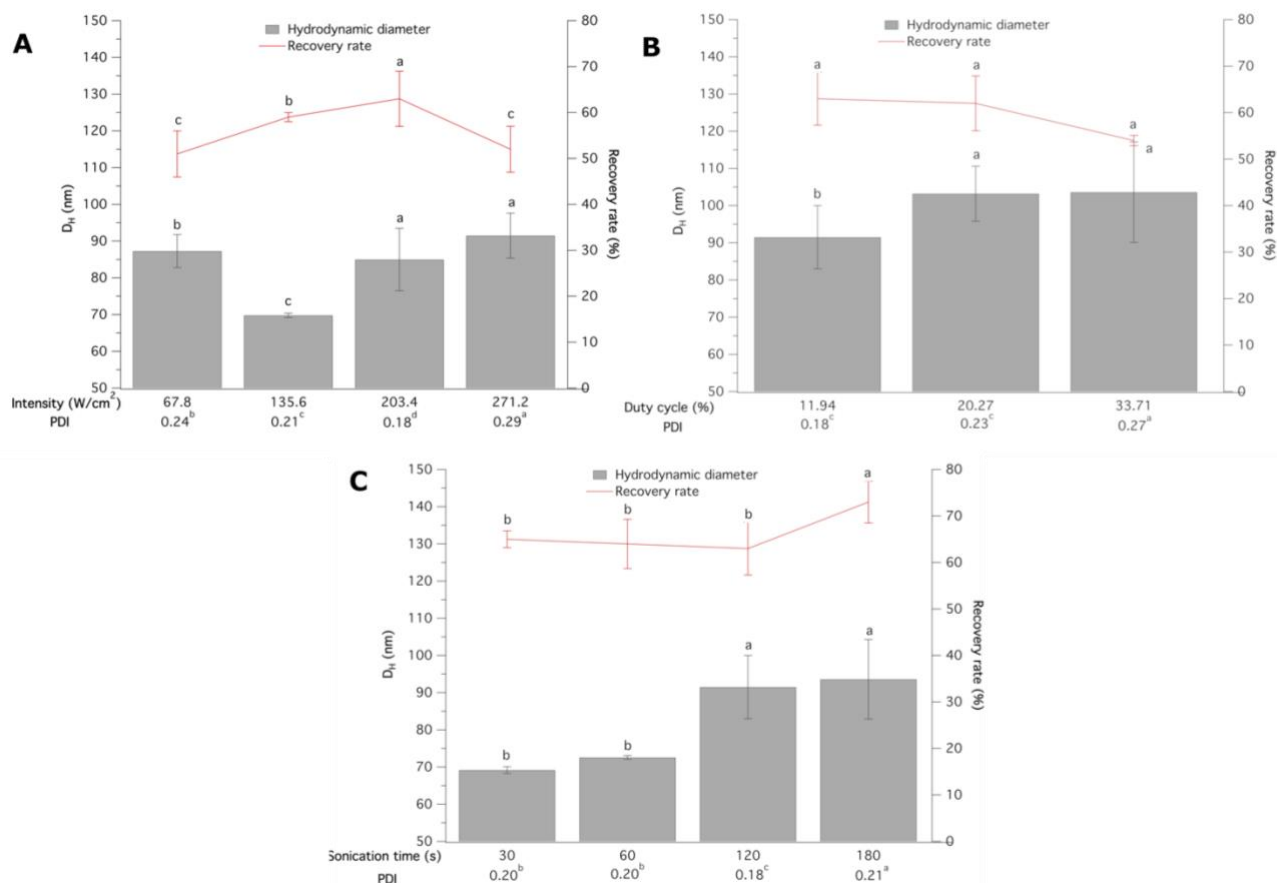
Effect of acoustic intensity

Ultrasonic input power is proportional to the acoustic intensity. Acoustic intensity is a more precise parameter as defined by the input power applied on the surface of the sonotrode. So, to analyze the effect of ultrasonic power on extremulsions, the acoustic intensity was tested at 67.8, 135.6, 203.4 and 271.2 W/cm². As indicated in Figure 6A, the minimum D_H was obtained at 135.6 W/cm² and was around 69.8 nm compared to 87.3 nm at 67.8 W/cm² and

91.5 nm at 203.4 and 271.2 W/cm². A similar trend, consecutive to droplets coalescence under increased shear rates delivered in the medium, has already been reported as “over-processing” effect by other groups. (Kentish et al., 2008) Finally, the best compromise between droplet size distribution and recovery rate was achieved applying 203.4 W/cm² of acoustic intensity. A monodisperse distribution in droplet size was obtained with 203.4 W/cm² of acoustic intensity, associated to droplet D_H of 92 nm. Figure 6A also shows that the acoustic intensity played an important role in curcumin extraction. The recovery rate was first enhanced with the increase of acoustic intensity, reaching a maximum at 203.4 W/cm² and decreasing at 271.2 W/cm². The cavitation development depends on the acoustic intensity. Higher acoustic intensity will enhance the agitation and the level of cavitation. Cavitation induces plant permeability developing cracks in the cell wall which facilitated extracting medium entrance and solubilization of the extracts (Chemat et al., 2017). However, above a certain acoustic intensity, there is a waste of ultrasonic energy, because no increase in permeability can be observed as a result of a too high cavitation level in the medium. Indeed, cavitation provides microbubbles that reduce US propagation in the medium and cell permeability. The acoustic intensity of 203.4 W/cm², attributed to the highest extraction yield and the narrowest size distribution of droplets, was selected and the effect of the duty cycle was then investigated.

Effect of duty cycle (DC)

The effect of DC at 11.94%, 20.27% and 33.71% on the D_H and curcumin recovery rate of extremulsions was investigated. The pulsed mode has been favored over the continuous mode since it causes less technical damage (probe erosion) and generates less heat, which can be damaging to thermo-sensitive bioactive compounds (Vilkhu et al., 2008). As shown in Figure 6B, DC increase showed a negative effect on the D_H and no significant effect on the curcumin recovery rate. Therefore, for the rest of the study the DC was kept at 11.94% as it assessed the lowest D_H and the lowest energy consumption. Our results are although in contradiction with those obtained by Sun *et al.* and Shahavi *et al.* who, increasing the DC, observed an increase in extraction yield and a decrease in droplet size respectively (Shahavi et al., 2015; Sun et al., 2011).



Constant parameters are $m_{Curcuma\ longa}$ (400 mg), $m_{Tributyrin}$ (85 mg), $m_{Medium\ chain\ triglycerides}$ (15 mg), water volume (4 mL), $m_{TPGS\ 1000}$ (60 mg), centrifugation speed (1 100 G then 10 000 G), centrifugation time (1 then 5 min) and without pre-treatment (see table 1).

Figure 6: Effect of acoustic intensity (A), duty cycle (B) and sonication time (C) on the D_H and the curcumin recovery rate

Effect of sonication time

The sonication time corresponds to the effective sonication duration throughout extremulsions are submitted to the US field. So, the sonication time has to be carefully optimized, since exposure to ultrasonic irradiations may damage the quality of extracts. As indicated in Figure 6C, increasing the sonication time from 30 to 180 seconds induced an increase in the D_H up to 93.6 nm and led to an increase in the recovery rate up to 73 % for 180 seconds. The threshold wasn't reached in this experiment. The lowest PDI was obtained with 120 seconds of sonication exposure. A further increase in sonication time above 180 seconds could enhance the curcumin recovery rate but previous works reported a possible cavitation-induced degradation of compounds over a longer exposure time (Rouhani et al., 2009). This increase in sonication time could also be related with a further increase in dispersity as

observed from 120 to 180 seconds. Moreover, our goals were to keep a short extraction process and to obtain droplets below 100 nm with an acceptable polydispersity ($PDI < 0.2$). As 120 seconds of sonication time was sufficient to meet these objectives, this condition was retained.

Conclusions

An alternative method for the extraction of curcumin from *Curcuma longa* has been investigated. The obtained crude extract yields were compared with Soxhlet extraction in order to select the best operation parameters. The objective of this study was to optimize the emulsification and extraction parameters in order to obtain a formulation with a recovery rate as close as possible to 100%, a droplet D_H of approximately 100 nm and a PDI of less than 0.2. Compared to the previous study (Dall'armellina et al., 2021), water volume, matrix ratio and post-treatment conditions have been optimized. On the basis of economic considerations, the optimal extremulsion composition appeared to be a concentration of surfactant of 15 g/L, a water volume of 4 mL and 400 mg of *Curcuma longa*. In addition, this study determined the optimal US parameters to formulate and extract curcumin from *Curcuma longa* (ultrasonic amplitude of 60%, duty cycle of 11,96%, US time of 120 sec). The variation of these parameters synergistically influences the extraction efficiency and the characteristics of the emulsion. An extremulsion containing 63% of curcumin with a D_H of 92 nm and a PDI of 0.18 was obtained. However, extremulsions are nanoemulsions and as such they are long term unstable systems, difficult to store and transport, and because of their high-water activity, they are also vulnerable to microbial attack (Amin et al., 2014). Thus, a dried step prior to scale-up development and application in food products could be a strategy to retard curcumin degradation and to facilitate their storage and transport. In the coming years, this technology could provide a new green approach to extract specific compounds to be used as constituents in the manufacture of functional foods or as nutraceuticals. Investigating the impact of this new dry or liquid curcumin formulation on the curcumin bio-accessibility is the subject of a future study.

Conflicts of interest

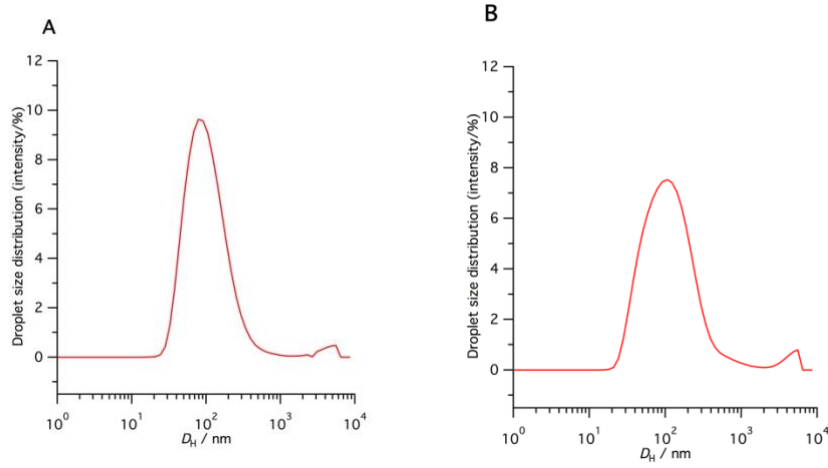
There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Region Sud and Lyofal company (Salon de Provence) for funding the PhD thesis grant of A. Dall'armellina. This study was conducted with the financial support of the European Regional Development Fund, the French Government, the Sud Provence-Alpes-Côte d'Azur Region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon.

Supporting Information

Figure S1: Size distribution of extremulsion with a water volume of 4mL (A) of 10 mL (B)



REFERENCES

- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions* 174, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>
- Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J.-H., 2017. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16, 295–315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>
- Amin, M.C.I.M., Abadi, A.G., Katas, H., 2014. Purification, characterization and comparative studies of spray-dried bacterial cellulose microparticles. *Carbohydrate Polymers* 99, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.041>
- Anand, P., Thomas, S.G., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Sung, B., Tharakan, S.T., Misra, K., Priyadarsini, I.K., Rajasekharan, K.N., Aggarwal, B.B., 2008. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochemical Pharmacology, Special Issue: Apoptosis World 2008* 76, 1590–1611. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.08.008>
- Chakravarty, A.K., Chatterjee, S.N., Yasmin, H., Mazumder, T., 2009. Comparison of efficacy of turmeric and commercial curcumin in immunological functions and gene regulation. *IJP - International Journal of Pharmacology* 5, 333–345.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Dall'armellina, A., Letan, M., Duval, C., Contino-Pépin, C., 2021. One-pot solvent-free extraction and formulation of lipophilic natural products: from curcuma to dried formulations of curcumin. *Green Chemistry* 23, 8891–8900. <https://doi.org/10.1039/D1GC00587A>
- Ezhilarasi, P.N., Karthik, P., Chhanwal, N., Anandharamakrishnan, C., 2013. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food Bioprocess Technol* 6, 628–647. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Ishihara, M., Kadoma, Y., 2004. Cytotoxicity, ROS-generation Activity and Radical-scavenging Activity of Curcumin and Related Compounds. *Anticancer Res* 24, 563–570.

Goel, A., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B., 2008. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* 75, 787–809. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.08.016>

Gupta, S.C., Patchva, S., Koh, W., Aggarwal, B.B., 2012. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 39, 283–299. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05648.x>

Kentish, S., Wooster, T.J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., Simons, L., 2008. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, Food Innovation: Emerging Science, Technologies and Applications (FIESTA) Conference 9*, 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.005>

Leung, M.H.M., Colangelo, H., Kee, T.W., 2008. Encapsulation of Curcumin in Cationic Micelles Suppresses Alkaline Hydrolysis. *Langmuir* 24, 5672–5675. <https://doi.org/10.1021/la800780w>

Ojha, K.S., Aznar, R., O'Donnell, C., Tiwari, B.K., 2020. Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 122, 115663. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115663>

Preetz, C., Hauser, A., Hause, G., Kramer, A., Mäder, K., 2010. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 39, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.11.009>

RAČKOVÁ, L., KOŠŤÁLOVÁ, D., Bezakova, L., Fialova, S., Bauerova, K., Toth, J., Štefek, M., Vanko, M., Holkova, I., Oblosinsky, M., 2009. Comparative study of two natural antioxidants, curcumin and *Curcuma longa* extract. *Journal of Food & Nutrition Research* 48, 148–152.

Rouhani, S., Alizadeh, N., Salimi, S., Haji-Ghasemi, T., 2009. Ultrasonic Assisted Extraction of Natural Pigments from Rhizomes of 11.

Sahne, F., Mohammadi, M., Najafpour, G.D., Moghadamnia, A.A., 2017. Enzyme-assisted ionic liquid extraction of bioactive compound from turmeric (*Curcuma longa* L.): Isolation, purification and analysis of curcumin. *Industrial Crops and Products* 95, 686–694. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.037>

Selvam, C., Jachak, S.M., Thilagavathi, R., Chakraborti, Asit.K., 2005. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*

Letters 15, 1793–1797. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.02.039>

Shahavi, M.H., Hosseini, M., Jahanshahi, M., Meyer, R.L., Darzi, G.N., 2015. Evaluation of critical parameters for preparation of stable clove oil nanoemulsion. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.08.024>

Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer, Cancer Chemoprevention - An Update on a Novel and Exciting Field of Oncology* 41, 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>

Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K., Chourasia, M.K., 2017. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 252, 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>

Stetefeld, J., McKenna, S.A., Patel, T.R., 2016. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev* 8, 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>

Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Yu, D., 2011. Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.05.014>

Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, Green Extraction Techniques* 71, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, Food Innovation: Emerging Science, Technologies and Applications (FIESTA) Conference* 9, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>

Zhang, R., McClements, D.J., 2016. Enhancing nutraceutical bioavailability by controlling the composition and structure of gastrointestinal contents: Emulsion-based delivery and excipient systems. *Food Structure* 10, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2016.07.006>

Chapitre IV : Étude du séchage des extrémulsions par lyophilisation

Les premiers objectifs de thèse ayant été atteints avec l'obtention d'extrémulsions monodisperses ayant un diamètre de gouttelettes aux alentours de 100 nm et un taux de recouvrement en curcumine optimisé, l'étude s'est poursuivie sur l'impact des paramètres du cycle de lyophilisation sur la stabilité des extrémulsions. La lyophilisation a été réalisée à l'aide d'un lyophilisateur de laboratoire de taille pilote en collaboration et au sein des locaux de l'entreprise Lyofal à Salon de Provence.

Nous avons commencé cette étude en comparant l'impact des vitesses de congélation et de réhydratation ainsi que celui des techniques de redispersion sur l'aspect des lyophilisats et sur les propriétés physico-chimiques des extrémulsions réhydratées. Cette étude a été réalisée sur des extrémulsions diluées avec des solutions de cryoprotecteurs de nature différente (tréhalose ou maltodextrine) à deux concentrations différentes (1% ou 5%). Cette première étude a permis de déterminer qu'une réhydratation rapide et une redispersion des extrémulsions à l'aide d'un vortex en présence de 5% de tréhalose étaient les conditions optimales pour aboutir à un PDI inférieur à 0,3. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas permis de mettre en avant une vitesse de congélation par rapport à l'autre. La seconde étude visait à étudier l'impact de la dilution des extrémulsions avant lyophilisation, de l'augmentation de la quantité de cryoprotecteur et de nouveau la vitesse de congélation. Les résultats observés ont permis de valider la concentration en cryoprotecteur de 5%, un facteur de dilution de deux et de privilégier la congélation rapide à la congélation lente.

Ce chapitre sera soumis très prochainement à International Journal of Pharmaceutics.

Effect of freeze-drying process and conditions on the stability of curcumin-loaded nanoemulsions

Alice Dall'armellina^a, Mathias Letan^b, Jean-Baptiste Mazzitelli^a and Christiane Contino-Pépin^{*a}

^a*Equipe Chimie Bioorganique et Systèmes Amphiphiles, Institut des Biomolécules Max Mousseron, UMR 5247, Avignon Université, 84911 Avignon, France.*

^b*Société Lyofal (Synerlab group), Salon de Provence, France.*

* *Corresponding author: christine.pepin@univ-avignon.fr*

Abstract

In the present work, the freeze-drying of an original formulation called extremulsion was investigated. Extremulsion is a facile and cost-effective process using ultrasound to extract and formulate bioactive substances from vegetal sources in nanodroplets stabilized by a GRAS-listed surfactant. By varying several parameters influencing the performance of the freeze-drying process, the re-dispersibility and physico-chemical properties of dry extremulsions were investigated as well as their long-term stability.

