



**HAL**  
open science

# Valorisation par bioraffinage des co-produits des fruits de la Passion et de Goyavier pour la mise en oeuvre de peintures écoconçues

Alice Delvar

## ► To cite this version:

Alice Delvar. Valorisation par bioraffinage des co-produits des fruits de la Passion et de Goyavier pour la mise en oeuvre de peintures écoconçues. Cristallographie. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2019. Français. NNT : 2019INPT0047 . tel-04166767

**HAL Id: tel-04166767**

**<https://theses.hal.science/tel-04166767v1>**

Submitted on 20 Jul 2023

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Sciences des Agroressources

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme ALICE DELVAR

le mardi 28 mai 2019

**Titre :**

Valorisation par bioraffinage des co-produits des fruits de la Passion et de Goyavier pour la mise en oeuvre de peintures écoconçues

---

**Ecole doctorale :**

Sciences de la Matière (SDM)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle ( LCA)

**Directeur(s) de Thèse :**

MME PASCALE DE CARO

M. YANIS CARO

**Rapporteurs :**

M. JEAN-LOUIS LANOISELLE, UNIVERSITE DE BRETAGNE SUD

M. PIERRE VILLENEUVE, CIRAD MONTPELLIER

**Membre(s) du jury :**

Mme MARTINE URRUTIGOITY, TOULOUSE INP, Président

Mme CHRISTINE RAYNAUD, TOULOUSE INP, Invité

Mme ELISABETH NEUHAUSER, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Invité

Mme PASCALE DE CARO, TOULOUSE INP, Membre

M. THOMAS PETIT, UNIVERSITE DE LA REUNION, Membre

M. YANIS CARO, UNIVERSITE DE LA REUNION, Membre





## Résumé

---

Les peintures naturelles, plus écologiques et plus saines, constituent une alternative intéressante aux peintures solvantées pour certaines applications. Les peintures naturelles de la gamme Natura, développée par la société DERIVERY, sont constituées d'un liant à base d'huile végétale mise en émulsion dans l'eau et répondent aux critères du label PURE. Afin de développer une nouvelle gamme de peintures écoconçues adaptées notamment au marché de l'Outre-Mer, de nouvelles sources locales d'approvisionnement en huile végétale tropicale sont nécessaires. Un biocide naturel est également recherché pour remplacer les biocides synthétiques actuellement utilisés dans les peintures en émulsion. Pour répondre à ces objectifs de sélection de nouveaux ingrédients naturels, les matières premières identifiées sont des co-produits issus de l'industrie agroalimentaire réunionnaise, notamment ceux en provenance de la production de jus des fruits de la passion et du goyavier rouge. Ces co-produits, ou ces écarts de production, sont composés de graines, de pulpes résiduelles et de peaux, non ou peu valorisés actuellement.

Les travaux réalisés ont montré la faisabilité technique de procédés d'extraction d'ingrédients multifonctionnels limitant les impacts environnementaux. Ainsi, en fonction de la nature du co-produit, les extractions d'huile des graines ont été réalisées par pression à froid, par macération éthanolique et par fluide supercritique (SC-CO<sub>2</sub>) et, pour les pulpes et peaux, des extraits aqueux et éthanoliques ont été étudiés. Les huiles des graines de fruit de la passion et de goyavier rouge ont des compositions en acides gras les classant comme huiles semi-siccatives, avec plus de 70 % d'acide linoléique. L'huile de fruit de la passion est riche en caroténoïdes agissant pour une meilleure conservation. L'huile de goyavier comporte une teneur élevée en stérols végétaux, intéressants pour la formulation de peinture grâce à leurs propriétés émulsifiantes. Les fractions obtenues à partir des pulpes de ces deux fruits tropicaux présentent des teneurs élevées en polyphénols associées à des activités antioxydantes notables, en particulier pour le goyavier rouge. Les extraits éthanoliques montrent également une activité antimicrobienne vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes et d'une souche fongique.

Deux autres procédés alternatifs d'extraction basés sur une activation thermomécanique ont été mis en œuvre à partir du fruit de la passion, en accord avec une démarche de bioraffinerie. Ces procédés permettent de réaliser simultanément une étape d'extraction et de pré-formulation d'émulsions, avec une extraction combinée des différentes molécules actives, lipophiles et hydrophiles. Le rôle des polyphénols et des protéines dans la stabilisation des émulsions est mis en évidence par rhéologie et par un suivi cinétique du crémage.

Des nouvelles émulsions ont été préparées avec les molécules actives obtenues et évaluées en tant que liants dans la fabrication des peintures naturelles de la gamme Natura. Les résultats ont permis de valider le concept d'utilisation de ces actifs végétaux pour l'écoconception de peintures naturelles dont les propriétés répondent aux spécifications visées. Les essais microbiologiques réalisés sur les formulations ont confirmé la capacité des extraits éthanoliques issus des deux fruits, à améliorer la résistance des peintures émulsionnées vis-à-vis d'une contamination microbienne.



## *Abstract*

---

Natural paints, with lower environmental and health impacts, are an interesting alternative to solvent-based paints for some applications. The company Derivery has developed a range of natural paints called Natura in agreement with the criteria of the Pure ecological label. The binder of these paints consists of an emulsion based on vegetable oils. In order to develop a new range of eco-designed paints adapted especially to the overseas market, new local sources of tropical vegetable oils are needed. A natural biocide is also sought to replace the synthetic biocides currently used in emulsion paints. To meet these objectives of selecting new natural ingredients, the raw materials identified are co-products from the Reunion food industry, especially the one resulting from the production of passion fruit and red strawberry guava juices. These co-products, or these output gaps, are composed of seeds, pulp and shells, which are currently not valued.

In this work, we showed the technical feasibility of processes with limited environmental impacts for the extraction of multifunctional ingredients. Thus, depending on the the co-product nature, the oil extractions were carried out by cold pressing, by maceration in ethanol or by SC-CO<sub>2</sub> from the seeds and aqueous or ethanolic extracts of the pulps were studied. Vegetable oils obtained from the seeds of these two fruits have fatty acid compositions classifying them as semi-drying oils, with more than 70% of linoleic acid. Passion fruit oil is rich in carotenoids acting for better preservation. The guava oil has a high content of sterols, with emulsifying properties interesting for the paint formulation. The fractions obtained from the pulps have high levels of polyphenols associated with significant antioxidant activities, especially for the red strawberry guava. The ethanolic extracts of the two fruits also show an antimicrobial activity against several bacterial strains and a fungal strain.

Two alternative extraction methods based on a thermo-mechanical activation were implemented from the passion fruit, in accordance with a biorefinery approach. These methods make it possible to simultaneously carry out the extraction and the pre-formulation of emulsion, with a combined extraction of the different hydrophilic and lipophilic molecules. The role of polyphenols and proteins in the emulsions stabilization was assessed by rheological measurements and by kinetic monitoring of creaming.

New emulsions were prepared with the active molecules obtained and were evaluated as natural paint binders. The properties of the obtained formulations correspond to the industrial specifications thus validating the use of these new ingredients for the eco-design of natural paints. The microbiological tests carried out on the formulations confirmed the ability of the ethanolic extracts of both fruits to improve the resistance of the emulsified paints against microbial contamination.



## *Remerciements*

---

Les recherches faisant l'objet de ce manuscrit sont le fruit de travaux réalisés au sein de plusieurs entités : le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA) de Toulouse INP, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) de l'Université de La Réunion, le Centre de Traitement des Agro-Ressources (CRT-CATAR) à l'ENSIACET ainsi que l'entreprise DERIVERY implantée en Normandie (Pont-Authou et Brionne).

Les travaux ont été financés par l'entreprise DERIVERY spécialisée dans la fabrication de peintures et vernis pour l'Industrie et le Bâtiment, dans le cadre d'une convention CIFRE.

Je tiens tout d'abord à remercier les deux directeurs de laboratoire, Monsieur Gérard VILAREM pour le LCA, et Madame Anne BIALECKI (Pr.) pour le LCSNSA, de m'avoir accueillie dans leurs équipes de recherche respectives.

J'adresse également tous mes remerciements à Monsieur Thierry BARRE directeur général de l'entreprise DERIVERY pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux dans de très bonnes conditions.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame Pascale DE CARO (LCA) et Yanis CARO (LCSNSA) que je remercie chaleureusement pour leur confiance et leur disponibilité.

Je tiens à remercier tout spécialement Madame Christine RAYNAUD, directrice du CRT-CATAR, pour ses précieux conseils tout au long de la thèse.

Je remercie bien sûr Monsieur Alain SHUM, directeur adjoint du LCSNSA pour sa contribution régulière au projet.

Mes remerciements vont naturellement à Messieurs Stéphane VAN BUTSELE et Rudy THOMAS pour avoir partagé leurs connaissances dans le domaine des peintures et pour m'avoir guidée au sein de l'entreprise DERIVERY.

J'exprime mes vifs remerciements à Messieurs Jean-Louis LANOISELLE, Professeur à l'Institut de Recherche Dupuy de Lôme (Université de Bretagne Sud) et Pierre VILLENEUVE, Chercheur au CIRAD et Responsable de l'équipe LiFFHe de l'UMR IATE (Université de Montpellier), pour avoir accepté de juger ce manuscrit en qualité de rapporteurs.

Je remercie sincèrement Madame Martine URRUTIGOITY (Pr.) du Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) et Monsieur Thomas PETIT (Pr.) du LCSNSA, d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Merci également à Monsieur Thomas PETIT pour ses conseils.

Je remercie Madame Elisabeth NEUHAUSER (Pr.), Directrice du Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaires et Environnementales (LBAE, Université de Toulouse, site d'Auch), d'avoir accepté de prendre part au jury.

Enfin, un grand merci à l'ensemble des chercheurs du LCA pour leur aide et leur bonne humeur au cours de ces trois années ; je pense plus particulièrement à Anne, Géraldine, Muriel, Dominique, William, Éric, Jean-François, Sophie, Céline, Laure et Ingrid.



# Sommaire

---

## Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	13
<b>Chapitre I : Étude bibliographique</b> .....	19
I.1. La formulation des peintures.....	20
I.1.1. Les différents types de peintures.....	20
I.1.1.1. Définitions.....	20
I.1.1.2. Les liants .....	20
I.1.1.3. Les types de solvants.....	22
I.1.1.4. Les charges et les pigments.....	23
I.1.1.5. Les additifs.....	24
I.1.1.6. Le séchage.....	24
I.1.2. Contexte réglementaire relatif aux émissions de COV .....	25
I.2. Les peintures écologiques et naturelles.....	28
I.2.1. Les labels écologiques .....	28
I.2.1.1. Ecolabel européen .....	28
I.2.1.2. Label PURE .....	29
I.2.2. Le marché des peintures écologiques et naturelles .....	29
I.2.3. Les ingrédients spécifiques aux peintures naturelles .....	30
I.2.3.1. Les liants naturels.....	30
I.2.3.2. Les additifs.....	34
I.2.3.3. L'émulsion végétale .....	35
I.3. Choix des matières premières végétales .....	37
I.3.1. Propriétés visées.....	37
I.3.1.1. Sélection d'une huile végétale tropicale.....	37
I.3.1.2. Sélection d'extraits végétaux actifs.....	37
I.3.2. Description des matières premières végétales sélectionnées .....	38
I.3.2.1. Le goyavier de Chine .....	38
I.3.2.2. Le fruit de la Passion.....	39
I.3.2.3. La carambole.....	40
I.3.2.4. La banane .....	40
I.3.2.5. Le tangor .....	41
I.3.2.6. La papaye .....	42

I.3.2.7. La patate douce .....	42
I.3.2.8. Le manioc.....	43
I.3.3. Propriétés des huiles végétales de graines de fruits .....	44
I.3.3.1. Caractéristiques physico-chimiques.....	44
I.3.3.2. Teneur en acides gras .....	45
I.3.3.3. Composés de la fraction insaponifiable des huiles.....	46
I.3.4. Propriétés des ingrédients actifs présents dans les coproduits végétaux.....	50
I.3.4.1. Propriétés antibactériennes et antifongiques .....	50
I.3.4.2. Activité antioxydante .....	50
I.3.4.3. Propriétés des matières premières végétales sélectionnées.....	54
I.4. Les procédés d'extraction .....	61
I.4.1. Les procédés d'extraction d'huiles végétales.....	61
I.4.1.1. Préparation des graines .....	61
I.4.1.2. Extraction par pression.....	61
I.4.1.3. Extraction par solvant .....	62
I.4.1.4. Méthodes alternatives.....	63
I.4.2. Les procédés d'extraction de substances naturelles actives .....	64
I.4.2.1. Macération .....	65
I.4.2.2. Distillation.....	65
I.4.2.3. Extraction accélérée par solvant.....	65
I.4.3. Extrusion bi-vis .....	66
I.4.3.1. Fonctionnalité d'un extrudeur bi-vis .....	66
I.4.3.2. Extraction d'une huile végétale par extrusion bi-vis.....	68
I.4.3.3. Extraction de molécules actives par extrusion bi-vis .....	69
I.5. Conclusion .....	70
<i>Références bibliographiques</i> .....	72

**Chapitre II : Extraction des huiles végétales et des fractions actives à partir des co-produits végétaux.....84**

II.1. Description des matières premières .....	85
II.1.1. Inventaire des co-produits végétaux .....	85
II.1.2. Caractérisation des co-produits de fruit de la passion et de goyavier rouge.....	86
II.2. Extraction et caractérisation des lipides de graines de goyavier rouge et de fruit de la passion ...	88
II.2.1. Comparaison des différentes méthodes d'extraction des lipides .....	88
II.2.1.1. Extraction par solvant .....	88

II.2.1.2. Extraction continue en presse à vis .....	90
II.2.1.3. Extraction au dioxyde de carbone supercritique (SC-CO <sub>2</sub> ) .....	91
II.2.2. Influence de la méthode d'extraction sur les propriétés physico-chimiques des huiles .....	95
II.2.2.1. Profil d'acides gras .....	95
II.2.2.2. Indice d'acide.....	96
II.2.2.3. Teneurs en caroténoïdes.....	97
II.2.3. Composition des fractions insaponifiables .....	98
II.2.3.1. Composition en stérols.....	98
II.2.3.2. Composition en tocophérols .....	99
II.2.4. Bilan sur l'extraction des huiles végétales.....	100
II.3. Extraction, purification et caractérisation de fractions aux propriétés antioxydantes .....	101
II.3.1. Sélection d'une méthode d'extraction de substances naturelles actives .....	101
II.3.2. Extraction et caractérisation de fractions actives.....	105
II.3.3. Purification des fractions actives sur résine polymérique.....	108
II.3.3.1. Comparaison des résines Amberlite™ XAD4 et FPX66.....	108
II.3.3.2. Purification sur résine des extraits actifs aqueux .....	109
II.3.3.3. Purification sur résine des extraits actifs éthanoliques .....	112
II.3.3.4. Caractérisation chimique des extraits de fruit de la passion et de goyavier.....	114
II.3.4. Bilan sur l'extraction des fractions actives .....	119
II.4. Conclusion .....	119
<i>Références bibliographiques</i> .....	121

<b>Chapitre III : Procédés intégrés pour l'extraction et la mise en émulsion des molécules actives</b> .....	<b>125</b>
III.1. Caractérisation de la matière première .....	125
III.2. Procédés d'extraction .....	128
III.2.1. Procédé discontinu .....	128
III.2.2. Procédé continu par extrusion bi-vis .....	129
III.3. Caractérisation des émulsions .....	134
III.3.1. Composition chimique.....	134
III.3.2. Distribution de la taille des gouttelettes .....	135
III.3.3. Rhéologie des émulsions .....	136
III.3.2.1. Principe des mesures rhéologiques.....	136
III.3.2.2. Propriétés d'écoulement .....	138
III.3.2.3. Propriétés viscoélastiques.....	139

III.3.4. Stabilité des émulsions obtenues .....	141
III.4. Conclusion.....	142
<i>Références bibliographiques</i> .....	144

**Chapitre IV : Mise en œuvre de formulations pour des applications dans l'industries des peintures naturelles écologiques.....145**

IV.1. Composition des peintures naturelles Derivery.....	146
IV.2. Incorporation des huiles végétales issues de co-produits végétaux.....	149
IV.2.1. Choix des formules .....	149
IV.2.2. Évaluation des nouvelles formulations .....	150
IV.2.2.1. Influence de la substitution des huiles végétales sur le séchage .....	150
IV.2.2.2. Influence de la substitution des huiles sur la résistance à l'eau .....	153
IV.2.2.3. Influence de la substitution des huiles sur le jaunissement .....	153
IV.2.2.4. Influence de la substitution des huiles végétales sur la brillance .....	156
IV.2.3. Incorporation des fractions lipidiques extraites avec les procédés intégrés .....	157
IV.3. Addition des extraits actifs.....	157
IV.3.1. Choix de la formule.....	157
IV.3.2. Evaluation des nouvelles formulations .....	158
IV.3.3. Evaluation de la protection antimicrobienne.....	159
IV.3.3.1. Identification des souches de contamination.....	160
IV.3.3.2. Mesure du potentiel antibactérien et antifongique des extraits végétaux.....	161
IV.3.3.3. Evaluation de la protection antimicrobienne des formulations .....	164
IV.4. Conclusion.....	166
<i>Références bibliographiques</i> .....	168

**Chapitre V : Partie expérimentale.....169**

V.1. Préparation de la matière première.....	170
V.1.1. Traitement des co-produits frais .....	170
V.1.1.1. Séchage.....	170
V.1.1.2. Traitement des co-produit séchés .....	172
V.1.2. Caractérisation de la matière première .....	172
V.1.2.1. Teneur en eau et matières volatiles.....	172
V.1.2.2. Teneur en matières minérales .....	172
V.1.2.3. Teneur en constituants pariétaux .....	173
V.1.2.4. Teneur en azote total et en protéines .....	173

V.1.2.5. Teneur en lipides totaux .....	175
V.1.2.6. Dosage des pectines.....	175
V.1.2.7. Teneur en composés hydrosolubles et éthanol solubles .....	176
V.2. Extraction de l'huile végétale .....	176
V.2.1. Macération.....	176
V.2.2. Extraction par pression .....	176
V.2.3. Extraction au CO <sub>2</sub> -supercritique.....	177
V.3. Caractérisation de l'huile végétale .....	178
V.3.1. Détermination du profil glycéridique .....	178
V.3.2. Profil en acides gras.....	179
V.3.3. Indice d'iode.....	179
V.3.4. Indice d'acide .....	180
V.3.5. Dosages des caroténoïdes .....	180
V.3.6. Analyse des stérols .....	180
V.3.7. Analyses des tocophérols.....	181
V.4. Obtention de fractions bioactives .....	182
V.4.1. Macération.....	182
V.4.2. Extraction ASE.....	182
V.4.3. Extraction Soxhlet .....	182
V.4.4. Extraction Fibertec .....	182
V.4.5. Purification des extraits .....	182
V.5. Caractérisation des fractions bioactives .....	182
V.5.1. Dosage des polysaccharides .....	182
V.5.2. Dosage des polyphénols totaux .....	183
V.5.3. Mesure de l'activité anti-radicalaire .....	183
V.5.4. Caractérisation chimique par chromatographie sur couche mince haute performance .....	184
V.6. Formulation et caractérisation des peintures naturelles.....	187
V.6.1. Formulation .....	187
V.6.2. Caractérisation du film de peinture .....	187
V.6.2.1. Dureté pendulaire .....	187
V.6.2.2. Résistance à l'eau .....	188
V.6.2.3. Jaunissement.....	188
V.6.2.4. Indice de brillance .....	188
V.7. Evaluation de la protection antimicrobienne .....	188
V.7.1. Identification des souches de contamination .....	188
V.7.2. Mesure du potentiel antifongique et antibactérien des extraits .....	190

V.7.3. Evaluation de la protection antimicrobienne des extraits .....	190
V.8. Procédé intégré d'extraction.....	191
V.8.1. Procédé discontinu.....	191
V.8.2. Procédé continu par extrusion bi-vis .....	191
V.8.3. Caractérisation des émulsions .....	193
V.8.3.1. Microscopie optique .....	193
V.8.3.2. Granulométrie laser .....	193
V.8.3.3. Rhéologie.....	193
V.8.3.4. Indice de crémage.....	193
<i>Références bibliographiques</i> .....	194
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>195</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>199</b>
<b>Listes des figures.....</b>	<b>202</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>205</b>

## Introduction générale

Le domaine des peintures, grand consommateur de solvants et autres matières premières d'origine pétrochimique, doit faire face depuis une quinzaine d'année à un durcissement des réglementations et à l'évolution de la demande des consommateurs. Les nouvelles législations européennes visent en effet à limiter l'impact environnemental et sanitaire des peintures, principalement grâce au contrôle des émissions de composés organiques volatils (COV). Ces polluants volatils regroupent plusieurs milliers de molécules appartenant à un grand nombre de familles chimiques (dont les alcanes, alcènes, hydrocarbures aromatiques, cétones) aux propriétés physico-chimiques et toxicologiques variées. A l'échelle de notre planète, 90 % des émissions atmosphériques de COV sont d'origine biogénique, c'est à dire qu'elles proviennent de sources naturelles telles que les forêts, les cultures ou les océans [1]. Parmi les composés émis, l'isoprène ( $C_5H_8$ ) issu du couvert forestier représente 50 % des émissions totales biogéniques [2]. Des hydrocarbures mono-terpéniques ( $C_{10}H_{16}$ ) et des composés oxygénés (aldéhydes, cétones et alcools) sont également émis par la végétation [2]. Cependant, à l'échelle d'un pays industrialisé comme la France, les émissions de COV sont principalement d'origine anthropique, c'est-à-dire liées aux activités humaines. La concentration en COV atmosphériques peut ainsi atteindre plusieurs centaines de  $\mu\text{g.m}^{-3}$  en milieu urbain et industrialisé, contre quelques  $\mu\text{g.m}^{-3}$  dans une zone isolée de sources anthropiques [3]. Par ailleurs, une étude menée par l'Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur (OQAI) montre que les concentrations en COV dans l'air sont plus importantes à l'intérieur des bâtiments qu'en extérieur (Figure 1). La pollution de l'air intérieur peut provenir de nombreuses sources, incluant les peintures et les vernis, mais aussi les matériaux de construction et les produits ménagers. Le toluène, le formaldéhyde et les xylènes, utilisés comme solvant dans les peintures, font partie des composés les plus présents, avec des teneurs comprises entre 40 et 80  $\mu\text{g.m}^{-3}$  [4].

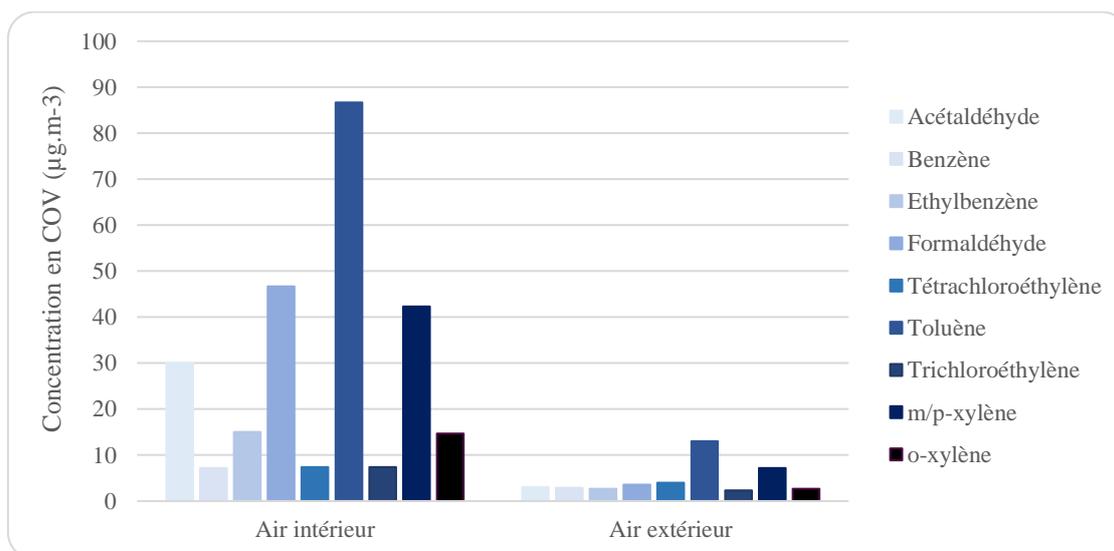


Figure 1: Concentration des COV (en  $\mu\text{g.m}^{-3}$ ) mesurés dans l'air intérieur (Source : OQAI, 2006 [4])

Sensibilisés à la qualité de l'air intérieur, les consommateurs sont de plus en plus attirés par des produits naturels au détriment des produits synthétiques, poussant les fabricants de

peinture à développer des produits innovants. La mise au point de formulations naturelles constitue cependant un challenge technologique. Les peintures naturelles doivent en effet atteindre des performances similaires à celles des produits synthétiques en termes de séchage, d'adhérence et de durabilité, tout en restant suffisamment compétitives économiquement.

Depuis 2003, la société Derivery a mis au point une gamme de peintures naturelles appelée Natura grâce au développement de liants entièrement naturels à base d'huiles végétales en émulsion [5]. Les produits Natura sont détenteurs du label Pure qui garantit un minimum de 95 % d'ingrédients naturels ou d'origine naturelle, le contrôle de l'origine des matières premières et des procédés de transformation et des teneurs très faibles en COV. L'utilisation de ressources naturelles locales (huiles végétales produites localement) permet également de réduire l'impact environnemental des peintures Natura.

L'une des limites à l'utilisation des peintures naturelles reste cependant le risque de contamination et de développement microbien de la conservation du produit. Contrairement aux milieux solvantés, les milieux aqueux enrichis en élément nutritifs que constituent les peintures naturelles sont en effet un terrain favorable à la croissance de microorganismes. Ce développement microbien peut aussi être favorisé par les conditions climatiques (température et taux d'humidité élevés) de certains environnements. Des biocides sont donc actuellement ajoutés aux formulations pour inhiber ce processus. Ces biocides sont des molécules de synthèse aux propriétés bactéricides, fongicides et/ou algicides, souvent utilisés en mélange synergique. L'utilisation de ces additifs synthétiques est contrôlée par le règlement européen n° CE 528/2012 [6], qui régule la mise sur le marché des biocides en Europe. Certaines de ces substances sont ainsi soumises à autorisation lorsqu'elles sont jugées préoccupantes, de par leur toxicité pour l'Homme ou pour les organismes aquatiques notamment. Actuellement, l'élimination du risque de développement microbien dans les peintures naturelles implique d'avoir recours à des additifs synthétiques aux teneurs autorisées limitées. Le renforcement de la protection des formulations dans les environnements sensibles, comme les régions tropicales d'Outre-Mer, nécessite donc de nouvelles solutions innovantes.

Dans une volonté d'étendre son marché des peintures naturelles à des régions d'Outre-Mer comme La Réunion, la société Derivery recherche de nouvelles matières premières, d'origine naturelle, pour élargir sa gamme de formulations et proposer des produits adaptés à cet environnement. De nouvelles sources d'approvisionnement en huiles végétales tropicales sont recherchées afin de remplacer les huiles végétales importées et ainsi limiter l'empreinte carbone du processus de fabrication. Les conditions climatiques particulières de La Réunion (climat tropical) et le risque accru de développement microbien qu'elles impliquent, doivent également être prises en compte lors de la mise au point des nouvelles peintures naturelles. Ainsi, l'élargissement des sources d'approvisionnement en ingrédients végétaux vise aussi le développement d'un biocide d'origine naturelle permettant de protéger les formulations naturelles contre le risque de développement microbien en conditions de stockage défavorables, que ce soit à l'Île de la Réunion ou en métropole.

L'insertion de nouvelles matières premières dans la gamme de peinture Natura est cependant soumise à un cahier des charges contraignant. En particulier, les procédés d'extraction doivent tout d'abord répondre aux critères du label Pure, qui limite notamment

l'utilisation de solvant non biosourcé. Les liants formulés à partir des nouvelles huiles végétales subtropicales doivent également permettre d'atteindre des performances au moins similaires aux liants actuels, particulièrement en termes de séchage et de jaunissement. Afin de satisfaire la demande du marché actuel en peintures naturelles, les huiles végétales doivent aussi pouvoir être produites à partir d'agro-ressources subtropicales disponibles et peu coûteuses, et en quantité suffisante, soit une tonne par an selon une première estimation fixée par l'entreprise Derivery. De plus, le développement d'un biocide naturel devra prendre en compte la variabilité des contaminations microbiennes pouvant exister entre les régions au climat tropical et tempéré. Enfin, la viabilité économique doit également être assurée par une bonne accessibilité des matières premières et par l'optimisation du procédé d'extraction et des rendements associés. L'industrie agroalimentaire réunionnaise, spécialisée entre autres dans la transformation des fruits et légumes tropicaux, est un des secteurs économiques les plus porteurs de ce territoire insulaire. La production fruitière réunionnaise représente près de 30 000 tonnes par an, réparties en 40 espèces différentes [7]. L'utilisation de co-produits, ou d'écarts de production, issus de la transformation de ces fruits et légumes tropicaux est donc privilégiée pour garantir la disponibilité aisée des matières premières pour les entreprises partenaires à La Réunion. Les filières existantes de transformation constituent une source fiable d'approvisionnement en graines, en pulpe et en peaux de fruits, matières premières potentielles pour l'obtention de nouveaux ingrédients végétaux pour les peintures naturelles.

L'intégration des co-produits de l'industrie agro-alimentaire dans un schéma de bioraffinerie occupe actuellement une place importante aux interfaces des domaines de la chimie, biochimie et des matériaux. La valorisation de co-produits végétaux présente en effet un double enjeu écologique et économique. La production de fruits, et plus particulièrement de fruits tropicaux, s'est accélérée ces dernières années face à la demande croissante du marché en jus et autres produits alimentaires transformés à base de fruits (compotes, glaces, pulpes congelées, etc.). La proportion de co-produits générés par la transformation artisanale et industrielle de fruits tropicaux est d'autant plus importante qu'ils contiennent généralement un ratio « partie comestible : déchet » plus faible que les fruits des régions tempérées. Les problèmes environnementaux posés par la génération d'une quantité importante de déchets végétaux provenant de ces transformations alimentaires ont mené aux deux principaux débouchés suivants pour l'utilisation de ces co-produits : l'épandage (ou le compostage), et l'usage en alimentation animale. Le caractère périssable de ces co-produits de l'industrie agroalimentaire limite toutefois leur exploitation à grande échelle, du fait du coût élevé des étapes de séchage, de stockage et, éventuellement, de transfert de ces co-produits. Les nouvelles voies de valorisation se concentrent donc sur l'obtention de composés à haute valeur ajoutée permettant de rentabiliser la valorisation des co-produits. Les co-produits végétaux issus de l'industrie agroalimentaire constituent une réserve inexploitée en ingrédients fonctionnels et molécules bioactives, telles que les lipides (acides gras, stérols), les pigments (caroténoïdes), les polysaccharides et les polyphénols, potentiellement utilisables dans les peintures naturelles.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dont l'objectif principal est de sélectionner de nouveaux ingrédients d'origine naturelle pour répondre à l'évolution du besoin du marché et du cahier des charges des peintures naturelles en émulsion de la société Derivery. Diversifier l'approvisionnement en matières premières, tout en privilégiant des ressources

locales, pour développer des formulations adaptées aux marchés et au contexte environnemental de l'Outre-mer, représentent les premiers enjeux de ce projet.

Ces objectifs justifient la co-tutelle de ce travail entre le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle de l'ENSIACET (Toulouse INP) associé au CATAR (Centre d'Application et de Traitement des Agroressources) et le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA) de l'Université de La Réunion, aux expertises complémentaires dans les domaines des procédés de fractionnement de la biomasse et de l'analyse des substances naturelles, en lien avec leur formulation. Ainsi, ce travail de thèse repose sur l'identification de matières premières naturelles disponibles sur l'Ile de La Réunion et sources d'ingrédients multifonctionnels aux propriétés recherchées, puis sur la mise en œuvre d'une stratégie de valorisation s'intégrant clairement dans une démarche de bioraffinerie et d'écoconception.

Le manuscrit de thèse s'organise en 4 chapitres. Le premier chapitre porte sur des données bibliographiques relatives aux agro-ressources locales potentiellement intéressantes pour l'obtention de nouvelles huiles végétales et pour le développement d'un biocide naturel, en lien avec le cahier des charges des nouveaux ingrédients pour peintures naturelles.

Dans le deuxième chapitre, sont présentées les différentes techniques d'extraction mises en œuvre pour obtenir les huiles végétales et les autres molécules naturelles actives à partir des co-produits végétaux sélectionnés, tout en satisfaisant les exigences du cahier des charges du label Pure. Les compositions des extraits obtenus sont discutées en fonction des modes d'extraction.

Dans le troisième chapitre, deux procédés alternatifs sont décrits pour l'extraction combinée des huiles végétales et des composés bioactifs, en une seule étape. Les performances sont discutées en termes de qualité et de stabilité des émulsions obtenues, et de réduction des impacts environnementaux.

Le quatrième chapitre est consacré à la formulation des nouvelles peintures naturelles incorporant les nouveaux ingrédients végétaux. Les performances des nouvelles formulations sont comparées à celles des formulations déjà commercialisées par l'industriel. L'étude des propriétés antimicrobiennes des extraits inclut trois méthodologies permettant d'évaluer leur efficacité pour améliorer la conservation des formulations.

## **Références**

1. Goldstein A. H., Galbally I. E., Known and unexplored organic Constituents in the earth's atmosphere, *Journal of environmental Science and technology*, 2007, 41, 1515-1521
2. Kesselmeier J., Staudt M., Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC) : An overview on Emission, Physiology and Ecology, *Atmospheric Chemistry*, 1999, 33, 23–88
3. Institut écocitoyen pour la connaissances de pollutions, Campagne de mesures atmosphériques des Composés Organiques Volatils par échantillonnage passif, 2016
4. Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur, Premier état de la qualité de l'air dans les logements français, Dossier de presse, 2006
5. Alouche A., Burel C., Lecamp L., Barre T., Emulsions à base de stanolies d'huiles végétales ou animales et d'émulsifiants naturels, Brevet FR 2867192, 2005
6. Règlement (UE) No 528/2012 du parlement européen et du conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides (J. O. n° L 167/1 du 27/06/2012, p. 1-123)
7. Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt de La Réunion, La production fruitière à La Réunion, *Agreste*, 2014



## *Chapitre I : Étude bibliographique*

I.1. La formulation des peintures.....	20
I.1.1. Les différents types de peintures.....	20
I.1.2. Contexte réglementaire relatif aux émissions de COV .....	25
I.2. Les peintures écologiques et naturelles.....	28
I.2.1. Les labels écologiques .....	28
I.2.2. Le marché des peintures écologiques et naturelles .....	29
I.2.3. Les ingrédients spécifiques aux peintures naturelles .....	30
I.3. Choix des matières premières végétales .....	37
I.3.1. Propriétés visées.....	37
I.3.2. Description des matières premières végétales sélectionnées .....	38
I.3.3. Propriétés des huiles végétales de graines de fruits .....	44
I.3.4. Propriétés des ingrédients actifs présents dans les coproduits végétaux.....	50
I.4. Les procédés d'extraction .....	61
I.4.1. Les procédés d'extraction d'huiles végétales.....	61
I.4.2. Les procédés d'extraction de substances naturelles actives .....	64
I.4.3. Extrusion bi-vis.....	66
I.5. Conclusion .....	70
<i>Références bibliographiques</i> .....	72

## I.1. La formulation des peintures

### I.1.1. Les différents types de peintures

#### I.1.1.1. Définitions

La peinture est un produit en pâte, liquide ou en poudre, contenant des pigments blancs ou colorés dispersés dans un liant. Une fois appliquée sur une surface, appelée subjectile, elle forme un film mince et solide présentant des qualités décoratives, protectrices ou spécifiques [1]. Les principaux constituants intervenant dans les formules de peinture peuvent être répartis en cinq familles :

- **Les liants** : Substance filmogène qui lie les différents constituants entre eux et fixe la peinture au subjectile (résines alkydes ou époxydes, huiles végétales)
- **Les solvants** : Substance souvent volatile qui dissout les constituants et liquéfie la peinture pour faciliter son application (hydrocarbures, eau)
- **Les pigments** : Fine poudre insoluble blanche ou colorée qui donne la teinte voulue à la peinture (oxydes métalliques, pigments végétaux)
- **Les matières de charge** : Matière solide pulvérulente qui diminue le prix de revient de la peinture et renforce les propriétés mécaniques du film (carbonate de calcium, sulfate de baryum)
- **Les additifs** : Substance minoritaire ajoutée pour donner à la formulation des propriétés spécifiques (siccatif, biocide, antimousse ou anti-peau)

Le choix de ces constituants, et plus particulièrement du liant et du solvant, détermine le type de peinture formulée et le mode de formation du film, communément appelé séchage.

#### I.1.1.2. Les liants

Le type de peinture est déterminé par le type de liant utilisé. Ces constituants sont classés selon leurs caractéristiques chimiques.

##### I.1.1.2.1. Polyuréthanes

Les liants polyuréthanes sont obtenus après réaction chimique entre un composé isocyanate et une molécule présentant des groupements alcools. Cette réaction a lieu à température ambiante et peut également être accélérée par chauffage. Les peintures polyuréthanes peuvent être vendues en deux parties à mélanger juste avant l'application ou sous la forme d'une peinture classique [2] :

- **Peinture polyuréthane à deux composants** : Un durcisseur isocyanate doit être ajouté à la base contenant le polyalcool et les pigments. Le mélange ainsi formé reste utilisable pendant un temps appelé « pot-life » nécessaire à l'application. Passé ce délai, la viscosité du produit augmente et l'application peut présenter des défauts.
- **Peinture polyuréthane mono-composant** : Les peintures polyuréthanes mono-composants peuvent contenir le polyalcool et un composé isocyanate masqué. Une cuisson est alors nécessaire pour éliminer l'agent masquant et déclencher la formation du film polyuréthane.

#### I.1.1.2.2. Résines époxydes

Les peintures aux résines époxydes se présentent sous la forme de deux phases séparées, une base de formulation et un durcisseur, à mélanger au moment de l'utilisation. La base contient le premier réactif, la résine époxydique, ainsi que les pigments et les additifs dilués dans un solvant. Le durcisseur est constitué du second réactif, généralement de type polyamine, lui aussi en solution dans un solvant. Après réaction à température ambiante, le film obtenu est dur, résistant à l'abrasion et aux produits chimiques. Des peintures époxy mono-composant existent également. La résine époxydique est dans ces cas-là associée à une résine acrylique et la formation du film se fait après cuisson [3]. Ce type de peinture est particulièrement utilisé pour la protection anti corrosion.

#### I.1.1.2.3. Résines alkydes

On distingue trois types de résines alkydes. Elles sont issues de l'estérification de polyalcools par des acides organiques tels que l'acide phtalique et les acides gras insaturés contenus dans les huiles végétales. Les résines présentent des propriétés différentes selon leur teneur en huile, notamment au niveau du temps de séchage [4] :

- **Résines alkydes longues en huile** : Elles contiennent plus de 55% d'huile et présentent donc les temps de séchage les plus longs et une tendance au jaunissement. Les résines alkydes longues en huile sont principalement utilisées dans le milieu du bâtiment.
- **Résines alkydes moyennes en huile** : Elles contiennent 30 à 55% d'huile. Leur temps de séchage est rapide et elles ne jaunissent pas. Les résines alkydes moyennes en huile ont surtout des applications industrielles.
- **Résines alkydes courtes en huile** : Elles contiennent moins de 30% d'huile. Les résines alkydes courtes en huile forment un film plus dur et cassant, au séchage très rapide. Elles peuvent être utilisées en mélange dans des vernis polyuréthanes à 2 composants.

Ces résines peuvent en effet être modifiées par l'ajout d'un autre type de liant. Des résines alkydes uréthanes, acryliques ou encore silicone existent. Ces résines modifiées permettent de combiner certaines propriétés intéressantes des deux types de liants.

#### I.1.1.2.4. Liants acryliques

Les liants acryliques existent sous deux formes. Ces esters d'acide polyméthacrylique ou polyacrylique peuvent être présents sous la forme de polymères, ou de monomères. Dans ce dernier cas, la formation du film s'effectue grâce à un photo-initiateur et à une exposition à un rayonnement ultraviolet (UV). Ces peintures présentent une bonne stabilité en extérieur, une bonne adhérence et une résistance élevée à l'eau. Les liants acryliques peuvent également être combinés à différents réactifs pour obtenir d'autres propriétés (peintures acrylique-uréthane ou acrylique siliconée) [5].

#### I.1.1.2.5. Liants naturels

Plusieurs types de produits naturels peuvent être utilisés en tant que liants dans les peintures. C'est le cas de certaines huiles végétales, de résines et de gommes d'origine végétale ou animale. Des huiles siccatives telles que l'huile de lin, l'huile de chanvre, l'huile de bois de

Chine ou l'huile de soja sont utilisées. Les principales résines sont la colophane, les copals et la gomme laque [6].

### *I.1.1.3. Les types de solvants*

Le solvant est également un constituant très influent dans la formulation d'une peinture. Déterminant pour le mode d'application et pour les émissions de composés organiques volatils (COV), le solvant doit être choisi en fonction du liant employé et du support à peindre, de sa forme, de son environnement et de ses conditions d'utilisation. Certains liants peuvent être utilisés en phase aqueuse ou d'autres en phase solvant, en adaptant le durcisseur et les additifs.

#### *I.1.1.3.1. Peinture en phase solvant*

Les peintures en phase solvant sont encore largement utilisées, notamment en milieu industriel. Leur facilité d'emploi et leur stabilité sont en effet appréciables. Toutefois, les réglementations concernant les émissions de COV dans l'air se durcissent au fur et à mesure des années, poussant les fabricants, les applicateurs et les consommateurs à se tourner vers d'autres solutions moins nocives à la fois pour l'environnement et pour la santé humaine.

Les solvants utilisés dans les peintures se répartissent en 5 familles chimiques.

- **Les hydrocarbures :** Ces solvants sont principalement dérivés de l'industrie pétrolière. Le white spirit™ ou les solvants naphtha, largement utilisés en peinture, sont des mélanges d'hydrocarbures aliphatiques et aromatiques dont la composition exacte varie en fonction du raffinage et de la matière première. Quelques hydrocarbures terpéniques ou chlorés sont également employés.
- **Les alcools :** Les alcools sont utilisés comme solvant pour plusieurs types de résines comme les résines alkydes ou les résines naturelles. Les alcools butyliques ou éthyliques sont les plus courants.
- **Les éthers de glycol :** Les éthers de glycol se retrouvent dans les peintures à base de résines époxydiques ou en tant que co-solvant dans les peintures en phase aqueuse.
- **Les esters :** Les esters les plus courants sont les acétates d'éthyle et de butyle. Ils sont notamment présents dans les peintures polyuréthanes.
- **Les cétones :** Les peintures polyester ou acryliques peuvent contenir des cétones à chaînes linéaires ou cycliques.

#### *I.1.1.3.2. Peinture en phase aqueuse*

Les peintures en phase aqueuse sont de plus en plus présentes depuis quelques dizaines d'années, dans le milieu du bâtiment comme en industrie. Plusieurs raisons expliquent ce développement. Des peintures en phase aqueuse permettent en effet de réduire l'utilisation de solvants d'origine pétrochimique, plus dangereux pour l'environnement et nocifs pour l'Homme, et plus coûteux également. Les peintures en phase aqueuse dégagent une odeur moins forte et émettent beaucoup moins de COV que les peintures en phase solvant. Une petite quantité de co-solvants organiques reste parfois nécessaire à la formulation de ces peintures, pour augmenter la stabilité de la peinture, améliorer la solubilisation du liant dans l'eau ou favoriser la formation du film. Deux types de peinture en phase aqueuse existent [7] :

- **Peintures hydrodiluable (peinture en émulsion)** : Elles sont préparées en deux temps. Les charges et les pigments sont dispersés sous forte agitation dans un minimum d'eau pouvant contenir des additifs dispersants ou épaississants. Le liant en émulsion dans l'eau est ensuite ajouté.
- **Peintures hydrosolubles** : Dans ce cas, les charges, les pigments sont dispersés dans une faible quantité de liant mis en solution dans un mélange eau et co-solvant. Après dispersion, le reste du liant en solution et les additifs sont ajoutés.

Les principaux types de liants synthétiques (époxydes, acryliques, polyuréthanes, alkydes) peuvent être mis en œuvre dans les deux types de peinture aqueuse. Les liants naturels (résine ou huile végétale) sont plutôt présents dans les peintures en émulsion.

#### I.1.1.3.3. Peinture en poudre

Le principal avantage des peintures en poudre est l'absence totale de solvant et donc l'absence d'émission de COV. La sévérité croissante des réglementations concernant les composés organiques volatils mène à un développement de plus en plus important de ce type de peinture. Ces produits sont des poudres thermoplastiques à base de résines époxydiques, acryliques ou polyesters [8]. La réticulation permettant la formation du film est déclenchée par chauffage. La poudre déposée sur la surface du substrat fond et les espèces réactives entrent ainsi en contact.

#### I.1.1.4. Les charges et les pigments

Les charges et les pigments sont des matières pulvérulentes qui confèrent aux peintures leur opacité et leur couleur. Le taux de matières pulvérulentes dans la formulation influence également certaines propriétés de la formulation dont la dureté, la viscosité ou la perméabilité. Contrairement au solvant qui définit le type de peinture, les charges et les pigments sont utilisés indifféremment dans les peintures en phase solvant ou dans les peintures à l'eau.

##### I.1.1.4.1. Les charges

Les charges sont des solides de couleur blanche d'origine principalement minérale. Introduites dans la peinture sous forme de poudre de granulométrie généralement supérieure à 1 µm, les charges sont insolubles dans le milieu dispersant. Leur pouvoir opacifiant est faible. Les matières les plus courantes appartiennent à 3 familles chimiques [7] :

- **Les sulfates** : barytine ( $\text{BaSO}_4$  naturel),
- **Les carbonates** : craie ( $\text{CaCO}_3$ ), dolomie ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MgCO}_3$ ),
- **Les silicates** : kaolin ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $2\text{SiO}_2$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$ ), talc ( $3\text{MgO}$ ,  $4\text{SiO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

##### I.1.1.4.2. Les pigments

Les pigments sont des poudres solides, blanches ou colorées, responsables de l'opacité et de la couleur de la peinture. D'origine minérale ou organique, ce sont des poudres généralement très fines (granulométrie  $< 1 \mu\text{m}$ ), insolubles dans le milieu de dispersion. Les pigments sont le plus souvent classés par couleur et parmi les pigments minéraux, les principaux sont [7] :

- **Blanc** : dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ), oxyde de zinc ( $\text{ZnO}$ ),
- **Vert** : oxyde de chrome ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ),
- **Jaune** : jaune vanadate ( $\text{BiOV}$ ), oxyde de fer ( $\text{FeO(OH)}$ ),

- **Rouge** : rouge de cadmium (CdS, CdSe), oxyde de fer ( $\alpha\text{Fe}_2\text{O}_3$ ),
- **Bleu** : bleu de cobalt ( $(\text{CoO})_m(\text{Al}_2\text{O}_3)_n$ ), bleu de Prusse ( $\text{FeNH}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ),
- **Noir** : oxyde de fer ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ).

Parmi les pigments organiques, on trouve des dérivés de dioxazine (violet à rouge), de phtalocyanine (bleu à vert), des dérivés azoïques (jaune à rouge) ou le noir de carbone.

#### 1.1.1.5. Les additifs

Les additifs sont ajoutés en faible quantité (généralement moins de 1 %) dans la formulation, pour donner différentes propriétés à la peinture, avant application ou après séchage. Les principaux types d'additifs permettant d'améliorer le comportement de la peinture au stockage sont présentés dans le Tableau I-1.

Tableau I-1: Caractéristiques des différents additifs en peinture

Effet sur	Additif	Rôle	Composés
<b>La fabrication</b>	Dispersant	Facilite la dispersion des charges et des pigments	Polyphosphate de sodium, sels d'acides carboxyliques
	Anti-mousse	Evite la formation de mousse lors de la fabrication	Huiles minérales, huiles siliconées
<b>La peinture en pot</b>	Anti-peau	Ralentit ou évite la formation d'un film sec à la surface du pot de peinture	Méthyléthylcétoxime, butylraldoxime
	Anti-sédimentation	Freine la sédimentation des pigments	Polyphosphate de sodium, éthers cellulosiques
<b>Le film</b>	Catalyseur de séchage	Amorce la réaction de séchage	Sels métalliques (siccatifs) ou catalyseurs acides
	Agent de matité	Donne un aspect mat, satiné ou brillant au film	Silicates, cires de polyéthylènes
	Anti-UV	Protège le film du rayonnement solaire	Benzophénones, benzotriazoles

#### 1.1.1.6. Le séchage

En peinture, le séchage désigne communément la formation du film solide. Ce phénomène peut être physique et/ou chimique en fonction du type de liant. Selon le cas, le séchage s'opère à température ambiante, sans apport extérieur d'énergie, ou après une activation, par élévation de la température ou par exposition aux rayonnements ultraviolets.

##### 1.1.1.6.1. Séchage physique

Le séchage physique est la première étape du séchage. Il ne fait intervenir que des phénomènes physiques et ne transforme pas chimiquement le liant. L'état du liant au sein de la formule détermine le type de mécanismes mis en jeu. Lorsque le liant est dissout dans le solvant, l'évaporation de celui-ci provoque le durcissement réversible du film (peinture acrylique polymère). Une resolubilisation du liant dans un solvant adapté est possible. Lorsque le liant est en émulsion dans le solvant (eau), un phénomène de coalescence est observé. L'évaporation du solvant rompt l'émulsion et met ainsi en contact les micelles de liant qui réagissent ensuite entre elles et forment un film solide irréversible (peinture alkyde hydrodiluable).

#### I.1.1.6.2. Séchage chimique

##### **Séchage par réaction entre deux composants**

La formation du film peut également se faire par réaction entre les groupements chimiques de deux composants présents dans la peinture. Ces composants sont le plus souvent séparés dans deux phases différentes, la base et le durcisseur, à mélanger avant l'application. C'est le cas des peintures époxydes ou polyuréthanes à deux composants. La transformation chimique commence donc dès le mélange et se poursuit une fois la peinture appliquée. Des liaisons intermoléculaires se créent et forment ainsi un réseau tridimensionnel. Dans le cas de peintures mono-composants, le séchage ne peut se faire qu'après une phase de cuisson au four. Les initiateurs présents dans la formule (phénol ou caprolactame masquant le groupement polyisocyanate dans le cas des peintures polyuréthane mono-composant) sont en effet activés par chauffage [5]. Ce type de séchage est réservé aux subjectiles insensibles à la chaleur, mais il est très intéressant pour peindre les pièces à morphologie complexe grâce à la bonne diffusion de la chaleur.

##### **Séchage par photopolymérisation**

Certaines peintures contenant un photo-initiateur (peinture acrylique monomère ou acrylique-uréthane) sèchent grâce à un rayonnement énergétique apporté sous forme d'ultraviolets ou de faisceau d'électrons. Le photo-initiateur permet d'amorcer la réaction de polymérisation qui conduit à la formation d'un réseau moléculaire réticulé solide. Ce type de séchage peut être compliqué pour des peintures très pigmentées ou appliquées en couches épaisses. En effet, les pigments absorbent les rayonnements UV et le durcissement du film n'est pas complet. Le séchage par rayonnement, qui permet un séchage très rapide à température ambiante (quelques millisecondes), est donc privilégié pour des films minces, des surfaces relativement planes et des subjectiles sensibles à la chaleur [5].

##### **Séchage par oxydation**

Pour les peintures à base d'huiles végétales ou de dérivés (peintures alkydes), le séchage est provoqué par l'oxydation des acides gras du liant. Cette réaction est continue et lente, mais peut être accélérée par l'ajout de catalyseurs (siccatifs). Ce processus sera détaillé dans le paragraphe II.3.1.

#### ***I.1.2. Contexte réglementaire relatif aux émissions de COV***

Les Composés Organiques Volatils (COV) sont définis comme « tout composé organique dont le point d'ébullition initial, mesuré à la pression standard de 101,3 kPa, est inférieur ou égal à 250 °C » selon la directive européenne 2004/42/CE, complétée par la directive 2010/79/UE [9]. Le terme COV désigne donc une multitude de molécules aux propriétés très variées, appartenant aux différentes familles chimiques telles que les alcanes, les alcènes, les cétones, les alcools, les aldéhydes, les esters ou les éthers. Ces composés ont un impact néfaste sur l'environnement et la santé humaine, qu'il soit direct ou indirect. Certaines de ces substances peuvent en effet être dangereuses et sont classées au niveau européen comme très toxiques, toxiques, irritantes ou mutagènes et soumises à des conditions d'étiquetage et d'utilisation [10]. Au niveau environnemental, les composés organiques volatils associés aux oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) générés par le trafic routier, deviennent des précurseurs de pollution photo-oxydante [11]. Sous l'effet

des rayonnements ultraviolets dans la troposphère (jusqu'à 10 km d'altitude), les COV produisent de l'ozone et d'autres composés oxydants. Ces substances associées sont des irritants respiratoires, ont des impacts nocifs sur les écosystèmes et contribuent à l'effet de serre. Les COV ont un effet indirect en agissant sur l'ozone, et un effet direct en tant que substance toxique.

Les sources anthropiques de COV sont généralement classées en trois catégories principales : l'industrie manufacturière, le transport routier et le domaine résidentiel et tertiaire [12]. Les émissions anthropiques de COV en France ont diminué de 75 % entre 1990 et 2016, passant de 2400 kt à 600 kt, grâce à la réduction importante des émissions du secteur routier (Figure I-1).

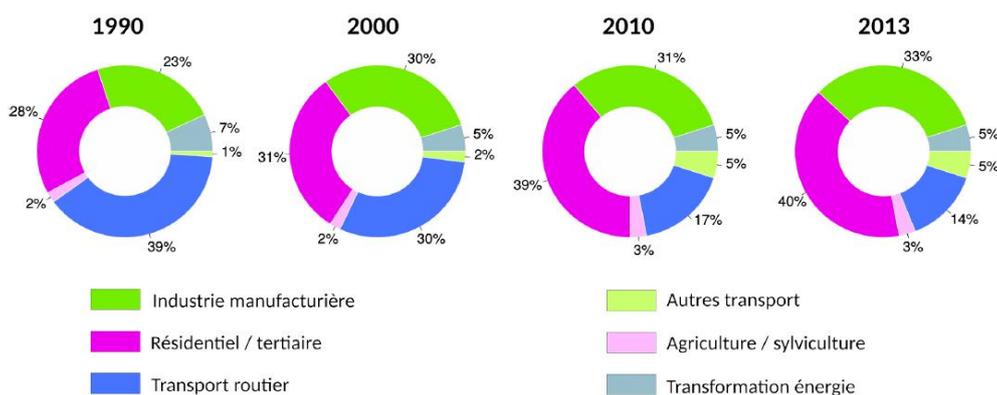


Figure I-1: Répartition des sources anthropiques principales d'émissions de COV entre 1990 et 2013 [12]

Les émissions de COV non méthaniques (COVNM) de l'industrie manufacturière et du domaine des peintures ont également diminué de plus de 60 % grâce à une prise de conscience, des progrès technologiques et des réglementations plus sévères (Figure I-2).

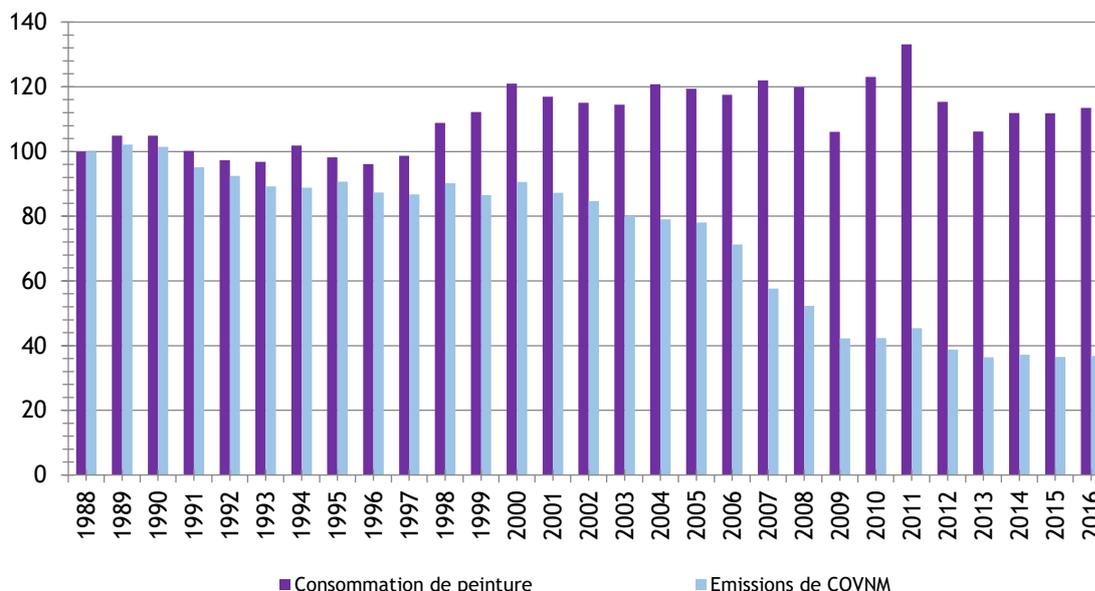


Figure I-2: Emissions de COVNM et consommation de peinture entre 1988 et 2016 en base 100 (Source : CITEPA, 2018)

Le secteur industriel, incluant l'industrie des peintures, reste cependant un grand consommateur de solvants hydrocarbonés (white spirit<sup>TM</sup>, toluène), oxygénés (alcools, cétones) et halogénés

(trichloroéthylène), qui étaient responsables de 47 % des émissions anthropiques de COVNM en 2015 [5]. Notons que les peintures en phase aqueuse hydrodiluables contiennent des co-solvants de type éther de glycol, également émetteurs de COV.

La législation concernant les émissions de COV est en constante évolution depuis les années 90. Dans l'industrie manufacturière, les secteurs de la peinture et des revêtements, de par leur utilisation importante de solvants, sont les principaux concernés par ces réglementations. La directive n° 2004/42/CE du 21 avril 2004 relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certains vernis et peintures, a mis en place un plan de réduction progressive des émissions en deux phases d'action de 3 ans chacune. Les objectifs de cette directive complétée par la directive 2010/79/UE, sont de limiter l'impact des COV sur la santé des consommateurs et de protéger l'environnement des émissions toxiques. Depuis 2010, au terme de ces deux phases, une teneur maximale en COV (en grammes par litre de peinture) à ne pas dépasser est imposée pour chacune des 12 catégories de peintures (Tableau I-2) [9].

Tableau I-2: Teneurs maximales autorisées en COV pour les 12 catégories de produits selon la directive 2004/42/CE [9]

Catégorie de produit	Type	Teneur maximale en COV g/L
Murs et plafonds intérieurs (Brillant $\leq 25$ angle à $60^\circ$ )	Solvant	30
	Eau	30
Murs et plafonds intérieurs (Brillant $> 25$ angle à $60^\circ$ )	Solvant	100
	Eau	100
Murs extérieurs support minéral	Solvant	430
	Eau	40
Peintures intérieures et extérieures pour finition et bardage bois ou métal	Solvant	300
	Eau	130
Vernis et lasures intérieurs/extérieurs pour finitions	Solvant	400
	Eau	130
Lasure non filmogène intérieure/extérieure	Solvant	130
	Eau	700
Impression fixatrice	Solvant	750
	Eau	30
Revêtement monocomposant à fonction spéciale	Solvant	140
	Eau	500
Revêtement monocomposant/bicomposant à fonction spéciale pour utilisation finale spécifique	Solvant	140
	Eau	500
Revêtement à fonction durcissante et/ou isolante	Solvant	350
	Eau	30
Revêtement multicolore	Solvant	100
	Eau	100
Revêtement à effets décoratifs	Solvant	200
	Eau	200

Depuis septembre 2013, la réglementation sur l'étiquetage des produits utilisés en intérieur impose aux producteurs d'indiquer, en plus de la teneur totale en COV, la quantité de COV émise dans l'air pendant 28 jours après utilisation du produit. Les niveaux d'émission des

solvants les plus nocifs déterminent une classe de peinture de A+ (très faibles émissions) à C (fortes émissions) (Tableau I-3).

Tableau I-3 : Classement des peintures selon le taux d'émission en  $\mu\text{g.m}^{-3}$  de certains COV et de l'émission totale de COV (COVT) (Source : ADEME, 2017)

COV	Unité	A <sup>+</sup>	A	B	C
Formaldéhyde	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 10	< 60	< 120	> 120
Acétaldéhyde	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 200	< 300	< 400	> 400
Toluène	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 300	< 450	< 600	> 600
Tetrachloroéthylène	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 250	< 350	< 500	> 500
Xylènes	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 200	< 300	< 400	> 400
1,2,4-Triméthylbenzène	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 1000	< 1500	< 2000	> 2000
1,4-Dichlorobenzène	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 60	< 90	< 120	> 120
Ethylbenzène	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 750	< 1000	< 1500	> 1500
2-Butoxyéthanol	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 1000	< 1500	< 2000	> 2000
Styrène	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 250	< 350	< 500	> 500
COV Totaux	$\mu\text{g.m}^{-3}$	< 1000	< 1500	< 2000	> 2000

## I.2. Les peintures écologiques et naturelles

### I.2.1. Les labels écologiques

Afin de faire face aux problématiques environnementales et sanitaires liées au domaine des peintures, les autorités européennes et les organismes de certification indépendants ont créé des labels visant à valoriser les produits plus respectueux de l'environnement et moins nocifs pour la santé.

#### I.2.1.1. Ecolabel européen

Depuis 2009, la Commission européenne a mis en place des conditions d'attribution d'un label écologique pour les peintures et les vernis visant à réduire les émissions de solvants et à limiter les rejets de substances nocives pour l'environnement [13]. Ces conditions ont été revues et renforcées en 2014, donnant lieu à la création de l'Ecolabel européen (Décision 2014/312/UE). Ce label garantit des produits ayant des impacts réduits sur l'environnement à tous les stades de leur cycle de vie et présentant des performances élevées [14]. Les exigences reposent donc sur la sélection et la production des matières premières, sur la qualité des produits et sur l'information du consommateur. Les principaux critères permettant d'obtenir le label sont :

- Teneur maximale en pigments blancs ( $\text{TiO}_2$  ou autre),
- Contrôle du procédé de production du  $\text{TiO}_2$  (limitation de la quantité de déchets produits),
- Teneur maximale en COV et composés organiques semi-volatils (COSV),
- Restriction d'utilisation de substances classées dangereuses (conformément à la directive 2009/2/CE),
- Contrôle des performances du produit (adhérence, vieillissement, rendement),
- Sensibilisation du consommateur (mesures de sécurité et recyclage des produits).

En 2018, une trentaine de fabricants de peinture en France détenaient l'Ecolabel (Figure I-3) pour certaines de leurs gammes de produits [15].



Figure I-3: Logo de l'Ecolabel européen pour peintures et vernis

### 1.2.1.2. Label PURE

PURE (PeintUres et Revêtements Ecologiques d'origine naturelle) est une association professionnelle créée en 2009 réunissant des fabricants de peintures pionniers dans le développement de produits écologiques. L'association a contribué à l'élaboration d'un référentiel « Peinture et revêtement écologique d'origine naturelle » avec l'organisme de contrôle et de certification spécialisé dans les produits issus de l'agriculture biologique ECOCERT. Ce référentiel, sur lequel repose le label PURE (Figure I-4), permet de garantir au consommateur une transparence sur la composition du produit, l'utilisation majoritaire d'ingrédients naturels ou d'origine naturelle, la limitation des émissions COV et de la teneur en produits toxiques [16]. Les principales exigences de ce référentiel sont :

- 95% minimum de produits naturels ou d'origine naturelle,
- Liste restreinte de produits pétrochimiques autorisés,
- Teneur maximale en dioxyde de titane,
- Seuil d'émission COV de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  pour les produits d'intérieur,
- Produits toxiques et agents chimiques CMR (Cancérogène, mutagène et toxique pour la reproduction) interdits,
- Procédés de transformation des matières premières contrôlés.

La composition du produit fini mais aussi l'origine des matières premières et les éventuels procédés de transformation de ces matières sont des paramètres contrôlés. Les procédés mis en place doivent donc être éco-responsables. Les espèces végétales utilisées ne doivent pas faire partie des espèces protégées ou menacées, et doivent être garanties sans OGM. L'étiquetage des produits avec le détail de la composition et l'origine naturelle des matières premières est également obligatoire.



Figure I-4: Logo du label Pure pour peintures et revêtements

### 1.2.2. Le marché des peintures écologiques et naturelles

En 2017 en France, le marché des peintures bâtiment était estimé à 200 millions de litres par an pour les professionnels et 120 millions de litres par an pour les particuliers [17]. Le

durcissement des réglementations et la demande croissante des consommateurs en produits plus respectueux de l'environnement et de la santé poussent les fabricants de peinture à proposer des peintures plus écologiques. Depuis 2010, la directive européenne CE n° 2004/42/CE (complétée par la directive 2010/79/UE) définissant des seuils d'émissions maximales de COV a notamment favorisé le développement des peintures en phase aqueuse. Selon la FIPEC (Fédération des Industries des Peintures, Encres, Couleurs, Colles et adhésifs, Préservation du bois), les ventes en France de produits en phase aqueuse représentaient 90 % des ventes dans le secteur de la peinture décorative en 2016, dont la majeure partie sont des peintures acryliques. Ces produits plus écologiques possèdent des performances similaires aux peintures solvantées et contiennent peu ou pas de solvant, leur permettant de prétendre à l'Ecolabel européen.

Depuis une dizaine d'années, certains fabricants proposent également des gammes de peintures naturelles ou biosourcées, certifiées ou non par des labels existants tel que le label Pure. Ces formulations majoritairement issues d'ingrédients d'origine naturelle et présentant de faibles émissions de COV sont à distinguer des peintures écologiques elles aussi à faible teneur en COV mais contenant des ingrédients synthétiques. Les peintures naturelles sont un secteur en développement représentant 3 % des ventes françaises de peintures décoratives en 2016 selon la FIPEC.

### *1.2.3. Les ingrédients spécifiques aux peintures naturelles*

Une peinture naturelle est composée des mêmes éléments fonctionnels que les peintures classiques (liants, charges, pigments et additifs) mais se définit par l'origine naturelle d'au moins 95 % de ses ingrédients. Les composants synthétiques sont remplacés par des produits d'origine végétale, animale ou minérale peu ou non transformés. La majorité des peintures naturelles se présentent sous la forme d'émulsions, dans lesquelles le liant, l'huile végétale, est dispersée dans le solvant, l'eau. Les charges et les pigments utilisés sont d'origine minérale et font partie des ingrédients utilisés dans les peintures classiques. Quelques additifs spécifiques aux peintures naturelles sont également ajoutés : le siccatif pour amorcer le séchage par oxydation et les biocides pour améliorer la conservation de la formule.

#### *1.2.3.1. Les liants naturels*

Les huiles végétales et les standolies d'huile (huiles « cuites ») sont les liants les plus utilisés pour les peintures naturelles. Elles peuvent être utilisées seules, en mélange ou combinées à des résines naturelles. La composition en acides gras des huiles végétales définit leur capacité à sécher (siccativité) et ainsi leur possible emploi en tant que liant dans les peintures naturelles.

##### *1.2.3.1.1. Siccativité (séchage)*

La siccativité est la caractéristique des huiles végétales la plus importante pour la formulation de peinture. Elle est définie comme «la propriété que possèdent certaines substances appliquées en couche mince, d'évoluer de façon irréversible de l'état liquide à l'état solide par polymérisation oxydative sous l'action de l'air, et éventuellement de la lumière » [18]. La siccativité d'une huile est donc une indication de sa capacité à sécher en présence de l'oxygène de l'air à température ambiante (phénomène d'auto-oxydation). Cette propriété est liée à la composition de l'huile végétale et plus particulièrement à la présence d'acides gras insaturés. L'auto-oxydation des huiles est un mécanisme radicalaire faisant intervenir trois phases : l'initiation, la propagation et la terminaison.

## Initiation

Il existe plusieurs voies d'initiation pour l'auto-oxydation des acides gras. En l'absence d'un catalyseur extérieur, la voie principale implique les impuretés facilement oxydables présentes dans les huiles, tels que les hydroperoxydes formés au cours du procédé d'extraction. Après décomposition thermique ou contact avec l'atmosphère, des radicaux libres sont générés à partir de ces impuretés et peuvent amorcer l'oxydation radicalaire en arrachant un atome d'hydrogène allylique à la chaîne d'acide gras (Figure I-5).

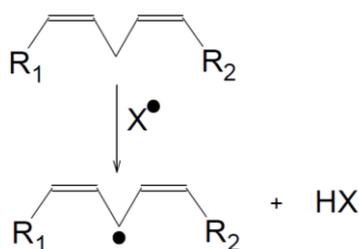


Figure I-5: Etape d'initiation du mécanisme d'auto-oxydation des acides gras [19]

## Propagation

Au cours de l'étape de propagation, le radical formé après l'initiation peut d'abord subir une isomérisation vers un état plus stable (par conjugaison des doubles liaisons) avant l'addition de l'oxygène menant à la formation d'hydroperoxydes (Figure I-6). Ces hydroperoxydes instables se décomposent ensuite en radicaux peroxydes ou alkoxydes par scission homolytique de la liaison O-O et forment des produits secondaires d'oxydation variés dont des aldéhydes, des acides carboxyliques ou des cétones [20].

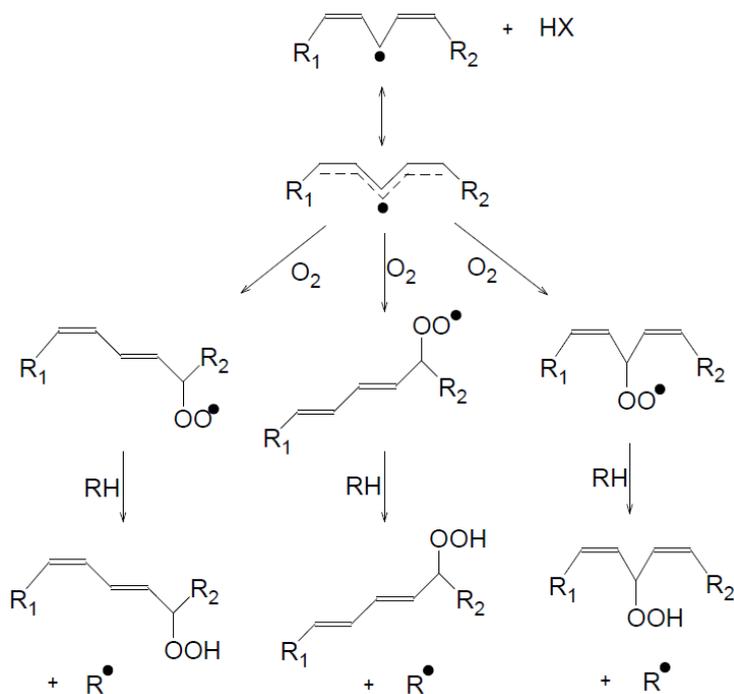


Figure I-6: Mécanisme de formation des hydroperoxydes au cours de l'auto-oxydation des acides gras [19]

## Terminaison

Le processus d'auto-oxydation est continu et ne présente pas réellement de phase de terminaison. La recombinaison des radicaux mène cependant préférentiellement à la formation d'espèces non radicalaires stables qui mettent un terme au cycle réactionnel. Les radicaux issus de l'étape de propagation réagissent ainsi pour former un polymère tridimensionnel grâce à la formation de ponts éthers ou peroxydes [21].

### I.2.3.1.2. Les huiles végétales

Les huiles végétales sont principalement composées de triacylglycérols (ou triglycérides), dont les longues chaînes carbonées non ramifiées comportent, majoritairement, un nombre pair de carbones (de C<sub>6</sub> à C<sub>20</sub>) et peuvent présenter une ou plusieurs insaturations. Les triglycérides mixtes, pour lesquels les radicaux alkyles R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> sont différents, sont les plus communs (Figure I-7).

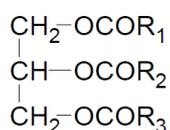


Figure I-7: Formule semi-développée d'un triglycéride mixte

Les propriétés des huiles végétales diffèrent en fonction des acides gras qui les composent. Les acides gras les plus courants sont présentés dans le Tableau I-4.

Tableau I-4: Formule et structure des principaux acides gras

Acide gras	Formule	Structure
Acide laurique (C12 :0)	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	
Acide myristique (C14 :0)	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	
Acide palmitique (C16 :0)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	
Acide palmitoléique (C16 :1 ω7)	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	
Acide stéarique (C18 :0)	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	
Acide oléique (C18 :1 ω9)	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	
Acide linoléique (C18 :2 ω6)	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	
Acide α-linolénique (C18 :3 ω3)	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	

Les huiles végétales comprennent une fraction majoritaire saponifiable, c'est-à-dire comportant une fonction ester hydrolysable, composée en grande partie des triglycérides (95 à 99 % en poids de l'huile) et d'une faible quantité de lipides polaires dont les phospholipides (0,1 à 0,2 %). La partie insaponifiable de l'huile (généralement de l'ordre de 0,1 à 3 % dans les huiles végétales classiques) est constituée de composés mineurs liposolubles, tels que les hydrocarbures, les stérols, les méthyl-stérols, les alcools triterpéniques, les tocophérols et les caroténoïdes [22].

Parmi les huiles végétales, seules les huiles comportant une proportion élevée d'acides gras insaturés sont utilisées dans les peintures. Les huiles sont divisées en trois catégories selon leur indice d'iode ( $\text{gI}_2/100\text{g}$  huile), attestant de leur richesse en acides gras insaturés (Tableau I-5). Plus l'indice d'iode est élevé, plus le nombre d'insaturations dans l'huile est élevé. Les huiles siccatives présentent un indice d'iode élevé ( $> 150$ ) et ont une bonne capacité de séchage, telle que l'huile de lin riche en acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique. Un nombre plus élevé de doubles liaisons induit en effet une meilleure réticulation et donc un film plus solide en un temps plus faible.

Tableau I-5: Siccativité des huiles en fonction de leur indice d'iode

Catégorie	Indice d'iode ( $\text{gI}_2/100\text{g}$ )	Exemple d'huile végétale
Non siccative	$< 110$	Huile d'olive
Semi-siccative	$110 < \text{Indice} < 150$	Huile de noix, huile de tournesol
Siccative	$> 150$	Huile de lin, huile de chanvre

Connue pour ses propriétés siccatives depuis le XV<sup>ème</sup> siècle, l'**huile de lin** est depuis employée comme liant en peinture [23]. Le lin, *Linum usitatissimum*, est une plante herbacée de la famille des *Linaceae* dont les premières traces de culture datent de 8000 ans avant JC [24]. La production mondiale de graines de lin s'élevait à 2 millions de tonnes en 2010, pour des utilisations variées, dans les domaines du textile, de l'alimentation animale ou pour l'industrie chimique [25, 26].

Le lin donne des petites graines ovales et plates de couleur brune, mesurant entre 3 et 6 mm de longueur. Le poids de 1000 grains varie entre 5 et 10 grammes [26]. La teneur élevée en huile, de 26 à 45 % selon les variétés, et le profil en acide gras de cette huile, font la particularité de la graine de lin [27]. L'huile de lin est en effet majoritairement composée d'acide  $\alpha$ -linoléique (C18 :3  $\omega$ 3) (Tableau I-6). Sa richesse en acides gras polyinsaturés en fait l'une des huiles les plus siccatives, avec un indice d'iode de 180. Utilisée en tant que liant, elle présente cependant le désavantage de jaunir après une période de non exposition à la lumière. Ce phénomène est dû à la richesse en acide  $\alpha$ -linoléique de l'huile de lin, qui favorise la formation de composés colorés *via* la condensation de cétones conjuguées au cours du mécanisme d'auto-oxydation [28]. L'huile de lin peut être utilisée brute ou « cuite » après standolisation, afin de réduire ce phénomène de jaunissement et d'améliorer le temps de séchage.

Tableau I-6: Composition en acide gras des huiles de lin, de chanvre et de tournesol [21,29,30,31,32] (en pourcentage des acides gras totaux de l'huile)

	Huile de tournesol [21]	Huile de lin [21,29,30,31]	Huile de chanvre [31,32]	Huile de tung [21]
Acide palmitique (C16 :0)	5 - 8	4 - 6	6 - 7	3 - 4
Acide stéarique (C18 :0)	4 - 6	2 - 3	2 - 3	1 - 3
Acide oléique (C18 :1, <i>n</i> -9)	15 - 25	10 - 22	12 - 16	4 - 9
Acide linoléique (C18 :2, <i>n</i> -6)	62 - 70	12 - 18	55 - 57	8 - 10
Acide $\alpha$ -linoléique (C18 :3, <i>n</i> -3)	$< 1$	50 - 62	16 - 22	-
Acide $\alpha$ -éléostéarique (C18 :3 $\Delta$ c9, t11, t13)	-	-	-	77 - 86

**L'huile de chanvre**, extraite des graines de *Cannabis sativa*, appelées chènevis, est également utilisée pour la formulation de peintures comme liant. Le chanvre textile est une plante de la famille *Cannabaceae* d'abord cultivée pour ses fibres, utilisées en textile ou en papeterie. Les graines de chanvre sont oblongues, d'environ 3 à 5 mm de long, et d'une couleur allant du brun au vert. Leur teneur en huile varie de 28 à 35 % [32]. L'huile de chanvre est très riche en acide gras insaturés (plus de 72 %) (Tableau I-6). C'est une huile siccatrice avec un indice d'iode de 155.

**L'huile de tournesol**, ou la standolie d'huile de tournesol, peuvent être utilisées en peinture comme liant. Habituellement réservée au domaine alimentaire, l'huile de tournesol est une huile semi-siccatrice particulièrement riche en acide linoléique (Tableau I-6). La standolisation permet à l'huile de tournesol d'atteindre un séchage suffisamment rapide pour être employée comme liant. De plus, l'huile de tournesol présente une bonne résistance au jaunissement à l'obscurité.

**L'huile de tung** (ou huile de bois de chine) est issue de la pression des graines de l'arbre appelé noyer de bancoulier (*Aleurites moluccana*) originaire d'Asie tropicale. Les graines renferment 25 à 45 % d'huile composée à 80 % d'acide  $\alpha$ -éléostéarique, acide gras présentant trois insaturations conjuguées (Tableau I-6) [21]. L'huile de tung est une huile siccatrice donnant un film plus élastique et plus résistant au jaunissement que l'huile de lin.

Plusieurs autres huiles siccatrices ou semi-siccatrices peuvent être utilisées en peinture, telles que les huiles de chia, de périlla, de soja ou de noix.

#### I.2.3.1.3. Standolisation

Le temps de séchage des huiles végétales siccatrices, de l'ordre de quelques jours, est parfois considéré comme trop long pour certains usages commerciaux [33]. Une étape de prépolymérisation thermique des doubles liaisons des acides gras est donc parfois utilisée pour raccourcir le temps de séchage. Ce procédé, appelé standolisation, consiste à chauffer les huiles à haute température (supérieure à 270 °C) en l'absence d'oxygène. Les huiles « cuites » obtenues, ou standolies, ont une viscosité plus élevée, permettent un séchage plus rapide, plus homogène et forment un film plus élastique et résistant à l'eau. Plusieurs mécanismes ont été proposés dans les années 50 afin d'expliquer les transformations chimiques subies par les acides gras au cours de la standolisation, sans qu'aucun n'ait pu être confirmé [34].

#### I.2.3.2. Les additifs

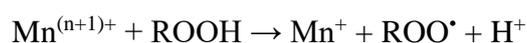
Les additifs sont des composés ajoutés en faible quantité dans la peinture afin d'en améliorer certaines qualités ou de lui conférer des propriétés spécifiques. Dans les peintures naturelles, les principaux additifs sont les siccatifs et les biocides.