Keywords Freeze-drying, nanoemulsions, freezing speed, cryoprotectant, curcumin

Introduction

Plant-derived natural bioactive molecules have gained increasing attention due to their antioxidant and therapeutic potential for the prevention of cardiovascular disorders and cancer (Suleria et al., 2019). Their extraction and encapsulation in different delivery systems were both the main objective of a lot of research. On the one hand, there is a growing interest on finding new extraction techniques in order to overcome the limits of conventional methods such as application of high temperatures for a prolonged time affecting heat sensitive molecules. Alternative techniques using ultrasound, microwave, high pressure, pulsed electric field, supercritical fluid, and others are more welcoming since they promote solvent savings, low working temperatures and short duration (Azmir et al., 2013). On the other hand, food, pharmaceutical, agrochemical researchers and industries work on delivery systems able to protect, encapsulate and deliver natural bioactive molecules. Colloidal systems, and more particularly nanoemulsions, are good delivery candidates as they involve small particle size, good stability and may provide prolonged blood circulation and good biodisponibility. The most common form of nanoemulsions consists in a multitude of droplets of phase A dispersed in a phase B, A and B being two immiscible phases. The term water in oil (W/O) nanoemulsion is used if the continuous phase is an oil phase, and oil-in-water (O/W) nanoemulsion when the continuous phase is a water phase. Nanoemulsions may act as reservoirs for water insoluble drugs while improving their bioavailability for therapeutic or nutraceutic applications (McClements et al., 2007). However, these systems are prone to microbial growth, drug leakage, and hydrolysis of their components, like phospholipids and triglycerides that may constitute both shell and core of droplets, due to the presence of a large amount of water in the system. In order to avoid these drawbacks and improve the therapeutic potential of nanoemulsions, dehydration by freeze-drying appears to be an interesting approach. During freeze-drying most of the water of a sample is converted into ice that sublimates at low pressure resulting in a crystalline or amorphous solid. This process allows to obtain dry nanoemulsions with a long term stability and easier transport and storage (Joseph et al., 2019).

In order to combine these technical advances, an innovative green extraction process has

been recently developed by our team and called “extremulsion”, for “extract-emulsion” (ref submitted paper). This technique is the combination of the ultrasound-based extraction of bioactive compounds from a natural source along with their encapsulation in an oil-in-water nanoemulsion. Organic extracting solvents are herein replaced by a medium composed of oils, a surfactant derived from Vitamin E (TPGS) and water. After removal of the matrix residue, a bioactive substance-enriched extract is obtained under the form of a nanoemulsion. The second step of the process consists in the extremulsion freeze-drying allowing a final product under the form of a dry powder easy to store and ready to use.

This procedure was applied to the extraction and encapsulation of curcumin from *Curcuma longa*. As the principal curcuminoid of turmeric, curcumin presents a large amount of health benefits such as anti-tumor, anti-inflammatory, anticarcinogenic, and antioxidant activities (Selvam et al., 2005; Sharma et al., 2005; Tiwari, 2015). Despite having many health benefits, curcumin is a lipophilic molecule with a poor distribution in the body and limited bioavailability. Recent studies where curcumin is encapsulated in colloidal delivery systems like lipid-based nanoemulsions were reported in the literature as an interesting avenue to overcome its poor distribution in the body and its rapid metabolization and excretion (Sari et al., 2015; Sharma et al., 2021; Sood et al., 2014).

In this study the stability of curcumin-loaded extremulsions during the freeze-drying process was studied. A freeze-drying cycle mainly consists of three steps: freezing, sublimation and then drying. First, the sample is cooled until it is completely solidified. If this step is carried out in the freeze-dryer, the temperature of the shelf is lowered. Then the sublimation step starts when the pressure is decreased to values below the vapour pressure of the ice and the temperature of the shelf is increased in order to compensate for the latent heat lost during the sublimation of ice. This stage ends when the product temperature becomes positive. The last step is the drying of the sample. The residual water will desorb through the pores of the open product as the ice crystals sublimate. These different stages are critical for extremulsions and can lead to the loss of their physico-chemical properties. In order to limit droplet destabilization during freeze-drying a cryoprotectant must be added to the formulation. Moreover, critical temperatures (glass transition and collapse temperatures) should be preliminary defined. Glass transition temperature (T_g') is the temperature at which an amorphous material changes from a viscous to a glassy state. In order to ensure complete solidification of the sample, freezing must be carried out at a lower temperature than the T_g'

of the same frozen and amorphous sample. The collapse temperature (T_c) is the maximum temperature the product is allowed to reach during sublimation. Freeze-dried products heated above their T_c during the freeze-drying step lose their macroscopic structure and collapse. So, it is important not to exceed these critical temperatures during the freeze-drying process in order to avoid structural disorganisation of the sample and to maintain its integrity.

Critical temperatures are dependent on the formulation composition; therefore, each critical temperature of each formulation has to be assessed. Several other parameters influencing the success of the freeze-drying process were investigated after the determination of critical temperatures: cryoprotectant nature and concentration, rehydration speed, reconstitution conditions, freezing speed, dilution of the extremulsion prior to lyophilization. The robustness of freeze-drying conditions on higher volumes and the long-term stability of freeze-dried extremulsions were then studied. The objectives of this work were to obtain 1) a conservation of the physico-chemical features of extremulsions after lyophilization (droplet size, size distribution and curcumin concentration) 2) lyophilizates with a homogeneous and non-compact appearance and a rapid reconstitution time 3) low residual humidity 4) long-term stability.

Material and methods

Chemicals

Curcumin standard (>99.5%), D- α -Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, Tributyrin (98%), acetonitrile (HPLC grade), acetone (99,8%) and trifluoroacetic acid, trehalose were purchased from Sigma-Aldrich and maltodextrine DE9 (Glucidex[®]) from Roquette. Labrafac CC was provided by Gattefosse (Saint-Priest, France).

Extremulsions preparation

Unless otherwise stated, 400 mg of *Curcuma longa* powder were brought into contact with 85 mg of tributyrin, 15 mg of Labrafac CC and 4 mL of TPGS 1000 at 15 g/L in water. Extremulsions were prepared using a high-power ultrasonic device (Bioblock Scientific

Vibracell 75043, 13-mm diameter sonotrode) with a titanium horn immersed in the solution. Pulsed ultrasound (15 US cycles, 8 sec on/59 sec off, duty cycle 11.94 %, total sonication time of 2 minutes) was applied at 20 kHz frequency using 60% maximum amplitude (450 W). The solution was cooled with an ice bath during the complete sonication process. After sonication, the ultrasonic probe was washed with milliQ water and the rinsing water was added to the emulsion. The resulting curcumin loaded emulsion was then centrifuged for 1 minute at 1100 G and the supernatant volume was centrifugated a second time for 5 minutes at 10 000 G. The final supernatant volume was adjusted to 5 mL with milliQ water in a volumetric flask. After preparation, all extremulsions were stored at 4°C in the dark.

Parent extremulsions characterization

Droplet size measurements

The droplet size distribution of extremulsions before and after freeze-drying was analysed by dynamic light scattering (DLS) using a Nano-S Nanosizer (Malvern Instrument). Samples, diluted by 10 in milliQ water, were placed in a 45 µL quartz tank and subjected to 10 measurements of 10 seconds each. The hydrodynamic diameter (D_H) was obtained by averaging the results of 10 measurements. Measurements were made at an angle of 173° using a laser with a wavelength of 633 nm. Results were reported as the average diameter D_H and polydispersity index (PDI). Each D_H and PDI presented in this study are the average of the D_H and PDI of triplicated assays.

Curcumin quantification

Curcumin concentration of extremulsions was analysed by HPLC and performed on an Alliance Waters system (e2695) with a 2998 photodiode array detector. Chromatographic separation was carried out with a Kinetex Biphenyl (100 Å, 4,6*100 mm, 2,6 µm) purchased from Phenomenex® (Torrance, United-States). A linear gradient of A (water containing 0.1% trifluoroacetic acid) and B (acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid) was used with an elution gradient as follows (v/v): 0 min, B 37%; 10 min, B 50%; 15min, B 100% maintained for 10 min. The detection wavelength was 420 nm. The injection volume was 5.0 µL. Data

acquisition were performed by using a Empower TM3 software. The method presented linearity over the range from 1 to 100 µg/mL ($R^2=0.9977$). The calibration curve was constructed by the dilution of curcumin standard (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germany) with acetonitrile to provide the desired concentrations (1.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0 and 100.0 µg/mL) followed by injection into the HPLC system. Samples were directly dissolved in acetonitrile and filtered through nylon membrane filter (0.2 µm).

Cryo-microscopy

The collapse temperature (T_c) was determined for the different formulations with a freeze-drying microscope (Olympus TH4-200,) equipped with a video camera and a computer to capture the collapse image. The equipment consists of a small freeze-drying chamber containing a temperature-controlled stage, a vacuum pump to ensure the evacuation and an optical window through which the drying sample can be observed by a microscope. Each extremulsion formulation (with 1% or 5% of trehalose or maltodextrin DE9) was frozen at -40°C with a freezing speed of 20°C/min then vacuum at 300 µbar was assessed. When 1 cm of sublimation front was visible, samples were heated until 0°C with a speed of 2°C/min. The collapse temperature was measured when a crack appeared between the sublimated part and the non-sublimated part.

DSC

A differential scanning calorimeter DSC 1 Star system (Mettler Toledo, Düsseldorf, Germany) was used to measure the glass transition temperature (T_g) of extremulsions. The instrument was calibrated with indium $\Delta H_{\text{fusion}} = 27.4 \text{ J/g}$, $T_m = 155.6 \text{ °C}$ for melting point and heat fusion. A heating speed of 5°C/min was applied throughout the analysis in the temperature range -60 °C to 20 °C.

Extremulsion freeze-drying

The freeze-drying of extremulsion samples was performed on an industrial scale freeze-dryer Lyovac GT4 (Usifroid, Maurepas, France). The apparatus is composed of three shelves with a

drying surface of 0.4 m², an external condenser with a capacity of 5 kg and different control instrumentations: three thermocouples (P100) to measure the product temperature and a single sensor (PT100) positioned at the fluid inlet in the first shelf to measure the temperature of shelves.

The freeze-drying procedure consisted in three successive steps: freezing, primary drying, and secondary drying. The freezing step was carried out using two freezing speeds: 0.18 °C/min and 44 °C/min to observe the influence of this speed on the stability of extremulsions. The shelf temperature was maintained at -40 °C for 90 min continuously to complete the freezing of extremulsions while decreasing the chamber pressure to 47 µbar. The temperature of the condenser was decreased at -50 °C, and then, the water vapor was evacuated through a vacuum pump until 100 µbar. The shelf temperature was increased at -34 °C for 120 min followed by a plateau of 10 h then it was increased at -10 °C for 5 h and maintained during 7 h. This increase of the temperature supplies the necessary heat for the sublimation of ice.

After all the ice has been removed, the product typically contains the water “dissolved” in the amorphous solute phase. This dissolved water, conventionally denoted as “unfrozen water,” was removed by desorption during the secondary drying step. So, the temperature of the shelf was increased until 20 °C and the pressure was decreased until 30 µbar for 5 h and maintained during 16 h. At the end of the cycle, the vials were closed under a partial vacuum (around 750 mbar), sealed with alu-caps and kept at 4 °C until analysis.

Cryoprotectants used in this study were trehalose and maltodextrin DE9 solubilised in water at different concentrations. 0.2 mL of extremulsion and 0.2 mL of cryoprotectant solution were filled into 2 mL freeze-drying vials (Fisher Bioblock Scientific, France) to have a final cryoprotectant solution of 1 or 5% w/v. Each freeze-drying condition was investigated in triplicates.

Rehydrated extremulsions

Redispersion of dry extremulsions in water

The powders were rehydrated rapidly or dropwise with the amount of distilled water required to restore the same composition as the parent extremulsion assuming that only

water was lost during the freeze-drying process. The rehydrated extremulsion were gently shaken by hand and then using a vortex until the samples became homogeneous. Some samples were then placed in an ultrasound bath for five minutes.

Droplet size measurement

The droplet size distribution of rehydrated extremulsions was measured using exactly the same protocols as for their parent solutions (section 2.2.1). We define S_f/S_i as the ratio between the droplet size of each extremulsion sample before and after freeze-drying. Provided oil leakage after the drying process is insignificant, the ratios are expected to be larger than unity if coalescence of droplets occurs during the drying process. The smaller these ratios (the closer to unity), the better the protection against coalescence.

Karl-Fischer titration

Residual moisture analysis was performed by coulometric Karl-Fischer titration (C30S, METTLER TOLEDO, Viroflay, France) with a headspace module. About 100 mg crushed lyophilized product was heated up to 100 °C in the headspace module. The principle of Karl-Fischer titration is to measure the oxidation of sulphur dioxide by diiodine in the presence of water. The evaporated water by dried air flow was transferred to the titration solvent (Hydranal Coulomat AG) composed of methanol and imidazol and residual moisture was assessed.

Results and discussion

Parent extremulsions

In the present work, extremulsions contain curcumin-loaded nanodroplets which oily phase is composed of a mixture of medium and short chain triglycerides stabilized in water by tocopherol polyethylene glycol succinate (TPGS 1000). TPGS is a GRAS (Generally Recognize As Safe) surfactant approved by FDA as a drug solubilizer in oral, parenteral, topical, nasal,

and rectal/vaginal therapies (Constantinides et al., 2006). In a previous work, parameters influencing the droplet size, polydispersity and extraction rate were investigated in detail (ref submitted paper). Starting from 400 mg of *Curcuma longa*, the optimal composition of extremulsions was previously settled to be 85 mg of tributyrin, 15 mg of a mix of triglycerides C₈-C₁₀ and 4 mL of an aqueous solution of TPGS 1000 at 15 g/L. This process allowed to extract 0.41 g/L of curcumin which corresponds to a curcumin recovery rate of 63 % compared to the Soxhlet extraction which is the traditional extraction technique. Translucent nanoemulsions with droplets of 92 ± 9 nm and a size distribution of 0.18 were obtained using an ultrasound process at an amplitude of 60 % for 2 minutes. Temperature increase was constrained by an ice bath. Thanks to its very small droplet size around 100 nm, this formulation presented a great stability over time. After seven months in the dark at 4°C, droplet size was 124 ± 9 nm with a PDI of 0.20. However, in an attempt to improve the shelf life and ease of storage of extremulsions and in particular to avoid any microbial growth for future food application, their stability to freeze-drying was explored. A preliminary study was done to determine critical temperatures (T_g' and T_c) using DSC and freeze-drying microscopy. Then, an investigation of the extremulsion stability over freeze-drying cycle in two steps was achieved with particular emphasis on the D_H and PDI.

Critical temperature assessments

Freezing step

Table 1: Experimental determination of collapse temperature (T_c) and glass transition temperature (T_g') of extremulsions containing maltodextrin or trehalose at 1 or 5%

Cryoprotectant	Concentration (%)	T_c^a (°C)	$T_g'^b$ (°C)
Trehalose	1	–	-32.90
Maltodextrin	1	–	-27.26
Trehalose	5	-27.9	-30.93
Maltodextrin	5	-24.4	-28.76

^a Determined by freeze-drying microscope

^b Determined by DSC

During the freezing step, ice crystals of pure water form and a phase separation occurs between ice and the cryo-concentrated solution. This viscous solution solidifies at T_g' *i.e.* the glass transition temperature of maximally cryo-concentrated solutions yielding an amorphous, crystalline or combined amorphous-crystalline phase. Cryoprotectants known to vitrify at T_g' may protect droplets against the mechanical stress of ice crystals formation and prevent their aggregation. The freezing step must be carried out below T_g' in order to ensure the total solidification of the product. Thermal analysis by DSC of extremulsions with two types of cryoprotectant, trehalose and maltodextrin DE9 at two different concentrations 1% and 5% resulted in different T_g' values.

As shown in Table 1, the lowest T_g' was found for the formulation containing 1% trehalose. Consequently, the set temperature of the primary drying was defined at -34°C , two degrees below the lowest T_g' , in order to compensate shelf temperature variations. For practical reasons the glass transition temperature of this extremulsion sample is suitable since it is not too low and therefore not too difficult to reach.

The preliminary study by DSC allowed to determine the solidification peak. The lowest freezing temperature was found for the sample containing 5% of trehalose and was of -25.69°C . Therefore, the freezing temperature was set at -40°C for all the samples.

Dehydration step

Freeze-dried formulations are likely to lose macroscopic structure and collapse during the dehydration step, as a consequence it is important to determine the collapse temperature (T_c) *i.e.* the maximum allowable product temperature during the primary drying. The T_c of extremulsions with two different cryoprotectants: trehalose and maltodextrin DE9 at two different concentrations: 1% and 5% were determined by freeze-drying microscope. This analysis revealed that formulations with 1% of trehalose and 1% of maltodextrin DE9 present T_c inferiors to those containing 5% of cryoprotectant. Collapse of formulations with 1% of cryoprotectant was too fast to note the corresponding temperature (Table 1). Collapse temperature of formulation containing 5% of trehalose was -27.9°C which is close to the collapse temperature of trehalose alone (-28°C).

Therefore, the critical temperatures determined during the preliminary study allowed the freeze-drying conditions for the products presented in section 2.4 to be established. The study

was carried out in two stages as shown in Figure 1. Conditions leading to rehydrated extremulsions with a PDI lower than 0.3 have been retained from the first screening to switch to the second one. Following experiments were carried out with 400 μ L of extremulsion (diluted or not) per vial of 2 mL. The volumetric ratio extremulsion:vial was of 1:5.

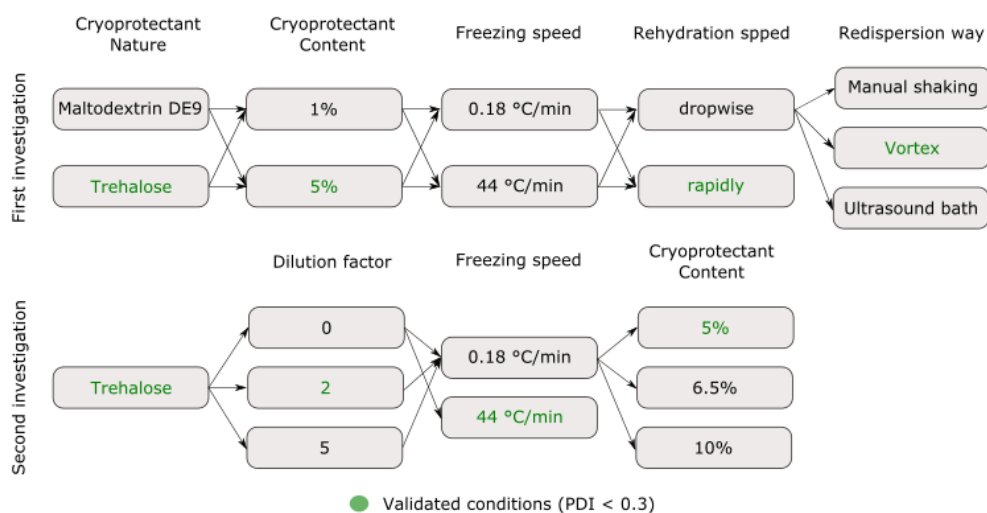


Figure 1: Screening of the freeze-drying cycle in two steps

Stability over freeze-drying cycle

Product temperature

During the first investigation, product temperatures of three samples were followed as shown in figure 2. For the screening of extremulsion stability during the freeze-drying cycle, two freezing speeds (0.18°C/min and 44°C/min) and two trehalose concentrations (1% and 5% w/v) were explored. As shown in Figure 2, for a trehalose concentration of 5% and a freezing speed of 44°C/min, the product mean temperature during the sublimation step was -35.3°C which is below the T_c (-27.9°C) previously assessed for extremulsions in such conditions. This result is consistent with the preservation of the sample integrity during the sublimation step. For a trehalose concentration of 1% with a freezing speed of 44°C/min and 0.18°C/min, the product mean temperature was respectively of -34,7 °C and -28,9 °C. Since the collapse temperature for extremulsions with 1% of trehalose could not be assessed during the microscopy study, appearance of resulting cakes allowed to deduct if samples exceeded their

collapse temperature during the sublimation step or not. Freeze-dried extremulsions with 1% of trehalose were not compacted and showed no sign of collapse whatever the freezing speed and sublimation mean temperature. As shown in Figure 2, sample 1 became dehydrated faster as its temperature increases faster than that of samples 2 and 3. Sample 1, which undergoes a slow freezing, probably forms bigger and fewer ice crystals than samples 2 and 3 which froze rapidly. During the primary drying step, the ice is sublimated from the surface of the sample to the bottom of the vial. In this way, the resulting vapour is removed by diffusion through the pores of the dry portion of the sample. As diffusivity is related to pore size, fast freezing, which forms smaller crystals and pores, leads to more difficult vapor transfer which increases the duration of the primary drying step.