##### I.2.3.2.1. Additif : siccatif

Les siccatifs sont utilisés pour réduire le temps de séchage et améliorer le durcissement à cœur des peintures. Appartenant à la famille chimique des sels métalliques, ce sont des catalyseurs des réactions d'oxydation et/ou de polymérisation des huiles végétales provoquant la formation du film [35]. Les siccatifs sont répartis en deux classes en fonction de leur action et de leur composition chimique. Les siccatifs primaires contiennent des métaux de transition possédant plusieurs états d'oxydation tels que le cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ), le manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) ou le fer ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et les

siccatifs auxiliaires sont composés de métaux de transition ne présentant qu'un seul état d'oxydation, tels que le potassium ( $K^+$ ) ou le calcium ( $Ca^{2+}$ ).

Les siccatifs primaires interviennent dans les deux premiers stades du mécanisme d'oxydation des huiles : l'initiation et la propagation. Les ions métalliques peuvent en effet initier l'oxydation en réagissant avec le dioxygène de l'air pour former de l'oxygène singulet et un radical peroxy. Le radical ainsi formé amorce l'oxydation en arrachant un atome d'hydrogène à la chaîne d'acide gras [28]. Lors de la propagation, les siccatifs primaires catalysent la décomposition des hydroperoxydes par la réaction rédox de Haber et Weiss :



L'énergie d'activation nécessaire à la décomposition de deux moles d'hydroperoxydes est ainsi divisée par deux en présence d'un catalyseur métalliques [36]. Cette double action permet un séchage rapide de la couche supérieure de peinture avant la désactivation du siccatif primaire. Le séchage en profondeur est favorisé par l'ajout de siccatifs auxiliaires. Ceux-ci empêchent la désactivation des siccatifs primaires par les acides carboxyliques et permettent de préserver leur action jusqu'au séchage en profondeur du film [36].

Les siccatifs au cobalt ont été les plus utilisés ces dernières décennies, mais leur cancérogénicité suspectée [37] pousse aujourd'hui les industriels à rechercher des solutions alternatives, principalement orientées vers le développement de nouveaux complexes de manganèse [35, 38].

#### I.2.3.2.2. Additif : Biocide

Les biocides sont définis comme toute substance active destinée « à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique » [39]. Ils sont utilisés en peinture pour prévenir la contamination des produits par des microorganismes de la famille des bactéries, des moisissures, des levures ou des microalgues. La composition riche en eau et l'absence de solvant chimique pouvant inhiber le développement des microorganismes dans les peintures naturelles, les rendent particulièrement sensibles à ces contaminations microbiennes. La température et l'humidité ambiante des lieux de stockage peuvent également favoriser un développement microbien. Les biocides sont généralement des molécules de synthèse et sont classés selon leur mécanisme d'action. Ces substances peuvent ainsi être électrophiles (isothiazolinones, aldéhydes), oxydantes (chlore, brome) ou lysantes (phénols, alcools) [40]. Parmi celles-ci, les isothiazolinones, et plus particulièrement un mélange de méthylisothiazolinone et de chloroisothiazolinone, est souvent employé dans les produits aqueux et dans les peintures naturelles. L'utilisation de ce biocide est en effet autorisée par les différents labels écologiques à des teneurs réduites (0,05 % massique) et sous condition d'information aux consommateurs par le biais de l'étiquetage [14,16].

#### I.2.3.3. L'émulsion végétale

Les peintures naturelles sont des peintures hydrodiluable. Le liant (huile et/ou résine végétale) est mis en émulsion dans le solvant, l'eau, pour former un milieu homogène.

### I.2.3.3.1. Définition

Une émulsion est une dispersion de deux liquides non miscibles. La phase dispersée ou discontinue est présente sous forme de fines gouttelettes à l'intérieur de la phase dispersante ou continue. Le plus souvent, les émulsions sont constituées d'une phase hydrophile et d'une phase lipophile. Deux classes d'émulsions sont distinguées en fonction de la dispersion de ces deux phases. Lorsque la phase huileuse est dispersée à l'intérieure de la phase aqueuse, l'émulsion est de type huile-dans-l'eau. A l'inverse, lorsque des gouttelettes de phase aqueuse sont dispersées dans une phase lipophile, l'émulsion est appelée eau-dans-l'huile. Les différents constituants de l'émulsion sont répartis dans les deux phases ou à leur interface en fonction de leur affinité avec chacune d'entre elles. Les émulsions sont des systèmes instables thermodynamiquement dont la stabilité est influencée par de nombreux paramètres tels que la taille des gouttelettes, le pH ou la viscosité des deux phases [41].

### I.2.3.3.2. Emulsifiants

L'obtention d'une émulsion nécessite souvent l'emploi d'émulsifiants qui stabilisent la dispersion de gouttelettes. Ces molécules appartiennent à la famille des tensioactifs ou surfactifs et améliorent la formation et la stabilité des émulsions grâce à leurs propriétés physicochimiques. Cationiques, anioniques ou amphiphiles, les émulsifiants se placent à l'interface des deux phases hydrophiles et hydrophobes et diminuent la tension interfaciale. La quantité d'énergie nécessaire à la déstabilisation des gouttelettes de liquide est ainsi plus importante. De plus, la couche formée autour des gouttelettes limite la coalescence, l'un des phénomènes de déstabilisation physique des émulsions (Figure I-8).

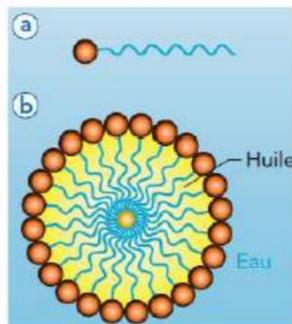


Figure I-8 : a) Tensioactif présentant une tête hydrophile et une queue hydrophobe  
b) Gouttelette d'huile stabilisée par le tensioactif dans une émulsion huile-dans-l'eau

Parmi les émulsifiants naturels, les protéines sont particulièrement utilisées, notamment pour les émulsions huile-dans-l'eau [42]. Ces molécules possèdent en effet des propriétés émulsifiantes particulièrement intéressantes grâce à leur capacité à former un film viscoélastique résistant autour des gouttelettes. Après adsorption à l'interface eau-huile, la conformation des protéines change afin de former des liaisons fortes (ponts disulfures intermoléculaires) entre leurs chaînes latérales d'acides aminés [43]. Ces modifications conformationnelles sont plus rapides pour des protéines relativement flexibles comme la caséine [41]. La formation de cette membrane protectrice aide à la formation des gouttelettes d'huile, en réduisant la tension interfaciale et à leur stabilisation en limitant les phénomènes de coalescence et de floculation grâce à des interactions stériques et électrostatiques.

Les huiles végétales peuvent également contenir des molécules émulsifiantes naturelles comme des phospholipides [42], des stérols [44] ou des acides gras libres [45], qui facilitent la mise en œuvre et favorisent la stabilité de l'émulsion.

### **I.3. Choix des matières premières végétales**

#### *I.3.1. Propriétés visées*

Deux types d'ingrédients à inclure dans la formulation d'une peinture écologique et naturelle utilisable en milieu subtropical et plus spécifiquement à destination de l'Île de la Réunion, ont été recherchés parmi des co-produits de l'industrie agroalimentaire réunionnaise non valorisés actuellement : (i) une huile végétale tropicale dont le mode d'extraction, la teneur et la composition en acides gras correspondent aux critères de siccativité souhaités par l'industrie des peintures, (ii) des extraits végétaux actifs doués de propriétés biologiques spécifiques, notamment biocide.

##### *I.3.1.1. Sélection d'une huile végétale tropicale*

L'huile végétale recherchée sera utilisée, seule ou mélangée à une autre, pour réaliser une émulsion qui servira de base pour une gamme de formulations de peintures écologiques. L'huile végétale sert de liant, ingrédient d'une peinture permettant de lier les différents constituants entre eux et d'adhérer au support. Afin d'assumer ce rôle de liant et ainsi permettre le séchage de la peinture, l'huile végétale doit présenter un certain nombre de caractéristiques, notamment au niveau de sa composition. Les huiles végétales utilisées en peinture sont choisies pour leur forte teneur en acides gras polyinsaturés. La présence de doubles liaisons va en effet permettre de former un réseau tridimensionnel solide par oxydation avec l'oxygène de l'air. L'huile végétale recherchée devra donc être semi-siccative ou siccative afin de pouvoir être incorporée à des formulations de peintures. Elle devra présenter une forte teneur en acides gras polyinsaturés (AGPI) tels que l'acide linoléique (C18 :2, *n*-6) et l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18 :3, *n*-3). Cette huile ne devra pas avoir une odeur trop forte, ni une coloration trop prononcée. Enfin, l'extraction de l'huile devra être possible par simple pression à froid ou par un procédé éco-responsable conforme au référentiel ECOCERT, sur lequel repose le label Pure.

##### *I.3.1.2. Sélection d'extraits végétaux actifs*

Les peintures naturelles actuelles présentent une résistance plus faible que les peintures synthétiques face aux contaminations microbiologiques favorisées par un climat subtropical. L'ajout de biocide chimique permet de diminuer le risque de développement microbien mais ne l'élimine pas complètement. Aujourd'hui toléré par l'organisme ECOCERT, le biocide utilisé (mélange de méthylisothiazolinone et de chloroisothiazolinone) est voué à disparaître des formulations de peintures écologiques. Un nouvel ingrédient d'origine végétale aux propriétés antibactériennes et/ou antifongiques est donc recherché pour lutter contre ce phénomène de contamination microbienne. Les procédés utilisés pour extraire et purifier cette(ces) substance(s) devront être éco-responsables et en accord avec le référentiel ECOCERT. L'extrait végétal actif sera introduit en tant qu'additif dans la formulation finale sans influencer les autres propriétés du produit, notamment le séchage.

### I.3.2. Description des matières premières végétales sélectionnées

Les matières premières pour l'extraction des nouveaux ingrédients ont été choisies parmi les co-produits agroalimentaires disponibles sur l'île de La Réunion. La valorisation de ces co-produits présente un double intérêt économique pour les industries agroalimentaires, et écologique pour l'écosystème insulaire sensible de La Réunion.

#### I.3.2.1. Le goyavier de Chine

Le goyavier de Chine (*Psidium cattleianum*), également appelé goyavier-fraise ou arça, est un arbuste fruitier originaire d'Amérique latine. Il fait partie de la famille des *Myrtaceae* qui comprend plus de 3800 espèces, dont le goyavier (*Psidium guajava*) donnant pour fruit la goyave. Le goyavier de Chine est actuellement présent en Amérique du Sud, en Amérique centrale et dans les îles de la mer des Caraïbes [46]. Il a également été introduit en Asie, en Australie, à l'île Maurice et à La Réunion. Cette espèce comprend deux variétés : le goyavier rouge (*P. cattleianum* Sabine) et le goyavier jaune (*P. cattleianum* var. *lucidum*) (Figure I-9). Plus résistant, le goyavier rouge est adapté au climat tropical chaud et humide mais supporte des températures proches de zéro et se développe jusqu'à plus de 1300 m d'altitude [47]. Présent à la Réunion depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle, le goyavier rouge est aujourd'hui naturalisé sur des centaines d'hectares et est inscrit sur la liste de niveau 5, niveau le plus élevé, des espèces envahissantes de l'île de la Réunion [48].



Figure I-9 : Illustration botanique de l'espèce *Psidium cattleianum* var. *lucidum* [49]

Le goyavier rouge est cultivé pour ses fruits récoltés au début de l'hiver austral entre avril et juin. Les baies produites sont sphériques, mesurant environ 2,5 cm de diamètre. La peau est rouge violacé à maturité et la chair blanche, juteuse, sucrée et acidulée. Les fruits contiennent des petites graines rondes et dures d'environ 3 mm de diamètre.

La culture du goyavier rouge est en plein essor à La Réunion, avec des productions annuelles en progression, 7 tonnes de fruits collectées en 2008, 70 tonnes en 2011 et 1130 tonnes en 2017 selon la Chambre d'Agriculture de La Réunion. Cette croissance est en partie due à la filière de transformation des fruits du goyavier rouge, dont la demande, estimée à 400 tonnes par an en 2018 par le CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), ne cesse d'augmenter. Les fruits sont utilisés pour faire des confitures, des

gelées, des jus de fruits ou des sorbets par des confiseurs locaux et par des petites et moyennes entreprises (PME) de transformation agroalimentaire, telle que l'entreprise Royal Bourbon Industries, une des principales PME de transformation de produits agroalimentaires sur l'île. La transformation des fruits de goyaviers rouges génère une production importante de co-produits, constitués majoritairement de graines et de peau, non valorisés actuellement. Ces co-produits sont considérés comme des Déchets Industriels Banals (DIB) alors que ces fruits et l'huile des graines qu'elle renferme, peuvent constituer une ressource végétale intéressante.

### I.3.2.2. Le fruit de la Passion

Le fruit de la passion (*Passiflora edulis*) ou grenadille est originaire du Brésil. Il fait partie de la famille des *Passifloraceae*, composée de plus de 500 espèces, dont une vingtaine produisant des fruits comestibles. Parmi celles-ci, *Passiflora edulis* est la plus cultivée dans le monde [50]. Cette plante grimpante est présente en Amérique du Sud, en Australie, en Afrique, dans certaines régions d'Asie et à la Réunion. Elle présente deux variétés : *Passiflora edulis edulis* aux fruits pourpres et *Passiflora edulis flavicarpa* aux fruits jaunes. La variété pourpre est la plus cultivée sur l'île de la Réunion, avec 500 tonnes produites en 2017 d'après la Chambre d'Agriculture de La Réunion. Elle fait également partie de la liste de niveau 4 des espèces invasives sur l'île [48]. Les fruits sont des baies ovoïdes mesurant de 5 à 8 cm (Figure I-10). Leur peau épaisse de couleur pourpre à marron se ride en mûrissant. Ils contiennent une multitude de graines noires ovoïdes d'environ 5 mm de diamètre, enfermées dans un arille jaune.



Figure I-10 : Illustration botanique de l'espèce *Passiflora edulis* [51]

Les fruits de la passion sont commercialisés et consommés frais, mais depuis ces dernières années, ils sont de plus en plus utilisés par l'industrie agroalimentaire réunionnaise pour la fabrication de jus, de confitures, de pulpes ou de sorbets. La demande croissante de ce type de produits transformés provoque une augmentation de la quantité générée de co-produits végétaux (peau, graines, etc.) et pose la question du traitement et de la valorisation de ces résidus [52]. Ces co-produits et les lipides qu'ils renferment, pourraient être valorisés à des fins de formulation de peintures écologiques.

### I.3.2.3. La carambole

La carambole (*Averrhoa carambola*), ou fruit étoilé, est le fruit comestible d'un arbre de la famille des *Oxalidaceae*. Le carambolier est un petit arbre atteignant généralement de 3 à 5 m de hauteur, aux feuilles persistantes. Peu résistant au froid, il pousse dans des zones au climat tropical ou subtropical telles que le Brésil, la Malaisie, la Chine ou l'Australie [53]. Originaire d'Asie, il a été introduit à la Réunion au XVIII<sup>ème</sup> siècle où il est depuis cultivé [54]. Répartie en deux récoltes d'environ deux mois, la capacité annuelle de production des arbres matures (âgés de plus de 8 ans) est de 90 à 300 kg [55].

Les fruits mesurant 7,5 à 12,5 cm de longueur dont la coupe transversale a la forme d'une étoile, sont constitués de 5 côtes saillantes renfermant chacune des graines plates (Figure I-11). La peau jaune comestible renferme une pulpe translucide sucrée et acidulée, dont la saveur varie selon la variété et le moment de la récolte.



Figure I-11: Illustration botanique de l'espèce *Averrhoa carambola* [49]

La carambole est un fruit très fragile, dont la chair se brunit au moindre choc. Elle est donc le plus souvent vendue localement, pour être consommée fraîche, ou transformée en jus et en confitures par les entreprises locales. La composition en composés organiques issus des co-produits générés par la transformation du fruit (pulpe résiduelle, peau et graines) pourrait être mise à profit pour en extraire des ingrédients actifs.

### I.3.2.4. La banane

Le bananier (*Musa acuminata*) appartient à la famille des plantes herbacées arbustives ou arborescentes *Musaceae*. Originaire d'Asie du Sud Est, il fait partie des premières espèces cultivées par l'Homme il y a 7000 ans [56]. La banane est aujourd'hui essentielle à l'alimentation et à l'économie de nombreux pays tropicaux et subtropicaux, et est également devenue le fruit le plus populaire dans les pays industrialisés [57]. La production annuelle de bananes à La Réunion était de 1900 tonnes en 2015 d'après la Chambre d'Agriculture.

Le bananier est composé de grandes feuilles appelées gaines, mesurant 1 à 2 m de long et 60 cm de large, arrangées en spirale [58]. Les gaines forment un faux tronc de 30 cm de diamètre à la base et pouvant atteindre 1,5 à 6 m de hauteur. Des fleurs jaunes regroupées en grappe et

enfermées dans des feuilles violacées constituent l'inflorescence appelée régime. Les bananes sont des baies allongées pourvues d'une peau épaisse passant du vert au jaune, organisées en couronnes superposées appelées main (Figure I-12). Leur chair pâteuse et jaunâtre est riche en sucres, en vitamines et en oligo-éléments. Les fruits sont surtout utilisés en local pour fabriquer des confitures et autres confiseries, générant des résidus non encore valorisés à ce jour.



Figure I-12: Illustration botanique de l'espèce *Musa acuminata* [59]

#### 1.3.2.5. Le tangor

Le tangor, ou Tangor Ortanique (*Citrus reticulata* x *Citrus sinensis*), est un hybride de la famille des *Rutaceae* issu du croisement entre la mandarine (*C. reticulata*) et l'orange (*C. sinensis*). Il est cultivé dans toutes les zones productrices d'agrumes telles que les Etats-Unis, l'Afrique du Sud ou le Maroc et a été introduit à La Réunion dans les années 1970. L'agrumiculture représente la deuxième plus importante culture fruitière sur l'île avec 400 ha, dont 60 % sont dédiés à la production de tangors (Chambre d'Agriculture de La Réunion, 2001).



Figure I-13: Illustration botanique de l'espèce *Citrus vulgaris* [60]

Les arbres fruitiers ont une capacité de production annuelle de plus de 60 kg [61]. La période de récolte s'étend de juin à septembre à la Réunion. Les fruits sont ronds, de couleur orange à

maturité, à l'épiderme fin et adhérent à la pulpe (Figure I-13). Ils se divisent généralement en 16 quartiers pouvant contenir plusieurs pépins. Juteux et sucrés, les fruits sont souvent utilisés pour la fabrication de jus, de sorbets ou de confitures en local. De nombreux coproduits (peau, pépins...) sont issus de cette transformation agroalimentaire.

#### 1.3.2.6. La papaye

Le papayer (*Carica papaya*) est l'espèce la plus connue de la famille *Caricaceae* comprenant 40 spécimens. Il est cultivé pour ses fruits comestibles en Amérique du Sud, en Afrique de l'Ouest et en Inde. Il a été introduit à la Réunion au XVIII<sup>ème</sup> siècle, où on le trouve dans les jardins et dans les cultures fruitières.

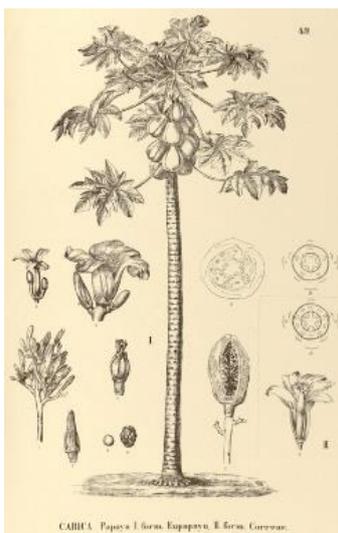


Figure I-14: Illustration botanique de l'espèce *Carica papaya* [62]

Le papayer est un petit arbre adapté aux climats tropicaux et subtropicaux et aux altitudes inférieures à 900 mètres [63]. D'une hauteur de 3 à 8 m, il est non ramifié et possède à son sommet des touffes de grandes feuilles persistantes (Figure I-14). Les papayers ont une croissance rapide et peuvent produire des fruits dès la première année. La capacité de production des arbres matures est d'environ 25-56 tonnes/hectare par an [64]. Les papayes sont produites toute l'année à la Réunion, avec un pic de production à la fin de l'été austral, de janvier à avril. Les fruits sont des baies ovoïdes longues d'une quinzaine de centimètres dont la peau passe du vert au jaune ou jaune orangé à maturité. La pulpe orangée renferme en son centre des graines rondes noires. Les papayes sont consommées mûres pour leur chair sucrée, ou vertes comme légume et servent également à la fabrication de confitures, de pulpes et de jus en local. La peau et les graines peuvent renfermer des substances naturelles potentiellement intéressantes.

#### 1.3.2.7. La patate douce

La patate douce (*Ipomoea batatas*) est une plante vivace à tiges rampantes de la famille des *Convolvulaceae*. Originaires d'Amérique du Sud, elles sont maintenant largement cultivées en Afrique, Asie et Océanie. La patate douce représente la cinquième culture vivrière mondiale dans les pays en développement, principaux producteurs. Plus de 130 millions de tonnes sont produites chaque année pour l'alimentation animale et humaine [65].



Figure I-15: Illustration botanique de l'espèce *Ipomoea batatas* [66]

La patate douce se développe en longues tiges tubéreuses pouvant atteindre 4 à 5 m de long. Ces tiges sont généralement situées à moins de 25 cm de la surface du sol, mais peuvent aussi être rampantes ou grimpantes lorsqu'elles rencontrent un obstacle [67]. La croissance est rapide et les premières récoltes ont lieu après 3 mois dans les zones subtropicales. Les rendements obtenus sont très dépendants des zones et des conditions de cultivation, avec des moyennes de 5 à 16 tonnes / hectares en Afrique et en Asie [68]. Les tubercules sont de forme allongée à arrondie et à la peau fine. Les couleurs de la peau et de la chair sont nombreuses selon les variétés, allant du beige à l'orange et au violet (Figure I-15). A la Réunion, les entreprises agroalimentaires transforment la patate douce pour en faire des confitures, de la farine et des gâteaux, générant des déchets essentiellement sous forme de peaux.

#### 1.3.2.8. Le manioc

Le manioc (*Manihot esculenta*) est un arbuste vivace de la famille des *Euphorbiaceae* cultivé pour sa racine comestible. Le nom manioc désigne aussi bien la plante que la racine. Originaire du bassin amazonien, le manioc est aujourd'hui l'une des cultures vivrières mondiales les plus importantes. Grâce à ses qualités nutritives, sa robustesse et à sa capacité à pousser dans des sols régulièrement touchés par la sécheresse, le manioc constitue la base de l'alimentation dans de nombreux pays en développement [69]. Importé à la Réunion au XVIII<sup>ème</sup> siècle depuis le Brésil, il est maintenant cultivé en petite quantité.

Le manioc se divise en deux parties : la partie émergente constituée de l'arbuste mesurant jusqu'à 4 m de hauteur, et un réseau souterrain de racines pouvant atteindre 1 m de long. Ces racines peuvent subir un phénomène de tubérisation et conduire à la production de tubercule à la chair blanche recouverte d'une écorce brune (Figure I-16). Des rendements de 5 à 30 tonnes par hectares ont été observés suivant les conditions de culture [70]. Le tubercule contient des composés cyanogènes le rendant toxique pour l'homme. Ces composés sont éliminés par lavage, cuisson et séchage. Le manioc est le plus souvent consommé sous forme de féculé. Ses utilisations artisanales et industrielles à la Réunion ciblent principalement la fabrication de féculé, de gâteaux et de produits de confiserie.



Figure I-16: Manioc (*Manihot esculenta*) [71]

### ***I.3.3. Propriétés des huiles végétales de graines de fruits***

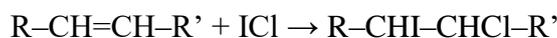
Les graines de goyavier rouge et de fruits de la passion ont été étudiées précédemment pour leur capacité à fournir une huile végétale riche en acides gras insaturés. Les travaux de Kobelnik *et al.* et de Barrales *et al.* sur des fruits originaires du Brésil indiquent que la teneur en huile des graines est de 12 % pour le goyavier [72] et de 24 % pour les fruits de la passion [73].

#### ***I.3.3.1. Caractéristiques physico-chimiques***

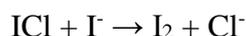
Les caractéristiques de l'huile végétale extraite des graines de fruit de la passion sont présentées dans le Tableau I-7 [74, 75]. A notre connaissance, ces données physico-chimiques ne sont pas documentées dans la littérature pour l'huile extraite de graines de goyavier rouge.

Le degré d'insaturation d'une huile, important dans le domaine des peintures, est indiqué par **l'indice d'iode**. Il est déterminé grâce au dosage des doubles liaisons par le diiode. Il est exprimé comme la masse de diiode fixé pour 100 grammes d'huile. Le réactif de Wijs (ICl) est généralement utilisé pour ce dosage, selon les étapes suivantes :

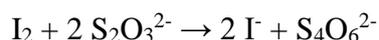
- Introduction du réactif de Wijs en excès et réaction d'addition sur les doubles liaisons :



- Transformation de l'excès d'ICl en I<sub>2</sub>:



- Dosage du diiode formé par le thiosulfate de potassium :



L'huile de fruit de la passion est semi-siccative (110 < Indice < 150) et possède un indice d'iode proche de celui des huiles de soja ou de maïs [76].

**L'indice d'acide** permet d'évaluer la quantité d'acides gras libres, c'est-à-dire non estérifiés, présents dans l'huile. Cet indice est souvent utilisé pour attester de la qualité d'une huile. En effet, la quantité d'acides gras libres est liée aux altérations subies par la graine pendant la

récolte, le stockage ou le séchage [77]. L'indice d'acide est exprimé comme la masse d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme d'huile. Les huiles extraites à froid utilisées dans le domaine alimentaire doivent présenter un indice d'acide inférieur à 4,5 mg KOH/ g d'huile, valeur préconisée par la Commission du Codex Alimentarius [78].

L'**indice de saponification** correspond à la masse d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification complète d'un gramme d'huile [79]. Il est lié à la composition de l'huile et dépend de la quantité de composés insaponifiables présents [80]. Ainsi l'huile extraite des graines de fruit de la passion a un indice de saponification similaire à celui de l'huile de tournesol ou de pépins de raisin [74].

La densité et l'indice de réfraction observés pour l'huile des graines de fruit de la passion sont semblables aux valeurs obtenues pour les huiles végétales communes telles que l'huile de colza ou de maïs [76].

Tableau I-7: Propriétés physico-chimiques des huiles des graines de fruit de la passion [74, 75]

	<b>Fruit de la passion (<i>Passiflora edulis</i>)</b>
<b>Indice d'iode (g I<sub>2</sub> / 100g)</b>	129 - 132
<b>Indice d'acide (mg KOH /g)</b>	2,3
<b>Indice de saponification (mg KOH /g)</b>	180 - 194
<b>Densité (20°C)</b>	0,9171 - 0,9173
<b>Indice de réfraction (20°C)</b>	1,4674 - 1,4731

### *1.3.3.2. Teneur en acides gras*

Les compositions en acides gras des huiles de graines de goyavier et de fruit de la passion issues de la littérature sont décrites dans le tableau I-8 [52, 72, 74, 81, 82]. Les valeurs sont présentées sous forme de fourchette, la répartition massique des acides gras pouvant varier selon la variété du fruit ou les conditions de culture et de récolte [83]. Les deux huiles présentent des profils en acides gras similaires. L'acide linoléique (C18 :2, *n*-6) est l'acide gras majoritaire, présent à plus de 70 %. L'acide linoléique, recherché dans les huiles alimentaires, fait partie des acides gras du groupe des Omega-6 dont il est le précurseur. C'est un acide gras essentiel non synthétisé par l'organisme dont les apports doivent être couverts par l'alimentation. Pour les deux huiles de graines, l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18 :3, *n*-3), précurseur des acides gras de la famille des Omega-3, n'est présent que sous forme de traces.

La richesse en acide linoléique de l'huile de fruit de la passion est en accord avec son indice d'iode la classant dans les huiles semi-siccatives. Au regard de la teneur en acide linoléique de l'huile de goyavier rouge, son indice d'iode devrait vraisemblablement être similaire à celui de l'huile de fruit de la passion.

Tableau I-8: Composition en acides gras des huiles de graine de goyavier [72, 81] et de fruit de la passion [21, 74, 82]

Acide gras	Formule chimique	Goyavier ( <i>Psidium cattleianum</i> )	Fruit de la passion ( <i>Passiflora edulis</i> )
Acide palmitique	C16 :0	6 - 9 %	8 - 9 %
Acide stéarique	C18 :0	4 - 5 %	2 - 3 %
Acide oléique	C18 :1, <i>n</i> -9	7- 11 %	14 - 16 %
Acide linoléique	C18 :2, <i>n</i> -6	75 - 81 %	73 -74 %
Acide $\alpha$ -linoléique	C18 :3, <i>n</i> -3	< 1 %	< 1 %

### I.3.3.3. Composés de la fraction insaponifiable des huiles

La fraction insaponifiable des huiles végétales renferme des molécules appartenant à plusieurs familles chimiques. Les molécules les plus couramment étudiées sont les tocophérols, les stérols et les caroténoïdes, mais les composés insaponifiables comprennent également des méthyl-stérols, des hydrocarbures ou des alcools triterpéniques.

#### I.3.3.3.1. Tocophérols

Les tocophérols sont une famille de composés organiques rassemblés sous le terme générique de vitamine E. Ils sont constitués d'une longue chaîne aliphatique de 16 carbones attachée à un noyau chromanol portant un, deux ou trois groupements méthyles [84]. Les quatre substances appartenant à la famille des tocophérols sont différenciées par la position des groupements méthyles sur le noyau aromatique. On distingue ainsi les formes isomériques notées *alpha*, *beta*, *gamma* et *delta*-tocophérol (Figure I-17). Grâce à leur structure chimique, ces molécules sont liposolubles et possèdent des propriétés antioxydantes. Dans la graine, les tocophérols participent à la bonne conservation des acides gras en inhibant les réactions de dégradation radicalaires [85]. La composition en tocophérols de l'huile de fruits de la passion est présentée dans le tableau I-9 [75, 82].

Tableau I-9: Teneur en tocophérols dans l'huile de graine de fruit de la passion en mg/100g [75, 82]

	Fruits de la passion ( <i>Passiflora edulis</i> )
$\alpha$ -tocophérol	0,5 - 1,4
$\beta$ -tocophérol	2,6 - 2,9
$\gamma$ -tocophérol	0,7 - 21,7
$\delta$ -tocophérol	24,3 - 84,6

Le composé majoritaire est le  $\delta$ -tocophérol. Dans les huiles végétales, les isomères majoritaires sont généralement l' $\alpha$ -tocophérol (huile de tournesol [86]) et le  $\gamma$ -tocophérol (huile de lin, huile de chanvre [87, 88]). La teneur en tocophérols dans une huile végétale peut être influencée par plusieurs paramètres tels que le stockage ou le séchage des graines [89], l'origine géographique, les conditions de culture ou la variété du fruit [80].

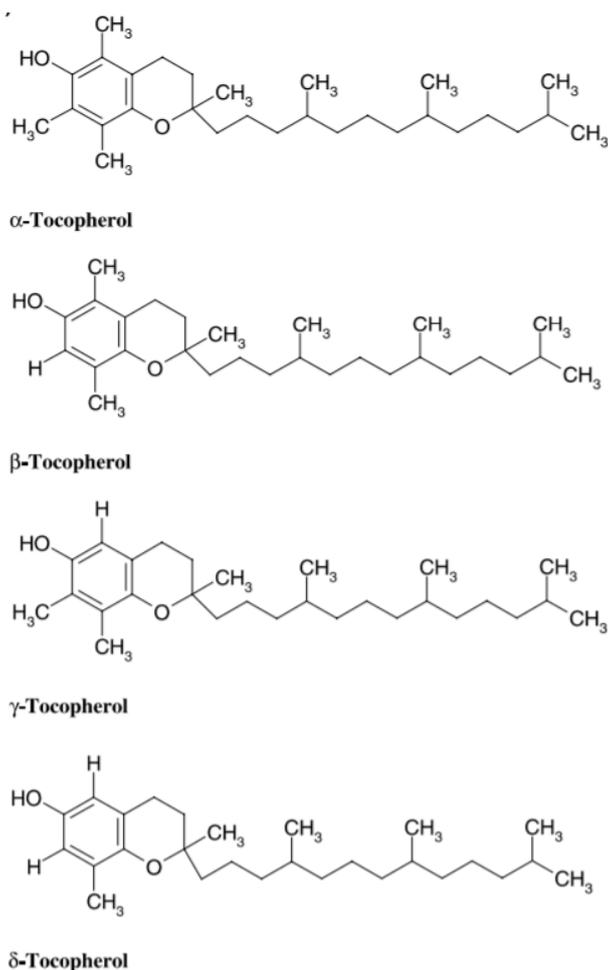


Figure I-17: Structure chimique des tocophérols [85]

### I.3.3.3.2. Phytostérols

Les stérols végétaux, appelés phytostérols, constituent souvent la majeure partie des composés insaponifiables des huiles végétales. Ce sont des composés triterpéniques, à la structure et aux fonctions biologiques proches de celles du cholestérol animal [90]. Ces alcools stéroïdes sont constitués d'un noyau tétracyclique possédant une fonction hydroxyle sur le troisième carbone du cycle A et d'une chaîne latérale sur le cycle D (Figure I-18). Dans les huiles végétales, les stérols les plus communs présentent une insaturation généralement située en 5<sup>ème</sup> position sur le cycle B ( $\beta$ -sitostérol, stigmastérol) ou plus rarement en 7<sup>ème</sup> position ( $\Delta$ 7-avénastérol) [91].

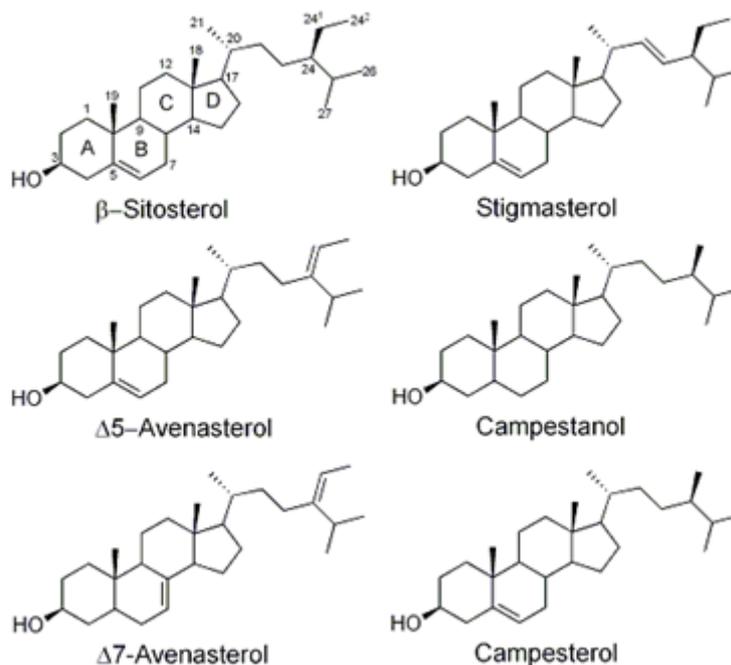


Figure I-18: Structure chimique des principaux phytostérols présents dans les huiles végétales [91]

Les phytostérols peuvent être présents sous différentes formes dans les huiles végétales. Les stérols libres ou sous forme d'esters d'acides gras sont les plus fréquents mais des stéryl-glucosides et des stéryl-glucosides acétylés peuvent également être rencontrés [92, 93]. La composition en phytostérols de l'huile de fruit de la passion est détaillée dans le Tableau I-10 [75, 94].

Tableau I-10: Teneur en phytostérols en mg/100g d'huile de fruit de la passion originaire du Brésil [75, 94]

	<b>Fruit de la passion (<i>Passiflora edulis</i>)</b>
<b>Campesterol</b>	16 - 28
<b>Stigmasterol</b>	78 - 112
<b>β-sitosterol</b>	68 - 139
<b>Total</b>	175 - 275

Comme pour les tocophérols, les teneurs en stérols sont dépendantes de plusieurs facteurs. Le lieu et les conditions de culture pour une graine donnée ont ainsi une influence sur la composition en phytostérols de l'huile végétale, même si les variabilités constatées sont inférieures à celles constatées pour les tocophérols [90]. La variabilité génétique peut également être à l'origine de variations de composition [95]. Ainsi, les huiles extraites des graines de fruit de la passion originaire du Brésil présente des teneurs différentes, notamment en β-sitostérol et en stigmasterol selon les sources [80, 94].

Les phytostérols sont utilisés dans plusieurs domaines grâce à leurs propriétés biologiques variées [90]. Ils sont en effet connus pour inhiber l'absorption intestinale du cholestérol, et ainsi diminuer le taux de cholestérol dans le sang. Les phytostérols sont incorporés à de nombreux

produits ou compléments alimentaires [91]. Les propriétés anticancéreuses et anti-inflammatoires des phytostérols ont également été étudiées [96, 97]. Enfin, leurs pouvoirs émulsifiant et pénétrant sont souvent utilisés en cosmétique [44].

#### I.3.3.3.3. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des métabolites secondaires produits par les plantes rassemblant plus de 750 composés le plus souvent tétraterpéniques (structure en C40) [98]. Ces pigments lipophiles sont divisés en deux familles principales selon leur composition chimique : les carotènes qui sont hydrocarbonés et les xanthophylles qui contiennent de l'oxygène, sous la forme d'une liaison cétone, alcool, esters d'alcool, etc. [99]. Les caroténoïdes peuvent être linéaires ou présenter un ou deux cycles (situés à l'extrémité de la molécule). Le lycopène, l' $\alpha$ -carotène et le  $\beta$ -carotène (pour les carotènes) et la lutéine et la xéaxanthine (pour les xanthophylles) font partie des caroténoïdes les plus courants (Figure I-19).

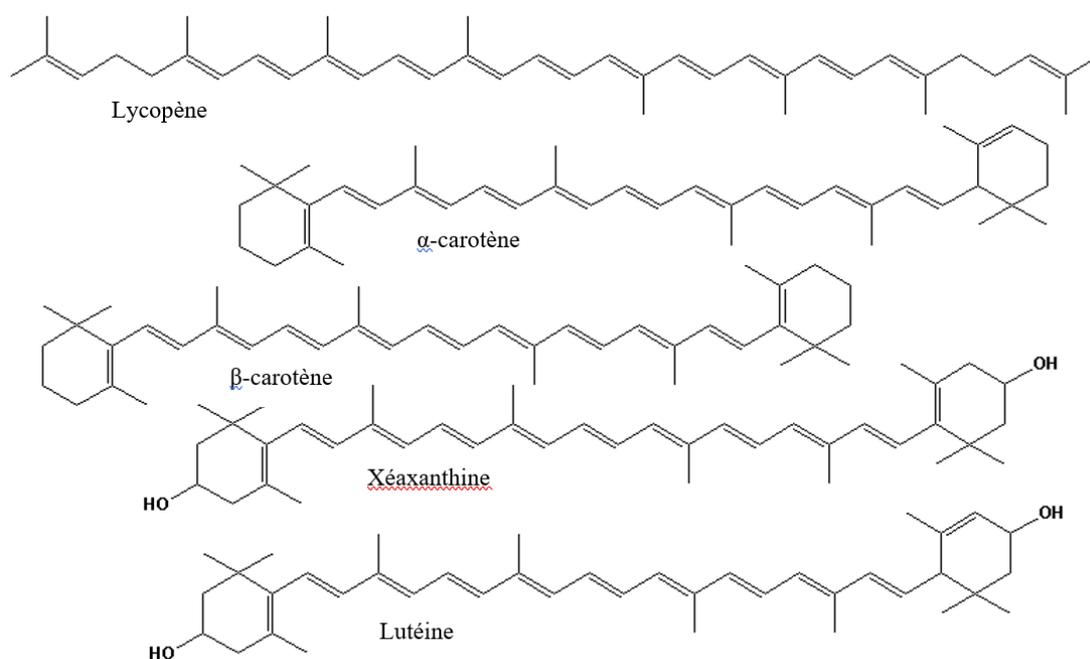


Figure I-19: Structure chimique de plusieurs caroténoïdes courants

Leur caractéristique principale est leur couleur variant du jaune au rouge. Ces pigments absorbent dans le domaine du visible entre 400 et 500 nm grâce à un système de double liaisons conjuguées. Plus le degré de conjugaison de la molécule est élevé, plus sa longueur d'onde maximale d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ) est élevée et plus sa coloration tend vers le rouge [100].

Les caroténoïdes sont aussi largement connus pour leurs propriétés antioxydantes, dues à deux phénomènes. D'une part, la structure hautement conjuguée de ces pigments leur permet de désactiver les radicaux libres par formation de caroténoïdes radicaux stabilisés. D'autre part, les caroténoïdes peuvent désactiver les espèces oxygénées réactives comme l'oxygène singulet par quenching. Ces propriétés antioxydantes sont notamment utilisées en cosmétique pour la protection des formulations contre les rayonnements UV [99].

### *1.3.4. Propriétés des ingrédients actifs présents dans les coproduits végétaux*

Les fractions extraites de pulpes, peaux et pépins de fruits ou légumes sont connues pour renfermer de nombreuses substances naturelles actives. Dans le cadre de notre étude, une activité antibactérienne ou antifongique et des propriétés antioxydantes sont recherchées pour ces extraits végétaux.

#### *1.3.4.1. Propriétés antibactériennes et antifongiques*

Ces dernières années, la recherche s'est concentrée sur l'extraction et l'évaluation de composés antimicrobiens à partir d'épices, de fruits ou de légumes afin de remplacer les biocides de synthèse aux impacts environnementaux néfastes. Les plantes contiennent en effet une large variété de composés organiques aux propriétés antimicrobiennes, capables de retarder la croissance des microorganismes ou de provoquer leur mort. Ces métabolites secondaires, sont le plus souvent impliqués dans la défense contre les prédateurs et les agents parasitaires ou infectieux [101]. Les mécanismes précis de leur activité antimicrobienne sont généralement inconnus ou incomplets. Cependant, plusieurs modes d'action possibles mettant en jeu deux cibles principales ont été identifiés pour certains groupes de composés [102]. La première cible est l'enveloppe cellulaire avec la modification de la perméabilité ou la rupture de la membrane plasmique provoquant la perte de macromolécules intracellulaires [103] ou l'altération du matériel génétique de la cellule [104]. La seconde cible d'action des composés antimicrobiens est le système enzymatique des cellules. L'inactivation d'enzymes responsables de la production d'énergie ou de la synthèse de constituants structurels et la dénaturation de protéines [105] constituent ainsi les principaux mécanismes de perturbation enzymatiques identifiés.

Parmi les composés végétaux, plusieurs classes de molécules ont montré une activité antimicrobienne intéressante pour des applications industrielles : les polyphénols, les polyamines et les glucosinolates [101]. L'allyl-isocyanate, dérivé d'un glucosinolate, est ainsi utilisé actuellement en agroalimentaire pour ses propriétés antibactériennes et antifongiques [106].

Les propriétés antimicrobiennes des extraits de plantes sont influencées par les conditions de culture et de récolte et par la méthode d'extraction. Les extractions mécaniques ou aqueuses sont aujourd'hui préférées aux extractions au solvant organique comme le méthanol [102].

#### *1.3.4.2. Activité antioxydante*

Certains auteurs ont pu corréler l'activité antioxydante et la teneur en polyphénols de différents extraits végétaux à leurs propriétés antibactériennes ou antifongiques [107, 108, 109]. Des matières premières présentant de hautes teneurs en composés antioxydants sont donc prioritairement recherchées.

##### *1.3.4.2.1. Mécanismes d'action des antioxydants*

L'oxydation est un phénomène spontané et irréversible causé par des radicaux libres, principalement oxygénés. Le mécanisme d'oxydation se décompose en trois étapes très rapides. D'abord, les radicaux libres sont formés au cours de l'initiation sous l'influence d'un rayonnement UV ou d'ions métalliques. Pendant la propagation, les espèces réactives réagissent avec les substrats en leur arrachant un atome d'hydrogène, générant ainsi de nouveaux radicaux. Ces réactions en boucle sont arrêtées par la formation de nouvelles molécules stables par

recombinaison des espèces radicalaires lors de la terminaison. L'oxydation peut altérer de nombreuses molécules telles que les lipides, les glucides ou les protéines et donc provoquer la dégradation de produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques.

Les antioxydants sont une classe de molécules pouvant être décrites comme « toutes substances qui, présentes en faible concentration par rapport à un substrat oxydable, retardent significativement ou inhibent l'oxydation de ce substrat » [110]. Les antioxydants sont répartis en deux catégories selon l'étape de la réaction d'oxydation dans laquelle ils interviennent. Les **antioxydants primaires** agissent lors de la phase de propagation et sont également appelés désactivateurs de radicaux libres ou antioxydants par rupture de chaînes [111]. Ce sont des composés donneurs d'hydrogène conduisant à des radicaux libres stables et donc peu réactifs. Les **antioxydants secondaires** sont des substances inhibant la production de radicaux libres en décomposant les hydroperoxydes en alcools. Ce sont des thiols, des disulfures, des chélatants de métaux promoteurs d'oxydation ou des séquestrants d'oxygène [112]. Les antioxydants naturels les plus utilisés, notamment dans l'industrie agroalimentaire, sont la vitamine C, les caroténoïdes, les tocophérols (vitamine E) et les polyphénols végétaux.

#### I.3.4.2.2. Les polyphénols

Parmi les molécules naturelles antioxydantes, les polyphénols sont des composés organiques comportant un ou plusieurs noyaux aromatiques portant un ou plusieurs groupements hydroxyles. Ils sont naturellement présents dans les différents organes des végétaux, de la racine au fruit. Les polyphénols peuvent être des molécules à la structure chimique simple, comme l'acide gallique ou très complexe, comme les tannins (Figure I-20). Les polyphénols sont classés en différentes familles en fonction de leur structure chimique, dont les principales sont les acides phénoliques et les flavonoïdes. Les polyphénols possèdent de nombreuses propriétés dont la plus remarquable est leur activité antioxydante. Ce sont des antioxydants par rupture de chaîne, capable de produire des radicaux phénoxyles stabilisés par résonnance. La bioactivité des polyphénols et leurs effets bénéfiques sur la santé humaine ont également été étudiés, démontrant des propriétés anticancéreuses [113, 114] et anti-inflammatoires [115]. Enfin, les polyphénols peuvent montrer une activité antimicrobienne liée à leur structure chimique, et plus particulièrement à la présence de groupements hydroxyle [116]. Ces groupements ont en effet la capacité de rompre la membrane cellulaire des bactéries et de se lier aux sites actifs des enzymes des cellules bactériennes, perturbant ainsi le métabolisme cellulaire [117].

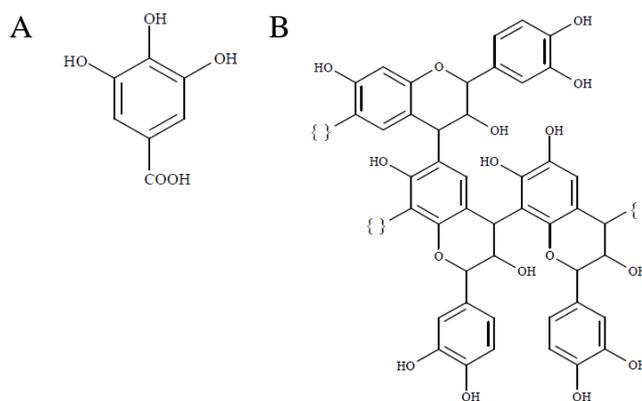


Figure I-20: Structures chimiques de l'acide gallique (A) et des tannins condensés (B) [111]

Les **acides phénoliques** sont principalement des dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique, dont les structures sont présentées dans la Figure I-21. On trouve les acides hydroxybenzoïques dans les fruits rouges, les radis noirs et le thé [118]. Les acides hydroxycinnamiques sont plus courants et se retrouvent dans des fruits tels que les pommes, les cerises ou les kiwis [119].

Acides phénoliques	Structure chimique	Exemples
Acides hydroxybenzoïques		R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H ; R <sub>2</sub> = OH : Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = OH : Acide gallique R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OH ; R <sub>3</sub> = H : Acide protocatéchuique R <sub>1</sub> = H ; R <sub>2</sub> = OH ; R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> : Acide vanillique R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = OH : Acide syringique
Acides hydroxycinnamiques		R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = H : Acide cinnamique R <sub>1</sub> = OH ; R <sub>2</sub> = H : Acide coumarique R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OH : Acide caféique R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub> ; R <sub>2</sub> = OH : Acide férulique

Figure I-21: Structures chimiques des principaux acides phénoliques [120]

Les **flavonoïdes** constituent une famille de composés variés à la structure complexe (Figure I-22) parmi lesquels les anthocyanes, les flavonols et les flavanols sont généralement les plus répandus dans les végétaux [120]. Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des plantes mais jouent également un rôle structural et protecteur contre les attaques fongiques, bactériennes ou virales [121].

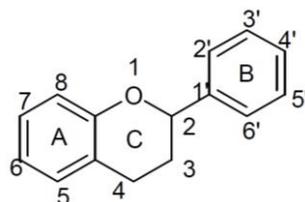


Figure I-22: Structure chimique des flavonoïdes

Les **anthocyanes** sont des pigments présents dans les tissus épidermiques des fruits et des fleurs, leur donnant des couleurs variant du rose au bleu. La stabilité de leurs différentes formes colorées et incolores est dépendante du pH [122]. Une vingtaine d'anthocyanes sont

aujourd'hui connues, parmi lesquelles six sont les plus courantes (Figure I-23). Les anthocyanes sont le plus souvent présentes sous forme glycosylée, augmentant ainsi leur stabilité et leur solubilité dans l'eau [118].

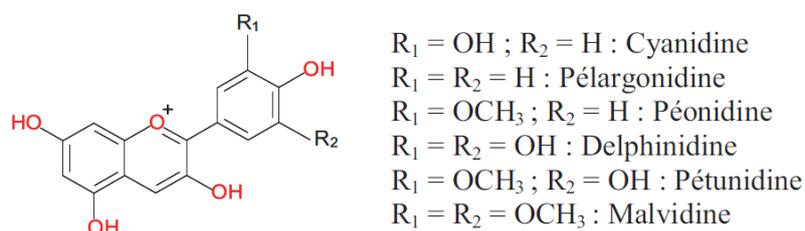


Figure I-23: Structure chimiques des principales anthocyanes [120]

**Les flavonols** sont les flavonoïdes les plus répandus dans les plantes comestibles. Le thé, la myrtille et le brocoli font partie des aliments les plus riches en flavonols [120]. Leur biosynthèse est stimulée par la lumière et explique leur accumulation dans les parties extérieures des fruits, telles que les peaux d'agrumes [123]. Ces composés sont souvent présents sous forme glycosylée, associés au glucose ou au rhamnose [120]. Parmi les flavonols, la quercétine est le composé le plus courant (Figure I-24).

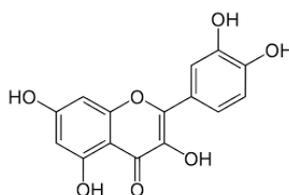


Figure I-24 : Structure chimique de la quercétine

**Les flavanols** sont des flavonoïdes existants sous forme monomère (catéchine, épicatechine) ou polymères (proanthocyanidines) [120]. Ces composés sont présents dans le cacao, le thé et les raisins [124]. Contrairement à la plupart des flavonoïdes, les flavanols ne se présentent pas sous forme glycosylée, les rendant ainsi plus facilement assimilables. Parmi les flavanols, la catéchine et l'épicatechine sont des monomères courants (Figure I-25).

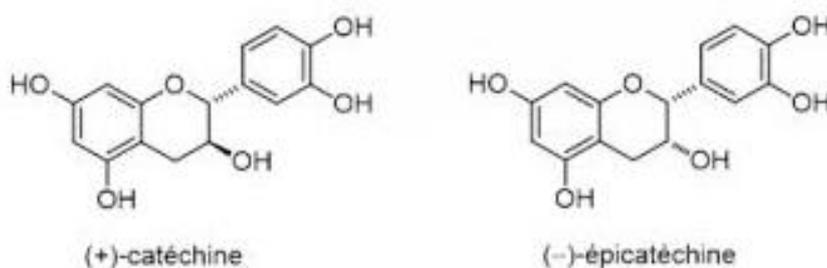


Figure I-25 : Structure chimique de la catéchine et de l'épicatechine

En plus de leur activité antioxydante, plusieurs études ont démontré que certains polyphénols peuvent participer à la stabilisation d'émulsion huile-dans-eau et eau-dans-huile. Zembyla *et al.* et Luo *et al.* ont étudié la capacité de certains polyphénols et flavonoïdes à s'adsorber à l'interface liquide-liquide d'émulsions en tant que particules solides, formant ainsi des émulsions de Pickering [125, 126]. Les gouttelettes entourées de cette couche de cristaux

phénoliques sont stabilisées par répulsion stérique et permettent d'obtenir des émulsions stables pendant plusieurs semaines. Sabouri *et al.* et Mattia *et al.* ont aussi montré la capacité de certains polyphénols à se fixer aux tensioactifs (caséine ou polysorbate) présents à la surface des gouttelettes grâce à des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène [127, 128]. Les propriétés viscoélastiques de la membrane tensioactive et le degré de dispersion de l'huile dans l'eau sont ainsi améliorés par ajout de catéchine ou de dérivés dans les émulsions.

#### *1.3.4.3. Propriétés des matières premières végétales sélectionnées*

Nous nous intéressons essentiellement aux propriétés biologiques ciblées pour les peintures : activités antifongiques ou antibactériennes et antioxydantes.

L'étude bibliographique réalisée a permis de rassembler les propriétés biologiques identifiées pour les fractions issues des matières premières végétales sélectionnées dans le cadre de ces travaux. Ont été répertoriés uniquement les travaux mettant en œuvre des extractions réalisées avec l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'eau ou des alcools (Tableau I-11) satisfaisant les exigences du label Pure.

Les extraits de peau de fruit de la passion, de papaye et de banane montrent une meilleure **activité antioxydante** que les extraits de pulpe obtenus dans les mêmes conditions, en accord avec les teneurs en polyphénols relevées [129]. Par contre, pour les oranges et mandarines, les extraits de pulpe sont plus riches en **polyphénols** que les extraits de peaux, dans les mêmes conditions d'extraction [144].

Il est observé que le taux de polyphénols est dépendant de la méthode et du solvant d'extraction, comme le montrent respectivement les travaux sur le goyavier [135, 137] et le manioc [148].

Par ailleurs, le tableau montre que pour chacun des fruits, au moins un extrait a montré une activité **antibactérienne** contre trois types de bactéries responsables d'intoxication alimentaire : les salmonelles (*Salmonella paratyphi*, *S. typhi* et *S. enteritidis*), les staphylocoques (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*) et *Escherichia coli*. De plus, certains auteurs font état d'une activité antibactérienne à large spectre pour les extraits de fruit de la passion, de carambole et de banane, issus de macération éthanolique [133] ou pour les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation [143].

Les huiles essentielles d'agrumes [142] présentent également une activité **antifongique**, notamment contre l'*Aspergillus*, champignon omniprésent dans notre environnement (eau, terre, poussière, aliments). Les extraits éthanoliques de banane, de passion et de papaye [133] possèdent quant à eux une activité contre une levure du genre *Candida*, fréquemment trouvée à la surface de la peau de l'homme et des animaux.

Chapitre I – Étude bibliographique

Tableau I-11: Caractérisation chimique de divers extraits de fruits entiers, de pulpes et de peaux de fruits recensées dans la littérature

Espèce	Partie	Extraction	Solvant	Polyphénols	Activité antioxydante	Molécules d'intérêt identifiées	Activité antibactérienne	Activité antifongique	Référence	
Fruit de la passion <i>Passiflora edulis</i>	Pulpe	M 4h	Méthanol	369-387 mg GAE/100g MS pulpe	817-921 µg/mL (IC50)				Morais <i>et al.</i> [129]	
	Peau			413-595 mg GAE/100g MS peau	326-368 µg/mL (IC50)					
	Pulpe et graines			47-68 mg GAE/100g MF	3 µg TE/g MF	Flavonoïde (10-14 mg Q/100g MF), proanthocyanidine (1 mg CC/100g MF), acide ascorbique (7-10 mg/100g MF)			Luximon-Ramma <i>et al.</i> [130]	
	Pulpe	M 1h	Eau:Méthanol (50:50) puis acétone:eau (70:30)	241-248 mg GAE/100g MF	8-12 µg TE/g MF				Souza <i>et al.</i> [131]	
	Pulpe	M 1h	Eau:éthanol (50:50) puis acétone:eau (70:30)	750-790 mg GAE/100g MS pulpe		Flavonoïde (55-65 mg/100g MS), anthocyane (3 mg/100g MS), caroténoïde (1226-1498 µg/100g MS)			Da silva <i>et al.</i> [132]	
	Peau	M 12h	Ethanol				<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>P. vulgaricus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>C. lyolytica</i>	Suhaila <i>et al.</i> [133]	
	Fruit	M 24h	Hexane				<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. paratyphi</i>			Akanbi <i>et al.</i> [134]
			Acétate d'éthyle					<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. paratyphi</i>		

Chapitre I – Étude bibliographique

Espèce	Partie	Extraction	Solvant	Polyphénols	Activité antioxydante	Molécules d'intérêt identifiées	Activité antibactérienne	Activité antifongique	Référence
<b>Goyavier</b> <i>Psidium cattleianum</i>	Fruit	M 24h	Acétone:eau (70:30) puis méthanol	527-600 mg GAE/100g MF	42-52 µg TE/g MF	Flavonoïdes (69-74 mg Q/100g MF), proanthocyanidines (246-266 mg CC/100g MF), acide ascorbique (23-26 mg/100g MF)			Luximon-Ramma <i>et al.</i> [130]
	Fruit	/	Méthanol	501 mg GAE/100g MF		Flavonoïdes (100 mg Q/100g), isoquercetin, hyperoside, cyanidin			Bigelmeyer <i>et al.</i> [82]
	Pulpe	M 30min à 0°C	Ethanol 90% puis acétone 50%	231-338 mg GAE/100g MF					Corre <i>et al.</i> [135]
	Pulpe		Eau	19-70 mg GAE/100g MF		Acide gallique, epicatechin, acide coumarique, acide férulique, myricétine, quercétine	<i>S. enteritidis</i>		Medina <i>et al.</i> [136]
	Pulpe	M 30min	Acétone:eau (70:30) puis méthanol	31-81 mg GAE/100g MF					
	Pulpe	I 4min	Eau	428-460 mg GAE/100g MF					McCook-Russel <i>et al.</i> [137]
	Pulpe	M 16h	Méthanol		11 µmol TE/g MF	Acide citrique, acide ursolic, acide oléanolique, esters de citrate, trioléine	<i>B. subtilis, S. aureus</i>		
<b>Carambole</b> <i>Averrhoa carambola</i>	Fruit	M 24h	Acétone:eau (70:30) puis méthanol	136-220mg GAE/100g MF	9-21 µg TE/g MF	Flavonoïdes (9-16 mg Q/100g MF), proanthocyanidines (87-138 mg CC/100g MF), acide ascorbique (14-21 mg/100g MF)			Luximon-Ramma <i>et al.</i> [130]
	Fruit	M 12h	Ethanol				<i>S. aureus, B. subtilis, B. cereus, L. bulgaricus, E. coli, P. vulgaricus, P. aeruginosa</i>		Suhaila <i>et al.</i> [133]
	Fruit	M 30min	Ethanol 50%	54-55 mg GAE/100g MF	79-83 mg TE/100g MF				Ali <i>et al.</i> [138]
	Pulpe	M 24h à 40 °C	Eau	7411-7989 mg GAE/100g MS		Acides phénoliques, flavonoïdes (1718-1918 mgQ/100g MS), terpénoïdes			Khanam <i>et al.</i> [139]
	Pulpe	E 45min à 90°C	Acétone 50%	30-37 mg GAE/g MS pulpe	4446-5885 mg TE/ 100g MS pulpe	Proanthocyanidines			Shui <i>et al.</i> [140]

Chapitre I – Étude bibliographique

Espèce	Partie	Extraction	Solvant	Polyphénols	Activité antioxydante	Molécules d'intérêt identifiées	Activité antibactérienne	Activité antifongique	Référence	
<b>Banane</b> <i>Musa acuminata</i>	Peau	M 4h	Méthanol	185-482 mg GAE/100g MS peau	149-398 µg/L (IC50)	Flavonoïdes (35-115 mg Q/100g MS peau)			Morais <i>et al.</i> [129]	
	Pulpe			242-286 mg GAE/100g MS pulpe	480-636 µg/L (IC50)	Flavonoïdes (107-181 mg Q/100g MS pulpe)				
	Pulpe	M 24h	Acétone:eau (70:30) puis méthanol	11-12mg/100g MF	1 µmol TE/g MF	Flavonoïdes (6 mg Q/100g MF), proanthocyanidines (4-6 mg CC/100g MF), acide ascorbique (0,8 mg/100g MF)			Luximon-Ramma <i>et al.</i> [130]	
	Peau	M 7j	Acétate d'éthyle				<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. lutea</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. boydi</i> , <i>V. mimicus</i>			Jain <i>et al.</i> [141]
			Ethanol				<i>B. megaterium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. lutea</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. boydi</i> , <i>V. mimicus</i>			
	Pulpe		Acétate d'éthyle				<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. lutea</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. boydi</i> , <i>V. mimicus</i>			
			Ethanol				<i>B. subtilis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. lutea</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. boydi</i> , <i>V. mimicus</i>			
	Fruit	M 12h	Ethanol				<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>C. lyolytica</i>		Suhaila <i>et al.</i> [133]

*Chapitre I – Étude bibliographique*

Espèce	Partie	Extraction	Solvant	Polyphénols	Activité antioxydante	Molécules d'intérêt identifiées	Activité antibactérienne	Activité antifongique	Référence
<b>Papaye</b> <i>Carica papaya</i>	Pulpe	M 4h	Méthanol	262-390 mg GAE/100g MS pulpe	694-802 µg/mL (IC50)	Flavonoïdes (49-77 mg Q/100g MS pulpe)			Morais <i>et al.</i> [129]
	Peau			279-893 mg GAE/100g MS peau	246-338 µg/mL (IC50)	Flavonoïdes (37-136 mg Q/100g MS peau)			
	Pulpe	M 1h	Eau:éthanol (50:50) puis acétone:eau (70:30)	1137-1391 mg GAE/100g MS pulpe		Anthocyane (2 mg/100g MS), caroténoïde (1824-2223 µg/100g MS), lycopène (1870-2285 µg/100g MS)			Da silva <i>et al.</i> [132]
	Peau et graines			758-808 mg GAE/100g MS		Flavonoïdes (96-98 mg Q/100g MS), anthocyane (20-24 mg/100g MS), caroténoïde (490 µg/100g MS), lycopène (85 µg/100g MS)			
	Pulpe	M 24h	Acétone:eau (70:30) puis méthanol	54-62 mg/100g MF	8-12 µmol TE/g MF	Flavonoïdes (36-39 mg Q/100g MF), proanthocyanidines (19-23 mg CC/100g MF), acide ascorbique (91-95 mg/100g MF)			Luximon-Ramma <i>et al.</i> [130]
	Fruit	M 12h	Ethanol				<i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaricus</i>	<i>C. lypolytica</i>	Suhaila <i>et al.</i> [133]
Pulpe	M 30min	Ethanol 50%	28-29 mg GAE/100g fruit	58-67 mg TE/100g fruit					Ali <i>et al.</i> [138]

Chapitre I – Étude bibliographique

Espèce	Partie	Extraction	Solvant	Polyphénols	Activité antioxydante	Molécules d'intérêt identifiées	Activité antibactérienne	Activité antifongique	Référence
Orange <i>Citrus sinensis</i>	Huile essentielle	P	-					<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. chrysogenum</i>	Viuda-Martos <i>et al.</i> [142]
	Huile essentielle	HD	Eau				<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. fluorescence</i> , <i>P. myxofaciens</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Streptococcus sp</i>		Javed <i>et al.</i> [143]
	Pulpe	M	Méthanol	124-232 mg GAE/g MS extrait	3-4 mg/mL (IC50)	Flavonoïdes (1-4 mg Q/g MS extrait)			Ghasemi <i>et al.</i> [144]
	Peau			133-160 mg GAE/g MS extrait	1-2 mg/mL (IC50)	Flavonoïdes (2-23 mg Q/g MS extrait)			
	Peau	S	Dichlorométhane	10 mg GAE/g MS extrait	173 µg/mL (IC50)				Anagnostopoulou <i>et al.</i> [145]
Mandarine <i>Citrus reticula</i>	Huile essentielle	P	-					<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. chrysogenum</i>	Viuda-Martos <i>et al.</i> [142]
	Huile essentielle	HD	Eau				<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>P. fluorescence</i> , <i>P. myxofaciens</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Streptococcus sp</i>		Javed <i>et al.</i> [143]
	Pulpe	M	Méthanol	197-397 mg GAE/g MS extrait	2-4 mg/mL (IC50)	Flavonoïdes (1-17 mg Q/g MS extrait)			Ghasemi <i>et al.</i> [144]
	Peau			104-172 mg GAE/g MS extrait	1-3 mg/mL (IC50)	Flavonoïdes (1-6 mg Q/g MS extrait)			
	Peau	I 30min	Eau	2-33 mg GAE/g MS	1-9 mg TE/g MS	Acides caféique, férulique, coumarique, cinapique, vanillique, hydroxy-benzoïque, chlorogénique			Xu <i>et al.</i> [146]

*Chapitre I – Étude bibliographique*

Espèce	Partie	Extraction	Solvant	Polyphénols	Activité antioxydante	Molécules d'intérêt identifiées	Activité antibactérienne	Activité antifongique	Référence
<b>Manioc</b> <i>Manihot esculenta</i>	Tubercule	C 5min	Eau	9-11 mg GAE/g MF					Faezah et al. [147]
	Tubercule	M 21j	Ethanol, eau	6 g GAE/ g extrait	2557-2777 µg/mL (IC50)	Acide coumarique, phénols, xanthone			Yi et al. [148]
			Ethanol, acétate d'éthyle	29-31 g GAE/g extrait	318-78 µg/mL (IC50)				
Feuille	M 48h	Méthanol					<i>E. aerogenes, E. cloacae</i>	Noumedem et al. [149]	
<b>Patate douce</b> <i>Ipomoea batatas</i>	Tubercule	V 2min	Méthanol	6-23 mg GAE/100g MF	10-100 µmol TE/100g MF	Anthocyanes (4-53 mg/100g MF), caroténoïdes (1-226 µg/100g MF)			Teow et al. [150]
	Tubercule	R 10min	Ethanol	9-167 mg GAE/100g MF					Jung et al. [151]
	Tubercule	M 3h	Acétone 70%	415-617 mg GAE/100g MF	2333-2507µmol TE/100g MF				Tang et al. [152]
	Tubercule	M 24h	Ethanol 90 %				Anthocyanes (85-90 mg/100g MS), caroténoïdes (5-14 mg/100g MS)	<i>E. coli, S. aureus</i>	Rath et al. [153]

MS : Matière sèche, MF : Matière fraîche, M : Macération, I : Infusion, E : Extraction, P : Pression, HD : Hydrodistillation, S : Soxhlet, C : Centrifugation, V : Vortex, GAE : Equivalent d'acide gallique, TE : Equivalent de Trolox, IC50 : Concentration inhibitrice 50%, Q : Equivalent de quercétine

## I.4. Les procédés d'extraction

### I.4.1. Les procédés d'extraction d'huiles végétales

A l'échelle industrielle, trois principaux types de procédés existent pour l'extraction d'huiles à partir de graines oléagineuses : l'extraction par pression, l'extraction par solvant ou l'extraction mixte, incluant une étape d'extraction par solvant de l'huile résiduelle du tourteau. Des procédés alternatifs, mettant en jeu des solvants aux impacts sanitaire et environnemental plus réduits, ont été développés mais restent actuellement non compétitifs en termes de coût pour des productions à grande échelle.

#### I.4.1.1. Préparation des graines

Avant l'extraction, les graines peuvent être soumises à différents prétraitements visant à favoriser l'extraction de l'huile. Ces étapes peuvent être physiques, telles que le nettoyage, le décorticage et l'aplatissage des graines, ou thermiques, comme le séchage ou la cuisson.

Une première étape de nettoyage peut être nécessaire afin d'éliminer les matériaux étrangers mêlés aux graines. Les poudres sont aspirées, tandis que les particules trop petites ou trop grandes sont éliminées par tamisage. Afin d'améliorer le pressage ou la qualité nutritionnelle de l'huile et du tourteau, certaines graines, comme le tournesol, peuvent subir un décorticage [154]. Les graines sont ensuite transformées en flocons par aplatissage. Ce prétraitement combinant des contraintes de cisaillement et d'écrasement permet de casser les structures internes les moins accessibles et d'augmenter la surface de contact dans le cas d'une extraction par solvant.

Le séchage permet de maîtriser le taux d'humidité et donc la dureté des graines, paramètre important pour l'extraction par pression. Enfin, la cuisson améliore l'extraction de l'huile en diminuant sa viscosité et en favorisant la coalescence des gouttelettes lipidiques dans la graine [155].

#### I.4.1.2. Extraction par pression

L'extraction par pression est la méthode principalement utilisée en industrie pour les graines oléagineuses contenant plus de 20 % d'huile (lin, tournesol, colza). Le pressage est un procédé physique de séparation solide-liquide dans lequel l'huile est exsudée sous l'effet d'une force de compression. Les premiers équipements de pressage étaient des presses hydrauliques. Les presses à vis (Figure I-26) développées en 1900 permettent une extraction en continu et l'obtention de meilleurs rendements grâce à l'association d'une pression mécanique et de forces de cisaillement. Le pressage hydraulique est donc aujourd'hui réservé à certaines matières premières telles que le cacao ou les olives [156]. Le procédé le plus courant utilisant une presse à vis est donc décrit ici.

Les graines sont introduites dans le fourreau et entraînées par la vis sans fin. L'extrémité du fourreau comporte une ouverture de diamètre connu permettant l'expulsion du tourteau. L'accumulation de matière à l'intérieur du fourreau permet de générer une force de pression suffisante pour libérer l'huile enfermée dans les cellules. Les perforations du fourreau permettent la récupération de l'huile. Le procédé peut être effectué à froid (c'est-à-dire sans apport extérieur de chaleur) ou avec chauffage du fourreau. Les forces de friction engendrent

toutefois une élévation de la température pouvant atteindre plusieurs dizaines de degrés, même dans le cas d'une extraction à froid [157].

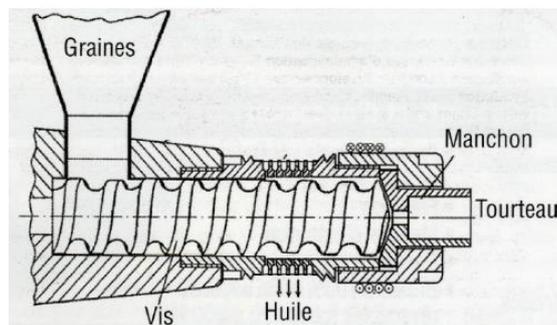


Figure I-26 : Schéma d'une presse à vis

L'huile brute obtenue est décantée et filtrée afin d'éliminer les particules solides. Selon la matière première, le tourteau obtenu renferme encore 16 à 24 % d'huile. L'huile résiduelle peut alors être extraite par percolation à l'aide d'un solvant dans le cas d'un procédé mixte, ou bien le tourteau riche en protéines et en acides gras peut être destiné à l'alimentation animale [156]. Dans le cas d'une seconde extraction, le solvant est ensuite éliminé du tourteau par évaporation et de l'huile par distillation.

#### *1.4.1.3. Extraction par solvant*

L'extraction par solvant était autrefois réservée aux graines à faible teneur en huile [158]. Cependant depuis ces cinquante dernières années, le procédé industriel classique d'extraction d'huile combine l'extraction par pression et par solvant, même dans le cas de graines riches en huile [159]. L'addition d'une étape d'extraction de tourteau par solvant permet en effet d'atteindre un rendement de 97%, contre 89% pour un procédé de simple trituration [160]. Le solvant utilisé préférentiellement est l'hexane, grâce à ses propriétés apolaires permettant une forte solubilité avec l'huile et une faible solubilité avec l'eau. Son coût est relativement peu élevé, notamment grâce à la possibilité de recyclage du solvant. Son inflammabilité, sa toxicité et sa dangerosité pour l'environnement constituent néanmoins des inconvénients et poussent la recherche à trouver des solutions alternatives. Plusieurs solvants de substitution ont été envisagés, préférentiellement parmi les alcanes et les alcools. L'heptane montrent ainsi des capacités d'extraction équivalentes à celles de l'hexane [161, 162]. L'iso-hexane, grâce à ses propriétés chimiques très proches de l'hexane, est actuellement utilisé dans certaines raffineries nord-américaines [163]. La température d'ébullition de l'iso-hexane légèrement inférieure à celle de l'hexane permet en effet de réduire le coût énergétique nécessaire à son évaporation et ainsi de compenser la différence de prix existante entre les deux solvants [164]. L'origine pétrochimique et la toxicité de ces alcanes restent cependant un inconvénient. L'éthanol et l'isopropanol ont donc été étudiés en tant que solvant d'extraction. Ces deux solvants font en effet partie des substances autorisées pour l'extraction dans le secteur agro-alimentaire et leur manipulation est moins dangereuse du fait de leur inflammabilité inférieure à celles des hydrocarbures [162, 165, 166]. Une étude réalisée sur l'extraction du tourteau de tournesol concernant le recyclage, le rendement et la rentabilité économique, a ainsi démontré que l'éthanol pouvait être utilisé industriellement à la place de l'hexane [167].

Certains travaux font état de l'obtention d'huile à partir de graines de fruit de la passion à l'aide de solvants alternatifs. L'acétone, l'éthanol et l'isopropanol ont été comparés à l'hexane dans différentes conditions d'extraction [165]. Des rendements équivalents ou supérieurs (jusqu'à 23,6 % d'huile) ont ainsi été obtenus pour l'acétone et l'éthanol dans le cas d'extractions assistées par ultrasons ou par macérations.

#### I.4.1.4. Méthodes alternatives

Les études concernant l'extraction d'huile végétale se concentrent maintenant sur le développement de procédés alternatifs aux procédés classiques d'extraction par solvant. L'utilisation des ultrasons ou des microondes permet ainsi d'améliorer les performances des extractions traditionnelles. Mais l'un des axes de recherche majeur de ces dernières années repose sur l'emploi des fluides supercritiques.

##### I.4.1.4.1. CO<sub>2</sub> supercritique

La recherche sur l'extraction d'huile, notamment pour l'agroalimentaire, se concentre sur l'obtention d'huile végétale de haute qualité ne présentant aucun risque pour la santé des consommateurs, à l'aide de procédés respectueux de l'environnement. L'utilisation du CO<sub>2</sub> supercritique apparaît depuis quelques années comme une solution alternative prometteuse pour l'extraction d'huile végétale. Un fluide est à l'état supercritique quand sa température dépasse sa température critique  $T_c$ , tout en étant soumis à une pression supérieure à sa pression critique  $P_c$ . Les fluides supercritiques possèdent des caractéristiques physiques intermédiaires entre l'état liquide et l'état gazeux leur conférant une bonne capacité de solvation vis-à-vis des composés à extraire. Leur masse volumique proche de celles des liquides, leur viscosité proche de celles des gaz et leur diffusivité intermédiaire permettent en effet un transfert de matière important entre les molécules extractibles et le solvant [156]. Du fait de ses nombreux avantages, le dioxyde de carbone est le fluide supercritique le plus utilisé pour l'extraction d'huiles végétales [166]. Les conditions critiques du CO<sub>2</sub> relativement basses ( $T_c = 31,1$  °C,  $P_c = 37,8$  MPa) (Figure I-27) facilitent en effet sa mise en œuvre, tout comme sa grande disponibilité, sa non-toxicité, son inflammabilité et son faible coût [168].

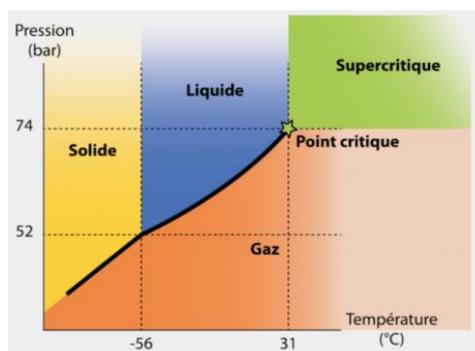


Figure I-27 : Diagramme de phase du dioxyde de carbone [169]

Le réglage des paramètres influençant l'extraction des huiles tels que la température, la pression et la durée de l'extraction, permet d'atteindre des rendements élevés [170]. L'extraction des triglycérides nécessite en effet une pression suffisamment élevée pour permettre leur solubilisation dans le CO<sub>2</sub> supercritique [156]. Les acides gras libres et les phospholipides ne sont que faiblement extraits, produisant ainsi des huiles végétales de grande qualité ne

nécessitant pas ou peu d'étapes de raffinage [171]. La séparation du CO<sub>2</sub> supercritique après extraction par dépressurisation est également efficace et permet d'obtenir des huiles pures [166].

Cette technologie a été étudiée pour l'obtention d'huile à partir de graines de fruits de la passion. Les rendements en huile atteignant 26 % sont équivalents aux rendements d'extraction classiques à l'hexane [170, 171].

#### I.4.1.4.2. Microondes - Ultrasons

Les traitements par les microondes ou les ultrasons, en combinaison avec les méthodes d'extraction classiques permettent d'améliorer les rendements, de réduire la durée d'extraction, la température ou la quantité de solvant nécessaire, et ainsi de rendre les procédés plus écologiques.

Les microondes peuvent être utilisées comme un prétraitement avant une extraction mécanique ou au solvant. Le chauffage induit par les microondes présente l'avantage d'être rapide et relativement uniforme dans la matière. Le mécanisme d'action des microondes repose sur la création de pores dans les parois cellulaires sous l'effet de l'augmentation de la température. La pénétration du solvant dans la matière et la diffusion de l'huile à travers les parois cellulaires sont donc facilitées [172]. La diffusivité accrue de l'huile permet ainsi une extraction plus rapide, plus efficace et avec une quantité de solvant plus faible [173]. Un prétraitement aux microondes sur des noisettes ou des fruits de palmier permet ainsi d'atteindre des rendements supérieurs à ceux obtenus sur des matériaux non traités après extraction à l'hexane [174] ou à l'aide d'une presse hydraulique [172]. La qualité de l'huile extraite peut également être améliorée avec un prétraitement aux microondes. Les huiles obtenues à partir de pépins de raisin sont en effet plus riches en antioxydants tels que les tocophérols et les caroténoïdes [174, 175].

Les ultrasons sont des ondes sonores non comprises dans le domaine audible des humains dont les fréquences utilisées pour l'extraction sont généralement comprises entre 20kHz et 100MHz [173]. L'utilisation des ultrasons lors d'une extraction au solvant permet d'intensifier le transfert de matière et de garantir une pénétration du solvant dans le matériau plus rapide en rompant les parois cellulaires [176]. Un traitement aux ultrasons participe ainsi à la réduction du temps, de la température et de la quantité de solvant nécessaire à l'extraction d'huile à partir de graines de lin [177]. L'utilisation des ultrasons permet également de modifier les capacités d'extraction des solvants. Sous ultrasons, les rendements d'extraction d'huile de soja obtenus avec un mélange isopropanol : hexane sont supérieurs à ceux obtenus dans les mêmes conditions pour chacun des solvants seuls [178]. Les ultrasons permettent ainsi d'atteindre les performances des solvants classiques tels que l'hexane avec des solvants plus verts, comme observé par De Oliveira *et al.* sur les graines de fruits de la passion extraites à l'acétone [165].

#### I.4.2. Les procédés d'extraction de substances naturelles actives

Différents procédés d'extraction de fractions actives à partir de matière première végétale existent en fonction de la nature des molécules d'intérêt, du type de matière première et du mode de conservation (séchage, congélation). Ces procédés sont le plus souvent précédés d'une phase de prétraitement qui implique différentes opérations :

- Une activation mécanique (broyage) pour augmenter la surface de contact,
- Une activation physico-chimique (congélation),
- Une hydrolyse chimique ou enzymatique pour déstructurer un réseau polymérique.

Les substances naturelles actives sont ensuite extraites des fruits ou légumes à l'aide des principales méthodes d'extraction décrites ci-dessous.

#### *1.4.2.1. Macération*

Lors d'une macération, la matière première végétale (graines, pulpe, racines, feuilles ou écorce) est mise en contact avec le solvant à température ambiante pendant une durée généralement comprise entre quelques heures et quelques jours. Une agitation continue ou ponctuelle peut être mise en place afin d'augmenter le transfert de matière entre l'échantillon et le solvant. Après l'extraction, le résidu solide est filtré ou la suspension est centrifugée. Le solvant est alors évaporé en partie ou totalement, de façon à obtenir des extraits liquides ou solides suivant les applications.

Des solvants de polarité différente sont utilisés pour la macération en fonction des molécules d'intérêt à extraire. Les principaux solvants polaires sont le méthanol, l'éthanol et l'eau tandis que les solvants apolaires généralement employés sont l'acétone ou l'acétate d'éthyle. Le recours à des extractions successives à l'aide de solvants de polarité différente est courant.

Pour les matières premières végétales sélectionnées dans cette étude, l'état de l'art indique que l'obtention de teneurs en polyphénols et d'activités antiradicalaires élevées est observée après macérations successives dans des solvants polaires et apolaires. Pour les extraits de goyavier rouge, de carambole, de papaye et de banane, deux macérations successives de 24h dans un mélange acétone : eau (70 : 30), puis dans du méthanol permettent d'obtenir une activité radicalaire plus prononcée comparée à d'autres méthodes répertoriées dans le Tableau I-11 [130]. Les teneurs en polyphénols les plus élevées sont quant à elles obtenues après macération pendant 1h dans un mélange eau : éthanol (50 : 50) puis acétone : eau (70 : 30) pour les extraits de fruit de la passion et de papaye [132].

#### *1.4.2.2. Distillation*

La distillation est une méthode traditionnelle d'extraction de molécules actives non sensibles à la température et d'huiles essentielles à partir de matières premières végétales. Deux principaux types de distillation existent : l'hydrodistillation et la distillation par entraînement à la vapeur [179]. Dans le cas d'une hydrodistillation, la matière est placée au contact de l'eau, puis portée à ébullition. Les vapeurs d'eau contenant les molécules hydrosolubles et l'huile essentielle sont entraînées puis refroidies et récupérées. Après refroidissement, l'huile essentielle et les composés hydrosolubles peuvent être séparés par décantation. Pour la distillation par entraînement à la vapeur, l'eau est chauffée séparément et la vapeur est ensuite injectée au contact de la matière. Trois principaux phénomènes physico-chimiques sont responsables de l'extraction lors d'une distillation : l'activation thermique, la diffusion des solutés dans l'eau et l'hydrolyse de certaines molécules [180].

#### *1.4.2.3. Extraction accélérée par solvant*

L'extraction accélérée par solvant (également dénommée extraction solide/liquide sous pression) permet d'extraire des composés à une température supérieure à la température

d'ébullition du solvant. L'application d'une pression élevée permet en effet au solvant de rester sous forme liquide. Grâce aux conditions de température et de pression élevées, la solubilité et la vitesse de transfert sont augmentées tandis que la tension de surface du solvant et sa viscosité sont diminuées.

L'extraction accélérée par solvant a été étudiée pour l'obtention de molécules naturelles bioactives telles que les polyphénols, les caroténoïdes ou les huiles essentielles à partir de matière première végétale de toute sorte [181]. D'autres études sur l'extraction de polyphénols et d'autres molécules antioxydantes ont montré que ce procédé d'extraction présentait plusieurs avantages par rapport aux méthodes conventionnelles : des rendements d'extraction au moins égaux sont obtenus, plus rapidement et en consommant beaucoup moins de solvant [182, 183].

### *1.4.3. Extrusion bi-vis*

L'extrusion bi-vis est une technologie plus récente utilisée pour le fractionnement thermo-mécano-chimique des agro-ressources. Développé à l'origine pour l'industrie métallurgique puis adapté à l'industrie agro-alimentaire, le procédé bi-vis permet depuis une vingtaine d'années de nouvelles avancées en matière de fractionnement et de valorisation de matières premières végétales [163]. La capacité du procédé d'extrusion bi-vis à exercer des actions mécaniques (cisaillement, compression, broyage), thermiques (chauffage, séchage, cuisson) et chimiques (réaction, extraction solide-liquide) en continu sur la matière mène à des applications variées telles que :

- L'extraction d'huile de graines oléagineuses [184, 185],
- L'extraction de molécules végétales (protéines [186], hémicellulose [187], pectines [188]),
- La production de pâtes papetières [189],
- La fabrication d'agro-matériaux composites [190].

#### *1.4.3.1. Fonctionnalité d'un extrudeur bi-vis*

Un extrudeur bi-vis est constitué de deux vis parallèles identiques tournant à la même vitesse dans un fourreau à la section en forme de huit. Les extrudeurs sont classés selon deux principaux critères (Figure I-28) :

- L'interpénétration des vis : les vis sont dites co-pénétrantes (vis interpénétrées) lorsque le filet de l'une pénètre le chenal de l'autre. Dans le cas contraire, les vis sont dites non co-pénétrantes (vis non interpénétrées) et se comportent alors comme deux extrudeurs mono-vis.
- Le sens de rotations des vis : les vis sont dites co-rotatives lorsqu'elles tournent dans le même sens et contra-rotatives lorsqu'elles tournent en sens inverse.

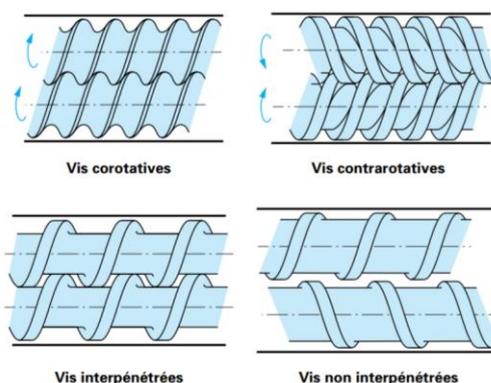


Figure I-28: Principaux arrangements de vis des extrudeurs bi-vis [191]

Les extrudeurs bi-vis les plus répandus sont à vis co-pénétrantes et co-rotatives, dans lesquels la matière progresse axialement le long du fourreau par passage d'une vis à l'autre en subissant un champ de contrainte relativement uniforme. Ces effets de contraintes sont apportés par les éléments de vis de forme variable placés sur les arbres de vis. Le choix et l'arrangement de ces tronçons de vis définissent le profil de vis et permettent d'assurer dans plusieurs zones les différentes opérations telles que le mélange, le cisaillement ou la compression. Les différents éléments de vis peuvent être classés selon leur fonction, dépendante de leur géométrie (Figure I-29) :

- Les vis de convoyage,
- Les vis de malaxage,
- Les vis à contrefilet.

**Les éléments de convoyages** sont des vis à pas direct responsables du convoyage de la matière. L'utilisation d'un pas de vis décroissant permet de mettre la matière sous pression et cette action peut être renforcée par la présence d'éléments restrictifs gênant le convoyage (contre-filet ou avant du fourreau). Un pas de vis croissant provoque la détente de la matière, notamment après une zone de compression. La combinaison de zones de pression et de détente mises en place après une zone d'injection de liquide améliore la diffusivité du solvant dans la matière et celle des solutés dans le solvant. Les vis de convoyage peuvent être trapézoïdales (T2F) ou conjuguées et à simple (C1F) ou double filet (C2F). Les éléments à double filet permettent un avalement plus important et sont généralement placés dans la zone d'alimentation. Les vis à simple filet ont quant à elles une action de cisaillement légèrement plus importante grâce à leur sommet de filet plus large.

**Les éléments de malaxage** sont des éléments restrictifs ayant un fort effet de mélange et de cisaillement. Ne possédant pas d'effet de convoyage en eux-mêmes, ces vis causent une restriction partielle du flux de matière et peuvent être employées pour provoquer le remplissage complet d'une zone et ainsi favoriser les transferts thermiques avec les parois du fourreau thermo-régulées. Le temps de séjour prolongé et le mélange intime permis par ces éléments de malaxage sont également intéressants lors d'extraction de composés de la paroi cellulaire ou lors de réaction chimique. Les vis sont de type monolobe (MAL 0) ou bilobe (MAL 2) et peuvent être montées et orientées de façon à obtenir un mélange statique ou un effet de convoyage direct ou inverse, une compression axiale et/ou radiale et un cisaillement important.

**Les vis à contrefilet**, ou pas inverse, ont des effets de mélange et de cisaillement intenses. Ce sont les éléments restrictifs les plus importants, indispensables au pressage de la matière. La présence de vis à contrefilet provoque la formation d'un bouchon. Le temps de séjour et la pression axiale sont fortement augmentés. Le placement d'un module de filtration en amont d'une zone de vis à contrefilet permet ainsi une séparation liquide/solide. Les éléments peuvent être à simple filet, pour une contre-poussée et un cisaillement plus importants, ou à double filet pour l'obtention d'un bouchon dynamique.

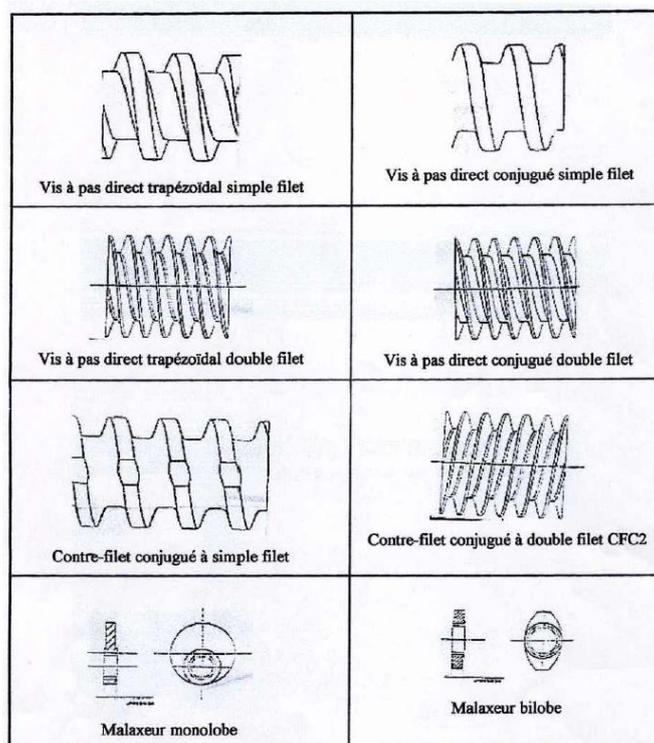


Figure I-29: Vis les plus couramment employées en extrusion co-pénétrante et co-rotative [192]

### I.4.3.2. Extraction d'une huile végétale par extrusion bi-vis

L'extraction d'huile de graines oléagineuses par extrusion bi-vis permet de réaliser différentes étapes du procédé industriel habituel (trituration, pressage, extraction au solvant du tourteau) avec un seul équipement. En effet, les différentes zones de l'extrudeur peuvent être adaptées à l'aplatissage ou au broyage des graines, à leur séchage ou à leur cuisson, au pressage de la matière, à la séparation de l'huile obtenue et à l'extraction de l'huile résiduelle contenue dans le tourteau par ajout d'un solvant.

#### I.4.3.2.1. Extraction par pression

L'extrusion bi-vis a déjà été étudiée pour l'extraction d'huile de graines oléagineuses par pression. La combinaison de zones de malaxage, de filtration et de pressage ainsi que l'ajustement des paramètres opératoires permettent d'obtenir des performances au moins comparables à celles des presses mono-vis actuellement utilisées industriellement.

L'extraction par pression d'huile de graines de tournesol en extrudeur bi-vis à vis co-rotatives et co-pénétrantes a ainsi permis d'atteindre un rendement de 85 %, semblable au rendement maximum atteint en presse mono-vis à haut débit, grâce au positionnement d'une deuxième

zone de pressage et de filtration [163, 193]. L'influence des conditions opératoires a également été étudiée lors de l'extrusion bi-vis de graines de colza et a mené à classer les paramètres en deux catégories : ceux influant sur la transformation de la matière en amont du pressage, telle que la présence d'éléments de malaxage (monolobe), et ceux jouant directement sur l'efficacité du pressage, telle que la vitesse de rotation de la vis [194]. L'optimisation de ces paramètres a permis d'obtenir des rendements atteignant 86 %, similaires à ceux d'une presse mono-vis. L'extrusion de graine de jatropha a également mis en avant le coût réduit du procédé bi-vis par rapport au procédé mono-vis classique en comparant les énergies mécaniques spécifiques requises par les deux méthodes pour l'expression d'huile [195].

#### I.4.3.2.2. Extraction par solvant

La capacité de l'extrudeur bi-vis à réaliser de l'extraction solide/liquide a également conduit à des recherches sur l'extraction d'huile par solvant en extrusion. Dès 1998, la faisabilité de l'extraction de graines de tournesol avec une solution alcoolique a été vérifiée : les rendements ont atteint 90 % lors de l'injection d'une solution acidifiée de 2-ethylhexanol dans le fourreau, sans modification de la qualité de l'huile [185, 196]. Le modèle industriel d'extraction d'huile par pression suivie d'une extraction de l'huile résiduelle du tourteau par solvant a également été reproduit par extrusion. Un rendement global d'extraction de 97 % a ainsi été obtenu avec un extrudeur équipé d'une première zone dédiée au pressage des graines de tournesol et d'une seconde zone consacrée à l'extraction du tourteau par ajout d'esters méthyliques de tournesol [194].

#### I.4.3.2.3. Extraction aqueuse

L'extraction aqueuse de graines oléagineuses étudiée depuis les années 60 implique généralement un traitement mécanique et une extraction solide/liquide effectués en batch. Ce procédé peut également être réalisé en continu par extrusion bi-vis. L'huile extraite par ce type de procédé est obtenue sous forme d'émulsion, plus ou moins stabilisée par les autres molécules extraites de la matrice. Une étape de démixtion (par modification de la température, du pH ou par centrifugation par exemple) peut être nécessaire à la récupération de l'huile. L'extraction aqueuse de graines de tournesol en extrudeur bi-vis a permis d'extraire un rendement de 55 % en huile et d'obtenir des émulsions stabilisées par des protéines et des phospholipides [197]. L'extraction aqueuse par extrusion bi-vis a également été utilisée pour obtenir des émulsions stabilisées par le mucilage de lin pour le domaine cosmétique à partir de graines de colza, pastel, lin, cardon et/ou chanvre seules ou en mélange [198].

#### I.4.3.3. Extraction de molécules actives par extrusion bi-vis

Plus récemment, plusieurs études ont montré que le procédé d'extrusion bi-vis pouvait être une nouvelle méthode éco-responsable d'extraction de molécules à haute valeur ajoutée, notamment pour la valorisation de co-produits végétaux. L'extraction éthanolique alcaline des acides férulique et p-coumarique par extrusion à partir de co-produits de chanvre a ainsi été étudiée [199]. L'action mécanique fournie par l'extrudeur favorise le mélange liquide-solide et a permis d'atteindre des rendements d'extraction allant de 60 jusqu'à 100 % du potentiel, respectivement, pour ces deux molécules. L'extraction aqueuse de protéines de luzerne réalisée en extrudeur bi-vis a mis en avant l'influence du profil de vis et du ratio solvant/solide dans ce type de procédé [200]. L'augmentation du ratio eau/solide a également permis d'améliorer

l'extraction de polyphénols à partir de co-produits de bois (souche, nœud et écorce), menant à des extraits riches en polyphénols et en antioxydants utilisables comme conservateurs pour des revêtements du bois ou comme compléments alimentaires [201].

## **I.5. Conclusion**

Cette étude bibliographique a permis de faire l'inventaire des informations disponibles sur une sélection de co-produits de fruits et de légumes de l'industrie agroalimentaire réunionnaise. Les données relatives aux huiles de graines de fruit de la passion et de goyavier ont été répertoriées et ont montré que peu d'informations étaient disponibles sur l'huile des graines de goyavier, contrairement à l'huile de fruit de la passion plus largement étudiée. Ces deux huiles végétales tropicales présentent un intérêt pour leur richesse en acide gras insaturés. Certaines méthodes d'extraction éco-compatibles, adaptées à l'obtention des fractions lipidiques ont été inventoriées comme étant applicables aux deux graines.

Les propriétés physico-chimiques et biologiques des extraits de fruits issus des matières premières choisies (graines, pulpe, peau et fruits entiers) ont été rassemblées. Les teneurs en polyphénols et les activités antioxydantes des extraits de goyavier, de fruit de la passion et de carambole sont les plus élevées. Pour la suite des travaux, ont été conservées les matières premières présentant une activité antibactérienne et/ou antifongique sur plusieurs souches de contaminants microbiens.

Cette étape a non seulement permis de cerner les enjeux de ce projet, dans un contexte plus large de développement durable mais également d'identifier les principaux verrous scientifiques et technologiques. Ainsi sur la base de ce travail bibliographique, les principales questions scientifiques abordées au cours de l'avancement des travaux, sont les suivantes :

- Quel(s) procédé(s) éco-responsables et quelles conditions choisir pour optimiser les rendements en huile végétale et en fractions d'intérêt tout en satisfaisant aux exigences du label Pure ?
- Existe-t-il une relation entre les teneurs en polyphénols, l'activité antioxydante et les propriétés antimicrobiennes attendues des extraits de co-produits ?
- Quelle stratégie mettre en place pour réaliser une co-extraction des différents constituants des co-produits ?
- Comment mettre en œuvre un procédé limitant le nombre d'étapes unitaires du processus de fabrication ?
- Comment mesurer l'efficacité antimicrobienne des extraits au sein d'une émulsion ?

Afin de répondre à ces questions scientifiques et lever les verrous technologiques, plusieurs champs disciplinaires ont été mobilisés, notamment la lipochimie, la (bio)chimie, l'analyse chimique, la physico-chimie, la microbiologie et les procédés. Ce travail s'est articulé en trois parties :

- Étude de l'extraction et de la caractérisation des huiles végétales et des fractions actives à partir des différents constituants des co-produits végétaux répertoriés d'intérêt ;
- Mise en œuvre d'un procédé intégré de valorisation des coproduits afin d'obtenir des milieux préformulés ;

- Étude de l'intégration des fractions d'intérêt pour accéder à de nouvelles formulations de peintures naturelles, dont les performances et la conservation sont évaluées.

### Références bibliographiques

1. ISO, Peintures et vernis – Termes et définitions, 2014, NF EN 4618
2. INRS, Peintures en solvants, 2005, ED 971, Paris
3. Brock T., Groteklaes M., Mischke P., Manuel de technologies des peintures et vernis, Offranville : Eurocol Editions, 2000,
4. Anliker R., Vernis alkydes et peintures à l’huile, RUCO Le magazine spécial des peintres et vernisseurs, 15, 2009
5. Müller B., Poth U., Formulation des peintures et vernis, Offranville : Eurocol Editions, 2003
6. Perego F., Dictionnaire des matériaux du peintre, Saint Amand Montrond : Belin, 2005
7. INRS, Peintures en phase aqueuse (ou peintures à l’eau), 2006, ED 955, Paris
8. Cabines d’application par projection de peinture en poudre, 2004, ED 928, Paris
9. Directive 2004/42/CE du Parlement européen et du Conseil du 21 avril 2004 (J. O. n° L 143 du 30/04/2004, p. 87–96)
10. Règlement (UE) 2017/776 du Parlement européen et du Conseil relatif à la classification, à l’étiquetage et à l’emballage des substances et des mélanges du 4 mai 2017 (J. O. n° L 116 du 05/05/2017, p. 1-19)
11. Cicolella A., Les composés organiques volatils (COV) : définition, classification et propriétés, *Revue des Maladies Respiratoires*, 2007, 25 (2) 155-163
12. Grange D., Host S., Gremy I., Les composés organiques volatils (COV), 2007, Observatoire régional de santé d’Ile-de-France
13. Décision 2009/544/CE de la Commission du 13 août 2008 établissant les critères écologiques pour l’attribution du label écologique communautaire aux peintures et vernis d’intérieur (J. O. n° L 181, 14/07/2009, p. 118-127)
14. Décision 2014/312/UE de la Commission du 28 mai 2014 établissant les critères écologiques pour l’attribution du label écologique de l’Union européenne aux peintures et aux vernis d’intérieur ou d’extérieur (J. O. n° L 164, 03/06/2014, p. 45-70)
15. AFNOR Certification, Liste des Peintures et Vernis d’intérieur ou d’extérieur certifiés Ecolabel Européen, Edition n°2018/07, 21/08/2018
16. ECOCERT, 2015, Référentiel ECOCERT Peintures
17. MSI Reports, Marché des Peintures Décoratives en France, 2017, Lyon
18. Helme J.P., *Revue Française des Corps Gras*, 1994, 41, 13-19
19. Olesea R., Mesure et prédiction de la réactivité des lipides au cours du chauffage d’huiles végétales à haute température, Autre, AgroParisTech, 2012
20. Falla N., Linoleic Based Coatings: A Study of the Dry Film Structure, *Journal of Coatings Technology*, 1992, 64, 55–60
21. Poth U., Drying Oils and Related Products, *Ullmann encyclopedia of industrial chemistry*, 2001, 11, 621-636
22. Morin O., Pages-Xatart-Pares X., Huiles et corps gras végétaux : ressources fonctionnelles et intérêt nutritionnel, *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 2012, 19, 63-75
23. Lazzari M., Chiantore O., Drying and oxidative degradation of linseed oil, *Polymer Degradation and Stability*, 1999, 65, 303–313

24. Van Zeiste W., 1972, Palaeobotanical results in the 1970 seasons at Cayonu, Turkey, *Helinium*, 12
25. Vaisey-Genser M. A., Morris D., 2003, Introduction History of the cultivation and uses of flaxseed. dans: *Flax, The genus Linum*. Eds Muir, A. D., Wescott, N. D., CRC Press, 34, 1-22
26. Labalette F., Landé N., Wagner D., Roux-Duparque M., Saillet E., La filière lin oléagineux française : panorama et perspectives, *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 2011, 8, 113-122
27. Popa V., Gruia A., Raba D., Dumbrava D., Moldovan C., Bordean D., Mateescu C., Fatty acids composition and oil characteristics of Linseed from Romania, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2012, 18, 136-140
28. Kumarathan R., Rajkumar A., Hunter N., Gesser H., Autoxidation and yellowing of methyl linolenate, *Progress in Lipid Research*, 1992, 31, 109-126
29. Oomah, B., Kenaschuk E., Cui W., Mazza G., Variation in the composition of water-soluble polysaccharides in flaxseed, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43, 1484-1488
30. Daun J., Barthet V., Chornick T., Duguid S., 2003, Structure, composition, and variety development of flaxseed. dans: *Flaxseed in Human Nutrition, Second Edition*. Thompson, L. U. and Cunnane, S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 1-40
31. Morin O., Caractéristiques des huiles de lin et de chanvre, 2015, *OCL*, 22
32. Bureau L, L'huile de chanvre, *Phytothérapie*, 2010, 8, 109-112
33. Halary J.L., Matériaux Polymères et Développement Durable, *L'actualité chimique*, 2010, 338-339, 41-53
34. Sigwalt P., *Peintures Pigments et Vernis*, 1957, 33, 544-550
35. Bieleman J., Progress in the development of cobalt-free drier systems, *Macromolecular Symposia*, 2002, 187, 811-821
36. Mallégol J., Lemaire J., Gardette J.L., Drier influence on the curing of linseed oil, *Progress in Organic Coatings*, 2000, 39, 107-113
37. Soucek M., Khattab T., Wu J., Review of autoxidation and driers, *Progress in Organic Coatings*, 2012, 73, 435-454
38. Bouwman E., van Gorkum R., A study of new manganese complexes as potential driers for alkyd paints, *Journal of Coatings technology and Research*, 2007, 4, 491-503
39. Directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 février 1998 (J.O. n° L123, 24/04/1998, 1-63)
40. Williams T., The mechanism of action of isothiazolone biocides, *PowerPlant chemistry*, 2007, 9, 14-22
41. McClements D.J., Protein-stabilized emulsions, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2004, 9, 305-313
42. Bos M., Vliet T., Interfacial, rheological properties of adsorbed proteins layers and surfactants: A review, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2001, 91, 437-471
43. DeGrado W., Lear, J., Introduction to peptide conformation at apolar / water interfaces. 1: A study with model peptides of defined hydrophobic periodicity, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1985, 107, 7684-7689

44. Folmer B. Sterol surfactants: from synthesis to applications, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2003, 103, 99-119
45. Waraho T. McClements D.J., Decker E., Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions, *Food Chemistry*, 2011, 129, 854-859
46. Patel S., Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: a review on prospects and threats, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2012, 11, 243–248
47. Lim T. K., *Edible Medicinal And Non Medicinal Plants: Volume 3*, Springer, 2012
48. Lavergne C., Liste des espèces invasives de la Flore vasculaire de La Réunion, 2011, Conservatoire Botanique National de Mascarin
49. Descourtilz J. T., Pérée A., Flore médicale des Antilles, ou traité des plantes usuelles des colonies françaises, anglaises, espagnoles et portugaises, Tome cinquième, 1827
50. Nyanzi S., B. Carstensen, W. Schwack, A comparative study of fatty acid profiles of *Passiflora* seed oils from Uganda, *Jouranl of the American Oil Chemists' Society*, 2005, 82, 41-45
51. Curtis S., *Botanical Magazine*, June 1818 Issue
52. C.R., N. Jorge, Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and Chemical Characteristics. *Brazilian Archive in Biology and Technology*, 2012, 55(1), 127-134
53. Fern Ken, Tropical Plants Database, [en ligne] mis à jour le 16/08/2018, consulté le 24/09/2018, <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Averrhoa+carambola>
54. Fleurs, fruits, feuilles de, L'île de la Réunion et d'ailleurs, [en ligne] mis à jour le 31/12/2016, consulté le 24/09/2018, [http://fleurs-fruits-feuilles-de.com/averrhoa\\_carambola.php](http://fleurs-fruits-feuilles-de.com/averrhoa_carambola.php)
55. Food and Agriculture Organization of the UN, Ecocrop, [en ligne], consulté le 24/09/2018, <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=483>
56. D'Hondt A., Denoeud F., Wincker P., The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants, *Nature*, 2012, 488, 213-217
57. Manzo-Sánchez G., Buenrostro-Nava M., Guzmán S., Orozco-Santos M. Youssef M., Escobedo-Gracia Medrano R., Genetic Diversity in Bananas and Plantains (*Musa* spp.) in *Molecular Approaches to Genetic Diversity*, InTech, 2015, p. 93-121
58. Food and Agriculture Organization of the UN, Ecocrop, [en ligne], consulté le 24/09/2018, <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=7848>
59. Descourtilz J. T., Pérée A., Flore médicale des Antilles, ou traité des plantes usuelles des colonies françaises, anglaises, espagnoles et portugaises, Tome septième, 1829
60. Schmidt C., Darstellung und Beschreibung, Pharmacopoea Sämtliche Borussica officinellen Gewächse aufgeführten, 1853
61. Morton J., Tangor in *Fruits of warm climates*, Miami, Julia F. Morton, p. 45-46
62. Martius K., Flora brasiliensis, Volume XIII, Partie III, 1841
63. Fern Ken, Tropical Plants Database, [en ligne] mis à jour le 16/08/2018, consulté le 24/09/2018, <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Carica+papaya>
64. Food and Agriculture Organization of the UN, Ecocrop, [en ligne], consulté le 24/09/2018, <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=630>

65. The Crop Trust, Crop Trust, [en ligne], consulté le 24/09/2018, <https://www.croptrust.org/crop/sweet-potato/>
66. Descourtilz J. T., Pérée A., Flore médicale des Antilles, ou traité des plantes usuelles des colonies françaises, anglaises, espagnoles et portugaises, Tome huitième, 1829
67. Food and Agriculture Organization of the UN, Ecocrop, [en ligne], consulté le 24/09/2018, <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=1265>
68. Fern Ken, Tropical Plants Database, [en ligne] mis à jour le 16/08/2018, consulté le 24/09/2018, <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Ipomoea+batatas>
69. The Crop Trust, Crop Trust, [en ligne], consulté le 24/09/2018, <https://www.croptrust.org/crop/cassava/>
70. The Crop Trust, Crop Trust, [en ligne], consulté le 24/09/2018, <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=1420>
71. Descourtilz J. T., Pérée A., Flore médicale des Antilles, ou traité des plantes usuelles des colonies françaises, anglaises, espagnoles et portugaises, Tome troisième, 1827
72. Kobelnik M., Cassimiro D. L., dos Santos Dias D., Ribeiro C. A., Crespi M. S., Thermal behavior of araçá oil (*Psidium cattleianum* Sabine), *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2012, 108, 1281-1286
73. Barrales F. M., Rezende C. A., Martinez J., Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) seed oil assisted by ultrasound, 2015, *Journal of Supercritical Fluids*, 104, 183-192
74. Liu S., Yang F., Li J., Zhang C., Ji H., Hong P., Physical and chemical analysis of *Passiflora* seeds and seed oil from China, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2008, 59, 706-715
75. De Santana F., Shinagawa F., Araujo E., Costa A., Mancini-Filho J., Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Brazilian *Passiflora* Seed Oils, *Journal of Food Science*, 2015, 80, 2647-2654
76. Naz S., Sheikh H., Siddiqi R., Sayeed S. A., Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions, *Food Chemistry*, 2004, 88, 253-259
77. ISO, Graines oléagineuses – Détermination de l'indice d'acide, 1986, NF V03-906
78. Codex alimentarius, Norme pour les huiles végétales portant un nom spécifique, 1999, Codex Stan 210-199
79. ISO, Liants pour peintures et vernis – Détermination de l'indice de saponification – Méthode titrimétrique, 1998, NF EN ISO 3681
80. Lion P., Travaux pratiques de chimie organique, 1955, Dunod, Paris
81. Biegelmeier R., Andrade J., Aboy A., Apel M., Dresch R., Marin R., do Carmo Bassols Raseira M., Henriques A., Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of Red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* var. *Lucidum*) strawberry guava, *Journal of Food Science*, 2011, 76, 991-996
82. Piombo G., Barouh N., Barea B., Boulanger R., Brat P., Pina M., Villeneuve P., Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*), *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 2006, 13, 195-199

83. Chiou R., Liu C.P., Hou C., Liu C.D., Comparison of Fatty Acid Composition and Oxidative Stability of Peanut Oils Prepared from Spring and Fall Crops of Peanuts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43, 676-679
84. Cuvelier C., Dotreppe O., Istasse L., Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E, *Annales de Médecine Vétérinaires*, 2003, 147, 315-324
85. Lindsay D., Astley S., European research on the functional effects of dietary antioxidants, *Molecular Aspects of Medicine*, 2002, 23, 1-38
86. Ayerdi Gotor A., Berger M., Labalette F., Centis S., Dayde J., Calmon A., Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule, partie 1 : Tocophérols, *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 2006, 13, 206-212
87. Oomah B., Busson M., Godfrey D., Drover, J., Characteristics of hemp seed oil, *Food Chemistry*, 2002, 76, 33-43
88. Oomah B., Kenaschuk E., Mazza G., Tocopherols in flaxseed, *J of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 2076-2080
89. Lavedrine F., A. Revel, A. Poupard, J. Alary, Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC, *Food Chemistry*, 1997, 58, 135-140
90. Ayerdi Gotor A., Berger M., Labalette F., Centis S., Dayde J., Calmon A., Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule, partie 2 : Phytostérols, *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 2006, 13, 400-406
91. Winkler-Moser J., Gas Chromatographic Analysis of Plant Sterols, [en ligne], consulté le 09/10/2018, <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40384>
92. Kochlar L., Influence of processing on sterols of edible vegetable oils, *Progress in Lipid Research*, 1983, 22, 161-188
93. Toivo J., Phillips K., Lampi A., Piironen V., Determination of Sterols in Foods : Recovery of Free, Esterified, and Glycosidic Sterols, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2001, 14, 631-643
94. Da Silva A., Jorge N., Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste, *Food Research International*, 2014, 66, 493-500
95. Määttä K., Lampi A., Petterson J., Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79, 1021-1027
96. Awad A., Fink C., Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action, *The Journal of Nutrition*, 2000, 130, 2127-2130
97. Bouic P., Clark A., Lamprecht J., The effects of  $\beta$ -sitosterol (BSS) and  $\beta$ -sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: Inhibition of post marathon immune suppression and inflammation, *International Journal of Sports Medicine*, 1999, 20, 258-262
98. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H., Carotenoids: Handbook, Birkhäuser Verlag, Basel/Boston/Berlin, 2004
99. Saini R., Keum Y., Carotenoid extraction methods: A review of recent developments, *Food Chemistry*, 2018, 240, 90-103

100. Savy S., Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques : Des carotènes aux xanthophylles., Biochimie, Université de Bretagne occidentale - Brest, 2005
101. Sultanbawa Y., Plant antimicrobials in food applications: Minireview, in Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, A. Méndez-Vilas (Ed.)
102. Gyawali R., Hayek S., Ibrahim S., Plant extracts as antimicrobials in food products: mechanisms of action, extraction methods, and applications, *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 2015, 49
103. Bajpai V., Rahman, A., Dung N., Huh M., Kang S., In vitro inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *Journal of Food Science*, 2008, 73, 314–320
104. Burt S. A., Van der Zee R., Koets P., de Graaff A. M., Van Knapen F., Gaastra W., Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157: H7, *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73, 4484-4490
105. Tiwari B., Valdramidis V., O' Donnell C., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P., Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009
106. Vig A., Bio-protective effects of glucosinolates - A review, *Food Science and Technology*, 2009, 42, 1561-1572
107. Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A., Kouretas D., Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic *Lamiaceae* species, *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50, 4115-4124
108. Moreno S., Scheyer T., Romano C., Vojnov A., Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition, *Free Radical Research*, 2006, 40, 223–231
109. Fattouch S., Caboni P., Coroneo V., Tuberoso C., Angioni A., Dessi S., Marzouki N., Cabras P., Antimicrobial Activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Pulp and Peel Polyphenolic Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 963–969
110. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K., Methods for testing antioxidant activity, *The Analyst Journal*, 2002, 127, 183-198
111. Bouddah Poaty-Poaty, Modification chimique d'antioxydants pour les rendre lipophiles: application aux tannins, Chimie, Université Henri Poincaré - Nancy I, 2009
112. Rolland Y., Antioxydants naturels végétaux, *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 2004, 11, 419-424
113. Yu L., Zhao M., Wang J.S., Cui C., Yang B., Jiang Y., Zhao Q., Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine (*Pinus massoniana* Lamb) bark, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, 9, 122-128

114. McCann M.J., Gill C.I.R., O' Brien G., Rao J.R., McRoberts W.C., Hughes P., McEntee, R. Rowland I.R., Anti-cancer properties of phenolics from apple waste on colon carcinogenesis in vitro, *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45, 1224-1230
115. Harborne J.B., Williams C.A. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 2000, 55, 481-504
116. Lai P., Roy J., Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices, *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11, 1451-1460
117. Gyawali R., Ibrahim S., Natural products as antimicrobial agents, *Food Control*, 2014, 46, 412-429
118. Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 79, 727-747
119. Macheix J.J., Fleuriet A., Billot J., *Fruit phenolics*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1999
120. Grigoraş Cristina-Gabriela, Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformaton des fruits par extraction des composes bioactifs, Chimie, Université « Vasile Alecsandri » de Bacău, 2012
121. Harborne J.B., The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants, *Biochemical Systematics and Ecology*, 1999, 27, 335-368
122. Renault J.-H., Thépenier P., Zéches-Hanrot M., Le Men-Olivier L., Durand A., Foucault A., Margraff R. Preparative separation of anthocyanins by gradient elution centrifugal partition chromatography, *Journal of Chromatography*, 1997, 763, 345-352
123. Naczk M., Shahidi F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, 41, 1523-1542
124. Bonetti F., Brombo G., Zuliani G., Nootropics, Functional Foods, and Dietary Patterns for Prevention of Cognitive Decline, *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*, 2017, 211–232
125. Zembyla M., Murray B., Sarkar A., Water-in-oil pickering emulsions stabilized by water-insoluble polyphenol crystals, *Langmuir*, 2018, 34, 10001-10011
126. Luo Z., Murray B., Yusoff A., Morgan M., Povey M., Day A., Particle-stabilizing effects of flavonoids at the oil-water interface, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 2636-2645
127. Di Mattia C.D., Sacchetti G., Mastrocola D., Pittia P., Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions, *Food Research International*, 2009, 42, 1163-1170
128. Sabouri S., Geng J., Corredig M., Tea polyphenols association to caseinate-stabilized oil-water interfaces, *Food Hydrocolloids*, 51, 95-100
129. Morais D., Rotta E., Sargi S., Schmidt E., Bonafe E., Eberlin M., Sawaya A., Visentainer J., Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels, *Food Research International*, 2015, 77, 392-399
130. Luximon-Ramma A., Bahorun T., Crozier A., Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 83, 496–502

131. Souza V., Pereira P., Queiroz F., Borges S., Carneiro J., Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits, *Food Chemistry*, 2012, 134, 381-386
132. Da Silva L., de Figueiredo E., Ricardo N., Vieira I., de Figueiredo R., Brasil I., Gomes C., Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil, *Food Chemistry*, 2014, 143, 398-404
133. Suhaila M., Zahariah H., Norhashimah H., Antimicrobial Activity of some Tropical Fruit Wastes (Guava, Starfruit, Banana, Papaya, Passionfruit, Langsat, Duku, Rambutan and Rambai), *Journal of Tropical Agricultural Science*, 1994, 17, 219-227
134. Akanbi B., Bodunrin O., Olayanju S., Phytochemical Screening and Antibacterial Activity Of *Passiflora edulis*, *Researcher*, 2011, 3, 9-12
135. Corre L., Santos C., Vianello F., Lima G., Antioxidant content in guava (*Psidium guajava*) and araçá (*Psidium spp.*) germplasm from different Brazilian regions, *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 2011, 9, 384–391
136. Medina A., Haas L., Chaves F., Salvador M., Zambiasi R., da Silva W., Nora L., Rombaldi C., Araca (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells, *Food Chemistry*, 2011, 128, 916–922
137. McCook-Russell K., Nair M., Facey P., Bowen-Forbes C., Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits, *Food Chemistry*, 2012, 134, 1069–1073
138. Ali M., Devi L., Nayan V., Chanu K., Ralte L., Antioxidant activity of fruits available in Aizawl market of Mizoram, India, *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 2010, 1, 76-81
139. Khanam Z., Sam K., Zakaria N., Ching C., Bhat I., Determination of polyphenolic content, HPLC analyses and DNA cleavage activity of Malaysian Averrhoa carambola L. fruit extracts, *Journal of King Saud University – Science*, 2015, 27, 331-337
140. Shui G., Leong L., Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals, *Food Chemistry*, 2006, 97, 277-284
141. Jain P., Bhuiyan M., Hossain K., Bachar S., Antibacterial and antioxidant activities of local seeded banana fruits, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011, 5, 1398-1403
142. Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J., Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils, *Food Control*, 2008, 19, 1130–1138
143. Javed S., Javaid A., Mahmood Z., Javaid A., Nasim F., Biocidal activity of citrus peel essential oils against some food spoilage bacteria, *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5, 3697-3701
144. Ghasemi K., Ghasemi Y., Ebrahimzadeh M., Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 2009, 22, 277-281

145. Anagnostopoulou M., Kefalas P., Papageorgiou V., Assimopoulou A., Boskou D., Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*), *Food Chemistry*, 2006, 94, 19-25
146. Xu G., Chen J., Liu D., Zhang Y., Jiang P., Ye X., Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water, *Journal of Food Science*, 2008, 73, 11-18
147. Faezah O., Aishah H., Kalsom Y., Abdullah N., Wahab P., Sinniah U., Phenolics, Flavonoids, Antioxidant Activity and Cyanogenic Glycosides of Organic and Mineral-base Fertilized Cassava Tubers, *Molecules*, 2012, 17, 2378-2387
148. Yi B., Hu L., Mei W., Zhou K., Wang H., Luo Y., Wei X., Dai H., Antioxidant Phenolic Compounds of Cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan, *Molecules*, 2010, 16, 10157-10167
149. Noumedem J., Mihasan M., Lacmata S., Stefan M., Kuate J., Kuete V., Antibacterial activities of the methanol extracts of ten Cameroonian vegetables against Gram-negative multidrug-resistant bacteria, *Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 13
150. Teow C., Truong V.D., McFeeters R., Thompson R., Pecota K., Yencho G., Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours, *Food Chemistry*, 2007, 103, 829–838
151. Jung J.K., Lee S.U., Kozukue N., Levin C., Friedman M., Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots, *Journal of Food composition and analysis*, 2011, 24, 29-37
152. Tang Y. Cai W., Xu B., Profiles of phenolics, carotenoids and antioxidative capacities of thermal processed white, yellow, orange and purple sweet potatoes grown in Guilin, China, *Food Science and Human Wellness*, 2015, 4, 123–132
153. Rath D., George J., Mukherjee A., Naskar S., Mohandas C., Antibacterial activity of leaf and tuber extracts of orange, purple flesh antioxidants rich sweet potato, *Merit Research Journal of Agricultural Science and Soil Sciences*, 2016, 4, 67-71
154. Matthäus B., Oil technology dans: Technological Innovations in Major World Oil Crops, volume 2. Eds Gupta, S. K., Springer, New York, USA, 2012
155. Guillemain S., Extraction aqueuse d'huile de colza assistée par hydrolyse enzymatique : optimisation de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de procédés de déstabilisation, Procédés biotechnologiques et alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, 2006
156. Rombaut N., Etude comparative de trois procédés d'extraction d'huile : aspects qualitatifs et quantitatifs : application aux graines de lin et aux pépins de raisin, Génie des Procédés Industriels et développement durable, Université de Technologie de Compiègne, 2013
157. Pagès-Xatart-Parès X., Technologies des corps gras (huiles et graisses végétales), 2008, *Techniques de l'ingénieur, dossier F6070*, 19
158. Vadke V., Sosulski F., Mechanics of oil expression from canola, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 1988, 65, 1169-1176

159. Kartika I., Nouveau procédé de fractionnement des graines de tournesol : expression et extraction en extrudeur bi-vis, purification par ultrafiltration de l'huile de tournesol, Sciences des Agroressources, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2005
160. Finel F., Abert Vian M., Fabiano Tixier A.S., Carre P., Pages X., Chemat F., Les agrosolvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses, *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 2013, 20
161. Gandhi A., Joshi K., Jha K., Parihar V., Srivastav D., Raghunadh P., Kawalkar J., Jain S., Tripathi R., Studies on alternative solvents for the extraction of oil – I soybean, *International Journal of Food Science & Technology*, 2003, 38, 369-375
162. Wan P., Hron R., Dowd M., Kuk S., Conkerton E., Isohexane as an alternative hydrocarbon solvent, *Oil Mill Gaz*, 1995, 100, 28-32
163. Evon, P., Nouveau procédé de bioraffinage du tournesol plante entière par fractionnement thermo-mécano-chimique en extrudeur bi-vis : étude de l'extraction aqueuse des lipides et de la mise en forme du raffinat en agromatériaux par thermomoulage, Science des Agroressources, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2008
164. Wan P., Hron R., Dowd M., Kuk M., Conkerton E., Alternative Hydrocarbon Solvents for Cottonseed Extraction: Plant Trials, *Journal of the American Oil Chemist' Society*, 1995, 72, 661-664
165. R.C. De Oliveira, S. De Barros, M. Gimenes, The extraction of passion fruit oil with green solvents, *Journal of Food Engineering*, 2013, 117, 458-463
166. Sahena F., Zaidul I., Jinap S., Karim A., Abbas K., Norulaini N., Omar A., Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction – A review, *Journal of Food Engineering*, 2009, 95, 240-253
167. Sicaire A., Vian M., Fine F., Joffre F., Carré P., Tostain S., Chemat F., Alternative bio-based solvents for extraction of fat and oils: solubility prediction, global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 8430-8453
168. Shucheng L., Feng Y., Chaohua Z., Hongwu J., Pengzhi H., Chujin D., Optimization of process parameters for supercritical carbon dioxide extraction of Passiflora seed oil by response surface methodology, *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 48, 9-14
169. Innovation Fluides Supercritiques, Le portail des fluides supercritiques, [en ligne], consulté le 29/03/2019, <http://www.portail-fluides-supercritiques.com/Fluides-supercritiques.55.0.html>
170. Zahedi G., Azarpour A., Optimization of carbon dioxide extraction of Passiflora seed oil, *Journal of supercritical fluids*, 2011, 58, 40-48
171. Temelli, F., Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils, *Journal of Supercritical Fluids*, 2009, 47, 583-590
172. Uquiche E., Jeréz M., Ortíz J., Effect of pretreatment with microwaves of mechanical extraction yield and quality of vegetable oil from Chilean hazelnuts (*Gevuina avellana* Mol), *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008, 9
173. Azmir J. Zaidul I., Rahman M., Sharif K., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M., Ghafoor K., Norulaini N., Omar A., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 2013, 117, 426–436

174. Cheng S., Mohd Nor L., Chuah C., Microwave pretreatment: A clean and dry method for palm oil production, 2011, *Industrial Crops and Products*, 34, 967– 971
175. Oomah B., Liang J., Godfrey D., Mazza G., Microwave Heating of Grapeseed: Effect on Oil Quality, *Journal of the Agriculture and Food Chemistry*, 1998, 46, 4017-4021
176. Da Porto C., Porretto E., Decorti D., Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20, 1076–1080
177. Zhang Z., Wang L., Li D., Jiao S., Dong Chen X., Mao Z., Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed, *Separation and Purification Technology*, 2008, 62, 192–198
178. Li H., Ultrasound and Microwave Assisted Extraction of Soybean Oil, *Biosystems Engineering Technology*, University of Tennessee, 2002
179. Silva L., Nelson D., Drummond M., Dufossé L., Glória M., Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International*, 2005, 38, 1087–1096
180. Azmir J., Zaidul I., Rahman M., Sharif K., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M., Ghafoor K., Norulaini N., Omar A., Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 2013, 117, 426-436
181. Mustafa A., Turner C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction : A review. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 703, 8–18
182. Co M., Koskela P., Eklund-Akergren P., Srinivas K., King J., Sjoberg P., Turner C., Pressurized liquid extraction of betulin and antioxidants from birch bark, *Green Chemistry*, 2009, 11, 668–674
183. Ziakova A., Brandsteterova E., Application of different preparation techniques for extraction of phenolic antioxidants from lemon balm (*Melissa officinalis*) before HPLC analysis, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2002, 25, 3017–3032
184. Amalia Kartika I., Pontalier P.Y., Rigal L., Oil extraction of oleic sunflower seeds by twin screw extruder: influence of screw configuration and operating conditions, *Industrial Crops and Products*, 2005, 22, 207-222
185. Lacaze-Dufaure C., Fractionnement du tournesol oléique : expression et transformations chimiques des triglycérides de graines en esters lubrifiants et adjuvants en réacteur conventionnel et réacteur bi-vis. Science des Agroressources, Institut National Polytechnique de Toulouse, 1998
186. Silvestre F., Rigal L., Leyris J., Gaset A., Colle à l'eau à base d'extrait protéique végétal et procédé de préparation, 1999, Brevet Européen EP 0,997,513
187. N'Diaye S., Rigal L., Factors influencing the alkaline extraction of poplar hemicelluloses in a twinscrew reactor: correlation with specific mechanical energy and residence time distribution of the liquid phase, *Bioresource Technology*, 2000, 75, 13-18
188. Maréchal V., Rigal L., Characterization of by-products of sunflower culture: commercial applications for stalks and heads, *Industrial Crops and Products*, 1999, 10, 185-200

189. Manolas C., Gaset A., Jamet J.P., Rigal L., N'Diaye S., Process for depithing pith containing plants, in particular sorghum. 1995. Brevet Européen, EP 0 698 681
190. Geneau C., Procédé d'élaboration d'agromatériau composite naturel par extrusion bi-vis et injectionmoulage de tourteau de tournesol. Science des Agroressources, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2006
191. Vergnes B. Chapet M., Extrusion – Procédé d'extrusion bi-vis, 2001, Techniques de l'ingénieur
192. Amalia Kartika I., Nouveau procédé de fractionnement des graines de tournesol : expression et extraction en extrudeur bi-vis, purification par ultrafiltration de l'huile de tournesol, Science des Agroressources, Institut National Polytechnique de Toulouse, 2005
193. Amalia Kartika, I., Pontalier, P.Y., Rigal, L., Extraction of sunflower oil by twin screw extruder: screw configuration and operating conditions effects, *Bioresources Technology*, 2006, 97, 2302-2310
194. Guyomard, P., Étude de faisabilité d'un extrudeur bi-vis en pressage-extrusion de graines oléagineuses. Génie des Procédés Industriels, Université Technologique de Compiègne, 1994
195. Siregar A., Ghani J., Haron C., Rizal M., Yaakob Z., Kamarudin S., Comparison of oil press for jatropha oil – a review., *Research in Agricultural Engineering*, 2015, 61, 1–13
196. Lacaze-Dufaure C., Mouloungui Z., Rigal L., A twin-screw extruder for oil extraction : II. Alcohol extraction of oleic sunflower seeds, *Journal of the American Oil Chemist' Society*, 1999, 76, 1081-1086
197. Evon P., Vandenbossche V., Pontalier P.Y., Rigal L. Direct extraction of oil from sunflower seeds by twin-screw extruder according to an aqueous extraction process : Feasibility study and influence of operating conditions. *Industrial Crops and Products*, 2007, 2, 351-359
198. Magimel A., Candy L., Delgado C., Rigal L., Vilarem G., Procédé d'obtention d'émulsion stable à partir de graines entières oléo-protéagineuses, l'émulsion obtenue et les compositions cosmétiques comprenant ladite émulsion, 2016, Brevet français, FR 3 052 064
199. Candy L., Bassil S., Rigal L., Simon V., Raynaud C., Thermo-mechano-chemical extraction of hydroxycinnamic acids from industrial hemp by-products using a twin-screw extruder, *Industrial Crops & Products*, 2017, 109, 335–345
200. Colas D., Doumeng C., Pontalier P.Y., Rigal L., Twin-screw extrusion technology, an original solution for the extraction of proteins from alfalfa (*Medicago sativa*), *Food Bioproduction Process*, 2013, 91, 175–182
201. Celhay C., Mathieu C.E., Candy L., Vilarem G., Rigal L., Aqueous extraction of polyphenols and antiradicals from wood by-products by a twin-screw extractor: feasibility study. *Comptes Rendus Chimie*, 2014, 17, 204–211

## *Chapitre II : Extraction des huiles végétales et des fractions actives à partir des co-produits végétaux*

---

II.1. Description des matières premières .....	85
II.1.1. Inventaire des co-produits végétaux .....	85
II.1.2. Caractérisation des co-produits de fruit de la passion et de goyavier rouge.....	86
II.2. Extraction et caractérisation des lipides de graines de goyavier rouge et de fruit de la passion ...	88
II.2.1. Comparaison des différentes méthodes d'extraction des lipides .....	88
II.2.2. Influence de la méthode d'extraction sur les propriétés physico-chimiques des huiles .....	95
II.2.3. Composition des fractions insaponifiables .....	98
II.2.4. Bilan sur l'extraction des huiles végétales.....	100
II.3. Extraction, purification et caractérisation de fractions aux propriétés antioxydantes .....	101
II.3.1. Sélection d'une méthode d'extraction de substances naturelles actives .....	101
II.3.2. Extraction et caractérisation de fractions actives.....	104
II.3.3. Purification des fractions actives sur résine polymérique.....	107
II.3.4. Bilan sur l'extraction des fractions actives .....	119
II.4. Conclusion .....	119
<i>Références bibliographiques</i> .....	121

## **Chapitre II : Extraction des huiles végétales et des fractions actives à partir des co-produits végétaux**

L'exploitation des ressources naturelles génèrent souvent des problématiques d'extraction de composés cibles. Les procédés d'extraction mis en jeu ont longtemps été sélectionnés essentiellement sur les seuls critères du rendement et des coûts énergétiques. Plus récemment, la prise en compte des critères environnementaux et de la qualité des extraits est devenue incontournable. Au sein d'une bioraffinerie, sera privilégiée une utilisation optimale de la biomasse ainsi que des procédés propres minimisant la production de déchets.

L'objectif des travaux est d'obtenir deux types de fractions d'intérêt destinées à être incorporées dans des peintures naturelles à partir de co-produits de l'industrie agroalimentaire réunionnaise. Une fraction lipidique est donc extraite des graines et une fraction visant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes est obtenue à partir des pulpes et de peaux. Afin de respecter les exigences du référentiel Pure et de limiter l'impact environnemental et sanitaire des procédés d'obtention des nouveaux ingrédients, les différentes méthodes d'extraction mises en œuvre ont pour but de réduire la consommation de solvant et/ou d'utiliser des solvants verts. Les procédés d'extraction et de transformation des ingrédients sont en effet contrôlés par l'organisme de certification et sont autorisés dans la mesure où ils mènent à la formation de molécules biodégradables selon un procédé dont la dépense énergétique et la gestion des déchets ne nuisent pas à l'équilibre écologique [1]. Pour l'extraction de substances chimiques, l'utilisation de solvant est restreinte aux solvants naturels ou d'origine naturelle tels que l'eau, le CO<sub>2</sub> ou le bioéthanol, avec l'exception de l'hexane autorisé pour l'extraction d'huile végétale.

Pour mettre au point un traitement adapté aux co-produits de fruits, la composition biochimique de cette matière première a tout d'abord été étudiée.

Pour les graines, l'extraction par pression est comparée aux méthodes d'extraction par solvant : le Soxhlet, la macération et l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique. Les performances de l'éthanol en tant que solvant alternatif pour l'extraction d'huile sont évaluées. Pour l'extraction des pulpes et peaux, l'acétone, l'eau et l'éthanol sont utilisés.

Les fractions obtenues sont ensuite caractérisées pour vérifier leur adéquation avec le cahier des charges défini par Derivery.

### **II.1. Description des matières premières**

#### **II.1.1. Inventaire des co-produits végétaux**

Les matières premières sélectionnées pour l'obtention d'huile végétale et de fractions actives ont été fournies par des entreprises en agro-alimentaire de l'Ile de la Réunion : la Confiserie Panonnaise, la Confiserie d'Emilie, les vergers Law-Yat et l'entreprise Royal Bourbon Industries.

Ces co-produits (résidus de peau, graines, pépins, etc.) sont issus des procédés de transformation des fruits et légumes mis en œuvre par ces entreprises réunionnaises. Les co-produits collectés frais sur site, en aval du procédé de transformation, ont été acheminés au

laboratoire, séchés à 50 °C en tunnel de séchage (flux d'air 1 m/s) et ensuite entreposés jusqu'à leur analyse (voir V.1.1.). Les lots obtenus sont décrits dans le Tableau II-1.

Tableau II-112: Description des lots de co-produits sélectionnés pour l'obtention d'huiles ou d'extraits actifs

Matière première	Partie de la plante	MS du co-produit frais (g/100g)	Masse de co-produit séché (kg)	MS du co-produit séché (g/100g)
<i>Goyavier rouge</i>	<i>Pulpe et peau</i>	42,8	1,3	96,5
	<i>Graines</i>		37,8	96,5
<i>Carambole</i>	<i>Peau</i>	7,2	1,1	95,5
<i>Banane</i>	<i>Peau</i>	10,3	0,9	96,2
<i>Tangor</i>	<i>Peau</i>	37,1	8,8	96,5
	<i>Pépins</i>	45,3	0,5	99,2
<i>Papaye</i>	<i>Peau</i>	8,0	0,5	95,0
<i>Manioc</i>	<i>Peau</i>	20,3	1,1	96,2
<i>Patate douce</i>	<i>Peau</i>	29,9	2,3	96,5
<i>Fruit de la passion</i>	<i>Pulpe</i>	49,1	0,7	97,1
	<i>Graines</i>		5,9	96,7

Les co-produits contenant des graines ou des pépins ont logiquement les matières sèches (MS) initiales les plus élevées (goyavier, passion, tangors).

### II.1.2. Caractérisation des co-produits de fruit de la passion et de goyavier rouge

Le lot de co-produit de goyavier rouge étudié dans ces travaux est composé de graines, de peaux et de pulpe résiduelles et a été fourni par Royal Bourbon Industries (le plus gros transformateur de fruits de goyavier rouge sur l'île de La Réunion). Le co-produit collecté a été préalablement lavé à l'eau pour séparer les graines des résidus de pulpe et de peaux. Les graines ont ensuite été séchées à l'étuve à 50 °C, puis mélangées pour constituer un lot homogène de départ de 37,8 kg de graines séchées (Figure II-1). Une partie des peaux et de la pulpe résiduelle éliminées lors du lavage à l'eau a été conservée et séchée à 50 °C en tunnel de séchage pour constituer un lot de pulpe et peau sèche de 1,3 kg (Tableau II-1) (voir V.1.1.).

Le lot de co-produit de fruit de la passion est composé de graines et de pulpe résiduelle et a été fourni par les Vergers Law-Yat (le plus important grossiste et transformateur de fruits de la passion sur l'île de La Réunion). Le co-produit a été séché à l'étuve à 50 °C avant d'être tamisé pour séparer les graines de la pulpe et composer un lot homogène de 5,9 kg de graines séchées (Figure II-1). Un lot de 0,7 kg de résidus de pulpe a également été constitué (Tableau II-1).



Figure II-1 : Graines séchées de goyavier, pulpe séchée de goyavier, graines séchées de fruit de la passion et pulpe séchée de fruit de la passion (de gauche à droite)

La répartition massique des différentes parties des co-produits des deux fruits, avant la séparation des graines, est détaillée dans le Tableau II-2.

Tableau II-2: Caractéristiques des lots de co-produits de goyavier et de fruit de la passion

	Goyavier	Passion
<b>MS co-produit entier (g/100g)</b>	42,8	49,1
<b>% graines du co-produit (MS/MS)</b>	49,6	73,5
<b>% pulpe et peau du co-produit (MS/MS)</b>	50,4	26,5
<b>Masse de graines séchées (kg)</b>	37,8	5,9
<b>MS graines (g/100g)</b>	96,5	96,7

La répartition massique des tailles de particules obtenues après broyage des graines au moulin à café est présentée dans le Tableau II-3. Ce broyage est réalisé avant les analyses et les extractions par solvant (solvants et CO<sub>2</sub> supercritique).

Tableau II-3: Répartition massique des tailles de particules de graines broyées

Taille des particules	Goyavier (%)	Fruit de la passion (%)
<i>T &lt; 0,5 mm</i>	5,7	0,6
<i>0,5 mm &lt; T &lt; 0,8 mm</i>	10,1	10,9
<i>0,8 mm &lt; T &lt; 1,25 mm</i>	41,3	58,8
<i>1,25 mm &lt; T &lt; 1,6 mm</i>	28,6	14,5
<i>1,6 mm &lt; T &lt; 2 mm</i>	7,9	8,1
<i>T &gt; 2 mm</i>	6,8	7,4

La fraction de taille supérieure à 2 mm est principalement constituée de graines non broyées. Pour les deux graines, les particules mesurant entre 0,8 et 1,25 mm sont les plus abondantes, en particulier pour le fruit de la passion. Les graines de goyavier broyées donnent une répartition de tailles plus hétérogène que celle de fruit de la passion.

Les teneurs en matières minérales (voir V.1.2.2.), en composants pariétaux (voir V.1.2.3.), en protéines (voir V.1.2.4.), en lipides totaux (voir V.1.2.5.) et en pectines (voir V.1.2.6.) des graines séchées et des résidus de pulpe et peaux sont indiquées dans le Tableau II-4.

Tableau II-4: Composition chimique des graines de goyavier et de fruit de la passion (en g/100 MS)(n=3)

	Goyavier		Passion	
	Graines	Pulpe et peaux	Graines	Pulpe
<b>Matières minérales</b>	1,3 ± 0,1	2,5 ± 0,5	2,0 ± 0,0	5,5 ± 0,1
<b>Extractibles NDF</b>	21,8 ± 0,5	41,2 ± 0,4	43,4 ± 0,8	42,9 ± 0,6
<b>Composants pariétaux</b>	78,2 ± 0,6	58,8 ± 0,4	56,6 ± 1,0	57,1 ± 0,6
<i>Cellulose</i>	63,7 ± 0,2	30,5 ± 0,3	52,1 ± 0,4	37,0 ± 1,0
<i>Hémicellulose</i>	10,2 ± 1,0	0,7 ± 0,2	2,4 ± 0,6	13,0 ± 1,6
<i>Lignine</i>	4,3 ± 0,3	27,6 ± 0,6	2,2 ± 0,0	7,1 ± 0,1
<b>Lipides</b>	12,5 ± 1,9	0,3 ± 0,1	23,6 ± 0,9	0,7 ± 0,1
<b>Protéines</b>	5,0 ± 0,2	4,2 ± 0,1	12,2 ± 0,1	7,1 ± 0,1
<b>Pectines</b>	nd	5,2 ± 0,1	nd	3,3 ± 0,3

Les graines de fruits de la passion sont plus riches en protéines et en lipides, tandis que les graines de goyavier renferment davantage de constituants pariétaux. Les résidus de pulpe et peaux de goyavier sont particulièrement riches en lignine.

## II.2. Extraction et caractérisation des lipides de graines de goyavier rouge et de fruit de la passion

### II.2.1. Comparaison des différentes méthodes d'extraction des lipides

#### II.2.1.1. Extraction par solvant

Les graines séchées et broyées de goyavier rouge et de fruit de la passion ont été soumises à une extraction par Soxhlet (méthode de référence, voir V.1.2.5.) et par macération à température ambiante sous agitation constante (voir V.2.1.). L'hexane est le solvant de référence autorisé par le référentiel Pure pour l'extraction d'huiles végétales. L'éthanol (96 %) est le solvant alternatif biosourcé qui a été choisi pour sa disponibilité, son éco-compatibilité ainsi que pour son point d'ébullition inférieur à 100°C. Les rendements obtenus pour les deux graines, calculés selon la formule suivante, sont présentés dans le Tableau II-5.

$$r_L = \frac{m_L}{m_g \times MS_g} \times 100$$

Avec  $r_L$  le rendement en lipides,  $m_L$  la masse de lipides filtrée en g,  $m_g$  la masse de graines extraites en g et  $MS_g$  la matière sèche des graines en g/100g.

Tableau II-5: Rendements d'extraction obtenus par Soxhlet et par macération (Ratio S :L = ratio Solide :liquide)

Méthode	Durée (h)	Solvant	Ratio S:L	Rendement d'extraction (g/100g MS)	
				Goyavier	Passion
Soxhlet	4	Hexane	1 : 15	12,5 ± 1,9	23,6 ± 0,9
		Ethanol		10,4 ± 1,2	21,1 ± 2,5
	2	Hexane	10,4 ± 0,4	18,9 ± 0,3	
	4	Hexane	10,6 ± 0,3	20,2 ± 0,8	
Macération	8	Hexane	1 : 20	11,6 ± 1,8	25,7 ± 3,5
		Hexane		15,2 ± 2,1	30,0 ± 1,8
	24	Ethanol		15,6 ± 2,0	19,9 ± 1,4

Les rendements obtenus avec la méthode de référence (extraction par Soxhlet à l'hexane) indiquent que les graines de fruit de la passion sont près de deux fois plus riches en lipides que celles du goyavier. Ces valeurs sont similaires à celles indiquées par Patel [2] pour le goyavier (12 %) et par Barralès *et al.* [3] pour le fruit de la passion (24,7 %) dans des conditions similaires.

Concernant les macérations dans l'hexane à partir des deux fruits, à durée d'extraction égale, les rendements obtenus par macération sont légèrement inférieurs aux rendements par Soxhlet, mais ils sont supérieurs dans le cas des macérations de 24 h. En effet, en prolongeant l'extraction à 24 h, les rendements sont améliorés, ce qui permet d'atteindre des valeurs supérieures à celles obtenues par la méthode de référence : un gain de 2,7 % d'extraits lipidiques pour le goyavier, et un gain de 6,4 % pour le fruit de la passion. Le ratio solide : liquide (= ratio graines : solvant) de 1 : 20 et le temps de mise en contact de 24 h semblent favoriser la diffusion du solvant dans les graines broyées. L'analyse de la teneur en acides gras (sous forme d'esters ou sous forme libre) des échantillons (voir V.3.1.) confirme que les extraits à l'hexane sont entièrement composés de lipides, quelle que soit la méthode d'extraction (Tableau II-6). Ainsi, l'extraction totale du potentiel en lipides est possible sans activation thermique, en ajustant la durée d'extraction et le ratio graines : solvant.

Tableau II-6 : Teneur en lipides neutres et en triglycérides d'acides gras (TAG) des échantillons d'huiles extraites par solvant

Méthode	Solvant	Goyavier		Passion	
		Lipides neutres (g/100g)	TAG (%)	Lipides neutres (g/100g)	TAG (%)
Soxhlet	Hexane	99	97	100	97
	Éthanol	95	94	94	89
Macération (24 h)	Hexane	100	98	100	97
	Éthanol	69	92	91	91

Pour le goyavier, l'éthanol en tant que solvant alternatif conduit à des rendements quasiment similaires à l'hexane pour chacune des méthodes d'extraction : Soxhlet (4 h) ou macération (24 h). La composition des extraits déterminés par CPG-FID indique que la totalité du potentiel en lipides est récupérée, mais aussi la présence d'autres composés (profil chromatographique en Annexe 1). Pour le fruit de la passion, l'extraction au Soxhlet (4 h) par l'éthanol ou par l'hexane conduit à des rendements d'extraction identiques (21,1 – 23,6 %) et à une légère diminution de la teneur en lipides dans les extraits. Toutefois, le rendement en lipides neutres (18,1 %) obtenus par la macération à l'éthanol des graines de fruit de la passion est bien moins important que par la macération à l'hexane (30 %) (profil chromatographique en Annexe 1).

### II.2.1.2. Extraction continue en presse à vis

L'extraction de l'huile avec une presse à vis est le procédé industriel le plus répandu pour les graines oléagineuses. Ce procédé de pressage a été appliqué aux graines séchées entières de fruit de la passion et de goyavier à deux échelles différentes. L'huile des graines a tout d'abord été extraite à l'aide d'une presse à vis (Komet/ Motovario) d'une capacité de production maximale égale à 1 kg d'huile par heure, afin de vérifier la faisabilité de l'extraction par pression (voir V.2.2.). Ensuite, une presse d'une capacité de production maximale égale à 5 kg d'huile par heure (Komet CA59G) a été utilisée pour évaluer la possibilité d'une mise en œuvre industrielle (voir V.2.2.). En accord avec la littérature [4], afin d'optimiser le rendement en huile, le diamètre de filière et la vitesse de vis les plus faibles ont été choisis (Tableau II-7). Le fourreau a également été préchauffé à une température de 80 °C pour faciliter le pressage. Les graines de goyavier présentant une dureté importante ont nécessité une augmentation de leur teneur en eau pour permettre le pressage.

Tableau II-7: Paramètres opératoires de pression des graines de fruit

	Presse Komet/ Motovario				Presse Komet CA59G			
	Vitesse de rotation de la vis (rpm)	Diamètre de filière (mm)	Humidité des graines (g/100g)	Masse sèche graines pressées (g)	Vitesse de rotation de la vis (rpm)	Diamètre de filière (mm)	Humidité des graines (g/100g)	Masse sèche graines pressées (g)
<b>Goyavier</b>	40	6	10,5	1842	40	10	7,5	10661
<b>Passion</b>	40	6	3,3	377	20	10	3,3	2421

Pour les essais sur la presse Komet CA59G, le diamètre de filière a été choisi à 10 mm, pour éviter le blocage de la presse par obstruction (à des diamètres inférieurs). Notons que le pressage des graines de goyavier a nécessité une vitesse de vis de 40 rpm, supérieure à celle fixée pour les fruits de la passion. Pour chaque essai, l'huile obtenue a été filtrée (Whatman 2) pour éliminer les particules fines entraînées lors de l'extraction et la teneur en huile résiduelle du tourteau a été déterminée par extraction Soxhlet à l'hexane (méthode de référence, voir V.1.2.5.). Les rendements d'extraction sont présentés dans le Tableau II-8.

Tableau II-8: Rendements en huile des essais de pressage de graines

	Presse Komet/ Motovario		Presse Komet CA59G	
	Rendement (g/100g MS)	Teneur en huile du tourteau (g/100g MS)	Rendement (g/100g MS)	Teneur en huile du tourteau (g/100g MS)
<b>Goyavier</b>	3,4	5,6 ± 1,0	3,7	6,0 ± 0,4
<b>Passion</b>	4,9	5,0 ± 0,2	19,5	3,5 ± 0,0

Pour le pressage des graines de goyavier, le changement d'échelle n'a pas eu d'influence sur les rendements en huile de pression obtenus, c'est pourquoi, les teneurs en huile résiduelle des tourteaux sont similaires quelle que soit la presse employée.

Pour le fruit de la passion par contre, l'utilisation d'une presse de plus grande capacité a permis de quadrupler le rendement en huile de pression, pour atteindre le rendement obtenu par macération pendant 24 h dans l'éthanol. Dans ce cas, l'amélioration de l'efficacité du pressage est confirmée par une teneur en huile résiduelle plus faible dans le tourteau. Certains auteurs ont remarqué qu'une vitesse de vis réduite augmente la pression exercée sur la matière ce qui permet d'améliorer le rendement en huile [4, 5]. Ce paramètre est en faveur de l'extraction de l'huile de fruit de la passion avec la presse Komet CA59G.

Les rendements en huile par pressage sont inférieurs à ceux obtenus par extraction par solvant, car une partie de l'huile reste piégée dans le tourteau ou dans le volume mort de la presse (entre la vis et le fourreau).

Dans les conditions optimales testées, le pressage des graines de fruit de la passion suivie d'une extraction par solvant du tourteau permet d'extraire plus de 95 % du potentiel en lipides obtenu par la méthode de référence (Soxhlet à l'hexane), alors que pour les graines de goyavier, seulement 74 % du potentiel en lipides est extrait.

### II.2.1.3. Extraction au dioxyde de carbone supercritique (SC-CO<sub>2</sub>)

L'extraction au SC-CO<sub>2</sub> supercritique a été choisie comme procédé alternatif pour l'extraction d'huile végétale à partir des graines de fruit de la passion et de goyavier. L'influence de plusieurs paramètres opératoires sur la cinétique d'extraction et sur le rendement en extrait lipidique a été analysée :

- Le débit de CO<sub>2</sub>,
- La température d'extraction,
- La pression.

#### Détermination des paramètres optimaux

Les essais ont été réalisés à deux valeurs de pressions (150 ou 200 bars), de températures (40 ou 60°C) et de débits de CO<sub>2</sub> (50 ou 100 g/min). La recherche des paramètres optimaux a d'abord été réalisée sur les graines de fruit de la passion, plus riches en lipides. Puis, l'influence de la température a été étudiée sur l'extraction des deux graines. Les conditions opératoires des essais sont récapitulées dans le Tableau II-9. Le suivi cinétique permet d'arrêter l'extraction une fois que la masse d'extrait total extrait est stabilisée et de relever la durée de l'extraction. C'est pour cette raison que les plages de temps du suivi cinétique sont différentes selon les

expériences. Les extractions ont été réalisées sur des lots de graines broyées de 40 g pour le fruit de la passion et 50 g pour le goyavier (voir V.2.3.).

Tableau II-9: Conditions opératoires d'extraction des graines par CO<sub>2</sub> supercritique

Type de graines	Numéro d'expérience	Température (°C)	Pression (bars)	Débit de CO <sub>2</sub> (g/min)	Densité du CO <sub>2</sub> (kg/m <sup>3</sup> )
<i>Fruit de la passion</i>	1	40	150	100	781,3
	2	40	200	100	840,6
	3	40	200	50	840,6
	4	60	200	100	724,6
<i>Goyavier</i>	5	40	200	100	840,6
	6	60	200	100	724,6

Les rendements en extraits lipidiques obtenus au cours du temps pour ces différentes conditions opératoires sont rassemblés sur la Figure II-2.

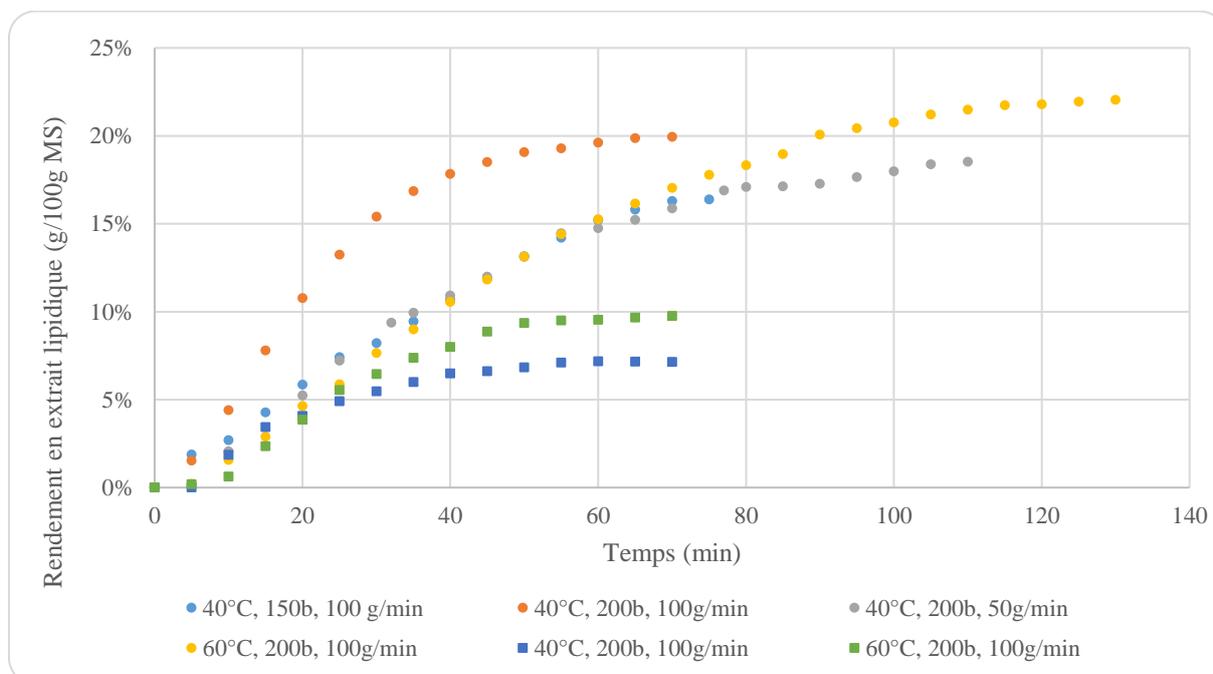


Figure II-2: Influence des conditions expérimentales sur l'extraction des graines de fruit de la passion (●) et de goyavier (■)

Suivant la figure II-2, l'augmentation de la **pression** de 150 à 200 bars (essais 1 et 2) permet d'améliorer le rendement final en extrait (19,9 %) en favorisant la diffusion du CO<sub>2</sub> dans la matière. La cinétique d'extraction est également plus rapide puisque pour atteindre 90% du rendement final en extrait, 45 min à 200 bars sont nécessaires contre 60 min à 150 bars. C'est pourquoi la pression de 200 bars (pression maximale de l'équipement) a été retenue pour poursuivre les essais.

La diminution du **débit** de CO<sub>2</sub> de 100 à 50 g/min (essais 2 et 3) génère un allongement de la durée d'extraction et une diminution du rendement en extrait (18,5 %). Un débit de 100g/min a donc été conservé pour les essais suivants.

Le tracé de la masse d'extrait obtenu en fonction de la quantité de CO<sub>2</sub> consommé (Figure II-3) pour les deux débits permet d'observer deux phases d'extraction. Dans la première phase (entre 0 et 3 kg de CO<sub>2</sub>), les deux courbes se superposent et sont quasi-linéaires, indiquant que le procédé est uniquement contrôlé par la solubilité de l'extrait lipidique dans le solvant. La pente de ce tronçon permet de déterminer une valeur approximative de 2,2 g/kg CO<sub>2</sub> pour la solubilité de l'huile de fruit de la passion à 200 bars, 40 °C [6]. Dans la seconde phase non linéaire (> 3 kg de CO<sub>2</sub>), le procédé est alors contrôlé par le transfert de matière.

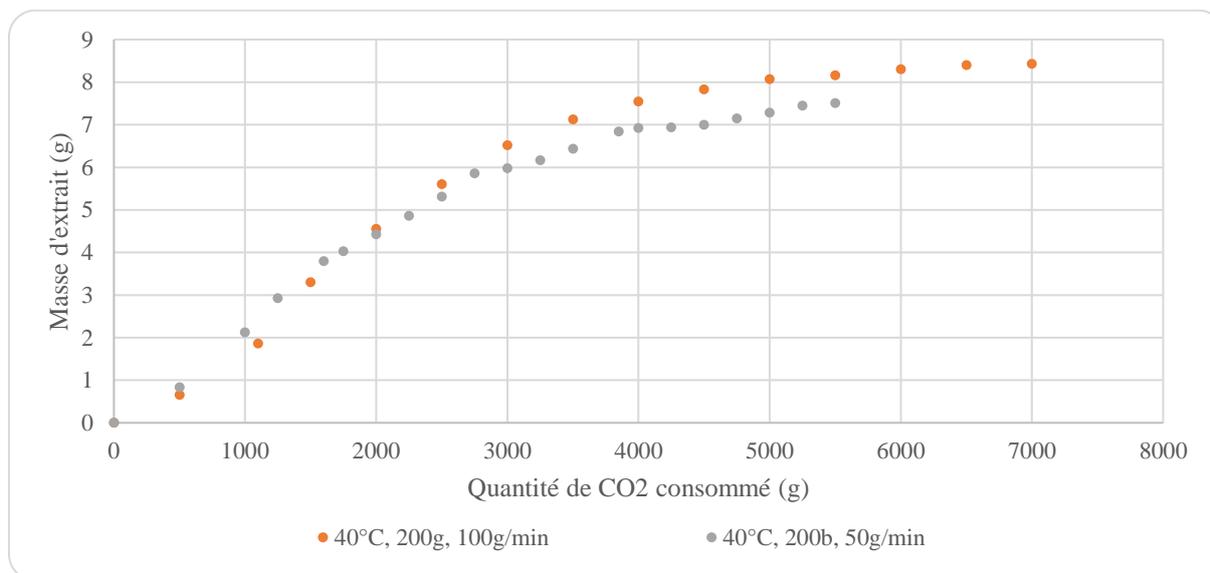


Figure II-3: Masse totale d'extrait de graines de fruit de la passion en fonction de la quantité de CO<sub>2</sub> consommée pour des débits de 50 et 100 g/min

La figure II-2 montre également qu'un changement de **température** de 40 à 60 °C (essais 2 et 4 pour le fruit de la passion, 5 et 6 pour le goyavier) permet d'augmenter les rendements finaux en extrait pour les deux graines. D'après les Figures II-2 et II-4, pour le fruit de la passion, la solubilité de l'huile dans le CO<sub>2</sub> à 60 °C (1,1 g/kg CO<sub>2</sub>) étant réduite de moitié par rapport à celle à 40 °C, la phase première phase d'extraction contrôlée par la solubilité est plus longue à 60 °C. Par contre, pour le goyavier, la valeur de solubilité de l'huile égale à 1,0 g/kg CO<sub>2</sub> (200 b, 100 mg/min) est peu sensible à cette variation de température (Figure II-4). Pour les deux graines, à 60 °C, la quantité finale d'extrait lipidique est supérieure, avec une cinétique plus longue pour le fruit de la passion.

Le paramètre d'optimisation principal étant le rendement en lipides, la température choisie est 60°C.