It is admitted that for an optimized freeze-drying cycle the sample mean temperature remains below the shelf temperature during all the cycle which is not our case (Morais et al., 2016). In our conditions, the low ice deep at the top of the vials (5 mm) probably induced a fast primary drying followed by an increase of sample temperature beyond the shelf temperature in the second dehydration step. This study of the product temperature during the first investigation leads to the hypothesis that sample 3 will have the best physico-chemical characteristics after rehydration. In order to validate this hypothesis, the appearance of the different lyophilizates was inspected and the conservation of their physico-chemical properties after rehydration was studied as a function of the rehydration speed and the redispersion mode.

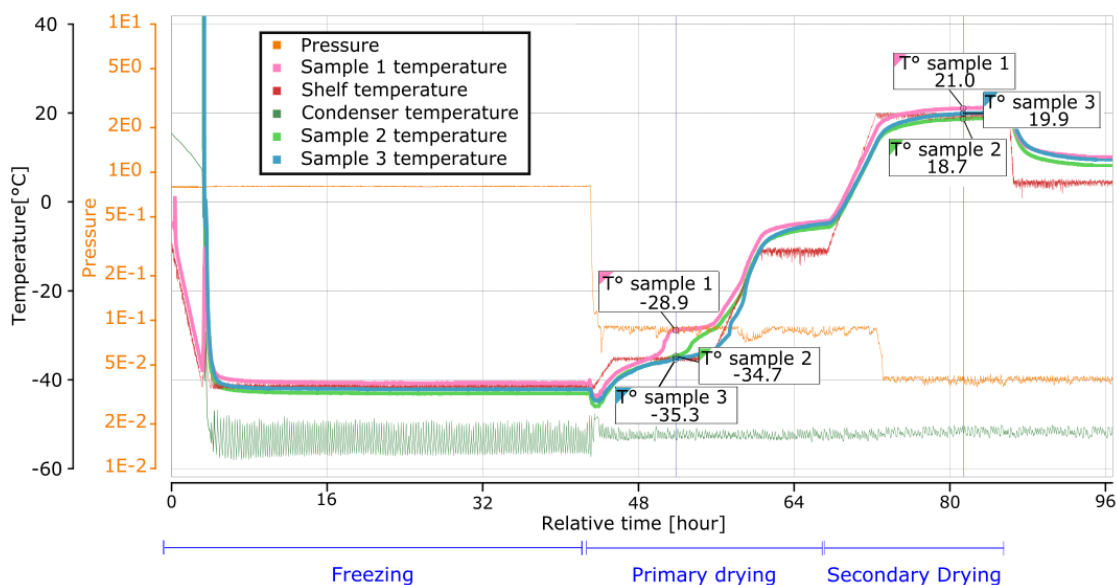


Figure 2: Freeze-drying cycle showing shelf, products and condenser temperatures (sample 1: extremulsion with 1% of trehalose and a freezing speed of 0.18°C/min, sample 2: extremulsion with 1% of trehalose and a freezing speed of 44°C/min, sample 3: extremulsion with 5% of trehalose and a freezing speed of 44°C/min)

Redispersion of dried extremulsion

Parent emulsions were freeze-dried following different conditions as described in section 2.4 and following the investigation in two steps presented in Figure 1. Each sample condition was triplicated. After freeze-drying, resulting dry extremulsions were first evaluated with regards to the appearance of lyophilizates and to the good achievement of both rehydration and redispersion steps. The addition of water to dry extremulsions was called rehydration while the return to their initial volume after rehydration was called redispersion. Cakes did not present any fusion or collapse sign. As shown in Figure 3A, cake was homogeneous, retain its initial volume, did not present wet part which could be the sign of phase separation during the process. We observed that samples submitted to a slow freezing of 0.18°C/min slightly bubbled during the rehydration which could be the sign of cracks in the cake (Figure 3B).

Freeze-dried products were all rehydrated with 400 μ L of deionised water. Rehydrated extremulsions were characterized right after redispersion in terms of droplet size and size distribution. During the first investigation, redispersion of powders was performed by either manual shaking, vortex agitation or with an ultrasound bath for five minutes with two

rehydration speeds: dropwise or rapidly (Figure 1). Compared to the parent extremulsions (*i.e.* solutions), freeze-dried samples rehydrated with the dropwise method were opaque (Figure 3C) and presented a significant increase in dispersity ($PDI > 0.3$) compared to those rehydrated rapidly (Figure 3D) which were perfectly translucent. As a consequence, the rapid rehydration was adopted for the second round of investigation. These results are in opposition with those observed by Schaffazick *et al.* and Wang who explained that rapid addition of water could disrupt the porous structure of the cake and lead to its collapse (Schaffazick *et al.*, 2003; Wang, 2000). Redispersion speeds were also different depending on the cryoprotectant: trehalose formulations exhibited a higher redispersion velocity (in less than 1 min) compared to maltodextrin ones.

Table 2: Influence of the reconstitution way on droplet size and dispersity of extremulsions measured by DLS (cumulant analysis)

Sample	Reconstitution way	S_f (nm)	PDI	S_f/S_i
1	Manual shaking	-	> 0.3	-
2	Vortex	118 ± 7	0.22	1.3
3	Ultrasound bath (5min)	116 ± 8	0.22	1.3

$PDI > 0.3$ corresponds to a multimodal curve by contin analysis; S_i (initial size) = 92 nm; S_f (final size) = D_H

As opposed to manual shaking, the vortex method appeared to faster redisperse the sample and allowed to obtain monodisperse extremulsions (Table 2). Redispersion using the ultrasound bath did not improve droplet distribution as the S_f/S_i ratio was equal for samples 2 and 3. DLS measurements showed that there was no difference between the droplet size and the PDI of extremulsions redispersed by vortex agitation or ultrasound bath. Thus, the vortex method, which was rapid and easy to perform, was used for the following experiments. Lyophilizates rapidly rehydrated with half the initial volume (200 μ L) and redispersed with the vortex method led to same granulometric characteristics ($D_H = 122$ nm, $PDI = 0.25$) than rehydration with the exact initial water volume.

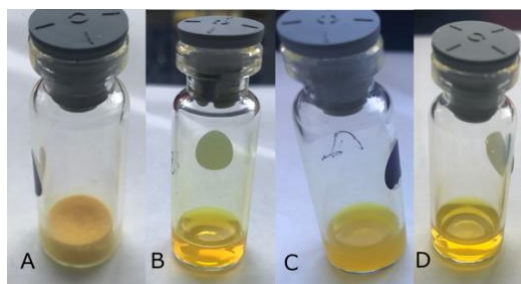


Figure 3: Pictures of freeze-dried extremulsions with 5% of trehalose and a freezing speed of 44°C/min (A), a freezing speed of 0.18°C/min and a rapid rehydration (B*), a freezing speed of 44°C/min and a dropwise rehydration (C), a freezing speed of 44°C/min and a rapid rehydration (D). **It is noteworthy that in the case of (B) small bubbles appeared at the surface of the solution during rehydration.*

Influence of the cryoprotectant nature and content on droplet size and dispersity of rehydrated extremulsions

The influence of the cryoprotectant nature and content on droplet size and dispersity was investigated in two steps (Figure 1). During the first round of investigation, two cryoprotectants at two different concentrations were explored to prevent the stresses that might occur in the surfactant layer of extremulsion droplets during the freeze-drying step: trehalose and maltodextrin DE9 at 1 and 5%. Maltodextrin has a molecular weight of 1477.3 g/mol while trehalose has a molecular weight of 342.3 g/mol. A high molecular weight sugar with low hygroscopicity, like maltodextrin, promotes a high glass transition temperature that will produce an amorphous powder with low stickiness and therefore higher flowability (Morais et al., 2016). On the contrary, trehalose, having a lower T_g' , has often been reported as stabilizer of dry active molecules due to its amorphous state at room temperature (Buitink et al., 2000). Moreover, maltodextrin DE 9 (9 dextrose equivalents) is a polysaccharide whereas trehalose is a disaccharide. This can lead to differences in the interaction with surfactant head group and so to different cryoprotective effects.

Table 3: Influence of the cryoprotectant nature and content on the droplet size and dispersity (DLS cumulant analysis) of rehydrated extremulsions. Samples 4 to 9 were frozen with a freezing speed of 44°C/min.

Sample	Cryoprotectant nature	Cryoprotectant content (%)	S _f (nm)	PDI	S _f /S _i
4	Maltodextrin DE9	1	-	>0.3	-
5		5	-	>0.3	-
6	Trehalose	1	-	>0.3	-
7		5	130 ± 1	0.24	1.4
8		6.5	132 ± 3	0.24	1.4
9		10	128 ± 1	0.25	1.4

PDI > 0.3 correspond to a multimodal curve in contin analysis; S_i (initial size) = 92 nm; S_f (final size) = D_H

As shown in Table 3, DLS analysis of samples 4 and 5 after rapid rehydration and vortex redispersion (as previously validated) showed a PDI superior to 0.3. The increase in droplet size and the wide size distribution after freeze-drying with maltodextrin can be explained by several theories: *i*) the fusion or aggregation of droplets due to mechanical forces exerted by cryoprotectant crystals on droplets which could be related with the bad reconstitution of samples containing maltodextrin presented in the part 3.3.2, *ii*) maltodextrin and trehalose could have different crystallization behaviours during the process. If maltodextrin crystallizes during the process it will not be able to combine with the surfactant layer and to protect extremulsion droplets during the freeze-drying cycle (Zhang et al., 2008).

Sample 6 with 1% of trehalose showed a huge dispersity in droplet size contrary to sample 7 with 5% of trehalose which afforded droplet size of 130 nm and a PDI of 0.24. As shown in Figure 2, during the primary drying step, samples containing 5% of trehalose had a lower temperature and sublimated slower than those containing trehalose at 1%. These results are in good agreement with the literature (Cavalli, 1997) and suggest that a higher amount of cryoprotectant, trehalose being the best cryoprotectant in our case, allows to better protect nanoemulsion droplets. According to these results obtained during the first round of investigation, trehalose was definitively selected as cryoprotectant and used at 6.5 et 10% during the second screening (Samples 8 and 9 in Table 3). As shown in Table 3, the S_f/S_i ratio

was equal for samples 7, 8 and 9. A limit of stabilization was reached with 5% of trehalose and no further improvement was obtained increasing the trehalose concentration. In some instances, increasing cryoprotectant concentration may even destabilize the formulation. Indeed, Sameti *et al.* observed a particle aggregation with increasing glucose concentrations during the lyophilization of cationically modified silica nanoparticles (Sameti et al., 2003). In order to save cryoprotectant, a trehalose concentration of 5%, the smallest content of cryoprotectant allowing to obtain a PDI < 0.3, was retained for the rest of the study.

influence of the freezing speed on the droplet size and dispersity of rehydrated extremulsions

During the first round of investigation, extremulsions were diluted by 2 prior the freeze-drying cycle and two freezing speeds were investigated: 0.18°C/min and 44°C/min (Figure 1). Samples freeze-dried through the fast or the slow freezing speed presented comparable D_H and PDI after rehydration which did not allow to discriminate the conditions (data not shown). During the second round of investigation, extremulsions without dilution prior to the freeze-drying cycle and frozen with a freezing speed of 0.18°C/min or 44°C/min presented different properties (Sample 10 and 11 in Table 4). The freezing speed of 0.18°C/min induced a polydisperse extremulsion whereas fast freezing at 44°C/min provided a monodisperse extremulsion. The fast freezing resulted in better redispersability and induced smaller ice crystals formation and a larger specific surface area of ice leading in a decrease of the particle mechanical stress (Lee et al., 2009). According to these results, the fastest freezing mode, *i.e.* 44°C/min, was selected for the rest of the study.

Table 4: Influence of the freezing speed and dilution factor on the droplet size and dispersity of rehydrated extremulsions (DLS cumulant analysis)

Sample	Freezing speed (°C/min)	Dilution factor	D_H (nm)	PDI
10	0.18	0	-	> 0.3
11	44	0	156 ± 1	0.26
7	44	2	130 ± 1	0.24
12	44	5	-	> 0.3

PDI > 0.3 corresponds to a multimodal curve in contin analysis; S_i (initial size) = 92 nm; S_f (final size) = D_H

Effect of dilution prior to lyophilization on droplet size and dispersity of rehydrated extremulsions

In the second investigation step, different dilution factors (none, x2 or x5) were applied to extremulsions before lyophilization (Table 4). The dilution factor allowing the smallest droplet distribution was x2. Sample 11 with a dilution factor of 0 presented a PDI of 0.26 and an increase in droplet size of 64 nm after rehydration while sample 7 with a dilution factor of 5 was polydisperse. Indeed, nanodroplet concentration had an important impact on the freeze-drying cycle. De Jaeghere *at al.* observed this effect showing much less damage in higher concentration of Poly(Lactic Acid)–Poly(Ethylene Oxide) copolymer nanoparticles in the suspension to be freeze-dried (Jaeghere et al., 2000). Also, the higher concentration of droplets (no dilution) may induce their aggregation and fusion and requires the use of a higher cryoprotectant concentration. (Lee et al., 2009) The intermediate dilution factor (2) appeared then as the best compromise.

Curcumin concentration

The curcumin quantification by HPLC of rehydrated extremulsions freeze-dried under the optimized conditions (5% of trehalose, fast freezing, dilution x2) resulted in a curcumin concentration of 0.35 g/L corresponding to a reduced recovery rate of 54% compared to 63% assessed before the freeze-drying cycle thus corresponding to 14% of curcumin loss. The theoretical composition of dehydrated extremulsions was calculated assuming that the total amount of water was evaporated and that all other components were fully recovered. The loss of curcumin during the freeze-drying cycle, which is nevertheless moderate, is maybe ascribed to the processing conditions.

Impact of the volume of freeze-dried solution

In order to freeze-dry higher solution volumes, content of each component of extremulsions was multiplied by 2.5 and the same ultrasound process was applied on this 10 mL-extremulsion. The higher extraction volume resulted in droplets of 72 ± 1 nm in diameter and a PDI of 0.20 with a curcumin recovery rate of 61% which corresponds to 0.40 g/L of curcumin

which is in good agreement with previous small-scale samples.

This 10 mL-extremulsion was first aliquoted with the same volume (400 μ L) in a vial of 2 mL and freeze-dried with conditions optimized previously (dilution by 2, fast freezing, 5% of trehalose). Right after a fast rehydration and a redispersion using vortex, the droplet size and size distribution were measured by DLS. As shown in Table 5, an increase in droplet size (+41 nm) and dispersity (+0.07) was observed compared to parent solutions. The ratio S_f/S_i of 1.56 was higher compared to that of the previous test (1.4 in Table 3) performed on the same extremulsion volume, *i.e.* 400 μ L. Then, two different volume aliquots of extremulsions, 1 and 5 mL, were freeze-dried keeping constant the volumetric ratio sample:vial (1:5). The droplet size of extremulsions was more affected at 5 mL as the ratio S_f/S_i increased to 1.9. Increase in dispersity was similar in both cases.

Long term stability

A long-term stability study was carried out after a storage of the lyophilizate during six months at 4°C in the dark, on droplet size, dispersity, curcumin concentration and residual moisture of extremulsions. DLS measurements did not exhibit destabilization signs: no increase of the D_H and PDI (Table 5). Ratio S_f/S_i where S_f corresponds to the droplet size of extremulsions rehydrated after six months of storage at 4°C were similar to those obtained with extremulsion rehydrated right after the freeze-drying cycle. However, unless no colour change was visible to the naked eye, freeze-dried extremulsions presented a loss of curcumin of 26% in average (Table 5) whatever the volume of starting solution.

Table 5: Evolution of the droplets size and dispersity of extremulsions rehydrated and stored at 4°C in the dark during 6 months.

$V_{\text{Lyophilizate}}$ (mL)	Rehydrated extremulsion			Rehydrated extremulsion after 6 months of storage at 4°			Curcumin loss (%)
	S_f (nm)	PDI	S_f/S_i	S_f (nm)	PDI	S_f/S_i	
0.4	113± 58	0.27	1.56	118 ± 7	0.22	1.63	25
1	106 ± 7	0.22	1.47	93 ± 2	0.27	1.29	28
5	140± 5	0.22	1.94	145 ± 4	0.22	2.01	24

$S_i = 72 \text{ nm}$; $S_f = D_H$

Residual moisture

In order to ensure a long-term stability of dry extremulsions, it is primordial to control and limit the yield of residual water in the powders. The residual moisture content of freeze-dried extremulsions (starting from 1 mL of solution) was measured by Karl-Fisher titration and was of 1.971 %. A high residual moisture content may destabilize extremulsion due to cryoprotectant crystallization and usually a moisture content of 1% and less is recommended. (Williams and Polli, 1984) The residual humidity measured in the lyophilizate after six months of storage may explain the loss of curcumin measured after six months of storage (around 26%). Indeed, at neutral pH curcumin can be degraded by hydroxyl ions present in water. (Zheng et al., 2017) As the residual moisture was slightly higher than 1% and correlated to the progress of the second drying step, the duration of the second drying process may need to be increased for future studies.