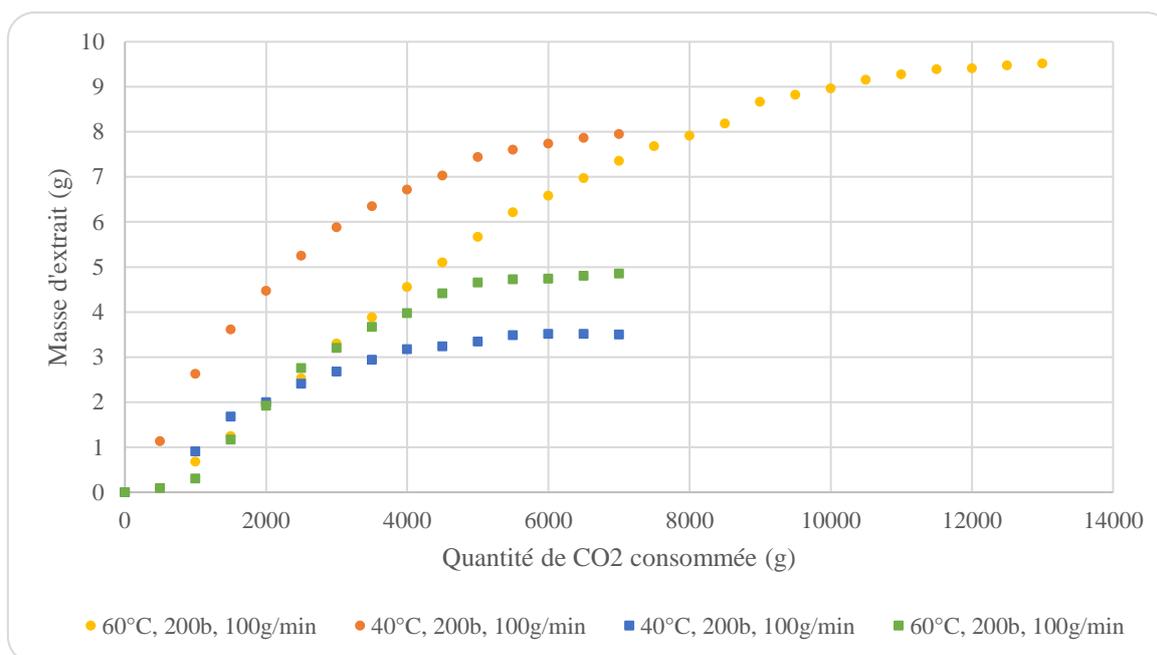


Figure II-4: Masse totale d'extrait en fonction de la quantité de CO<sub>2</sub> consommée pour le fruit de la passion (•) et le goyavier (▪) à 40 °C et 60 °C

### Comparaison des performances de l'extraction SC-CO<sub>2</sub>

Après variation des paramètres opératoires, les conditions sélectionnées (60 °C, 200 bars, 100 g/min) conduisent aux performances d'extraction présentées dans le Tableau II-10.

Tableau II-10: Performances de l'extraction avec le CO<sub>2</sub> supercritique à 60 °C, 200 bars et 100 g/min

	<i>Goyavier</i>	<i>Passion</i>
<b>Rendement (g/100g MS)</b>	9,8 ± 0,2	22,6 ± 0,6
<b>Durée de l'extraction (min)</b>	70	130
<b>CO<sub>2</sub> consomme (L)</b>	5,1	9,4

Appliquées aux graines de fruit de la passion, ces conditions permettent d'extraire 91,5 % du potentiel en lipides extraits par la méthode de référence (Soxhlet à l'hexane), pour une durée divisée par deux. Zahedi *et al.* ont obtenu un rendement de 24,4 % pour une extraction à 60 °C et 200 bars avec une quantité plus importante de graines [7].

L'extraction des graines de goyavier avec le CO<sub>2</sub> supercritique a permis de récupérer 76,8 % du potentiel en lipides avec une quantité de solvant proportionnellement plus faible. Lors du broyage des graines de goyavier, 43 % des particules obtenues sont de taille supérieure à 1,25 mm contre 27 % pour les graines de fruit de la passion. Les travaux de Kiriamiti [6] sur l'extraction de graines de tournesol au CO<sub>2</sub> supercritique ont montré que la finesse du broyage influence positivement le rendement en lipides grâce à l'augmentation de la surface de contact solvant-soluté. L'optimisation de l'étape de broyage pour obtenir davantage de particules de tailles inférieures à 1,25 µm pourrait donc permettre d'améliorer le rendement en huile, en particulier à partir des graines de goyavier.

## II.2.2. Influence de la méthode d'extraction sur les propriétés physico-chimiques des huiles

L'influence de la méthode d'extraction sur les propriétés physico-chimiques des huiles est basée sur les caractéristiques suivantes :

- La composition en acides gras, déterminante pour une utilisation des huiles en peinture,
- L'indice d'acide, ayant une influence sur le comportement de l'huile en formulation,
- La teneur en caroténoïdes, comme indicateur des propriétés antioxydantes.

### II.2.2.1. Profil d'acides gras

La composition en acides gras des huiles de goyavier rouge et de fruit de la passion déterminée par chromatographie en phase gazeuse est présentée dans le Tableau II-11 (voir V.3.2.). Le profil en acides gras obtenu est similaire indépendamment de la méthode d'extraction mise en œuvre (solvant, pression et SC-CO<sub>2</sub>). Ainsi, seules les valeurs moyennes obtenues pour les trois types d'extraction sont indiquées (profil chromatographique en Annexe 1).

Tableau II-11: Compositions en acides gras des huiles de goyavier rouge et de fruit de la passion

	<b>Goyavier</b>	<b>Passion</b>
<i>Acide palmitique</i> (C16 :0)	7,4 ± 0,1	9,4 ± 0,1
<i>Acide stéarique</i> (C18 :0)	4,1 ± 0,1	2,5 ± 0,1
<i>Acide oléique</i> (C18 :1, n-9)	9,7 ± 0,2	16,6 ± 0,3
<i>Acide linoléique</i> (C18 :2, n-6)	78,3 ± 0,2	70,9 ± 0,5
<i>Acide α-linolénique</i> (C18:3, n-3)	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0

Les huiles extraites par la méthode de référence (Soxhlet à l'hexane) présentent la même composition en acides gras que les échantillons extraits par pression ou CO<sub>2</sub> supercritique. Le solvant ou les conditions opératoires appliquées aux graines n'ont donc pas d'influence sur le profil en acides gras. Cette observation est en accord avec les résultats de Barralès *et al.* [3] sur la caractérisation de l'huile de fruit de la passion extraite par Soxhlet et CO<sub>2</sub> supercritique.

L'acide linoléique (C18 :2, n-6), acide gras polyinsaturé majoritaire dans les deux huiles, représente 78 % des acides gras totaux pour le goyavier, et 71 % pour le fruit de la passion. L'huile de fruit de la passion est plus riche en acide oléique (C18 :1, n-9) mais les deux huiles ont un taux d'acides gras insaturés total identique de 88 %. Les profils en acides gras obtenus sont similaires à ceux reportés par Biegelmeier *et al.* [8] pour le goyavier, et de Santana *et al.* [9] pour le fruit de la passion.

Parmi les huiles fréquemment utilisées en peinture, les huiles de goyavier et de fruit de la passion ont des compositions en acides gras proches de celle de l'huile de tournesol, majoritairement constituée d'acide linoléique (62 à 70 %) et d'acide oléique (15 à 25 %) [10]. Les indices d'iode des deux huiles extraites de ces co-produits végétaux tropicaux sont proches de celui de l'huile de tournesol compris entre 125 et 144 (Tableau II-12) (voir V.3.3.). Les huiles de goyavier et de fruit de la passion sont donc semi-siccatives, et possiblement adaptées à une utilisation en tant que liant dans la formulation d'une peinture naturelle.

Tableau II-12: Indices d'iode des huiles de goyavier et de fruit de la passion

	Goyavier	Passion	Tournesol [11]	Chanvre [11]	Lin [11]
Indice d'iode (g <sub>2</sub> /100g)	139 ± 2	136 ± 2	125 - 144	140 - 170	170 - 204

### II.2.2.2. Indice d'acide

L'indice d'acide des huiles est souvent utilisé comme indicateur de la qualité d'une huile, en particulier dans le domaine alimentaire. La Commission du Codex Alimentarius fixe à 4 mg KOH/g la valeur maximale pour une huile alimentaire [12].

Les indices d'acides des échantillons d'huiles de goyavier et de fruit de la passion ont été déterminés par dosage acido-basique (voir V.3.4.) (Tableau II-13).

Tableau II-13: Indice d'acides (en mg<sub>KOH</sub>/g) des huiles de goyavier et de fruit de la passion extraites par pression (P), Soxhlet à l'hexane (SH), Soxhlet à l'éthanol (SE), macération à l'hexane (MH), macération à l'éthanol (ME), et CO<sub>2</sub> supercritique (SC-CO<sub>2</sub>)

Méthode d'extraction	P	SH	SE	MH	ME	SC-CO <sub>2</sub>
Goyavier	1,8 ± 0,5	2,8 ± 0,1	7,9 ± 0,5	2,3 ± 0,2	5,7 ± 0,7	2,4 ± 0,0
Passion	0,9 ± 0,1	1,7 ± 0,3	4,1 ± 0,3	1,3 ± 0,2	7,5 ± 0,5	1,1 ± 0,0

La majorité des huiles extraites par les différentes techniques présentent des indices d'acide inférieurs à la limite du Codex Alimentarius (< 4 mg KOH/g), exceptées pour les huiles extraites avec l'éthanol comme solvant, aussi bien par Soxhlet que par macération. Leur indice d'acide plus élevé, jusqu'à 7,5 pour l'huile de fruit de la passion extraite par macération à l'éthanol et jusqu'à 7,9 pour l'huile de goyavier extraite par Soxhlet à l'éthanol, indique que l'éthanol (plus polaire que l'hexane) est un solvant qui conduit à une extraction plus importante des acides gras libres contenus dans les graines ou à une altération de l'huile. Le profil glycéridique des échantillons confirme la présence d'une quantité d'acides gras libres plus importante dans les extraits éthanoliques (voir V.3.1.) (profil chromatographique en Annexe 1).

Comme attendu, les huiles extraites par pression ont les indices d'acides les plus faibles. Les échantillons de fruit de la passion possèdent des indices d'acide plus faibles que les huiles de goyavier, sauf pour la macération dans l'éthanol, qui a donné lieu à un rendement d'extraction élevé en acides gras libres. Notons que la présence d'acides gras libres n'est pas problématique pour la formulation des peintures. Ces molécules aux propriétés émulsifiantes peuvent même contribuer à stabiliser la formulation.

### II.2.2.3. Teneurs en caroténoïdes

La présence de caroténoïdes confère des propriétés anti-oxydantes aux huiles végétales. Les teneurs en caroténoïdes (exprimées en mg équivalent de  $\beta$ -carotène par kilo) des différents échantillons d'huiles, déterminées par dosage spectrophotométrique (voir V.3.5.), sont présentées dans le Tableau II-14.

Tableau II-14: Teneurs en caroténoïdes des huiles de goyavier et de fruit de la passion extraites par pression (P), Soxhlet à l'hexane (SH), Soxhlet à l'éthanol (SE), macération à l'hexane (MH), macération à l'éthanol (ME), et CO<sub>2</sub> supercritique (SC-CO<sub>2</sub>)

	Extraction	P	SH	SE	MH	ME	SC-CO <sub>2</sub>
Goyavier	Caroténoïdes (mg eq. $\beta$ carotène/kg)	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	nd	4,3 ± 0,3	nd	2,6 ± 0,0
	Couleur	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune	Orange	Jaune
Passion	Caroténoïdes (mg eq. $\beta$ carotène/kg)	8,6 ± 0,0	25,9 ± 0,1	nd	9,2 ± 0,2	nd	3,2 ± 0,2
	Couleur	Jaune orangé	Orange	Jaune orangé	Jaune orangé	Brun	Jaune

La macération à l'éthanol conduit aux huiles les plus colorées (orange dans le cas du goyavier et brun pour le fruit de la passion), mais dont les teneurs en caroténoïdes n'ont pas pu être déterminées pour des raisons d'insolubilité des extraits éthanoliques dans le solvant utilisé pour le dosage par la méthode spectrophotométrique : l'*iso*-hexane. Les comparaisons porteront donc uniquement sur les huiles extraites par pression, par SC-CO<sub>2</sub> et par Soxhlet ou macération à l'hexane.

Pour le goyavier, les teneurs en caroténoïdes dans l'huile sont faibles et dépendent relativement peu de la méthode d'extraction : les teneurs varient de 2,6 à 4,3 mg éq.  $\beta$ -carotène/kg d'huile. Les huiles extraites par la méthode de référence (Soxhlet à l'hexane) et par pression renferment 3 mg éq.  $\beta$ -carotène/kg d'huile et présentent une couleur jaunâtre.

Pour le fruit de la passion, les teneurs en caroténoïdes dans les huiles extraites sont nettement plus élevées et les valeurs sont très dépendantes de la méthode d'extraction. L'huile la plus riche en caroténoïdes (26 mg éq.  $\beta$ -carotène/kg) est obtenue par l'extraction au Soxhlet à l'hexane, correspondant à une coloration jaune-orangée soutenue. Le Soxhlet à l'hexane est une technique d'extraction reconnue pour isoler les caroténoïdes apolaires lipophiles, et plus particulièrement le lycopène et le  $\beta$ -carotène [13]. Lors de précédents travaux, ces deux molécules ont été identifiées dans des fruits de la passion (var. *flavicarpa*) originaires du Brésil avec 11 autres caroténoïdes [14].

Les échantillons d'huile extraite par CO<sub>2</sub> supercritique présentent une coloration plus faible et conduisent à des teneurs plus faibles en caroténoïdes. D'autres auteurs ont également décelé des teneurs en caroténoïdes plus faibles pour les huiles extraites au CO<sub>2</sub> supercritique à partir d'autres graines oléagineuses [15, 16]. Ainsi, un co-solvant tel que l'éthanol est le plus souvent

utilisé pour favoriser l'extraction supercritique des caroténoïdes, et plus particulièrement pour l'extraction des composés polaires [13].

Les huiles végétales les plus couramment utilisées en peinture (chanvre, lin, tournesol) sont le plus souvent extraites par pression. La teneur en caroténoïdes de l'huile de fruit de la passion étant fortement dépendante de la méthode d'extraction, seuls les échantillons extraits avec la même technique sont comparés ici. Dans le cas d'une extraction par pression, les huiles de goyavier et de fruit de la passion sont plus riches en caroténoïdes que les huiles de lin et de chanvre [17]. L'huile de goyavier présente une teneur en caroténoïdes similaire à celle de l'huile de tournesol [18].

Ferreira *et al.* ont montré qu'une teneur élevée en caroténoïdes, et notamment en  $\beta$ -carotène, peut être associée à une activité antioxydante prononcée, comme mis en évidence pour l'huile extraite de fruit de la passion (*P. edulis flavicarpa*) [19].

### II.2.3. Composition des fractions insaponifiables

L'objet de cette partie est de réaliser une extraction de l'huile des graines dédiée à l'analyse des stérols et des tocophérols de la partie insaponifiable.

Des échantillons d'huile ont été préparés par extraction à froid au cyclohexane juste avant l'analyse des stérols et des tocophérols afin de préserver les composés. Pour se faire, les graines broyées ont subi trois centrifugations successives (5 min à 10000 g) dans du cyclohexane à 5°C. Les échantillons d'huile sont obtenus après rassemblement des 3 fractions et évaporation du solvant (voir V.3.6.).

Pour le dosage des stérols, les échantillons d'huile sont saponifiés à chaud dans une solution éthanolique de soude (1M). L'ajout de cyclohexane et d'eau permet ensuite de récupérer la fraction insaponifiable en phase organique après décantation.

#### II.2.3.1. Composition en stérols

Les phytostérols sont utilisés dans les domaines pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques pour leurs propriétés pharmacologiques, antioxydantes, nutritionnelles et émulsifiantes [20]. La présence de phytostérols dans les huiles végétales participe à leur conservation et contribue à leur mise en émulsion.

La composition en stérols, déterminée par chromatographie en phase gazeuse selon la méthode de Roche *et al.* [21] (voir V.3.6.), est présentée dans le Tableau II-15 (profil chromatographique en Annexe 1). On constate tout d'abord que l'huile de goyavier est plus riche en stérols que l'huile de fruit de la passion. La teneur totale en stérols de l'huile de fruit de la passion est supérieure aux valeurs indiquées dans la littérature (200 à 300 mg/100g) pour des graines de fruits jaunes (var. *Flavicarpa*) et violets (var. *Sims*) récoltés au Kenya ou au Brésil [9, 22, 23]. Cependant, comme l'ont indiqué certains auteurs, pour une même espèce végétale, les teneurs totales en phytostérols peuvent varier en fonction de l'origine géographique ou des conditions de culture [24, 25].

Tableau II-15: Composition en stérols en mg/100 g des huiles de goyavier rouge et de fruit de la passion

	<i>Goyavier</i>		<i>Fruit de la passion</i>	
	<i>Teneur en mg/100g</i>	<i>Proportion</i>	<i>Teneur en mg/100g</i>	<i>Proportion</i>
<i>Campesterol</i>	17,7± 0,2	3,4	38,7 ± 0,4	11,1
<i>Stigmasterol</i>	8,9 ± 0,4	1,7	98,6 ± 0,1	28,3
<i>β-sitosterol</i>	400,2 ± 0,6	77,8	157,5 ± 0,6	45,2
<i>Δ5 avenasterol</i>	46,2 ± 1,8	9,0	18,5 ± 0,2	5,3
<i>Δ7 stigmasterol</i>	2,6 ± 0,4	0,5	7,1 ± 1,5	2,0
<i>Δ7 avenasterol</i>	7,5 ± 0,2	1,5	9,4 ± 0,2	2,7
<i>Cycloartenol</i>	13,8 ± 0,7	2,7	nd	
<i>Methylene cycloartanol</i>	14,2 ± 0,7	2,8	8,9 ± 0,1	2,6
<i>Citrostadienol</i>	3,3 ± 0,3	0,6	9,6 ± 0,3	2,8
<i>Teneur totale</i>	514,4 ± 3,9	100	348,2 ± 3,1	100

Ensuite, comparées aux huiles de lin et de chanvre, l'huile de goyavier présente des teneurs particulièrement élevées en β-sitostérol (78% des stérols totaux) et en Δ5 avenasterol (9 %). De même, l'huile de fruit de la passion se distingue par des teneurs en β-sitosterol (45 %), stigmasterol (28 %) et campesterol (11 %) plus élevées que celles de l'huile de lin et de chanvre [26]. Ces molécules aux propriétés émulsifiantes et antioxydantes peuvent contribuer à stabiliser la formulation des peintures écologiques. La présence de phytostérols rares, tels que le Δ7 stigmasterol, le Δ7 avenasterol, le methylene cycloartanol et le citrostadienol, est également à noter dans les deux huiles.

### II.2.3.2. Composition en tocophérols

Les tocophérols, en synergie avec les autres composés antioxydants des huiles, tels que les caroténoïdes ou les polyphénols, permettent d'améliorer la stabilité des huiles face à l'oxydation et donc de prolonger leur conservation [27].

Les tocophérols présents dans les huiles ont été quantifiés par HPLC (voir V.3.7.) (Tableau II-16). Les deux huiles présentent des teneurs totales en tocophérols proches de 20 mg/100g d'huile (soit 200 ppm). Pour le fruit de la passion, le γ-tocophérol (64%) est le composé majoritaire trouvé dans notre échantillon, suivi du δ- et de l'α-tocophérol (22 et 14%, respectivement). On note une certaine variabilité dans les compositions en tocophérols de cette huile selon les études, avec des teneurs totales variant de 46 - 49 mg/100g [23, 28] à 80 - 89 mg/100g [9]. Ces variations peuvent être fonction de la variété (jaune ou pourpre), de l'origine géographique (la majorité des études sont réalisées sur des fruits provenant du Brésil ou du Kenya) ou encore du prétraitement et/ou des conditions d'entreposage des graines.

Pour le goyavier, l'α-tocophérol (60 %) est majoritaire suivi du γ-tocophérol (27 %). Ces deux isomères sont d'ailleurs les formes les plus courantes identifiées dans les huiles végétales [29].

Tableau II-16: Teneurs en tocophérols en mg/100g des huiles de goyavier rouge et de fruit de la passion

	<b>Goyavier</b>	<b>Fruit de la passion</b>
<i><b>α-tocophérol</b></i>	13.7 (60 %)	2.5 (14 %)
<i><b>γ-tocophérol</b></i>	6.2 (27 %)	11.3 (64 %)
<i><b>δ-tocophérol</b></i>	2.9 (13 %)	3.9 (22 %)
<b>Teneur totale</b>	22.8	17.7

Les teneurs totales en tocophérols des deux huiles de co-produit (20 mg/100g) sont plus faible que celle de l'huile de lin (44-59 mg/100g) ou de l'huile de chanvre (77-80 mg/100 g) [26]. Il est possible que les étapes de séchage des graines à 50 °C et leur stockage pendant plusieurs mois aient contribué à la dégradation des tocophérols, comme montré par Lavedrine *et al.* [30].

#### II.2.4. Bilan sur l'extraction des huiles végétales

Différentes méthodes d'extraction des lipides à partir des co-produits végétaux ont été mises en œuvre : par simple pression à froid, par extraction conventionnelle au solvant, ou par fluide supercritique. Les performances de solvants alternatifs à l'hexane, tels que l'éthanol et le SC-CO<sub>2</sub>, capables de réduire les impacts environnementaux et sanitaires liés aux procédés classiques d'extraction chimique, ont été étudiées et comparées dans le Tableau II-17.

Tableau II-17 : Rendements d'extraction obtenus par Soxhlet, par macération 24h, par pression (presse CA59G), et par CO<sub>2</sub> supercritique (60 °C, 200 bars, 100 g/min)

<b>Méthode</b>	<b>Solvant</b>	<b>Rendement (g/100g MS)</b>	
		<i>Goyavier</i>	<i>Passion</i>
<b>Soxhlet</b>	<i>Hexane</i>	12,5 ± 1,9	23,6 ± 0,9
	<i>Ethanol</i>	10,4 ± 1,2	21,1 ± 2,5
<b>Macération</b>	<i>Hexane</i>	15,2 ± 2,1	30,0 ± 1,8
	<i>Ethanol</i>	15,6 ± 2,0	19,9 ± 1,4
<b>Pression</b>	/	3,7	19,5
<b>Supercritique</b>	<i>SC-CO<sub>2</sub></i>	9,6 ± 0,2	21,6 ± 0,6

L'éthanol semble être adapté comme solvant de substitution à l'hexane et présente l'avantage de fournir des extraits lipidiques plus riches en acides gras libres pouvant faciliter la mise en émulsion.

Pour le goyavier, si on veut éviter l'utilisation de l'hexane, la macération à l'éthanol et l'extraction en SC-CO<sub>2</sub> sont des techniques efficaces. Des conditions d'extraction par pression satisfaisantes n'ont pas pu être identifiées du fait de la dureté élevée de ces graines.

Pour le fruit de la passion, comme alternative à l'utilisation de l'hexane, l'extraction par pression et l'extraction par SC-CO<sub>2</sub> ont donné de bons résultats en termes de rendements en extraits. En effet, la nature des graines (dureté, tailles des graines et tailles des particules après broyage) les rend sensibles aux techniques d'extraction mettant en œuvre des contraintes mécaniques et physiques. L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique présente l'avantage d'être rapide, de fournir des extraits sans trace de solvant et permet d'extraire jusqu'à 91 % du potentiel en lipides pour le fruit de la passion. L'extraction par pression de ces mêmes graines fournit une huile riche en caroténoïdes.

Par conséquent, les deux huiles sont extractibles grâce à des méthodes adaptées au référentiel d'exigence concernant les ingrédients de peintures naturelles (Label Pure).

Les propriétés physico-chimiques des huiles extraites des co-produits de goyavier rouge et de fruit de la passion répondent ainsi au référentiel d'exigences pour une utilisation en formulation dans des peintures naturelles. En effet, les deux huiles sont semi-siccatives et composées à plus de 70 % d'acide linoléique (C18:2, *n*-6), indiquant une capacité de séchage par polymérisation oxydative similaire à celle de l'huile de tournesol. La teneur en acides gras libres peut être ajustée en fonction de la méthode d'extraction. Les teneurs en antioxydants (caroténoïdes, phytostérols, tocophérols) confèrent aux deux huiles une stabilité anti-oxydante intéressante, compatible a priori avec les exigences d'un séchage oxydatif. Les teneurs en stérols plutôt élevées pour les deux huiles sont appropriées pour la stabilité des émulsions à réaliser.

### **II.3. Extraction, purification et caractérisation de fractions aux propriétés antioxydantes**

#### ***II.3.1. Sélection d'une méthode d'extraction de substances naturelles actives***

Les co-produits végétaux séchés et broyés, tels que les peaux de carambole, de papaye, de banane, de patate douce et de manioc, les pépins de tangors, et les pulpes de goyavier ont été soumis à deux types d'extraction en utilisant l'acétone comme solvant : une macération à froid de 24 heures (voir V.4.1.), et une extraction accélérée par solvant (ASE) consistant en trois cycles d'extraction de 5 minutes à 80 °C sous pression d'azote (voir V.4.2.). Les rendements obtenus sont présentés dans le Tableau II-18 et ont été calculés selon la formule suivante :

$$r_E = \frac{m_E \times MS_E}{m_{MP} \times MS_{MP}} \times 100$$

Avec  $r_E$  le rendement en extraits actifs,  $m_E$  la masse d'extraits actifs récupérés en g,  $MS_E$  la matière sèche de l'extrait actif en g/100g,  $m_{MP}$  la masse de matière première (co-produit) mise en œuvre en g, et  $MS_{MP}$  la matière sèche de la matière première en g/100g.

Tableau II-18: Rendements obtenus pour les extractions par ASE et macération à froid à l'acétone des différents co-produits végétaux

Co-produits		ASE		Macération	
		Rendement (g MS <sub>E</sub> /100g MS <sub>MP</sub> )	MS extrait (g/100g)	Rendement (g MS <sub>E</sub> /100g MS <sub>MP</sub> )	MS extrait (g/100g)
<b>Tangor</b>	Pépins	21,1 ± 1,9	0,65 ± 0,01	4,9 ± 0,3	0,77 ± 0,06
<b>Carambole</b>	Peau	10,1 ± 1,4	0,31 ± 0,04	5,1 ± 0,3	0,79 ± 0,05
<b>Tangor</b>	Peau	9,1 ± 0,0	0,26 ± 0,00	5,7 ± 0,4	0,89 ± 0,05
<b>Goyavier</b>	Pulpe et peau	8,6 ± 1,9	0,19 ± 0,05	6,2 ± 1,1	0,96 ± 0,17
<b>Banane</b>	Peau	4,5 ± 0,5	0,14 ± 0,02	4,2 ± 0,4	0,32 ± 0,04
<b>Papaye</b>	Peau	3,3 ± 0,2	0,10 ± 0,01	2,9 ± 0,4	0,49 ± 0,05
<b>Patate douce</b>	Peau	2,0 ± 0,1	0,06 ± 0,00	2,3 ± 0,4	0,36 ± 0,07
<b>Manioc</b>	Peau	1,0 ± 0,0	0,03 ± 0,00	1,7 ± 0,6	0,27 ± 0,09

D'après le Tableau II-18, les rendements d'extraction en extraits actifs obtenus en ASE sont supérieurs ou égaux à ceux obtenus en macération. La capacité d'extraction accrue des substances naturelles par l'acétone en utilisant la technique ASE s'explique par l'augmentation de la solubilité des composés dans l'acétone sous l'effet de la température et de la pression. La différence la plus importante entre les deux méthodes est observée pour les pépins de tangors, avec un rendement quintuplé en ASE (21,1 %), probablement dû à l'extraction d'huile et d'autres molécules lipophiles par l'acétone à chaud. Les extraits les plus riches sont ceux obtenus à partir des co-produits suivants : pépins et peaux de tangors (avec 21 % et 9 % de rendement en extraits actifs, respectivement), carambole (10 %) et goyavier (8,6 %).

Les extraits de peaux de carambole et de manioc obtenus en ASE présentent des teneurs en polyphénols nettement plus élevées que celles obtenues par macération des mêmes coproduits, associées à des activités antioxydantes plus prononcées (Tableau II-19). Les extraits de goyavier et de tangors (peau) montrent également des teneurs en polyphénols plus élevées en ASE, mais avec des activités antioxydantes plus faibles qu'en macération. Pour les autres co-produits les teneurs en polyphénols sont similaires pour les deux techniques.

Tableau II-19: Teneur en polyphénols totaux et activité antioxydante des extraits obtenus par ASE et macération à l'acétone

Co-produit		ASE		Macération	
		Polyphénols (g GAE/ 100g MS <sub>E</sub> )	IC <sub>50</sub> (mg/L)	Polyphénols (g GAE/ 100g MS <sub>E</sub> )	IC <sub>50</sub> (mg/L)
<i>Goyavier</i>	Pulpe et peau	13,0 ± 0,7	83 ± 1	10,5 ± 0,3	53 ± 2
<i>Carambole</i>	Peau	5,4 ± 0,4	105 ± 3	1,7 ± 0,3	350 ± 6
<i>Patate douce</i>	Peau	4,3 ± 1,0	115 ± 2	4,3 ± 0,2	128 ± 5
<i>Manioc</i>	Peau	7,3 ± 1,0	306 ± 5	2,0 ± 0,4	975 ± 46
<i>Tangor</i>	Peau	6,1 ± 0,5	650 ± 5	3,6 ± 0,5	625 ± 7
<i>Banane</i>	Peau	1,2 ± 0,4	2412 ± 31	1,3 ± 0,1	1971 ± 60
<i>Papaye</i>	Peau	0,9 ± 0,2	3774 ± 59	0,7 ± 0,0	2516 ± 45
<i>Tangor</i>	Pépin	0,3 ± 0,1	4229 ± 154	0,1 ± 0,0	9680 ± 276

\*GAE : équivalent en acide gallique ; IC<sub>50</sub> : concentration d'échantillon nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH ; MS<sub>E</sub> : matière sèche de l'extrait

L'absence de corrélation entre la teneur totale en polyphénols et l'IC<sub>50</sub> peut s'expliquer par la présence de composés antioxydants non phénoliques, par une synergie entre les composés ou par l'activité antioxydante dominante de certains polyphénols [31]. Le test Folin-Ciocalteu utilisé pour la détermination de la teneur totale en polyphénols peut également surestimer la teneur en phénols en détectant d'autres composés non phénoliques tels que des protéines, des vitamines ou des polysaccharides [32].

Parmi les extraits acétoniques analysés, l'extrait actif obtenu des co-produits de goyavier rouge présente la plus forte teneur en polyphénols (10.5 – 13.0 g GAE/ 100g MS d'extrait) et l'activité antioxydante la plus prononcée (IC<sub>50</sub> de 53 mg/L pour l'extrait obtenu par macération).

Pour satisfaire aux critères du label Pure, l'éthanol (96 %) a été utilisé comme solvant alternatif en remplacement de l'acétone pour l'extraction d'ingrédients actifs pour peintures naturelles. Les essais d'extraction par ASE à l'éthanol ont été réalisés essentiellement avec le co-produit de goyavier (présentant l'activité antioxydante la plus prononcée).

Tableau II-20: Influence du solvant sur l'extraction des composés actifs par ASE à partir de pulpe et de peaux de goyavier

	Acétone	Ethanol
<b>Rendement (g MS<sub>E</sub>/100g MS<sub>MP</sub>)</b>	8,6 ± 1,9	24,3 ± 0,0
<b>MS de l'extrait (g/100g)</b>	0,19 ± 0,05	0,52 ± 0,06
<b>Polyphénols totaux (g GAE/100g MS<sub>E</sub>)</b>	13,0 ± 0,7	10,1 ± 0,1
<b>IC<sub>50</sub> (mg/L)</b>	83 ± 1	34 ± 1

D'après le Tableau II-20, l'extraction à l'éthanol permet de tripler le rendement en extraits actifs, grâce notamment à l'extraction accrue des sucres. Les analyses des extraits éthanoliques présentées dans le paragraphe suivant II.3.2 montrent en effet une teneur élevée en

polysaccharides. La teneur en polyphénols est plus élevée avec l'acétone mais l'extrait éthanolique montre une activité antioxydante accrue. Ce résultat pourrait s'expliquer par un phénomène de synergie existant entre les composés de l'extrait éthanolique menant à une activité antioxydante prononcée. De précédents travaux ont en effet observé une activité antioxydante renforcée de l'acide ascorbique en milieu éthanolique en présence d'acides organiques tels que l'acide citrique ou l'acide aconitique [33, 34], et la vitamine C et l'acide citrique font partie des composés identifiés dans des extraits de goyavier (Tableau I-11). La nature des composés phénoliques extraits en fonction du solvant pourrait également expliquer cette absence de corrélation entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante [31].

Le rendement obtenu et les caractéristiques de l'extrait éthanolique montrent que l'éthanol est un solvant adapté pour l'obtention d'extraits actifs.

Les performances des extractions éthanoliques impliquant différentes techniques d'extraction (extraction au reflux au Soxhlet (voir V.4.3.) ou au Fibertec (voir V.4.4.), par ASE (à 80°C et sous pression) et par macération à froid) ont été comparées dans le Tableau II-21, toujours à partir de pulpe de goyavier. Le Fibertec est un dispositif comprenant des creusets filtrants permettant de réaliser à la fois la mise en contact, l'extraction et la filtration d'une matière.

Tableau II-21: Résultats des extractions éthanoliques à partir de pulpe de goyavier

	ASE (3x 5 min)	Fibertec (1 h)	Soxhlet (4 h)	Macération (24 h)
<b>Rendement (g MS<sub>E</sub>/100g MS<sub>MP</sub>)</b>	24,3 ± 0,0	17,2 ± 0,9	16,7 ± 0,6	10,5 ± 0,1
<b>MS de l'extrait (g/100g)</b>	0,52 ± 0,06	0,14 ± 0,02	1,04 ± 0,09	1,28 ± 0,08
<b>Polyphénols totaux (g GAE/100g MS<sub>E</sub>)</b>	10,1 ± 0,1	9,3 ± 0,3	6,9 ± 0,4	2,5 ± 0,8
<b>IC<sub>50</sub> (mg/L)</b>	34 ± 1	59 ± 2	74 ± 4	107 ± 3

L'extraction éthanolique par ASE permet d'obtenir le rendement en extraits actifs le plus élevé (24,3 %), l'extrait le plus riche en polyphénols (10,1 g GAE/100g MS d'extrait) et le pouvoir antioxydant le plus prononcé (IC<sub>50</sub> : 34 mg/L). La macération conduit à un rendement en extraits actifs moindre par rapport aux autres extractions. La différence de rendement en extraits actifs entre l'extraction ASE et la macération à l'éthanol est plus importante que pour les extractions à l'acétone (Tableau II-19).

En comparaison, l'extraction au reflux au Fibertec conduit à un rendement en extraits actifs relativement intéressant (17,2 %) et l'extrait obtenu renferme une teneur relativement élevée en polyphénols (9,3 g GAE/100g MS d'extrait ; IC<sub>50</sub> : 59 mg/L). Ainsi, pour obtenir une quantité importante d'extraits riches en composés antioxydants en peu de temps (une heure), l'extraction à reflux à l'éthanol au Fibertec est un choix intéressant. Cette méthode d'extraction rapide et efficace a été sélectionnée pour la suite des expérimentations.

### II.3.2. Extraction et caractérisation de fractions actives

Une extraction à reflux à l'éthanol (96 %) au Fibertec a été appliquée aux différents co-produits. Une extraction aqueuse en utilisant le même procédé à reflux a également été mise en œuvre à titre de comparaison et les résultats sont reportés au Tableau II-22 (voir V.4.4.).

Tableau II-22: Rendements d'extraction éthanolique et aqueuse en extraits actifs obtenus au Fibertec (à reflux)

Co-produit		Ethanol		Eau	
		Rendement (g MS <sub>E</sub> /100g MS <sub>MP</sub> )	MS extrait (g/100g)	Rendement (g MS <sub>E</sub> /100g MS <sub>MP</sub> )	MS extrait (g/100g)
<i>Banane</i>	<i>Peau</i>	60,4 ± 0,9	0,22 ± 0,04	40,8 ± 0,5	0,28 ± 0,04
<i>Carambole</i>	<i>Peau</i>	40,5 ± 0,3	0,31 ± 0,02	49,4 ± 0,2	0,30 ± 0,04
<i>Papaye</i>	<i>Peau</i>	35,5 ± 0,4	0,12 ± 0,00	38,8 ± 0,1	0,25 ± 0,01
<i>Tangor (pépin)</i>	<i>Pépins</i>	34,2 ± 0,3	0,27 ± 0,01	33,4 ± 0,4	0,21 ± 0,01
<i>Tangor (peau)</i>	<i>Peau</i>	29,0 ± 0,7	0,20 ± 0,01	43,0 ± 1,6	0,26 ± 0,01
<i>Passion</i>	<i>Pulpe</i>	23,6 ± 1,0	0,20 ± 0,02	28,2 ± 0,4	0,19 ± 0,02
<i>Manioc</i>	<i>Peau</i>	19,8 ± 0,8	0,07 ± 0,01	41,4 ± 2,0	0,28 ± 0,01
<i>Patate douce</i>	<i>Peau</i>	17,7 ± 0,9	0,06 ± 0,00	57,0 ± 5,2	0,29 ± 0,01
<i>Goyavier</i>	<i>Pulpe et peau</i>	17,2 ± 0,9	0,14 ± 0,02	23,0 ± 1,3	0,13 ± 0,01

Les rendements d'extraction à l'eau sont plus élevés, sauf dans le cas de la banane (peau) et du tangor (pépin), dont les co-produits contiennent davantage de composés lipophiles. Les pépins d'orange, variété proche du tangor, sont en effet connus pour renfermer près de 12 % d'huile [35] et les peaux de banane peuvent renfermer jusqu'à 11 % de matières grasses [36].

Les propriétés des extraits actifs aqueux et éthanoliques obtenus au Fibertec (à reflux) sont répertoriées dans le Tableau II-23. La teneur en sucres (voir V.5.1.), en polyphénols (voir V.5.2.) et l'activité antioxydante (voir V.5.3.) des extraits y sont indiquées.

Tableau II-23: Propriétés des extraits aqueux et éthanoliques obtenus au Fibertec (à reflux)

Co-produit		Ethanol			Eau		
		Sucres (g/100g MS <sub>E</sub> )	Polyphénols (g GAE/ 100g MS <sub>E</sub> )	IC <sub>50</sub> (mg/L)	Sucres (g/100g MS <sub>E</sub> )	Polyphénols (g GAE/ 100g MS <sub>E</sub> )	IC <sub>50</sub> (mg/L)
<i>Goyavier</i>	<i>Pulpe et peau</i>	44,7 ± 1,1	9,3 ± 0,3	59 ± 2	23,2 ± 1,6	10,5 ± 3,4	37 ± 9
<i>Papaye</i>	<i>Peau</i>	27,2 ± 1,5	2,5 ± 0,1	104 ± 2	12,3 ± 0,5	2,4 ± 0,2	387 ± 4
<i>Patate douce</i>	<i>Peau</i>	17,4 ± 0,5	1,4 ± 0,2	200 ± 5	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,2	647 ± 7
<i>Passion</i>	<i>Pulpe</i>	29,6 ± 2,2	5,3 ± 0,6	295 ± 8	13,2 ± 1,4	3,1 ± 0,1	466 ± 15
<i>Manioc</i>	<i>Peau</i>	31,3 ± 1,1	1,1 ± 0,1	423 ± 6	6,5 ± 0,4	1,7 ± 0,9	343 ± 5
<i>Carambole</i>	<i>Peau</i>	85,0 ± 1,0	1,7 ± 0,1	504 ± 11	62,9 ± 0,7	3,9 ± 1,8	176 ± 17
<i>Tangor</i>	<i>Peau</i>	63,1 ± 1,1	3,5 ± 0,1	721 ± 6	44,6 ± 1,1	4,1 ± 0,5	552 ± 10
<i>Banane</i>	<i>Peau</i>	69,6 ± 0,8	0,8 ± 0,1	883 ± 9	63,3 ± 2,0	1,0 ± 0,3	980 ± 11
<i>Tangor</i>	<i>Pépins</i>	19,5 ± 0,3	1,0 ± 0,0	1423 ± 42	12,4 ± 0,5	1,7 ± 0,9	956 ± 22

Parmi les co-produits étudiés, les co-produits de banane et de carambole sont les plus riches en sucres (glucose et fructose). Ces sucres sont davantage extraits par l'éthanol que par l'eau.

Concernant l'activité antioxydante, les extraits de pulpe de goyavier sont les plus riches en polyphénols générant une forte activité antioxydante (9,3-10,5 g GAE/100g MS d'extrait ; IC<sub>50</sub> : 37-59 mg/L), quel que soit le solvant d'extraction (Tableau II-23). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Luximon-Ramma *et al.* ayant démontré que le goyavier possède la meilleure activité antioxydante parmi 17 fruits exotiques [37].

Les autres extraits actifs présentant une forte activité antioxydante sont ceux obtenus à partir d'une extraction éthanolique à reflux de papaye (2,5 g GAE/100g ; IC<sub>50</sub> : 104 mg/L), de patate douce (1,4 g GAE/100g ; IC<sub>50</sub> : 200 mg/L) et de fruit de la passion (5,3 g GAE/100g ; IC<sub>50</sub> : 295 mg/L). Il est aussi intéressant de noter que l'extrait de carambole obtenu par extraction aqueuse à reflux présente une forte activité antioxydante (3,9 g GAE/100g ; IC<sub>50</sub> : 176 mg/L). La Figure II-5 confirme qu'il n'est pas possible d'établir de corrélation entre l'activité antioxydante des extraits bruts et leur teneur en polyphénols, quel que soit le solvant d'extraction. La présence de composés non phénoliques antioxydants, le développement de synergie entre composés ou la surestimation de la teneur en polyphénols en sont probablement la raison [32, 33, 34].

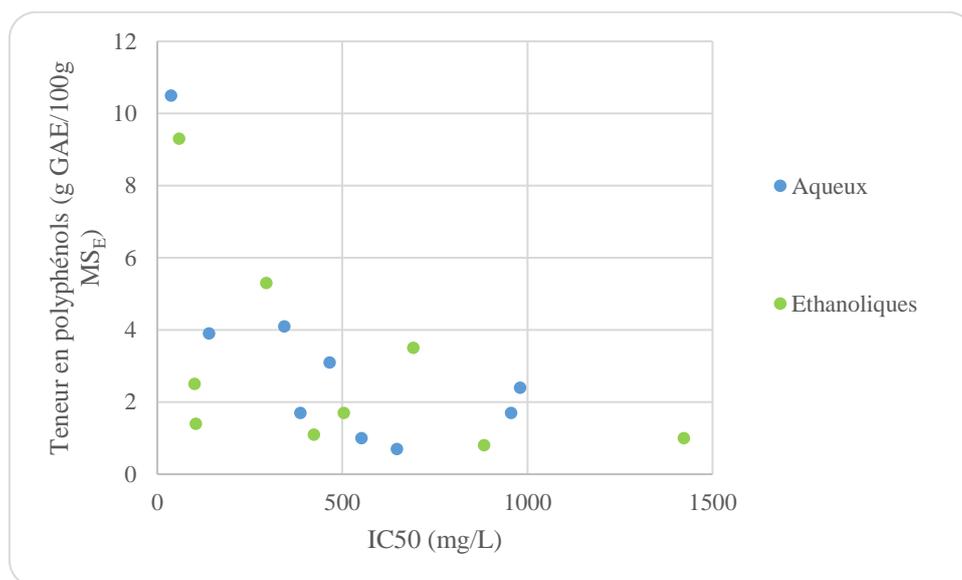


Figure II-5: Activité antioxydante des extraits (IC<sub>50</sub>) en fonction de leur teneur totale en polyphénols

Le Tableau II-24 présente les rendements d'extraction en polyphénols à partir des co-produits sec ou frais de façon à établir une comparaison avec les données de la littérature rassemblées dans le Tableau I-11.

Tableau II-24: Teneur en polyphénols des co-produits en fonction du solvant d'extraction

		Ethanol		Eau	
		Dans le co- produit sec (mg GAE/100g MS co-produit)	Dans le co- produit frais (mg GAE/100g co- produit)	Dans le co- produit sec (mg GAE/100g MS co-produit)	Dans le co- produit frais (mg GAE/100g co-produit)
<b>Goyavier</b>	Pulpe et peau	1599,6	684,6	2415,0	1033,6
<b>Passion</b>	Pulpe	1250,8	614,1	874,2	429,2
<b>Tangor</b>	Peau	1015,0	376,6	1763,0	654,1
<b>Tangor</b>	Pépins	342,0	154,9	567,8	257,2
<b>Patate douce</b>	Peau	247,8	74,1	399,0	119,3
<b>Papaye</b>	Peau	887,5	71,0	931,2	74,5
<b>Carambole</b>	Peau	688,5	49,6	1926,6	138,7
<b>Manioc</b>	Peau	217,8	44,2	703,8	142,9
<b>Banane</b>	Peau	483,2	49,8	408,0	42,0

D'après le Tableau II-24, les polyphénols des co-produits de fruit sont davantage extraits à l'eau qu'à l'éthanol, observation en accord avec les rendements et les teneurs en polyphénols répertoriés dans les Tableaux II-22 et II-23. Les co-produits de fruit de la passion et de banane font cependant exception à cette tendance. Le rendement élevé de l'extraction à l'éthanol pour la banane et la teneur en polyphénols supérieure de l'extrait éthanolique de fruit de la passion expliquent ce résultat.

Nos résultats montrent que les co-produits de goyavier, de tangor (peau) et de fruit de la passion sont les plus riches en polyphénols, avec jusqu'à 2,4 mg GAE/100g co-produit sec pour la pulpe de goyavier (extrait aqueux), 1,8 g GAE/100g co-produit sec pour la peau de tangor (extrait aqueux), et 1,3 g GAE/100g co-produit sec pour la pulpe de fruit de la passion (extrait éthanolique). Les teneurs obtenues sont supérieures à celles recensées dans le Tableau I-11. L'extraction à reflux par Fibertec, à l'eau ou à l'éthanol, mise en œuvre permet d'extraire plus efficacement les polyphénols que les macérations dans différents solvants (méthanol, éthanol, acétone, eau) mises en œuvre par plusieurs auteurs [38, 39, 40, 41, 42]. L'infusion de pulpe de goyavier réalisée par McCook-Russel a permis de récupérer 460 mg de polyphénols pour 100 g de pulpe fraîche [43], soit moins de la moitié des polyphénols extraits par Fibertec à l'eau à partir du co-produit.

Pour les pépins de tangors (257 mg) et la patate douce (119 mg), la quantité de polyphénols extraits à l'eau à reflux par Fibertec à partir des co-produits est également supérieure aux valeurs présentes dans la littérature pour l'extraction de polyphénols par macération ou reflux [44, 45, 46].

Les teneurs en polyphénols des peaux de tangors (654 mg) et du co-produit de carambole (139 mg) sont similaires à celles trouvées dans la littérature pour des macérations [37, 47, 48] ou des

infusions [49]. L'extraction des polyphénols des co-produits de banane et de papaye au Fibertec a également fourni des résultats semblables à ceux recensés dans la littérature pour des macérations au méthanol [38].

En définitive, l'utilisation de co-produits agricoles à des fins d'extraction à reflux, à l'eau ou à l'éthanol, apparaît favorable en termes de rendement en extraits actifs et de richesse des extraits en polyphénols.

### II.3.3. Purification des fractions actives sur résine polymérique

#### II.3.3.1. Comparaison des résines Amberlite™ XAD4 et FPX66

La résine FPX66 est utilisée pour la purification et la décoloration de produits alimentaires et la résine XAD4 est recommandée pour l'adsorption de molécules organiques de faibles masses moléculaires dans des solvants aqueux ou polaires (Fiches produits en Annexes 2 et 3). Ces deux résines polymériques permettent d'adsorber les polyphénols par liaisons hydrophobes et par empilement aromatique avant de les éluer dans un solvant organique comme l'éthanol. Les caractéristiques des deux résines choisies pour la purification des extraits sont répertoriées dans le Tableau II-25.

Tableau II-25: Propriétés des résines Amberlite™ XAD4 et FPX66

	Composition	Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	Taille des particules (mm)	Diamètre des pores (Å)
<b>XAD4</b>	Polymère			
	aromatique	750	0,3 – 1,2	100
	macroréticulé			
<b>FPX66</b>	Polymère			
	aromatique	700	0,60 – 0,75	200 - 250
	macroréticulé			

Les fractions actives aqueuses obtenues par extraction au Fibertec (à reflux) à partir des co-produits de goyavier, carambole et papaye, présentant différents teneurs en polyphénols ont été mises en contact avec les résines XAD4 et FPX66 placées dans une colonne. Après adsorption des extraits sur les résines, rinçage à l'eau et élution des molécules adsorbées avec de l'éthanol (voir V.4.5.), les rendements de purification sont calculés selon les formules suivantes :

$$r_g = \frac{m_{Ep} \times MS_{Ep}}{m_E \times MS_E} * 100$$

$$r_{PP} = \frac{PP_{Ep} \times m_{Ep} \times MS_{Ep}}{PP_E \times m_E \times MS_E} * 100$$

Avec  $r_g$  le rendement de purification global en %,  $r_{PP}$  le taux de récupération des polyphénols en %,  $m_{Ep}$  la masse d'extrait purifié en g,  $m_E$  la masse d'extrait initial en g,  $MS_{Ep}$  la matière

sèche de l'extrait purifié en g/100g, MS<sub>E</sub> la matière sèche de l'extrait initial en g/100g, PP<sub>Ep</sub> la teneur en polyphénols de l'extrait purifié en g GAE/100g MS<sub>Ep</sub>, et PP<sub>E</sub> la teneur en polyphénols de l'extrait initial en g GAE/100g MS<sub>E</sub>

Tableau II-26: Rendements de purification en polyphénols d'extraits aqueux avec les résines XAD4 et FPX66

	XAD4		FPX66	
	Rendement global (g MS <sub>Ep</sub> /100g MS <sub>E</sub> )	Taux de récupération des polyphénols (%)	Rendement global (g MS <sub>Ep</sub> /100g MS <sub>E</sub> )	Taux de récupération des polyphénols (%)
<b>Goyavier</b>	15,3	61,9	24,6	79,2
<b>Carambole</b>	5,9	20,4	8,4	71,7
<b>Papaye</b>	9,7	25,9	16,6	74,0

D'après le Tableau II-26, les meilleurs rendements de purification et taux de récupération sont obtenus pour les extraits actifs de goyavier, quelle que soit la résine employée. Les rendements et les taux de récupération sont plus élevés avec la résine FPX66 quelle que soit la matière première. Le taux de récupération des polyphénols est ainsi supérieur à 70 % avec la résine FPX66. Le diamètre des pores de cette résine (200 – 250 Å) semble donc plus adapté pour purifier les composés phénoliques présents dans nos extraits, en particulier pour la carambole et la papaye qui présentent des taux de récupération largement supérieurs avec la résine FPX66. Buran *et al.* ont également démontré lors de la purification d'extraits de myrtille que la cinétique d'adsorption des polyphénols sur la résine XAD4 était plus lente qu'avec la résine FPX66, et que la désorption des polyphénols était favorisée par la taille des pores de la résine FPX66 [49].

La résine FPX66 a donc été choisie pour concentrer les extraits actifs en polyphénols tout en minimisant les pertes.

### II.3.3.2. Purification sur résine des extraits actifs aqueux

Les fractions actives aqueuses obtenues à partir des différents co-produits ont été purifiées en éliminant les sucres et en adsorbant les polyphénols sur la résine FPX66 (Tableau II-27).

Les taux de récupération des polyphénols sont supérieurs à 70 %, excepté pour les extraits de banane et de patate douce qui présentent des taux de récupération inférieurs à 45 %. Ces deux échantillons sont également les deux extraits aqueux présentant les teneurs en polyphénols initiales les plus faibles. De la même façon, les échantillons initiaux présentant des teneurs élevées en polyphénols, tels que la pulpe de goyavier et de passion, les peaux de tangerine, fournissent des extraits purifiés avec les taux de récupération en polyphénols les plus élevés. L'efficacité de l'enrichissement en polyphénols semble donc liée à la teneur initiale en polyphénols. Cette tendance a également été observée lors de la purification de polyphénols sur une autre résine polymérique (XAD7) par Jiao *et al.* [50].

Tableau II-27: Résultats de purification d'extraits actifs aqueux sur résine FPX66

	Rendement global (g MS <sub>Ep</sub> /100g MS <sub>E</sub> )	MS de l'extrait purifié (g/100g)	Taux de récupération des polyphénols (%)
<i>Passion</i>	14,9	0,08	98,8
<i>Tangor (peau)</i>	27,2	0,27	87,0
<i>Goyavier</i>	24,6	0,14	79,2
<i>Papaye</i>	16,6	0,14	74,0
<i>Manioc</i>	6,3	0,11	72,3
<i>Tangor (pépins)</i>	16,1	0,12	72,1
<i>Carambole</i>	8,4	0,09	71,7
<i>Banane</i>	5,2	0,09	43,3
<i>Patate douce</i>	20,2	0,26	38,7

L'analyse des sucres dans les extraits purifiés montre des teneurs en sucres très faibles (inférieures à 2,3 g/100g MS<sub>Ep</sub>), indiquant que la purification sur la résine FPX66 (par absorption des composés et désorption des polyphénols par l'éthanol) a permis d'éliminer efficacement les sucres (95 à 100 % d'élimination) dans les extraits récupérés au final. Les Figures II-6 et II-7 montrent l'évolution de la teneur en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits après purification sur résine, en comparaison avec celles des extraits bruts.

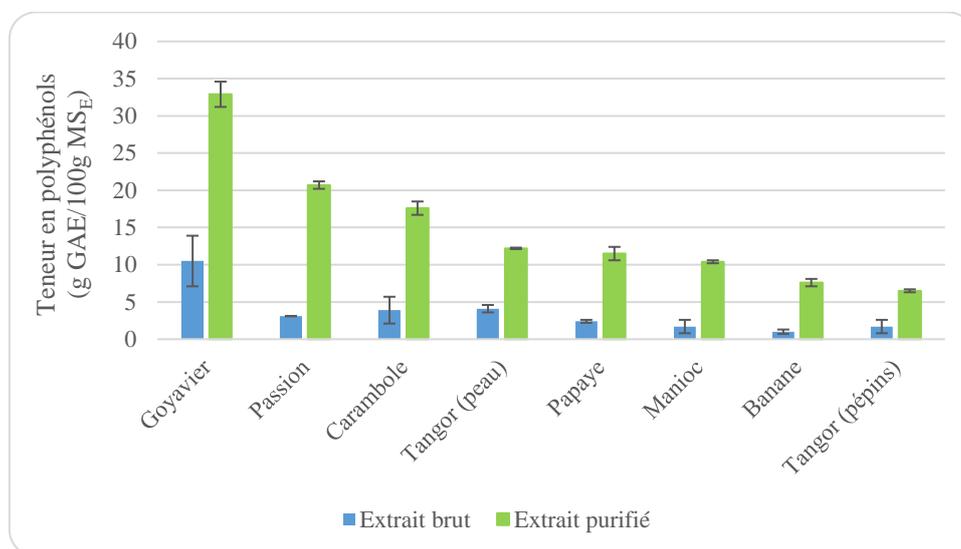


Figure II-6: Évolution des teneurs en polyphénols des extraits aqueux après purification

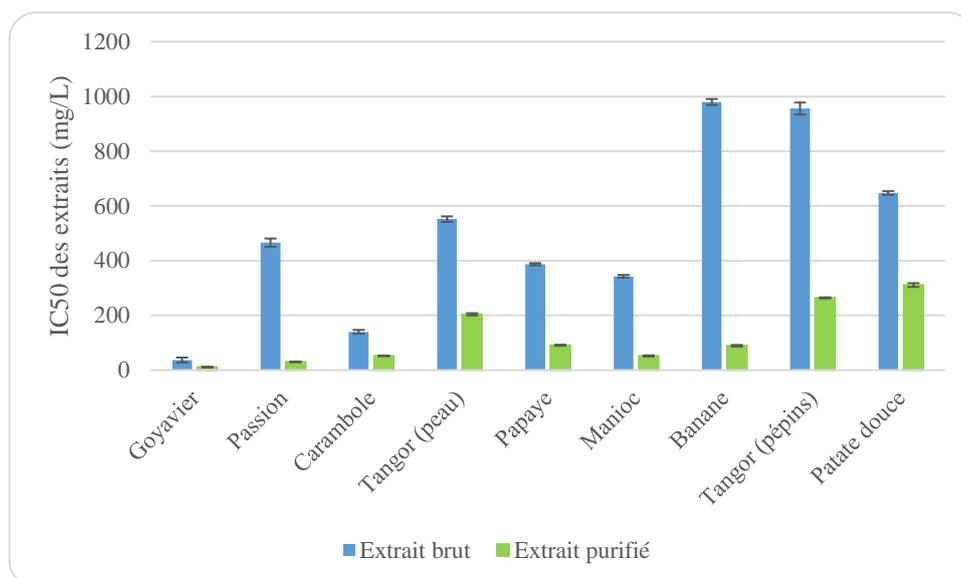


Figure II-7: Évolution de l'activité antioxydante des extraits aqueux après purification

Les extraits purifiés présentent tous des teneurs en polyphénols au minimum trois fois plus élevées que les extraits bruts (Figure II-6).

Parmi les extraits purifiés, les extraits de pulpe de goyavier et de fruit de la passion sont les plus riches en polyphénols, avec des teneurs supérieures à 30 et 20 %, respectivement, ainsi que des activités antioxydantes élevées : IC<sub>50</sub> inférieures à 10 et à 30 mg/L, respectivement, pour le goyavier et le fruit de la passion (Figure II-7).

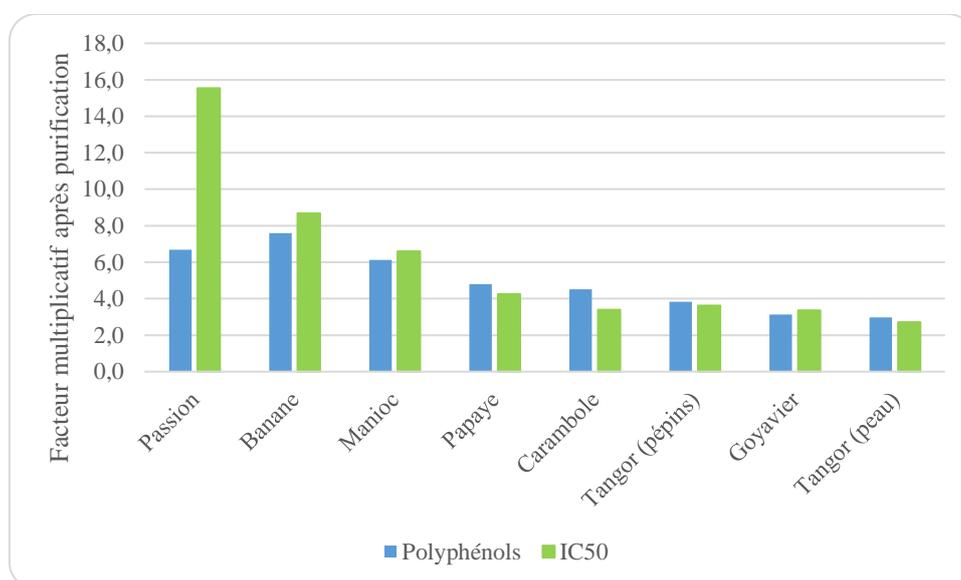


Figure II-8: Comparaison de l'enrichissement en polyphénols et du renforcement de l'activité antioxydante dans les extraits aqueux purifiés

L'enrichissement en polyphénols et le renforcement de l'activité antioxydante des extraits purifiés sont corrélés comme le montre la Figure II-8, indiquant que les polyphénols sont les molécules principalement responsables de l'activité antioxydante des extraits. Seul l'extrait purifié de fruit de la passion possède une activité antioxydante plus élevée que celle attendue

par rapport à l'enrichissement en polyphénols. Un phénomène de synergie entre les composés peut être à l'origine de cette activité élevée.

### II.3.3.3. Purification sur résine des extraits actifs éthanoliques

Compte tenu de la teneur élevée en polyphénols des pulpes de goyavier et de fruit de la passion, et de l'utilisation des graines de ces deux fruits pour obtenir des huiles végétales, ces deux co-produits ont été sélectionnés pour la suite des travaux.

Les fractions actives éthanoliques obtenues par extraction au Fibertec (à reflux) à partir des co-produits de goyavier et de fruit de la passion ont été purifiées sur résine FPX66.

Tableau II-28: Résultats de purification d'extraits actifs éthanoliques sur résine FPX66

	Rendement global (g MS <sub>Ep</sub> /100g MS <sub>E</sub> )	MS de l'extrait purifié (g/100g)	Récupération des polyphénols (%)
<i>Goyavier</i>	8,5	0,06	38,7
<i>Passion</i>	11,2	0,05	47,9

Les rendements globaux et les taux de récupération des polyphénols sont plus faibles que ceux obtenus pour les extraits aqueux (Tableau II-28). Moins de 50 % des polyphénols initiaux sont ainsi présents dans les extraits purifiés. Ce résultat peut s'expliquer par une perte de matière lors de l'étape de resolubilisation des extraits éthanoliques secs dans l'eau.

Pour les deux co-produits (goyavier et passion), en termes de teneurs totales en polyphénols des extraits purifiés, les extraits éthanoliques présentent des teneurs supérieures à celles des extraits aqueux, malgré les faibles taux de récupération en polyphénols obtenus (Tableau II-28). L'extrait éthanolique purifié de goyavier est ainsi composé à plus de 40 % de polyphénols (Figure II-9). L'activité antioxydante des extraits purifiés de goyavier (aqueux et éthanolique) est très prononcée, avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> (comprises entre 11 et 14 mg/L) proches de celle de la vitamine E (7 mg/L) (Figure II-9). Les extraits éthanoliques purifiés de fruit de la passion montrent quant à eux une activité antioxydante (IC<sub>50</sub> : 50 mg/L) légèrement plus faible que celle de l'extrait aqueux purifié (IC<sub>50</sub> : 30 mg/L) (Figure II-8).

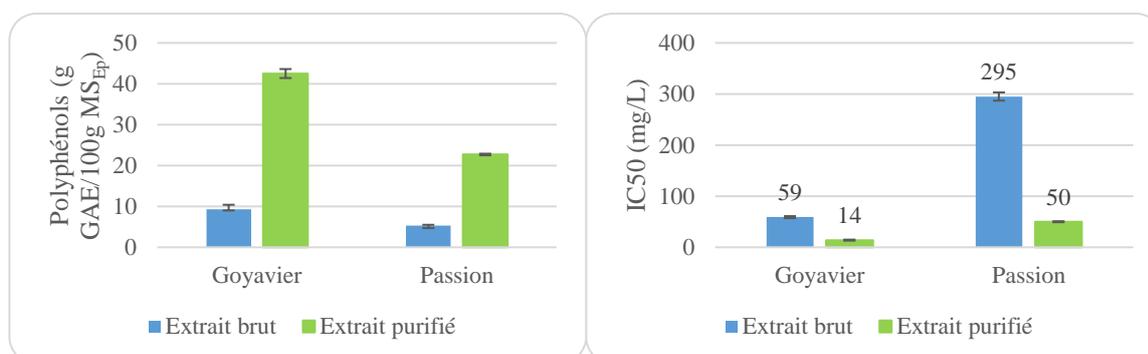


Figure II-9: Évolution des teneurs en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits éthanoliques après purification

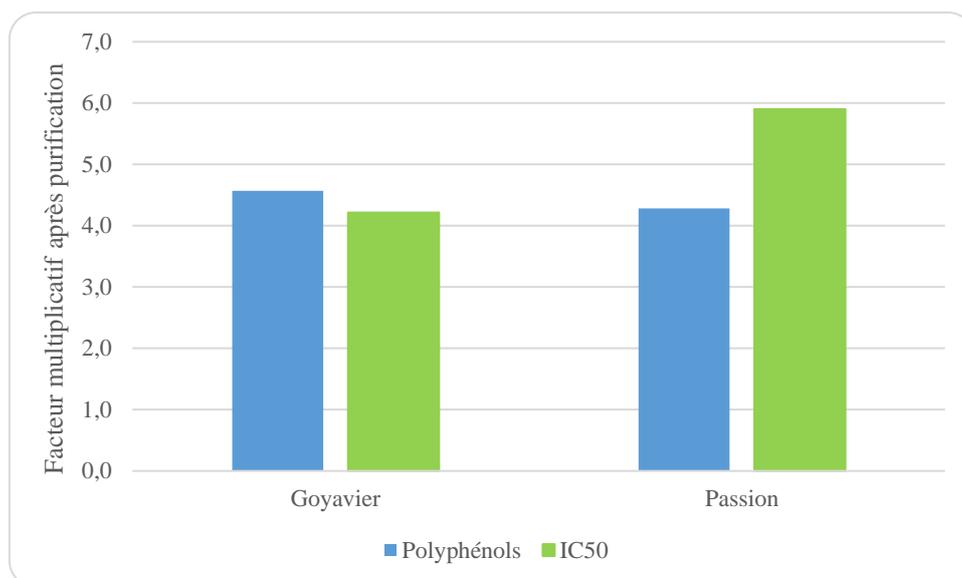


Figure II-10: Comparaison de l'enrichissement en polyphénols et du renforcement de l'activité antioxydante dans les extraits éthanoliques purifiés

Comme pour les extraits aqueux mais dans une moindre mesure, le renforcement de l'activité antioxydante constaté pour l'extrait purifié de fruit de la passion est plus important que l'enrichissement en polyphénols (Figure II-10), ce qui tend à confirmer l'hypothèse émise, quant à la présence d'un phénomène de synergie entre les composés.

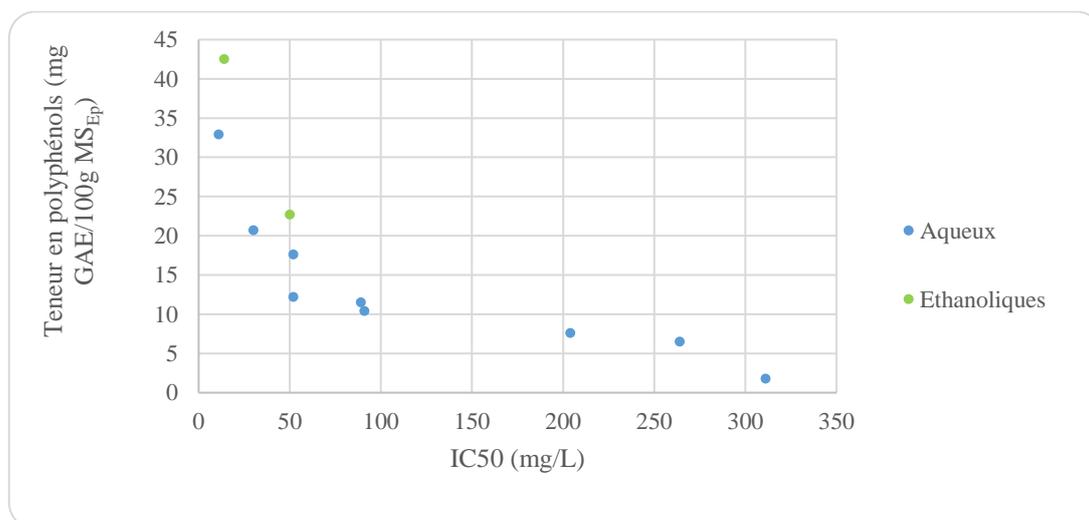


Figure II-11: Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur totale en polyphénols des extraits purifiés

D'après la Figure II-11, l'étape de purification fait apparaître une certaine relation entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits purifiés ( $R^2 = 0,587$ ). La purification permet d'éliminer les molécules interférant dans le dosage des polyphénols totaux (vitamines, polysaccharides, protéines), reliant ainsi de manière plus fiable la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits purifiés.

Tableau II-29: Rendement en extraits et en polyphénols après extraction au Fibertec et purification sur résine pour le goyavier et le fruit de la passion

Après extraction	Éthanol		Eau	
	Rendement en extrait (g MS <sub>E</sub> /100g MS <sub>MP</sub> )	Rendement en polyphénols (g PP/100g MS <sub>MP</sub> )	Rendement en extrait (g MS <sub>E</sub> /100g MS <sub>MP</sub> )	Rendement en polyphénols (g PP/100g MS <sub>MP</sub> )
Goyavier	17,2	1,6	23,0	2,4
Fruit de la passion	23,6	1,3	28,2	0,9
Après extraction et purification	Ethanol		Eau	
Goyavier	1,5	0,5	5,7	1,9
Fruit de la passion	2,6	0,6	4,2	0,9

L'étape de purification permet d'obtenir des extraits 3 à 6 fois plus concentrés en polyphénols et présentant des activités antioxydantes renforcées. Dans le cas des extractions aqueuses, le rendement global en polyphénols (après extraction et purification) est assez peu impacté par l'étape de purification, en particulier pour le fruit de la passion (Tableau II-29). L'obtention d'extraits concentrés et à très faibles teneurs en polysaccharides par cette voie est donc envisageable. Par contre, pour les extractions éthanoliques, le rendement global en polyphénols est diminué de plus de moitié par l'étape de purification. Malgré les fortes teneurs en polyphénols des extraits éthanoliques purifiés, cette voie de purification n'apparaît donc pas adaptée à une extraction à l'éthanol.

#### II.3.3.4. Caractérisation chimique des extraits

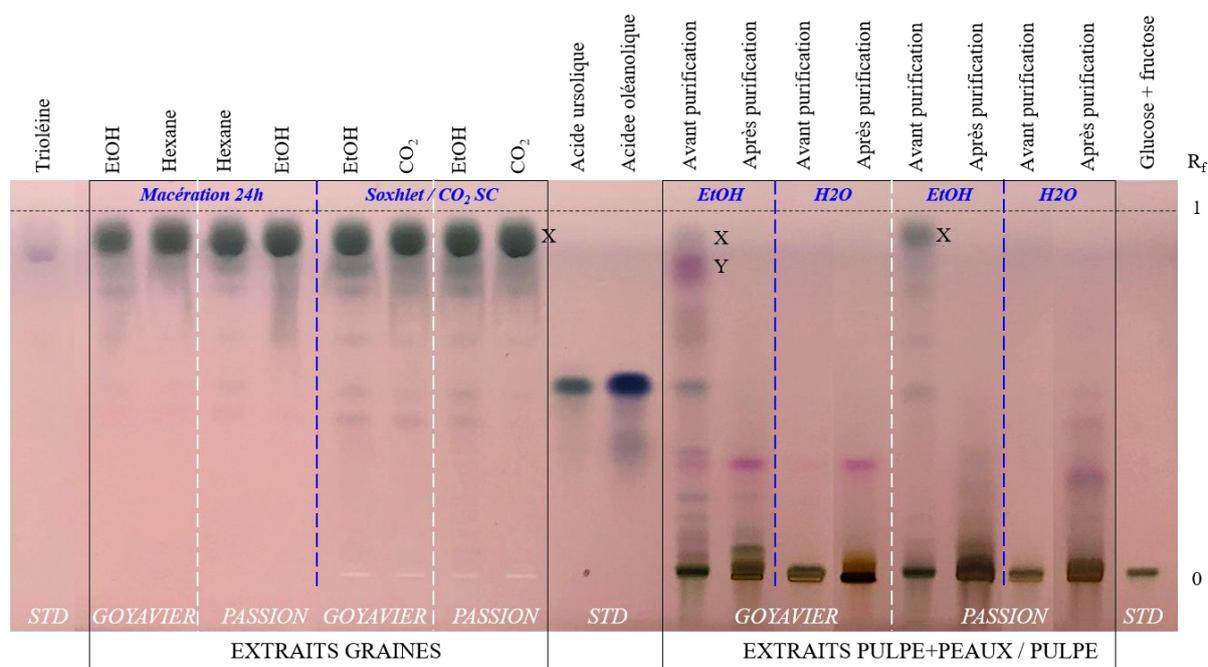
Les extraits bruts et purifiés de fruit de la passion et de goyavier ont été analysés par chromatographie sur couche mince à haute performance (CCMHP, en anglais High Performance Thin Layer Chromatography HPTLC) (voir V.5.4.). Les profils chromatographiques ont été comparés à ceux des étalons choisis en fonction de l'étude bibliographique réalisée sur des extraits des deux fruits (Tableau I-11). Quatre standards ont été utilisés : l'acide ursolique ( $R_f = 0,52$ ), l'acide oléanolique ( $R_f = 0,53$ ), et la trioléine ( $R_f = 0,88$ ) identifiés dans des extraits méthanoliques de pulpe de goyavier par McCook-Russel *et al.* [43], et un mélange de glucose et fructose ( $R_f = 0,02$ ), identifiés dans les extraits bruts des deux fruits (voir II.3.2.). Les résultats, incluant les profils des extraits lipidiques des graines des deux fruits, sont présentés dans la Figure II-12.

Notons que pour les extraits bruts aqueux, la filtration réalisée avant l'analyse (sur filtre 0,45  $\mu\text{m}$ ) semble avoir éliminé les composés autres que les sucres.

Par comparaison des profils chromatographiques des extraits avec ceux des étalons, l'identification de deux groupes de composés peut être proposée :

- Les sucres (glucose et fructose) présents dans tous les extraits bruts ( $R_f = 0,01 - 0,03$ ) et absents dans les extraits purifiés. Cette observation est en accord avec les teneurs très faibles en sucres dosées dans les extraits purifiés par HPIC (voir II.3.3.2.) et confirme que la purification sur résine élimine efficacement les sucres dans nos extraits.

- Les acides triterpéniques présents dans les extraits éthanoliques des deux fruits, mais non observés après purification. Les extraits éthanoliques présentent en effet un spot au même rapport frontal que l'acide ursolique et l'acide oléanolique ( $R_f = 0,51 - 0,52$ ), qui confirme la présence de l'une ou de ces deux molécules. Ces acides triterpéniques ne sont pas visibles dans les extraits purifiés. Ils ne sont donc pas adsorbés sur la résine FPX66 et sont éliminés avec les sucres lors de l'étape de purification.



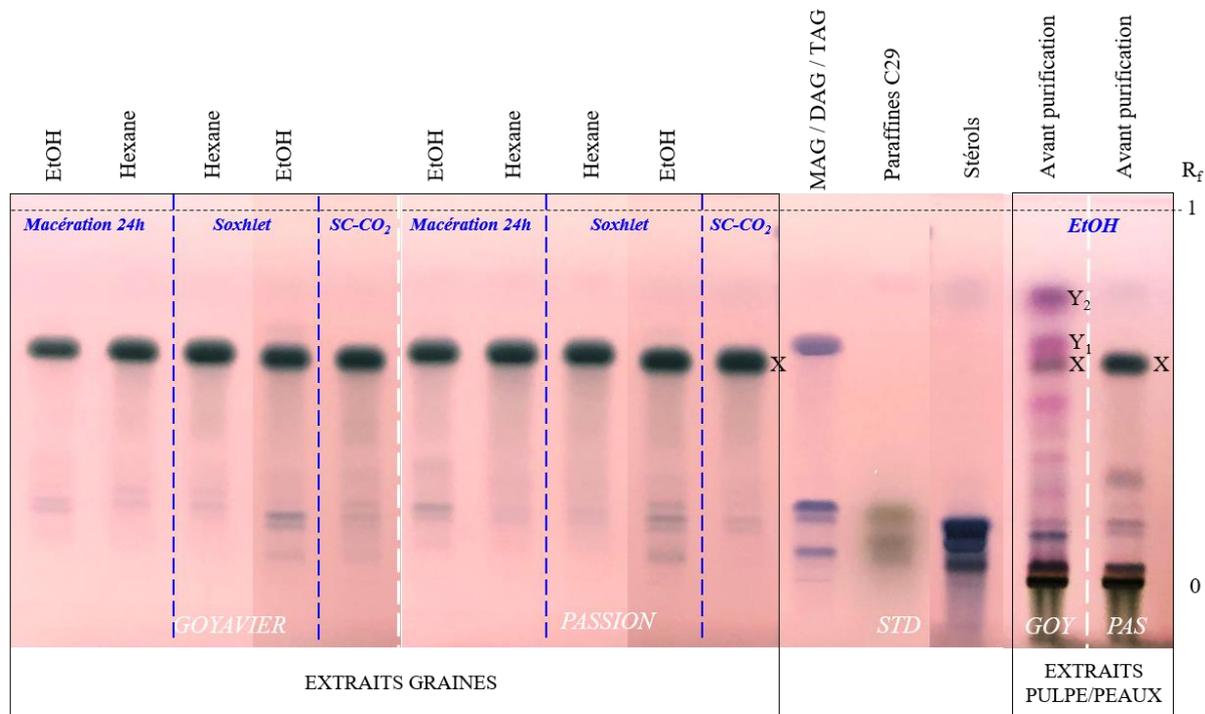
Plaque HPTLC silice 20 x 10 cm  
 Système de développement : Hexane-CHCl<sub>3</sub>-MeOH (3:6:1)  
 Solution de dérivation chimique : anisaldehyde sulfurique  
 Quantités déposés : environ 30 µg pour les extraits et entre 2 et 8 µg pour les standards (STD)

Figure II-12 : Profils chromatographiques des extraits de fruit de la passion et de goyavier (pulpe/peaux et graines) (système de développement 1)

Pour les extraits éthanoliques obtenus à partir des pulpes, plusieurs autres composés sont présents dans les extraits bruts et absents après purification, dont :

- Un composé X proche du front de solvant ( $R_f = 0,90$ ) (coloration verte) présent dans les extraits des deux fruits, et plus nettement dans l'extrait de fruit de la passion (Figures II-13 et II-14). Ce composé est également présent dans les extraits lipidiques obtenus à partir des graines des deux fruits par extraction à l'hexane, à l'éthanol et au CO<sub>2</sub> supercritique (Figure II-12). La présence de ce composé a été confirmée dans un autre système de développement (Figure II-13). Son  $R_f$  est proche de celui de la trioléine (Tableau II-30). Leurs spectres UV-visible présentent des profils similaires (Figure II-14), avec un maximum à 200 nm (absence de chromophores ou de conjugaison). Le composé absorbe dans le visible après dérivation chimique avec l'anisaldehyde sulfurique (spot vert sur fond rose).

Ce composé plutôt apolaire pourrait donc être de nature lipidique et provenir des graines. L'observation de ce composé dans les extraits éthanoliques bruts de pulpe pourrait être due à la présence de graines dans les lots de pulpe. Cette hypothèse pourra être vérifiée après identification complète de ce composé.



Plaque HPTLC silice 20 x 10 cm

Système de développement : hexane-éther diéthylique-acide acétique glacial (70:30:1)

Solution de dérivation chimique : anisaldéhyde sulfurique

Quantités déposés : environ 8 µg pour les extraits de graines et 100 µg pour les extraits de fruits et entre 4 et 8 µg pour les standards (STD)

Figure II-13 : Profils chromatographiques des extraits lipidiques et des extraits bruts éthanoliques des pulpes de fruit de la passion et de goyavier (système de développement 2)

- Un composé Y au  $R_f = 0,86$  (coloration rose) présent dans l'extrait éthanolique brut de goyavier, dont le spectre UV-visible est présenté dans la Figure II-14. Le spectre présente deux maxima d'absorption à 225 et 286 nm avec deux épaulements à 347 et 384 nm. Deux hypothèses peuvent être émises à propos de ce spot : (i) il s'agit d'un composé pur, (ii) il est le résultat d'une co-élution de plusieurs composés. L'analyse de cet extrait dans le système de développement 2 (Figure II-13) met en évidence la présence d'une meilleure séparation des composés de l'extrait notamment dans la zone  $R_f$  comprise entre 0,62 et 0,90, avec deux spots distincts ( $Y_1$  et  $Y_2$ ) (Tableau II-30). Les spectres UV de ces composés montrent un maximum d'absorption à 225 nm pour  $Y_1$  ( $R_f = 0,64$ ) et un maximum d'absorption à 285 nm avec deux épaulements à 350 et 388 nm pour  $Y_2$  ( $R_f = 0,77$ ) (Figure II-15). Le spectre du composé Y élué dans le système de développement 1 est donc une moyenne des absorbances des deux molécules co-éluées.