Conclusions

This study illustrates a new strategy for the stabilization of extremulsions using freeze-drying. The suitability of extremulsions to keep their physico-chemical properties over a freeze-drying cycle was demonstrated. A fast freezing combined with the use of 5% of trehalose with a formulation diluted by 2 before freeze-drying appeared to be the optimal conditions to limit the droplets and dispersity growth. Dry extremulsions presented a residual

moisture of 1.971% and were stable under 6 months of storage at 4°C in the dark, with no change in appearance, reconstitution ability and droplet size. However, a loss of 25% in curcumin concentration was measured after the 6 months-storage. Despite this loss of curcumin, as all other physico-chemical properties remained unchanged, these results are considered encouraging, especially as the loss of curcumin could be limited by optimising the second drying step. A scanning electron microscope analysis could possibly be a complementary analysis to be carried out to discuss the aspect of the dry extremulsion. Further studies could focus on an accelerate stability study in order to evaluate the loss in curcumin under a longer period and on the dry formulation ability to increase the curcumin bioavailability for oral administration application.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Region Sud and Lyofal company (Salon de Provence) for funding the PhD thesis grant of A. Dall'armellina. This study was conducted with the financial support of the European Regional Development Fund, the French Government, the Sud Provence-Alpes-Côte d'Azur Region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon.

REFERENCES

- Ak, T., Gülçin, İ., 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions* 174, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering, SI: Extraction and Encapsulation* 117, 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Buitink, J., Dries, I.J. van den, Hoekstra, F.A., Alberda, M., Hemminga, M.A., 2000. High Critical Temperature above Tg May Contribute to the Stability of Biological Systems. *Biophysical Journal* 79, 1119–1128. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76365-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76365-X)
- Cavalli, R., 1997. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 148, 47–54. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04822-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04822-3)
- Constantinides, P.P., Han, J., Davis, S.S., 2006. Advances in the Use of Tocols as Drug Delivery Vehicles. *Pharm Res* 23, 243–255. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-9262-9>
- Fujisawa, S., Atsumi, T., Ishihara, M., Kadoma, Y., 2004. Cytotoxicity, ROS-generation Activity and Radical-scavenging Activity of Curcumin and Related Compounds. *Anticancer Res* 24, 563–570.
- Jaeghere, F.D., Allémann, E., Feijen, J., Kissel, T., Doelker, E., Gurny, R., 2000. Freeze-Drying and Lyopreservation of Diblock and Triblock Poly(Lactic Acid)–Poly(Ethylene Oxide) (PLA–PEO) Copolymer Nanoparticles. *Pharmaceutical Development and Technology* 5, 473–483. <https://doi.org/10.1081/PDT-100102031>
- Joseph, C., Savoie, R., Harscoat-Schiavo, C., Pintori, D., Monteil, J., Faure, C., Leal-Calderon, F., 2019. Redispersible dry emulsions stabilized by plant material: Rapeseed press-cake or cocoa powder. *LWT* 113, 108311. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108311>
- Lee, M.K., Kim, M.Y., Kim, S., Lee, J., 2009. Cryoprotectants for freeze drying of drug nano-suspensions: Effect of freezing rate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 4808–4817. <https://doi.org/10.1002/jps.21786>

- McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J., 2007. Emulsion-Based Delivery Systems for Lipophilic Bioactive Components. *Journal of Food Science* 72, R109–R124.
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00507.x>
- Morais, A.R. do V., Alencar, É. do N., Xavier Júnior, F.H., Oliveira, C.M. de, Marcelino, H.R., Barratt, G., Fessi, H., Egito, E.S.T. do, Elaissari, A., 2016. Freeze-drying of emulsified systems: A review. *International Journal of Pharmaceutics* 503, 102–114.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.047>
- Sameti, M., Bohr, G., Ravi Kumar, M.N.V., Kneuer, C., Bakowsky, U., Nacken, M., Schmidt, H., Lehr, C.-M., 2003. Stabilisation by freeze-drying of cationically modified silica nanoparticles for gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics, A Special Issue for Professor Hans E. Junginger on the occasion of his 60th birthday* 266, 51–60.
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00380-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00380-6)
- Sari, T.P., Mann, B., Kumar, R., Singh, R.R.B., Sharma, R., Bhardwaj, M., Athira, S., 2015. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids* 43, 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.07.011>
- Selvam, C., Jachak, S.M., Thilagavathi, R., Chakraborti, Asit.K., 2005. Design, synthesis, biological evaluation and molecular docking of curcumin analogues as antioxidant, cyclooxygenase inhibitory and anti-inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 1793–1797. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.02.039>
- Sharma, N., Kaur, G., Khatkar, S.K., 2021. Optimization of emulsification conditions for designing ultrasound assisted curcumin loaded nanoemulsion: Characterization, antioxidant assay and release kinetics. *LWT* 141, 110962.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110962>
- Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2005. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer, Cancer Chemoprevention - An Update on a Novel and Exciting Field of Oncology* 41, 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Sood, S., Jain, K., Gowthamarajan, K., 2014. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113, 330–337.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.030>

- Suleria, H.A.R., Barrow, C., Barrow, C., 2019. Bioactive Compounds from Plant Origin : Extraction, Applications, and Potential Health Benefits. Apple Academic Press.
<https://doi.org/10.1201/9780429029288>
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, Green Extraction Techniques* 71, 100–109.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Williams, N.A., Polli, G.P., 1984. The Lyophilization of Pharmaceuticals: A Literature Review. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 38, 48–60.
- Zhang, L., Liu, L., Qian, Y., Chen, Y., 2008. The effects of cryoprotectants on the freeze-drying of ibuprofen-loaded solid lipid microparticles (SLM). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 750–759.
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.12.003>
- Zheng, B., Zhang, Z., Chen, F., Luo, X., McClements, D.J., 2017. Impact of delivery system type on curcumin stability: Comparison of curcumin degradation in aqueous solutions, emulsions, and hydrogel beads. *Food Hydrocolloids* 71, 187–197.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.022>

Discussion générale

L'objectif principal de ces travaux de thèse était de développer un procédé d'extraction et d'encapsulation de molécules bioactives à partir de matrices végétales dans des NEs stables appelées extremulsions et de concevoir des extremulsions sèches chargées en molécules bioactives. La technologie ultrasonore a été utilisée afin d'extraire les substances bioactives de la matrice végétale et de les encapsuler dans des systèmes colloïdaux ; permettant ainsi de répondre aux problématiques d'éco-extraction et de formulation en une seule étape. L'un des défis à relever pour la conception d'un procédé d'éco-extraction est la limitation de l'utilisation des solvants organiques, combiné à une réduction du nombre d'étapes entre la source de l'actif et l'extrait. Dans notre cas, l'alternative à l'emploi de solvants organiques pour l'extraction est un milieu composé en majorité d'eau, d'huile biocompatible et d'un tensioactif. L'application d'ondes ultrasonores dans le milieu où est placée la matrice végétale, permet de rompre les membranes cellulaires et de libérer les molécules bioactives visées tout en formant des gouttelettes d'huile de taille nanométrique grâce aux forces de cisaillement et à l'organisation du tensioactif à leur surface. Les molécules libérées sont solubilisées dans la phase huileuse et encapsulées dans le cœur hydrophobe des nanogouttelettes formées. Un post-traitement est nécessaire pour éliminer les résidus de matrice et microgouttes résiduelles, et ainsi obtenir une NE de polydispersité limitée et parfaitement translucide. Une étape finale de séchage des extremulsions par lyophilisation est ajoutée au procédé afin de stabiliser les extrémulsions pour un stockage sur le long terme. Ce procédé conduit donc à des formulations sèches faciles à conserver et à transporter qu'on peut ainsi considérer comme « *prêtes à l'emploi* » par simple ajout d'eau. À notre connaissance ce procédé peut être considéré comme innovant puisqu'il combine extraction et formulation « one pot » dans un milieu essentiellement composé d'eau, le tout aboutissant à une formulation sèche.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à la mise au point et à l'optimisation de ce procédé innovant en l'appliquant à l'extraction et à la formulation de la curcumine à partir du *Curcuma longa*.

Afin d'évaluer le procédé, trois paramètres décrivant la stabilité des gouttes et la capacité d'extraction ont été mis en avant : la distribution en taille, le diamètre hydrodynamique moyen (D_H) et le taux de recouvrement en curcumine. La distribution en taille ainsi que le D_H des gouttelettes d'extremulsion ont été mesurés par diffusion dynamique de la lumière. Le taux de recouvrement en curcumine a été calculé par rapport au taux d'extraction en curcumine obtenu au Soxhlet dans l'acétone à la suite de la quantification de la curcumine par

HPLC. Les valeurs limites que nous nous sommes fixées pour ces paramètres étaient les suivantes : un PDI (Indice de polydispersité) $<0,3$ (de préférence $<0,2$), un D_H d'environ 100 nm et un taux de recouvrement proche de 100%.

Dans cette discussion, la capacité d'extraction du procédé est confrontée à celle de techniques d'extraction décrites dans la littérature et la stabilité des extrémulsions par rapport à d'autres systèmes d'encapsulation. Néanmoins, il est important de garder en mémoire que ces deux aspects du procédé sont influencés par des paramètres communs et donc difficilement discutables séparément. Il a été prouvé que les paramètres qui influencent le taux d'extraction ont également un effet sur la dispersité des extrémulsions. À notre connaissance, la littérature actuelle est rare en ce qui concerne l'extraction sans solvant combinée, en une seule étape, à l'encapsulation. Les avantages et les inconvénients des extrémulsions sont donc mis en perspectives par rapport aux principes d'écoextraction et aux applications futures.

Étude du milieu d'extraction

Afin de répondre aux objectifs établis, nous avons expérimenté les différents paramètres pouvant influencer la distribution en taille et le taux d'extraction des extrémulsions uns à uns. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la composition du milieu d'extraction (tensioactif et huile) dans le but d'obtenir des gouttelettes de l'ordre de 100 nm et une distribution en taille monodisperse et étroite. Nous avons choisi de stabiliser les gouttelettes de phase huileuse à l'aide d'un tensioactif dérivé de la vitamine E, le tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS). Ce tensioactif est qualifié de « GRAS » (Generally Recognised As Safe) puisqu'il est un conjugué biodégradable de l' α -tocopherol et du polyéthylène glycol (PEG) relié par un lien succinate. Le TPGS est approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) en tant que supplément nutritionnel hydrosoluble à base de vitamine E et adjuvant pharmaceutique sans danger pour la formulation de médicaments (Yan et al., 2007). L'encombrement stérique apporté par les chaînes PEG présente l'avantage de protéger la substance active encapsulée dans les gouttelettes. Il permet de réduire le potentiel zêta et les interactions dans l'organisme induites par la charge en surface des gouttelettes. Ces

propriétés permettent de supprimer la reconnaissance par le système immunitaire et l'opsonisation (Knop et al., 2010). L'utilisation d'un co-surfactant a été évitée afin de proposer un système « modèle » le plus simple possible.

L'avantage lié à l'encapsulation de substances actives dans des gouttelettes stabilisées par un tensioactif est que celui-ci peut servir à la fonctionnalisation des gouttes en surface, par le greffage de ligands de ciblage (sucres, peptides) ou de marqueurs pour l'imagerie. La fonctionnalisation permet aux nanovecteurs de libérer sélectivement le principe actif au niveau des cellules cibles tout en suivant la localisation du principe actif dans la zone d'intérêt dans le cas des théranostiques (Kaneda et al., 2009). Cependant, un regard particulier doit être porté sur la nature du tensioactif, sa toxicité, sa biodégradabilité et son caractère allergène pour des applications topiques (Lémery et al., 2015). Malgré de nombreux avantages qui expliquent leur utilisation très répandue, les tensioactifs contenant des fragments pegylés sont controversés d'un point de vue écologique puisque leur production à base d'oxyde d'éthylène hautement toxique est très polluante. La pertinence et l'utilité de tensioactifs verts en tant qu'alternative aux tensioactifs synthétiques actuels est de plus en plus discutée (Rebello et al., 2014). Les tensioactifs verts sont définis comme des molécules amphiphiles biosourcées obtenues dans la nature ou synthétisées à partir de matières premières renouvelables. Les tensioactifs synthétiques peuvent aussi être remplacés par des particules solides. Les émulsions stabilisées de cette manière sont appelées émulsions de Pickering. Le lait homogénéisé en est un exemple. Les gouttelettes sont stabilisées par des unités de caséine (protéines) adsorbées à la surface. De la même manière, on pourrait envisager de stabiliser les extrémulsions par des particules solides provenant de la matrice végétale afin de limiter l'utilisation de tensioactifs synthétiques.

Ainsi, l'un des principaux atouts des extrémulsions est que la nature des huiles et du tensioactif peut être modulée en fonction des applications souhaitées.

D'autre part, comparée aux micelles, la phase huileuse qui compose les NEs leur permet de solubiliser une plus grande quantité de principe actif mais aussi d'améliorer l'absorption de l'actif dont elles sont chargées dans les tissus humains (Gupta et al., 2016). De plus, l'emploi des micelles pour le transport de principes actifs est limité par la dégradation rapide des molécules transportées conséquence d'une fuite passive rapide. Les NEs sont plus stables que les micelles car l'ajout d'huile dans le cœur hydrophobe des micelles permet de diminuer le phénomène de fuite passive. Ainsi, l'extraction micellaire permettant l'extraction et

l'encapsulation simultanée de principe actif dans des micelles ne semble théoriquement pas pouvoir concurrencer le procédé proposé dans cette thèse.

Le choix d'un système tel que les NEs pour encapsuler les substances bioactives permet aux extremulsions d'être transposables à une large gamme d'applications. En effet, la taille des gouttelettes et donc l'aspect (translucide ou laiteux) des extremulsions peut être adapté en fonction de l'application souhaitée. La taille nanométrique des gouttelettes d'extremulsion leur confère une stabilité cinétique et une rhéologie ajustable. De plus, elles ont l'avantage de disposer d'une phase huileuse et d'une phase aqueuse leur permettant de solubiliser des actifs hydrophiles et hydrophobes, ce qui autorise une certaine synergie d'action des substances bioactives extraites. Ces propriétés en font une solution attrayante pour des applications alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

Cette étude appliquée à la curcumine permet de démontrer le concept mais aucune application n'est privilégiée à ce stade. Dans un premier temps, des tests de solubilité de la curcumine dans différentes huiles nous ont permis de mettre en évidence que la tributyrine était le meilleur candidat pour solubiliser la curcumine dans le cœur des gouttelettes (chapitre 2). Ensuite, des essais de formulations d'émulsions « blanches » (sans ajout de *C. longa*) ont été réalisés afin de déterminer les proportions d'huile et de tensioactif ainsi que la nature de tensioactif adéquates. Ces essais préliminaires ont permis de déterminer que le TPGS 1000 était plus propice à l'obtention de NEs monodisperses comparé au TPGS 750M. L'étude de la stabilité dans le temps des émulsions « blanches » a démontré l'importance de l'ajout d'un deuxième corps gras plus hydrophobe pour limiter le murissement d'Ostwald des gouttelettes de tributyrine. Par conséquent, la phase huileuse optimisée est composée de tributyrine (triglycéride à chaînes courtes) et d'un mélange de triglycérides à longues chaînes sous la forme de cire (mélange C10-C18) ou d'huile (mélange C8-C10) dans les proportions 85/15. L'application des conditions optimisées dans le cadre de l'étude des émulsions blanches à l'extraction de curcumine à partir de 100 mg de *C. longa* via la formulation d'extremulsions a présenté des résultats différents en termes de distribution en taille de gouttelettes et de taux d'extraction. L'hypothèse d'une mauvaise agitation de la matrice végétale dans le milieu d'extraction lorsque la sonde ultrasonore est proche du fond du flacon a été formulée. Cette agitation limitée pourrait entraîner une augmentation de la température et une diminution de l'intensité ultrasonore et du phénomène de cavitation permettant la formation de petites gouttelettes. En effet, la cavitation est réduite à des températures d'extraction plus élevées

car les vides formés lors des cycles de compression/décompression sont remplis de vapeurs de solvant, ce qui entraîne un effondrement moins violent des microbulles. À basse température, la pression de vapeur du solvant est faible et permet aux bulles de cavitation de s'effondrer violemment (Chemat et al., 2017). Afin de valider cette hypothèse, l'impact du positionnement de la sonde à ultrasons dans le milieu extractant a été étudié. L'augmentation de la distance entre la tige à ultrasons et le fond du flacon a eu un impact significatif sur la distribution en taille et sur le taux de recouvrement en curcumine. Les extremulsions obtenues avec la cire ou l'huile en tant que deuxième corps gras ont présenté des résultats similaires : un PDI inférieur à 0,3, un D_H d'environ 100 nm et un taux de recouvrement par rapport à l'extraction au Soxhlet dans l'acétone d'environ 80%. Cependant, seules les extremulsions obtenues avec le mélange d'huiles (tributyryne/triglycérides C8-C10) ont conservé leurs propriétés physicochimiques à la suite de la lyophilisation en présence de tréhalose comme cryoprotecteur.

Par la suite, l'impact du volume d'eau sur les propriétés des extremulsions a été étudié (chapitre 3). L'augmentation du volume d'eau jusqu'à 4 mL a permis d'augmenter le taux de recouvrement et de diminuer le D_H des extremulsions. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse formulée plus haut qui stipule que la surcharge de particules solides dans le milieu d'extraction diminue l'intensité ultrasonore délivrée. Cette hypothèse a été vérifiée une nouvelle fois lors de l'étude de l'augmentation de la quantité de matrice dans le milieu. L'augmentation des quantités de *C. longa* a été associée à l'augmentation du D_H et à la diminution drastique du taux de recouvrement. Une deuxième hypothèse concernant la diminution du taux de recouvrement en curcumine pourrait être que l'augmentation de la température liée à l'augmentation du ratio matrice/milieu d'extraction induirait une dégradation thermique de la curcumine. Afin de limiter ce risque, la température pourrait être mieux contrôlée par une circulation externe d'eau froide pendant l'extraction. En fonction de l'intensité des ultrasons et du solvant, les températures d'extraction les plus courantes, varient de 10°C à 80°C. Néanmoins, en augmentant la quantité de matière première jusqu'à 400 mg, le PDI a atteint une valeur minimale de 0,18, puis il a augmenté de manière significative (0,25) au-delà de 500 mg de matrice. Le meilleur rapport matière première/milieu d'extraction a été obtenu pour 400 mg de matrice/4ml d'eau, car il a permis d'obtenir des nanoémulsions monodisperses ($PDI < 0,2$) avec un D_H inférieur à 100 nm et un taux de récupération acceptable ($63 \pm 6 \%$).

Cette première étude basée sur le milieu d'extraction a établi une composition idéale afin d'atteindre les propriétés physico-chimiques des extremulsions visées. Elle est aussi la preuve de l'encapsulation et de la formulation efficace de la curcumine en une seule étape et en un temps très court (seulement 2 minutes de sonication au total sur tout le cycle). De plus, elle a révélé la possibilité d'obtenir des extremulsions sèches stables et facilement redispersibles grâce au contrôle du procédé de lyophilisation.

Étude des paramètres de traitement

Par ailleurs, nous avons étudié les paramètres liés au traitement. En particulier, l'ajout d'une étape de prétraitement, les paramètres ultrasonores appliqués ainsi que les paramètres de centrifugation (post-traitement) ont été explorés (chapitre 3).

Dans le but d'économiser de la matière première et d'optimiser les conditions d'extraction, différentes conditions de prétraitement ont été étudiées telles que la macération, l'ultraturax et le bain à ultrasons. La combinaison de deux ou plusieurs techniques qui peuvent avoir des rôles complémentaires ou synergiques peut conduire à une augmentation de l'efficacité d'extraction. Les conditions de prétraitement ont été sélectionnées en gardant à l'esprit la limitation du temps total du procédé. L'ajout d'une étape de prétraitement (quel que soit le matériel utilisé) n'a pas conduit à une augmentation significative du taux de recouvrement en curcumine et n'a eu qu'un faible impact sur la taille des gouttelettes. De plus, une étape de prétraitement peut impliquer une perte de curcumine d'un dispositif à l'autre et une augmentation du temps d'extraction et de la consommation en énergie. En conséquence, l'ajout d'une étape de prétraitement n'a pas été concluant et n'a pas été retenu pour la suite de l'étude.

Le post-traitement, quant à lui, s'est avéré être l'étape du traitement ayant le plus grand impact sur les propriétés finales des extremulsions. De plus, cette étape est conditionnée et corrélée à la quantité de matrice végétale de départ. Plus la quantité de matière première est importante, plus la vitesse ou le temps de centrifugation devra être élevé pour limiter le nombre de particules solides restant en suspension ainsi que pour réduire la dispersité de taille des gouttelettes. Ainsi, les paramètres du post-traitement ont été optimisés conjointement au ratio de matière première. Le post-traitement consiste en l'élimination des

résidus de matrice après l'extraction assistée par US grâce à une étape de centrifugation. Une mauvaise élimination des résidus de matrice végétale peut avoir un impact sur la quantification de la curcumine et la dispersité de l'extremulsion. Le taux d'extraction peut en effet être surestimé en raison d'une seconde extraction survenant lors de la préparation de l'échantillon pour l'analyse HPLC. Il est important de noter qu'à la fin du processus, le seul « déchet » produit est le résidu végétal (« cake ») éliminé par centrifugation qui est lui parfaitement biodégradable et qui pourrait être recyclé pour d'autres applications.

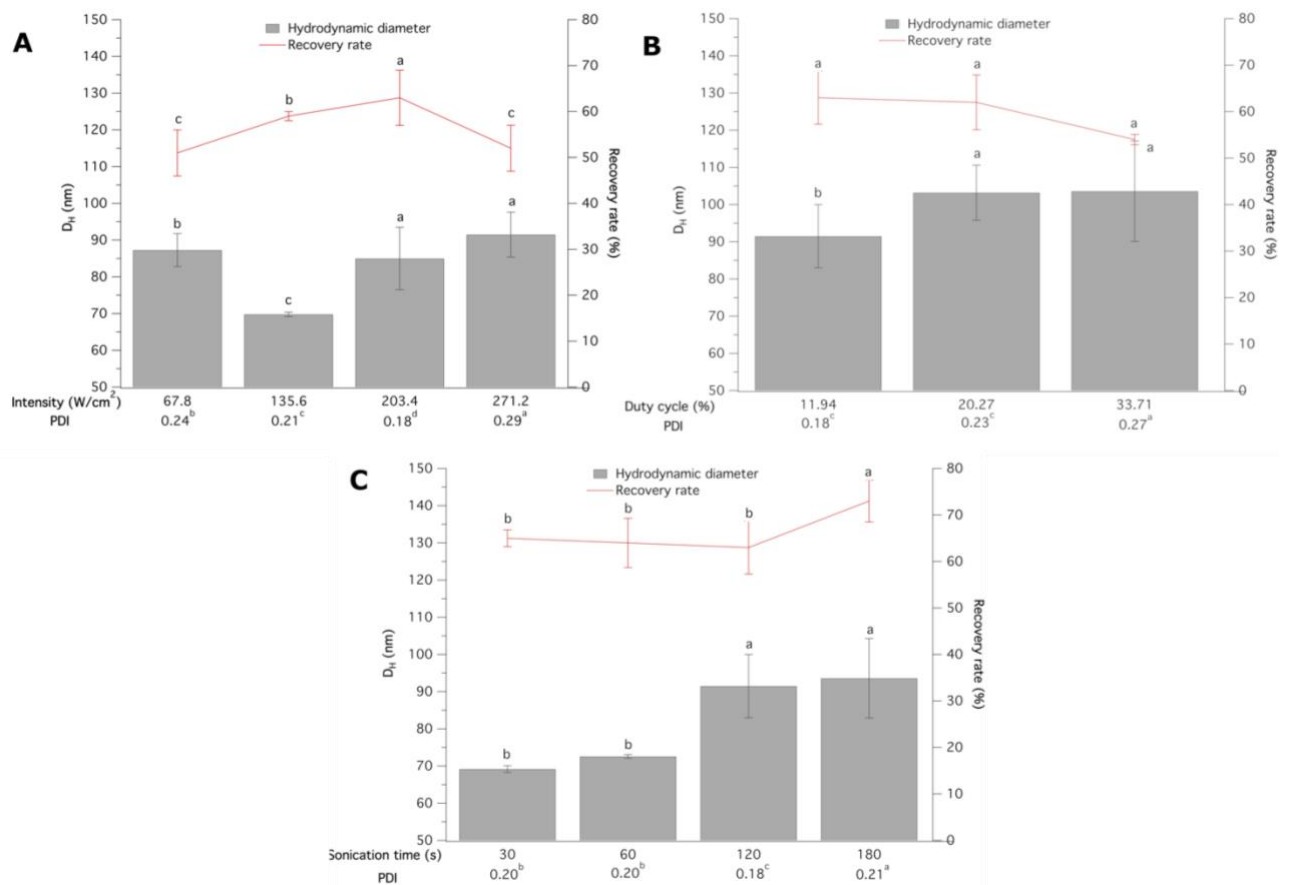


Figure 1 : Effet de l'intensité acoustique (A), du rapport cyclique (B) et du temps de sonication (C) sur le D_H et le taux de recouvrement en curcumine.

Les paramètres du traitement ultrasonore tels que l'intensité ultrasonore, le temps de sonication effective (somme des temps d'impulsions ultrasonores appliquées au milieu, *i.e.* sans les temps "morts") et le rapport cyclique (rapport du temps de sonication effective sur le temps total d'insonification, *i.e.* avec les temps "morts") ont aussi été étudiés. Lorsqu'on fait varier l'intensité ultrasonore de 67,8 à 271,2 W/cm², le taux de recouvrement le plus élevé et

le PDI le plus faible sont obtenus à 203,4 W/cm². L'augmentation du rapport cyclique, ou « *duty cycle* », de 11,94 à 33,71% a été corrélée avec celle du PDI et du D_H alors que le taux de recouvrement en curcumine est resté stable. Le rapport cyclique a donc été fixé à 11,94%. En appliquant ce rapport cyclique de 11,94 %, l'augmentation du temps de sonication effective de 30 sec à 180 sec (qui allonge donc la durée totale du traitement ultrasonore) a entraîné un accroissement du D_H accompagnée d'une amélioration assez limitée du taux de recouvrement en curcumine. Seul un temps de sonication effective de 120 sec a permis de réduire le PDI au-dessous de 0,2, ce qui nous a conduit à fixer ce temps à 120 sec.

Le traitement ultrasonore est au cœur de ce procédé et pourrait difficilement être remplacé par une autre technique puisqu'il permet l'extraction des substances actives des plantes mais aussi l'émulsification, c'est-à-dire l'encapsulation des molécules d'intérêt. L'extraction assistée par ultrasons présente de nombreux avantages comparés aux techniques conventionnelles et aux nouvelles techniques d'extraction et son utilisation a augmenté ces dernières décennies (Tiwari, 2015). C'est un procédé qui est moins coûteux que l'extraction par fluide supercritique et plus respectueux de l'environnement que certaines techniques puisqu'il est peu consommateur en énergie et émetteur de CO₂ et qu'il permet de limiter la consommation de solvants. Cependant, l'utilisation des ultrasons au cours des processus d'extraction présente certains défis. L'une des principales limites de l'extraction assistée par ultrasons est la difficulté de mise à l'échelle. Ce problème est principalement dû à la répartition non uniforme des conditions de traitement, à l'atténuation des ondes ultrasonores dans les échantillons à haute viscosité, à la diminution de l'onde ultrasonore avec la distance et à la corrosion des transducteurs ultrasonores (Ojha et al., 2020). La conception d'un réacteur à grande échelle industrielle doit permettre une distribution uniforme du phénomène de cavitation au-dessus du seuil requis pour une intensification suffisante de l'opération d'extraction (Shirsath et al., 2012). Le développement de ce type de réacteurs à large échelle, composé de plusieurs transducteurs avec ou sans fréquence multiple, permet d'augmenter le rendement cavitationnel comparé aux réacteurs conventionnels. En revanche, pour ce qui est de la formulation, Peshkovsky *et al.* ont montré la possibilité de monter en échelle la préparation ultrasonore de NEs H/E translucides à partir d'une échelle de laboratoire (Peshkovsky et al., 2013). Ces résultats offrent donc de bonnes perspectives de mise à l'échelle industrielle. Un autre inconvénient lié à l'extraction assistée par ultrasons se présente lors de l'utilisation d'une matrice végétale molle. Dans ce cas, le rapport matrice

végétale-solvant doit être augmenté car la matière végétale amortit l'intensité ultrasonore (Vinatoru, 2001).

Les taux de recouvrement obtenus grâce aux extremulsions optimisées sont conformes à ceux rapportés par d'autres auteurs utilisant des techniques d'extraction non conventionnelles basées sur des solvants naturels comme les huiles végétales ou les alcools.

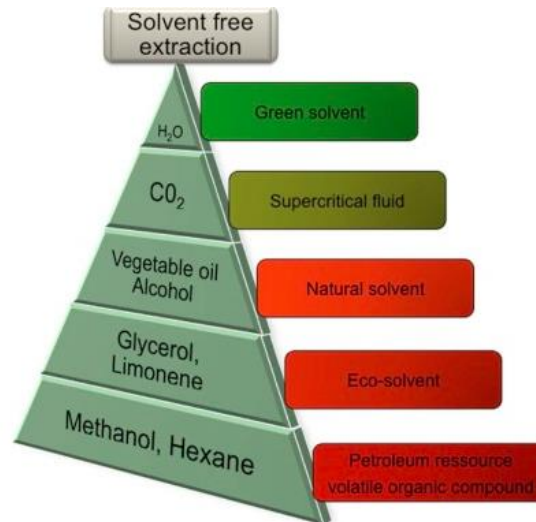


Figure 2: Pyramide des solvants conventionnels et des solvants alternatifs (Chemat et al., 2015)

Wakte *et al.* ont obtenu un taux de recouvrement en curcumine à partir de *C. longa* de 69,36% par extraction au CO₂ supercritique, avec un temps d'extraction de 240 à 300 minutes (en utilisant 10% d'éthanol comme modificateur) alors que notre procédé extremulsion, utilisant des huiles comme solvant, a donné un taux de recouvrement de 63% en seulement 2 minutes de temps total de sonication effective (chapitre 3) (Wakte et al., 2011). Ils ont aussi étudié l'extraction assistée par micro-ondes et par ultrasons de la curcumine dans l'éthanol et ont obtenu respectivement 48.57% et 32.85% en 5 minutes d'irradiation.

Il existe dans la littérature différentes études décrivant l'extraction et l'encapsulation simultanée de substances actives.

Degot *et al.* ont étudié l'extraction de la curcumine à partir de *C. longa* à l'aide d'une microémulsion sans tensioactif composée d'eau, d'éthanol et de triacétine (Degot et al., 2021). Le mélange ternaire a été concentré par extraction répétée de rhizomes frais dans le même mélange d'extraction et une concentration en curcuminoïdes de ~130 mg/mL a été obtenue. Des extraits de curcumine hydrosolubles stables à la dilution dans l'eau et au

stockage jusqu'à cinq mois à l'abri de la lumière naturelle ont ainsi été obtenus et proposés pour des applications en tant que colorants naturels.

Pettinato *et al.* ont étudié la combinaison de l'extraction par haute pression et température de composés bioactifs et l'encapsulation dans des liposomes à partir de résidus de café (Pettinato *et al.*, 2020). Cette technique a permis d'obtenir des taux d'extraction élevés (43 mg d'équivalents d'acide caféique /g de marc de café séché et 59 µg d'équivalents de Trolox/L d'extrait) en travaillant sous atmosphère inerte à 150 °C pendant 60 min et en utilisant de l'éthanol. Les liposomes d'environ 200 nm ont été produits par la méthode supercritique et ont permis d'obtenir une efficacité d'encapsulation de 89 % et sans réduction significative de l'activité antioxydante des composés extraits.

Popović *et al.* ont étudié l'extraction assistée par ultrasons et l'encapsulation simultanées des principes actifs de la cerise cornaline dans la β -cyclodextrine (Popović *et al.*, 2021). L'extraction des polyphénols et des iridoïdes de la cerise cornaline lyophilisés a été réalisée par quatre solvants différents : eau pure, éthanol aqueux à 50 % (méthode conventionnelle), solution aqueuse à 1,5 % de β -CD et solution aqueuse d'éthanol à 1,5 % de β -CD. L'efficacité d'extraction de ces composés n'a pas dépassé celle de la méthode conventionnelle cependant l'efficacité d'encapsulation des polyphénols de cerise cornéliennes dans le β -CD était de 65,62%. Les extraits éthanol-eau ont été utilisés pour former des complexes d'inclusion entre la β -CD et les composés bioactifs sous forme solide. L'extrait a montré une solubilité dans l'eau et un pouvoir antioxydant plus élevé, et la libération des anthocyanes de la poudre séchée a été prolongée de 50% dans les 2 premières heures.

Les techniques proposées dans la littérature afin d'extraire et d'encapsuler simultanément nécessitent l'utilisation de solvants miscibles à l'eau comme l'éthanol et sont parfois plus difficiles à mettre en œuvre que la technique que nous proposons qui nécessite un nombre très limité d'étapes et qui est peu coûteuse. Il est important de noter que les paramètres optimisés lors de notre étude sont dépendants de la matrice utilisée et ne sont donc pas transposables à d'autres matrices végétales en l'état. Il n'est donc pas envisageable de comparer les résultats obtenus à l'aide des techniques présentées dans la littérature lorsqu'elles sont réalisées sur des matrices différentes.

Afin de déterminer le taux d'encapsulation de principes actifs dans des particules la technique d'ultracentrifugation est généralement utilisée. L'ultracentrifugation est réalisée à l'aide d'une ultracentrifugeuse et la vitesse de rotation doit dépasser 15 000 tours par minute.

Le but de cette technique est de séparer les particules très fines (de 1 à 500 nm) dispersées dans un liquide de densité pratiquement égale (Li et al., 2018). Dans notre étude, nous avons réalisé une centrifugation avec une vitesse de rotation inférieure à 15 000 tours par minute afin d'éliminer les résidus mais la technique de l'ultracentrifugation n'a pas été employée. La centrifugation appliquée dans notre cas était de 13 375 tours par minute. C'est pourquoi, nous présentons un taux d'extraction en curcumine mais nous ne pouvons pas discuter le taux d'encapsulation. La technique d'ultracentrifugation pourrait être employée sur notre extrait afin de compléter cette étude. Cependant, il n'est pas certain que cette technique permettrait de séparer les gouttelettes des micelles de tensioactifs présentes en suspension autour des gouttelettes et observable en microscopie confocale. En effet, pour éviter la coalescence des gouttelettes, une certaine concentration en tensioactif (et donc en micelle) est nécessaire dans la phase aqueuse et ces micelles contiennent de la curcumine dans leur cœur hydrophobe.

Étude du séchage des extrémulsions par lyophilisation

Pour finir, nous nous sommes intéressés au séchage des extrémulsions à l'aide du procédé de lyophilisation. Après avoir déterminé les températures critiques des extrémulsions en présence de cryoprotecteurs, différents paramètres ont été analysés tels que la vitesse de congélation et de réhydratation, la technique de redispersion, la nature et la concentration du cryoprotecteur et le facteur de dilution des extrémulsions avant lyophilisation. L'étude a été réalisée en deux parties. La première partie a permis de déterminer qu'une réhydratation rapide des lyophilisats ainsi qu'une redispersion à l'aide d'un vortex était à privilégier. De plus, comparée à 1%, une concentration en tréhalose de 5% a permis de stabiliser les gouttelettes d'extrémulsions pendant le cycle de lyophilisation. Les lyophilisats obtenus à la suite du procédé dans ces conditions étaient conformes (pas de signe de collapse ou de fuite de la phase huileuse). La deuxième partie de l'étude a validé qu'il était inutile d'augmenter la concentration en tréhalose et qu'une dilution par 2 des extrémulsions avant le cycle de lyophilisation favorisait la conservation des propriétés physico-chimiques des gouttes contrairement à un facteur 0 ou 5. Au vu de ces deux parties de l'étude, la congélation rapide a semblé permettre une meilleure stabilisation des extrémulsions. Les lyophilisats obtenus à

la suite d'un cycle de lyophilisation dans les conditions optimisées ont montré une redispersion dans l'eau quasiment instantanée.

Par conséquent, les extraits secs obtenus pourraient être un ingrédient de départ pour le développement de produits alimentaires à haute valeur ajoutée offrant une solubilité dans l'eau et une stabilité accrue de la curcumine. Cependant, la stabilité sur le long terme (étude réalisée sur 6 mois) de la curcumine dans les lyophilisats est un paramètre à améliorer, notamment en revoyant la montée en température lors de l'étape de séchage du cycle de lyophilisation afin de limiter davantage le taux d'humidité résiduelle.