Tableau II-30 : Comparaison des éluions des composés X et Y et de l'étalon trioléine dans deux systèmes de développement

Système de développement	Triterpénoïdes (1)	Lipides (2)
Référence figure	Figure II-12	Figure II-13
R <sub>f</sub> composé X	0,90	0,59
R <sub>f</sub> trioléine standard	0,88	0,60
R <sub>f</sub> composé Y	0,86	Y <sub>1</sub> : 0,64 Y <sub>2</sub> : 0,77

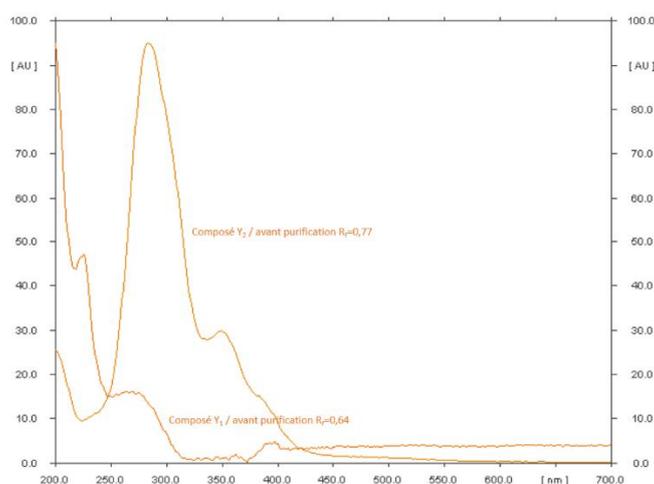


Figure II-15 : Spectres UV-visible des composés Y<sub>1</sub> et Y<sub>2</sub> (système de développement 2)

Pour les extraits de goyavier aqueux et éthanoliques, on peut également noter la présence d'un composé au R<sub>f</sub> = 0,31 - 0,32 (coloration rose), présent dans les extraits avant et après purification (Figure II-12), et dont la concentration semble plus importante dans l'extrait purifié. Ce composé semble caractéristique des extraits de goyavier. Il pourrait s'agir d'un polyphénol étant donné que la purification entraîne une augmentation de la teneur en polyphénols totaux des extraits (310 à 460 %) (voir II.3.3.2. et II.3.3.3.).

Une chromatographie sur couche mince préparative permettrait d'isoler ces quelques fractions d'intérêt (R<sub>f</sub> = 0,32 et 0,90 pour le système de développement 1, R<sub>f</sub> = 0,64 et 0,77 pour le système de développement 2) pour des analyses complémentaires telles que la spectrométrie de masse. La poursuite de l'identification de ces composés devrait permettre de valider certaines hypothèses formulées ci-dessus et d'enrichir la littérature scientifique sur les composés actifs du goyavier et du fruit de la passion.

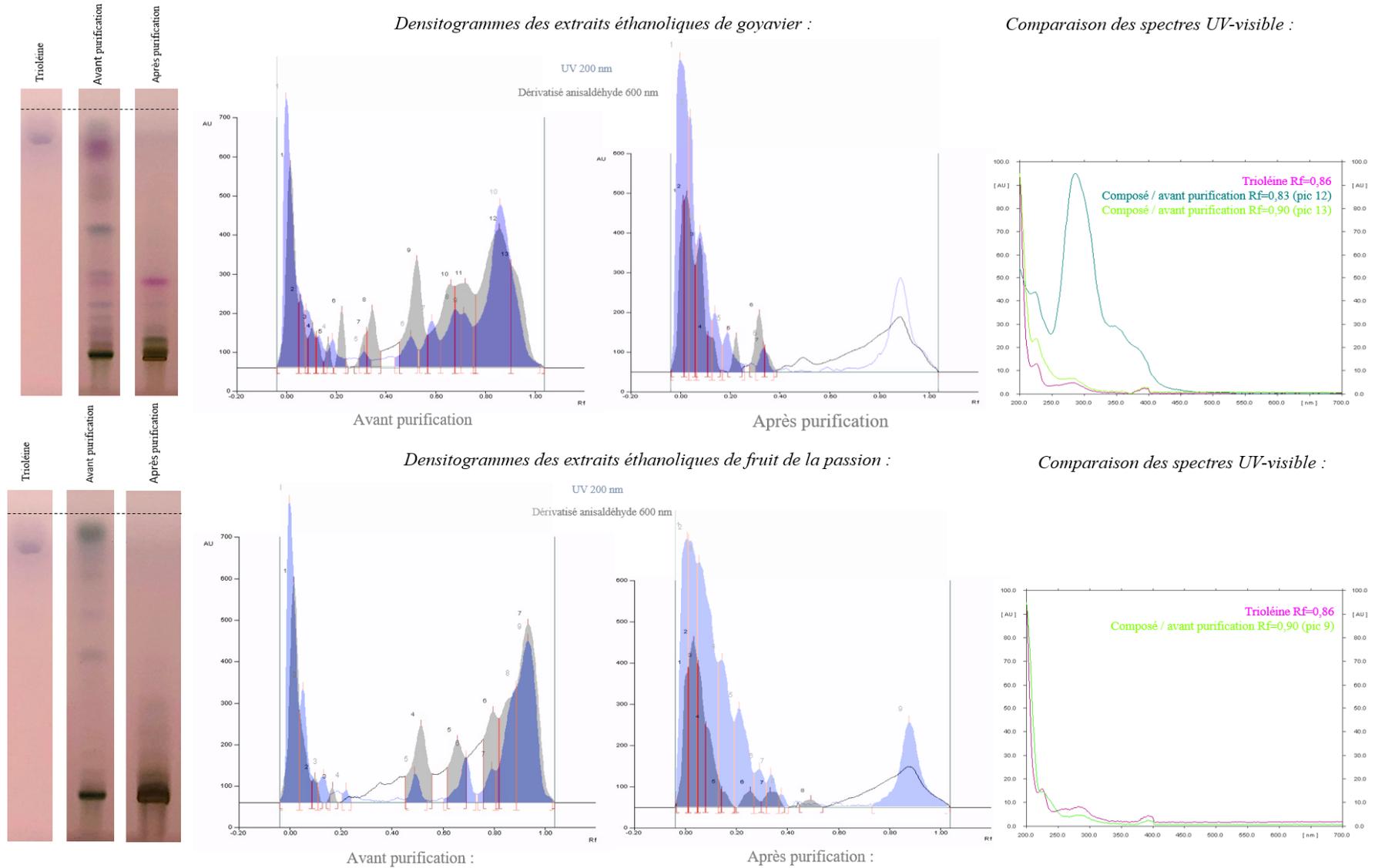


Figure II-14 : Profils chromatographiques, densitogrammes et spectres UV-visible des extraits éthanoliques de pulpe de fruit de la passion et de goyavier

### **II.3.4. Bilan sur l'extraction des fractions actives**

L'extraction par solvant de fractions actives à partir de co-produits végétaux a été étudiée. L'éthanol et l'eau ont été choisis afin de satisfaire aux exigences du Label Pure concernant l'extraction d'ingrédients actifs pour les peintures naturelles. Les méthodes à reflux de solvant mises en œuvre ont permis d'obtenir de meilleurs rendements et des teneurs en composés antioxydants plus élevées que pour les macérations. Deux co-produits se distinguent par leurs teneurs élevées en polyphénols associées à des activités antioxydantes intéressantes : la pulpe et les peaux de goyavier et celle du fruit de la passion. La purification sur résine Amberlite™ des extraits issus de ces deux co-produits a permis d'obtenir des fractions contenant de 20 à 42,5 % (exprimé en g GAE/100g MS extrait) de polyphénols. Les extraits de goyavier ainsi enrichis ont montré des activités antioxydantes proches de celle de la vitamine E ( $IC_{50} = 7$  mg/L). La caractérisation chimique des extraits bruts et purifiés des deux fruits a confirmé l'élimination des sucres et d'autres composés, tels que des acides triterpéniques, lors de cette étape de purification.

Les composés phénoliques sont considérés comme étant l'une des sources principales des propriétés pharmacologiques des plantes [32]. Plusieurs auteurs ont trouvé une corrélation entre la teneur en polyphénols d'extraits végétaux, leur activité antioxydante et leur activité antimicrobienne [32, 51, 52]. Les acides ursoliques et oléanoliques, détectés dans les extraits bruts des deux fruits, sont également reconnus pour leur activité antibactérienne [53]. Les propriétés biologiques des extraits de goyavier et de fruit de la passion semblent donc en accord avec une possible utilisation comme agents conservateurs dans des peintures naturelles.

## **II.4. Conclusion**

Deux types d'ingrédients ont été isolés à partir de co-produits de l'agro-industrie : des huiles végétales et des extraits antioxydants.

À partir des graines, la faisabilité technique de plusieurs méthodes éco-compatibles d'extraction d'huile a été vérifiée : l'extraction par macération éthanolique pour le goyavier ou par CO<sub>2</sub>-supercritique et par pression pour le fruit de la passion ont ainsi mené à la récupération d'environ 80 % du potentiel en lipides.

À partir des pulpes, les extraits aqueux et éthanoliques de fruit de la passion et de goyavier se distinguent du panel initial de co-produits par des teneurs en polyphénols élevés et des activités antioxydantes notables. La purification sur résine mise en œuvre est intéressante pour concentrer les extraits en polyphénols.

Ainsi, les co-produits du goyavier et du fruit de la passion se révèlent être adaptés pour l'obtention des deux types d'ingrédients recherchés. Les procédés d'extraction appliqués permettent la valorisation de chacun des constituants des co-produits, selon une démarche de bioraffinerie séquencée.

Le Tableau II-31 montre les rendements en molécules d'intérêt par kilogramme de co-produit sec, traité selon un schéma faisant intervenir une extraction par pression ou par macération éthanolique des graines et une extraction aqueuse des pulpes.

Tableau II-31 : Rendements en g de matière sèche par kilogramme de co-produit sec  
(P) : extraction par pression, (M) : extraction par macération éthanolique

	Goyavier rouge	Fruit de la passion
<b>Graines (g MS)</b>	496	735
<b>Huile végétale (P) (g)</b>	18,4	143,3
<b>Huile végétale (M) (g)</b>	77,4	146,3
<b>Pulpe (g)</b>	504	265
<b>Extrait aqueux (g)</b>	115,9	74,7
- <b>Sucres (g)</b>	26,9	9,9
- <b>Polyphénols (g)</b>	12,2	2,3
<b>Extrait purifié (g)</b>	28,7	11,1
- <b>Polyphénols (g)</b>	9,4	2,3

La production d'huile végétale est plus importante à partir des co-produits de fruit de la passion, composés majoritairement de graines riches en lipides. L'utilisation de co-produit de goyavier plus riche en pulpe conduit à une récupération importante des polyphénols. Dans la suite des travaux, le comportement des deux huiles dans des formulations de peinture est évalué. Nous avons choisi d'étudier uniquement l'activité des extraits phénoliques provenant des mêmes co-produits pour la protection antimicrobienne des formulations naturelles.

### Références bibliographiques

1. ECOCERT, 2015, Référentiel ECOCERT Peintures
2. Patel S., Exotic tropical plant *Psidium cattleianum*: a review on prospects and threats, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2012, 11, 243–248
3. Barrales F. M., Rezende C. A., Martinez J., Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) seed oil assisted by ultrasound, *Journal of Supercritical Fluids*, 2015, 104, 183-192
4. Savoie R., Lanoisellé J.L., Vorobiev E., Mechanical continuous oil Expression from oilseeds: A Review, *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6, 1-16
5. Rombaut N., Etude comparative de trois procédés d'extraction d'huile : aspects qualitatifs et quantitatifs : application aux graines de lin et aux pépins de raisin, Génie des Procédés Industriels et développement durable, Université de Technologie de Compiègne, 2013
6. Kiriamiti H.K., Rascol E., Marty A., Condoret J.S., Extraction rates of oil from high oleic sunflower seeds with supercritical carbon dioxide, *Chemical engineering and processing*, 2001, 41, 711-718
7. Zahedi G., Azarpour A., Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of *Passiflora* seed oil, *Journal of Supercritical Fluids*, 2011, 58, 40-48
8. Biegelmeier R., Andrade J., Aboy A., Apel M., Dresch R., Marin R., do Carmo Bassols Raseira M., Henriques A., Comparative analysis of the chemical composition and antioxidant activity of Red (*Psidium cattleianum*) and yellow (*Psidium cattleianum* car. *Lucidum*) strawberry guava, *Journal of Food Science*, 2011, 76, 991-996
9. De Santana F., Shinagawa F., Araujo E., Costa A., Mancini-Filho J., Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Brazilian *Passiflora* Seed Oils, *Journal of Food Science*, 2015, 80, 2647-2654
10. Morin O., Pages-Xatart-Pares X., Huiles et corps gras végétaux : ressources fonctionnelles et intérêt nutritionnel, *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 2012, 19, 63-75
11. Thomas A., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, *Fats and Fatty Oils*, Wiley-VCH Verlag, 2002
12. Codex alimentarius, Norme pour les huiles végétales portant un nom spécifique, 1999, Codex Stan 210-199
13. Saini R., Carotenoid extraction methods: A review of recent developments, *Food Chemistry*, 2018, 240, 90-103
14. Mercadante A. Z., Britton G., Rodriguez-Amaya D. B., Carotenoids from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46, 4102-4106
15. De França L., G. Reber, M. Meireles, N. Machado, G. Brunner, Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region, *Journal of Supercritical Fluids*, 1999, 14, 247-256
16. Szentmihalyi K., P. Vinkler, B. Lakatos, V. Illes, M. Then, Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods, *Bioresource Technology*, 2002, 82, 195-201

17. Konuskan D. B., Arslan M., Oksuz A., Physicochemical properties of cold pressed sunflower, peanut, rapeseed, mustard and olive oils grown in the Eastern Mediterranean region, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2018,
18. Teh S., Birch J., Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013, 30, 26–31
19. Ferreira B.S., de Almeida C.G., Faza L.P., de Almeida A., Diniz C.G., da Silva V.L., Grazul R.M., Le Hyaric M., Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods. *Molecules*, 2011, 16, 5875-5885
20. He Y., Chen H., Lei Z., Cao J., Tan Y., Optimization of Emulsifying Effectiveness of Phytosterol in Milk Using Two-Level Fractional Factorial Design. *Acta Universitatis Cibiniensis*, 2017, Series E: Food Technology. 21. 10.1515/auaft-2017-0012
21. J. Roche, A. Bouniols, Z. Mouloungui, T. Barranco, M. Cerny, Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2006, 108, 287-297
22. Da Silva A., Jorge N., Bioactive compounds of the lipid fractions of agro-industrial waste, *Food Research International*, 2014, 66, 493-500
23. Piombo G., Barouh N., Barea B., Boulanger R., Brat P., Pina M., Villeneuve P., Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*), *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 2006, 13, 195-199
24. Ayerdi Gotor A., Berger M., Labalette F., Centis S., Dayde J., Calmon A., Variabilité des teneurs et compositions des composés mineurs dans l'huile de tournesol au cours du développement du capitule, partie 2 : Phytostérols, *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 2006, 13, 400-406
25. Määttä K., Lampi A., Petterson J., Phytosterol content in seven oat cultivars grown at three locations in Sweden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999, 79, 1021-1027
26. Morin O., Caractéristiques des huiles de lin et de chanvre, *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 2015, 22
27. Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A., The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols, *Lipids*, 1996, 31, 671–701
28. Malacrida C.R., Jorge N., Yellow passion fruit seed oil (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*): Physical and Chemical Characteristics. *Brazilian Archive of Biology and Technology*, 2012, 55, 127-134
29. Schwarz H., Ollilainen V., Piironen V., Lampi A.M., Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21, 152-161
30. Lavedrine F., A. Revel, A. Poupard, J. Alary, Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC, *Food Chemistry*, 1997, 58, 135-140
31. Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A., Kouretas D., Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic *Lamiaceae* species, *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50, 4115-4124

32. Huang D., Ou B., Prior R., The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53, 1841-1856
33. Lo Scalzo R., Organic acids influence on DPPH<sup>\*</sup> scavenging by ascorbic acid, *Food Chemistry*, 2008, 107, 40-43
34. Piang-Siong W., de Caro P., Marvilliers A., Chasseray X., Payet B., Shum Cheong Sing A., Illien B., Contribution of *trans*-aconitic acid to DPPH<sup>\*</sup> scavenging ability in different media, *Food Chemistry*, 2017, 214, 447-452
35. Moulehi I., Bourgou S., Ourghemmi I., Tounsi M., Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts, *Industrial Crops and Products*, 2012, 39, 74-80
36. Debabandya M., Sabyasachi M., Namrata S., Banana and its by-product utilisation : an overview, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2010, 69, 323-329
37. Luximon-Ramma A., T. Bahorun, A. Crozier, Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 83, 496-502
38. Morais D., Rotta E., Sargi S., Schmidt E., Bonafe E., Eberlin M., Sawaya A., Visentainer J., Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels, *Food Research International*, 2015, 77, 392-399
39. Souza V., Pereira P., Queiroz F., Borges S., Carneiro J., Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits, *Food Chemistry*, 2012, 134, 381-386
40. Da Silva L., de Figueiredo E., Ricardo N., Vieira I., de Figueiredo R., Brasil I., Gomes C., Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil, *Food Chemistry*, 2014, 143, 398-404
41. Corre L., Santos C., Vianello F., Lima G., Antioxidant content in guava (*Psidium guajava*) and araçá (*Psidium* spp.) germplasm from different Brazilian regions, *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 2011, 9, 384–391
42. Medina A., Haas L., Chaves F., Salvador M., Zambiasi R., da Silva W., Nora L., Rombaldi C., Araca (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells, *Food Chemistry*, 2011, 128, 916–922
43. McCook-Russell K., Nair M., Facey P., Bowen-Forbes C., Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits, *Food Chemistry*, 2012, 134, 1069–1073
44. Teow C., Truong V.D., McFeeters R., Thompson R., Pecota K., Yencho G., Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours, *Food Chemistry*, 2007, 103, 829–838
45. Jung J.K., Lee S.U., Kozukue N., Levin C., Friedman M., Distribution of phenolic compounds and antioxidative activities in parts of sweet potato (*Ipomoea batata* L.) plants and in home processed roots, *Journal of Food composition and analysis*, 2011, 24, 29-37

46. Ali M., Devi L., Nayan V., Chanu K., Ralte L., Antioxidant activity of fruits available in Aizawl market of Mizoram, India, *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 2010, 1, 76-81
47. Ghasemi K., Ghasemi Y., Ebrahimzadeh M., Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 2009, 22, 277-281
48. Xu G., Chen J., Liu D., Zhang Y., Jiang P., Ye X., Minerals, Phenolic Compounds, and Antioxidant Capacity of Citrus Peel Extract by Hot Water, *Journal of Food Science*, 2008, 73, 11-18
49. Buran T., Sandhu A., Li Z., Rock C., Yang W., Gu L., Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins, *Journal of Food Engineering*, 2014, 128, 167-173
50. Jiao X., Zhang X., Zhang Q., Gao N., Li B., Meng X., Optimization of enrichment and purification of polyphenols from blueberries (*Vaccinium* spp.) by macroporous resins XAD-7HP, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 2017, 29, 581-588
51. Moreno S., Scheyer T., Romano C., Vojnov A., Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition, *Free Radical Research*, 2006, 40, 223–231
52. Fattouch S., Caboni P., Coroneo V., Tuberoso C., Angioni A., Dessi S., Marzouki N., Cabras P., Antimicrobial Activity of Tunisian Quince (*Cydonia oblonga* Miller) Pulp and Peel Polyphenolic Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 963–969
53. Jesus J., Lago J., Laurenti M., Yamamoto E., Passero L., Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids : an update, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-14

## *Chapitre III : Procédés intégrés pour l'extraction et la mise en émulsion des molécules actives*

---

III.1. Caractérisation de la matière première .....	126
III.2. Procédés d'extraction .....	128
III.2.1. Procédé discontinu .....	128
III.2.2. Procédé continu par extrusion bi-vis .....	129
III.3. Caractérisation des émulsions .....	134
III.3.1. Composition chimique.....	134
III.3.2. Distribution de la taille des gouttelettes .....	135
III.3.3. Rhéologie des émulsions .....	136
III.3.4. Stabilité des émulsions obtenues .....	141
III.4. Conclusion.....	142
<i>Références bibliographiques</i> .....	144

### **Chapitre III : Procédés intégrés pour l'extraction et la formulation en émulsion des molécules actives**

L'extraction d'huile végétale et de substances bioactives a été réalisée à partir d'un co-produit issu de la transformation agro-alimentaire du fruit de la passion. Des extractions séparées ont ensuite été réalisées, d'une part pour récupérer l'huile végétale à partir des graines et d'autre part pour obtenir des extraits actifs riches en composés hydrophiles antioxydants à partir des résidus de pulpe.

L'objectif de ce chapitre est de développer un procédé de bio-raffinage adapté à l'extraction simultanée des lipides et des composés antioxydants à partir du fruit de la passion frais pris comme modèle. Travailler à partir du fruit frais présente l'avantage de s'affranchir de l'étape de séchage, diminuant ainsi le coût énergétique du procédé global, et permettant d'utiliser l'eau contenue dans le fruit comme fluide extractant. Cette approche combine également les procédés d'extraction et de pré-formulation en émulsion huile-dans-eau, réduisant ainsi le nombre d'étapes nécessaires pour mobiliser les molécules actives.

Les procédés intégrés ont été mis en œuvre à deux échelles différentes selon la matière première utilisée. Un premier procédé discontinu à l'échelle laboratoire à partir de la partie comestible du fruit de la passion (graines, pulpe et jus) a d'abord été étudié. Un second procédé continu par extrusion bi-vis a ensuite été développé pour utiliser les fruits entiers issus des écarts de production et ainsi valoriser les coques, riches en fibres cellulosiques et en polyphénols.

Les compositions en molécules d'intérêt (lipides et polyphénols) des milieux organisés obtenus ont été corrélées aux analyses microscopiques et rhéologiques afin de dégager les caractéristiques favorables (dispersion, viscosité, stabilité) pour une formulation de peinture écologique.

#### **III.1. Caractérisation de la matière première**

La partie comestible du fruit (graines, pulpe et jus) sera utilisée pour alimenter le procédé discontinu. Par contre, le fruit entier pourra être traité par un procédé continu. La composition des différentes parties du fruit de la passion a donc été étudiée au préalable comme présentée dans le Tableau III-1 (voir V.1.2.).

Tableau III-1: Composition des différentes parties du fruit de la passion (n=3)

	<i>Pulpe</i>	<i>Graine</i>	<i>Coque</i>	<i>Fruit entier</i>
<i>Répartition massique (% du fruit frais)</i>	15,8 ± 0,8	7,7 ± 0,3	50,0 ± 1,1	100
<i>Matière sèche (g/100g)</i>	12,7 ± 0,3	78,1 ± 0,4	16,0 ± 0,2	19,9 ± 1,2
<i>Matières minérales (g/100g MS)</i>	5,5 ± 0,1	2,1 ± 0,0	20,9 ± 1,5	14,0 ± 1,5
<i>Cellulose (g/100g MS)</i>	37,0 ± 1,0	54,5 ± 0,4	30,6 ± 0,2	25,6 ± 1,2
<i>Hémicellulose (g/100g MS)</i>	13,0 ± 1,6	2,5 ± 0,6	11,9 ± 0,1	11,6 ± 0,7
<i>Lignine (g/100g MS)</i>	7,1 ± 0,1	2,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,4
<i>Protéine (g/100g MS)</i>	7,7 ± 0,1	12,2 ± 0,1	7,5 ± 0,1	8,4 ± 0,0
<i>Pectine (g/100g MS)</i>	3,3 ± 0,3	/	7,3 ± 1,0	5,2 ± 0,4
<i>Lipides (g/100g MS)</i>	0,7 ± 0,1	23,6 ± 0,9	0,4 ± 0,0	5,8 ± 0,2
<i>Extractibles NDF (g/100g MS)</i>	42,9 ± 0,6	43,4 ± 0,8	57,4 ± 0,0	61,3 ± 0,0
<i>Extractibles aqueux (g/100g MS)</i>	31,4 ± 0,3	15,7 ± 0,8	44,2 ± 0,2	53,8 ± 0,9
<i>Teneur en polyphénols des extractibles aqueux (g GAE/ 100g MSE)</i>	3,1 ± 0,1	6,7 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,3
<i>Polyphénols (g/100g MS)</i>	1,0	1,1	0,7	0,6

La partie comestible du fruit de la passion (pulpe, graines et jus) représente 50 % du fruit frais. En termes de masses sèches, les coques constituent un peu moins de la moitié du poids sec du fruit entier. Les constituants pariétaux, et plus particulièrement la cellulose, sont les constituants majoritaires des différentes parties du fruit. Le fruit entier est riche en matières minérales (14 %), provenant principalement des coques. Les constituants de la partie comestible du fruit (graines et pulpe) sont quant à eux riches en polyphénols. Comme attendu, la quasi-totalité des lipides sont localisés dans les graines.

## III.2. Procédés d'extraction

### III.2.1. Procédé discontinu

Pour le procédé discontinu, deux voies ont été envisagées : la voie 1 utilisant la partie comestible du fruit (pulpe, graines et jus) et la voie 2 utilisant uniquement la pulpe et les graines additionnées à de l'eau (voir V.8.1.). La seconde voie permet en effet de simuler l'utilisation de co-produit frais de fruit de la passion, obtenu après l'extraction du jus réalisée par les entreprises agroalimentaires. Les coques ne sont pas utilisées dans ce procédé, car leur présence empêche le cisaillement des graines et donc l'extraction d'huile.

Dans les deux cas, la matière première est soumise à deux broyages successifs, le premier au blender et le second au mélangeur à immersion à haut cisaillement, afin de rompre les parois cellulaires et de libérer l'huile contenue dans les graines ainsi que les autres composés hydrophiles du fruit. Le mélange obtenu est filtré sur toile de nylon (100 µm) pour obtenir les filtrats 1 et 2, issus des voies 1 et 2, respectivement (Figure III-1). Les filtrats 1 et 2 sont ensuite utilisés pour formuler plusieurs émulsions. Les émulsions 1A et 2A sont préparées par émulsification à l'Ultraturax™ des filtrats correspondants (sans complément d'huile). Les émulsions enrichies 1B et 2B sont issues de l'émulsification à l'Ultraturax™ des filtrats enrichis en huile. La teneur en huile de ces filtrats enrichis est ajustée à 10 % par ajout d'huile de fruit de la passion issue de la pression des graines pour étudier l'influence d'un enrichissement en huile sur les propriétés des émulsions (Figure III-1).

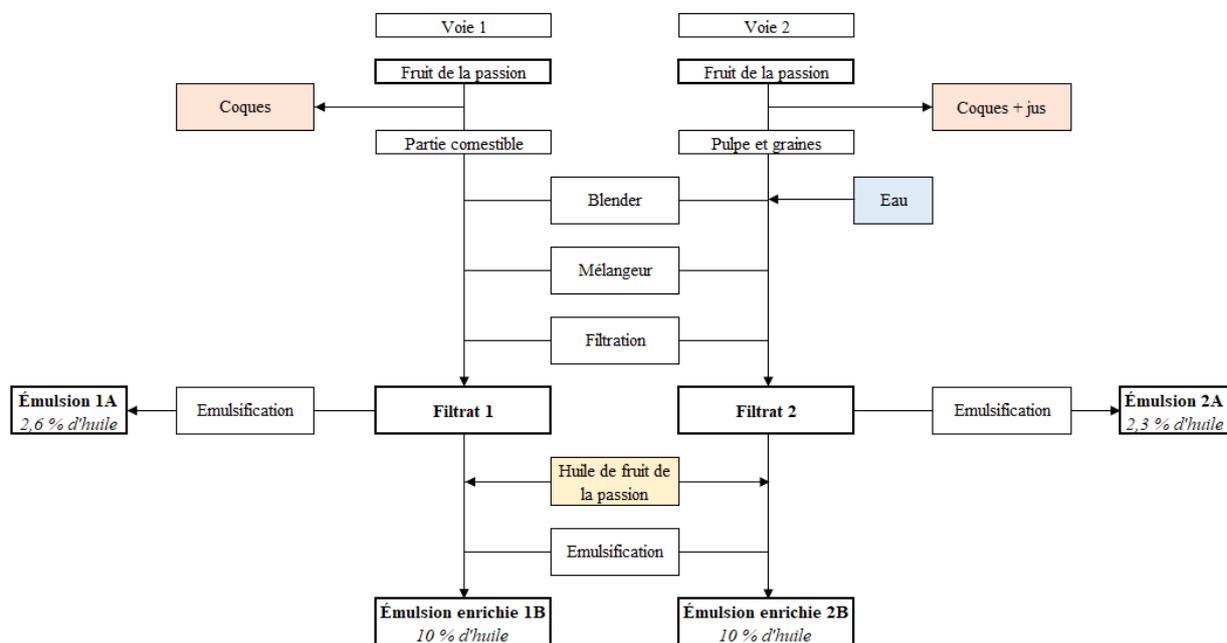


Figure III-1: Procédé discontinu de traitement du fruit de la passion : voies 1 et 2

Les rendements en huile, en protéines et en polyphénols ont été calculés selon la formule suivante :

$$R_y = \frac{R_F \times MS_F \times T_y}{10000}$$

Avec  $R_y$  (g/100g de partie comestible) le rendement en composés  $y$ ,  $R_F$  (g/100g de partie comestible) le rendement en filtrat,  $MS_F$  (g/100g) la matière sèche du filtrat et  $T_y$  (g/100g  $MS_F$ ) la teneur en composés  $y$  du filtrat.

Les deux voies du procédé discontinu permettent d'obtenir des quantités de filtrat similaires (81,1 à 83,7 g de filtrat pour 100g de partie comestible) (Tableau III-2). Les rendements en matière sèche sont égaux (54 g $MS_F$ /100g $MS_{MP}$ ), indiquant que les deux voies du procédé permettent de récupérer la même proportion de matière sèche initiale. Les broyages successifs permettent d'extraire efficacement l'huile, avec plus de 75 % des lipides des graines récupérés dans le filtrat. La présence du jus lors du broyage n'a pas d'influence sur le rendement en huile. Le rendement en protéines est quant à lui supérieur avec la voie 1, grâce à l'extraction des protéines contenues dans le jus du fruit. Près de 75 % des protéines de la partie comestible du fruit sont ainsi obtenues dans le Filtrat 1. Le rendement en polyphénols est également meilleur pour la voie 1, confirmant la présence de polyphénols dans le jus de fruit de la passion. La voie 1 permet ainsi de récupérer 43 % des polyphénols extractibles contenus dans la partie comestible du fruit de la passion.

Tableau III-2: Rendements en filtrats et en molécules actives obtenus par le procédé discontinu voies 1 et 2

		<i>Voie 1</i>	<i>Voie 2</i>
<b>MP</b>	<i>MS<sub>MP</sub></i> (g/100g comestible)	25,4	14,0
	<i>Huile</i> (g/100g comestible)		2,8
	<i>Protéines</i> (g/100g comestible)		2,1
	<i>Polyphénols</i> (mg GAE/100g comestible)		129,5
<b>Filtrat</b>	<i>Total</i> $R_F$ (g/100g comestible)	81,1 ± 4,0	83,7 ± 4,4
	$R_{MSF}$ (g $MS_F$ /100g $MS_{MP}$ )	54,4 ± 0,1	54,6 ± 0,9
	<i>Huile</i> $R_H$ (g/100g comestible)	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,2
	<i>Protéines</i> $R_N$ (g/100g comestible)	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1
	<i>Polyphénols</i> $R_{PP}$ (mg GAE/100g comestible)	55,3 ± 1,1	32,0 ± 0,8

### III.2.2. Procédé continu par extrusion bi-vis

Un extrudeur bi-vis Cleextral BC21 a été utilisé pour mettre en œuvre l'extraction de molécules actives à partir du fruit de la passion en continu (voir V.8.2.). L'extrudeur est composé de sept modules de 100 mm de longueur (Figure III-2). Les vis sont équipées d'éléments de 25 ou 50 mm de longueur composant le profil de vis. La température à l'intérieur de l'extrudeur est régulée à 30 °C par circulation d'eau dans les modules 2, 3, 4, 5 et 7. La matière première est alimentée manuellement dans l'extrudeur au module 1. La filtration s'effectue au niveau du module 6 à l'aide d'éléments percés d'orifices de 1 mm de diamètre. Le positionnement du contrefilet dans le module 7 permet le pressage de la matière.

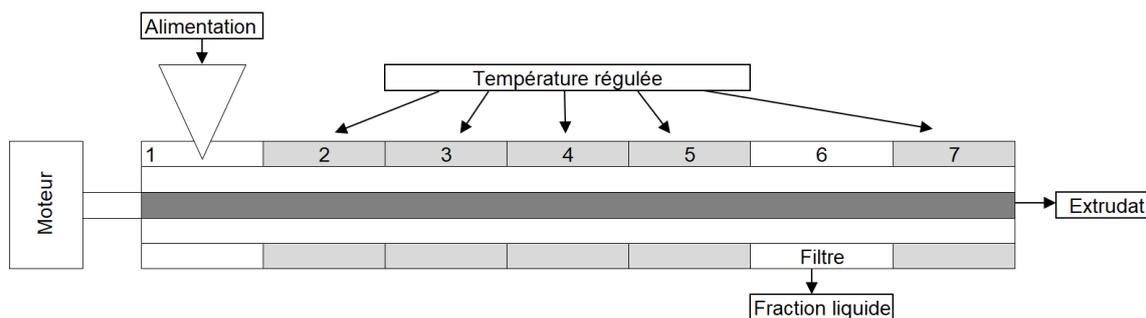


Figure III-2: Schéma de l'extrudeur bi-vis utilisé

Une première extraction a été réalisée en alimentant l'extrudeur avec des morceaux de fruit de la passion à un débit de 6 kg/h ( $Q_{MP}$ ). Le profil de vis utilisé est visible en Figure III-3 et la vitesse de rotation des vis est fixée à 150 rpm.

Une extraction aqueuse de l'extrudat 1 a ensuite été réalisée dans un second temps. La partie solide récupérée lors de la 1<sup>ère</sup> étape a été alimentée dans l'extrudeur à un débit de 6 kg/h et l'eau a été injectée au niveau du module 2 à un débit de 4,8 kg/h. Le profil de vis a été conservé à l'exception du contrefilet placé en module 7 dont le pas de vis a été diminué pour augmenter la restriction (Figure III-3). La vitesse des vis a également été augmentée à 200 rpm.

	1		2		3		4		5		6			7			
Profil 1	T2F 50	T2F 50	C2F 33	C2F 33	C2F 25	BB 90° (5*5)	C2F 33	C2F 25	BB 90° (10*10)	C2F 33	C2F 25	C2F 25	C2F 16	C2F 16	C2F 16	CF2C -25	C2F 33
Profil 2	T2F 50	T2F 50	C2F 33	C2F 33	C2F 25	BB 90° (5*5)	C2F 33	C2F 25	BB 90° (10*10)	C2F 33	C2F 25	C2F 25	C2F 16	C2F 16	C2F 16	CF2C -16	C2F 33

T2F : Vis trapézoïdale à double filet, C2F : vis conjuguée à double filet, BB : disque malaxeur bilobe, CF2C : contre filet conjugué à double filet

Figure III-3: Profil de vis utilisés pour l'extraction 1 et l'extraction aqueuse

Les débits de sortie des fractions solides et liquides ont été mesurés. Les fractions liquides récupérées en sortie ont été filtrées sur toile de nylon (100  $\mu$ m) pour constituer le Filtrat 3 (issu de la 1<sup>ère</sup> extraction) et le Filtrat 4 (issu de la 2<sup>ème</sup> extraction) (Figure IV-4). Plusieurs émulsions ont ensuite été préparées à partir du filtrat 3 : une émulsion non enrichie (émulsion 3), une émulsion enrichie à 2,5 % en huile (émulsion 3A à la teneur semblable à celles des émulsions 1A et 2A) et une émulsion enrichie à 10 % en huile (émulsion 3B à la teneur semblable à celles des émulsions 1B et 2B). Pour les émulsions enrichies, le filtrat 3 a été enrichi en huile de fruit de la passion extraite par pression avant l'émulsification à l'Ultraturax<sup>TM</sup> pendant 2 minutes à 18000 rpm.

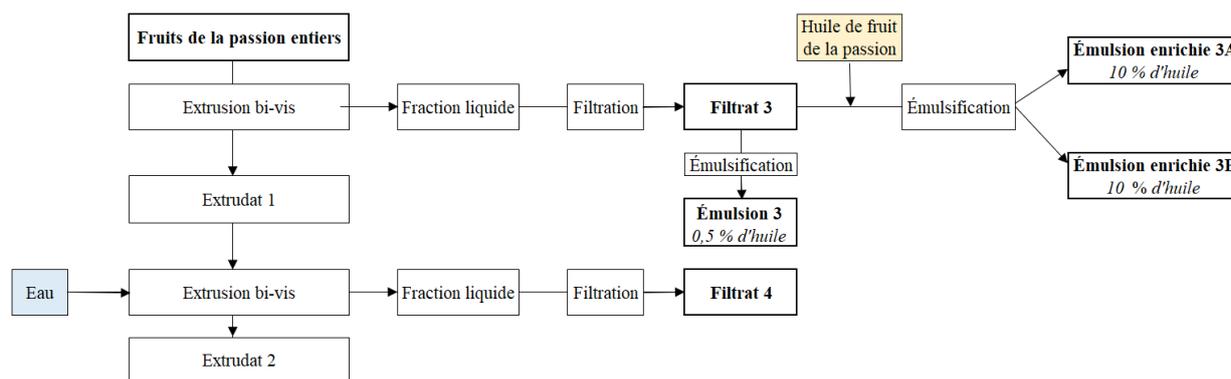


Figure III-4 : Procédé discontinu par extrusion bi-vis

Les rendements en extrudat ( $R_E$ ), en filtrat ( $R_F$ ) et en résidus de filtration ( $R_R$ ) ont été calculés selon la formule :

$$R_X = \frac{Q_X}{Q_{MP}} \times 100$$

Avec  $R_X$  (g/100g fruit) le rendement en fraction considérée,  $Q_X$  (kg/h) le débit de sortie de la fraction considérée et  $Q_{MP}$  (kg/h) le débit d'entrée de la matière première.

Les rendements en matière sèche en extrudat ( $R_{MSE}$ ), en filtrat ( $R_{MSF}$ ) et en résidus de filtration ( $R_{MSR}$ ) ont été calculés selon la formule :

$$R_{MSX} = \frac{Q_X \times MS_X}{Q_{MP} \times MS_{MP}} \times 100$$

Avec  $R_{MSX}$  (g  $MS_X/100g MS_{MP}$ ) le rendement en matière sèche en fraction considérée,  $Q_X$  (kg/h) le débit de sortie de la fraction considérée,  $MS_X$  (g/100g) la matière sèche de la fraction considérée,  $Q_{MP}$  (kg/h) le débit d'entrée de la matière première et  $MS_{MP}$  (g/100g) la matière sèche de la matière première.

Les rendements en huile ( $R_H$ ), en polyphénols ( $R_{PP}$ ) et en protéines ( $R_N$ ) des filtrats ont été calculés selon la formule suivante :

$$R_y = \frac{R_F \times MS_F \times T_y}{10000}$$

Avec  $R_y$  (g/100g de fruit) le rendement en composés  $y$  dans le filtrat,  $R_F$  (g/100g fruit) le rendement en filtrat,  $MS_F$  la matière sèche du filtrat et  $T_y$  (g/100g  $MS_F$ ) la teneur en composés  $y$  du filtrat.

Les rendements par rapport à la matière sèche en huile, en protéines et en polyphénols ont été calculés selon la formule suivante :

$$R_{MSy} = \frac{R_{MSF} \times T_y}{100}$$

Avec  $R_{MSy}$  (g/100g  $MS_{MP}$ ) le rendement en composés  $y$  dans le filtrat,  $R_{MSF}$  (g  $MS_F/100g MS_{MP}$ ) le rendement en matière sèche en filtrat, et  $T_y$  (g/100g  $MS_F$ ) la teneur en composés  $x$  du filtrat.

Tableau III-3: Bilan massique du procédé continu par extraction bi-vis

		<i>Extraction 1</i>	<i>Extraction 2</i>
<i>Alimentation</i>	Q <sub>MP</sub> (kg/h)	6,6	6,0
	MS <sub>MP</sub> (%)	19,9	28,2
	Q <sub>Eau</sub> (kg/h)	/	4,8
	L/S ratio	/	2,8
<i>Extrudat</i>	Q <sub>E</sub> (kg/h)	2,6	5,4
	MS <sub>E</sub> (%)	27,2	22,3
	R <sub>MSE</sub> (g MS <sub>E</sub> /100g MS <sub>MP</sub> )	53,5	38,0
	R <sub>E</sub> (g/100g fruit)	39,1	35,1
<i>Filtrat</i>	Q <sub>F</sub> (kg/h)	3,3	5,0
	MS <sub>F</sub> (%)	13,1	5,2
	R <sub>MSF</sub> (g MS <sub>F</sub> /100g MS <sub>MP</sub> )	32,4	8,1
	R <sub>F</sub> (g/100g fruit)	49,2	32,4
<i>Résidu de filtration</i>	Q <sub>R</sub> (kg/h)	0,3	0,7
	MS <sub>R</sub> (%)	33,8	27,8
	R <sub>MSR</sub> (g MS <sub>R</sub> /100g MS <sub>MP</sub> )	7,4	5,8
	R <sub>R</sub> (g/100g fruit)	4,3	4,3

Les conditions opératoires mises en œuvre avec les fruits de la passion ont généré la formation d'un bouchon dynamique fibreux. Les rendements en extrudats (R<sub>MSE</sub>) et en particules (R<sub>MSR</sub>) peuvent être utilisés comme indicateurs du défibrage des matières premières (Tableau IV-3). Les rendements en extrudats (53 – 71 %) permettent également de vérifier l'efficacité de la déstructuration des fruits (Tableau III-3). Le débit du filtrat (Q<sub>F</sub>) et la matière sèche de l'extrudat (MS<sub>E</sub>) indiquent que la séparation solide / liquide a été efficace. Lors de la deuxième extraction, la diminution du pas de vis du contrefilet dans le module 7 et l'ajout d'eau ont permis un défibrage supplémentaire de la matière, comme l'indiquent les valeurs des rendements en extrudat et en particules de l'extraction 2.

Les rendements en composés actifs dans les filtrats 3 et 4 sont présentés dans le Tableau III-4.

Tableau III-4: Rendement d'extraction en molécules actives pour le procédé continu

		<i>Filtrat 3</i>	<i>Filtrat 4</i>	<i>Procédé global</i>
<b>Huile</b>	R <sub>MSH</sub> (g/100g MS <sub>fruit</sub> )	1,2	0,1	1,4
	R <sub>H</sub> (mg/100g fruit)	246,2	22,7	268,9
<b>Protéines</b>	R <sub>N</sub> (g/100g MS <sub>fruit</sub> )	2,4	0,9	3,2
	R <sub>N</sub> (g/100g fruit)	0,5	0,2	0,7
<b>Polyphénols</b>	R <sub>PP</sub> (mg GAE/100g MS <sub>fruit</sub> )	299,8	79,2	379,0
	R <sub>PP</sub> (mg GAE/100g fruit)	59,7	16,3	76,0

Le rendement en huile de la première étape (246,2 mg/100g de fruit) correspond à environ 18 % du potentiel en lipides des graines du fruit frais (1,4 g/100g de fruit). Le rendement global atteint après l'extraction aqueuse de l'extrudat (268,9 mg/100g de fruit) indique qu'une partie des molécules lipophiles est encore retenue dans le résidu solide, comme observé par certains auteurs lors de l'extraction d'huile de graine de tournesol [1]. Les résultats obtenus pour l'extraction aqueuse d'extrudat de graines de tournesol [2] et des fruits de coriandre [3] semblent indiquer que ce rendement en huile peut être amélioré en modifiant la configuration de la vis et les paramètres opératoires. Concernant l'extraction de l'huile, le procédé discontinu permet d'atteindre des rendements plus élevés que le procédé continu. L'utilisation du mélangeur à haut cisaillement favorise donc l'extraction des lipides par rapport à l'extrudeur, notamment grâce à un broyage plus fin des graines favorisant la libération de l'huile.

La teneur en protéines du fruit frais étant égale à 1,7 g/100g de fruit, la première étape du procédé continu permet de récupérer 28 % des protéines dans le Filtrat 3. L'extraction aqueuse de l'extrudat 1 permet d'atteindre un rendement global en protéines de 0,7 g/100g de fruit, soit 38 % du potentiel. Les rendements supérieurs obtenus pour le procédé discontinu semblent indiquer que les protéines de la partie comestible sont plus accessibles que celles des coques, et que leur extraction est favorisée par l'utilisation du mélangeur et l'application d'un cisaillement plus important de la matière. Les protéines de la partie comestibles sont en effet principalement issues des graines (68 %), qui sont broyées plus finement dans le procédé discontinu.

Le rendement d'extraction en polyphénols de la première étape correspond à 51 % de la teneur en polyphénols extractibles du fruit entier (117,8 mg GAE/100g de fruit). Après l'extraction aqueuse de l'extrudat, le procédé continu permet de récupérer 64,5 % des polyphénols extractibles du fruit. L'extraction des polyphénols est donc améliorée en extrusion par rapport au procédé discontinu, notamment grâce à l'ajout d'eau.

### III.3. Caractérisation des émulsions

#### III.3.1. Composition chimique

La composition chimique des filtrats obtenus avec le procédé discontinu (Filtrats 1 et 2) et avec le procédé continu par extrusion bi-vis (Filtrats 3 et 4) est présentée dans le Tableau III-5.

Tableau III-5: Composition chimique des filtrats

		Filtrat 1	Filtrat 2	Filtrat 3	Filtrat 4
<b>Matière sèche</b>	(g/100g)	17,2 ± 0,6	8,7 ± 0,5	13,1 ± 0,2	5,2 ± 0,0
<b>Teneur en huile</b>	(g/100g de filtrat)	2,6 ± 0,1	2,3 ± 0,3	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,0
	(g/100g MS filtrat)	15,6 ± 1,1	25,5 ± 1,9	3,8 ± 0,1	1,4 ± 0,0
<b>Protéines</b>	(g/100g de filtrat)	2,0 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0
	(g/100g MS filtrat)	11,4 ± 0,0	14,1 ± 0,0	7,3 ± 0,0	10,7 ± 0,0
<b>Polysaccharides</b>	(g GAE/L de filtrat)	48,0 ± 2,4	37,3 ± 1,0	68,7 ± 2,5	23,6 ± 0,6
	(g/100g MS filtrat)	28,1 ± 1,4	40,5 ± 0,6	52,4 ± 1,9	45,9 ± 1,2
<b>Polyphénols</b>	(g GAE/L de filtrat)	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,5 ± 0,0
	(g GAE/100g MS filtrat)	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1
<b>IC<sub>50</sub></b>	(mg/L de filtrat)	2913 ± 180	2855 ± 123	838 ± 29	704 ± 15

La voie 1 du procédé discontinu utilisant toute la partie comestible du fruit permet d'obtenir le filtrat le plus concentré en matière sèche (17,2 %). Les quantités de matière sèche récupérées dans les filtrats 1, 2 et 3 par rapport à la matière sèche entrante des procédés sont cependant similaire (62 – 70 %).

Concernant l'extraction d'huile et de protéines, les filtrats 1 et 2 présentent des teneurs plus élevées que les filtrats 3 et 4. L'utilisation du mélangeur à haut cisaillement favorise donc l'extraction de ces molécules par rapport à l'extrudeur, notamment grâce à un broyage plus fin des graines menant à une libération de l'huile plus aisée. L'extraction des autres composés analysés est cependant améliorée en extrusion par rapport au procédé discontinu. Les filtrats issus de l'extrusion (Filtrats 3 et 4) présentent des teneurs plus élevées en polysaccharides et en polyphénols. Les teneurs du Filtrat 4 indiquent que l'étape d'extraction aqueuse permet une récupération accrue de ces composés. Les filtrats du procédé continu contiennent deux fois plus de polyphénols que les filtrats 1 et 2, grâce à l'extraction des polyphénols contenus dans les coques de fruit de la passion. Les polyphénols des coques représentent en effet d'après le Tableau III-1 la moitié des polyphénols extractibles à l'eau du fruit de la passion.

Sur la Figure III-5, les micrographies optiques des filtrats (F1, F2 et F3) montrent une dispersion de la phase lipidique dans le milieu aqueux, quelle que soit la méthode de préparation employée (mélangeur à haut cisaillement pour les filtrats 1 et 2, extrudeur bi-vis pour le filtrat 3) (voir V.8.3.1.). Ainsi, les filtrats (F1, F2) et les émulsions (1A, 2A) du procédé discontinu présentent des gouttelettes de diamètres inférieurs à 10 µm. Le procédé continu génère quant à lui un filtrat F3 et une émulsion 3A présentant une fine dispersion de gouttelettes de lipides de tailles 1 à 5 µm. Pour toutes les émulsions enrichies (B), l'addition d'huile végétale se traduit par une population abondante en gouttelettes plus grosses, de taille entre 8 et 15 µm.

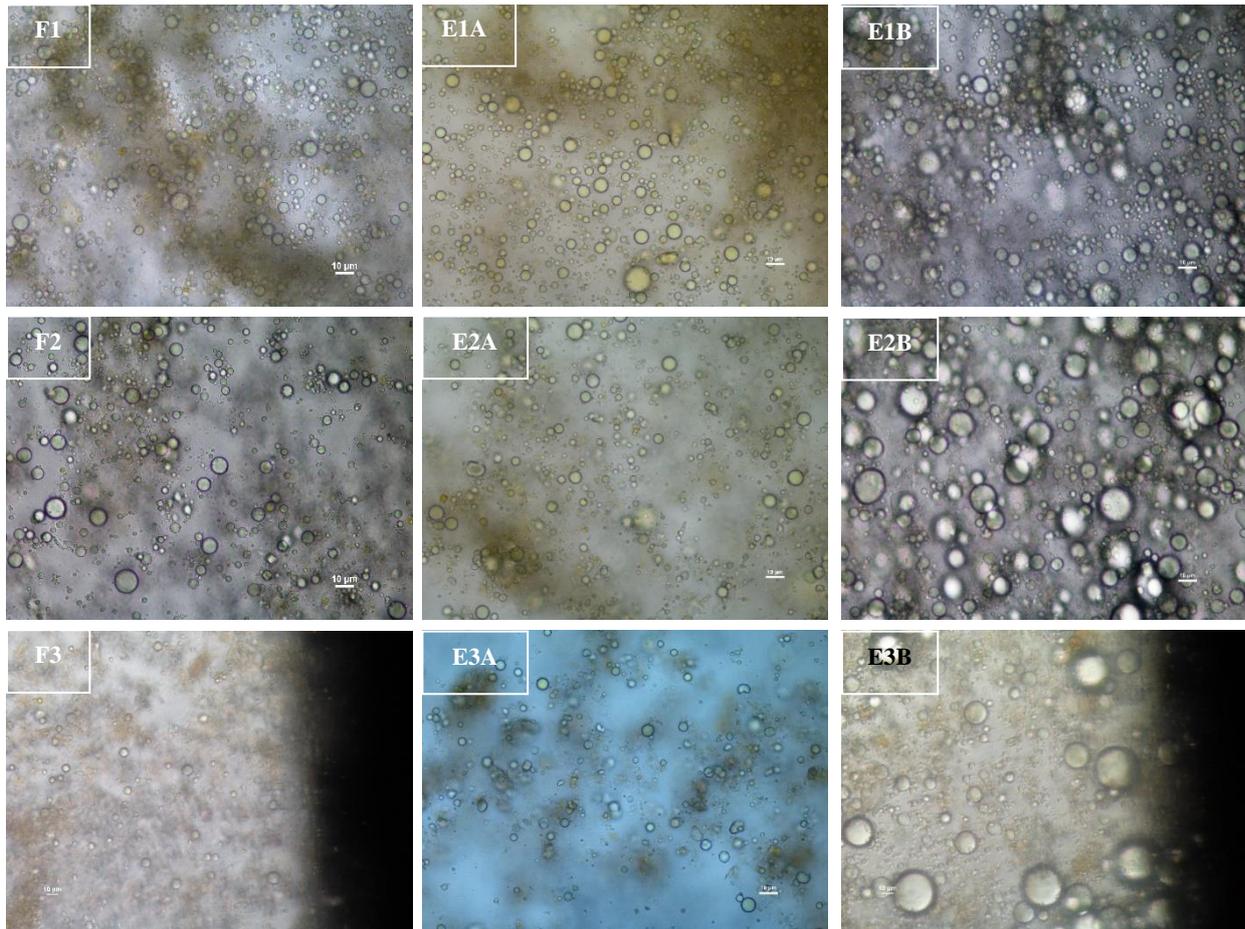


Figure III-5: Micrographies optiques des filtrats et des émulsions - échelle 10 µm (x 40)

### III.3.2. Distribution de la taille des gouttelettes

Les émulsions obtenues avec le procédé discontinu (émulsions 1A, 1B, 2A et 2B) ont été étudiées par granulométrie laser à l'aide d'un Mastersizer 2000 (Malvern) (voir V.8.3.2.).

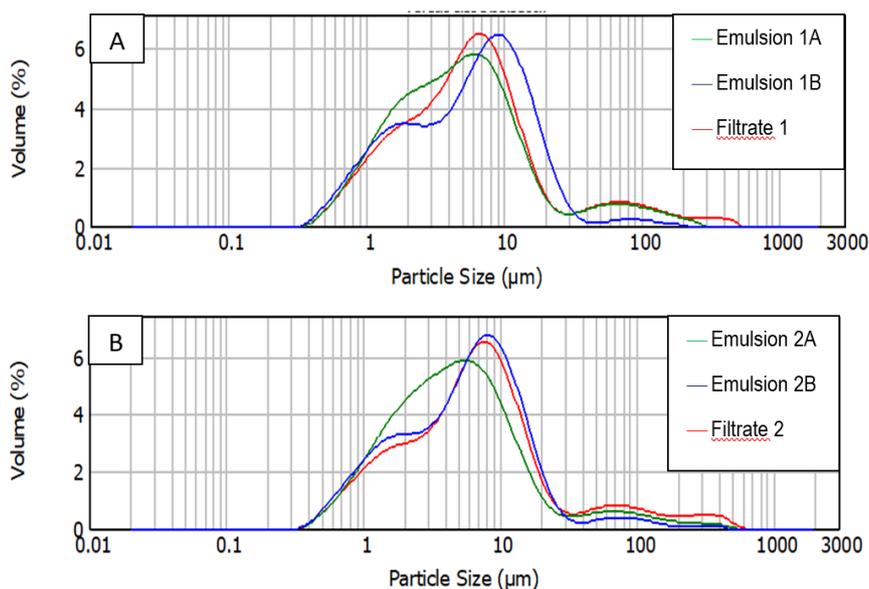


Figure III-6: Profil de distribution des tailles de gouttelettes pour les échantillons du procédé discontinu

Les tailles de gouttelettes d'huile sont restées constantes au cours des expériences, indiquant qu'aucun phénomène de coalescence ne se produit durant l'analyse. Les filtrats et les émulsions B montrent des profils de distributions très similaires avec 3 populations de gouttes (Figure III-6). La population la plus importante rassemble les gouttes d'environ 8  $\mu\text{m}$ . Les deux autres tailles les plus probables sont autour de 1,5  $\mu\text{m}$  et 80  $\mu\text{m}$ . Pour les émulsions A, la population ayant une taille comprise entre 1,5 et 6  $\mu\text{m}$  est plus importante comparée aux filtrats, ce qui confirme que l'émulsification tend à fractionner les gouttes. Ce résultat est confirmé par le diamètre de Sauter  $d_{32}$  inférieur pour les émulsions A (Tableau III-6).

Tableau III-6: Diamètres de Sauter de gouttelettes obtenus par granulométrie laser

	$d_{32}$ ( $\mu\text{m}$ )
Filtrat 1	$3,10 \pm 0,06$
Emulsion 1A	$2,83 \pm 0,02$
Emulsion 1B	$2,84 \pm 0,06$
Filtrat 2	$3,39 \pm 0,06$
Emulsion 2A	$2,87 \pm 0,04$
Emulsion 2B	$3,06 \pm 0,05$

### III.3.3. Rhéologie des émulsions

#### III.3.2.1. Principe des mesures rhéologiques

Les mesures rhéologiques caractérisent la réponse d'un fluide soumis à une contrainte, en termes d'écoulement et de déformation. La compréhension de ces phénomènes est essentielle dans de nombreux domaines et notamment pour la formulation d'émulsions et de peintures. La viscosité d'une peinture est ajustée avec soin afin que le produit soit suffisamment fluide pour être appliqué sans effort mais suffisamment visqueux pour éviter les coulures ou la décantation des pigments dans le pot. L'étude rhéologique d'une émulsion peut également permettre de prévoir sa stabilité physique.

Un rhéomètre rotatif à contrainte imposée équipé d'une géométrie cône plan a été utilisé pour toutes les mesures (Figure III-7).

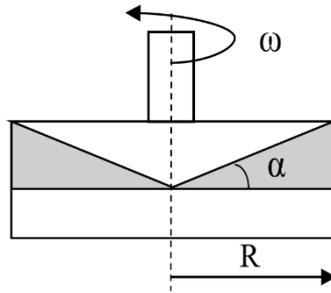


Figure III-7: Schéma d'une géométrie cône-plan

Le fluide est alors soumis à un cisaillement entre la surface solide immobile (stator) sur laquelle il repose et la surface de rayon R (rotor), inclinée d'un angle  $\alpha$ , tournant à une vitesse  $\omega$  avec un couple C.

Pour l'étude des propriétés d'écoulement, en régime permanent, la contrainte de cisaillement  $\tau$ , obtenue à partir du couple à appliquer pour maintenir le mouvement du rotor, est déterminée en fonction du gradient de cisaillement  $\gamma$ . La viscosité  $\eta$  est alors calculée à partir de l'équation suivante :

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma}$$

La relation entre la contrainte de cisaillement et le gradient de cisaillement permet de classer les fluides en deux grandes familles. Si cette relation est linéaire, le fluide est newtonien et la viscosité reste constante quelle que soit la vitesse de cisaillement. Pour les fluides non newtoniens, la contrainte et le gradient de cisaillement ne sont pas proportionnels. L'étude de la viscosité détermine alors le comportement rhéofluidifiant (la viscosité diminue avec le gradient) ou rhéoépaississant (la viscosité augmente avec le gradient) du fluide.

Les propriétés viscoélastiques des fluides sont caractérisées en régime dynamique oscillatoire. Les fluides viscoélastiques se comportent différemment en fonction de la déformation qu'ils subissent et possèdent ainsi à la fois les propriétés élastiques d'un solide et visqueuses d'un liquide. Le balayage en amplitude, au cours duquel le fluide est soumis à une déformation sinusoïdale d'amplitude croissante, permet de définir le domaine linéaire de viscoélasticité (DLVE). Dans ce domaine, les propriétés élastiques dominent et la structure interne du fluide n'est pas perturbée par la déformation. La limite de ce domaine, associée au point d'écoulement, est caractérisée par une contrainte critique  $\tau_C$  représentant la transition entre la réponse élastique et la réponse visqueuse du fluide. Ces deux réponses sont modélisées par les modules  $G'$ , module élastique ou module de stockage, et  $G''$ , module visqueux ou module de perte, qui sont respectivement les parties réelles et imaginaires du module complexe de cisaillement  $G^*$ .

$$G^* = G' + iG'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} (\cos\delta + i\sin\delta)$$

Avec  $\tau_0$  la contrainte imposée en Pa,  $\gamma_0$  l'amplitude de la déformation imposée,  $\delta$  l'angle de déphasage entre la déformation et la contrainte.

### III.3.2.2. Propriétés d'écoulement

Sur la Figure III-8, la viscosité apparente ( $\eta$ ) et la contrainte de cisaillement ( $\tau$ ) des émulsions et filtrats ont été tracées en fonction de la vitesse de déformation ( $\dot{\gamma}$ ) (voir V.8.3.3.).

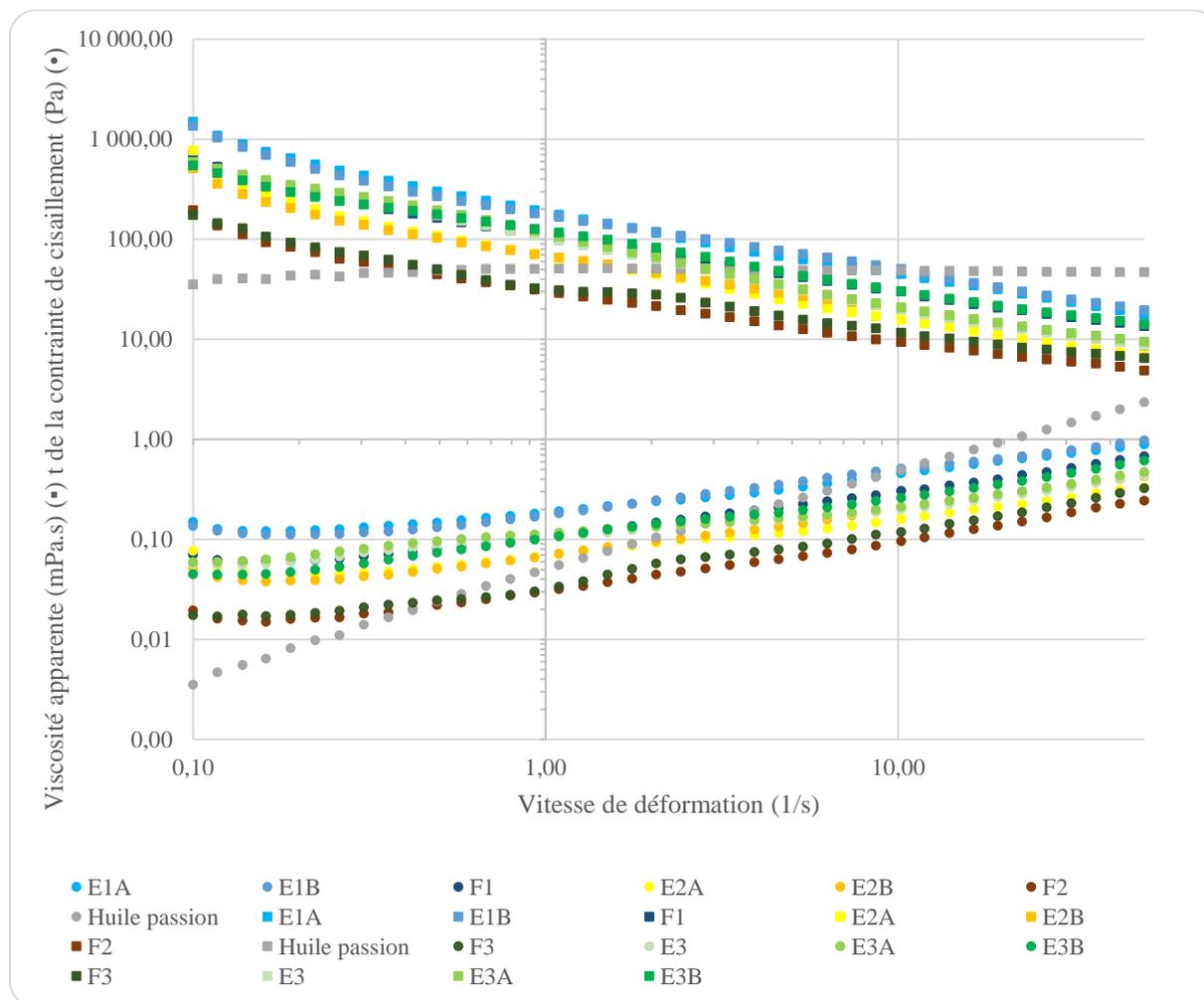


Figure III-8: Evolution de la viscosité apparente (•) et de la contrainte de cisaillement (•) des échantillons en fonction de la vitesse de déformation

L'huile de fruit de la passion a ici été utilisée comme référence en tant que fluide newtonien, dont la contrainte est proportionnelle au gradient de vitesse et la viscosité constante en fonction de la déformation. Les filtrats et les émulsions se comportent quant à eux comme des fluides rhéofluidifiants, dont la viscosité diminue avec l'augmentation du gradient de déformation.

Les échantillons obtenus par la voie 1 (F1, E1A, E1B) ont les viscosités les plus élevées, suivis des échantillons issus de l'extrusion (F3, E3, E3A et E3B) puis des échantillons obtenus par la voie 2 (F2, E2A, E2B). Les échantillons du groupe 1 sont les plus riches en matières sèches ( $MS_{F1} = 17,2 \%$ ) comparés aux échantillons du groupe 2 ( $MS_{F2} = 8,7 \%$ ), ce qui peut expliquer en partie les différences de viscosités observées. De plus, les échantillons des groupes 1 et 3 sont plus riches en polysaccharides et peuvent également contenir des émulsifiants naturels telles que les protéines contenues dans le jus ou issues des coques de fruit de la passion (pour

les échantillons issus de l'extrusion), d'où leurs viscosités accrues par rapport aux échantillons de la voie 2.

Par ailleurs, on remarque que les filtrats présentent des viscosités plus faibles que les émulsions correspondantes ( $\Delta = 3-13 \text{ mPa.s}$ ), ce qui signifie que l'étape d'émulsification a pour effet d'améliorer la viscosité du milieu. L'enrichissement en huile effectué a également permis d'augmenter légèrement la viscosité des émulsions B par rapport aux émulsions A.

### III.3.2.3. Propriétés viscoélastiques

Les courbes du module élastique  $G'$  et du module visqueux  $G''$  en fonction de la déformation obtenues après un balayage en amplitude sont présentées sur les figures III-9 et III-10 (voir V.8.3.3.).

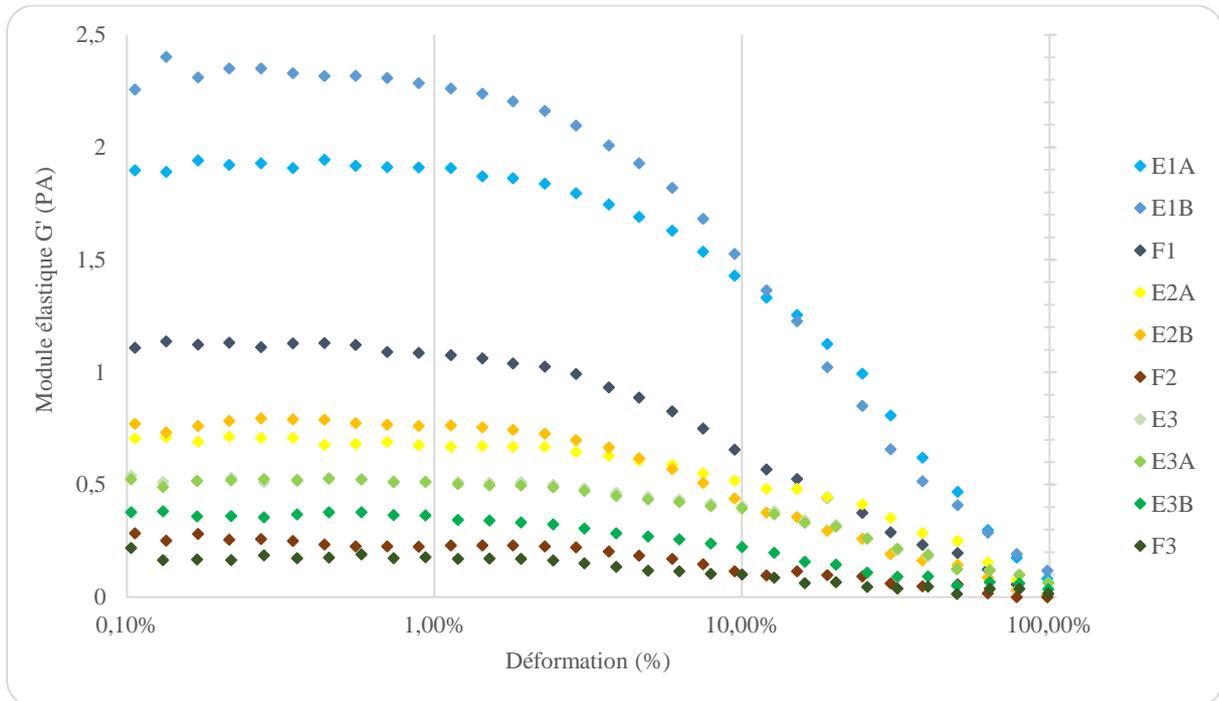


Figure III-9 : Evolution du module élastique  $G'$  en fonction de la déformation

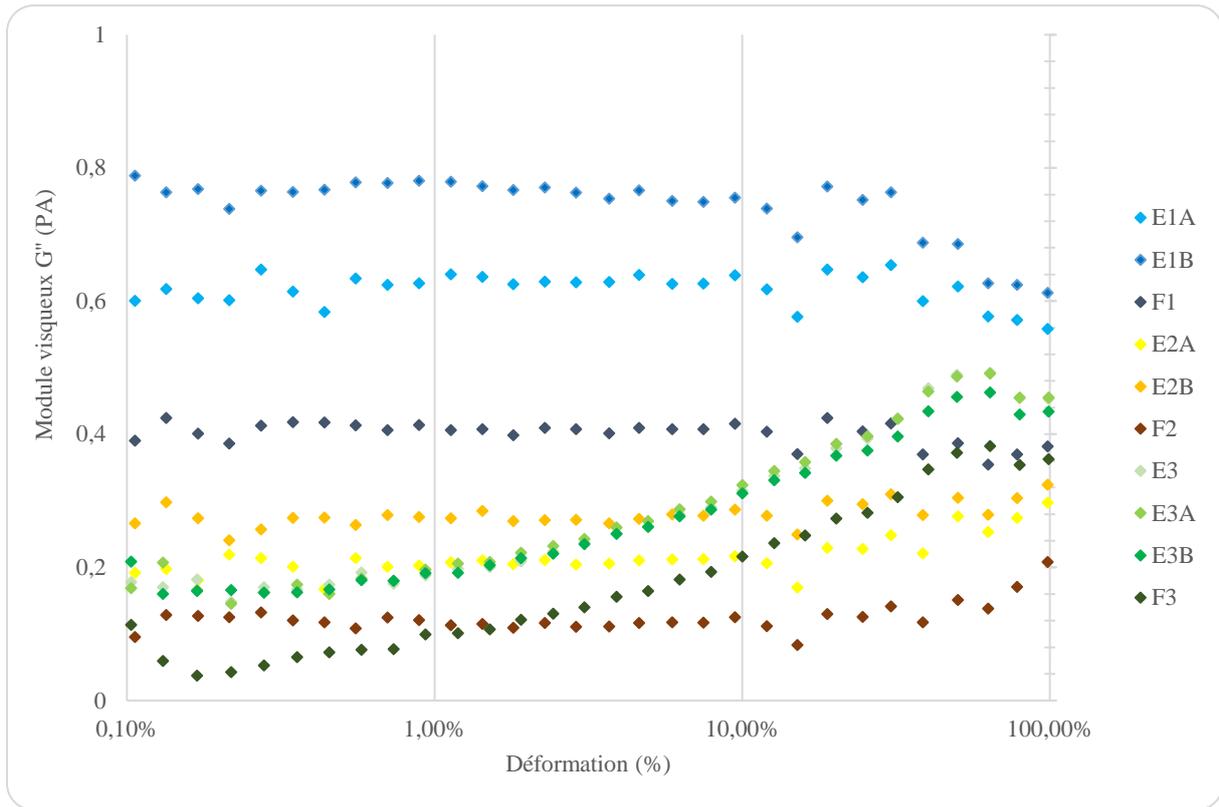


Figure III-10: Evolution du module visqueux  $G''$  en fonction de la déformation

Les données rhéologiques permettent de caractériser le domaine linéaire de viscoélasticité et le point de croisement entre les deux modules  $G'$  et  $G''$  (Tableau III-7). La limite du DLVE a été fixée à la déformation critique  $\gamma_C$  correspondant à une diminution de 10 % de la valeur du module élastique  $G'$ .

Tableau III-7 : Valeurs caractéristiques du DLVE pour les émulsions et les filtrats

	$G'$ (Pa)	$G''$ (Pa)	$\gamma_C$ (%)	$G'=G''$ (Pa)	$\gamma_{G'=G''}$ (%)
<b>Emulsion 1A</b>	1,9262	0,6758	4,6	0,6354	29,0
<b>Emulsion 1B</b>	2,3082	0,7411	3,7	0,7965	26,2
<b>Filtrat 1</b>	1,1121	0,4294	2,9	0,4365	22,1
<b>Emulsion 2A</b>	0,7109	0,1994	3,7	0,2611	45,4
<b>Emulsion 2B</b>	0,7507	0,2654	3,1	0,3129	21,1
<b>Filtrat 2</b>	0,2641	0,1110	0,5	0,1300	8,9
<b>Emulsion 3</b>	0,5207	0,1965	3,9	0,3472	15,4
<b>Emulsion 3A</b>	0,5216	0,1784	3,9	0,3762	15,2
<b>Emulsion 3B</b>	0,3493	0,2055	3,1	0,2575	4,8
<b>Filtrat 3</b>	0,1954	0,1054	1,9	0,1493	3,4

Pour tous les échantillons, le module de stockage  $G'$  est 2 à 3 fois supérieur au module de perte  $G''$  dans le domaine linéaire de viscoélasticité (DLVE), traduisant ainsi le comportement élastique dominant des filtrats et des émulsions dans ce domaine. La longueur du DLVE est cependant différente selon le type d'échantillons. La comparaison des déformations critiques obtenues montre que le DLVE des émulsions est plus long que celui de leur filtrat correspondant. Les émulsions, grâce à leur viscosité accrue, ont donc une meilleure résistance face à la déformation que les filtrats et ne vont s'écouler qu'à partir d'une déformation plus importante ( $\gamma_C$ ). L'observation de la déformation correspondant au point de croisement des modules confirme cette analyse : les valeurs de  $\gamma_{G'=G''}$  reflétant la transition entre la réponse élastique et la réponse visqueuse des échantillons sont plus élevées pour les émulsions que pour les filtrats.

Les échantillons du groupe 1 montrent les domaines linéaires de viscoélasticité les plus longs, tandis que les échantillons du groupe 2 ont les domaines les plus courts (Tableau III-7). Il apparaît donc que les facteurs favorables à une viscosité plus élevée (émulsions par rapport aux filtrats ou bien groupe 1 par rapport au groupe 2) confèrent une meilleure stabilité au milieu. Conserver le jus du fruit de la passion et ses molécules naturelles émulsifiantes, au sein de la formulation, fournit des échantillons pré-formulés avec une meilleure capacité de déformation, se traduisant par un seuil d'écoulement plus élevé.

Les DLVE plus courts observés pour les émulsions B comparés aux émulsions A correspondantes peuvent s'expliquer par la population plus importante de grosses gouttelettes (8 – 15  $\mu\text{m}$ ) dans les émulsions B. En effet, la présence de gouttelettes de diamètres plus importants favorise les réarrangements entre gouttelettes et mène à une plus faible résistance à la déformation pour ces émulsions. Arditty a ainsi également observé une diminution de la déformation critique de 7 à 2 % lorsque le diamètre de gouttes s'accroît de 10  $\mu\text{m}$  dans des émulsions directes huile-dans-eau [4]. Le DLVE plus court observé pour l'émulsion 3B par rapport aux émulsions 3 et 3A (Tableau III-7), peut donc être corrélé à une augmentation du diamètre des gouttelettes dans les échantillons enrichis à 10 % après extrusion, conformément à l'observation microscopique des émulsions 3A et 3B (Figure III-5).

#### III.3.4. Stabilité des émulsions obtenues

La stabilité des émulsions a été évaluée grâce à l'indice de crémage (CI) (voir V.8.3.4.). Lors du vieillissement d'une émulsion un phénomène de déstabilisation réversible appelé crémage peut avoir lieu : l'émulsion surnage tandis qu'une couche de sérum apparaît en bas du flacon. L'indice de crémage est alors obtenu en divisant la hauteur de sérum par la hauteur totale, selon la formule suivante :

$$CI (\%) = \frac{H_S}{H_T} \times 100$$

Avec CI l'indice de crémage en %,  $H_S$  la hauteur de sérum en mm, et  $H_T$  la hauteur de l'émulsion en mm.

Après 14 jours, l'émulsion 3A est la plus stable, conduisant à un indice de crémage inférieur à 20 % (Figure III-11). Cette émulsion préparée à partir du fruit entier est plus stable que les émulsions 1A et 2A (CI : 32 %) préparées sans les coques de fruit, indiquant l'extraction

probable d'émulsifiants naturels. Les polyphénols, présents en plus grande quantité dans l'émulsion 3A que dans les émulsions 1A et 2A, peuvent également jouer un rôle dans la stabilisation de l'émulsion. En effet, les travaux de Di Mattia *et al* et Sabouri *et al* ont montré que certains polyphénols peuvent se concentrer à la surface des gouttelettes d'huile en se liant aux molécules émulsifiantes présentes à l'interface *via* des liaisons hydrogène ou des interactions hydrophobes [5, 6]. Cette couche de polyphénols améliore le degré de dispersion de l'huile et renforce la résistance de la surface des gouttelettes face à une dilatation ou à un gradient de tension de surface. L'ajout de catéchine et de quercétine a ainsi permis d'améliorer la stabilité d'émulsion huile-dans-eau sur une durée de 10 jours [6]. Il est cependant difficile de prédire ces propriétés, qui dépendent notamment de la nature des molécules émulsifiantes et du pH de la solution. Concernant nos milieux, l'association de polyphénols et de molécules émulsifiantes naturelles extraites lors de l'extrusion semble plus favorable à la stabilisation des émulsions que les composés extraits par le procédé discontinu.

L'enrichissement en huile conduit à des émulsions B présentant des stabilités inférieures aux émulsions A correspondantes. L'émulsion 2B enrichie en huile et ne contenant pas de molécules émulsifiantes issues du jus ou des coques, présente ainsi l'indice de crémage le plus élevé. La stabilité renforcée des émulsions A par rapport aux émulsions B est en accord avec les tailles de gouttes plus faibles (Figures III-5 et Tableau III-6) et les DLVE plus grands (Figure III-10) obtenus pour les émulsions A.

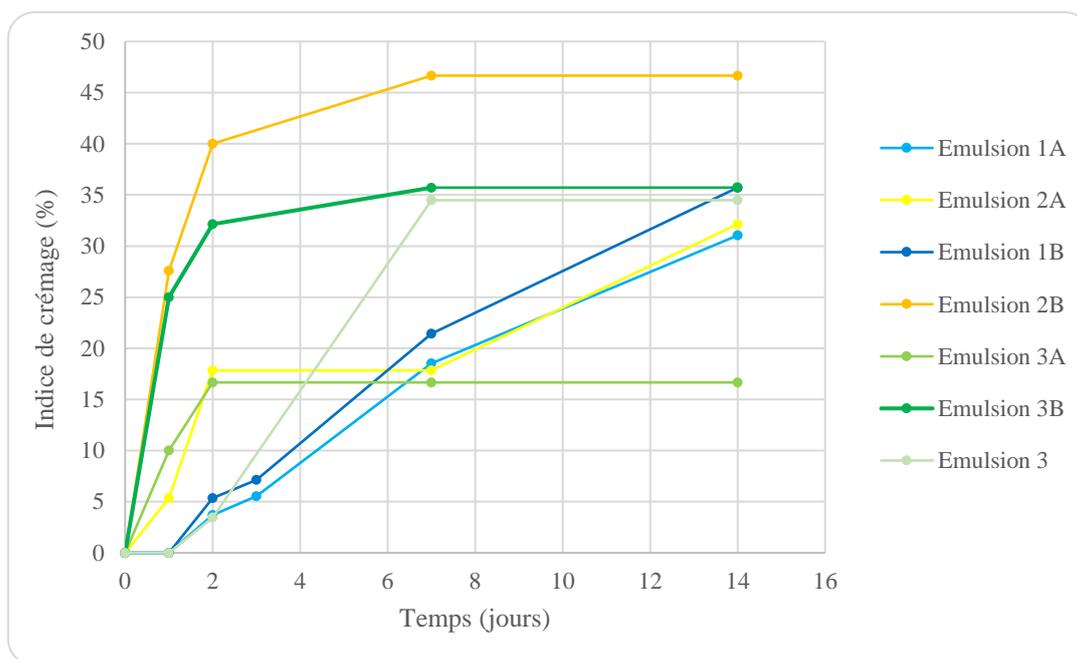


Figure III-11: Stabilité des émulsions évaluée par l'indice de crémage

### III.4. Conclusion

Les procédés d'extraction de molécules d'intérêt à partir d'une matière première végétale mettent généralement en œuvre une extraction dédiée à chaque type de composé à partir d'une partie spécifique de la plante dans une stratégie de bioraffinage. Dans ce chapitre, une méthode éco-compatible alternative se substituant à différentes extractions a été développée. La stratégie mise en œuvre repose sur l'extraction combinée de plusieurs types de molécules d'intérêt

(lipophiles et hydrophiles) pour la préparation de milieux organisés pouvant ensuite servir de base de formulation pour les peintures écologiques. Pour ce faire, un traitement thermomécanique du fruit de la passion a été évalué selon deux procédés. D'une part, un procédé discontinu capable de traiter 500 grammes de la partie comestible (pulpe, graines et jus) du fruit par des effets de mélange et de cisaillement, et d'autre part, un procédé continu impliquant un extrudeur bi-vis alimenté par six kilogrammes de fruits frais entiers par heure.

L'extraction de l'huile est favorisée par le cisaillement important des graines observé au cours du procédé discontinu. La voie 1 de ce procédé (conservant le jus du fruit) permet ainsi de récupérer 75 % des lipides contenus dans les graines du fruit et de co-extraire 75 % des protéines et 43 % des polyphénols extractibles de la partie comestible.

Le ratio « solide : liquide » du fruit de la passion frais s'est montré adapté au profil de vis choisi pour l'extrusion, permettant ainsi le défibrage et le pressage de la matière. Ce procédé conduit à des filtrats avec des teneurs élevées en polyphénols (1 g GAE / 100 g MS), représentant 67,5 % des polyphénols extractibles du fruit entier. En effet, la présence des coques riches en extractibles hydrophiles (44,2 g / 100 g de MS) et l'addition d'eau lors de la seconde extraction améliorent la récupération des molécules hydrosolubles. Une optimisation du profil de vis permettrait d'améliorer les rendements, comme suggérée par les travaux de Evon *et al* [2].

La dispersion de l'huile végétale dans les milieux résultants a été mise en évidence par microscopie optique et par granulométrie des filtrats et des émulsions (diamètre moyen des gouttelettes d'environ 3 µm). Les émulsions 1A et 1B du procédé discontinu ont les viscosités les plus élevées, correspondant également à des teneurs élevées en protéine et en matière sèche. Cette caractéristique est importante pour assurer une consistance adéquate à la formulation finale de peinture. De plus, ces émulsions présentent les seuils d'écoulement les plus élevés, caractéristique recherchée pour obtenir une peinture sans coulure à l'application. Les émulsions préparées à partir de filtrats obtenus par extrusion du fruit entier (émulsion 3A) se sont révélées les plus stables dans le temps. Les polyphénols et polysaccharides co-extraits agissent probablement en faveur de cette stabilité physique. Les polyphénols peuvent également contribuer à la conservation des émulsions naturelles.

L'utilisation de procédés thermomécaniques pour valoriser les co-produits ou les écarts de production du fruit de la passion permettrait de minimiser les coûts en énergie et en solvant tout en réduisant les étapes d'extraction, ce qui permet de limiter les impacts environnementaux. Dans le même temps, l'extrudat pourrait être réutilisé pour la production d'agromatériaux par thermo-pression selon l'exemple de l'extrudat de tournesol [7]. Pour l'extrusion, une alimentation de 100 kg mènerait à la production de 78,5 kg d'émulsion pré-formulée. Si la même quantité de fruit est utilisée pour la production de jus, le co-produit résultant de cette transformation, composé de graines et de pulpe, pourrait être traité par le procédé discontinu (voie 2) et permettrait d'obtenir 41,9 kg d'émulsion pré-formulée.

### Références bibliographiques

1. Evon P., Vandebossche V., Pontalier P.Y., Rigal L., Direct extraction of oil from sunflower seeds by twin-screw extruder according to an aqueous extraction process: Feasibility study and influence of operating conditions, *Industrial Crops and Products*, 2007, 2, 251-259
2. Evon P., Vandebossche V., Pontalier P.Y., Rigal L., Aqueous extraction of residual oil from sunflower press cake using a twin-screw extruder: Feasibility study, *Industrial Crops and Products*, 2009, 29, 455-465
3. Sriti J., Msaada K., Talou T., Faye M., Kartika I., Marzouk B., Extraction of coriander oil by twin-screw extruder: Screw configuration and operating conditions effect, *Industrial Crop Products*, 2012, 40, 355-360
4. Arditty S., Fabrication, stabilité et propriétés rhéologiques des émulsions stabilisées par des particules colloïdales, Analyse de données, Statistiques et Probabilités, Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2004
5. Di Mattia C.D., Sacchetti G., Mastrocola D., Pittia P., Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions, *Food Research International*, 2009, 42, 1163-1170
6. Sabouri S., Geng J., Corredig M., Tea polyphenols association to caseinate-stabilized oil-water interfaces, *Food Hydrocolloids*, 2015, 51, 95-100
7. Evon P., Vandebossche V., Pontalier P.Y., Rigal L., New thermal insulation fiberboards from cake generated during biorefinery of sunflower whole plant in a twin-screw extruder, *Industrial Crops and Products*, 2014, 52, 354-362

## *Chapitre IV : Mise en œuvre de formulations pour des applications dans l'industrie des peintures naturelles écologiques*

---

IV.1. Composition des peintures naturelles Derivery .....	146
IV.2. Incorporation des huiles végétales issues de co-produits végétaux .....	149
IV.2.1. Choix des formules .....	149
IV.2.2. Évaluation des nouvelles formulations .....	150
IV.2.3. Incorporation des fractions lipidiques extraites avec les procédés intégrés .....	157
IV.3. Addition des extraits actifs .....	157
IV.3.1. Choix de la formule .....	157
IV.3.2. Evaluation des nouvelles formulations .....	158
IV.3.3. Evaluation de la protection antimicrobienne .....	159
IV.4. Conclusion .....	166
<i>Références bibliographiques</i> .....	168

## **Chapitre IV : Mise en œuvre de formulations pour des applications dans l'industrie des peintures naturelles écologiques**

Le Laboratoire Natura, département de la société DERIVERY, a développé une gamme de produits respectueux de l'environnement et de la qualité de l'air, produits formulés à partir d'émulsions végétales. Pour répondre à l'évolution du cahier des charges de certaines formulations et pour diversifier les matières premières, les nouveaux ingrédients obtenus et caractérisés (chapitres II et III) vont être introduits dans quelques formulations.

Tout d'abord, les huiles végétales extraites par pression des graines de fruit de la passion et de goyavier rouge sont incorporées dans les formules de peinture en remplacement total ou partiel des huiles végétales (huile de chanvre) ou des standolies (lin ou tournesol) habituellement utilisées. Les performances des peintures contenant les nouvelles huiles sont comparées aux peintures actuellement commercialisées, notamment en caractérisant les propriétés des films obtenus. Les filtrats obtenus par le procédé intégré sont également évalués en tant que phase aqueuse pour la formulation de liants émulsionnés.

Ensuite, des extraits bruts et purifiés de pulpe de fruit de la passion et de goyavier rouge sont ajoutés aux formulations et leur capacité à inhiber le développement microbien dans une peinture naturelle est évaluée. L'influence des nouvelles formules sur la capacité de séchage des peintures est également étudiée.

### **IV.1. Composition des peintures naturelles Derivery**

Les peintures naturelles écologiques proposées par Derivery sont à base d'émulsions d'huiles végétales. Certaines de ces formules peuvent contenir jusqu'à 98 % d'ingrédients naturels ou d'origine naturelle. Certifiée par le label PURE, la gamme Natura™ propose des peintures intérieures et extérieures aux taux d'émissions de COV très faibles (< 0,1g/L), correspondant à la catégorie A+ (Tableau I-3).

Les formules de ces peintures peuvent être principalement décomposées en deux demi-produits : des bases pigmentaires et des émulsions aqueuses. La base pigmentaire est une dispersion aqueuse de charges et de pigments permettant à la peinture d'être opaque et couvrante. L'émulsion inclue des huiles végétales, le plus souvent transformées (ex : Standolie), ou un vernis qui est obtenu par dissolution de résines naturelles dans une ou plusieurs huiles végétales chauffées. L'émulsion et la base pigmentaire sont mélangées afin d'obtenir la peinture, appelée finition (Figure IV-1). Les matières premières utilisées pour la formulation des demi-produits et de la finition sont répertoriées dans le Tableau IV-1.

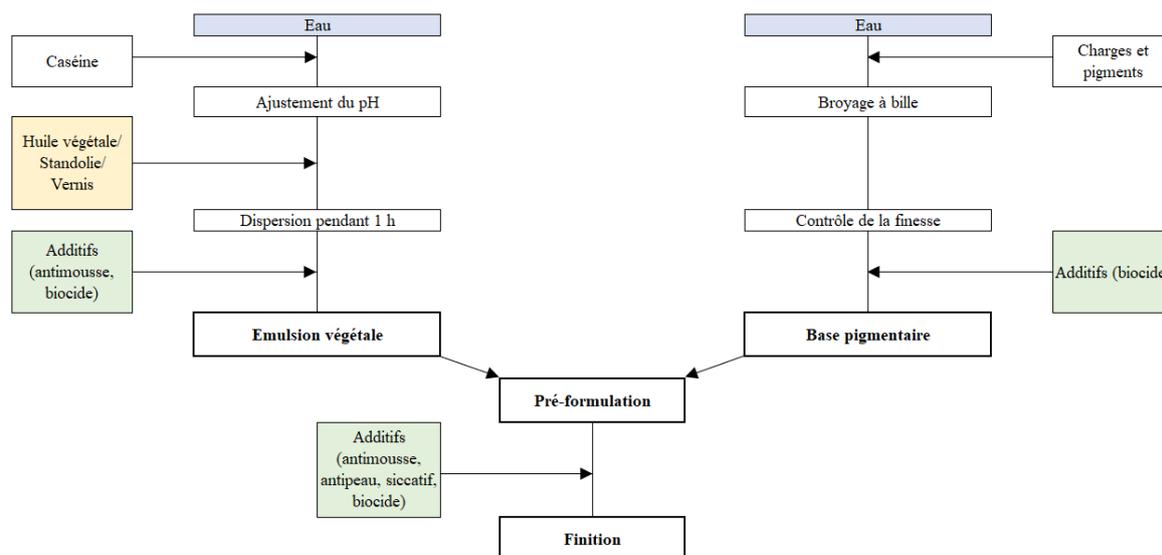


Figure IV-1 : Procédé de formulation des peintures naturelles

Dans les peintures naturelles Derivery, les **liants** sont des huiles végétales, des standolies (huiles prépolymérisées) et des résines terpéniques naturelles. Les huiles végétales sont extraites sans solvant, par pression, à partir de graines de lin, de chanvre, de ricin ou de tournesol principalement. Les liants sont mis en émulsion dans l'eau à l'aide d'additifs dispersants et stabilisants. La caséine est ainsi utilisée comme émulsifiant naturel. Ajoutée sous la forme d'une fine poudre blanche et transformée en caséinate par ajout d'hydroxyde de sodium, elle permet d'assurer la bonne dispersion des gouttelettes de phase grasse dans la phase aqueuse. La base pigmentaire est préparée par dispersion des **charges**, poudres blanches naturelles ou d'origine naturelle d'oxydes métalliques ou de roches friables, dans de l'eau gélifiée par ajout d'éther de cellulose. La couleur blanche de la peinture est obtenue grâce aux **pigments** blancs et à l'ajout d'une faible quantité de pigment bleu afin de compenser la teinte jaunâtre de l'émulsion. Les **additifs**, ajoutés en faible quantité (< 1 % de la masse finale), représentent la part non naturelle de la peinture. Parmi ceux-ci figurent notamment le siccatif, nécessaire pour démarrer et accélérer la polymérisation des huiles végétales, des agents anti-peau et anti-mousse améliorant la mise en œuvre et le stockage de la peinture, et des conservateurs à base d'isothiazolinones (mélange de méthylisothiazolinone (MIT), benzisothiazolinone (BIT) et chloroisothiazolinone (CIT)). Bien qu'actuellement tolérés à des teneurs réduites par les labels écologiques, ces biocides sont toxiques, allergènes, corrosifs et nocifs pour l'environnement. Le développement de nouveaux biocides moins nocifs pour la santé et l'environnement serait donc un apport important pour le domaine des peintures naturelles.

**Chapitre IV – Mise en œuvre de formulations pour des applications dans l'industrie des peintures naturelles écologiques**

*Tableau IV-1 : Caractéristiques des ingrédients de la gamme de peintures naturelles Derivery (1 : naturel ; 2 : d'origine naturelle ; 3 : partiellement ou totalement synthétique)*

<b>Ingrédients</b>	<b>Type</b>	<b>Description</b>	<b>Naturalité</b>	<b>Incorporation</b>
<i>Standolie de lin</i>	Liant	Huile de lin pré-polymérisée	2	émulsion/ vernis
<i>Standolie de tournesol</i>	Liant	Huile de de tournesol pré-polymérisée	2	émulsion/ vernis
<i>Standolie d'huile de ricin déshydratée</i>	Liant	Huile de ricin pré-polymérisée et déshydratée	2	émulsion/ vernis
<i>Huile de chanvre</i>	Liant		1	émulsion/ vernis
<i>Damar</i>	Liant	Résine terpénique naturelle sécrétée par un arbre indonésien donnant des vernis brillants, transparents, non jaunissants et au bon pouvoir adhésif	1	émulsion/ vernis
<i>Carbonate de calcium</i>	Charge	Craie naturelle sous forme de poudre fine blanche	1	base pigmentaire
<i>Kaolin</i>	Charge	Argile blanche très friable et très fine principalement constituée de silicate d'aluminium	1	base pigmentaire
<i>Syénite à néphéline</i>	Charge	Roche ignée de couleur blanche à grains moyens	1	base pigmentaire
<i>Dioxyde de titane</i>	Pigment	Poudre micrométrique cristalline blanche utilisée pour ses propriétés blanchissantes et opacifiantes	2	base pigmentaire
<i>Oxyde de zinc</i>	Pigment/ Charge	Pigment inorganique conférant au film une grande blancheur et un fini brillant	2	base pigmentaire
<i>Lithopone</i>	Pigment/ Charge	Pigment blanc constitué d'un mélange de sulfure de zinc et de sulfate de baryum	2	base pigmentaire
<i>Aluminosilicate de sodium polysulfuré</i>	Pigment	Pigment bleu sous forme de poudre au très fort pouvoir colorant également appelé violet outremer	2	finition
<i>Caséine</i>	Emulsifiant	Transformée en caséinate par l'hydroxyde de sodium, fort pouvoir émulsifiant, épaississant et stabilisant	2	émulsion
<i>Hexaméthaphosphate de sodium</i>	Additif	Agent dispersant participant à la stabilisation de l'émulsion et inhibiteur de corrosion	2	émulsion
<i>Hydroxyde de sodium</i>	Additif	Régule le pH	2	émulsion
<i>Siccatif au manganèse</i>	Additif	Oxyde métallique permettant d'accélérer et d'améliorer la formation du film solide de peinture	3	finition
<i>Antipeau</i>	Additif	Agent à base d'amines ralentissant ou empêchant la formation d'une peau sèche à la surface de la peinture lors du stockage en pot	3	finition
<i>Antimousse</i>	Additif	Agent à base d'huile végétale évitant la formation de mousse lors de la préparation de la peinture	3	émulsion/ finition
<i>Conservateur</i>	Additif	Biocide à base de MIT, BIT et CIT permettant d'inhiber le développement microbien dans la peinture	3	Base pigmentaire/ émulsion/ finition
<i>Ether de cellulose</i>	Additif	Polymère cellulosique aux propriétés épaississantes permettant d'ajuster la viscosité des formulations	2,3	Base pigmentaire/ émulsion/ finition

## IV.2. Incorporation des huiles végétales issues de co-produits végétaux

### IV.2.1. Choix des formules

Plusieurs formules ont été choisies afin de permettre l'évaluation et la validation des nouveaux ingrédients obtenus dans le chapitre II. Les produits formulés avec les nouveaux composants sont comparés aux produits de référence et doivent fournir des performances au moins égales à celles des formules actuelles. Les paramètres évalués concernent aussi bien le procédé de fabrication que les caractéristiques de la peinture. Ainsi les évaluations portent sur la mise en œuvre de la formulation (dissolution des résines, mise en émulsion), le séchage de la peinture, la résistance à l'eau, la brillance et le jaunissement à l'obscurité.

La composition en acides gras des huiles utilisées dans les peintures est déterminante pour le séchage. La présence importante de liaisons insaturées est nécessaire à la formation du réseau tridimensionnel et donc à la formation d'un film solide. Ainsi, l'huile de lin et la standolie de lin, riches en acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3,  $n$ -3) sont majoritairement utilisées. Les huiles de chanvre et de tournesol, composées principalement d'acide linoléique (C18:2,  $n$ -6) sont également employées. La composition en acides gras des huiles extraites des co-produits de fruit de la passion et de goyavier rouge par des procédés alternatifs (macération à l'éthanol, extraction par pression ou par CO<sub>2</sub>-SC) se rapprochent de ces dernières. Les essais d'incorporation des nouvelles huiles dans des formulations pourront donc être réalisés par remplacement total ou partiel des huiles actuellement utilisées.

Pour le choix des formules tests, plusieurs autres critères ont été définis afin d'évaluer l'utilisation des huiles végétales de fruit de la passion et de goyavier rouge dans une gamme de produits la plus large possible :

- Présence des huiles majoritaires actuellement utilisées (chanvre, tournesol, lin) pouvant être totalement ou partiellement remplacées,
- Formules avec ou sans résine,
- Formules avec ou sans siccatif,
- Formules mates ou satinées,
- Formules pour une application intérieure ou extérieure.

La présence ou l'absence de résine et de siccatif permettra de vérifier l'interaction des nouvelles huiles avec ces ingrédients au sein de la formule et lors du séchage. La capacité des huiles à être utilisées dans des produits de brillances variées et pour différentes applications sera également évaluée.

Les trois formules sélectionnées grâce à ces critères sont les suivantes : la peinture Natura™ satin tournesol, la Tassili™ mat Ecocert et la Natura™ lin satiné, dont les propriétés sont présentées dans le Tableau IV-2 (voir Fiche technique en Annexe 4).

Tableau IV-2: Propriétés des peintures Natura tournesol, Tassili mat et Natura lin choisies pour les essais d'incorporation des nouvelles huiles végétales

	Huiles présentes	Présence de résine	Présence de siccatif	Brillance	Application
Natura satin tournesol	Tournesol Chanvre	Oui	Oui	Satin	Intérieure
Tassili mat Ecocert	Lin Chanvre	Oui	Non	Mat	Intérieure
Natura lin satiné	Lin	Non	Oui	Satin	Extérieure

Le remplacement total ou partiel des huiles de lin, de chanvre et de tournesol a été évalué en fonction de la nature de l'huile et de la quantité présente dans la peinture. Le panel d'échantillons proposés pour la validation des nouvelles huiles est présenté dans le Tableau IV-3.

Tableau IV-3: Composition des formules essais pour l'évaluation des huiles de fruit de la passion et de goyavier rouge

	Formule	Contrôle	Essais goyavier			Essais passion		
NT1 à NT7	Natura tournesol	Tournesol Chanvre (1 :1)	Tournesol Goyavier (1 :1)	Goyavier Chanvre (1 :1)	Goyavier Goyavier (1 :1)	Tournesol Passion (1 :1)	Passion Chanvre (1 :1)	Passion Passion (1 :1)
TM1 à TM3	Tassili mat	Lin Chanvre (3 :1)	Lin Goyavier (3 :1)			Lin Passion (3 :1)		
NL1 à NL5	Natura lin	Lin	Lin : Goyavier (7 :1)	Lin : Goyavier (3 :1)		Lin : Passion (7 :1)	Lin : Passion (3 :1)	

Les huiles de tournesol et de lin sont utilisées sous forme de standolies (huiles pré-polymérisées). Les échantillons NT4, NT7 et la référence NL1 ne comportent qu'une seule huile végétale.

#### IV.2.2. Évaluation des nouvelles formulations

Aucune modification du procédé de formulation n'a été nécessaire lors de la mise en œuvre des peintures (voir V.6.1.). Les nouvelles huiles végétales de fruit de la passion et de goyavier rouge ont permis d'assurer la dissolution des résines, ainsi que la mise en émulsion. Le séchage et l'aspect des films obtenus ont ensuite été caractérisés.

##### IV.2.2.1. Influence de la substitution des huiles végétales sur le séchage

La dureté d'un matériau est définie comme l'aptitude à résister, sans altération ou déformation permanente, à la pénétration d'un matériau plus dur. La détermination de la dureté d'un film sec permet ainsi d'évaluer plusieurs propriétés, telles que la résistance à l'abrasion, la résistance à l'usure ou la ductilité. En peinture, la mesure de la dureté du film est utilisée comme indicateur de la qualité du séchage. Le suivi du séchage du film est effectué grâce aux relevés de la dureté pendulaire pendant un mois (voir V.6.2.1.).

Pour les formules Tassili™ mat (Figure IV-2), les échantillons contenant les nouvelles huiles végétales (standolie de lin + huile de fruit de la passion ou huile de goyavier) et les échantillons de référence (standolie de lin + huile de chanvre) ont des comportements identiques. Le remplacement de l'huile de chanvre influence très peu le séchage durant les 15 premiers jours

( $\delta_{\text{moyen}} = 3,1$  secondes). Au bout d'un mois, les échantillons de référence et ceux à l'huile de goyavier présentent des valeurs de dureté identiques. La dureté relevée pour l'échantillon à l'huile de fruit de la passion est quant à elle inférieure ( $\delta = 15$  secondes).

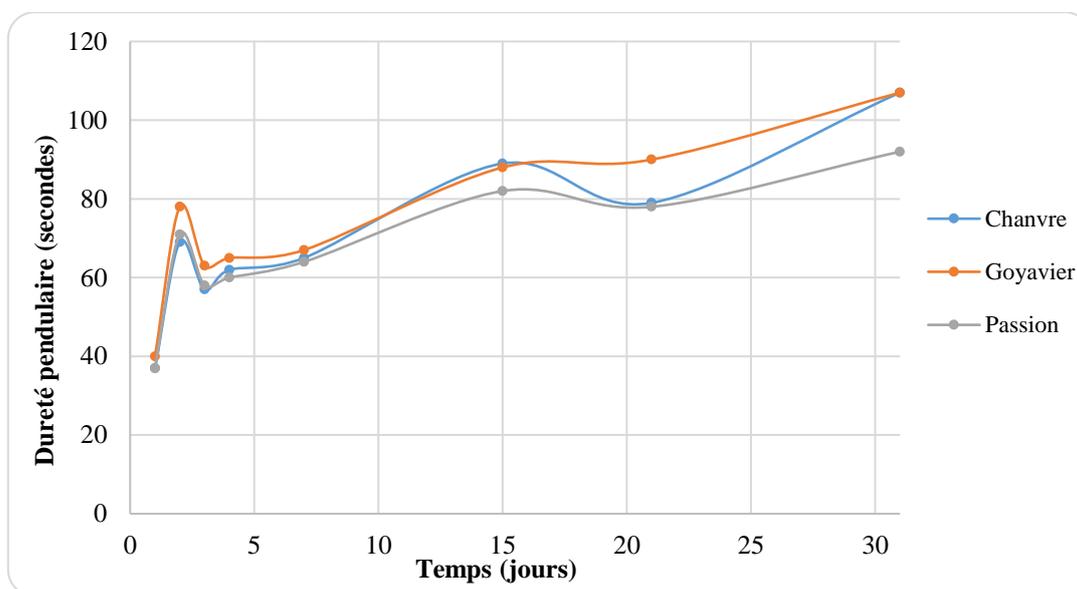


Figure IV-2: Duretés pendulaire relevées au cours d'un mois de séchage pour les échantillons Tassili mat

Concernant la formule Natura™ lin (Figure IV-3), le remplacement partiel de la standolie de lin n'a pas modifié le profil de séchage ( $\delta_{\text{moyen}} = 3,2$  secondes). Pour tous les échantillons (standolie de lin + huile de fruit de la passion ou de goyavier en proportion 7:1 ou 3:1, m/m), la dureté finale relevée après un mois est légèrement supérieure ou égale à la dureté obtenue pour le produit de référence (100% standolie de lin).

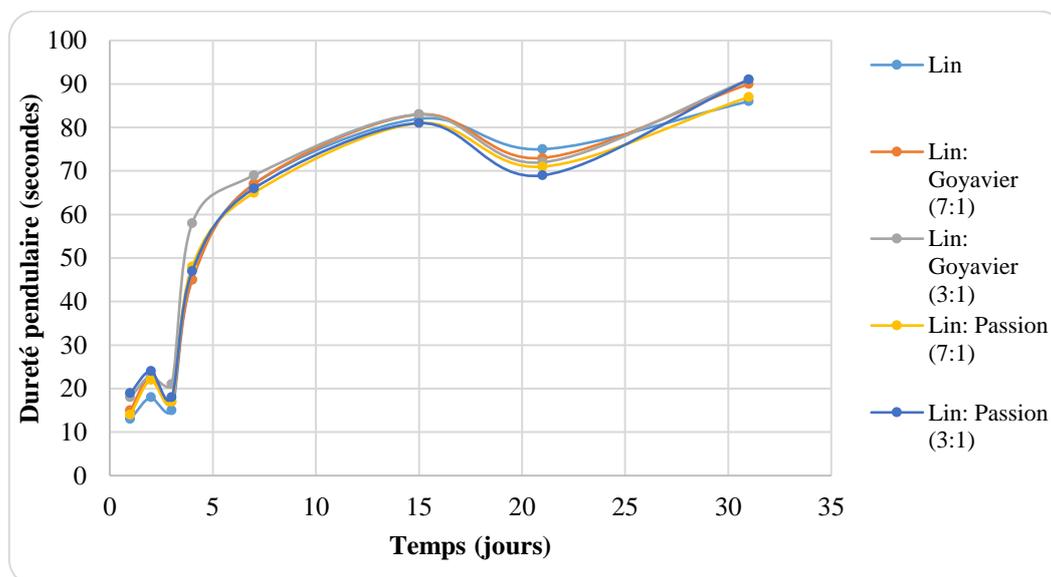


Figure IV-3: Duretés pendulaires relevées au cours d'un mois de séchage pour les échantillons Natura lin

La figure IV-4 rassemble les résultats pour la formule Natura™ tournesol. Parmi les formules testées, deux échantillons (standolie de tournesol + huile de goyavier, et huile de goyavier seule) présentent un comportement légèrement différent des autres, à savoir des valeurs de dureté

faibles pendant une semaine de séchage avant d'atteindre des valeurs élevées (autour de 120 secondes) après 15 jours. Les quatre autres échantillons formulés, y compris l'échantillon de référence (standolie de tournesol et huile de chanvre), atteignent un plateau autour de 90 secondes de dureté pendulaire après 3 à 5 jours. L'utilisation d'huile de goyavier seule ou en complément de la standolie de tournesol semble donc ralentir le séchage de quelques jours mais permettrait d'obtenir un film plus solide après 15 jours.

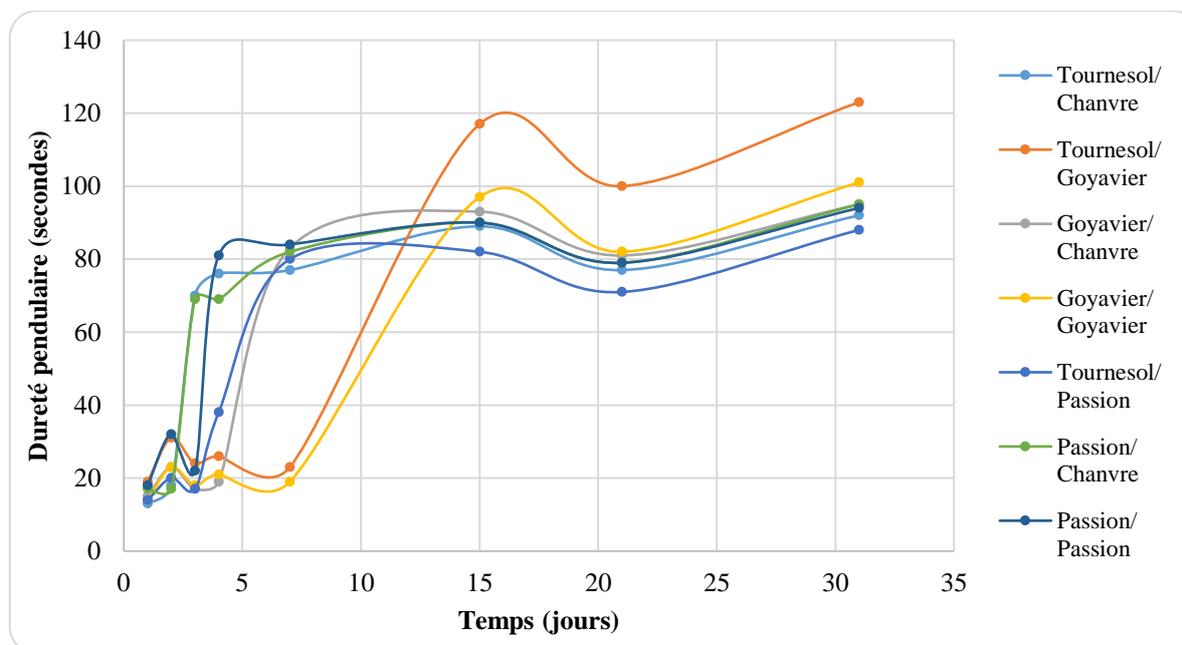


Figure IV-4: Duretés pendulaires relevées au cours d'un mois de séchage pour les échantillons Natura tournesol

La substitution de **l'huile de chanvre** dans les 6 formules Natura™ tournesol et Tassili™ mat a permis d'obtenir quatre films d'une dureté similaire ou supérieure à celle des échantillons de références, et ce dès 15 jours. L'utilisation **d'huile de goyavier** donne un profil de séchage identique dans le cas de la formule Tassili™ mat et retarde d'une semaine le séchage en donnant un film plus dur pour la formule Natura™ tournesol. Par contre, le remplacement de l'huile de chanvre par de **l'huile de fruit de la passion** (échantillon n°NT5 et TM3) ne permet pas d'atteindre un séchage au moins équivalent au séchage de la référence dans les deux formules testées. Ce résultat peut s'expliquer par la teneur en AGPI (Acides Gras PolyInsaturés) de l'huile de fruit de la passion inférieure à celle des huiles de chanvre et de goyavier (Tableau IV-4).

Tableau IV-4: Composition en acides gras insaturés des huiles végétales de référence [1-5] et des huiles végétales de fruit

	Huile de tournesol [1]	Huile de lin [1-4]	Huile de chanvre [4, 5]	Huile de goyavier	Huile de fruit de la passion
<b>C18:1, n-9</b>	15-25	10 - 22	12 - 16	10	17
<b>C18:2, n-6</b>	62-70	12 - 18	55 - 57	78	70
<b>C18:3, n-3</b>	< 1	50 - 62	16 - 22	< 1	< 1
<b>Σ AGPI</b>	62 - 70	62 - 80	71 - 79	78	70

Le remplacement de la **standolie de tournesol** par l'huile de goyavier ou de fruit de la passion (4 échantillons NT) a permis d'obtenir des profils de séchage et des valeurs de duretés semblables à l'échantillon de référence. La composition en acides gras insaturés des huiles de fruits très similaire à celle de l'huile de tournesol pourrait expliquer les performances très proches en termes de séchage pour la formule Natura™ tournesol, et ce même en l'absence de standolisation.

La substitution partielle de la **standolie de lin** (Natura™ Lin), a permis d'obtenir des échantillons séchant de manière équivalente à celle de l'échantillon de référence même en l'absence de standolisation. On note que les teneurs totales en AGPI des deux huiles (goyavier et passion) sont dans la gamme de celle de l'huile de lin (62-80%) même si la répartition en acide linoléique (C18:2, n-6) et  $\alpha$ -linoléique (C18:3, n-3) dans l'huile de lin est différente des deux autres huiles.

En définitive, le séchage semble dépendre davantage de la teneur totale en AGPI que de la répartition en acide linoléique et  $\alpha$ -linoléique. L'huile de goyavier s'est montrée compatible avec les trois formules, en mélange avec les huiles de chanvre, de tournesol ou de lin, ou en substitution totale (NT4). L'huile de fruit de la passion s'est révélée adaptée aux formules Natura™ lin et Natura™ tournesol, respectivement en mélange avec la standolie de lin ou l'huile de chanvre. Le mélange huile de fruit de la passion et standolie de lin est peu performant pour la formule Tassili™ mat en terme de dureté du film.

#### *IV.2.2.2. Influence de la substitution des huiles sur la résistance à l'eau*

La résistance à l'eau du film formé après application est évaluée en déposant une goutte d'eau sur la peinture. Au bout d'une minute, l'eau est essuyée. Le film est déclaré résistant à l'eau si aucune altération n'est constatée visuellement (voir V.6.2.2.).

Cette donnée est particulièrement importante dans deux cas :

- Pour une peinture destinée à l'extérieur : le film doit être résistant aux conditions climatiques,
- En cas de surcouchage : l'application d'une seconde couche de peinture ne doit pas altérer la première par un phénomène de détrempe.

Parmi tous les échantillons, seul l'échantillon n°NT5 (tournesol + passion) présente un résultat différent de celui de l'échantillon de référence. La substitution de l'huile de chanvre par l'huile de fruit de la passion dans cette formule conduit à un film résistant à l'eau après 3 jours de séchage, contre 1 jour pour l'échantillon de référence (tournesol + chanvre). Les performances du mélange standolie de tournesol et huile de fruit de la passion sont donc inférieures aux valeurs de référence en termes de dureté et de résistance à l'eau.

#### *IV.2.2.3. Influence de la substitution des huiles sur le jaunissement*

Le jaunissement est un phénomène constaté lorsqu'une peinture blanche vire au jaune. Ce phénomène est naturel pour les peintures alkydes et naturelles contenant des huiles végétales (ou leurs dérivés) maintenues dans l'obscurité. Le phénomène d'oxydation des huiles peut en effet mener à la production de doubles liaisons conjuguées absorbant dans le domaine UV-

visible et responsables du jaunissement. Ces liaisons chromophores sont dégradées par la lumière du jour, inversant ainsi le phénomène.

La caractérisation de la couleur d'une peinture est réalisée grâce au modèle colorimétrique ou espace chromatique CIELAB (ou  $L^*a^*b^*$  CIE) créé en 1976. Un modèle colorimétrique permet la représentation d'une couleur par un système de coordonnées (Figure IV-5). Les trois paramètres principaux sont :

- L : paramètre d'intensité ou de clarté variant entre 0 (noir) et 100 (blanc de référence)
- $a^*$  : composant rouge-vert variant entre -128 (vert) et + 128 (rouge)
- $b^*$  : composant jaune-bleu variant entre -128 (bleu) et +128 (jaune)

L'espace chromatique CIELAB décrivant l'ensemble des couleurs de la vision humaine est particulièrement utilisé pour caractériser les couleurs de surface. L'évaluation du jaunissement d'une peinture à l'obscurité se fait par comparaison des coordonnées colorimétriques avant et après une période de mise à l'obscurité (voir V.6.2.3.).

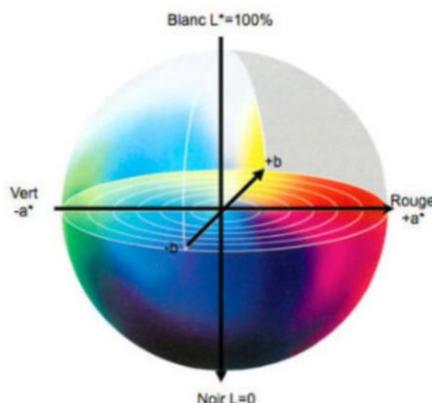


Figure IV-5 : Représentation graphique des coordonnées  $L$ ,  $a^*$  et  $b^*$  du modèle colorimétrique CIELAB [6]

Les coordonnées colorimétriques des différents échantillons ont été relevées par spectrophotométrie après 24h de séchage, puis après 7 et 15 jours passés à l'obscurité, correspondant à des conditions sévères de test, en particulier pour la peinture extérieure (Natura™ lin). Les mesures confirment tout d'abord que la substitution des huiles n'impacte pas les coordonnées L (clarté) et  $a^*$  (composant rouge-vert) des différentes formules (Tableau A4-1 en Annexe 4). La colorimétrie de la peinture n'est donc pas fortement modifiée par les nouvelles huiles, ce qui évitera des problèmes lors d'une mise à la teinte éventuelle.

La variation de la coordonnée  $b^*$  (composant jaune-bleu) va permettre de détecter une évolution de la composante jaune.

Pour les échantillons de Tassili™ mat (Figure IV-6), le jaunissement observé est faible pour tous les échantillons. On note que les échantillons formulés avec l'huile de goyavier ou de fruit de la passion sont moins jaunâtres que l'échantillon formulé avec l'huile de chanvre, après 7 et 15 jours, l'huile de goyavier ayant un léger avantage sur les deux mesures ( $\delta_b = -0,14$ ).

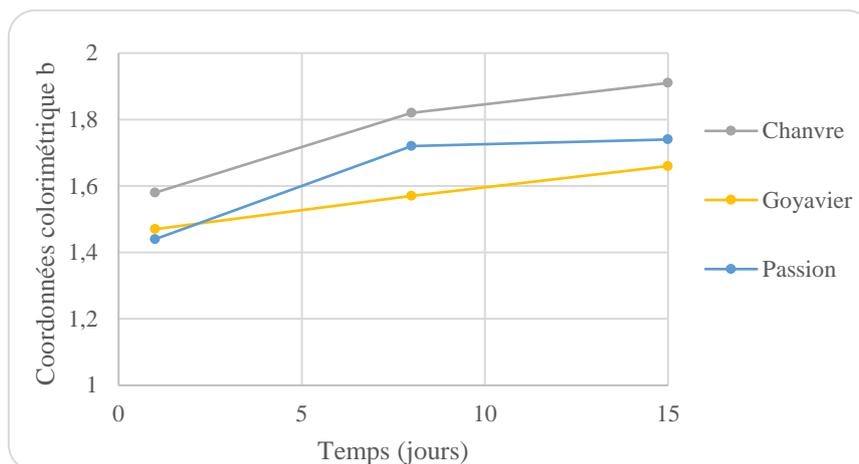


Figure IV-6: Evolution de la coordonnée colorimétrique b en l'absence de lumière (Tassili mat)

Pour la formule **Natura™ lin**, la substitution partielle de la standolie de lin par de l'huile de goyavier ou de fruit de la passion augmente la teinte jaune de la peinture au bout de 7 jours, mais cette différence s'estompe après 15 jours (Figure IV-7). L'influence du taux de substitution n'est pas vraiment significative sur le jaunissement final de la peinture.

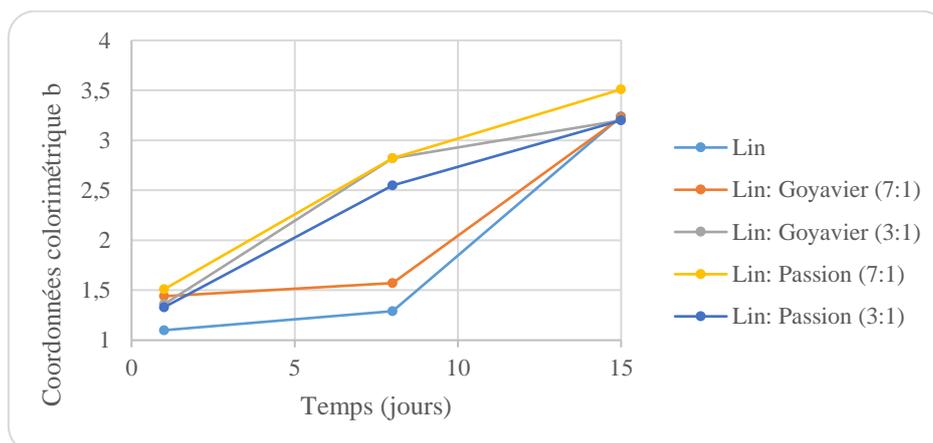


Figure IV-7: Evolution de la coordonnée colorimétrique b en l'absence de lumière (Natura Lin)

**Les échantillons de Natura™ tournesol** contenant l'une des deux nouvelles huiles (goyavier ou passion) présentent tous des valeurs de  $b^*$  inférieures à la référence (Tableau A5-1 en Annexe), y compris dans le cas d'une substitution totale. Ce sont d'ailleurs deux formulations à base de goyavier et goyavier/tournesol qui présentent les teintes les plus blanches sur la durée du suivi. De plus, après 15 jours, aucun échantillon ne présente d'évolution significative de teinte vers le jaune (Figure IV-8).

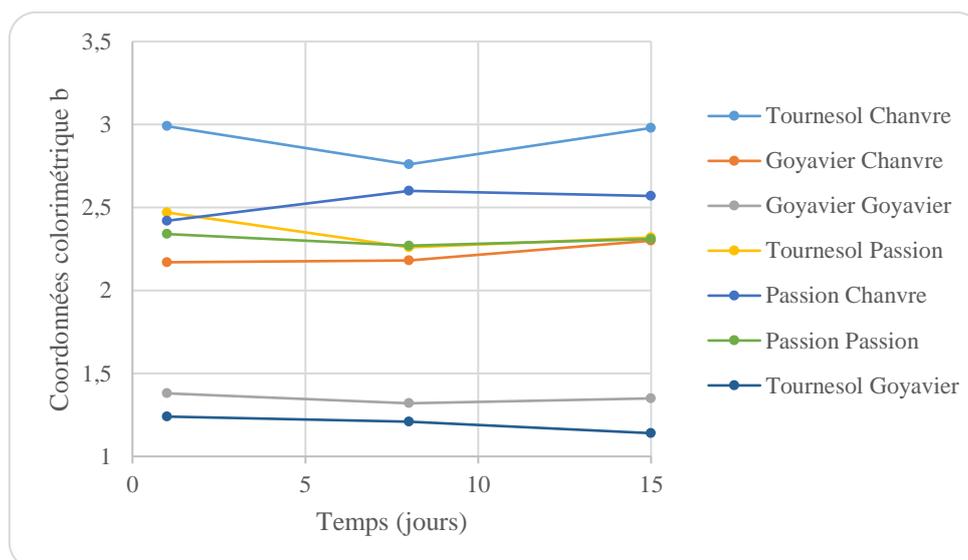


Figure IV-8: Evolution de la coordonnée colorimétrique b en l'absence de lumière (Natura Tournesol)

En définitive, quel que soit l'essai de substitution, l'incorporation d'huile de goyavier ou de fruit de la passion, n'a jamais accentué la tendance au jaunissement de la formulation au bout de 15 jours.

Au contraire, en mélange avec la standolie de lin, les nouvelles huiles ralentissent le phénomène de jaunissement de la formulation Tassili™ mat.

En mélange avec la standolie de lin dans la formule Natura™ lin, le niveau de jaunissement est équivalent à la référence au bout de 15 jours.

Pour la formule Natura™ tournesol, les nouvelles huiles, en mélange avec les standolies de tournesol ou l'huile de chanvre, permettent d'avoir des formules stables en teinte pendant la durée des essais. Une substitution totale du chanvre et du tournesol dans cette formule peut même être envisageable, la teinte blanche n'ayant pas évoluée durant l'essai.

#### IV.2.2.4. Influence de la substitution des huiles végétales sur la brillance

La brillance est une perception visuelle survenant lors de l'observation d'une surface. Cette perception est directement liée à la proportion de lumière réfléchi et à l'angle de réflexion. La brillance est quantifiée en dirigeant un rayon lumineux d'intensité constante et connue à un angle déterminé sur la surface et en mesurant la quantité de lumière réfléchi selon ce même angle. L'angle d'illumination est choisi en fonction du niveau de brillance de la surface parmi trois géométries (Tableau IV-5).

Tableau IV-5: Domaine de brillance et angles de mesure recommandés

Plage de brillance	Valeur mesurée à 60 °	Angle recommandé
Très brillant	> 70	20 °
Moyennement brillant, satiné	10 à 70	60 °
Faible brillant, mat	< 10	85 °

Les indices de brillances ont été mesurés après 24h de séchage (Tableau IV-6) (voir V.6.2.4.). Aucune différence significative n'a été observée pour les échantillons contenant les nouvelles huiles végétales par rapport aux échantillons de référence. La substitution totale ou partielle des huiles ou des standolies habituelles (lin, chanvre et tournesol) n'influence pas la brillance de la peinture après séchage et ne nécessite donc pas d'ajustement des formules, notamment sur les quantités de composés azurants ou matifiants.

Tableau IV-6: Indices de brillance mesurés à 60° après 24h de séchage  
Les indices indiquent la valeur des écarts types : a = 0,1 ; b = 0,2 ; c=0,3

Tassili™ mat			Natura™ lin					Natura™ tournesol						
Chanvre	Goyavier	Passion	Lin	Lin : Goyavier (7 :1)	Lin : Goyavier (3 :1)	Lin : Passion (7 :1)	Lin : Passion (3 :1)	Tournesol/ Chanvre	Tournesol/ Goyavier	Goyavier/ Chanvre	Goyavier/ Goyavier	Tournesol/ Passion	Passion/ Chanvre	Passion/ Passion
2,7 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>	4,6 <sup>b</sup>	4,4 <sup>b</sup>	4,4 <sup>a</sup>	4,7 <sup>c</sup>	4,6 <sup>b</sup>	5,9 <sup>b</sup>	5,6 <sup>b</sup>	6,2 <sup>c</sup>	5,8 <sup>b</sup>	5,5 <sup>c</sup>	5,9 <sup>b</sup>	5,7 <sup>b</sup>

### IV.2.3. Incorporation des fractions lipidiques extraites avec les procédés intégrés

Les filtrats obtenus à l'aide des procédés intégrés continus (Filtrats 1 et 2) et discontinus (Filtrat 3) à partir du fruit de la passion ont également été utilisés pour la mise en œuvre de formulations de peinture naturelle. Les filtrats ont été incorporés à la formulation en tant que phase aqueuse pour la préparation de l'émulsion végétale (Figure IV.1.). Cette substitution a nécessité une adaptation de la formule initiale (Natura lin). D'une part, la caséine a été dispersée dans les filtrats, à la place d'une dispersion dans l'eau. D'autre part, le pH du mélange a été ajusté entre 8 et 9, en tenant compte du pH des filtrats (4 – 5). La standolie de lin a ensuite été ajoutée pour obtenir le liant émulsionné.

Ces essais de formulation ont permis d'obtenir des milieux formulés de texture homogène et conforme à la gamme de viscosité visée pour les peintures naturelles.

## IV.3. Addition des extraits actifs

### IV.3.1. Choix de la formule

La formule de peinture choisie pour évaluer les propriétés antimicrobiennes des extraits actifs végétaux provenant de la pulpe de fruit de la passion ou de goyavier rouge est la formule la plus sensible aux contaminations microbiennes, car contenant le plus faible taux de biocide ; la peinture Tassili™ mat ne contient en effet que 0,22 % (m/m) de biocide (bactéricide et fongicide à base d'isothiazolinones), contre 0,45 % et 0,46 % pour la Natura™ tournesol et la Natura™ lin par exemple. Le paramètre principal à évaluer pour valider l'utilisation des extraits végétaux est en effet l'évolution de la contamination microbienne au cours du temps. Les extraits devront permettre de conserver le produit de façon au moins aussi efficace que les ingrédients actuels. De plus, ils devront pouvoir être intégrés à différentes étapes de la formulation et dans les différents milieux préparés (base pigmentaire, émulsion ou produit fini).

Enfin, l'ajout de ces extraits ne devra pas modifier les autres propriétés de la peinture, en particulier son séchage. Deux types d'extraits actifs végétaux ont été évalués, les extraits aqueux ou éthanoliques bruts obtenus par extraction à reflux de pulpe de fruit de la passion et de goyavier, et les extraits purifiés sur résine Amberlite™ (FPX66). Ces extraits ont été sélectionnés d'une part pour leurs teneurs élevées en polyphénols, et d'autre part car ils permettent de valoriser les résidus de pulpe et de peau des co-produits des deux fruits, parallèlement à une valorisation des graines par extraction de l'huile végétale.

#### ***IV.3.2. Evaluation des nouvelles formulations***

L'incorporation des extraits actifs végétaux (aqueux et éthanoliques) au sein des formulations est destinée à remplacer la substance biocide Acticide MBS™ (antibactérien et anti-fongique) à base d'isothiazolinones. Ce biocide est présent à la teneur de 0,22 % massique dans la formule Tassili™ mat et est incorporé dans les demi-produits de la formule et dans la finition, sous forme d'une solution aqueuse de concentration égale à 5 %.

L'addition des extraits végétaux (taux d'incorporation inférieurs à 1% en masse) a été envisagée à différentes étapes du procédé de formulations :

- Au sein de la base pigmentaire,
- Au sein de l'émulsion, en phase aqueuse ou en phase lipidique,
- Au sein de la formulation finale.

Ces trois scénarios ont conduit à des formulations homogènes et stables. Pour la suite des essais, il a été choisi de réaliser l'addition des extraits lors de la dernière étape de la formulation.

Le séchage des formulations contenant les extraits a été suivi par relevé des duretés pendulaires pendant un mois (Figure IV-9).

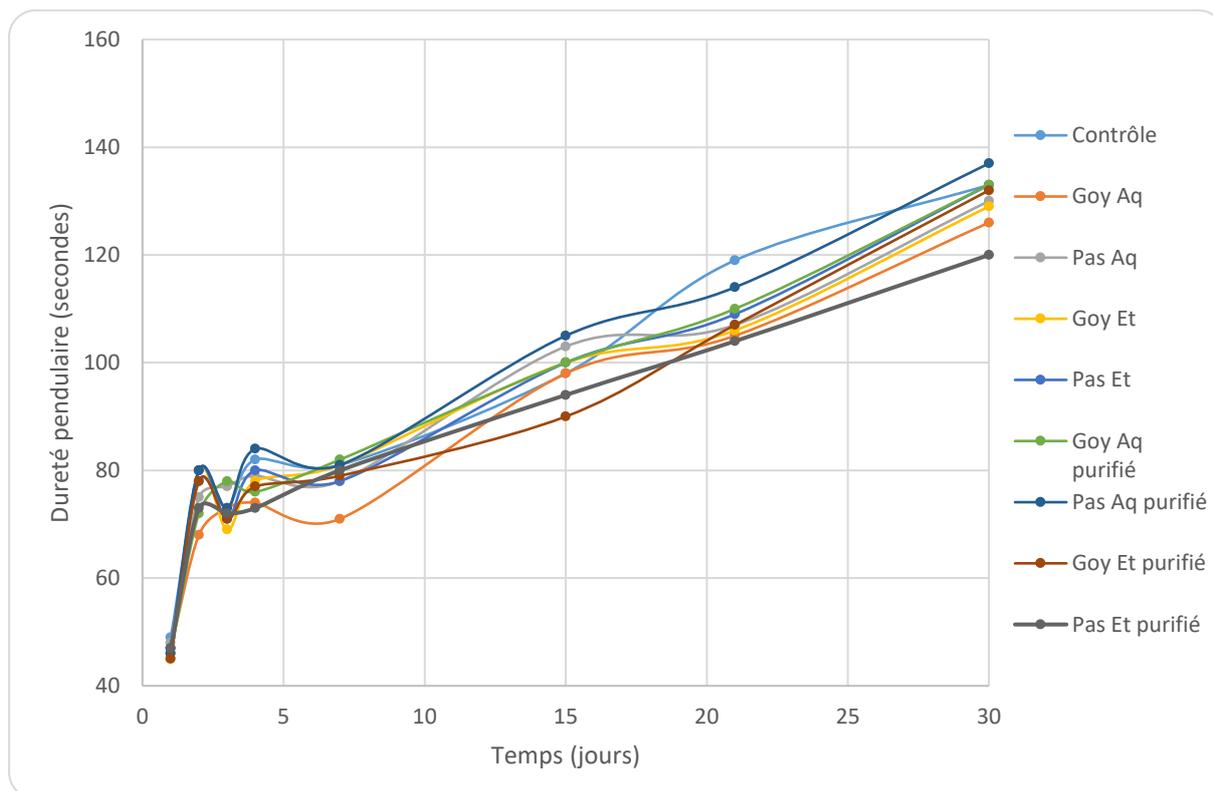


Figure IV-9 : Duretés pendulaires relevées au cours d'un mois de séchage pour les échantillons Tassili™ mat avec extraits

Le profil de séchage des formulations contenant les extraits est assez similaire à celui de la formulation de référence, correspondant à un delta moyen de 4 secondes à  $t = 30$  jours. Les extraits antioxydants ne ralentissent pas le séchage de la peinture et permettent d'obtenir un film de dureté proche à celle de l'échantillon de référence.

Concernant la résistance à l'eau et la brillance, les essais réalisés montrent que les extraits n'ont pas d'influence sur les caractéristiques du film.

L'utilisation des extraits végétaux antioxydants comme additifs dans les formulations de peintures naturelles semblent donc possible en termes de performances du film.

### IV.3.3. Evaluation de la protection antimicrobienne

Depuis une dizaine d'années, la société Derivery se préoccupe du risque de contamination microbienne des peintures naturelles. En 2007, des prélèvements avaient été effectués sur la chaîne de production et avaient été soumis à des analyses pour détecter la présence éventuelle de contaminants bactériens et fongiques. L'étude réalisée dans le cadre de cette thèse a pour objectif d'apporter des informations supplémentaires dans ce domaine et d'évaluer la capacité de protection de nouveaux ingrédients face au risque de développement microbien.

Pour cela, trois approches complémentaires ont été mises en œuvre :

- Les souches de contamination (souches métropolitaine et réunionnaise) ont été étudiées au LCSNSA (Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments) de l'Université de La Réunion.

- Le potentiel antibactérien et antifongique des extraits a été mesuré sur un panel de microorganismes, par Aquitaine Microbiologie (Cellule de Transfert de Technologie de l'Université Bordeaux Segalen).
- La protection antimicrobienne des formulations contenant les extraits a été évaluée au sein de l'entreprise DERIVERY.

#### IV.3.3.1. Identification des souches de contamination

Des échantillons de peinture Tassili™ mat préparés sans biocide ont été placés dans des conditions de température et d'humidité propices au développement de microorganismes, dans deux environnements différents.

En métropole, un échantillon de peinture en pot fermé a été placé dans une pièce à atmosphère contrôlée à une température de 25 °C pendant un mois. Ce cas mime la conservation de la peinture dans un environnement intérieur en métropole et représente un risque modéré de contamination (favorise le développement de contaminants déjà présents dans le pot).

A l'île de La Réunion, un second échantillon de peinture en pot ouvert a été laissé à l'extérieur pendant 12 heures à une température moyenne de 29 °C ± 5 °C et une humidité ambiante de 65 % ± 5 %. Ce cas d'étude reproduit une utilisation de la peinture dans un environnement extérieur à la Réunion, et représente un risque élevé de contamination (par des contaminants de l'environnement).

La méthode d'identification comprend plusieurs étapes (voir V.7.1.) :

- L'ensemencement des différents milieux de culture avec l'échantillon contaminé,
- La différenciation des bactéries Gram positives et Gram négatives par coloration de Gram,
- L'identification du microorganisme à l'aide de galeries API® (Analytical Profile Index) fournies par BioMérieux.

**Pour le premier échantillon de métropole**, un développement microbien à la surface de la peinture a été constaté et isolé sur gélose Malt agar, suggérant une contamination par des levures et des moisissures (Figure IV-10). La coloration de la surface de la peinture après stockage est due à un phénomène de déphasage.

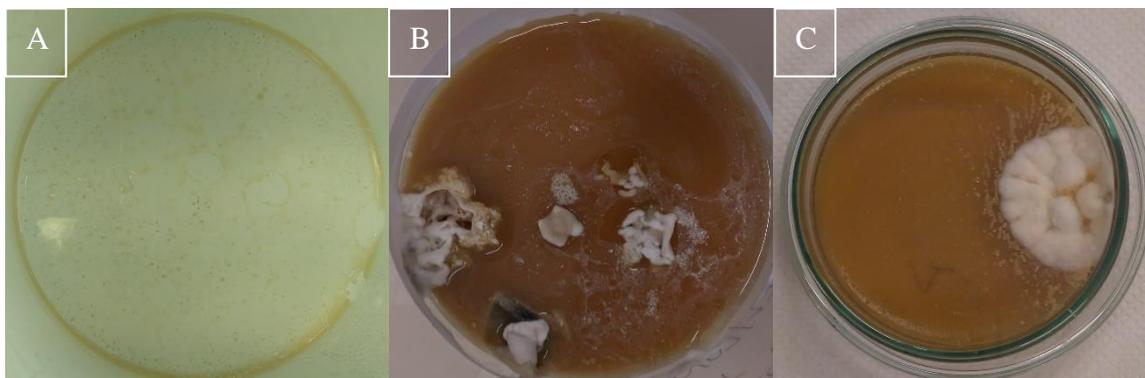


Figure IV-10: Photographies d'un échantillon de peinture Mat Ecocert sans biocide avant stockage (A), après un mois de stockage à 25 °C (B), et d'une colonie repiquée sur gélose Malt agar (C)

L'analyse des microorganismes de l'échantillon de peinture réalisée au LCSNSA n'indique cependant pas la présence de champignon ou de levure. Les résultats obtenus lors de l'ensemencement sur les différents milieux de culture suggèrent la présence d'un microorganisme dominant de type bactérien et pouvant appartenir au genre *Staphylococcus*. La coloration de Gram et le test de la catalase ont en effet confirmé la présence de bactéries Gram +, catalase + en forme de coque s'apparentant au genre *Staphylococcus*. La réalisation d'une galerie API Staph confirme que le microorganisme isolé est une bactérie de genre *Staphylococcus*, mais n'a pas permis d'identifier le nom de l'espèce.

On ne peut cependant pas exclure que le microorganisme d'apparence fongique, observé en métropole, soit mort au cours de l'acheminement des échantillons à La Réunion. La présence de la bactérie du genre *Staphylococcus* pourrait également être due à une contamination opportuniste.

**Pour le second échantillon** (pot ouvert en extérieur à la Réunion), l'ensemencement des différents milieux de culture mène à l'observation de microorganismes s'apparentant à des levures et des moisissures. Les microorganismes développés sur le milieu Sabouraud suggère notamment une contamination fongique du genre *Aspergillus* (Figure IV-11).



Figure IV-11: Flore fongique de l'échantillon (2) observée après ensemencement en surface sur la gélose Sabouraud

En conclusion, deux souches distinctes de contamination ont été identifiées, l'une dans l'échantillon de peinture en métropole, l'autre souche dans l'échantillon de l'Ile de Réunion. Ce résultat peut s'expliquer par les conditions d'exposition différentes. On peut faire l'hypothèse que la croissance des microorganismes fongiques sur l'échantillon contaminé à La Réunion peut être responsable de l'inhibition de la souche bactérienne observée dans l'échantillon métropolitain.

Notons que la variabilité des conditions de stockage et d'utilisation des peintures, ainsi que la variabilité des flores microbiennes en fonction des environnements, génèrent une grande variabilité des flores isolées et rendent difficile l'identification complète des souches potentiellement responsables des contaminations, d'où la nécessité d'utiliser un biocide à large spectre.

#### *IV.3.3.2. Mesure du potentiel antibactérien et antifongique des extraits végétaux*

Afin d'évaluer le potentiel antibactérien et antifongique des extraits végétaux de fruit de la passion et de goyavier, la méthode de diffusion sur disque a été mise en œuvre sur un panel de

7 bactéries, 2 champignons et 2 levures (voir V.7.2.). Cette méthode repose sur la diffusion d'une quantité connue d'extrait absorbé sur un disque de papier déposé à la surface d'un milieu de culture gélosé et préalablement ensemencée en surface avec le microorganisme étudié. Après incubation, des zones d'inhibition de la croissance microbienne sont observables autour des disques en fonction de l'activité de l'extrait (Figure IV-12). Plus l'extrait aura un pouvoir d'inhibition, plus la zone d'inhibition sera grande. L'extrait est donc reconnu inhibiteur lorsque le diamètre d'inhibition est supérieur au diamètre d'inhibition du témoin de contrôle (solvant de l'extrait).

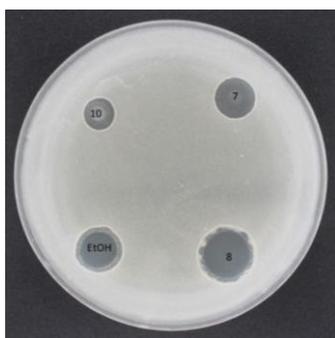


Figure IV-12 : Exemple de diamètre d'inhibition observé après incubation

Les extraits bruts et purifiés obtenus après extraction aqueuse et éthanolique des co-produits de goyavier rouge et de fruit de la passion ont été évalués. La teneur en matières sèches des extraits bruts a été ajustée à 3 % et celle des extraits purifiés à 0,3 %.

Tableau IV-7: Diamètres d'inhibition (mm) supérieurs au témoin de contrôle pour les extraits de goyavier et de fruit de la passion

Echantillon		Goyavier rouge				Fruit de la passion			
		Avant purification (3 % MS)		Après purification (0,3 % MS)		Avant purification (3 % MS)		Après purification (0,3 % MS)	
		Extrait aqueux	Extrait éthanol	Extrait aqueux	Extrait éthanol	Extrait aqueux	Extrait éthanol	Extrait aqueux	Extrait éthanol
<b>Bactérie</b>	<i>S. aureus</i>	na	<b>30 (18)</b>	na	na	na	<b>20</b>	na	na
	<i>S. epidermis</i>	na	<b>30 (17)</b>	<b>18</b>	na	na	<b>20</b>	na	na
	<i>E. coli</i>	na	<b>18</b>	na	na	na	<b>20</b>	na	na
	<i>K. pneumoniae</i>	na	<b>22</b>	na	na	na	<b>20</b>	na	na
	<i>P. aeruginosa</i>	na	<b>26</b>	na	na	na	<b>20</b>	na	na
	<i>E. faecium</i>	na	<b>22</b>	na	na	na	<b>19</b>	na	na
	<i>E. cloacae</i>	na	<b>19</b>	na	na	na	<b>21</b>	na	na
<b>Levure et champignon</b>	<i>A. niger</i>	na	na	na	na	na	na	na	na
	<i>P. italicum</i>	na	<b>20</b>	na	na	na	na	na	na
	<i>C. albicans</i>	na	na	na	na	na	na	na	na
	<i>C. famata</i>	<b>18</b>	na	na	na	na	<b>20</b>	na	<b>18</b>

\* na : non actif, Les valeurs entre parenthèse indiquent les diamètres d'inhibition pour l'extrait éthanolique de goyavier dilué 10 fois

Parmi les extraits bruts à 3 % de matière sèche, les extraits éthanoliques des deux fruits présentent une activité inhibitrice sur toutes les souches de bactéries testées (Tableau IV-7). L'extrait éthanolique de goyavier est particulièrement actif contre les bactéries du genre *Staphylococcus*, y compris pour l'extrait dilué dix fois, comme le confirme les diamètres d'inhibition observés. Concernant l'activité antifongique, les extraits de goyavier sont légèrement actifs contre la levure *Candida famata* (extrait aqueux) et contre un champignon (*Penicillium italicum* - extrait éthanolique). L'extrait éthanolique de fruit de la passion est également actif sur la levure *Candida famata*.

Parmi les extraits purifiés, seul l'extrait aqueux de goyavier présente une activité antibactérienne notable, avec l'inhibition d'une des deux espèces du genre *Staphylococcus*. De la même façon, seul l'extrait éthanolique de fruit de la passion possède une activité antifongique, ciblée sur la levure *Candida fumata*.

Les résultats montrent le potentiel antibactérien des extraits éthanoliques bruts des deux fruits pour différentes souches. Ces extraits présentent ainsi une activité antibactérienne contre le genre *Staphylococcus*, identifié comme une potentielle souche de contamination. Par contre, aucun extrait ne possède d'activité contre l'espèce du genre *Aspergillus*, identifié comme une potentielle souche de contamination à la Réunion.

Par ailleurs, les prélèvements effectués sur le site de production avaient montré la présence de souches majoritairement bactérienne (78% des microorganismes détectés) incluant *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* contre lesquelles les extraits éthanoliques se sont révélés actifs.

Le Tableau IV-8 rassemble les teneurs en polyphénols des extraits bruts et purifiés utilisés pour l'évaluation du potentiel antimicrobien.

Tableau IV-8: Teneurs en polyphénols des extraits bruts et purifiés de goyavier rouge et de fruit de la passion

Echantillon	Goyavier rouge				Fruit de la passion			
	Avant purification (MSE : 3 %)		Après purification (MSE : 0,3 %)		Avant purification (MSE : 3 %)		Après purification (MSE : 0,3 %)	
	Extrait aqueux	Extrait éthanol	Extrait aqueux	Extrait éthanol	Extrait aqueux	Extrait éthanol	Extrait aqueux	Extrait éthanol
<b>Teneur en polyphénols (g/100g MSE)</b>	10,5 ± 3,4	9,3 ± 0,3	32,9 ± 1,7	42,5 ± 1,1	3,1 ± 0,1	5,3 ± 0,6	20,7 ± 0,5	22,7 ± 0,2
<b>Concentration en polyphénols (g/L d'extrait)</b>	3,2 ± 0,8	2,2 ± 0,1 (0,2)	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0

\* La valeur entre parenthèse indique la concentration en polyphénols pour l'extrait éthanolique de goyavier dilué 10 fois

Les concentrations en polyphénols des extraits bruts sont comprises entre 0,9 et 3,2 g/L et les concentrations les plus élevées ont été détectés dans les extraits de goyavier. Concernant l'activité antimicrobienne, les extraits éthanoliques des deux fruits sont les plus actifs. Pour les extraits bruts, il n'existe pas de corrélation entre la concentration en polyphénols et l'activité antimicrobienne. Ce résultat confirme que l'activité antimicrobienne des extraits résulte à la fois de la nature des molécules extraites et des interactions entre composés. La caractérisation

chimique des extraits (II.3.3.4.) a ainsi montré la présence d'acides triterpéniques dans les extraits éthanoliques bruts des deux fruits. L'activité antibactérienne des extraits bruts éthanoliques pourrait être due à la présence de ces composés [1]. L'activité antimicrobienne détectée dans ces échantillons pourrait également s'expliquer par un effet synergique entre les polyphénols extraits, comme cela a été observé par Fattouch *et al.* et Hakkinen *et al.* pour des extraits végétaux [2, 3].

De plus, au sein de l'extrait brut, la matrice de polysaccharides peut avoir un effet protecteur vis-à-vis des polyphénols. Les polysaccharides et les polyphénols peuvent en effet se lier par le biais de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes [4]. Certains complexes de polyphénols-polysaccharides isolés par Kolodziejczyk-Czepas *et al.* et Pawlaczyk *et al.* ont montré des activités antioxydantes, antibactériennes et biologiques [5, 6].

Les extraits purifiés présentent des teneurs en polyphénols plus élevées que les extraits bruts correspondants mais sont moins concentrés. Ces extraits purifiés ne montrent qu'une activité antimicrobienne ciblée contre certaines souches (bactérienne ou fongique). En effet, l'extrait éthanolique purifié de fruit de la passion conserve uniquement l'activité antifongique contre *C. famata* et l'extrait éthanolique purifié de goyavier reste actif contre la bactérie *S. epidermis*. La purification des extraits éthanoliques pourrait être responsable d'une réduction de leur spectre d'activité, probablement par élimination des molécules participant à l'activité antimicrobienne, perturbant ainsi les phénomènes de synergie entre composés. Les composés non phénoliques éliminés lors de la purification tels que les polysaccharides, la vitamine C ou les acides triterpéniques jouent probablement un rôle sur l'activité antimicrobienne des extraits. Cependant, l'effet dose n'est pas à négliger et la différence de concentration en polyphénols entre les extraits bruts (1,3 – 2,2 g/L) et les extraits purifiés (0,6 – 1,1 g/L) pourrait également être responsable de la diminution du spectre d'activité.

#### IV.3.3.3. Evaluation de la protection antimicrobienne des formulations

La capacité des extraits de fruit de la passion et de goyavier à protéger la peinture Tassili<sup>TM</sup> mat d'un développement microbien a été évaluée et comparée aux performances du biocide Acticide MBS. Les quantités d'extraits à ajouter pour remplacer ce biocide ont été calculées en conservant la même masse de matière sèche pour les extraits bruts (Tableau IV-9). Pour les extraits purifiés, moins concentrés, un taux d'incorporation similaire a été conservé.

Deux échantillons de peinture Tassili<sup>TM</sup> mat (avec ou sans éthanol) ont également été préparés sans biocide afin de servir de 'blanc' pour les études de contamination microbienne.

Tableau IV-9: Taux d'incorporation des extraits végétaux dans la formule Tassili™ mat

Echantillons		Matière sèche (g/100g)	Taux d'incorporation (g/100g peinture)	Quantité incorporée (mg de MS)	Polyphénols incorporés (mg)
Contrôle	Blanc	/	/	/	/
	Blanc éthanol	/	0,61	/	/
	Acticide MBS	5,00	0,22	11,0	/
Goyavier	Extrait aqueux	2,68	0,41	11,0	1,2
	Extrait éthanol	1,91	0,56	10,7	1,0
	Extrait aqueux purifié	0,49	0,61	3,0	1,0
	Extrait éthanol purifié	0,33	0,61	2,0	0,9
Passion	Extrait aqueux	2,57	0,43	11,0	0,3
	Extrait éthanol	1,79	0,61	10,9	0,6
	Extrait aqueux purifié	0,47	0,61	2,9	0,6
	Extrait éthanol purifié	0,75	0,61	4,6	1,0

La protection antimicrobienne de la formule Tassili™ mat contenant les extraits de goyavier rouge et de fruit de la passion a été évaluée grâce au kit d'ATPmétrie Aqua-tools QG21S™. Ce test, basé sur le principe de bioluminescence, permet de déterminer l'ATP (adénosine triphosphate) total et l'ATP extracellulaire présent au sein de la peinture, afin d'estimer les quantités de microorganismes vivants, morts et totaux (voir V.7.3.). Les échantillons ont été analysés après leur préparation (t<sub>0</sub>) et après 3 mois de vieillissement accéléré en pot fermé à 40 °C (t<sub>1</sub>). Les concentrations en ATP cellulaire caractéristique des microorganismes vivants sont présentées dans le Tableau IV-10.

Tableau IV-10: Concentration en ATP cellulaire (en pg/mL) des échantillons de Tassili™ mat à t<sub>0</sub> (jour de préparation) et t<sub>1</sub> (après 3 mois de vieillissement à 40 °C)

Echantillon		t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>
Contrôle	Blanc	33,1	91,3
	Blanc éthanol	-	63,5
	Biocide MBS	25,8	64,3
Goyavier	Extrait aqueux	-	48,5
	Extrait éthanol	21,8	46,2
	Extrait aqueux purifié	14,5	35
	Extrait éthanol purifié	15,3	34,9
Passion	Extrait aqueux	33,9	219
	Extrait éthanol	20,1	38,3
	Extrait aqueux purifié	17,7	160
	Extrait éthanol purifié	20,2	45,2

Concernant les valeurs des échantillons de contrôle, le blanc éthanolique et le biocide MBS présentent après vieillissement des teneurs en ATP cellulaire similaires et inférieures à celle du blanc ne contenant aucun biocide, démontrant l'activité antimicrobienne de l'éthanol dans la formule.

Parmi les formules contenant les extraits, après le vieillissement accéléré, les deux formules contenant les extraits aqueux bruts et purifiés de fruit de la passion présentent une contamination microbienne visible (Figure IV-13). Les teneurs élevées en ATP cellulaire à  $t_1$  (160 – 219 pg/mL) de ces deux échantillons corroborent cette observation. Notons que les quantités de polyphénols incorporés dans ces deux formulations sont les plus faibles (Tableau IV-9). De plus, ces deux extraits n'ont montré aucune activité contre le panel de souches testées lors de l'évaluation du potentiel antimicrobien.

Tous les autres échantillons montrent des teneurs en ATP cellulaire proches comprises entre 35 et 49 pg/mL, pour des quantités de polyphénols incorporées proches de 1 mg. Ces teneurs en ATP cellulaires sont inférieures aux teneurs du blanc éthanolique et du contrôle MBS, indiquant la capacité des extraits bruts et purifiés à protéger la formule d'un développement microbien. La protection fournie par les extraits bruts éthanoliques des deux fruits est en accord avec les résultats de l'évaluation du potentiel antimicrobien réalisée sur un panel de souches d'origine bactérienne et fongique, qui a mis en évidence l'activité à spectre large de ces extraits. Les propriétés de conservation des extraits aqueux de goyavier et des extraits éthanoliques purifiés sont cependant plus surprenantes, au vu de leurs activités antimicrobiennes absentes ou très ciblées (Tableau IV-7). Il est possible que ces extraits présentent en réalité un spectre d'activité plus large mais non mis en évidence par le panel de souches choisi. L'incorporation des extraits aux formulations de peintures peut également créer de nouvelles interactions entre composés et générer de nouvelles synergies, responsables d'une activité antimicrobienne renforcée.



Figure IV-13 : Photographies du développement microbien observé à la surface des échantillons contenant les extraits aqueux bruts et purifiés de fruit de la passion, après vieillissement accéléré

#### IV.4. Conclusion

Les nouveaux ingrédients ont été incorporés avec succès dans des formulations de peintures naturelles. Suivant les formules, les huiles végétales de goyavier rouge et de fruit de la passion peuvent être utilisées seules ou en mélange avec les huiles et les standolies actuellement utilisées. Les deux huiles permettent de remplacer efficacement jusqu'à un quart de la standolie de lin pour la peinture Natura lin et la totalité de la standolie de tournesol dans la peinture

Natura tournesol. L'huile de chanvre peut également être substituée par l'huile de goyavier, quelle que soit la formule. La substitution de l'huile de chanvre et des standolies de lin et de tournesol par les huiles végétales de fruit conduit à la formation de films répondant aux spécifications en termes de séchage, de teinte et de brillance. Les huiles végétales tropicales peuvent donc constituer une solution alternative à l'utilisation de standolies, réduisant ainsi l'impact environnemental du procédé de fabrication. En effet, la standolisation fait intervenir un procédé à haute température sous atmosphère inerte. Notons que les essais de substitution ont été réalisés avec des huiles issues d'une extraction par pression. Dans le cas des huiles extraites par macération éthanolique ou au CO<sub>2</sub> supercritique, il serait nécessaire d'effectuer de nouveaux essais car leurs teneurs en lipides et leurs compositions en autres composés sont différentes.

Les graines de lin textile, de tournesol et de chanvre contiennent entre 30 et 47 % d'huile [1, 2]. L'extraction par pression de ces graines mène à la récupération de 62 à 84 % de ce potentiel en huile [2]. La pression des graines de fruit de la passion conduit à l'extraction de 82,6 % du potentiel en huile. Afin d'atteindre l'objectif de production d'huile fixé par Derivery d'une tonne par an, environ 14 tonnes de co-produit frais de fruit de la passion seraient nécessaires. Cette prévision est en accord avec les 500 tonnes de fruits de la passion récoltés à La Réunion en 2017 selon la Chambre d'Agriculture. Pour le goyavier, dont les graines sont moins riches en huile et dont l'extraction par pression n'est pas optimisée, environ 127 tonnes de co-produit frais devraient être traités pour récupérer une tonne d'huile. Ce fruit est cependant produit à plus grande échelle (1500 tonnes en 2017) et transformé par Royal Bourbon Industries, la plus grande société de transformation fruitière de l'île de la Réunion.

Concernant la protection antimicrobienne des formulations, les extraits éthanoliques des deux fruits ont montré une activité antibactérienne à large spectre associée à une activité antifongique ciblée. Cette activité couvre l'une des deux souches identifiées comme contaminant potentiel par le LCSNSA. Ces deux extraits ont également permis d'inhiber efficacement le développement microbien au sein de la formulation Tassili<sup>TM</sup> mat après 3 mois de vieillissement accéléré, en conservant les performances de la peinture en termes de séchage ou de résistance à l'eau. Les extraits aqueux de goyavier (bruts et purifiés) et les extraits éthanoliques purifiés des deux fruits ont aussi montré un potentiel de conservation des formulations naturelles après vieillissement. Les quantités de co-produits mobilisées pour la production d'huile végétale suffiraient à couvrir les besoins en extraits végétaux (500 à 900 kg de co-produit nécessaire).

### *Références bibliographiques*

1. Jesus J., Lago J., Laurenti M., Yamamoto E., Passero L., Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids : an update, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-14
2. Morin O., Pages-Xatart-Pares X., Huiles et corps gras végétaux : ressources fonctionnelles et intérêt nutritionnel, *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 2012, 19, 63-75
3. Oomah, B., Kenaschuk E., Cui W., Mazza G., Variation in the composition of water-soluble polysaccharides in flaxseed, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43, 1484-1488
4. Daun J., Barthet V., Chornick T., Duguid S., 2003, Structure, composition, and variety development of flaxseed. dans: *Flaxseed in Human Nutrition, Second Edition*. Thompson, L. U. and Cunnane, S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 1-40
5. Morin O., Caractéristiques des huiles de lin et de chanvre, 2015, *OCL*, 22
6. Bureau L, L'huile de chanvre, *Phytothérapie*, 2010, 8, 109-112
7. Frich A., Guide de la gestion des couleurs, [en ligne], consulté le 04/12/2019, <https://www.guide-gestion-des-couleurs.com/espaces-couleurs-gamut.html>

## *Chapitre V : Partie expérimentale*

---

V.1. Préparation de la matière première .....	171
V.1.1. Traitement des co-produits frais .....	171
V.1.2. Caractérisation de la matière première .....	172
V.2. Extraction de l'huile végétale .....	176
V.2.1. Macération .....	176
V.2.2. Extraction par pression .....	176
V.2.3. Extraction au CO <sub>2</sub> -supercritique.....	177
V.3. Caractérisation de l'huile végétale .....	178
V.3.1. Détermination du profil glycéridique .....	178
V.3.2. Profil en acides gras.....	179
V.3.3. Indice d'iode.....	179
V.3.4. Indice d'acide .....	180
V.3.5. Dosages des caroténoïdes .....	180
V.3.6. Analyse des stérols .....	180
V.3.7. Analyses des tocophérols.....	181
V.4. Obtention de fractions bioactives .....	182
V.4.1. Macération.....	182
V.4.2. Extraction ASE.....	182
V.4.3. Extraction Soxhlet .....	182
V.4.4. Extraction Fibertec .....	182
V.4.5. Purification des extraits .....	182
V.5. Caractérisation des fractions bioactives .....	182
V.5.1. Dosage des polysaccharides .....	182
V.5.2. Dosage des polyphénols totaux .....	183
V.5.3. Mesure de l'activité anti-radicalaire .....	183
V.5.4. Caractérisation chimique par chromatographie sur couche mince haute performance .....	184

V.6. Formulation et caractérisation des peintures naturelles.....	187
V.6.1. Formulation .....	187
V.6.2. Caractérisation du film de peinture .....	187
V.7. Evaluation de la protection antimicrobienne .....	188
V.7.1. Identification des souches de contamination .....	188
V.7.2. Mesure du potentiel antifongique et antibactérien des extraits .....	188
V.7.3. Evaluation de la protection antimicrobienne des extraits .....	190
V.8. Procédé intégré d'extraction.....	191
V.8.1. Procédé discontinu.....	191
V.8.2. Procédé continu par extrusion bi-vis .....	191
V.8.3. Caractérisation des émulsions .....	193
<i>Références bibliographiques</i> .....	194

## Chapitre V : Partie expérimentale

### V.1. Préparation de la matière première

Les matières premières (co-produits issus des procédés de transformation des fruits et légumes) ont été fournies par des entreprises en agro-alimentaire de l’Ile de la Réunion : la Confiserie Panonnaise, la Confiserie d’Emilie, les vergers Law-Yat et l’entreprise Royal Bourbon Industries (Tableau V-1). Les co-produits ont été collectés frais sur site et stockés à - 4 °C avant séchage.