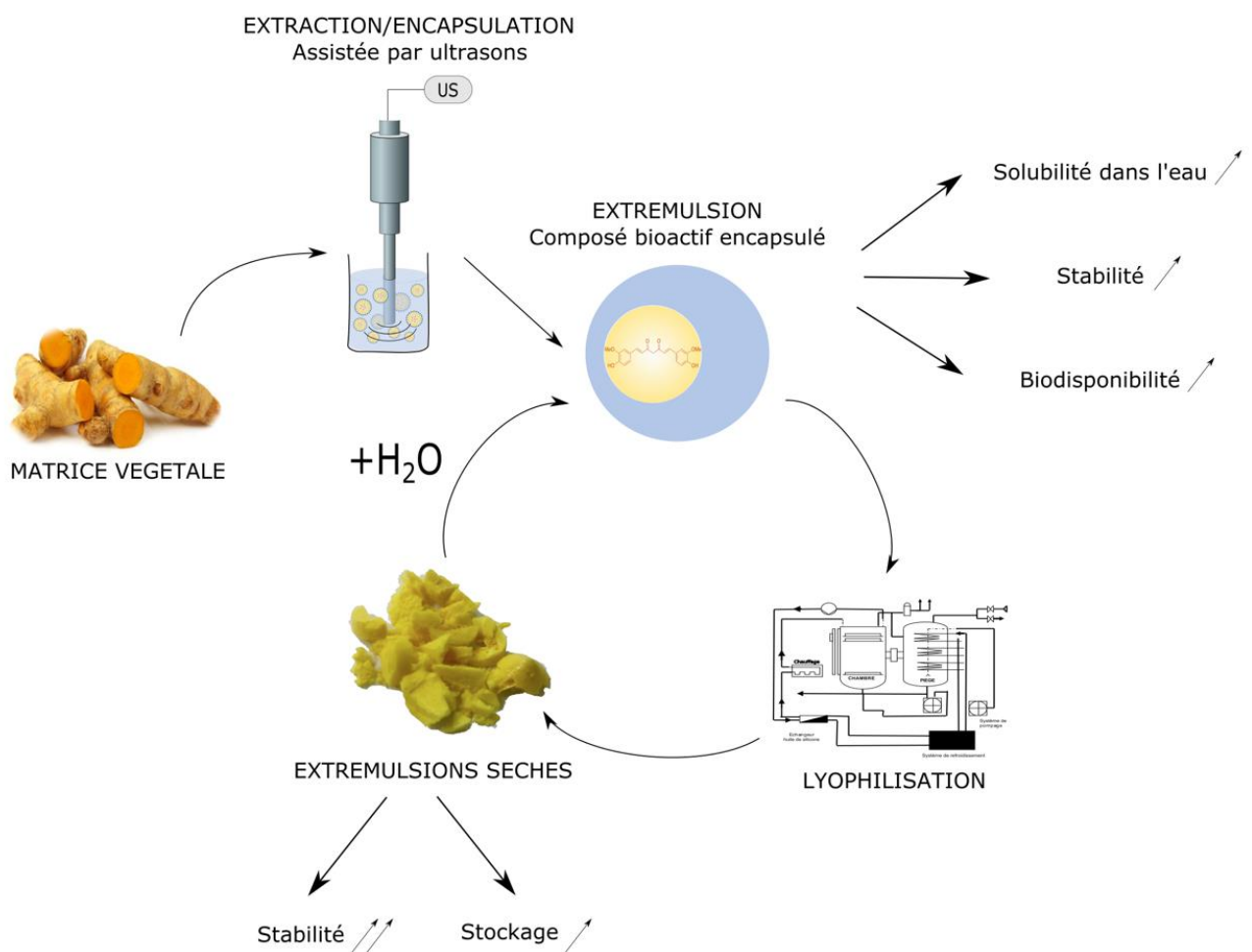


Figure 3: schéma général du procédé de conception des extrémulsions

REFERENCES

- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A., Allaf, T., Vorobiev, E., 2015. Solvent-free extraction of food and natural products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, Green Extraction Techniques* 71, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.021>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Degot, P., Huber, V., Touraud, D., Kunz, W., 2021. Curcumin extracts from *Curcuma Longa* – Improvement of concentration, purity, and stability in food-approved and water-soluble surfactant-free microemulsions. *Food Chemistry* 339, 128140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128140>
- Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S., 2016. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter* 12, 2826–2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>
- Kaneda, M.M., Caruthers, S., Lanza, G.M., Wickline, S.A., 2009. Perfluorocarbon Nanoemulsions for Quantitative Molecular Imaging and Targeted Therapeutics. *Ann Biomed Eng* 37, 1922–1933. <https://doi.org/10.1007/s10439-009-9643-z>
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U.S., 2010. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *Angewandte Chemie International Edition* 49, 6288–6308. <https://doi.org/10.1002/anie.200902672>
- Lémery, E., Briançon, S., Chevalier, Y., Bordes, C., Oddos, T., Gohier, A., Bolzinger, M.-A., 2015. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 469, 166–179. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.019>
- Li, P., Kumar, A., Ma, J., Kuang, Y., Luo, L., Sun, X., 2018. Density gradient ultracentrifugation for colloidal nanostructures separation and investigation. *Science Bulletin* 63, 645–662. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2018.04.014>
- Ojha, K.S., Aznar, R., O'Donnell, C., Tiwari, B.K., 2020. Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources.

- TrAC Trends in Analytical Chemistry 122, 115663.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115663>
- Peshkovsky, A.S., Peshkovsky, S.L., Bystryak, S., 2013. Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 69, 77–82.
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2013.02.010>
- Pettinato, M., Trucillo, P., Campardelli, R., Perego, P., Reverchon, E., 2020. Bioactives extraction from spent coffee grounds and liposome encapsulation by a combination of green technologies. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* 151, 107911. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107911>
- Popović, B.M., Blagojević, B., Latković, D., Četojević-Simin, D., Kucharska, A.Z., Parisi, F., Lazzara, G., 2021. A one step enhanced extraction and encapsulation system of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) polyphenols and iridoids with β -cyclodextrin. *LWT* 141, 110884. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110884>
- Rebello, S., Asok, A.K., Mundayoor, S., Jisha, M.S., 2014. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environ Chem Lett* 12, 275–287.
<https://doi.org/10.1007/s10311-014-0466-2>
- Shirsath, S.R., Sonawane, S.H., Gogate, P.R., 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 53, 10–23.
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2012.01.003>
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, Green Extraction Techniques* 71, 100–109.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 8, 303–313.
[https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
- Wakte, P.S., Sachin, B.S., Patil, A.A., Mohato, D.M., Band, T.H., Shinde, D.B., 2011. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology* 79, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.03.010>

Yan, A., Von Dem Bussche, A., Kane, A.B., Hurt, R.H., 2007. Tocopheryl polyethylene glycol succinate as a safe, antioxidant surfactant for processing carbon nanotubes and fullerenes. *Carbon* 45, 2463–2470. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.08.035>

Conclusion

La demande actuelle de mise en œuvre de produits de consommations plus sains a motivé la recherche de procédés d'extraction plus « verts » et de systèmes permettant de prolonger la stabilité et la solubilité des substances actives extraites. Néanmoins, la combinaison des procédures d'extraction et d'encapsulation pour améliorer le recouvrement en molécules actives et pour augmenter leur stabilité reste rare.

Ces travaux de thèse ont montré la possibilité de combiner l'extraction de substances naturelles lipophiles avec leur encapsulation simultanée dans des NEs H/E et de stabiliser les formulations résultantes, appelées extremulsions, grâce au procédé de lyophilisation. Les objectifs concernant les propriétés des extremulsions en termes de stabilité ont été atteints et le procédé s'est avéré pouvoir concurrencer sur de nombreux aspects les procédés d'extraction innovants décrits dans la littérature. Le principal défi pour la mise en échelle et l'application industrielle des extremulsions consiste à disposer d'informations suffisantes sur la faisabilité du modèle économique et sur l'accueil des produits obtenus par le consommateur potentiel.

L'avenir du traitement des molécules d'origine végétale doit reposer sur le concept de bioraffinerie, c'est-à-dire sur la combinaison de techniques qui réutilisent les matrices végétales résiduelles afin de parvenir à une production durable et qui répondent aux demandes et aux besoins du consommateur. L'extraction de substances bioactives, à partir de végétaux, combinée à l'encapsulation afin d'augmenter la durée de conservation est un bon moyen de valoriser les matrices végétales et d'étendre leur utilisation. En outre, l'extraction de substances actives lipophiles présentes dans des matrices végétales résiduelles de l'industrie agroalimentaire via le procédé extrémulsion pourrait être une stratégie intéressante afin d'augmenter la durabilité du procédé proposé.

Annexes

La curcumine a été largement étudiée et reconnue pour ses effets prometteurs sur la santé. Cependant, il existe un consensus sur le fait que ses bienfaits thérapeutiques sont limités par sa faible solubilité dans l'eau et sa dégradation biochimique et structurelle dans les conditions physiologiques du transit, ce qui altère sa biodisponibilité. L'utilisation des NEs pour améliorer la solubilité dans l'eau et la stabilité de la curcumine est largement décrite dans la littérature. Dans notre étude, nous proposons un procédé vert permettant d'extraire et d'encapsuler la curcumine dans des NEs en une seule étape. Ce procédé a permis l'obtention de NEs monodisperses avec des gouttelettes d'environ 100 nm chargées en curcumine appelées extrémulsions. La solubilité dans l'eau ainsi que la stabilité dans le temps de la curcumine ont été améliorées grâce à ces formulations. Les extrémulsions de curcumine ont ensuite été séchées grâce à un procédé de lyophilisation afin d'augmenter leur stabilité au stockage.

A la suite de cette étude, des travaux complémentaires ont été réalisés en collaboration avec l'équipe C2VN d'Aix-Marseille Université afin d'étudier le devenir de la curcumine d'extrémulsions sèches ou réhydratées pendant la digestion et son assimilation par les cellules intestinales et de les comparer aux propriétés d'une formulation commerciale, la curcumine adsorbée sur silice, soumise aux mêmes conditions.

Dans un premier temps, la cytotoxicité des extrémulsions de curcumine a été évaluée grâce à des tests MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Ces tests ont démontré que les extrémulsions de curcumine n'entraînaient aucune baisse de la viabilité des cellules de la lignée Caco-2 de 1 à 20 μ M durant 24 h.

Dans un second temps, la stabilité de la curcumine des extrémulsions sèches et réhydratées et celle de la formulation commerciale a été étudiée dans des milieux mimant les conditions gastriques et intestinales (milieux biopertinents). La curcumine des extrémulsions sèches a présenté une stabilité similaire à la curcumine adsorbée sur silice dans les fluides gastro-intestinaux simulés pendant 4 h. L'analyse par diffusion de la lumière (DLS) des extrémulsions

sèches ou réhydratées dans le milieu mimant les conditions gastriques pendant 4 h a permis de montrer que la taille des gouttelettes de ces formulations était stable. Ces analyses ont été réalisées à la suite d'une centrifugation à 20 000 G pendant 15 minutes afin d'éliminer les nanoobjets provenant des milieux ayant des tailles identiques aux gouttelettes des extrémulsions. En revanche, dans le milieu simulant les conditions intestinales, les extrémulsions sèches et les extrémulsions réhydratées ont présenté une distribution en taille de gouttelettes bimodale à partir de 1 h de mise en contact avec le milieu. La quantification de la curcumine présente dans le surnageant de ces échantillons a montré une diminution de la concentration en curcumine à partir de 2h de mise en contact. En considérant que la curcumine des extrémulsions est stable dans les milieux gastro-intestinaux simulés comme nous l'avons montré lors de la première partie de cette étude, ces résultats ont mis en évidence des échanges probables de curcumine entre les gouttelettes des extrémulsions et les nanoobjets présents dans le milieu biopertinent. Au cours de ces échanges, imputables à une probable réorganisation du mélange colloïdal, la curcumine pourrait fuir des extrémulsions et s'adsorber à des particules plus grosses écartées au cours de l'étape de centrifugation, ce qui expliquerait la baisse de curcumine observée en HPLC dans les surnageants.

Dans un troisième temps, un modèle de digestion *in vitro* a été utilisé pour déterminer la bio-accessibilité de la curcumine de ces formulations en présence d'aliment ou non. Les curcuminoïdes des extrémulsions sèches ou réhydratées ont présenté une bio-accessibilité supérieure à celle des curcuminoïdes adsorbés sur silice.

Enfin, une cinétique de captage, par les cellules Caco-2, de la curcumine des extrémulsions ainsi que des phases micellaires issues des digestions *in vitro* a été réalisée. Les résultats de la cinétique de captage des phases micellaires issues des digestions *in vitro* sont en cours de traitement. Les résultats de la cinétique de captage des extrémulsions ont montré que la curcumine, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine n'ont pas été retrouvées dans le compartiment basolatéral, quel que soit le temps d'incubation, que ce soit avec ou sans traitement à la β -glucuronidase. Ces résultats indiquent que les gouttelettes d'extrémulsions ne diffusent pas au travers des cellules Caco-2 par voie paracellulaire. En effet, les cellules Caco-2 sont de mauvaises sécrétrices au pôle basolatéral donc si nous avons

retrouvé de la curcumine à des temps d'incubation courts un passage en paracellulaire aurait pu être admis. Dans les cellules, la curcumine, la déméthoxycurcumine et la bisdéméthoxycurcumine n'ont été retrouvées qu'après 30 et 60 min et à des quantités relativement faibles, correspondant à des efficacités d'absorption inférieures à 3 %. Dans le compartiment apical, les trois curcuminoïdes ont montré une diminution de leurs quantités avec le temps d'incubation. Afin de différencier la diminution due à l'absorption cellulaire de celle due à la dégradation chimique, nous avons également réalisé une expérience similaire mais en l'absence de cellules. Nous avons observé une relative stabilité des quantités de curcuminoïdes jusqu'à 60 min suivie d'une diminution à partir de 120 min. Nous avons donc calculé la diminution des quantités de curcuminoïdes corrigée de celle due à la dégradation chimique et nous avons ensuite estimé l'efficacité de captage des curcuminoïdes. Ces résultats ont ainsi mis en évidence un captage efficace de la curcumine d'extrémulsions par les cellules Caco-2.

Les expériences réalisées en collaboration avec le laboratoire C2VN ont montré que l'incorporation des curcuminoïdes dans les extrémulsions permet d'améliorer leur biodisponibilité en comparaison avec la formulation commerciale qu'est la curcumine adsorbée sur silice.

Lors de cette collaboration, j'ai réalisé l'étude de stabilité des extrémulsions dans les milieux gastro-intestinaux simulés à Avignon Université et j'ai réalisé les digestions *in vitro* ainsi que les expériences de captage des extrémulsions sur les cellules Caco-2 avec le Dr Charles Desmarchelier à AMU. Les expériences de captage des phases micellaires sur les cellules Caco-2 ainsi que les extractions et les dosages suite aux expériences de digestion *in vitro* et de captage ont été réalisés par le Dr Charles Desmarchelier.

L'ensemble de ces travaux sera soumis prochainement dans le journal « Food Chemistry ».

Article en préparation

The incorporation of curcuminoids from *Curcuma longa* into extremulsions increases their bioaccessibility and intestinal cell uptake *in vitro*

Charles Desmarchelier^{1*#}, Alice Dall'Armellina^{2*}, Lucie Lecourt¹, Grégory Marconot¹,
Guillien Gillet¹, Patrick Borel¹ and Christiane Contino-Pépin^{2#}

¹ Aix Marseille Univ, INRA, INSERM, C2VN, Marseille, France.

² Avignon Université, Équipe CBSA, Avignon, France.

* These authors contributed equally.

Corresponding authors

Abstract

Curcumin is a polyphenol with many potential health benefits but its poor water solubility and stability under physiological transit conditions impair its bioavailability. In a preliminary study its water solubility and stability were enhanced using extremulsions. Extremulsions are nanoemulsions resulting from an extraction/encapsulation process and dried to enhance their stability and storage. Here, the objective was to study the fate of curcuminoids from extremulsions during digestion and intestinal cell uptake compared to curcumin adsorbed on silica. The stability of extremulsions in gastro-intestinal fluids and submitted to *in vitro* digestion model and Caco-2 cell was also investigated. Curcuminoids from extremulsions display higher bio-accessibility compared to curcuminoids adsorbed on silica. They display similar stability in simulated gastro-intestinal fluids. They are taken up by Caco-2 cells efficiently and do not undergo paracellular transport. The incorporation of curcuminoids into extremulsions offers a potential way to increase the bioavailability of these poorly absorbed phytochemicals.

Key words: curcuminoids, digestion, bioavailability.

Introduction

Curcumin and chemically-related molecules, collectively referred as curcuminoids, are lipid-soluble polyphenols found in the rhizome of turmeric (*Curcuma longa*) giving it its yellow color. Turmeric is widely used in cooking, particularly in Indian cuisine, in its dried powdered or fresh form. Turmeric extract, usually containing a mixture of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, is also used as a food additive or as a dietary supplement. The potential health effects of curcumin and turmeric extracts have been investigated in numerous studies but curcumin has never been shown to be conclusively effective in a randomized-controlled trial for any indication (Nelson, Dahlin, Bisson, Graham, Pauli, & Walters, 2017). Due to its poor solubility in the aqueous environment of the intestinal lumen, its fast biotransformation and its quick excretion of the body, it is only found at small concentrations in the circulation (Anand, Kunnumakkara, Newman, & Aggarwal, 2007). Numerous strategies have been employed to increase its bioavailability, focusing primarily on its intestinal absorption. Among these, encapsulation in different vehicles has been tried. Nanoemulsion-based delivery systems were especially explored due to their relatively small droplet size and kinetic stability allowing to increase both solubility, controlled release and absorption in the gastrointestinal tract of bioactive compounds (McClements and Rao, 2011).

Researchers like Chakravarty *et al.* and Račková *et al.* suggested that constituents of turmeric other than curcumin act synergistically and recommend use of turmeric extract instead of curcumin alone to get a better anti-inflammatory and anticancer effect (Chakravarty *et al.*, 2009). However, these studies were carried out on ethanolic turmeric rhizome extracts, which is in contradiction with the growing interest for natural products of consumers and industries. In order to provide a more natural formulation of turmeric extract, we have recently developed a new solvent-free process to concomitantly extract and encapsulate curcumin in nanoemulsions. The resulting formulations are called “extremulsions” for “extracts-emulsions”.

In this study, the impact of curcumin loading in extremulsions on its bio-accessibility and intestinal cell uptake *in vitro* has been investigated.

Materials and methods

Chemicals

D- α -Tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS 1000), tributyrin (98%), acetonitrile (HPLC grade), acetone (99,8%), trifluoroacetic acid, sodium taurocholate, pepsin and trehalose were purchased from Sigma-Aldrich. Labrafac CC was provided by Gattefosse (Saint-Priest, France). Lecithin was a gift from Lipoid (Lipoid S 100). Turmeric extract adsorbed on micro-granular silica with spherical particles (95% pure) was from Evonik Industries. NaCl was from Alfa Aesar. NaOH, was from Panreac Aldrich. HCl was from Acros organics. NaH₂PO₄ and dichloromethane were purchased from Carlo-Erba Reagent (Peypin, France).