Tableau V-1: Lots de co-produits frais

Matière première	Partie de la plante	Masse de co-produit frais (kg)	MS du co-produit frais (g/100g)
<i>Goyavier rouge</i>	Pulpe, peau et graines	118,5	42,8
<i>Carambole</i>	Peau	15,6	7,2
<i>Banane</i>	Peau	9,3	10,3
<i>Tangor</i>	Peau	31,4	37,1
	Pépins	1,6	45,3
<i>Papaye</i>	Peau et graines	6,53	8,0
<i>Manioc</i>	Peau	5,6	20,3
<i>Patate douce</i>	Peau	9,6	29,9
<i>Fruit de la passion</i>	Pulpe et graines	19,4	49,1

#### V.1.1. Traitement des co-produits frais

Les matières premières de type pulpe et peau (carambole, papaye, banane, patate douce, manioc) ont été broyées à l’aide d’un robot à couteaux Philips HR7762/90 afin de faciliter leur séchage. Le co-produit de goyavier a été soumis à un lavage à l’eau pour séparer les graines de la pulpe et des peaux résiduelles. Une partie de la pulpe et des peaux (4 kg) a été récupérée puis séchée.

##### V.1.1.1. Séchage

Les matières premières ont été séchées dans un tunnel de séchage à convection Gunt CE 130 (Hamburg) à une température de 50 °C avec un flux d’air de 1 m.s<sup>-1</sup> pendant 48 heures (Tableau V-2).

Tableau V-2 : Lots de co-produits séchés

Matière première	Partie de la plante	Masse de co-produit séché (kg)	MS du co-produit séché (g/100g)
<i>Goyavier rouge</i>	Pulpe et peau	1,3	96,5
	Graines	37,8	96,5
<i>Carambole</i>	Peau	1,1	95,5
<i>Banane</i>	Peau	0,9	96,2
<i>Tangor</i>	Peau	8,8	96,5
	Pépins	0,5	99,2
<i>Papaye</i>	Peau	0,5	95,0
<i>Manioc</i>	Peau	1,1	96,2
<i>Patate douce</i>	Peau	2,3	96,5
<i>Fruit de la passion</i>	Pulpe	0,7	97,1
	Graines	5,9	96,7

### V.1.1.2. Traitement des co-produit séchés

Le co-produit de fruit de la passion (pulpe et graines) a été soumis à un tamisage (tamis 50 mm) pour séparer les graines et la pulpe.

Les co-produits séchés ont été entreposés à température ambiante dans des contenants en plastique hermétique, à l'abri de la lumière. Avant toute analyse ou extraction, un broyage fin de la matière première est réalisé à l'aide d'un broyeur à couteaux IKA A11 afin d'obtenir des particules de tailles inférieures à 1 mm.

### V.1.2. Caractérisation de la matière première

#### V.1.2.1. Teneur en eau et matières volatiles

La détermination de la teneur en eau et en matières volatiles est réalisée selon la norme NF EN ISO 665 [1]. Elle correspond à la différence de masse observée sur un échantillon après chauffage en étuve ventilée à 103 °C pendant 24 h. Cette teneur, notée H, est exprimée en g/100g ou pourcentage en masse et est calculée selon la formule suivante :

$$H = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où  $m_0$  est la masse du creuset (en g),  $m_1$  est la masse du creuset et de la prise d'essai avant dessiccation (en g) et  $m_2$  est la masse du creuset et du résidu de dessiccation (en g).

Ce protocole est légèrement modifié pour la détermination de la teneur en eau et en matières volatils d'échantillons éthanoliques. Un préchauffage de 12 h en étuve ventilée à 50 °C est ajouté avant la dessiccation en étuve à 103 °C.

La teneur en matières sèches, notée MS, est aussi exprimée en pourcentage en masse et se calcule à l'aide de la valeur de H selon la formule suivante :

$$MS = 100 - H = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

#### V.1.2.2. Teneur en matières minérales

La détermination de la teneur en matières minérales est réalisée selon la norme NF V18-101 [2]. L'échantillon est placé dans un creuset taré et calciné à 550 °C pendant 6 h. Le résidu obtenu est pesé et permet de calculer la teneur en matières minérales, notée MM, selon la formule suivante :

$$MM = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où  $m_0$  est la masse du creuset (en g),  $m_1$  est la masse du creuset et de la prise d'essai avant calcination (en g) et  $m_2$  est la masse du creuset et du résidu de calcination (en g).

La matière organique notée MO et correspondant à la différence entre la matière sèche et la matière minérale, peut alors être calculée selon la formule suivante :

$$MO = MS - MM$$

### V.1.2.3. Teneur en constituants pariétaux

*Principe* : L'estimation de la composition en constituants pariétaux (lignine, cellulose et hémicellulose) est réalisée grâce à la méthode de Van Soest et Wine à l'aide d'un appareil Fibertec Tecator M1017. Cette méthode exploite les différences de solubilisation des composants pariétaux dans plusieurs solutions détergentes. Les constituants non pariétaux sont éliminés par une attaque neutre à l'aide du réactif NDF (Neutral Detergent Fiber) à base d'EDTA afin d'estimer la teneur totale en composants pariétaux (Lignine, cellulose et hémicellulose). Lors de l'attaque acide réalisée avec le réactif ADF (Acidic Detergent Fiber) à base de CTAB et d'acide sulfurique dilué, les constituants non pariétaux et l'hémicellulose sont solubilisés. Enfin, une seconde attaque avec une solution oxydante de permanganate de potassium est effectuée sur le résidu de l'attaque acide afin de solubiliser la lignine. Pour chaque attaque, la masse organique de résidu est calculée et les teneurs en lignine L, cellulose C et hémicellulose peuvent alors être obtenues.

Matière → L + C + H	Matière → L + C	→ C
Attaque neutre (NDF)	Attaque acide (ADF)	Attaque oxydante

*Protocole* : Cette analyse est effectuée sur une matière première préalablement séchée et broyée. Les matières riches en lipides telles que les graines doivent également être délipidées.

**Attaque neutre** : La prise d'essai (1 g) est introduite dans un fritté de porosité 2 préalablement taré. 100 mL de réactif NDF (Neutral Detergent Fiber) à base d'EDTA, de sodium lauryl sulfate, de phosphate disodique, de borate de sodium décahydrate et d'éthylène glycol monoéthyl éther sont introduits et portés à reflux pendant 1 h. Le réactif et les composés solubilisés sont éliminés par filtration et le résidu est rincé plusieurs fois avec de l'eau distillée bouillante. Le fritté et le résidu rincé sont séchés à l'étuve ventilée à 103 °C pendant 12 h, pesés et calcinés au four à 550 °C pendant 6 h avant la pesée finale. La teneur totale en constituants pariétaux est alors calculée selon la formule suivante :

$$L + C + H = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où  $m_0$  est la masse du fritté (en g),  $m_1$  est la masse du fritté et de la prise d'essai (en g),  $m_2$  est la masse du fritté et du résidu séché (en g) et  $m_3$  est la masse du fritté et du résidu calciné (en g).

**Attaque acide** : La prise d'essai (1 g) est introduite dans un fritté de porosité 2 préalablement taré. 100 mL de réactif ADF (Acid Detergent Fiber) à base de CTAB et d'acide sulfurique dilué sont introduits et portés à reflux pendant 1 h. Le réactif et les composés solubilisés sont éliminés par filtration et le résidu est rincé plusieurs fois avec de l'eau distillée bouillante. Le fritté et le résidu rincé sont séchés à l'étuve ventilée à 103 °C pendant 12 h puis pesés avant de subir l'attaque oxydante.

**Attaque oxydante** : 25 mL de mélange (2/1 v/v) de solution de permanganate de potassium saturée (50 g/L) et de solution tampon à base de nitrate de fer, de nitrate d'argent, d'acide

acétique glacial, d'acétate de potassium et d'alcool butylique tertiaire sont ajoutés au résidu séché et régulièrement agités pendant 90 min. Le réactif et les composés solubilisés sont éliminés par filtration et le résidu est rincé plusieurs fois avec une solution déminéralisante composée d'acide oxalique dihydraté, d'éthanol et d'acide chlorhydrique jusqu'à obtention d'un résidu de couleur blanche. Celui-ci est alors rincé deux fois avec de l'éthanol et deux fois avec de l'acétone. Le fritté et le résidu rincé sont séchés à l'étuve ventilée à 103 °C pendant 12 h, pesés et calcinés au four à 550 °C pendant 6 h avant la pesée finale. Les teneurs en lignine et en cellulose sont alors calculées selon les formules suivantes :

$$L + C = \frac{m_2 - m_4}{m_1 - m_0} \times 100$$

$$C = \frac{m_3 - m_4}{m_1 - m_0} \times 100$$

$$L = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où  $m_0$  est la masse du fritté (en g),  $m_1$  est la masse du fritté et de la prise d'essai (en g),  $m_2$  est la masse du fritté et du résidu séché après l'attaque acide (en g),  $m_3$  est la masse du fritté et du résidu séché après l'attaque oxydante (en g) et  $m_4$  est la masse du fritté et du résidu calciné (en g).

#### V.1.2.4. Teneur en azote total et en protéines

La détermination de la teneur en azote total et en protéines est réalisée par la méthode Kjeldahl avec l'appareil Tecator Kjeltac 2200 selon la norme NF EN ISO 5983-1 [3]. Cette méthode comporte une première étape de minéralisation permettant de transformer l'azote organique de l'échantillon en ammoniacque et une deuxième étape de dosage de l'ammoniacque à l'acide chloridrique.

**Minéralisation :** La prise d'essai (0,5 à 1,5 g) est mise en contact avec de l'acide sulfurique concentré à 95 % (12,5 mL) et deux pastilles de catalyseur ( $\text{CuSO}_4$ ) à 400 °C pendant 1 h à l'aide d'un appareil Tecator Digestor 2020. La réaction de minéralisation est la suivante :



**Dosage :** Une solution de soude à 40 % est ajoutée après refroidissement pour libérer l'ammoniacque, l'entraîner à la vapeur d'eau et le piéger dans une solution d'acide borique à 1 % contenant un mélange d'indicateurs colorés (vert de bromocrésol et rouge de méthyle). L'acide borique est alors dosé en retour par une solution d'acide chloridrique à 0,1 N. Les réactions mises en jeu sont les suivantes :

- Réaction d'alcalinisation par la soude :



- Piégeage de l'ammoniac :



- Dosage en retour :



La teneur en protéines est alors obtenue en multipliant la teneur en azote total par un coefficient empirique représentant la teneur moyenne en azote dans les protéines. La teneur en protéines se calcule donc selon l'équation suivante :

$$P = 6,25 \times \frac{M_N \times C \times (V_{\text{éq}} - V_0)}{m}$$

Avec P la teneur en protéines en g/100g,  $M_N$  la masse molaire de l'azote en g/mol, C la concentration de la solution d'acide chlorhydrique en mol/L,  $V_{\text{éq}}$  le volume équivalent du dosage en mL,  $V_0$  le volume équivalent du blanc en mL, m la prise d'essai en mg

#### *V.1.2.5. Teneur en lipides totaux*

La teneur en lipides totaux de la matière première a été déterminée selon la norme NF EN ISO 659 adaptée. Une prise d'essai de 10 à 15 g de matière première préalablement broyée est pesée. L'extraction des lipides est effectuée par Soxhlet avec 150 mL d'hexane. Après 4h d'extraction, le solvant est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les dernières traces de solvants sont évaporées par chauffage en étuve ventilée à 103 °C pendant 10 min. La teneur en lipides, notée  $W_L$  et exprimée en pourcentage en masse est calculée selon la formule suivante :

$$W_L = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \times 100$$

Où  $m_0$  est la tare du ballon utilisé pour l'extraction (en g),  $m_1$  la masse de la prise d'essai (en g) et  $m_2$  la masse de lipides obtenus et du ballon (en g).

#### *V.1.2.6. Dosage des pectines*

La détermination de la teneur en pectines est réalisée selon la méthode Blumenkrantz et Asboe-Hansen qui repose sur le dosage spectrophotométrique d'un complexe de couleur rose formé l'acide galacturonique. Une étape préalable d'extraction des pectines en milieu acide à partir de la matière première est nécessaire.

**Extraction :** La première étape est effectuée à l'aide d'un appareil Fibertec Tecator M1017. La prise d'essai (1 g) est introduite dans un fritté de porosité 2. Environ 100 mL d'éthanol à 95 % sont ajoutés et portés à ébullition pendant 5 min. L'éthanol et les composés solubles sont éliminés par filtration et le résidu solide est lavé deux fois à l'éthanol 80 %. Le fritté contenant le résidu solide (Matériel insoluble à l'alcool ou MIA) est séché en étuve ventilée à 103 °C pendant 12h. Après séchage, les frittés contenant le MIA sont placés dans l'appareil et 100 mL d'acide chlorhydrique à 0,05 M sont ajoutés et portés à ébullition pendant 30 min. La solution contenant les pectines solubilisées est récupérée par filtration et une deuxième extraction de 30 min est effectuée. Le deuxième extrait est récupéré, ajouté au premier et le volume total est ajusté à 1 L avec de l'eau déminéralisée. La solution obtenue est alors utilisée pour le dosage spectrophotométrique.

**Dosage :** Une gamme d'étalons externes d'acide galacturonique (0 à 100 mg/L) est préparée. Une prise d'essai (0,5mL) et 3mL de tétraborate de sodium à 0,0125 M dans l'acide sulfurique concentré sont ajoutés dans un tube à essai puis agités au vortex. Les tubes sont plongés pendant 5 min dans de l'eau bouillante puis refroidis dans un bain de glace. 50 µL de réactif (0,15 % (m/v) de m-hydroxydiphényl dans la soude à 0,5 %) sont additionnés et le mélange est agité au vortex pendant 30 secondes. L'absorbance de la solution à 520 nm est alors suivie pendant 5 min. La valeur d'absorbance la plus élevée atteinte lors de la cinétique étant la valeur d'absorbance retenue pour le calcul de la teneur en acide galacturonique.

#### *V.1.2.7. Teneur en composés hydrosolubles et éthanol solubles*

La teneur en composés solubles est déterminée à l'aide d'un appareil Fibertec Tecator M1017. Une prise d'essai d'environ 1 gramme de matière première séchée et broyée est placée dans un fritté de porosité 2 préalablement taré. Après insertion dans l'appareil, la matière est immergée dans 100 mL de solvant et portée à ébullition pendant 1 h. Le solvant contenant les composés solubles est ensuite récupéré par aspiration à travers le fritté. Après deux rinçages avec ce même solvant, le fritté contenant le résidu solide est placé en étuve ventilée pendant 12 h puis pesé. La teneur globale en composés solubles, notée HS pour les hydrosolubles et ES pour les éthanol solubles, est alors calculée selon la formule suivante :

$$HS = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où  $m_0$  est la tare du fritté utilisé pour l'extraction (en g),  $m_1$  la masse de la prise d'essai (en g) et  $m_2$  la masse de fritté et du résidu séché après extraction (en g).

## **V.2. Extraction de l'huile végétale**

### *V.2.1. Macération*

Les graines préalablement broyées (10 g) ont été mises en contact avec 200 mL de solvant (éthanol 96 % ou n-hexane). Après macération sous agitation continue orbitale (pendant 4h, 8h ou 24h), le résidu solide est filtré sur papier Whatman 2V et le solvant est évaporé sous pression réduite à 40 °C. Les dernières traces de solvant sont éliminées par chauffage en étuve ventilée à 103 °C pendant 10 min.

### **V.2.2. Extraction par pression**

L'extraction par pression a été réalisée sur deux presses de types monovis, dont les différentes caractéristiques et conditions opératoires sont présentées dans le Tableau V-3. La presse Komet/ Motovario a été utilisée sur des lots de graines de taille réduite (300 – 1000g) tandis que la presse Komet CA 59G a permis de simuler l'extraction de lot de graines (2 – 11 kg) en conditions industrielles. Les deux presses disposent de trémie permettant l'alimentation manuelle des graines. Un collier chauffant en laiton placé sur la tête de pressage (Figure V-1) porte le fourreau à une température comprise entre 80 et 100 °C avant l'extraction pour faciliter le pressage des graines et atteindre le régime stationnaire. La température est ensuite maintenue par les forces de friction générées par le pressage.

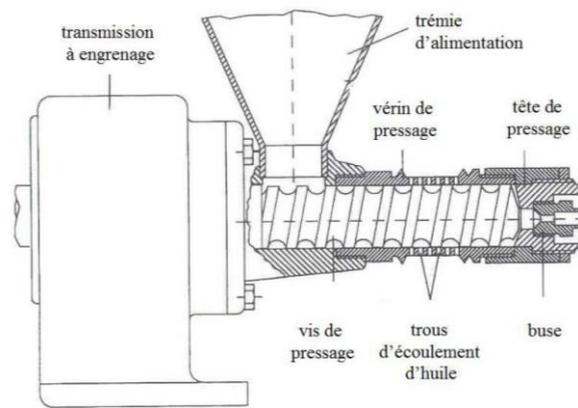


Figure V-1: Schéma d'une presse monovis

Tableau V-3 : Caractéristiques et conditions opératoires des deux presses monovis

	Komet CA 59G	Komet/ Motovario
Débit maximum d'huile (kg/h)	5	1
Puissance électrique du moteur (kW)	1,1	0,75
Longueur de vis (cm)	26,2	18
Ouverture de filière utilisée (mm)	10	6
Vitesse de rotation de la vis (rpm)	20-100	40

L'huile obtenue est filtrée sur papier Whatman 2 pour éliminer les particules solides et pesée.

L'humidité des graines de goyavier a été ajustée pour le pressage. Les graines et la quantité d'eau requise pour atteindre une teneur en eau de 11 % ont été homogénéisées et laissées en contact pendant 12h avant l'extraction.

### V.2.3. Extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique

L'équipement utilisé pour les extractions au CO<sub>2</sub>-supercritique (Figure V-2) est composé des éléments suivants :

- une pompe à CO<sub>2</sub> avec débitmètre intégré
- un réchauffeur
- un extracteur d'une contenance de 0,22L
- un séparateur d'une contenance de 0,22L
- 2 bains chauffants permettant de chauffer l'extracteur et le séparateur
- un système de refroidissement pour la pompe
- un coffret de commande
- 2 capteurs de pression (extracteur + séparateur)
- 2 manomètres à aiguille (extracteur + séparateur)
- 6 capteurs de température

L'équipement permet de travailler à des températures comprises entre 40 et 70 °C et jusqu'à une pression de 380 bars. Le CO<sub>2</sub> est approvisionné sous forme liquide depuis une bouteille par la pompe CO<sub>2</sub> et son système de refroidissement réglé à 2 °C. Il est ensuite pressurisé et délivré à un débit contrôlé compris entre 0,5 et 140 g/min. Le CO<sub>2</sub> est chauffé par le réchauffeur avant

de passer à l'état supercritique ( $T > 31\text{ °C}$ ,  $P > 74\text{ bars}$ ) par l'extracteur contenant la matière première. Le  $\text{CO}_2$  est alors détendu dans le séparateur permettant la récupération de l'extrait.

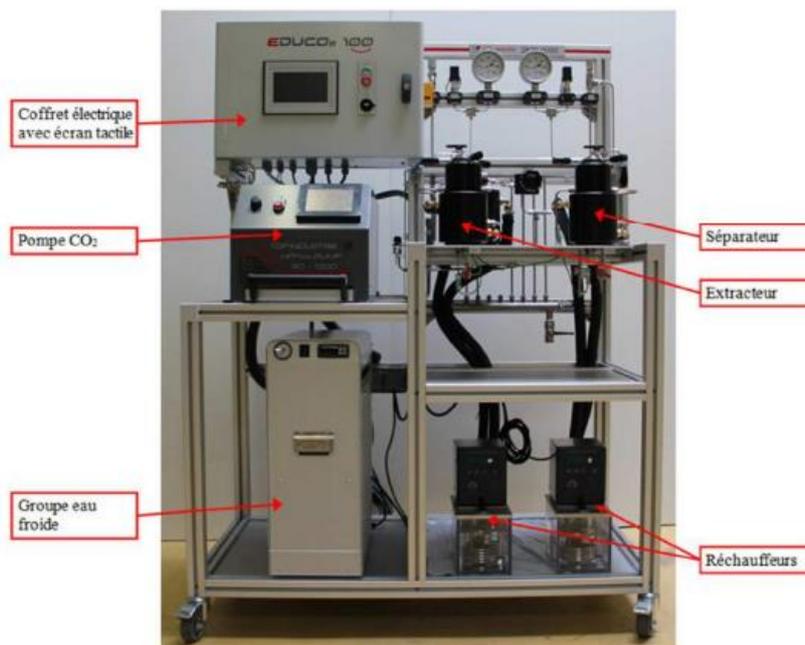


Figure V-2: Equipement d'extraction au  $\text{CO}_2$  supercritique

*Conditions expérimentales :* La cellule d'extraction est remplie de graines broyées finement (40-50 g), équipée d'un filtre en papier et d'un filtre en métal fritté avant d'être placée dans l'extracteur. La température de l'extracteur (40 ou 60°C) et du séparateur (60 °C) sont fixées au préalable. Après la phase de montée en pression et de stabilisation au débit souhaité, l'extraction est lancée. Afin de suivre la cinétique de l'extraction les extraits sont prélevés toutes les 5 min jusqu'à atteindre une masse constante.

### V.3. Caractérisation de l'huile végétale

#### V.3.1. Détermination du profil glycéridique

La détermination du profil glycéridique est réalisée par chromatographie en phase gazeuse après une étape de dérivation des acides gras.

**Dérivation :** Une solution à 1 g/L d'échantillon dans le cyclohexane est préparée et l'heptadécane (100 mg/L) est ajouté comme étalon interne. Un aliquot de 180  $\mu\text{L}$  de cette solution est mélangé avec 40 $\mu\text{l}$  de N-méthyl-N-triméthylsilyl-heptafluorobutyramide (MSHFBA). Le mélange est chauffé pendant 3 minutes à l'étuve à 103 °C.

**Analyse :** Les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG Perkin Elmer) avec un détecteur à ionisation de flamme selon les paramètres suivants :

- Colonne capillaire Agilent, DB5-HT
- Gaz vecteur : Hélium à une pression de 15 psi
- Injection on-column (1  $\mu\text{L}$ )

- Température de l'injecteur : maintien à 55°C pendant 0,5 min, augmentation à 340 °C à une vitesse de 200 °C/min, et maintien à 340 °C pendant 40 min
- Température du détecteur : 365 °C
- Température du four : maintien à 55 °C pendant 0,5 min, augmentation jusqu'à 80 °C à une vitesse de 45 °C/min, augmentation de 80 °C à 360 °C à une vitesse de 10 °C/min, et maintien à 360 °C pendant 16 min

Les monoglycérides, les diglycérides, les triglycérides et les acides gras libres sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux des standards.

### V.3.2. Profil en acides gras

La détermination du profil en acides gras d'une huile comporte une première étape de dérivation des acides gras avant l'analyse des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

**Dérivation :** La prise d'essai d'huile (20 mg) est dissoute dans 1 mL de TBME (méthyl tert-butyl éther). La méthylation d'un aliquot de 100 µL de ce mélange est effectuée avec 50µL de solution méthanolique de TMSH (Triméthylsulfonium hydroxyde) de concentration 0,5 M.

**Analyse :** Les échantillons sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG Varian 3900) avec un détecteur à ionisation de flamme selon les paramètres suivants :

- Colonne capillaire Agilent, Select FAME, 50 m x 0.25 mm x 0.25 µm
- Gaz vecteur : Hélium à un débit de 1,2 mL/min
- Injection on-column 1 µL
- Température de l'injecteur : 250 °C
- Température du détecteur : 250 °C
- Température du four : maintien à 185°C pendant 35 min, augmentation jusqu'à 250°C à une vitesse de 20°C/min, et maintien à 250°C pendant 1,75 min

Les acides gras sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux d'un mélange de standards.

### V.3.3. Indice d'iode

La détermination de l'indice d'acide des huiles a été réalisée selon la norme NF EN ISO 3961 adaptée [5]. Une prise d'essai adaptée à l'indice d'iode supposé de l'huile est choisie (0,15 g) et dissoute dans 20mL de chloroforme. 25 mL de réactif de Wijs sont ajoutés et le mélange est laissé sous agitation à l'abri de la lumière pendant 30 min. 20mL d'une solution d'iodure de potassium à 150 g/L et 100mL d'eau distillée sont alors additionnés. Le diiode est alors dosé à l'aide d'une solution de thiosulfate de sodium de concentration molaire connue. Trois blancs sont également réalisés sans échantillon. L'indice d'iode  $I_I$ , exprimé en gramme de diiode capable de se fixer sur les insaturations contenues dans 100 g d'huile, est calculé selon la formule suivante :

$$I_I = \frac{C_{thio} \times (V_0 - V_{eq}) \times 12,6}{m_h}$$

Où  $C_{\text{thio}}$  est la concentration de la solution de thiosulfate de sodium (en mol/L),  $V_0$  le volume moyen équivalent de solution de thiosulfate de sodium pour les blancs (en mL),  $V_{\text{éq}}$  est le volume équivalent de solution de thiosulfate de sodium pour l'échantillon (en mL) et  $m_h$  la masse de la prise d'essai d'huile (en g)

#### V.3.4. Indice d'acide

L'indice d'acide des huiles a été déterminé selon la norme NF EN ISO 660 adaptée [6]. La prise d'essai d'huile (20 mg) est dissoute dans 10 mL de propan-2-ol. Les acides gras libres contenus dans l'huile sont ensuite dosés par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium de concentration molaire connue. Le virage de l'indicateur coloré persistant après 30 secondes permet de déterminer le point d'équivalence. Trois blancs sont également réalisés sans échantillon. L'indice d'acide  $I_a$ , exprimé en mg d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1 g d'huile, est alors calculé selon la formule suivante :

$$I_a = \frac{C_{\text{KOH}} \times (V_{\text{éq}} - V_0) \times 56,1}{m_h}$$

Où  $C_{\text{KOH}}$  est la concentration de la solution de KOH (en mol/L),  $V_{\text{éq}}$  est le volume équivalent de KOH pour l'échantillon (en mL),  $V_0$  le volume moyen équivalent de KOH pour les blancs (en mL) et  $m_h$  la masse de la prise d'essai d'huile (en g)

#### V.3.5. Dosages des caroténoïdes

Le dosage des caroténoïdes totaux des huiles est effectué selon la norme NF EN ISO 17932 adaptée [7]. Une prise d'essai est choisie en fonction de la coloration de l'huile (0,1 à 0,5 g) et dissoute dans 2 mL d'isooctane. Après réalisation d'un blanc au solvant, 1mL de mélange est alors placé dans une cuve en quartz et l'absorbance est mesurée à 446 nm. La teneur en caroténoïdes totaux  $W_c$ , exprimée en mg d'équivalent  $\beta$ -carotènes par kg d'huile, est alors calculée selon la formule suivante :

$$W_c = \frac{\Delta A}{l \times \rho \times 2610} \times 10^6$$

Où  $\Delta A$  est la différence d'absorbance entre l'échantillon et le blanc,  $l$  le trajet optique de la cuve (en cm),  $\rho$  la concentration en huile dans l'isooctane (en g/100mL)

#### V.3.6. Analyse des stérols

La teneur et la composition en stérols des graines sont déterminées en chromatographie en phase gazeuse par injection de la fraction insaponifiable de l'huile extraite à froid.

**Extraction de l'huile :** Les graines broyées (5 g) sont placées dans des tubes à centrifuger avec 50 mL de cyclohexane. Après agitation au vortex, les tubes sont centrifugés pendant 15 min à 10000g à 5 °C. Après récupération de la phase organique grasse, deux autres extractions sont réalisées et les fractions rassemblées puis séchées avec quelques grammes de sulfate de sodium anhydre. Après filtration, le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif puis sous flux d'azote à température ambiante.

**Saponification et extraction de la fraction insaponifiable :** L'étalon interne du dosage des stérols est ajouté aux tubes servant pour la saponification. 50 µL de solution de cholestanol à 2 mg/L dans le chloroforme sont pesés précisément dans chaque tube avant évaporation du chloroforme sous flux d'azote. Une prise d'essai d'huile obtenue (100 mg) est introduite dans les tubes avec 2mL d'une solution d'hydroxyde de potassium à 1 M dans l'éthanol. Le mélange est agité au vortex et chauffé au bain marie à 75 °C pendant 20 min. Après refroidissement, 1 mL d'eau distillée et 6 mL de cyclohexane sont ajoutés et le mélange est agité au vortex. Après décantation, 160 µL de fraction insaponifiable (phase organique) sont prélevés, mélangés avec 40 µL de réactif de silylation (1mL de MSFBA + 50 µL de méthyl-imidazole) et chauffés à 103 °C pendant 3 min.

**Analyse en CPG :** Les échantillons sont ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse (Perkin Elmer) avec un détecteur à ionisation de flamme selon les paramètres suivants :

- Colonne CPSil 8CB, Varian, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm
- Gaz vecteur : Hélium avec une pression en tête de colonne de 100 kPa
- Injection on-column : 1 µL
- Température de l'injecteur : palier à 55 °C pendant 0,5 min, augmentation jusqu'à 340 °C à une vitesse de 200 °C/min et maintien à 340 °C pendant 45min
- Température du détecteur : 365 °C
- Température du four : palier à 160 °C pendant 0,5 min, augmentation jusqu'à 260 °C à une vitesse de 20 °C/min, augmentation jusqu'à 300 °C à une vitesse de 2 °C/min et augmentation jusqu'à 350 °C à une vitesse de 45 °C/min

Les stérols sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux d'un mélange de standards et quantifiés à l'aide de l'étalon interne (cholestanol).

### **V.3.7. Analyses des tocophérols**

La teneur et la composition en tocophérols des graines sont déterminées par chromatographie liquide de l'huile extraite à froid (voir extraction de l'huile dans 2.h) selon la norme NF EN ISO 9936 [8].

Une gamme d'étalons externes d'alpha, beta et gamma-tocophérols (1-5 mg/L) est préparée par dilution de solutions mères à 100 mg/L dans du cyclohexane. Une prise d'essai d'huile extraite à froid (10mg) est diluée dans 1 mg de cyclohexane.

**Analyse HPLC :** Les échantillons sont ensuite analysés par chromatographie liquide (Dionex) avec un détecteur fluorimétrique selon les paramètres suivants :

- Colonne Kromasil 100 SIL, 250 \* 4 mm
- Eluants : Isooctane/ Isopropanol (99,5/0 ,5) à un débit de 1,1mL/min
- Injection : 20 µL
- Détecteur :  $\lambda_{ex} = 290 \text{ nm}$  et  $\lambda_{em} = 317 \text{ nm}$

Les tocophérols sont identifiés par comparaison des temps de rétention avec ceux d'un mélange de standards et quantifiés par étalonnage externe.

## V.4. Obtention de fractions bioactives

### V.4.1. Macération

La matière première préalablement broyée (25 g) a été mise en contact avec 200 mL de solvant (acétone ou éthanol). Après macération sous agitation continue orbitale pendant 24h, le résidu solide est filtré sur papier Whatman 2V et le solvant est évaporé sous pression réduite à 30°C. Les extraits secs sont pesés puis resolubilisés dans de l'éthanol à 80 % pour les analyses.

### V.4.2. Extraction ASE

La matière première préalablement broyée (1 g) est mélangée avec 2 g de terre diatomée. Le mélange est placé dans les cellules d'extraction ASE entre deux filtres Whatman. La cellule est placée dans l'extracteur et mise à la température de 80 °C. Trois cycles d'extractions statiques de 5 minutes sont réalisés à une pression de 100 bars avant de nettoyer la cellule par une purge au solvant frais de 3 minutes. L'extrait résultant des trois cycles d'extraction et de la purge est collecté et la teneur en matière sèche est alors déterminée conformément à la méthode décrite dans le paragraphe 2.a.

### V.4.3. Extraction Soxhlet

La matière première préalablement broyée (20 g) a été mise en contact avec 175 mL de solvant (éthanol) dans un appareillage Soxhlet. Après 3 heures d'extraction, l'extrait est obtenu et la teneur en matière sèche est alors déterminée conformément à la méthode décrite dans le paragraphe 2.a.

### V.4.4. Extraction Fibertec

Les extraits sont obtenus selon le protocole décrits dans le paragraphe 2.f avec de l'eau ou de l'éthanol à 96%. Les fractions actives (composés solubilisés dans le solvant) sont obtenues par aspiration à travers les frittés. Leur teneur en matière sèche est alors déterminée conformément à la méthode décrite dans le paragraphe 2.a.

### V.4.5. Purification des extraits

**Préparation de la colonne de purification :** 30 g de résine FPX66 ont été introduits dans une colonne en verre et ont été rincés successivement avec 120 mL d'eau distillée, 120 mL d'un mélange eau : éthanol (80 : 20) (v : v), et 120 mL d'eau.

**Purification des extraits :** Environ 100 mL d'extrait solubilisé dans l'eau ont été lentement introduits dans la colonne. Un rinçage à l'eau distillée (120 mL) est ensuite effectué avant d'éluer les composés adsorbés avec 200 mL d'un mélange eau : éthanol (80 : 20) (v : v).

## V.5. Caractérisation des fractions bioactives

### V.5.1. Dosage des polysaccharides

Les teneurs en glucose et en fructose des échantillons ont été déterminées par chromatographie ionique à l'aide d'un détecteur électrochimique comportant une électrode travail en or.

- Colonne CarboPac PA1 (Dionex), 4 x 250 mm
- Eluant : Hydroxyde de potassium à un débit de 1 mL/min

- Gradient de concentration : maintien à 2mM pendant 39min, augmentation à 10 mM pendant 2min, augmentation à 100 mM pendant 8min, augmentation à 100 mM pendant 3min
- Température : 25°C
- Volume d'injection : 25 µL
- Liquide post-colonne : hydroxyde de sodium 300mM

La quantification est réalisée par étalonnage interne à l'aide du fucose et de deux gammes étalons de glucose et fructose (5 à 100mg/L).

### ***V.5.2. Dosage des polyphénols totaux***

La détermination de la teneur totale en polyphénols est réalisée par spectrophotométrie selon la méthode Folin-Ciocalteu. Le réactif du même nom constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration obtenue est évaluée à 760 nm et permet d'obtenir le taux de composés phénoliques contenus dans l'échantillon.

Une gamme d'étalonnage (0-100 mg/L) est préparée à partir d'une solution mère d'acide gallique dans l'éthanol à 500 mg/L. Les échantillons aqueux ou éthanoliques sont dilués (dilution 2 à 20) afin que leur concentration en polyphénols totaux soit comprise dans cette gamme de concentrations. L'analyse est effectuée en microplaque de 96 puits à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectrostar BMG, Labtech). Le blanc, les échantillons et les étalons sont analysés respectivement dans 4 puits distincts. Les 4 puits permettant d'obtenir la valeur du blanc sont remplis avec 200 µL d'eau. Les autres puits sont remplis de 20 µL d'étalon ou d'échantillon, de 10µL de réactif de Folin et de 170 µL d'une solution de carbonate de sodium à 2,36%. La plaque est incubée à 45°C et l'absorbance à 760 nm est mesurée toutes les 10 minutes pendant 40 minutes.

### ***V.5.3. Mesure de l'activité anti-radicalaire***

La détermination de l'activité antiradicalaire est réalisée par spectrophotométrie grâce au test DPPH (diphénylpicryldrazil). Cette molécule est réduite en DPPH-H par les composés antioxydants de l'échantillon, entraînant une décoloration mesurée à 516 nm. L'activité antiradicalaire de l'échantillon est évaluée grâce à l'IC<sub>50</sub>, valeur correspondant à la concentration d'échantillon nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH.

L'analyse est effectuée en microplaque de 96 puits à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectrostar BMG, Labtech). Les 4 puits permettant d'obtenir la valeur du blanc sont remplis avec 300 µL d'éthanol 96%. Les 5 puits permettant d'obtenir la valeur contrôle sont remplis avec 150 µL d'éthanol et 150 µL de solution éthanolique de DPPH à 90 mg/L. Pour chaque échantillon, 7 dilutions différentes sont effectuées dans les puits en ajoutant des volumes d'échantillons croissants (20-150 µL) et le volume d'éthanol nécessaire pour atteindre 150 µL. Chaque dilution d'échantillon est analysée dans 3 puits distincts. La solution de DPPH à 90 mg/L est ensuite ajoutée dans tous les puits d'échantillon (150 µL) et l'absorbance à 516nm est lue toutes les 5 minutes pendant 35 minutes.

Les valeurs d'absorbance finales permettent de tracer le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'échantillon (C) avec le pourcentage d'inhibition calculé selon la formule suivante :

$$I = \frac{(A_0 - A) * 100}{A_0}$$

Où  $A_0$  est l'absorbance moyenne du contrôle et A l'absorbance de l'échantillon.

La valeur de l'IC<sub>50</sub>, exprimée en mg/L est alors obtenue selon la formule suivante :

$$IC_{50} = \frac{0,5 - b}{a}$$

Où a est la pente de la droite  $I = f(C)$  et b l'ordonnée à l'origine.

#### ***V.5.4. Caractérisation chimique par chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP)***

##### ***V.5.4.1. Produits chimiques et matériel***

Les plaques en verre CCMHP silica gel 60F254 Merck (20 x 10 cm, épaisseur de couche 200 µm) ont été achetées chez Chromacim (Moirans, France).

Le réactif de dérivation à l'anisaldéhyde sulfurique a été préparé comme en diluant 0,5 mL d'anisaldéhyde dans 50 mL d'acide acétique et 1 mL d'acide sulfurique.

Les étalons chimiques : monooléine (MAG), dioléine (DAG), trioléine (TAG), acide ursolique, acide oléanolique, ergostérol, stigmastérol, nonacosane C29, glucose et fructose ont été préparés à 1 g/L dans l'hexane, le chloroforme, le THF ou le méthanol selon leur solubilité.

##### ***V.5.4.2. Équipement CCMHP et procédures générales***

Les extraits de graines de goyavier et de fruit de la passion ont été dilués à environ 1 g/L dans le cyclohexane ou dans un mélange chloroforme/méthanol (1 :1, v/v) pour les extraits éthanoliques et au CO<sub>2</sub> supercritique (Tableau V-4)

Les extraits de pulpe/peaux de goyavier et de fruit de la passion issus des macérations dans l'éthanol et dans l'eau, avant (MS = 30 g/L) et après purification sur résine (MS = 3 g/L) (Tableau V-4) ont été filtrés sur filtres seringues Millipore de 0,45 µm en acétate de cellulose ou PTFE selon le solvant. L'extrait aqueux de goyavier a dû être dilué par 10 avant filtration.

Tableau V-4 : Préparation des extraits pour la caractérisation chimique par CCMHP

MP	Extraction	Solvant extraction	C (mg/mL)	Solvant reprise
<b>Graines de goyavier</b>	Soxhlet	Hexane	1,32	Cyclohexane
	Macération 24h	Hexane	1,25	Cyclohexane
	Soxhlet	EtOH	1,09	Cyclohexane
	Soxhlet	EtOH	1,3	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (1:1)
	Macération 24h	EtOH	1,24	Cyclohexane
	SC-CO <sub>2</sub>	-	1,12	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (1:1)
<b>Pulpe et peaux de goyavier</b>	Extraction	EtOH	23,7	EtOH
	Extraction-Purification	EtOH-EtOH	2,6	EtOH 80%
	Extraction	H <sub>2</sub> O	3	H <sub>2</sub> O
	Extraction-Purification	H <sub>2</sub> O-EtOH	2,6	EtOH 80%
<b>Graines de fruit de la passion</b>	Soxhlet	Hexane	1,33	Cyclohexane
	Macération 24h	Hexane	1,35	Cyclohexane
	Soxhlet	EtOH	1,06	Cyclohexane
	Soxhlet	EtOH	1,14	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (1:1)
	Macération 24h	EtOH	1,15	Cyclohexane
	SC-CO <sub>2</sub>	-	1,24	CHCl <sub>3</sub> /MeOH (1:1)
<b>Pulpe de fruit de la passion</b>	Extraction	EtOH	23,7	EtOH
	Extraction-Purification	EtOH-EtOH	2,6	EtOH 80%
	Extraction	H <sub>2</sub> O	30	H <sub>2</sub> O
	Extraction-Purification	H <sub>2</sub> O-EtOH	2,6	EtOH 80%

Les échantillons ont été appliqués sur les plaques HPTLC au moyen de l'Autosampler ATS3 de CAMAG (Muttenez, Suisse). L'hexane, le chloroforme, l'éthanol et l'eau ont été utilisés comme solvants de rinçage en fonction des solvants de dilution des échantillons et des étalons chimiques. Les paramètres suivants ont été utilisés :

- Volume de prédosage : 1000 nL
- Surplus volume : 1000 nL
- Volume de rétractation : 100 nL
- Vitesse de dépôt : 50 nL/s (eau, éthanol), 150 nL/s (chloroforme, chloroforme/méthanol) ou 200 nL/s (hexane, cyclohexane)
- Vitesse de remplissage du capillaire : 500 nl/s

- Durée de rinçage : 10 s
- Volume de compression : 300 nL
- Durée de compression : 10 s
- Volume de décompression : 240 nL.

Le premier dépôt est appliqué à 15 mm du bord externe de la plaque (X) et à 10 mm du bord inférieur de la plaque (Y). La distance entre les dépôts est fixée automatiquement par le logiciel en fonction du nombre total de dépôts. Le mode d'application spray a été sélectionné, avec une vitesse de bande de 5 mm/s pour les solvants eau et éthanol et de 10 mm/s pour les autres solvants. La largeur de bande est fixée entre 4 et 5 mm selon le nombre total de dépôts.

Après développement (séchage de 30 minutes à l'air libre, à 20°C), les plaques sont scannées à 200 nm dans le TLC Scanner 3 de CAMAG, équipé de lampes au deutérium et au tungstène. La dimension de la fente a été fixée à 3 x 0,2 mm ou 4 x 0,2 mm. La vitesse de scan est de 10 mm/s et la résolution de 100 µm/step. Le type et le mode de mesure ont été sélectionnés sur rémission et absorption. Un filtre optique de second ordre a été utilisé, et le mode et la sensibilité du détecteur sont fixés automatiquement.

Le facteur de retard  $R_f$  est calculé comme représentant la position de la substance détectée en fonction du front de solvant mesuré à partir de la position initiale de dépôt (Y).

Les plaques sont ensuite dérivatisées par immersion dans une solution d'anisaldéhyde sulfurique au moyen du Chromatogram Immersion Device III de CAMAG, avec une vitesse d'immersion de 2 cm/s et une durée d'immersion de 3s. Elles sont séchées dans une étuve à 105°C pendant 5 à 10 minutes. Elles sont photographiées à la lumière du jour par une caméra digitale de 8 mégapixels (1,5 µm pixels, f/2,2). Elles sont de nouveau scannées à différentes longueurs d'onde (entre 400 et 800 nm, intervalles de 100 nm).

Les spectres UV-visible (200-800 nm) des substances détectées ont été enregistrés par le TLC Scanner 3, selon les paramètres utilisés pour le scan des densitogrammes.

L'Autosampler et le Scanner sont pilotés par le logiciel WinCats 1.4.6.2002 Planar Chromatography Manager de CAMAG. L'acquisition des données et leur traitement sont également effectués sur WinCats.

#### *V.5.4.3. Caractérisation chimique des extraits*

Les volumes d'application des différents échantillons sont adaptés de façon à déposer environ 8 µg d'extraits de graines et 30 µg d'extraits de pulpe, selon les concentrations de chaque extrait. A la fin des dépôts, les plaques sont séchées pendant 30 minutes à l'air libre, à l'abri de la lumière et à 20 °C avant développement.

Les développements sont opérés dans une cuve en verre à fond plat de 24 x 24 x 8 cm pour le système lipides (solvant de migration : hexane / éther diéthylique / acide acétique glacial, 70 :30 :1), et dans une cuve en verre double fond de 24 x 12 x 8 cm pour le système triterpénoïdes (solvant de migration : hexane / chloroforme / méthanol 3 :6 :1). La cuve à fond

plat est saturée par 45 mL de solvant de migration et la cuve double fond par 20 mL pendant 2 heures. La migration est effectuée directement dans la cuve à fond plat et dans 10 mL de solvant de migration dans la cuve double fond, jusqu'à 6 cm du bord inférieur des plaques. Après migration, les plaques sont séchées à l'air libre à 20°C pendant 30 minutes avant d'être analysées.

Les facteurs de retardement  $R_f$  ainsi que les spectres UV-visible des différentes substances séparées et détectées dans chaque analyse sont comparés à ceux des étalons chimiques.

## V.6. Formulation et caractérisation des peintures naturelles

Le procédé de fabrication inclut la préparation des demi-produits qui seront ensuite mélangés pour obtenir la finition. Le protocole de fabrication de chaque type de produits est détaillé ci-dessous. Toutes les étapes de mélange sont effectuées à l'aide de disperseurs équipés de turbine plate à disque denté.

### V.6.1. Formulation

**Base pigmentaire :** Un gel est préparé en mélangeant de l'eau et un épaississant à base d'éther de cellulose. Un mélange de différentes charges et les pigments sont ensuite ajoutés. Un broyage à bille d'une heure est effectué pour homogénéiser la base pigmentaire et obtenir la finesse exigée.

**Vernis :** Les huiles ou les standolies d'huiles végétales sont mélangées et chauffées. Lorsque leur température de dissolution est atteinte, les résines naturelles, telles que la résine dammar (résine terpénique) sont ajoutées. Après dissolution, le vernis est filtré à chaud pour éliminer les impuretés non solubilisées.

**Emulsions :** L'eau et la caséine sont mélangés au disperseur. Après ajustement du pH à une valeur comprise entre 8 et 9, la solution est laissée sous agitation jusqu'à épaississement. La phase huile (verniss, huile ou standolie) est alors ajoutée progressivement. Le mélange est agité jusqu'à l'obtention d'une émulsion homogène dont la viscosité est ajustée par ajout d'eau ou de gel.

**Finition :** La finition est préparée par ajout d'une base pigmentaire à une émulsion sous agitation au disperseur. Les additifs nécessaires, tels que les biocides ou le siccatif sont également incorporés.

### V.6.2. Caractérisation du film de peinture

L'application des échantillons est réalisée sur plaque de verre selon une épaisseur de 150µm à l'aide d'un tire-film et suivie d'un séchage en chambre ventilée et climatisée à 21°C. Dans le cas des essais de jaunissement, l'application a été faite sur des cartes à contraste à une épaisseur de 300 µm à l'aide d'un tire-film. La résistance et l'aspect du film obtenu sont caractérisés selon des protocoles normés ou des protocoles internes validés par l'entreprise.

#### V.6.2.1. Dureté pendulaire

La mesure de la dureté du film s'effectue selon la norme NF EN ISO 1522 [9]. La plaque de verre est immobilisée sous les deux billes servant de point d'appui à un pendule de Persoz (Erichsen, 299/300) (Figure V-3). Le pendule est fixé à un angle de 12° par rapport à sa position

de repos. La dureté est mesurée en lâchant le pendule et en notant la durée d'oscillation nécessaire pour passer d'une amplitude de  $12^\circ$  à  $4^\circ$ .



Figure V-3: Pendule de Persoz utilisé pour les mesures de dureté

La mesure de la dureté est réalisée toutes les 24h après application pendant une semaine, puis à 14 jours, 21 jours et 31 jours.

#### *V.6.2.2. Résistance à l'eau*

La résistance à l'eau du film formé après application est évaluée en déposant une goutte d'eau sur la peinture. Au bout d'une minute, l'eau est essuyée. Le film est déclaré résistant à l'eau si aucune altération n'est constatée visuellement. Le test est réalisé toutes les 24h après application, jusqu'à constatation de la résistance du film à l'eau.

#### *V.6.2.3. Jaunissement*

L'évaluation du jaunissement d'une peinture à l'obscurité se fait par comparaison des coordonnées colorimétriques avant et après une période de mise à l'obscurité. Une première mesure des coordonnées L, a\* et b\* est effectuée 24h après application à l'aide d'un spectrophotomètre (X-Rite 8200). Les cartes à contraste sont ensuite placées à l'obscurité et les paramètres sont de nouveau mesurés après 7 jours et 15 jours. La différence constatée au niveau du paramètre b permet d'évaluer le jaunissement de la peinture.

#### *V.6.2.4. Indice de brillance*

La mesure de l'indice de brillance est effectuée à l'aide d'un brillancemètre (Picogloss 503) à un angle de  $60^\circ$  selon la norme NF EN ISO 2813 [10]. L'indice de brillance est défini comme la moyenne de trois mesures effectuées en trois endroits différents du film.

La mesure de l'indice de brillance est réalisée 24h après application.

## **V.7. Evaluation de la protection antimicrobienne**

### *V.7.1. Identification des souches de contamination*

Des échantillons de peinture Tassili<sup>TM</sup> mat sans biocide ont été placés dans des environnements différents :

- Dans une pièce à atmosphère contrôlée ( $25^\circ\text{C}$ , % $\text{H}_2\text{O}$  55 %) en métropole pendant 1 mois

- A l'extérieur (29 °C, %H<sub>2</sub>O 65 %) à La Réunion pendant 12 heures

**Ensemencement :**

Sept milieux de culture ont été préparés avec les compositions suivantes (Tableau V-5)

Tableau V-5: Composition des milieux de culture (en g/L)

Milieu	Composition	pH final du milieu
<b>PCA</b>	Tryptone : 5,0	7,0
	Extrait autolytique de levure : 2,5	
	Glucose : 1,0	
	Agar agar bacteriologique : 12,0	
<b>YGC</b>	Extrait de levure : 5,00	6,6
	Glucose : 20,00	
	Chloramphenicol : 0,10	
	Agar : 15,00	
<b>TSC</b>	Tryptone : 15,0	7,6
	Peptone papainique de soja : 5,0	
	Extrait autolytique de levure : 5,0	
	Metabisulfite de sodium : 1,0	
	Citrate ferrique ammoniacal : 1,0	
	D-cycloserine : 0,4	
Agar agar bacteriologique : 15,0		
<b>Sabouraud</b>	Tryptone : 5,0	5,7
	Peptone pepsique de viande : 5,0	
	Glucose : 20,0	
<b>PDA</b>	Extrait de pomme de terre : 4,0	5,6
	Glucose : 20,0	
	Agar agar bacteriologique : 15,0	
<b>TBX</b>	Tryptone : 20,0	7,2
	Sels biliaires n°3 : 1,5	
	BCIG : 5,0 mg/L	
	Agar agar bacteriologique : 9,0	
<b>Baird Parker</b>	Tryptone : 10,0	7,2
	Extrait de viande : 5,0	
	Extrait autolytique de levure : 1,0	
	Pyruvate de sodium : 10,0	
	Glycine : 12,0	
	Chlorure de lithium : 5,0	
	Agar agar bacteriologique : 15,0	
Emulsion de jaune d'oeuf : 47,0 mL/L		
Tellurite de potassium a 3,5% : 3,0 mL/L		

Les milieux de culture ont été ensemencés par stries avec les échantillons de peinture et incubés pendant 24 heures à 37 °C.

**Coloration de Gram :**

Les bactéries déposées sur une lame de microscope sont colorées avec du violet de Gentiane. La lame est ensuite rincée avec un mélange acétone-éthanol. Les bactéries Gram – sont enfin recolorées avec de la fuschine avant l'observation microscopique.

### Galerie API :

La galerie API est ensemencée avec le microorganisme isolé en solution. Après incubation pendant 24 à 48 heures à 37 °C, les réactifs nécessaires à la lecture de la galerie sont ajoutés.

#### *V.7.2. Mesure du potentiel antifongique et antibactérien des extraits*

Le potentiel antibactérien et antifongique des extraits a été déterminé par la méthode de diffusion sur disque. Les souches de microorganismes testées sont :

Bactérienne :

- Staphylococcus aureus
- Staphylococcus epidermis
- Escherichia coli
- Klebsiella pneumoniae
- Pseudomonas aeruginosa
- Enterococcus faecium
- Enterobacter cloacae

Fongique :

- Aspergillus niger
- Penicillium italicum
- Candida albicans
- Candida famata

Les diamètres d'inhibition ont été relevés et comparés au diamètre d'inhibition des témoins de contrôle (solvant de l'extrait).

#### *V.7.3. Evaluation de la protection antimicrobienne des extraits*

La contamination microbienne des échantillons est évaluée grâce au kit d'ATPmétrie Aquatools QG21S™. Ce test, basé sur le principe de bioluminescence, permet de déterminer l'ATP (adénosine triphosphate) total et l'ATP extracellulaire présent au sein de la peinture, afin d'estimer les quantités de microorganismes vivants, morts et totaux.

Une calibration est réalisée avant chaque série d'analyses afin de vérifier l'activité de l'enzyme et de pouvoir convertir les valeurs relevées sur le luminomètre en concentrations d'ATP. Une solution de Luminase (100µL) et 2 gouttes du réactifs Ultracheck sont mélangés et la valeur de  $RLU_{ATP1}$  est lue au luminomètre. Si la valeur obtenue est inférieure à 50000 RLU (Unité Relative de Lumière), une nouvelle solution d'enzyme Luminase doit être utilisée. Pour l'analyse, l'échantillon (1 mL) est pré-dilué dans la solution Ultralute (9 mL). L'ATP total est ensuite extrait de l'échantillon pré-dilué (1 mL) à l'aide du réactif Ultralyse 30'' (1mL) pendant 1 minute. Afin de réduire les interférences lors de la mesure, l'échantillon extrait est dilué et bien homogénéisé avec 8 mL d'Ultralute Resin. Un aliquot (100 µL) de l'échantillon ainsi dilué est ajouté à la solution de Luminase (100 µL) avant la mesure au luminomètre ( $RLU_{tATP}$ ). L'analyse de l'ATP extracellulaire ou ATP dissout est effectuée à partir de l'échantillon pré-

dilué (1 mL) et du réactif Lumisolve (9 mL). Après une minute, 100 µL du mélange et 100 µL de solution de Luminase sont homogénéisés pour la mesure au luminomètre ( $RLU_{dATP}$ ).

Les valeurs d'ATP total, dissout et intracellulaire sont calculés grâce aux formules suivantes :

$$tATP = \frac{RLU_{tATP}}{RLU_{ATP1}} \times 100000$$

$$dATP = \frac{RLU_{dATP}}{RLU_{ATP1}} \times 100000$$

$$cATP = tATP - dATP$$

Avec tATP : l'ATP total en pg ATP/mL ; dATP : l'ATP dissout en pg ATP/mL ; cATP : l'ATP intracellulaire en pg ATP/mL.

## V.8. Procédé intégré d'extraction

### V.8.1. Procédé discontinu

**Voie 1 :** La partie comestible de 15 fruits de la passion (jus, pulpe et graines) a été broyée au blender (Gründig) pendant 3 cycles de 15 secondes, avec homogénéisation manuelle entre chaque cycle. Le mélange introduit dans un broyeur à fort cisaillement (Silverson) est broyé pendant 2 min puis filtré sur toile de nylon (ouverture de maille 100 µm).

**Voie 2 :** La partie comestible de 15 fruits de la passion a été filtrée sur tamis (ouverture 1 mm) afin d'éliminer le jus. Une masse d'eau équivalente à la masse de jus éliminée a été ajoutée au résidu de filtration (pulpe et graines) avant le broyage au blender, au broyeur à fort cisaillement et la filtration sur toile.

### V.8.2. Procédé continu par extrusion bi-vis

L'extrusion du fruit entier a été réalisée à l'aide d'un extrudeur bi-vis Clextral BC21 composé de deux vis inter-pénétrantes co-rotatives. L'extrudeur est constitué de sept modules de 100 mm de longueur assemblés entre eux. Ces modules sont thermo-régulés par circulation d'eau et peuvent être ouverts pour alimenter l'extrudeur en matières premières ou en liquides, fermés, ou équipés de grilles filtrantes. Une pompe à piston permet d'alimenter l'extrudeur en solvant. Les deux vis sont entraînées par un moteur et peuvent atteindre une vitesse de 227 rpm. Chaque module est équipé de différents éléments de vis de 25 ou 50 mm de longueur. Le profil de vis utilisé pour l'extraction de fruit de la passion est présenté dans la Figure V-4. L'extraction se décompose en deux étapes : une première extrusion du fruit entier et une extraction aqueuse de l'extrudat obtenu à la première étape.

Profil 1	1		2		3		4		5		6		7			
	T2F 50	T2F 50	C2F 33	C2F 33	C2F 25	BB 90° (9°)	C2F 33	C2F 25	BB 90° (10°10)	C2F 33	C2F 25	C2F 25	C2F 16	C2F 16	C2F 16	CF2C -25

Profil 2	1		2		3		4		5		6		7			
	T2F 50	T2F 50	C2F 33	C2F 33	C2F 25	BB 90° (6°)	C2F 33	C2F 25	BB 90° (10°10)	C2F 33	C2F 25	C2F 25	C2F 16	C2F 16	C2F 16	CF2C -16

Figure V-4: Profil de vis utilisé pour les deux étapes d'extraction du fruit de la passion

T2F : vis trapézoïdale double filet ; C2F : vis de convoyage double filet ; BB : malaxeur bilobe ; CF2C : contre-filet à double filet

**1<sup>ère</sup> extraction :** Les fruits de la passion découpés en morceaux (2 \*2 cm) sont alimentés manuellement dans l'extrudeur à un débit de 6 kg/h. La vitesse de vis est fixée à 150 rpm. L'extrudat solide et la fraction liquide en sortie du module 6 sont récupérées et pesées après atteinte du régime stationnaire (après 10 minutes). La fraction liquide est ensuite filtrée sur toile de nylon (ouverture de maille 100 µm).

**Extraction aqueuse :** L'extrudat de la première extraction est alimenté manuellement dans l'extrudeur à un débit de 6 kg/h. De l'eau est injectée au niveau du module 2 à un débit de 4,8 kg/h. La vitesse de la vis est fixée à 200 rpm. L'extrudat solide et la fraction liquide sont récupérés et pesés après atteinte du régime stationnaire (après 10 minutes). La fraction liquide est ensuite filtrée sur toile de nylon (ouverture de maille 100 µm).

**Caractérisation :** La teneur en huile des filtrats a été déterminée par extraction liquide liquide au cyclohexane. La détermination des teneurs en polysaccharides et en polyphénols totaux et la mesure de l'activité antioxydante ont été réalisées. Le taux de lipides de l'extrudat a été déterminé par extraction Soxhlet à l'hexane.

**Calcul :** Les fractions solides, liquides et les résidus de filtration sur toile ont été pesés et leur taux de matières sèches mesurés. Les débits de solide, de liquide et de résidus de filtrations ont ainsi été obtenus. Le rendement en filtrat  $Y_F$ , exprimé en g/100g de MS, a été calculé selon la formule suivante :

$$Y_F = \frac{Q_F \times MS_F}{Q_{MP} \times MS_{MP}} \times 100$$

Où  $Q_F$  est le débit de filtrat en kg/h,  $MS_F$  est le taux de matière sèche du filtrat,  $Q_{MP}$  est le débit de matière première introduite en kg/h et  $MS_{MP}$  le taux de matière sèche de la matière première.

Le rendement en huile  $Y_H$ , exprimé en g/100g de MS, a été calculé selon la formule suivante :

$$Y_H = \frac{Q_F \times MS_F \times W_{LF}}{Q_{MP} \times MS_{MP}} \times 100$$

Où  $Q_F$  est le débit de filtrat en kg/h,  $MS_F$  est le taux de matière sèche du filtrat,  $W_{LF}$  est la teneur en lipides du filtrat en g/100g de MS,  $Q_{MP}$  est le débit de matière première introduite en kg/h et  $MS_{MP}$  le taux de matière sèche de la matière première.

Le rendement en polyphénols  $Y_{PP}$ , exprimé en g/100g de MS, a été calculé selon la formule suivante :

$$Y_{PP} = \frac{Q_F \times MS_F \times W_{PPF}}{Q_{MP} \times MS_{MP}} \times 100$$

Où  $Q_F$  est le débit de filtrat en kg/h,  $MS_F$  est le taux de matière sèche du filtrat,  $W_{PPF}$  est la teneur en polyphénols du filtrat en g/100g de MS,  $Q_{MP}$  est le débit de matière première introduite en kg/h et  $MS_{MP}$  le taux de matière sèche de la matière première.

### V.8.3. Caractérisation des émulsions

#### V.8.3.1. Microscopie optique

La microstructure des échantillons a été étudiée à l'aide d'un microscope optique Nikon Eclipse E600 équipée d'une caméra Nikon DS-Fi2 pour l'acquisition des images. Une goutte d'échantillon a été placée sur une lame de microscope et recouverte d'une lamelle, avant d'être observée avec des grossissements croissants (x4, x10, x40, x100). Plusieurs photos ont été prises à différents endroits de l'échantillon afin d'obtenir de sélectionner une image représentative du milieu.

#### V.8.3.2. Granulométrie laser

La taille des gouttes présentes dans les émulsions a été déterminée à l'aide d'un granulomètre à diffraction laser Mastersizer 2000 (Malvern). Les échantillons ont été analysés à température ambiante. L'indice de réfraction de l'eau (1,33) a été utilisé comme référence.

#### V.8.3.3. Rhéologie

Les mesures de rhéologie ont été réalisées à l'aide d'un rhéomètre MCR 302 (Anton Paar) équipé d'un module de géométrie cône-plan de 50 mm de diamètre et présentant un angle de 2 °. La température des échantillons a été maintenue à 25 °C pendant les analyses grâce à un bain thermostaté (Huber). Dans un premier temps, l'écoulement des échantillons a été étudié en régime permanent en faisant varier le gradient de cisaillement de 0 à 50 s<sup>-1</sup>. Un balayage en amplitude en régime oscillant a ensuite été effectué afin de déterminer les propriétés viscoélastiques des émulsions. Les modules élastiques et visqueux  $G'$  et  $G''$  ont été mesurés en fonction de la déformation variant de 0,01 à 100% à fréquence constante (1 Hz).

#### V.8.3.4. Indice de crémage

Les émulsions fraîchement préparées (16 g) ont été introduites dans des tubes en verre transparent (diamètre interne 22 mm, hauteur 45 mm) fermés par des bouchons en plastique. Les tubes ont été placés à température ambiante pendant 14 jours. La hauteur totale des émulsions dans les tubes ( $H_T$ ) et la hauteur de sérum ( $H_S$ ) (couche aqueuse formée sous l'émulsion) ont été relevées après 24h, 48h, 72h, 7 jours et 14 jours. L'indice de crémage est calculé selon la formule suivante :

$$CI (\%) = \frac{H_S}{H_T} \times 100$$

Avec CI l'indice de crémage en %,  $H_S$  la hauteur de sérum en mm, et  $H_T$  la hauteur de l'émulsion en mm.

### ***Références bibliographiques***

1. ISO, 2000, Graines oléagineuses – Détermination de la teneur en eau et en matières volatiles, NF EN ISO 665
2. AFNOR, 1977, Aliments des animaux – Dosage des cendres brutes, NF V18-101
3. ISO, 2005, Aliments des animaux - Détermination de la teneur en azote et calcul de la teneur en protéines brutes - Partie 1 : méthode Kjeldahl, NF EN ISO 5983-1
4. ISO, 2009, Graines oléagineuses – Détermination de la teneur en huile (méthode de référence), NF EN ISO 659
5. ISO, 2018, Corps gras d'origines animale et végétale – Détermination de l'indice d'iode, NF EN ISO 3961
6. ISO, 2009, Corps gras d'origines animale et végétale – Détermination de l'indice d'acide et de l'acidité, NF EN ISO 660
7. ISO, 2011, Huile de palme - Détermination de la détérioration de l'indice de blanchiment (DOBI) et de la teneur en carotène, NF EN ISO 17932
8. ISO, 2016, Corps gras d'origines animale et végétale - Détermination des teneurs en tocophérols et en tocotriénols par chromatographie en phase liquide à haute performance, NF EN ISO 9936
9. ISO, 2007, Peintures et vernis – Essai d'amortissement du pendule, NF EN ISO 1522
10. ISO, 2014, Peintures et vernis – Détermination de l'indice de brillance à 20°, 60° et 85°, NF EN ISO 2813

## *Conclusion générale et perspectives*

---

Afin de protéger la santé des consommateurs et de préserver l'environnement, les réglementations relatives au domaine des peintures se sont durcies depuis une dizaine d'année. En raison de leurs effets direct (sanitaire) et indirect (impact environnemental), les COV sont la cible principale de ces législations. Les teneurs dans les peintures et les émissions de ces composés sont strictement contrôlées et limitées à des valeurs seuils en fonction du type de produit. Ce nouveau cadre légal s'accompagne d'une demande croissante des consommateurs pour un retour vers davantage de naturalité. Afin de répondre à cette demande, la société Derivery développe et commercialise des formulations de peintures naturelles depuis 2003. Ces produits se différencient des peintures traditionnelles par la nature des matières premières qui les composent. Les peintures de la gamme Natura sont constituées à plus de 95 % d'ingrédients naturels ou d'origine naturelle, conformément au label Pure. L'élargissement du marché des peintures naturelles aux zones tropicales telles que les DROM-COM nécessitent d'adapter les formulations afin d'améliorer leur résistance face au risque de contamination microbienne et d'y intégrer des ressources végétales locales.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était de développer et d'évaluer deux types d'ingrédients pour des formulations de peintures naturelles, à partir de co-produits de l'industrie agroalimentaire réunionnaise : (i) une huile végétale siccative ou semi-siccative pouvant être utilisée comme liant, et (ii) un biocide permettant d'améliorer la conservation des formulations.

Les recherches bibliographiques portant sur les agro-ressources disponibles sur l'île de la Réunion ont mené à la sélection d'un premier panel de co-produits issus de huit fruits et légumes. Le choix des matières premières pour l'extraction d'huile a été principalement guidé par la recherche d'huiles riches en acides gras polyinsaturés, adaptées à la formulation de liants en peinture. Les graines de fruit de la passion et de goyavier rouge renfermant des huiles majoritairement composées d'acide linoléique (C18 : 2, *n*-6) ont donc été retenues. Concernant les matières premières destinées à l'extraction du biocide végétal, la stratégie a reposé sur l'identification de co-produits riches en composés antioxydants et plus particulièrement en polyphénols, dont les propriétés biologiques incluent une activité antimicrobienne.

Parmi ces matières premières, les co-produits de fruits de la passion et du goyavier, composés de graines et de résidus de pulpes et/ou de peaux, se sont révélés adaptés pour l'obtention des deux types d'ingrédients recherchés (huiles végétales semi-siccatives et fractions actives d'intérêt). Deux méthodologies ont été mises en œuvre pour l'extraction des fractions d'intérêt : un schéma d'extraction fractionné après séparation des constituants des co-produits et un procédé intégré permettant l'extraction combinée des composés d'intérêt et leur pré-formulation en émulsion.

Pour le procédé fractionné, les constituants des co-produits de fruit de la passion et de goyavier rouge ont été séparés avant de réaliser, d'une part, l'extraction des huiles à partir des graines, et d'autre part, l'extraction de fractions antioxydantes à partir des résidus de pulpes et/ou de peaux. Des procédés éco-compatibles ont pu être mis en œuvre pour extraire les huiles

végétales (sans solvant, avec l'éthanol ou au CO<sub>2</sub> supercritique). Les caractéristiques des deux graines ont conduit à des performances des extractions différentes, notamment lors de la pression des graines à l'aide d'une presse monovis. Dans ces conditions, un rendement de 83 % du potentiel en huile a été atteint lors de l'extraction par pression des graines de fruit de la passion. Pour les graines de goyavier, les meilleurs rendements sont de 87 % et 77 % par rapport au potentiel en lipides, obtenus respectivement par macération éthanolique et par extraction avec le CO<sub>2</sub> supercritique.

L'étude des huiles extraites à l'aide des différents procédés a montré que la composition en acides gras est indépendante de la méthode d'extraction et a confirmé la présence majoritaire (70 à 78 %) d'acide linoléique dans les huiles des deux fruits.

L'incorporation des huiles végétales de fruit de la passion et de goyavier rouge obtenues par ces procédés éco-compatibles dans les formulations de peinture en émulsions a montré leur capacité à remplacer la totalité de l'huile de chanvre et de la standolie de tournesol, et jusqu'à un quart de la standolie de lin. Il faut savoir que les huiles végétales et les standolies représentent 12 à 43 % en masse des liants émulsionnés, et 4 à 18 % des formulations finales de peintures naturelles. Les performances des nouvelles formulations, notamment en termes de séchage, sont comparables voire supérieures à celles des formulations originales, indiquant l'adéquation des deux huiles tropicales avec le cahier des charges industriel.

Les extraits aqueux et éthanoliques issus des résidus de pulpe et de peaux des deux fruits ont montré des teneurs en polyphénols élevées (3,1 – 10,5 g/100g MS<sub>E</sub>) associées à des activités antioxydantes notables (IC<sub>50</sub> entre 37 et 59 mg/L pour le goyavier). Après l'étape de purification éliminant les composés non phénoliques, il semble possible de relier les teneurs en polyphénols des extraits purifiés et leur activité antioxydante, soulignant ainsi l'existence d'interactions entre composés dans les extraits bruts. Néanmoins, les substances naturelles éliminées ont montré qu'elles pouvaient avoir un rôle sur l'activité antimicrobienne des extraits, compte tenu de la différence du spectre d'activité des extraits bruts et purifiés. Les activités antibactériennes et antifongiques identifiées ne semblent donc pas être directement reliées aux seules teneurs en polyphénols des différents extraits (bruts et purifiés, aqueux et éthanoliques, goyavier et passion).

Les résultats des différents essais microbiologiques sur les seuls extraits ou bien en formulation ont démontré le potentiel des extraits éthanoliques (non purifiés) des deux fruits en tant que biocide pour les peintures naturelles. Notons, de plus, qu'en formulation, le potentiel de conservation (lié à la mesure de concentration en ATP) de la majorité des extraits testés (aqueux ou éthanoliques, bruts ou purifiés) est au moins égal à celui du biocide synthétique.

Un procédé innovant faisant appel à l'extrusion bi-vis a été développé en utilisant le fruit de la passion frais comme matière première modèle (écart de production) et a permis de réaliser simultanément l'extraction d'une partie des lipides de la graine (3,8 g/100g MS filtrat) et la co-extraction de protéines et de polyphénols (7,3 g et 0,9 g/100g MS filtrat respectivement). Les composés lipophiles et hydrophiles extraits ont été obtenus sous la forme d'une émulsion dont les caractéristiques de stabilité et de résistance à l'écoulement sont adaptées pour servir de base de formulation aux peintures naturelles.

En conclusion, ces résultats permettent de proposer un schéma de bioraffinerie appliqué aux co-produits de goyavier et de fruit de la passion pour la production de peintures naturelles sur l'île de La Réunion, intégrant les procédés éco-responsables sélectionnés, tout en faisant le lien entre les différentes voies de valorisation explorées (Figure VI-1). Ainsi, les choix technologiques ont été faits selon une approche en écoconception basée sur des critères pertinents pour chaque étape de la production des peintures naturelles :

- Tout d'abord, l'utilisation de ressources végétales locales limite les coûts et les impacts environnementaux du transport et élimine éventuellement ceux d'une étape de séchage de la matière première. De plus, compte tenu des rendements obtenus, il a été vérifié que la disponibilité de la biomasse (pour 1 tonne d'huile végétale et 55 kg de biocide naturel) est en accord avec les prévisions de production de peintures estimées par Derivery.
- Les procédés d'extraction proposés visent à minimiser les impacts énergétiques et environnementaux (sans COV) et à réduire le nombre d'étapes conduisant à la formulation finale (éviter la standolisation des huiles ou la purification des extraits et combiner des étapes d'extraction et de formulation).
- Une démarche de substitution d'une classe de composés controversés (biocide synthétique) par des actifs naturels a été amorcée.
- La qualité des extrudats obtenus permet d'envisager leur valorisation en bioproduits du type agro-matériaux et donc de minimiser les déchets (pertes de carbone). La compétitivité de la bioraffinerie s'en trouverait également améliorée.

Ainsi, le travail réalisé a permis d'atteindre les objectifs visés et conforte l'engagement de l'entreprise Derivery en matière de développement durable, montrant sa volonté constante de réduire les impacts environnementaux et sanitaires de son activité et d'améliorer la qualité de ses produits.

Néanmoins, des perspectives s'offrent à nous pour la suite des travaux :

- Concernant l'extraction d'huile végétale, la pression des graines est la méthode d'extraction la plus répandue au niveau industriel. La pression des graines de goyavier mériterait d'être étudiée plus en détails pour augmenter le rendement en huile.
- Le procédé continu par extrusion bi-vis du fruit entier devra faire l'objet d'une étude afin d'optimiser le rendement et la fonctionnalité des émulsions.
- L'activité antimicrobienne prometteuse des extraits éthanoliques et aqueux issus des deux fruits nécessitera des essais complémentaires impliquant un panel plus large de souches microbiennes afin de mieux appréhender leur spectre d'activité. La concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits devra également être déterminée vis-à-vis des souches ciblées afin de définir la concentration optimale d'extrait à incorporer dans les formulations.
- Les émulsions obtenues à partir des filtrats de l'extrusion devront être évaluées en termes de séchage et de protection antimicrobienne des peintures.