β -glucuronidase type H1 from *Helix Pomatia* was from Sigma-Aldrich. Bisphenol B (98.4% pure) was from Interchim. Ethyl acetate and methanol were HPLC grade reagents from Carlo-Erba Reagent (Peypin, France). Acetic acid (LC-MS grade) was from Merck-Millipore (Molsheim, France). Physico-chemical properties of curcumin were retrieved from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Curcumin formulations

Curcumin extremulsions were prepared using an ultrasound-based technique as previously reported (ref). Briefly, 150 mg of TPGS 1000 was dissolved in 10 mL of milliQ water. This solution was vigorously mixed with 1 g of *Curcuma longa* powder, 212.5 mg of tributyrin and 37.5 mg of Labrafac CC and sonicated for 2 minutes. The solution was cooled using an ice bath during all the process. After sonication, the ultrasonic probe was washed with milliQ water and the rinsing water was added to the emulsion. *Curcuma longa* residues were removed by a first centrifugation for 1 minute at 1100 G and the supernatant volume was centrifugated a second time for 5 minutes at 10 000 G. The last supernatant volume was collected as curcumin extremulsion sample and adjusted to 10 mL with milliQ water in a volumetric flask. After preparation, all extremulsions were stored at 4°C. The extremulsion was then diluted by 2 with a trehalose solution (100 g/L) and aliquoted in 400 μ L batches in 2 mL semi-stoppered vials. The freeze drying of these batches was performed on an industrial scale freeze dryer Lyovac GT4 (Usifroid, Maurepas, France). The freeze-drying procedure was as follows: freezing at -40 °C for 90 min, primary drying at -34 °C for 120 min follow of a plateau of 10h; then, the shelf temperature was raised to -10 °C for 5h and maintained during 7 h.

Dry extremulsions were rehydrated with half of the water volume of their parent solutions

(200 μL) and the droplet size distribution of the redispersed sample was analyzed by dynamic light scattering (DLS) using a Nano-S Nanosizer (Malvern Instrument) as previously reported (ref). Results were reported as the average diameter (Z-average) and polydispersity index (PDI).

Curcumin was quantified by HPLC analysis as described previously (ref). Briefly, a calibration curve was constructed by the dilution of curcumin standard with acetonitrile to provide the desired concentrations (1.0, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0 and 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 100 μL of sample was added to 300 μL of acetonitrile, mixed vigorously, filtered through nylon membrane filter (0.2 μm) and injected on a Waters system to determine the curcumin concentration in extremulsion. Each HPLC measurement was done in triplicate. The amount of curcumin in the extremulsion was calculated from the concentration of curcumin and compared to the amount obtained after Soxhlet extraction. The recovery rate was calculated as below:

$$\text{Recovery rate (\%)} = \frac{\text{Curcumin mass from extremulsion extraction}}{\text{Curcumin mass from Soxhlet extraction}} \times 100$$

Extremulsions stability in biorelevant media

According to Vertzoni *et al.*, 20 mL of Fasted State Simulated Gastric Fluid (FaSSGF) were prepared with 0.86 μg of sodium taurocholate, 0.4 μg of lecithin, pepsin at 0.1 mg/mL and NaCl at 34.2 mM. (Vertzoni *et al.*, 2005) 20 mL of Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF) were prepared according to the protocol described by Marques. (Marques, 2004). 33.1 mg sodium taurocholate is dissolved in 5 ml blank FaSSIF (buffer without the bile components), 118 μL of a solution containing 100 mg/ml lecithin in methylene chloride is added to form an emulsion, and the methylene chloride is eliminated under vacuum until a clear, micellar solution having no perceptible odor of methylene chloride is obtained. After cooling to room temperature, the volume is adjusted to 20 mL with blank FaSSIF.

Kinetic degradation of curcumin was evaluated under four conditions in quadruplicate: 1) freeze-dried extremulsion redispersed in FaSSGF, 2) freeze-dried extremulsion redispersed in FaSSIF, 3) curcumin -silica nanocomplex dissolved with FaSSGF, 4) curcumin -silica nanocomplex dissolved with FaSSIF.

One mL (volume of “fresh” extremulsion before freeze-drying) freeze-dried extremulsions were alternatively redispersed in 7.2 mL of FaSSGF or in 9.5 mL of FaSSIF and then aliquoted in four vials in order to quadruplicate the following studies. 153,73 μg of curcumin-silica

nanocomplex were rehydrated with 1 mL of distilled water and then alternatively diluted with 7.2 mL of FaSSGF or with 9.5 mL of FaSSIF and then aliquoted in four vials. Each vial was homogenized 4h in a rotating incubator (G76 Gyrotory water bath shaker, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) at 37°C. 500 µL of solution were collected in quadruplicate at 0, 120 and 240 min. 20 µL of each sampling was then analyzed by HPLC using the protocol described in the section 2.2 after a dilution by 2 in acetonitrile and a 0.2-microns filtration.

Gastro-intestinal fluids were centrifuged using at 20 000 G during 15 minutes with a sorvall st 16 centrifuge (thermo scientific, Pittsburgh, Pa.). Extremulsion were then diluted by 2 with both gastric and intestinal fluid and all samples were then analyzed by DLS using the protocol described in section 2.2.

A further kinetic degradation of curcumin during 4 h of dry and rehydrated extremulsions was achieved in biorelevant media mimicking gastric and intestinal fluids (FaSSGF and FaSSIF) with the same protocol described above using higher sample volumes. 300 mg of dry extremulsion were brought into contact with 37 mL of gastric fluid and 50 mL of intestinal fluid. 3.7 mL of rehydrated extremulsions were brought into contact with 37 mL of gastric fluid and 50 mL of intestinal fluid. All experiments were carried out in quadruplicates and 1 mL-sampling were collected at 0, 1, 2, 3 and 4h in quadruplicates. Each sampling was centrifuged during 15 minutes at 20 000 G and then analyzed by DLS and HPLC using the protocol described in section 2.2.

***In vitro* digestions**

In order to study the effect of the food matrix on curcumin bioaccessibility, two curcumin-rich meals were compared, each containing a mass of fresh or dried curcumin-loaded extremulsion equivalent to 1 mg of curcumin, i.e. equivalent to 133 ppm when food was present. The first meal had only curcumin. The second meal was a meat- and potato-based meal (Reboul, Richelle, Perrot, Desmoulins-Malezet, Pirisi, & Borel, 2006). For the meal with food, olive oil was added so that the final lipid content was 3.2%. *In vitro* digestions were carried out as previously described (Desmarchelier, Tourniaire, Preveraud, Samson-Kremser, Crenon, Rosilio, et al., 2013). A total of 7.5 g of meal were ground in 32 mL of NaCl 0.9% (30 s at 22 000 rpm) (T 18 basic Ultra-Turrax disperser, IKA, Staufen, Germany). At the end of the digestion, the aqueous phase containing mixed micelles was separated from food particles by centrifugation (2000 g for 1h07 at 10°C). In order to eliminate nonmicellar particles that were

recovered in the aqueous phase, it was passed through a 0.8 and a 0.22 μm filter (mixed cellulose esters; Millipore) to obtain the micellar phase. The digestate at the end of the duodenal digestion and the different phases obtained after centrifugation, *i.e.* the aqueous and the micellar phases and the nonsolubilized food debris, were collected, weighed and samples were stored at -20°C until lipid extraction and HPLC analysis. Curcuminoid solubilization in the aqueous and micellar phases was calculated as the ratio of the amount of curcuminoids present in the aqueous and micellar phases respectively to the amount of curcuminoid present in the digestate at the end of the duodenal digestion.

Caco-2 cell culture and measurement of curcuminoids uptake efficiency

Caco-2 clone TC-7 cells were a gift from Dr. M. Rousset (UMR_S 872, Paris, France) and they were cultured as previously described (Reboul, Abou, Mikail, Ghiringhelli, André, Portugal, et al., 2005), with a minor modification only, *i.e.* in the presence of DMEM supplemented with 16% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% non-essential amino acid and 1% antibiotics (complete medium).

In a preliminary experiment, extremulsion toxicity on intestinal cells was determined by the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) assay. Prior to the assay, cells (passage number 51) were seeded in 96-well plates at a density of 10 000 cells/well and they were cultured for one week in the presence of complete medium changed every day. For the assay, six concentrations of extremulsions dispersed in DMEM (1, 2, 3.33, 5, 10 and 20 μM) and five incubation times (0.5, 1, 2, 4 and 24 h) were tested with $n=4$ for each condition. Complete medium was replaced by 200 μL of extremulsions and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of air/ CO_2 (90:10, v/v). At the end of the incubation time, extremulsions were replaced by 200 μL MTT solubilized in DMEM (0.05 mg/mL) and further incubated for 2 h. MTT solutions were then replaced by 100 μL DMSO (Sigma-Aldrich) and plates were vigorously shaken to ensure homogenization. Absorbance was then measured at 540 nm, which corresponds to the wavelength of maximal absorption of formazan, produced by the reduction of MTT by viable cells, using a plate reader (Labsystems iEMS Reader MF, Unity Lab Services, Thermo Fisher Scientific). Cell survival was calculated as follows:

$$\% \text{ Cell survival} = \frac{\text{Mean absorbance in test wells}}{\text{Mean absorbance in control wells}} \times 100$$

For the measurement of the uptake efficiency of curcuminoids incorporated into extremulsions, cells were seeded and grown on Millicell® hanging cell culture inserts (Millipore S.A.S., Molsheim, France) for 21 days to obtain confluent and highly differentiated cell monolayers. Twelve hours prior to each experiment, the medium in both the apical and basolateral chambers was replaced with serum-free complete medium. The apical side of the cell monolayers received 1 mL of curcuminoids-rich extremulsions. Cell monolayers were incubated at 37°C for 0.5, 1, 2, 4 and 24 h. After the incubation period, media from each side of the membrane were collected. Cell monolayers were washed twice with 1 mL of PBS, scraped and collected in 500 µL of PBS. All samples were stored at -20°C until extraction and HPLC analysis. Additionally, to measure the degradation kinetics of curcuminoids incorporated in extremulsions, the experiment was mimicked in 6-well plates without cells

Lipid extraction

Curcumin was extracted from 500 µL aqueous samples using the following method: the mixture was extracted twice with two volumes of an ethyl acetate/methanol mixture (95/5; v/v), using bisphenol B as an internal standard. The organic phases obtained after centrifugation (1200 × *g*, 10 min, 4°C) were evaporated to dryness under nitrogen, and the dried extract was dissolved in 200 µL of methanol. A volume of 10-50 µL was used for HPLC analysis.

Upon their uptake by enterocytes, curcuminoids undergo glucuronidation and sulphation (Dempe, Scheerle, Pfeiffer, & Metzler, 2013). Therefore, prior to lipid extraction, in order to measure the uptake efficiency of curcuminoids by Caco-2 cells, cell culture samples were treated with β-glucuronidase type H1 from *Helix Pomatia*, which also displays a sulfatase activity, as described previously (Frank, Schiborr, Kocher, Meins, Behnam, Schubert-Zsilavec, et al., 2017; Kocher, Schiborr, Behnam, & Frank, 2015). Briefly, 5 µL 6 M hydrochloric acid were added to 500 µL sample. Fifty µL β-glucuronidase solubilized in 0.1 M sodium acetate (in order to reach 6 000 U/mL) were added to each sample and were then incubated for 45 min at 37 °C.

Curcumin quantification

Curcumin concentration was measured as previously described (Wichitnithad, Jongaroonngamsang, Pummangura, & Rojsitthisak, 2009), using a 5 µm C18 Zorbax Uptisphere

column (250 × 4.6 mm ; Interchim) and a guard column. The mobile phase was a mixture of 2% acetic acid/acetonitrile (60/40, v/v). Flow rate was 2 mL/min and the column was kept at a constant temperature (40 °C). The HPLC system comprised a Thermofisher pump, autosampler and diode array detector (Ultimate 3000). Curcumin was detected at 425 nm and was identified by retention time and spectrum compared with pure standard. Quantification was performed using Chromeleon software (version 7.2.10) comparing the peak area with standard reference curves. All solvents used were HPLC grade.

Statistics

Data were expressed as means ± SEM. Differences in Vitamin D form micellar incorporation and cellular uptake and efflux were tested using ANOVA (fixed-effects models). Prior to ANOVA, data were tested for equality of variances. Tukey's test, which maintains the family-wise error rate at alpha = 0.05, was used as a post hoc test for pairwise comparisons. Student's t-test was used to test the effect of membrane protein inhibition on the different form uptake. Data were tested for equality of variances and in case of inhomogeneous variances, Welch's correction was applied to Student's t-test. Values of p < 0.05 were considered significant. Statistical analyses were performed using SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Bioaccessibility of curcuminoids from extremulsion

Following *in vitro* digestions, the digestate was centrifuged to separate undigested food debris from the aqueous phase, which was filtered to obtain the micellar phase (**Figure 1**).

Extremulsion stability in biorelevant media vs curcumin-silica nanocomplex

The stability of curcumin-rich dry extremulsions and of a commercial curcumin formulation (curcumin adsorbed on silica) was followed during 4 h in two biorelevant media mimicking gastric and intestinal fluids (FaSSGF and FaSSIF) (Figure 2A). Both curcumin formulation showed similar stability in both media.

Both biorelevant media were analyzed in DLS and showed a polydisperse distribution with

one of the populations centered around 110 nm (Figure 2B). Extremulsion resulted in droplets of 72 ± 1 nm in diameter and a PDI of 0.20. As, extremulsions were also composed of droplets with a mean diameter in the same range, biorelevant media were centrifuged at different speeds and times in order to avoid size overlapping. A centrifugation at 20 000 G during 15 minutes appeared to be the best condition and allowed to obtain a monomodal distribution with aggregates (probably mixed micelles) around 36 nm for both gastric and intestinal fluids. A centrifugation at 20 000 G for 15 minutes was then applied to rehydrated extremulsions after dilution with both medias in order to discriminate extremulsion droplets and self-assembled aggregates from the biorelevant medium. Extremulsion diluted by 2 with the gastric fluid exhibited droplets of 112 nm and a polydisperse index of 0.33 while extremulsions diluted by 2 with the intestinal fluid exhibited droplets of 104 nm and a polydispersity index of 0.28.

Dry and rehydrated extremulsions were incubated with gastric and intestinal fluids at 37°C during 4h. Aliquots of incubating solutions were collected at different times and centrifuged at 20 000 G for 15 minutes. Supernatants were analyzed by DLS (Figure 2C) and their curcumin concentration assessed by HPLC.

As regards the DLS analysis, while the size distribution of both formulation (dry and rehydrated extremulsions) remained unchanged during the whole incubation time in the gastric medium (Figure 2C-A and 2C-B), in intestinal conditions, droplets exhibited a bimodal size distribution after 1 h of incubation (Figure 2C-C and 2C-D). A first population at around 25 nm (that can probably be ascribed to micelles) and another population at 200 nm were observed for both dry and rehydrated formulation. In both cases, the second population seemed to predominate at 1h and 4 h (according to the DLS analysis by contin).

Curcumin concentration of centrifuged aliquots collected at T_0 , T+1h, T+2h, T+3h and T+4 h of contact with the medium mimicking intestinal condition was estimated by HPLC (Figure 2D). As shown in Figure 2D, the concentration of curcumin decreased after 2 hours of incubation. This decrease of curcumin in the supernatant samples together with the size distribution profile over time (Figure 2C-C and 2C-D) can probably be ascribed to a curcumin exchange between extremulsion droplets (predominant at T_0) and a mixture of aggregates, composed of mixed-micelles and mixed-droplets (after T+1h) occurring over time. These curcumin exchanges are prone to curcumin loss as free curcumin is probably adsorbed to large particles removed from the medium during the centrifugation step.

Uptake efficiency of curcuminoids-rich extremulsions by Caco-2 cells

Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin were not found in the basolateral compartment at any incubation time, whether with or without treatment with β -glucuronidase. Curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin were found in cells only after 30 and 60 min and at relative low amounts, corresponding to uptake efficiencies < 3%. In the apical compartment, all three curcuminoids displayed a decrease in their amounts together with incubation time. In order to differentiate the decrease due to cellular uptake to that due to chemical degradation, we also carried out a similar experiment but in the absence of cells. We observed a relative stability of curcuminoid amounts up to 60 min followed by a decrease from 120 min onwards. We thus calculated the decrease of curcuminoid amounts corrected from that due to chemical degradation and we then estimated curcuminoid uptake efficiency (**Figure 3**).

Discussion

Curcumin has been shown to exhibit low oral bioavailability due to its chemical instability, low solubility, poor gastrointestinal absorption, high metabolism and rapid systemic elimination (Anand, Kunnumakkara, Newman, & Aggarwal, 2007). To be absorbed by the gastrointestinal tract, curcumin must first be solubilized in the aqueous environment of the intestinal lumen and then be transported across the gastrointestinal epithelium. The fate of curcumin during digestion remains poorly understood and we thus decided to focus our study on the key limiting processes involved. Curcumin is a slightly hydrophobic compound, with a logP of 3.2, and must thus be ingested within a water-soluble structure or extracted from the bolus/chyme and incorporated into a water-soluble structure during digestion in order to be available for absorption, *i.e.* bioaccessible.

The first objective of the study was to compare the stability of curcumin-rich dry extremulsions versus silica-adsorbed curcumin in simulated gastrointestinal fluids for 4 h. The degradation kinetics of curcumin showed that both formulations were able to protect curcumin during 4 h in these gastro-intestinal conditions. This study then aimed to investigate

the droplet size evolution of dry or rehydrated extremulsions in these same media for 4 h. Droplets from dry and rehydrated extremulsions were stable in gastric conditions but a destabilization of the colloidal solution appeared in intestinal conditions. A further investigation was the curcumin quantification of the supernatant of dry and rehydrated extremulsions in the intestinal fluid. Considering that the curcumin in the extremulsions is stable in the simulated gastrointestinal media as observed during the degradation kinetic of curcumin without centrifugation, the loss of curcumin measured in the supernatant certainly comes from the centrifugation step necessary during the DLS. Centrifugation would result in the removal of large particles in the centrifugal pellet, on which curcumin can be adsorbed. In addition, results of DLS analysis and HPLC quantification of curcumin in the supernatant are consistent with curcumin exchanges between curcumin-loaded droplets of extremulsions and mixed-micelles from the biorelevant medium.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Region Sud and Lyofal company (Salon de Provence) for funding the PhD thesis grant of A. Dall'armellina. This study was conducted with the financial support of the European Regional Development Fund, the French Government, the Sud Provence-Alpes-Côte d'Azur Region, the Departmental Council of Vaucluse and the Urban Community of Avignon.

References

- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm*, *4*(6), 807-818.
- Dempe, J. S., Scheerle, R. K., Pfeiffer, E., & Metzler, M. (2013). Metabolism and permeability of curcumin in cultured Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res*, *57*(9), 1543-1549.
- Desmarchelier, C., Tourniaire, F., Preveraud, D. P., Samson-Kremser, C., Crenon, I., Rosilio, V., & Borel, P. (2013). The distribution and relative hydrolysis of tocopheryl acetate in the different matrices coexisting in the lumen of the small intestine during digestion could explain its low bioavailability. *Mol Nutr Food Res*, *57*(7), 1237-1245.
- Frank, J., Schiborr, C., Kocher, A., Meins, J., Behnam, D., Schubert-Zsilavec, M., & Abdel-Tawab, M. (2017). Transepithelial Transport of Curcumin in Caco-2 Cells Is significantly Enhanced by Micellar Solubilisation. *Plant Foods Hum Nutr*, *72*(1), 48-53.
- Kocher, A., Schiborr, C., Behnam, D., & Frank, J. (2015). The oral bioavailability of curcuminoids in healthy humans is markedly enhanced by micellar solubilisation but not further improved by simultaneous ingestion of sesamin, ferulic acid, naringenin and xanthohumol. *Journal of Functional Foods*, *14*, 183-191.
- Nelson, K. M., Dahlin, J. L., Bisson, J., Graham, J., Pauli, G. F., & Walters, M. A. (2017). The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J Med Chem*, *60*(5), 1620-1637.
- Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., André, M., Portugal, H., Jourdheuil-Rahmani, D., Amiot, M. J., Lairon, D., & Borel, P. (2005). Lutein transport by Caco-2 TC-7 cells occurs partly by a facilitated process involving the scavenger receptor class B type I (SR-BI). *Biochem J*, *387*(Pt 2), 455-461.
- Reboul, E., Richelle, M., Perrot, E., Desmoulins-Malezet, C., Pirisi, V., & Borel, P. (2006). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *J Agric Food Chem*, *54*(23), 8749-8755.
- Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura, S., & Rojsitthisak, P. (2009). A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochem Anal*, *20*(4), 314-319.

Figure legends

Figure 1. Solubilization of curcumin from two extremulsion formulations (“fresh” extremulsion, referred as “*emulsion*” or dried-extremulsion referred as “*powder*”) following *in vitro* digestion conditions with or without food matrice.

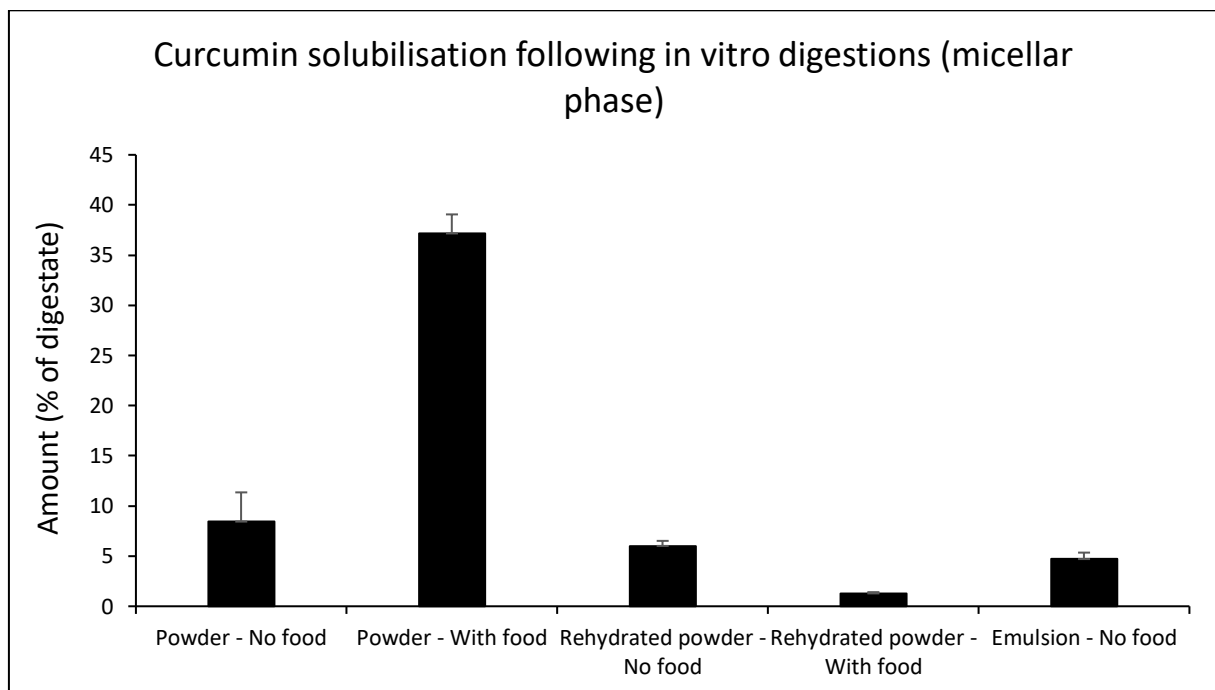
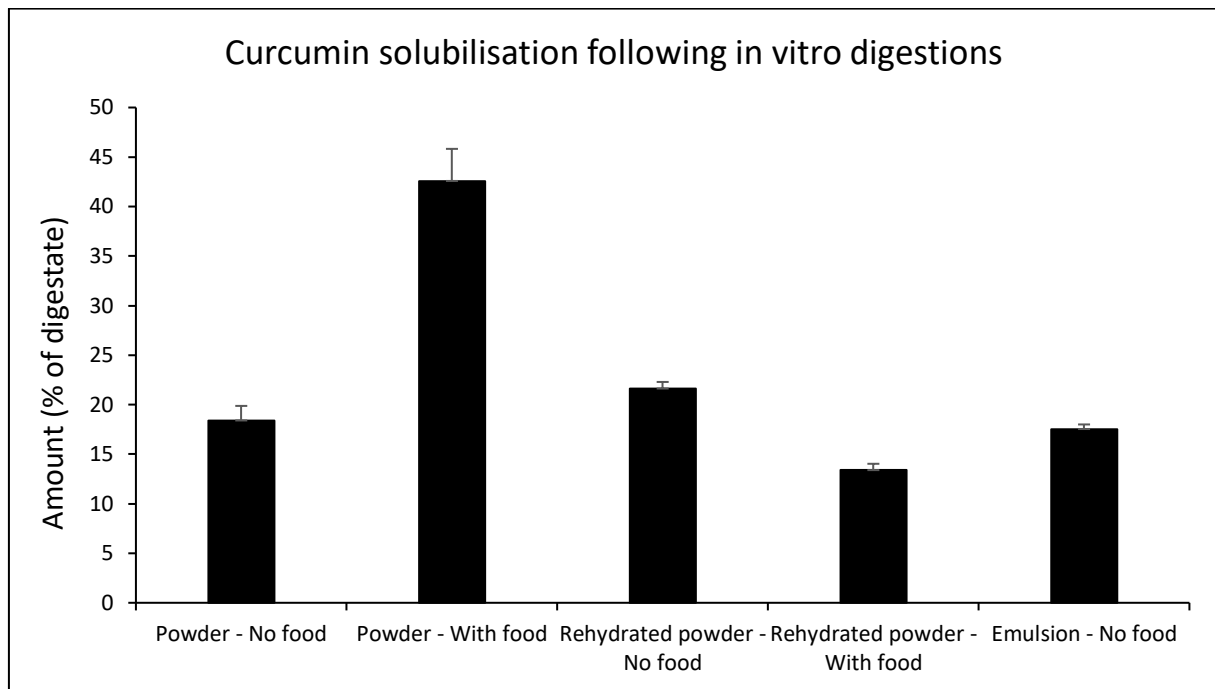


Figure 2A. Follow of the curcumin concentration over time of curcumin-rich dry extremulsions and of a commercial curcumin formulation (curcumin adsorbed on silica) in two biorelevant media mimicking gastro-intestinal fluids.

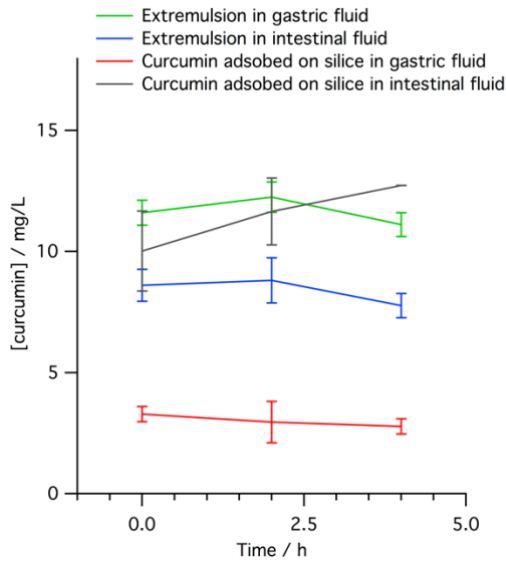


Figure 2B. DLS measurements of non-centrifuged extremulsion and gastro-intestinal fluids, compared to centrifuged (20 000 G,15 min) extremulsion after rehydration and dilution with gastro-intestinal fluids.

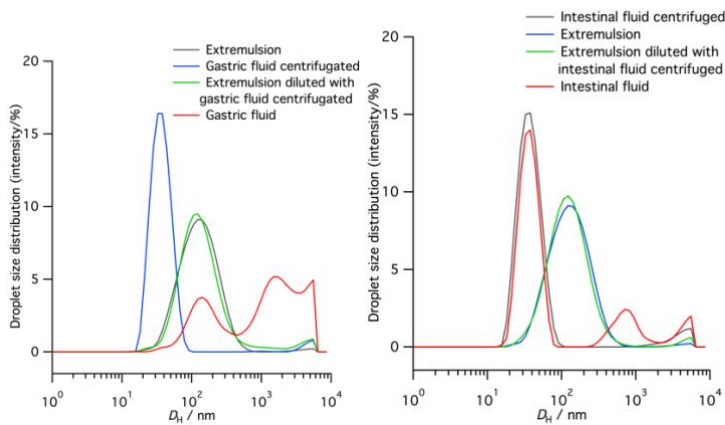


Figure 2C. DLS follow of dry extremulsion dispersed in gastric fluid (A); dry extremulsion rehydrated and diluted with gastric fluid (B); DLS follow of dry extremulsion dispersed in intestinal fluid (C); dry extremulsion rehydrated and diluted with intestinal fluid (D).

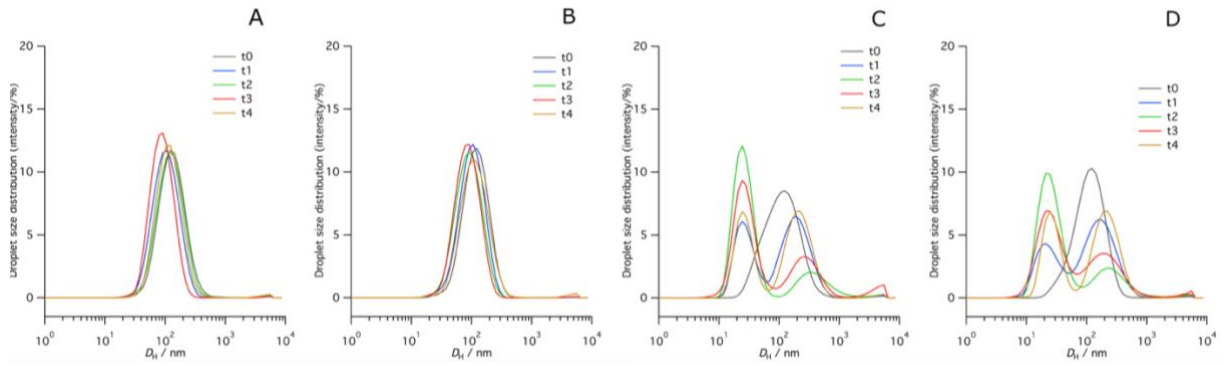


Figure 2D. Curcumin concentration over time of dry extremulsion dispersed in intestinal fluid and of dry extremulsion rehydrated and diluted with intestinal fluid after centrifugation (at 20 000 G during 15 min).

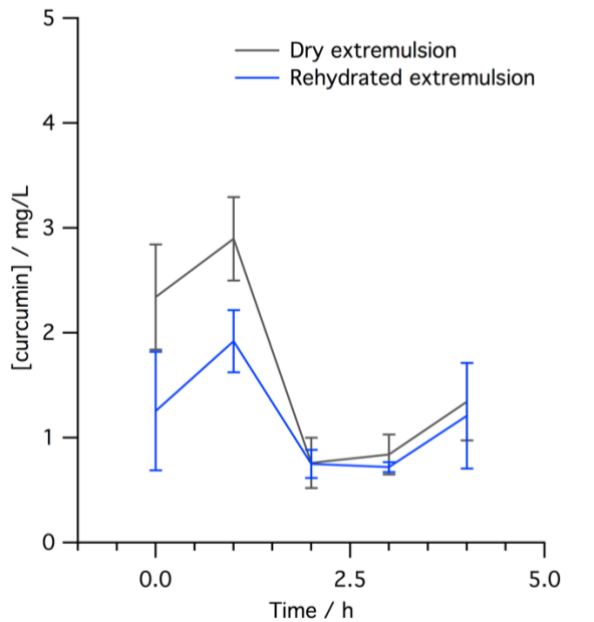


Figure 3.

Figure 3A.

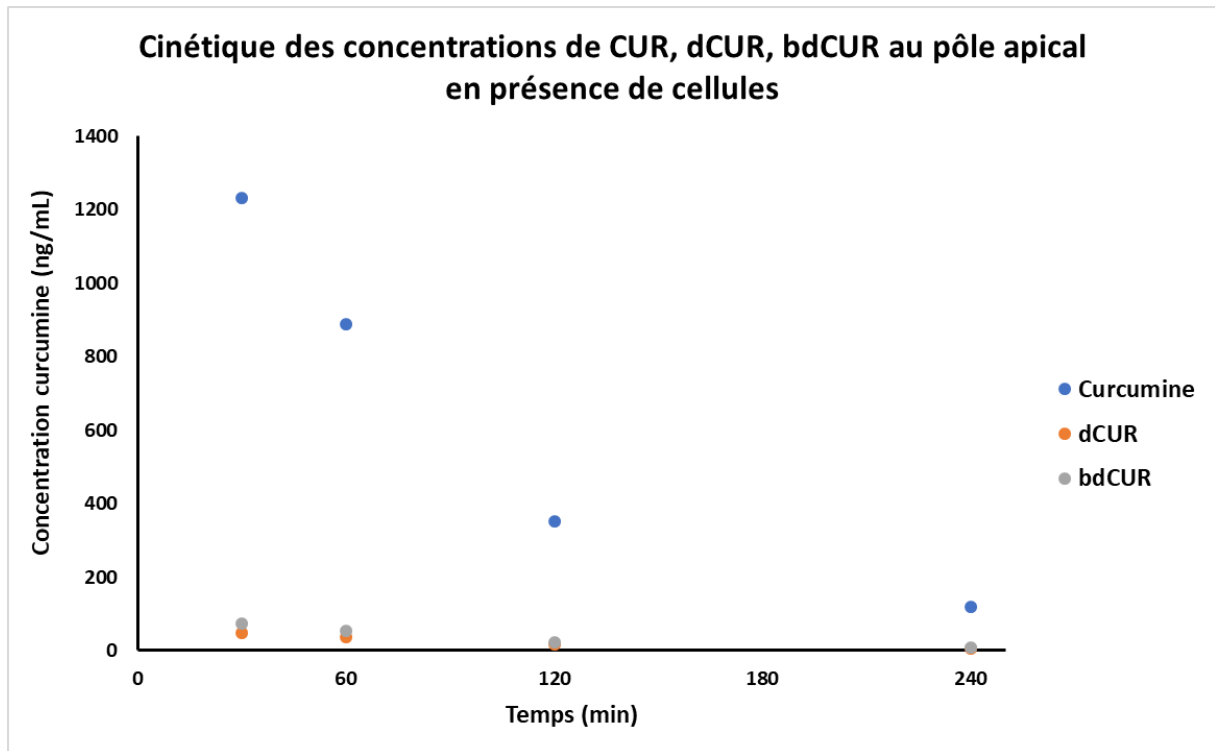


Figure 3B.

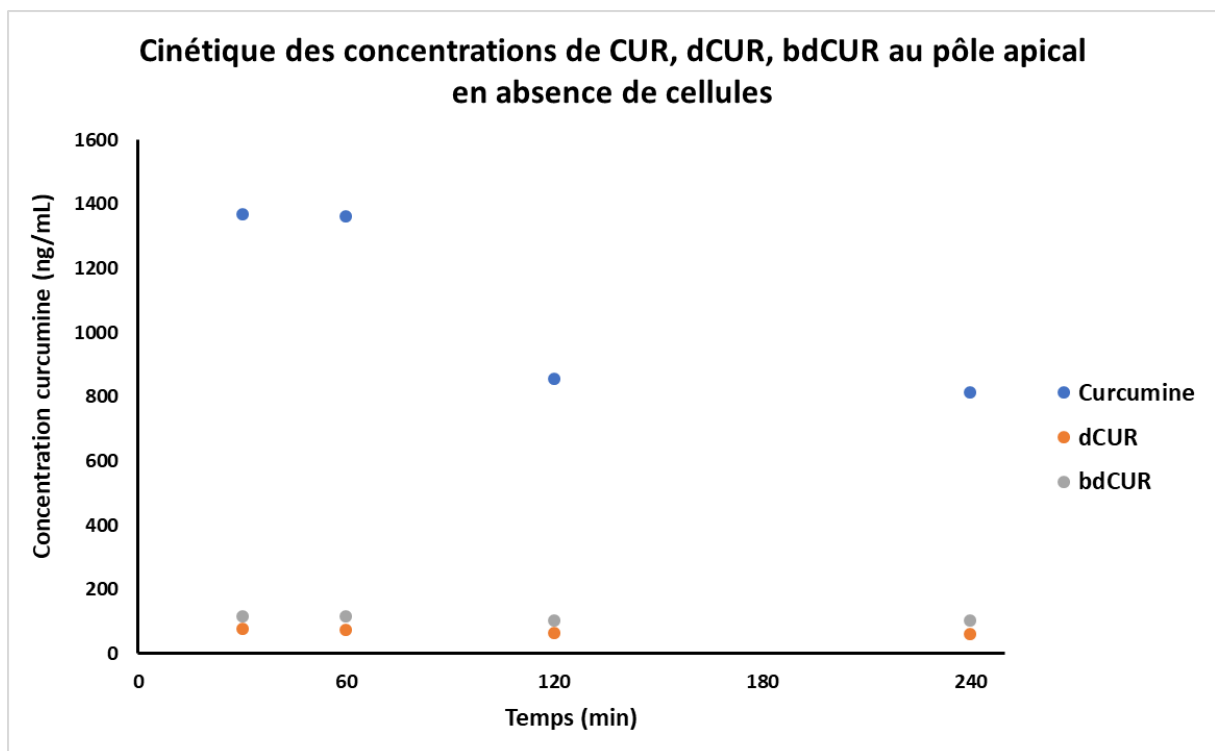


Figure 3C. Uptake efficiency of curcuminoid by Caco-2 cells (taking into account the chemical degradation of compounds).

	CUR	dCUR	bdCUR
30 min	10%	36%	38%
60 min	35%	53%	55%
120 min	59%	76%	78%
240 min	85%	92%	93%