## Conclusion générale

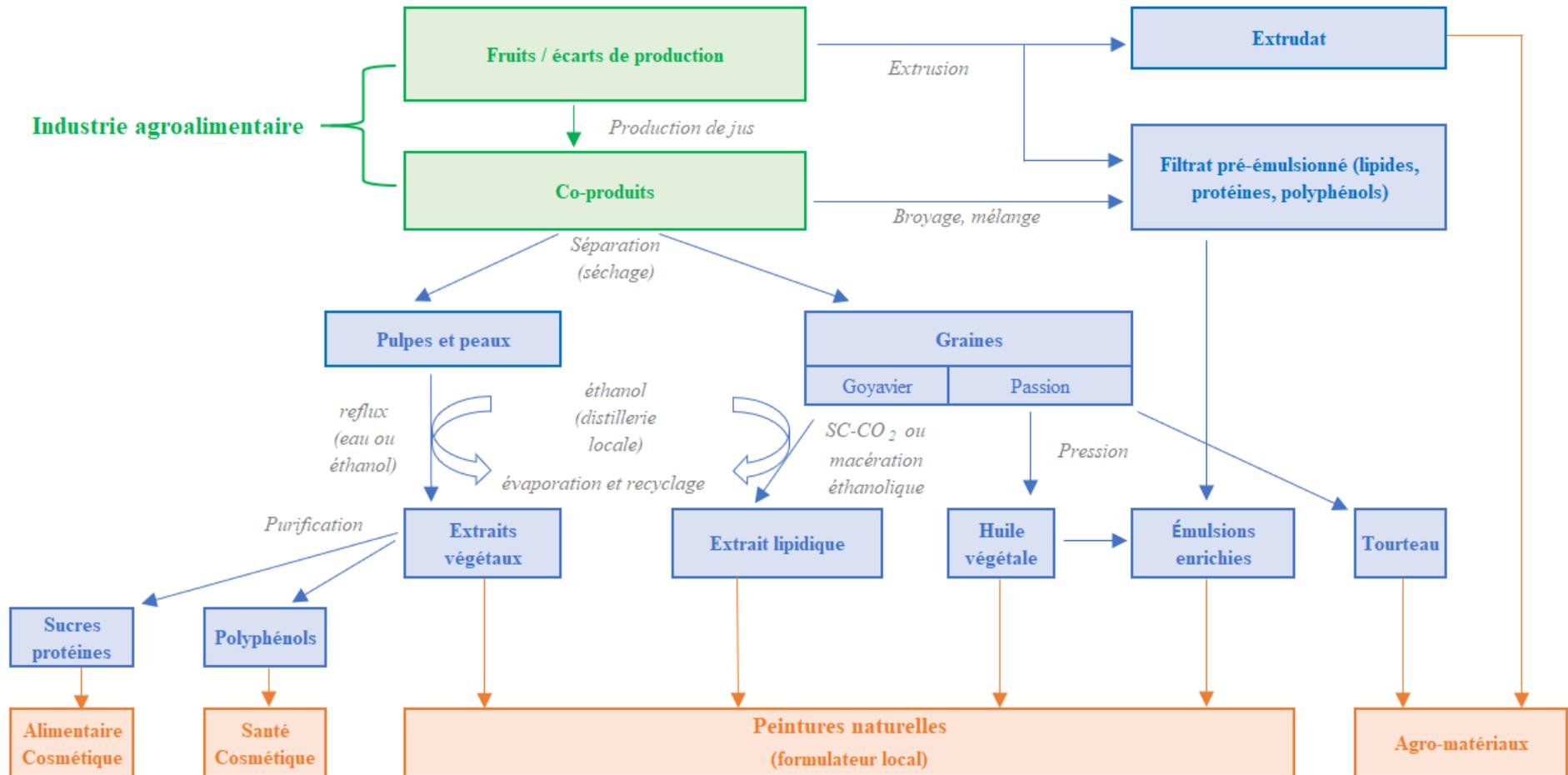


Figure VI-1 : Schéma de la bioraffinerie appliquée aux co-produits de goyavier et de fruit de la passion pour la production de peintures naturelles sur l'île de la Réunion

## Liste des tableaux

---

Tableau I-1: Caractéristiques des différents additifs en peinture .....	24
Tableau I-2: Teneurs maximales autorisées en COV pour les 12 catégories de produits selon la directive 2004/42/CE.....	27
Tableau I-3 : Classement des peintures selon le taux d'émission en $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ de certains COV et de l'émission totale de COV (COVT) .....	28
Tableau I-4: Formule et structure des principaux acides gras .....	32
Tableau I-5: Siccativité des huiles en fonction de leur indice d'iode .....	33
Tableau I-6: Composition en acide gras des huiles de lin, de chanvre et de tournesol .....	33
Tableau I-7: Propriétés physico-chimiques des huiles des graines de fruit de la passion .....	45
Tableau I-8: Composition en acides gras des huiles de graine de goyavier et de fruit de la passion ....	46
Tableau I-9: Teneur en tocophérols dans l'huile de graine de fruit de la passion en mg/100g.....	46
Tableau I-10: Teneur en phytostérols en mg/100g d'huile de fruit de la passion originaire du Brésil ..	48
Tableau I-11: Caractérisation chimique de divers extraits de fruits entiers, de pulpes et de peaux de fruits recensées dans la littérature .....	55
Tableau II-1: Description des lots de co-produits sélectionnés pour l'obtention d'huiles ou d'extraits actifs .....	86
Tableau II-2: Caractéristiques des lots de co-produits de goyavier et de fruit de la passion .....	87
Tableau II-3: Répartition massique des tailles de particules de graines broyées .....	87
Tableau II-4: Composition chimique des graines de goyavier et de fruit de la passion (en g/100 MS) ..	88
Tableau II-5: Rendements d'extraction obtenus par Soxhlet et par macération.....	89
Tableau II-6 : Teneur en lipides neutres et en triglycérides d'acides gras (TAG) des échantillons d'huiles extraites par solvant.....	89
Tableau II-7: Paramètres opératoires de pression des graines de fruit .....	90
Tableau II-8: Rendements en huile des essais de pressage de graines .....	91
Tableau II-9: Conditions opératoires d'extraction des graines par CO <sub>2</sub> supercritique.....	92
Tableau II-10: Performances de l'extraction avec le CO <sub>2</sub> supercritique à 60 °C, 200 bars et 100 g/min .....	94
Tableau II-11: Compositions en acides gras des huiles de goyavier rouge et de fruit de la passion....	95
Tableau II-12: Indices d'iode des huiles de goyavier et de fruit de la passion .....	96
Tableau II-13: Indice d'acides (en $\text{mg}_{\text{KOH}}/\text{g}$ ) des huiles de goyavier et de fruit de la passion extraites par pression (P), Soxhlet à l'hexane (SH), Soxhlet à l'éthanol (SE), macération à l'hexane (MH), macération à l'éthanol (ME), et CO <sub>2</sub> supercritique (SC-CO <sub>2</sub> ) .....	96
Tableau II-14: Teneurs en caroténoïdes des huiles de goyavier et de fruit de la passion extraites par pression (P), Soxhlet à l'hexane (SH), Soxhlet à l'éthanol (SE), macération à l'hexane (MH), macération à l'éthanol (ME), et CO <sub>2</sub> supercritique (SC-CO <sub>2</sub> ) .....	97
Tableau II-15: Composition en stérols en mg/100 g des huiles de goyavier rouge et de fruit de la passion .....	99
Tableau II-16: Teneurs en tocophérols en mg/100g des huiles de goyavier rouge et de fruit de la passion .....	100
Tableau II-17 : Rendements d'extraction obtenus par Soxhlet, par macération 24h, par pression (presse CA59G), et par CO <sub>2</sub> supercritique (60 °C, 200 bars, 100 g/min).....	100

Tableau II-18: Rendements obtenus pour les extractions par ASE et macération à froid à l'acétone des différents co-produits végétaux .....	102
Tableau II-19: Teneur en polyphénols totaux et activité antioxydante des extraits obtenus par ASE et macération à l'acétone .....	103
Tableau II-20: Influence du solvant sur l'extraction des composés actifs par ASE à partir de pulpe et de peaux de goyavier.....	103
Tableau II-21: Résultats des extractions éthanoliques à partir de pulpe de goyavier.....	104
Tableau II-22: Rendements d'extraction éthanolique et aqueuse en extraits actifs obtenus au Fibertec (à reflux).....	105
Tableau II-23: Propriétés des extraits aqueux et éthanoliques obtenus au Fibertec (à reflux) .....	105
Tableau II-24: Teneur en polyphénols des co-produits en fonction du solvant d'extraction.....	108
Tableau II-25: Propriétés des résines Amberlite™ XAD4 et FPX66.....	108
Tableau II-26: Rendements de purification en polyphénols d'extraits aqueux avec les résines XAD4 et FPX66.....	109
Tableau II-27: Résultats de purification d'extraits actifs aqueux sur résine FPX66.....	110
Tableau II-28: Résultats de purification d'extraits actifs éthanoliques sur résine FPX66 .....	112
Tableau II-29: Rendement en extraits et en polyphénols après extraction au Fibertec et purification sur résine pour le goyavier et le fruit de la passion .....	114
Tableau II-30: Comparaison des éluions des composés X et Y et de l'étalon trioléine dans deux systèmes de développement.....	117
Tableau II-31 : Rendements en gramme de matière sèche par kilogramme de co-produit sec .....	120
Tableau III-1: Composition des différentes parties du fruit de la passion.....	127
Tableau III-2: Rendements en filtrats et en molécules actives obtenus par le procédé discontinu voies 1 et 2 .....	129
Tableau III-3: Bilan massique du procédé continu par extraction bi-vis .....	132
Tableau III-4: Rendement d'extraction en molécules actives pour le procédé continu .....	133
Tableau III-5: Composition chimique des filtrats .....	134
Tableau III-6: Diamètres de Sauter de gouttelettes obtenus par granulométrie laser .....	136
Tableau III-7 : Valeurs caractéristiques du DLVE pour les émulsions et les filtrats .....	140
Tableau IV-1 : Caractéristiques des ingrédients de la gamme de peintures naturelles Derivery .....	148
Tableau IV-2: Propriétés des peintures Natura tournesol, Tassili mat et Natura lin choisies pour les essais d'incorporation des nouvelles huiles végétales.....	150
Tableau IV-3: Composition des formules essais pour l'évaluation des huiles de fruit de la passion et de goyavier rouge.....	150
Tableau IV-4: Composition en acides gras insaturés des huiles végétales de référence et des huiles végétales de fruit .....	152
Tableau IV-5: Domaine de brillance et angles de mesure recommandés.....	156
Tableau IV-6: Indices de brillance mesurés à 60° après 24h de séchage .....	157
Tableau IV-7: Diamètres d'inhibition (mm) supérieurs au témoin de contrôle pour les extraits de goyavier et de fruit de la passion.....	162
Tableau IV-8: Teneurs en polyphénols des extraits bruts et purifiés de goyavier rouge et de fruit de la passion.....	163
Tableau IV-9: Taux d'incorporation des extraits végétaux dans la formule Tassili™ mat .....	165

## *Liste des tableaux*

---

Tableau IV-10: Concentration en ATP cellulaire (en pg/mL) des échantillons de Tassili <sup>TM</sup> mat à t <sub>0</sub> (jour de préparation) et t <sub>1</sub> (après 3 mois de vieillissement à 40 °C) .....	165
Tableau V-1: Lots de co-produits frais.....	171
Tableau V-2 : Lots de co-produits séchés .....	171
Tableau V-3 : Caractéristiques et conditions opératoires des deux presses monovis.....	177
Tableau V-4 : Préparation des extraits pour la caractérisation chimique par CCMHP .....	185
Tableau V-5: Composition des milieux de culture (en g/L).....	189
Tableau A5-1 : Substitution des huiles végétales : coordonnées colorimétriques relevées après 24h de séchage .....	211

## Liste des figures

---

Figure 1: Concentration des COV (en $\mu\text{g.m}^{-3}$ ) mesurés dans l'air intérieur .....	13
Figure I-1: Répartition des sources anthropiques principales d'émissions de COV entre 1990 et 2013 .....	26
Figure I-2: Emissions de COVNM et consommation de peinture entre 1988 et 2016 en base 100.....	26
Figure I-3: Logo de l'Ecolabel européen pour peintures et vernis.....	29
Figure I-4: Logo du label Pure pour peintures et revêtements .....	29
Figure I-5: Etape d'initiation du mécanisme d'auto-oxydation des acides gras.....	31
Figure I-6: Mécanisme de formation des hydroperoxydes au cours de l'auto-oxydation des acides gras .....	31
Figure I-7: Formule semi-développée d'un triglycéride mixte .....	32
Figure I-8 : a) Tensioactif présentant une tête hydrophile et une queue hydrophobe b) Gouttelette d'huile stabilisée par le tensioactif dans une émulsion huile-dans-l'eau.....	36
Figure I-9 : Illustration botanique de l'espèce <i>Psidium cattleianum</i> var. <i>lucinum</i> .....	38
Figure I-10 : Illustration botanique de l'espèce <i>Passiflora edulis</i> .....	40
Figure I-11: Illustration botanique de l'espèce <i>Averrhoa Carambola</i> .....	40
Figure I-12: Illustration botanique de l'espèce <i>Musa acuminata</i> .....	41
Figure I-13: Illustration botanique de l'espèce <i>Citrus vulgaris</i> rossi .....	41
Figure I-14: Illustration botanique de l'espèce <i>Carica papaya</i> .....	42
Figure I-15: Illustration botanique de l'espèce <i>Ipomoea batatas</i> .....	43
Figure I-16: Illustration botanique de l'espèce <i>Manihot esculenta</i> .....	44
Figure I-17: Structure chimique des tocophérols .....	47
Figure I-18: Structure chimique des principaux phytostérols présents dans les huiles végétales .....	48
Figure I-19: Structure chimique de plusieurs caroténoïdes courants .....	49
Figure I-20: Structures chimiques de l'acide gallique (A) et des tannins condensés (B) .....	52
Figure I-21: Structures chimiques des principaux acides phénoliques.....	52
Figure I-22: Structure chimique des flavonoïdes .....	52
Figure I-23: Structure chimiques des principales anthocyanes .....	53
Figure I-24 : Structure chimique de la quercétine .....	53
Figure I-25 : Structure chimique de la catéchine et de l'épicatéchine .....	53
Figure I-26 : Schéma d'une presse à vis .....	62
Figure I-27 : Diagramme de phase du dioxyde de carbone.....	63
Figure I-28: Principaux arrangements de vis des extrudeurs bi-vis .....	67
Figure I-29: Vis les plus couramment employées en extrusion co-pénétrante et co-rotative.....	67
Figure II-1 : Graines séchées de goyavier, pulpe séchée de goyavier, graines séchées de fruit de la passion et pulpe séchée de fruit de la passion .....	87
Figure II-2: Influence des conditions expérimentales sur l'extraction des graines de fruit de la passion (●) et de goyavier (■) .....	92
Figure II-3: Masse totale d'extrait de graines de fruit de la passion en fonction de la quantité de CO <sub>2</sub> consommée pour des débits de 50 et 100 g/min.....	93
Figure II-4: Masse totale d'extrait en fonction de la quantité de CO <sub>2</sub> consommée pour le fruit de la passion (●) et le goyavier (■) à 40 °C et 60 °C .....	94

Figure II-5: Activité antioxydante des extraits (IC <sub>50</sub> ) en fonction de leur teneur totale en polyphénols .....	106
Figure II-6: Évolution des teneurs en polyphénols des extraits aqueux après purification .....	110
Figure II-7: Évolution de l'activité antioxydante des extraits aqueux après purification .....	111
Figure II-8: Comparaison de l'enrichissement en polyphénols et du renforcement de l'activité antioxydante dans les extraits aqueux purifiés .....	111
Figure II-9: Évolution des teneurs en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits éthanoliques après purification.....	112
Figure II-10: Comparaison de l'enrichissement en polyphénols et du renforcement de l'activité antioxydante dans les extraits éthanoliques purifiés .....	113
Figure II-11: Corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur totale en polyphénols des extraits purifiés.....	113
Figure II-12: Profils chromatographiques des extraits de fruit de la passion et de goyavier (pulpe/peaux et graines) (système de développement 1).....	115
Figure II-13: Profils chromatographiques des extraits lipidiques et des extraits éthanoliques bruts des pulpes de fruit de la passion et de goyavier (système de développement 2) .....	116
Figure II-14: Profils chromatographiques, dansitogrammes et spectres UV-visible des extraits éthanoliques de pulpe de fruit de la passion et de goyavier .....	118
Figure II-15: Spectres UV-visible des composés Y <sub>1</sub> et Y <sub>2</sub> (système de développement 2) .....	117
Figure III-1: Procédé discontinu de traitement du fruit de la passion : voies 1 et 2.....	128
Figure III-2: Schéma de l'extrudeur bi-vis utilisé .....	130
Figure III-3: Profil de vis utilisés pour l'extraction 1 et l'extraction aqueuse.....	130
Figure III-4 : Procédé discontinu par extrusion bi-vis.....	131
Figure III-5: Micrographies optiques des filtrats et des émulsions .....	135
Figure III-6: Profil de distribution des tailles de gouttelettes pour les échantillons du procédé discontinue .....	136
Figure III-7: Schéma d'une géométrie cône-plan.....	137
Figure III-8: Evolution de la viscosité apparente (•) et de la contrainte de cisaillement (▪) des échantillons en fonction de la vitesse de déformation .....	138
Figure III-9 : Evolution du module élastique G' en fonction de la déformation .....	139
Figure III-10: Evolution du module visqueux G'' en fonction de la déformation.....	140
Figure III-11: Stabilité des émulsions évaluée par l'indice de crémage .....	142
Figure IV-1 : Procédé de formulation des peintures naturelles .....	147
Figure IV-2: Duretés pendulaire relevées au cours d'un mois de séchage pour les échantillons Tassili mat.....	151
Figure IV-3: Duretés pendulaires relevées au cours d'un mois de séchage pour les échantillons Natura lin.....	151
Figure IV-4: Duretés pendulaires relevées au cours d'un mois de séchage pour les échantillons Natura tournesol.....	152
Figure IV-5 : Représentation graphique des coordonnées L, a* et b* du modèle colorimétrique CIELAB .....	154
Figure IV-6: Evolution de la coordonnée colorimétrique b en l'absence de lumière (Tassili mat) ....	155
Figure IV-7: Evolution de la coordonnée colorimétrique b en l'absence de lumière (Natura Lin) ....	155

Figure IV-8: Evolution de la coordonnée colorimétrique b en l'absence de lumière (Natura Tournesol) .....	156
Figure IV-9 : Duretés pendulaires relevées au cours d'un mois de séchage pour les échantillons Tassili <sup>TM</sup> mat avec extraits.....	159
Figure IV-10: Photographies d'un échantillon de peinture Mat Ecocert sans biocide avant stockage (A), après un mois de stockage à 25 °C (B), et d'une colonie repiquée sur gélose Malt agar (C).....	160
Figure IV-11: Flore fongique de l'échantillon (2) observée après ensemencement en surface sur la gélose Sabouraud.....	161
Figure IV-12 : Exemple de diamètre d'inhibition observé après incubation .....	162
Figure IV-13 : Photographies du développement microbien observé à la surface des échantillons contenant les extraits aqueux bruts et purifiés de fruit de la passion, après vieillissement accéléré...	166
Figure V-1: Schéma d'une presse monovis .....	177
Figure V-2: Equipement d'extraction au CO <sub>2</sub> supercritique.....	178
Figure V-3: Pendule de Persoz utilisé pour les mesures de dureté.....	188
Figure V-4: Profil de vis utilisé pour les deux étapes d'extraction du fruit de la passion .....	192
Figure VI-1 : Schéma de la bioraffinerie appliquée aux co-produits de goyavier et de fruit de la passion pour la production de peintures naturelles sur l'Ile de la Réunion.....	198
Figure A1-1 : Chromatogrammes des extraits lipidiques de graines de goyavier obtenus avec l'éthanol par Soxhlet (noir) et macération 24h (rouge) .....	205
Figure A1-2 : Chromatogramme de l'extrait lipidiques de graines de goyavier obtenus avec l'hexane par macération 24h.....	205
Figure A1-3 : Chromatogrammes des extraits lipidiques de graines de fruit de la passion obtenus avec l'éthanol par Soxhlet (noir) et macération 24h (rouge) .....	206
Figure A1-4 : Chromatogramme de l'extrait lipidique de graines de fruit de la passion obtenus avec l'hexane par macération 24h .....	206
Figure A1-5 : Chromatogramme des échantillons de graines de goyavier (noir) et de fruit de la passion (rouge) obtenus par macération 24h à l'hexane .....	207
Figure A1-6 : Chromatogramme des échantillons de graines de fruit de la passion (noir) et de goyavier (rouge) obtenus par centrifugation à froid au cyclohexane .....	207

## Annexes

### Annexe 1 : Analyses CPG-FID des lipides neutres, des acides gras et des stérols des huiles végétales de fruit de la passion et de goyavier

- Analyse des lipides neutres

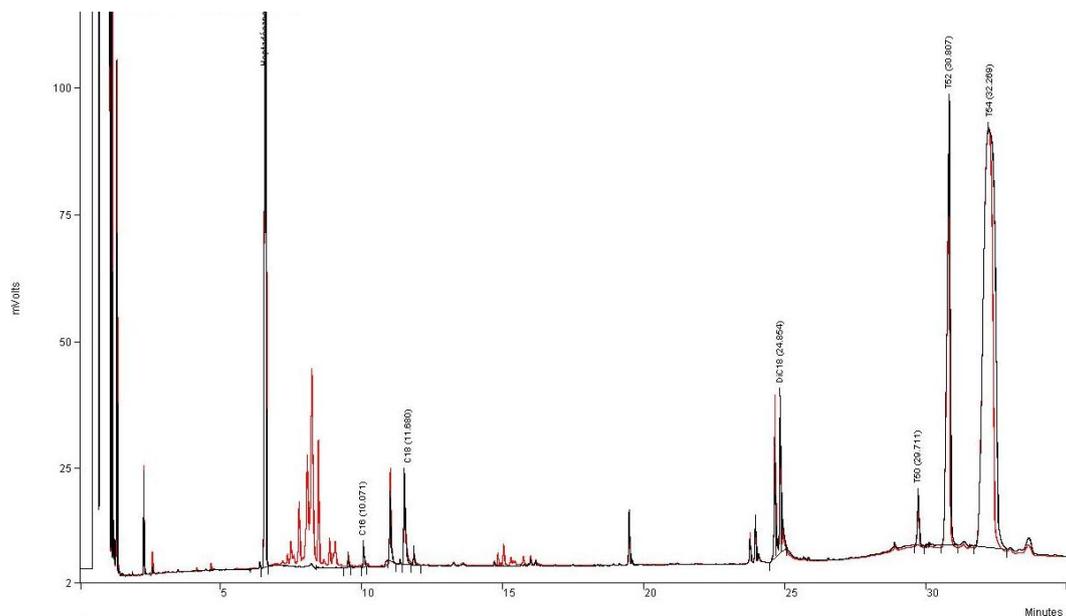


Figure A1-1 : Chromatogrammes des extraits lipidiques de graines de goyavier obtenus avec l'éthanol par Soxhlet (noir) et macération 24h (rouge)

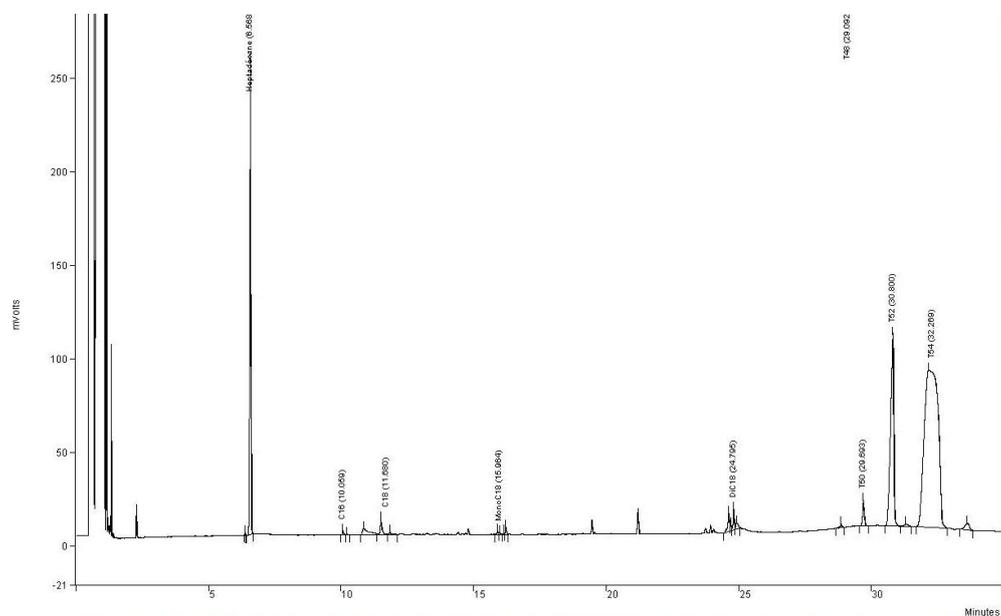


Figure A1-2 : Chromatogramme de l'extrait lipidique de graines de goyavier obtenu avec l'hexane par macération 24h

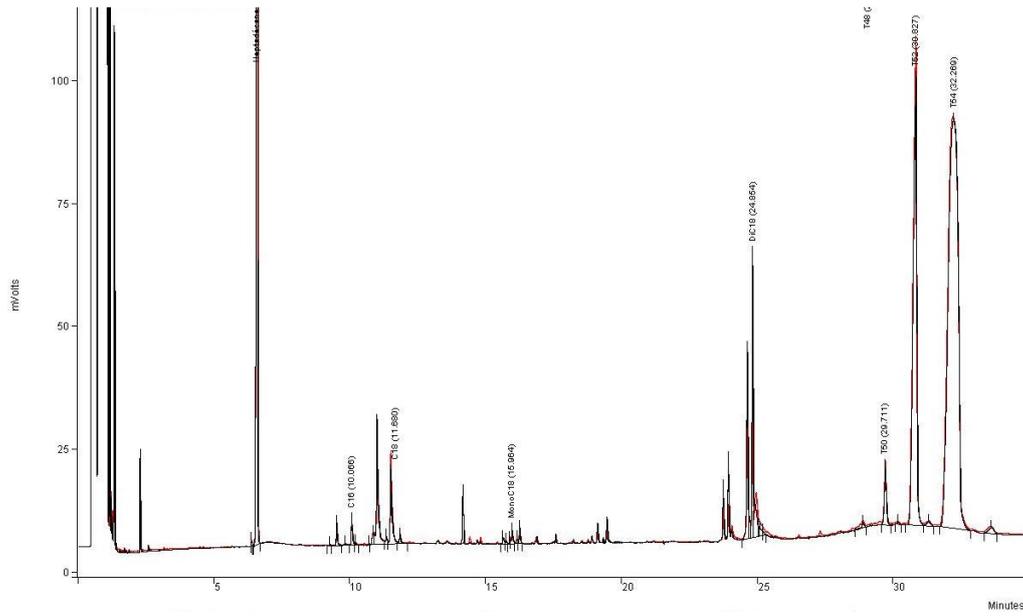


Figure A1-3 : Chromatogrammes des extraits lipidiques de graines de fruit de la passion obtenus avec l'éthanol par Soxhlet (noir) et macération 24h (rouge)

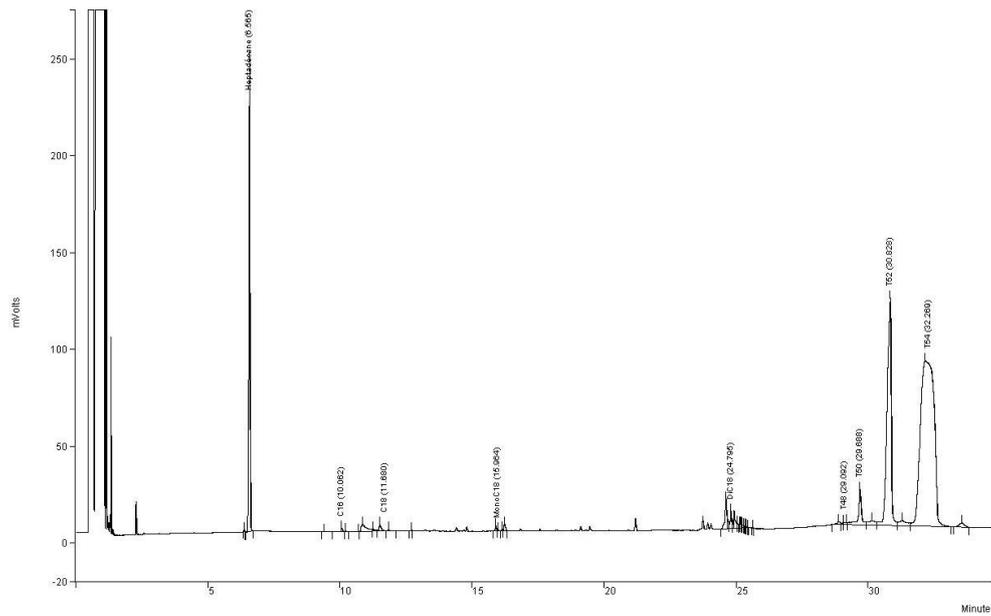


Figure A1-4 : Chromatogramme de l'extrait lipidique de graines de fruit de la passion obtenu avec l'hexane par macération 24h

- Analyse des acides gras

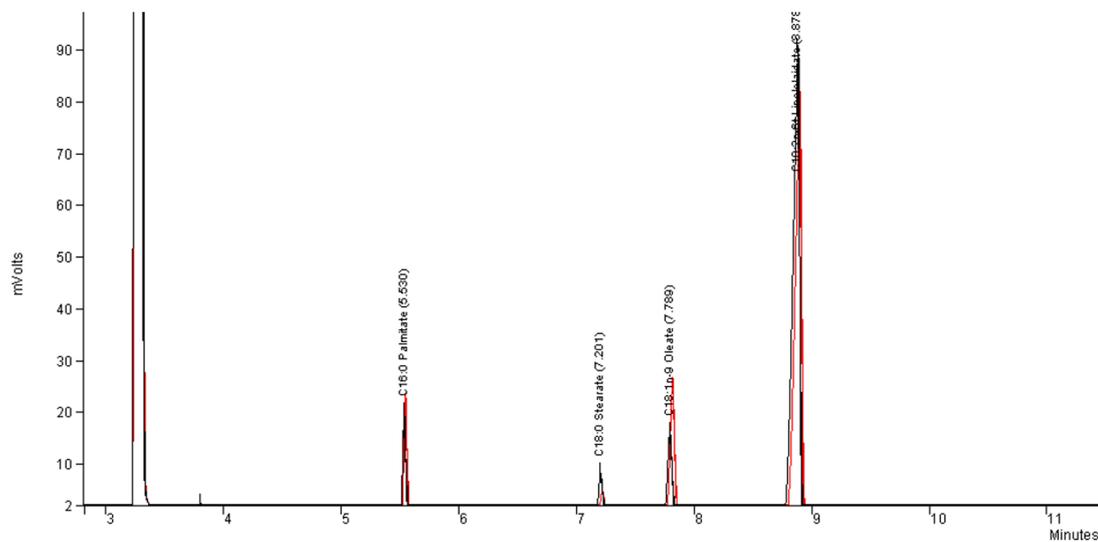


Figure A1-5 : Chromatogramme des échantillons de graines de goyavier (noir) et de fruit de la passion (rouge) obtenus par macération 24h à l'hexane

- Analyse des stérols

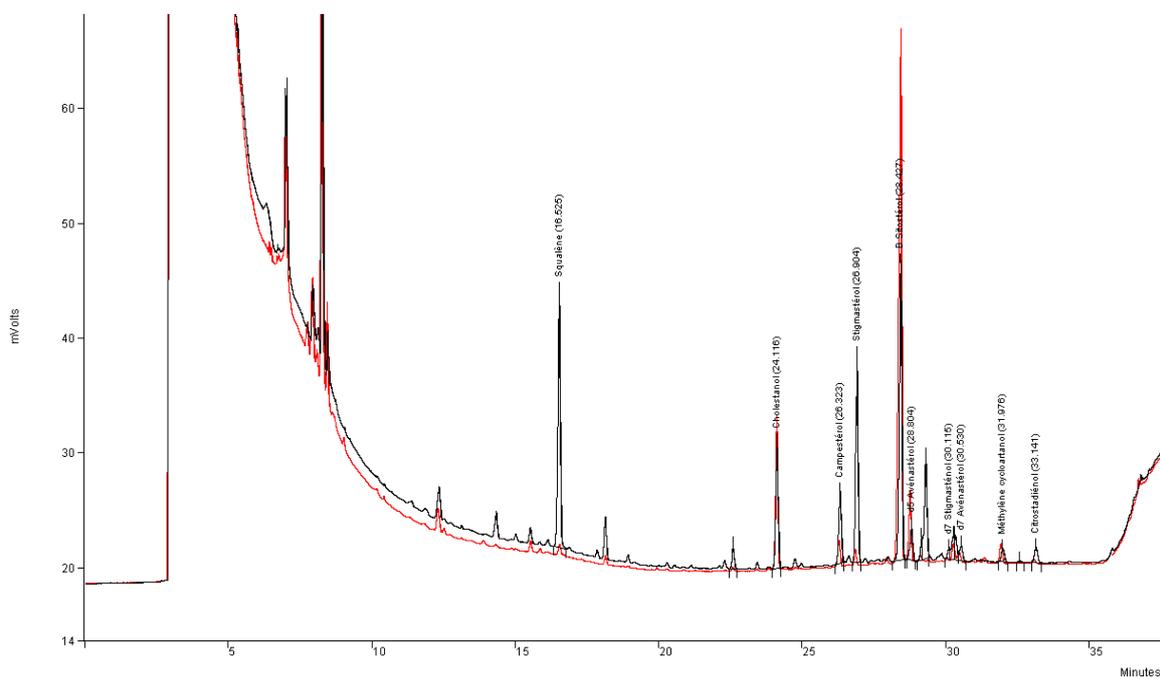


Figure A1-6 : Chromatogramme des échantillons de graines de fruit de la passion (noir) et de goyavier (rouge) obtenus par centrifugation à froid au cyclohexane

**Annexe 2 : Fiche produit de la résine Amberlite™ FPX66**

Product Data Sheet

**AMBERLITE™ FPX66**

Food Grade Adsorbent Resin

**Introduction**

AMBERLITE FPX66 is a macroreticular, non-functionalised adsorbent resin designed for the juice processing market where local regulations allow for such use.

AMBERLITE FPX66 can also be used for a wide variety of food processing applications to both recover high value materials and to purify and decolourise food and food additive streams.

AMBERLITE FPX66 has excellent physical resistance and thermal stability making it ideal for use in column based systems over a large number of process cycles.

**Properties**

Physical form	White beads
Matrix	Macroreticular aromatic Polymer
Moisture holding capacity	60 to 68 %
Shipping weight	680 g/L
Specific gravity	1.015 to 1.025
Particle size	
Uniformity coefficient <sup>(1)</sup>	≤ 2.0
Harmonic mean size <sup>(1)</sup>	0.600 - 0.750 mm
Fine content <sup>(1)</sup>	< 0.300 mm : 3.0 % max
Coarse beads <sup>(1)</sup>	> 1.180 mm : 5.0 % max
Surface area <sup>(2)</sup>	≥ 700 m <sup>2</sup> /g
Porosity <sup>(2)</sup>	≥ 1.4 cc/g
DVB content <sup>(1)</sup>	< 50 ppb

(1) Contractual values

(2) Values based on statistical control

**Suggested Operating Conditions**

pH range	0 - 14
Maximum operating temperature	150°C
Minimum bed depth	700 mm
Flow rate	
Loading step usually	2 to 16 BV*/h
Washing step	2 to 8 BV/h
Regeneration step	2 to 4 %
Rinse step	40 to 100 g/L <sub>R</sub>
Regenerants	Methanol or other water miscible organic solvents (ethanol, acetone, isopropanol, etc.) Dilute bases and/or dilute acids Hot water or steam for volatile materials

**Annexe 3 : Fiche produit de la résine Amberlite™ XAD4**

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street  
 Saint Louis, Missouri 63103 USA  
 Telephone 800-325-6832 • (314) 771-6765  
 Fax (314) 286-7828  
 email: techserv@sial.com  
 sigma-aldrich.com

**AMBERLITE XAD POLYMERIC RESINS**

Sigma Prod. Nos. XAD-4, XAD-7, XAD-16, 1-0377, 1-0393, and 1-0379  
 Replacement for Product Code 21,648-8

**Product Information****PHYSICAL DESCRIPTION:**

Appearance: White translucent beads, sometimes with faint yellow cast

**STORAGE / STABILITY AS SUPPLIED:**

Amberlite<sup>1</sup> resins are stable for years stored at room temperature. They may be shipped as waterwet products with sodium chloride and sodium carbonate salts to retard bacterial growth. These salts must be washed from the adsorbent prior to use.

**GENERAL REMARKS:**

Three parameters affect binding capacity of a resin for a particular material. The dipole moment, the pore size and the surface area. The material to be adsorbed must be able to migrate through the pores to the adsorbing surface. For adsorbents of equal pore size, a larger surface area has higher capacity for solute. There is an inverse relationship between surface area and pore size: the smaller the pore size the greater the surface area. On the following page is a table of comparative physical data. More detailed information for each resin is available on request.

The nonpolar XAD resins are generally used for adsorption of organic substances from aqueous systems and polar solvents. For hydrophobic compounds up to MW 20,000, XAD-2 has been widely used, but it was discontinued by Rohm and Haas.<sup>2</sup>

Currently suggested:

1. for relatively low molecular weight (MW), XAD-4
2. for small to medium MW, XAD-16
3. for relatively large MW organics, X1180.

XAD-2 and XAD-16 have been used for removal of detergents from protein solutions. The capacity for XAD-2 for Triton X-100 was reported as 0.37 g per g dry resin (1.91 g of hydrated resin).<sup>3,4</sup> Most XAD resins are nonpolar and may be used over a pH range of 0-14, with maximum usage temperature 480°F.

XAD-7 is the only "moderately polar" XAD resin now available. It has been used to remove relatively polar compounds from non-aqueous solvents, and to remove non-aromatic compounds from polar solvents. It has been used for removal of organic pollutants from aqueous wastes, ground water and vapor streams. The pH range is 0-14, with maximum usage temperature 300°F. A similar product is Diaion HP2MG, having larger pore diameter, but very similar in surface area.

An extensive literature survey from 1987 to 1991 is available from Supelco as product number T412139. They are available from Supelco's Order Entry (800-247-6628-) or Technical Service (800-359-3041).

RESIN	CAS NUMBER	CHEMICAL NATURE	DRY DENSITY (vs. wet) (g/mL)	SURF. AREA (sq. m/g)	PORE DIAM. AVE (Angstroms).	WEST MESH SIZE (nominal)	PORE VOL. (mL/g)
XAD-4	37380-42-0	Hydrophobic polyaromatic (dipole moment 0.3) Used to remove small hydrophobic compounds, surfactants; widely used in pharmaceutical manufacturing; used to remove chlorinated organics, pesticides, etc.	1.08 (1.02)	725	50	20 to 60	0.98

**Annexe 4 : Fiche technique de la peinture Tassili mat**



**TASSILI MAT ECOCERT 461**

Référence : TAS 461 0329

Edition : JUILLET 2016

**PRÉSENTATION:** peinture mate écologique à base d'huiles végétales

Peinture mate à base de liant végétal pour les murs et les plafonds des pièces sèches - Composition\*: eau (1), dioxyde de titane (4), carbonate de calcium (1), damar (1), silicates d'aluminium (type de kaolin)(1), stannole d'huile de lin(1), néphéline syénite (type de feldspath)(1), caséine (2), huile de chanvre (1), résinate de zinc (2), hydroxyde de sodium (2), antimousse à base d'huile végétale(3), conservateurs à base d'isothiazolinones (3), épaississant à base d'éther de cellulose (2)(3), aluminosilicate de sodium polysulfuré (2), hexamétaphosphate de sodium (2) - (1) Substance naturelle :78.4% - (2) Substance d'origine naturelle transformée :3.2% - (3) Substance pétrochimique :0.8% - (4) Dioxyde de titane (mineral transformé chimiquement) : 17,6%

**TEINTES ET CONDITIONNEMENTS:** Blanc en 0,9L, 2,25L, 9L

**QUALITES ENVIRONNEMENTALES ( PROMOTEUR LABORATOIRES NATURA)**

Produit contrôlé par Ecocert Greenlife -

Odeur très légère d'huile végétale - Pas de solvant, pas de co-solvant - Aucun siccatif - Très faible taux de C.O.V. (0,1g/L)

Les emballages et les résidus de peinture sont considérés comme déchets ménagers - Produit sans nocivité.

Emulsion à froid sans émission de gaz à effet de serre.

**FONCTION ET PRINCIPALES QUALITES**

Beau mat profond - Excellent couvrant et garnissant - Lavable

Monocouche sur support homogène imprimé à 70µm sec .

Mêmes performances techniques que celles exigées par l'Ecocert, attestées par laboratoire tierce partie.



**PRÉPARATION DES SURFACES AVANT PEINTURE** (Selon DTU 59.1)

Selon les cas: lessivage, dépoussiérage, "matage" des anciennes peintures adhérentes par ponçage léger.

Dans tous les cas: application préalable d'une couche de TASSILI PRIMAIRE 459

**UTILISATIONS RECOMMANDÉES.**

Murs et plafonds des pièces sèches en intérieur - Supports : plâtre, plâcoplâtre, Fermacell, papier à peindre, toile de verre, etc...

**PRECAUTIONS D'EMPLOI:**

Généralités: lire les conseils d'application et recommandations diverses au verso ou sur l'étiquette.

Dans tous les cas, appliquer en couches fines, sans surcharger, sans croiser - Recharger au fur et à mesure du travail.

Ne pas appliquer sur supports condensants, humides en permanence ni sur un support surchauffé ou à température < à 12°C.

**CARACTÉRISTIQUES ET RENDEMENT DU PRODUIT A 20°C**

Dté: 1,35 - ESP: 56% - Viscosité: Brookfield 4000 mPas - Brilliance: 2 à 3%

Dureté et lavabilité: bonnes après séchage à cœur (env. 7 jours) - Adhérence: excellente

Rendement sur support imprimé: 13,5m²/L/couche au rouleau 10mm en monocouche, 16m²/L/couche au rouleau 6mm en 2 couches.

**MATERIEL D'APPLICATION ET PRÉPARATION DU PRODUIT**

Mélanger énergiquement le produit, manuellement ou mécaniquement, pour le ramener à une viscosité "crèmeuse".

Brosse fibres synthétiques, "patte de lapin" ou rouleau poils courts 6mm ou moyens 9mm, pistolet, station peinture.

Avec un rouleau de plus de 12mm, prudence: l'aspect est moins lisse, un peu poché, et ce rendu, quand il n'est pas souhaité pour masquer les défauts du support, n'est pas toujours apprécié.

**DILUTION**

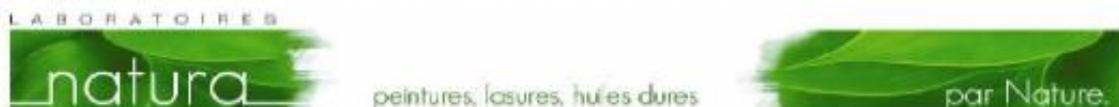
A l'eau: si nécessaire 5% à la brosse ou au rouleau en 1ère couche - Airless: 5% - Station peinture: variable selon matériel.

**SÉCHAGE A 20°C**

Sec au toucher	Recouvrable	Dur à cœur
30mn	6 à 8h à 20°C en système 2 couches	± une semaine

Conservation : 1 an minimum, impérativement au frais, en emballage d'origine non ouvert (T\* > 5°C et < 35°C).

Bidon entamé: conservation très aléatoire - En cas d'odeur suspecte, ne pas appliquer.



**Annexe 5 : Coordonnées colorimétriques des échantillons de Tassili<sup>TM</sup> mat, Natura tournesol et Natura lin formulés avec les nouvelles huiles végétales, relevées après 24h de séchage**

Tableau A5-13 : Substitution des huiles végétales : coordonnées colorimétriques relevées après 24h de séchage

	TM1	TM2	TM3	NL1	NL2	NL3	NL4	NL5	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5	NT6	NT7
	Lin / Chanvre	Lin / Goyavier	Lin / Passion	Lin	Lin: Goyavier 7 :1	Lin: Goyavier 3 :1	Lin: Passion 7 :1	Lin: Passion 3 :1	Tournesol / Chanvre	Tournesol / Goyavier	Goyavier/ Chanvre	Goyavier/ Goyavier	Tournesol / Passion	Passion/ Chanvre	Passion/ Passion
<b>L</b>	93,11	93,09	93,01	95,70	95,94	95,54	95,67	95,57	94,98	95,48	95,13	95,43	95,10	95,13	95,07
<b>a*</b>	0,10	0,14	0,14	-0,18	-0,28	-0,22	-0,26	-0,25	-0,08	0,12	0,12	0,10	0	0,03	0
<b>b*</b>	1,58	1,47	1,44	1,10	1,44	1,36	1,51	1,33	2,99	1,24	2,17	1,38	2,47	2,42	2,34

**Annexe 6 : Liste des travaux**

***Publications :***

Alice Delvar, Pascale de Caro, Yanis Caro, Alain Shum Cheong Sing, Rudy Thomas, and Christine Raynaud

Semi-Siccative Oils and Bioactive Fractions Isolated from Reunion Island Fruit Co-Product: Two Case Studies, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2019**, 121, 1800391, DOI: 10.1002/ejlt.201800391

Alice Delvar, Pascale de Caro, Yanis Caro, Alain Shum Cheong Sing and Christine Raynaud

Integrated processes for extraction and formulation of active molecules from fresh passion fruit (*Passiflorae edulis edulis*), *Journal of Food Engineering*, **2019**, soumise

***Communication orale :***

Alice Delvar, Pascale de Caro, Yanis Caro, Alain Shum Cheong Sing and Christine Raynaud

Extraction and characterization of bioactive fractions from food industry co-products: two case studies, *14<sup>th</sup> International Conference on Renewable Resources and Biorefineries (RRB14)*, 30 mai – 1<sup>er</sup> juin **2018**, Gand, Belgique

***Communication par affiche:***

Alice Delvar, Pascale de Caro, Yanis Caro, Alain Shum Cheong Sing and Christine Raynaud

Extraction processes of unsaturated vegetable oils from tropical fruit seeds, *6th International congress on Green Process Engineering (GPE)*, 3-6 juin **2018**, Toulouse, France

# Semi-Siccative Oils and Bioactive Fractions Isolated from Reunion Island Fruit Co-Product: Two Case Studies

Alice Delvar, Pascale de Caro,\* Yanis Caro,\* Alain Shum Cheong Sing, Rudy Thomas, and Christine Raynaud

This paper focused on the use of agro-industrial wastes of strawberry guava (*Psidium cattleianum*) and passion fruit (*Passiflora edulis*) generated by the agricultural industry on Reunion Island, according to two routes: extraction of semi-siccative oils from the seeds and extraction of bioactive compounds from residual pulp and peels. Oil content, fatty acid, carotenoids, tocopherol, and sterol concentrations are determined in the seed oils obtained by four different extraction processes using Soxhlet extraction, extraction by hexane and ethanol, mechanical pressing and supercritical-carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction. The oil extraction yields ranged from 15 to 30% w/w for strawberry guava and passion fruit, respectively. Both oils are classified as semi-siccative and had a similar total unsaturated fatty acid content (88%) with a prevalence of linoleic acid (70–78%). High contents in phytosterols and in  $\alpha$ -tocopherol are particularly detected in strawberry guava oil. The antioxidant activities of the bioactive compounds extracted by water and ethanol from pulp and peels are characterized by  $\alpha$ , $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) test. After purification on polymeric resin, significant antioxidant activities are recorded (half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) from 11 to 50 g L<sup>-1</sup>) and are related to polyphenol contents (20.7 to 42.5 g gallic acid equivalents (GAE)/100 g dry extract).

**Practical Applications:** There is a great interest on the use of tropical fruit wastes because of their large availabilities. Strawberry guava and passion fruit are often used in the food industry, for juice and jam production. The seeds, pulp, and peel residues are in fact a by-product of their industrial processing, which should be valuably processed instead of just throwing away. We can state that the extracted seed (rich in polyunsaturated fatty acids) of strawberry guava and passion fruit can be used in the industrial production of emulsions, paints, and varnishes. Within the positive aspects of the study, one can also distinguish the use of these tropical fruit by-products as beneficial sources of many valuable bioactive compounds, for example, carotenoids, tocopherols, phytosterols, and especially polyphenols, for functional formulations. Moreover, it may be the experimental basis for further development and use in food industry

## 1. Introduction

Different industries related to the agriculture sector generate a lot of agro-industrial waste in the form of solid waste (seeds, peels, pulps) or liquid waste. The generated residues are not only biodegradable in nature but often rich in bioactive compounds like functional lipids or polyphenols, depending upon source. Because of their large availabilities and their compositions that could be used in other processes, there is a great interest on the valorization of agro-industrial by-products. The paint and coating industries are one of the larger consumers of solvents in the world, which are mostly derived from petrochemical feedstocks and refinery operations. Regulations on VOC<sup>[1]</sup> have forced producers to adopt low-solvent and more eco-friendly formulations like waterborne coatings, thermosetting emulsions, colloidal dispersions or two-component systems.<sup>[2-3]</sup> Effective use of available agro-industrial by-products for production of functional plant-based oil emulsions can contribute to make the coating process cost effective and eco-friendly.

Passion fruit (*Passiflorae edulis edulis*; from the Passifloraceae family), and strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine;

A. Delvar, Prof. P. de Caro, Dr. C. Raynaud  
Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)  
Université de Toulouse, INRA  
INP-ENSIACET  
4 allée Emile Monso, CS 44362  
31030 Toulouse Cedex 4, France  
E-mail: pascale.decaro@ensiacet.fr

A. Delvar, Dr. R. Thomas  
Derivery SAS  
4 Rue Léon Talmy, 27290 Pont-Authou, France

Prof. Y. Caro, Dr. A. Shum Cheong Sing  
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA)  
Faculté des Sciences et Technologies  
Université de La Réunion  
15 avenue René Cassin, 97400 Saint-Denis, Réunion, France  
E-mail: yanis.caro@univ-reunion.fr

DOI: 10.1002/ejlt.201800391

Prof. Y. Caro  
Département Hygiène Sécurité Environnement (HSE)  
IUT de La Réunion  
Université de La Réunion  
40 avenue de Soweto, Terre Sainte  
97410 Saint-Pierre, Réunion, France

Dr. C. Raynaud  
Centre d'Application et de Traitement des Agroressources  
CRT CATAR, ENSIACET  
Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)  
UMR 1010-INRA/INPT, 4, allée Emile Monso – CS 44362  
31030 Toulouse Cedex 4, France

from the Myrtaceae family), are the main tropical fruits produced and transformed by the food industry of the Reunion Island, Indian Ocean. According to the French Department of Agriculture and Food statistics, 500 metric tons of passion fruit and 1130 metric tons of strawberry guava were produced on Reunion island in 2017, on 32 ha and 90 ha, respectively. These two fruits are widely used in the food industry, for juice and jam production (150 metric tons for strawberry guava and 5 metric tons for passion fruit). The processing of these fruits generates large amounts of fruit residues or by-products, in the form of seeds, residual pulp, shells, and peels. The valorization of these tropical fruit by-products is of potential economic and ecological interest for the food industry sector. Biorefinery approaches can be designed to develop new integrated fruit production schemes, including by-product transformation processes. The fruit waste contains several types of bioactive molecules, including functional lipids, polysaccharides, and polyphenols. In the framework of sustainable development, the production of plant extracts containing these compounds from fruit waste should meet the requirements of green chemistry, to limit the environmental pressure on a sensitive island ecosystem.

Many studies have been performed on passion fruit in the last 10 years. The composition of its pulp and its co-products (seeds) has been documented, revealing the presence of polyphenols and flavonoids with potentially useful antioxidant activity.<sup>[4-5]</sup> Previous studies have described the extraction of oil from passion fruit seeds by conventional methods with hexane,<sup>[6]</sup> with green solvents,<sup>[7]</sup> by accelerated solvent extraction<sup>[8]</sup> or with SC-CO<sub>2</sub> assisted by ultrasound.<sup>[9]</sup> Although previous works were performed for the oil extraction from seeds of passion fruit, no data are available regarding the extraction and characterization of bioactive compounds from strawberry guava (*P. cattleianum*) wastes. About the whole strawberry guava fruit (often collected in regions of Brazil), some studies investigated the volatile constituents,<sup>[10]</sup> polyphenol content and antioxidant activity.<sup>[11]</sup> To the best of our knowledge, only Biegelmeier et al. in 2011<sup>[12]</sup> and Kobelnik et al. in 2012<sup>[13]</sup> have reported an oil extraction with hexane from seeds of Brazilian strawberry guava for the elucidation of its fatty acid profile or thermal characterization. Therefore, no data are available concerning the minor organic components like carotenoids, tocopherols, and phytosterols of this seed oil or its physical and chemical properties.

The objective of this study is to find a solution of valuation of the by-products generated by the food industry after extraction of the juice of two tropical fruits from Reunion Island, for example, strawberry guava and passion fruit. Two routes are investigated: the extraction of semi-siccative oils from the seeds and the extraction of bioactive compounds from residual pulp and peels. The work involves the determination of the fatty acid profile, carotenoids, tocopherol, and phytosterol concentrations in the seed oils obtained by conventional (screw pressing and Solid-Liquid extraction) and non conventional (supercritical-carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) processes. The yield and the oil quality (PUFA, acid value, carotenoid, sterol, and tocopherol contents) obtained are compared and discussed to identify processes which could be specifically used for industrial production of paints and varnishes. Through this approach, the feasibility of

producing high-value organic extracts using the total collected material (integrated production scheme) is assessed. These drying oils and antioxidant fractions represent local resources adapted to new ecological formulations.

## 2. Experimental Section

### 2.1. Plant Material

The feedstock samples consisted of food industry by-products from purple passion fruit (*Passiflora edulis edulis*) and red strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine). These residues of fruit juice extraction were collected from local companies on Reunion Island. They consisted of seeds with residual peel and pulp. The moisture contents of the co-products were 22.9% for strawberry guava and 49.1% for passion fruit.

Strawberry guava seeds were washed with water and separated from the residual peel and pulp. The seeds were dried at 60 °C for 48 h. The pulp and peel residues were dried in a convection dryer (CE 130, Gunt Hamburg) at 50 °C with an airflow of 1 m s<sup>-1</sup>, for 48 h. The seeds accounted for 30.6% of the total dry weight of by-products.

Passion fruit co-product (residual pulp and seeds) was dried at 50 °C, with an airflow of 1 m s<sup>-1</sup>, for 48 h. The seeds representing 74.0% of the dry weight were then separated from the rest by sieving through a mesh with 4 mm pores.

### 2.2. Chemical Reagents

Cholestanol,  $\alpha$ ,  $\delta$ , and  $\gamma$ -tocopherol, gallic acid, Folin-Ciocalteu reagent, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), and Wijs reagent were purchased from Sigma Aldrich. Analytical grade solvents were obtained from VWR International.

### 2.3. Seed Oil Extraction

#### 2.3.1. Soxhlet Extraction (Conventional Extraction)

The dried seeds were ground in a grinder and subjected to Soxhlet extraction. The ground seeds (10 g) were placed in the thimble and 150 ml of hexane was added to the flask. After 4 h under reflux, the solvent was evaporated off, resulting in a yield of 1 to 3 g of oil. The extraction was conducted in triplicate and mean yields were calculated.

#### 2.3.2. Cold Maceration

Seed oil was extracted by cold maceration in hexane or ethanol. Ground seeds (10 g) were placed into a 250 ml Erlenmeyer flask, to which 200 ml of solvent was added. The medium was stirred continually for 24 h and filtered through grade 1 Whatman filter paper. The solvent was then evaporated off, and 1 to 3 g of oil was recovered.

### 2.3.3. Mechanical Cold Pressing

Seed oil was extracted with a mechanical screw press (CA 59G, Komet) operating at a maximum oil flow rate of 3–5 kg h<sup>-1</sup> and powered by an electric motor (1.1 kW). The press cylinder was heated before extraction to a temperature comprised between 80 and 100 °C. The press nozzle had a diameter of 10 mm and the screw speed was 40 rpm. The moisture content of the strawberry guava seeds was adjusted to 12%. The residual oil content of the pressed cakes was determined by Soxhlet extraction.

Mechanical pressing was also performed at laboratory scale, to generate mechanical-pressed oils for physicochemical analyses. The seeds (300 g) were pressed in a screw press (Komet) with a maximum oil flow rate of 1 kg h<sup>-1</sup>, powered by an electric motor (0.75 kW). The press cylinder was heated before extraction to a temperature comprised between 80 and 100 °C. The press had a nozzle diameter of 5 mm, a screw length of 18 cm, and a screw speed of 40 rpm.

### 2.3.4. Supercritical Dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) Extraction

Extractions were performed in a supercritical fluid unit consisting of a 0.22 L extraction vessel, a 0.22 L separator, a pneumatic pump, and two thermostatic baths. The ground seeds (40 g to 50 g) were loaded into the extractor for each experiment. Temperature, pressure, and CO<sub>2</sub> flow rate were kept constant during extraction. The influence of these three variables on oil extraction yield was evaluated. The extraction was stopped when a constant weight was attained.

## 2.4. Seed Oil Characterization

### 2.4.1. Fatty Acid Analysis

Fatty acid composition was determined by GC-FID, with a capillary column (Agilent, Select FAME, 50 m × 0.25 mm × 0.25 μm). Helium was used as the carrier gas, at a flow rate of 1.2 mL/min. The temperature was set to 250 °C for the injector and the detector. The temperature of the oven was maintained at 185 °C for 35 min, then increased to 250 °C by 20 °C min<sup>-1</sup>, and held at 250 °C for 1.75 min. Method for chemical derivation (transesterification of fatty acids to fatty acid methyl esters, FAMES): 20 mg of seed oil was added to 1 ml of tertio butyl methyl ether. A 100 μl aliquot was then mixed with 50 μl of 0.5 M methanolic trimethyl sulfonium hydroxide. Each sample was analyzed in triplicate. FAMES were identified by comparison of their retention times with those of pure reference standards, and were quantified using the total areas under the peaks.

### 2.4.2. Iodine Value, Acid Value, and β-Carotenoids

All analyses were performed in triplicate. For iodine value, 0.15 g of seed oil was dissolved in 20 ml of chloroform, and 25 ml of Wijs solution was added. The mixture was stirred for 30 min in the dark, and 20 ml of potassium iodide (150 g L<sup>-1</sup>) and 100 ml of demineralized water were then added to the Erlenmeyer flask.

The iodine value was obtained by titration of this solution with sodium thiosulfate (0.1 mol L<sup>-1</sup>), and is expressed in grams of iodine per 100 g (g<sub>I</sub>/100 g).

Acid value was determined by titrating 0.2 g of seed oil dissolved in 10 ml of propan-2-ol with potassium hydroxide (0.01 mol L<sup>-1</sup>). Acid value is expressed in milligrams of potassium hydroxide per gram (mg<sub>KOH</sub>/g).

A spectrophotometer (Spectrostar, BMG Labtech) was used to estimate total carotenoid content. The absorbance of a solution prepared by dissolving one gram of seed oil in 2 ml of isooctane was read at 446 nm in a quartz cell with a path length of 1 cm. Total carotenoid content ( $W_{\beta c}$ ) was calculated in milligrams of β carotene equivalent per kilogram of oil (mg eq. β carotene/kg), with Equation (1), in which 2610 is the molar extinction coefficient of β carotene in isooctane at 446 nm expressed in g<sup>-1</sup>.100 ml cm<sup>-1</sup>, ΔA is the difference in absorbance between the sample and the solvent, l is the optical path length in the cuvette in centimeters, and ρ is the oil concentration in grams of oil per 100 ml of solvent.

$$W_{\beta c} = \frac{1000000 \cdot \Delta A}{2610 \cdot l \cdot \rho} \quad (1)$$

### 2.4.3. Sterol Analysis

Sterols were analyzed by gas chromatography according to Roche et al.<sup>[14]</sup> after the extraction of unsaponifiable matter. Oil (150 mg) and cholestanol (100 μg) used as an internal standard were dissolved in 1 M ethanolic potassium hydroxide (2 ml) and heated at 75 °C for 20 min. The solution was cooled, and 1 ml of distilled water and 6 ml of cyclohexane were added. The organic phase was recovered by decantation. A mixture of 160 μl of the unsaponifiable matter extract and 40 μl of methyl imidazole in methyl trimethylsilyl heptafluorobutyramide (50 μl in 1 ml) was heated at 103 °C for 3 min. Samples were analyzed by GC-FID with a CP-Sil 8CB column (Varian, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) by on-column injection (volume 1 μl). The carrier gas was helium, at a pressure of 100 kPa. The injector temperature was set to 55 °C for 0.5 min, then increased to 340 °C at a rate of 200 °C min<sup>-1</sup> and held at 340 °C for 30 min. The detector temperature was set at 365 °C. The oven temperature program was as follows: 160 °C for 0.5 min, increasing to 260 °C at a rate of 20 °C min<sup>-1</sup>, maintenance at this temperature for 5.5 min, followed by an increase to 300 °C at a rate of 2 °C min<sup>-1</sup>, with holding at this temperature for 10 min and a final increase to 350 °C at a rate of 45 °C min<sup>-1</sup> and maintenance at this temperature for 3 min. The retention times of pure standards analyzed under the same conditions were used for the phytosterol identification. The quantification was performed using the internal standard cholestanol. Phytosterol contents were expressed as mg per 100 g of oil (mg/100 g).

### 2.4.4. Tocopherol Profile

Tocopherols were analyzed by HPLC (Dionex) with a Kromasil 100 SIL column (250 × 4 mm) and a spectrofluorimetric detector

according to the standard NF EN ISO 9936.<sup>[15]</sup> The mobile phase consisted of a mixture of isooctane and isopropanol (99.5:0.5v/v), and the flow rate was set at 1.1 ml min<sup>-1</sup>. The excitation and emission wavelengths were 290 and 317 nm, respectively. The samples were prepared by dissolving 10 mg of seed oil in 1 ml of cyclohexane. Analyses (20 µl per injection) were performed in triplicate. Tocopherols were identified by comparison of their retention time with those of external standards analyzed under the same conditions. The quantification was performed by external standardization with standard solutions of α, γ, and δ-tocopherol (1–5 µg ml<sup>-1</sup>). Tocopherol contents were expressed as mg per 100 g of oil (mg/100 g).

## 2.5. Bioactive Compounds Extraction from Pulp and Peel

### 2.5.1. Extraction

Dried peel and pulp samples were ground in a coffee grinder. Samples were extracted in distilled water or ethanol (96%), with a Fibertec apparatus. The solid:solvent ratio was 1:10. After 1 h, the extracts were filtered and were stored at -20 °C until analysis.

### 2.5.2. Purification

Polysaccharides were removed with a polymeric resin (Amberlite FPX66, DOW), under the form of particles made of macroreticular aromatic polymer particles (sizes between 0.60 and 0.75 mm and a surface area above 700 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>). As a pretreatment, 30 g of resin was washed with 120 ml of distilled water, followed by 120 ml of ethanol:water (80:20), and then 200 ml of distilled water. Extract (100 ml in total) was slowly loaded onto the column, which was rinsed with 120 ml of distilled water. The polyphenols-rich fraction was then eluted with 200 ml of ethanol:water (80:20).

## 2.6. Characterization of Plant Extracts

### 2.6.1. Total Polysaccharide Content

Polysaccharides were analyzed by ion exchange chromatography with a CarboPac PA1 column (Dionex). The eluent was potassium hydroxide, at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. The following concentration gradient was used: 2 mM for 39 min, increasing to 10 mM for 2 min, 100 mM for 8 min and 100 mM for 3 min. The temperature was set to 25 °C. The injection volume was 25 µl. External standards were used for polysaccharide identification. Fucose was used as an internal standard for polysaccharide quantification.

### 2.6.2. Total Phenolic Content

The total phenolic content of the plant extracts was determined by the Folin Ciocalteu method, as follows. In total, 20 µl of fruit extract, 10 µl of Folin Ciocalteu reagent and 170 µl of sodium carbonate was added to each well of a 96-well microplate. The

plate was incubated for 45 min at 45 °C and absorbance was measured at 760 nm with a spectrophotometer (Spectrostar, BMG Labtech). A calibration curve was plotted with a standard solution of gallic acid. Each sample was analyzed in four wells. Results are expressed as grams of gallic acid equivalent per 100 g of sample on a dry basis (GAE/100 g d.b.).

### 2.6.3. Evaluation of Antioxidant Activity

The antioxidant activity of the extracts was assessed by determining their free radical scavenging activity with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical as follows. Extracts were diluted in ethanol to obtain seven different concentrations. A 150 µl aliquot of each sample and 150 µl of ethanolic DPPH solution (90 mg L<sup>-1</sup>) were added to the wells of a 96-well microplate. The plate was kept in the dark for 40 min, with mixing by gentle rotation every 5 min. Absorbance was read at 516 nm with a spectrophotometer (Spectrostar, BMG Labtech). Antioxidant activity was assessed by determining the concentration providing 50% inhibition (IC<sub>50</sub>).

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Oil Extraction and Characterization

#### 3.1.1. Oil Content

Table 1 shows the results obtained for the different oil extraction methods. The highest yields were obtained by cold maceration in hexane: 30% for passion fruit and 15% for strawberry guava, showing a higher potential in extractable oil for passion fruit.

The yield of hexane soxhlet extraction for passion fruit (23.6%) was similar to that reported by Barrales et al.<sup>[9]</sup> in the same conditions. The oil yield obtained by strawberry guava seed maceration in hexane (15.2%) was slightly higher than that reported by Kobelnik et al.<sup>[13]</sup> In fact, for strawberry guava, maceration resulted in similar yields for each of the solvents. For passion fruit, the yield obtained by maceration was lower with ethanol than with hexane.

Thermal activation was not required, as maceration at room temperature resulted in the extraction of at least as much oil as Soxhlet extraction. The seed:solvent ratio (1:25) and the contact

**Table 1.** Seed oil extraction yields for (a) Soxhlet extraction for 4 h, (b) maceration at room temperature for 24 h, (c) mechanical pressing with a screw press (CAS9G), (d) supercritical CO<sub>2</sub> extraction, 100 g min<sup>-1</sup>, 200 bars, 60 °C.

Extraction method	Solvent	Yield (%)	
		Strawberry guava	Passion fruit
Soxhlet <sup>a</sup>	Hexane	12.5 ± 1.9	23.6 ± 0.9
Maceration <sup>b</sup>	Hexane	15.2 ± 2.1	30.0 ± 1.8
	Ethanol	15.6 ± 2.0	19.9 ± 1.4
Mechanical pressing <sup>c</sup>		3.7	19.5
SC <sup>d</sup>	CO <sub>2</sub>	9.6	21.6

time used for maceration (24 h) may have favored better diffusion of the solvent into the ground seeds, thereby improving yield. De Oliveira et al.<sup>[7]</sup> also reported better yields for solvent maceration than for Soxhlet extraction for passion fruit seeds.

Supercritical CO<sub>2</sub> was also used as an extraction solvent. The conditions giving the highest oil yields are presented in Table 1. The impacts of temperature, pressure, and CO<sub>2</sub> flowrate on oil extraction yield were studied in preliminary tests. Higher yields were obtained when CO<sub>2</sub> flowrate was increased from 50 to 100 g min<sup>-1</sup> and pressure from 150 to 200 bars. Increasing the temperature from 40 to 60 °C improved yields only for strawberry guava. Thus, optimal parameters (100 g min<sup>-1</sup>, 200 bars, 40 or 60 °C), led to a similar extraction time for strawberry guava and for passion fruit (80 min). This result agrees with the works of De Oliveira et al.<sup>[16]</sup> and Zahedi et al.,<sup>[17]</sup> who found respectively 18.5% and 23% yields, under the following conditions: 40 or 60°, 200 or 250 bars, between 1 and 2 h.

The yields obtained by mechanical pressing (Table 1) correspond to a recovering of 23.7% of total seed oil for strawberry guava, and 65% for passion fruit (maceration in hexane being the standard protocol), difference which can be explained by the seeds morphology.

### 3.1.2. Physicochemical Analysis

The physicochemical properties of extracted oils are presented in Table 2. Mechanical pressed oils presented similar refractive index. Their iodine values classify them both as semi-siccative oils. For the purposes of comparison, com oil, and soybean oil (125 and 130 gI<sub>2</sub>/100 g,<sup>[18]</sup>) are semi-siccative oils used in food industry.

Acid value is used as an indicator of oil quality, particularly for edible oils. The maximum acid value defined by the Codex Alimentarius Commission<sup>[19]</sup> is 4.0 mg KOH/g for crude oils. The acid values of all the oil samples tested here were below this limit except for the maceration in ethanol. Strawberry guava seed oil had a free fatty-acid content twice that of passion fruit.

For strawberry guava, all extraction methods yielded oils with similar carotenoid contents. For the extraction conditions tested on passion fruit seeds, the most strongly colored oil was obtained by Soxhlet extraction, with a carotenoid content of 26 mg eq. β carotene/kg. Extracts obtained with SC-CO<sub>2</sub> had a lighter color corresponding to the lowest carotenoids content (3.2 mg eq. β carotene/kg). Other authors also found lower carotenoid

**Table 3.** Fatty acid composition of seed oils (% of total fatty acids)

	Strawberry guava	Passion fruit
Palmitic acid (C:16-0)	7.4 ± 0.1	9.4 ± 0.1
Stearic acid (C:18-0)	4.1 ± 0.1	2.5 ± 0.1
Oleic acid (C:18-1, n-9)	9.7 ± 0.2	16.6 ± 0.3
Linoleic acid (C:18-2, n-6)	78.3 ± 0.2	70.9 ± 0.5
α-Linolenic acid (C:18-3, n-3)	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0

contents in oils extracted with SC-CO<sub>2</sub> from different seeds.<sup>[20,21]</sup> High carotenoid levels in passion fruit oil may be associated with high levels of antioxidant activity, as reported by Ferreira et al.<sup>[6]</sup>

### 3.1.3. Fatty Acid Composition

The fatty acid profiles of the two seed oils are presented in Table 3. The mean values obtained with the various extraction methods are shown, as fatty acid composition was not affected by the extraction process. Both seeds oils were polyunsaturated. The most abundant fatty acid was linoleic acid (C18:2), accounting for 78% of total oil content in strawberry guava and 70% in passion fruit. Passion fruit oil was richer in oleic acid than strawberry guava oil, but the two oils had a similar total unsaturated fatty acid content (88%). The fatty-acid profile of strawberry guava was similar to that reported by Biegelmeyer et al.<sup>[12]</sup> Extraction method had no effect on fatty acid composition, consistent with the findings of Barrales et al.<sup>[9]</sup> for passion fruit.

### 3.1.4. Sterol Analysis

The sterol profile of the oils is presented in Table 4. Strawberry guava seed oil was richer in sterols than passion fruit oil, with a sterol content of 514 mg/100 g. β-sitosterol was the most abundant phytosterol in both oils, accounting for 45% and 78% of total sterol content for passion fruit and strawberry guava, respectively. Passion fruit oil differed from strawberry guava oil in having higher stigmaterol and campesterol contents, consistent with the findings of Da Silva et al.<sup>[22]</sup> Strawberry guava oil also contained cycloartenol, which was not present in passion fruit oil.

**Table 2.** Physicochemical properties of extracted seed oils, MP, mechanical-pressed oil (laboratory press); S, Soxhlet extraction; MH, maceration in hexane; ME, maceration in ethanol; SC, supercritical CO<sub>2</sub> extraction.

Extraction method	Strawberry guava					Passion fruit				
	MP	S	MH	ME	SC	MP	S	MH	ME	SC
Refractive index	1.475 ± 0.001	nd	nd	nd	nd	1.474 ± 0.001	nd	nd	nd	nd
Iodine value g <sub>2</sub> /100g	139 ± 2	nd	nd	nd	nd	136 ± 2	nd	nd	nd	nd
Acid value mg <sub>100</sub> /g	1.8 ± 0.5	2.8 ± 0.1	2.3 ± 0.2	5.7 ± 0.7	2.4 ± 0.0	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.3	1.3 ± 0.2	7.5 ± 0.5	1.1 ± 0.0
Carotenoids mg eq. β carotene/kg	3.1 ± 0.1	3.0 ± 0.1	4.3 ± 0.3	nd	2.6 ± 0.0	8.6 ± 0.0	25.9 ± 0.1	9.2 ± 0.2	nd	3.2 ± 0.2
Color	Yellow	Yellow	Yellow	Orange	Yellow	Yellow-orange	Orange	Yellow-orange	Brown	Yellow

**Table 4.** Sterol composition of seed oils (mg/100 g)

	Strawberry guava	Passion fruit
Campesterol	17.7 ± 0.2	38.7 ± 0.4
Stigmasterol	8.9 ± 0.4	98.6 ± 0.1
β-sitosterol	400.2 ± 0.6	157.5 ± 0.6
Δ5 avenasterol	46.2 ± 1.8	18.5 ± 0.2
Δ7 stigmasterol	2.6 ± 0.4	7.1 ± 1.5
Δ7 avenasterol	7.5 ± 0.2	9.4 ± 0.2
Cycloartenol	13.8 ± 0.7	nd
Methylene cycloartenol	14.2 ± 0.7	8.9 ± 0.1
Otrodadienol	3.3 ± 0.3	9.6 ± 0.3
Total	514.4 ± 3.9	348.2 ± 3.1

### 3.1.5. Tocopherol Analysis

The results of the tocopherol analysis are shown in **Table 5**. In strawberry guava, the major tocopherol was α-tocopherol, accounting for 60% of total tocopherol content. In passion fruit, γ-tocopherol (64%) predominated, followed by δ- and α-tocopherol (22 and 14%, respectively). Malacrida et al.<sup>[23]</sup> found that δ-tocopherol was the major tocopherol (56%) in passion fruit oil extracted from seeds dried at room temperature, but they detected no α-tocopherol. These differences may be due to differences in the geographic origin of the fruit or in seed pretreatment. As demonstrated by Lavedrine et al.<sup>[24]</sup> seeds dried at 50 or 60 °C and storage may lead to a decrease in tocopherol content.

## 3.2. Pulp and Peel Extracts

### 3.2.1. Extraction and Purification Yields

As shown in **Table 6**, the extraction yields obtained for hydrophilic molecules were between 11 and 24%. The highest yield was obtained with water for strawberry guava (24.4%). A similar yield was obtained for passion fruit with ethanol (23.6%). Extracts were purified on a polymeric resin (FPX66) known to adsorb polyphenols, to remove polysaccharides in eluent. Aqueous extracts gave higher purification yields than ethanolic extracts.

### 3.2.2. Polysaccharides

For both fruits, the principal polysaccharides found in extracts were glucose (3.7–22.7 g/100 g d.b.) and fructose

**Table 5.** Tocopherol composition of seed oils (mg/100 g)

	Strawberry guava	Passion fruit
α-tocopherol	13.7	2.5
γ-tocopherol	6.2	11.3
δ-tocopherol	2.9	3.9
Total amount	22.8	17.7

**Table 6.** Extraction and purification yields from peel and pulp residues (g/100 g)

Solvent		Strawberry guava	Passion fruit
Water	Extraction	24.4 ± 2.1	11.1 ± 3.8
Ethanol		17.2 ± 0.9	23.6 ± 1.0
Water	Purification	24.6	14.9
Ethanol		8.5	11.2

(9.5–22.0 g/100 g d.b.). Analyses of the total polysaccharide contents in the crude extracts showed a higher content in polysaccharides for strawberry guava extracts than for passion fruit extracts. In fact, strawberry guava extracts contained 1.5 times and 1.8 times more polysaccharides, respectively in aqueous extracts and ethanolic extracts. A purification step was performed on the extracts to remove the polysaccharides and obtain concentrated fractions of polyphenols with higher antioxidant activity. Analyses on residues of purification confirmed that the polysaccharides removal rate was higher for aqueous extracts. The sugar fraction could be of interest for the food industry.

### 3.2.3. Total Polyphenol Content

The results of the total polyphenol analyses performed with the Folin-Ciocalteu method are presented in **Figure 1**. This assay is not specific to phenolic compounds as the reagent can be reduced by other chemical components including carotenoids, sugars, and ascorbic acid.<sup>[25]</sup> However, this method remains widely used and allows the comparison with existing data in the literature.

Crude peel and pulp extracts from strawberry guava were twice as rich in polyphenols as the corresponding crude extracts from passion fruit, with polyphenol contents ranging from 9 to 10 g GAE/100 g d.b. for strawberry guava, and from 3 to 5 g GAE/100 g d.b. for passion fruit.

The TPC of fresh co-products (0.6 and 2 g GAE/100 g f.w. for passion fruit and strawberry guava, respectively) compared with TPC of these two fresh fruits found in the literature<sup>[4,11,12,26,27]</sup> indicates that fresh co-products are up to four times richer in polyphenols. Strawberry guava co-products showed higher total phenolic content than several fruits known to be particularly rich in polyphenols like black raspberry, lemon, and grapefruit (670–893 mg GAE/100 g)<sup>[28]</sup> and could therefore be considered as a new valuable source of phenolic compounds. The high TPC of strawberry guava ethanolic extracts was previously correlated with strong inhibitory effect on α-glucosidase, indicating possible use of these extracts for decreasing blood glucose.<sup>[29]</sup> In addition to their strong antioxidant activities, phenolic compounds of strawberry guava were also found to have antimicrobial effect and to reduce the survival rates of breast and colon cancer cells,<sup>[30]</sup> leading to potential application in the pharmaceutical field.

In passion fruit, the main polyphenols were flavonoids, known for their inhibitory action on inflammatory cells.<sup>[11,31]</sup> Crude extracts containing polyphenols, polysaccharides, and

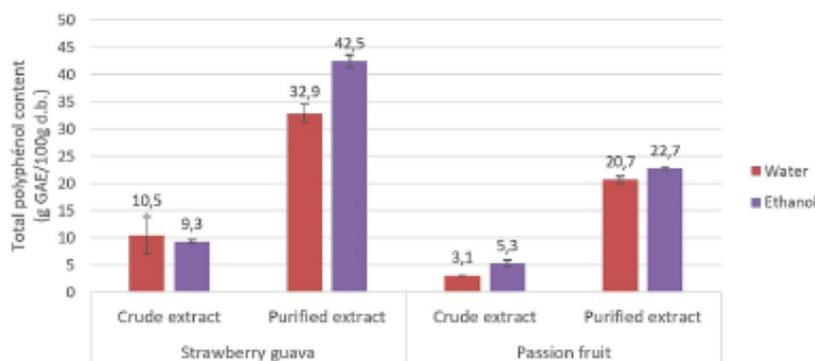


Figure 1. Total polyphenol content in crude and purified extracts (g GAE/100 g d.b.).

Vitamin C could also be used for nutraceuticals or food supplements.<sup>[32]</sup>

Purification resulted in an enrichment of the extracts in polyphenols. Polyphenol contents increased by a factor of 3 to 6.7, reaching a final value of more than 20% in the purified extracts.

Strawberry guava extracts had the highest polyphenol contents after purification (above 30%). Ethanolic extraction resulted in even higher levels (42.5%) of polyphenols in the purified fraction.

However, purified aqueous extracts of passion fruit presented a greater enrichment (multiplication factor: 6.7) in polyphenols than aqueous extracts of strawberry guava, despite their lower polysaccharide contents. In fact, it was shown that the purification step does not only remove polysaccharides but eliminate also the vitamin C, contained in higher amounts in strawberry guava than in passion fruit.<sup>[11,33]</sup> The purification yielded concentrated fractions of polyphenols that could be useful for possible applications in the pharmaceutical or cosmetic fields.<sup>[34]</sup>

#### 3.2.4. Antioxidant Activity

The antioxidant activity of extracts was evaluated by determining their free radical scavenging ability with the DPPH assay

(Figure 2). Crude extracts of strawberry guava had antioxidant activity, with  $IC_{50}$  of 37 to 59  $mg L^{-1}$  (the optimal  $IC_{50}$  value was obtained with water). These results are consistent with those of Luximon-Ramma et al.,<sup>[11]</sup> who showed that strawberry guava had the highest levels of antioxidant activity among 17 exotic fruits from Mauritius, including passion fruit. Indeed, the  $IC_{50}$  obtained for the strawberry guava co-product ethanolic extract are 10 times lower than the value obtained by Vinholes et al.<sup>[29]</sup> for fresh fruit ethanolic extract, thus showing the potential of this co-product as a source of natural antioxidants. Crude ethanolic extracts of strawberry guava were found to possess strong *in vivo* antioxidant properties.<sup>[35]</sup>

Purification allowed to concentrate extracts in antioxidant molecules by removing the polysaccharides and then to enhance their anti-radical activities. After purification, the aqueous extract of strawberry guava had a high level of antioxidant activity, with an  $IC_{50}$  (10–11  $mg L^{-1}$ ) close to that of Trolox (7  $mg L^{-1}$ ). Purification was effective, but given the low  $IC_{50}$  of crude extracts and the purification yield, the use of crude extracts merits consideration.

The  $IC_{50}$  of crude extracts of passion fruit ranged from 300 to 460  $mg L^{-1}$  (the optimal  $IC_{50}$  value was obtained with ethanol). The  $IC_{50}$  obtained after purification was similar to that for crude extracts of strawberry guava. Purification had a greater effect on  $IC_{50}$  for passion fruit extracts than for strawberry guava extracts;

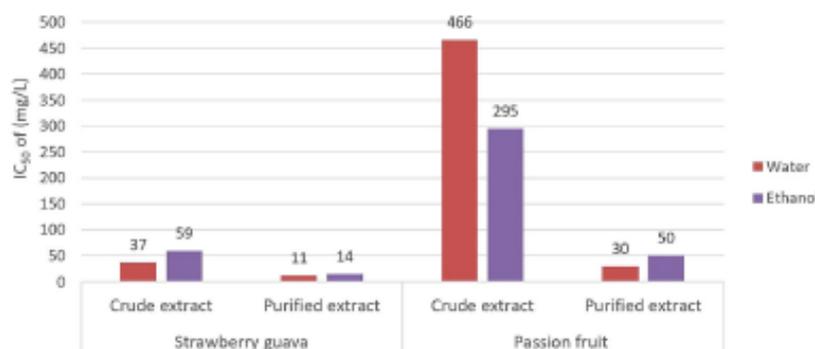


Figure 2.  $IC_{50}$  of the crude and purified extracts ( $mg L^{-1}$ ).

a multiplication factor of 15.5 was achieved for antioxidant activity enhancement in aqueous extracts of passion fruit. This result is consistent with the high level of polyphenol enrichment observed for the same extract. The activity of flavonoid-enriched fractions of passion fruit suggests possible application in functional food for purified extracts of co-products.<sup>[36]</sup>

A linear correlation between total polyphenol contents and antioxidant activity of the strawberry guava and passion extracts was highlighted with respective correlation coefficients  $R^2 = 0.79$  and  $0.92$ . The higher contents of vitamin C in strawberry guava compared to passion fruit could explain the different correlation coefficients.<sup>[4,27]</sup> Indeed, previous studies demonstrated that ascorbic acid is included in the total polyphenol content determined by the Folin-Ciocalteu method and provides minor contribution to the antioxidant potential of fruit extracts.<sup>[14,25]</sup>

#### 4. Conclusion

This study indicates that a biorefinery approach can be applied to these two tropical fruit by-products in the food sector. Polyunsaturated vegetable oils can be extracted from the seeds and functional organic molecules can be obtained from the residual peels and pulps. The extraction processes tested here were selected on the basis of their limited impacts on the environment and on health: green solvents (water, ethanol, SC-CO<sub>2</sub>), moderate temperatures (room temperature or 60 °C), or solvent-free extraction (mechanical pressing).

Oil extraction yields for passion fruit were about twice those for strawberry guava with one of the three solvents (30% and 15%). Ethanol was clearly an efficient solvent for extraction from strawberry guava seeds. Maceration in ethanol was also effective and could easily be scaled up. Moreover, SC-CO<sub>2</sub> extraction has the advantage of taking less time and generating oil free of all traces of solvent, despite a yield loss of about 30%. Both plant oils were found to be rich in linoleic acid, with interesting fatty acid profiles (88% unsaturated fatty acids) for use as semi-siccative oils in the coating industry. Moreover, new data were reported on strawberry guava oil composition: high levels of  $\alpha$ -tocopherol and sterols, including  $\beta$ -sitosterol in particular. This content in phytosterols combined with a high level in PUFA Omega-6 is interesting for different applications, including food industry. Passion fruit oil is currently used in the cosmetic industry for its antioxidant (mediated by carotenoids) and moisturizing properties.<sup>[6]</sup>

For extraction from pulp and peel, ethanol tended to give higher yields for both fruits. The extracts obtained had potentially useful polyphenol contents and antioxidant activities, particularly for strawberry guava. In fact, the total polyphenol contents of fresh co-products were found to be up to four times higher than those of fresh fruits. By removing polysaccharides, it is possible to enrich extracts in polyphenols, thereby increasing their antioxidant activity. Strawberry guava extracts enriched in this way had antioxidant activity levels similar to those of Trolox. The fraction of polysaccharides isolated could be of interest to the food industry.

Finally, the bioactive extracts and the seed oils could be combined to formulate innovative plant-based oil emulsions for

food or cosmetic fields, but also for ecofriendly painting and coatings with improved preservation properties.

#### Abbreviations

FAME, fatty acid methyl ester; GAE, gallic acid equivalent; GC-FID, gas chromatography coupled to flame ionization detector; HPLC, high performance liquid chromatography; IC, inhibition concentration; SC-CO<sub>2</sub>, supercritical carbon dioxide.

#### Acknowledgments

The authors thank Derivery SAS for financial and technical support, as well as National Agency for Research and Technology (ANRT) for funding.

#### Conflict of Interest

The authors have declared no conflict of interest.

#### Keywords

agro-industrial waste, green extraction processes, passion fruit, strawberry Guava, supercritical CO<sub>2</sub>

Received: September 10, 2018

Revised: January 10, 2019

Published online: February 25, 2019

- [1] Council Directive 2010 /79/EU of the European Parliament and of the Council of 19 October 2010 on the reduction of VOC emissions *Official J. L304*, 20.11.2010 18.
- [2] Y. Lu, R. C. Larock, *Prog. Org. Coat.* **2010**, 69, 31.
- [3] H. Liang, Y. Feng, J. Lu, L. Liu, Z. Yang, Y. Luo, Y. Zhang, C. Zhang, *Ind. Crops Prod.* **2018**, 122, 448.
- [4] A. Septembre-Malaterre, G. Stanislas, E. Douraguia, M. P. Gonthier, *Food Chem.* **2016**, 212, 225.
- [5] L. M. Ribeiro da Silva, E. A. Teixeira de Figueiredo, N. M. Ricardo, I. G. Vieira, R. Wilane de Figueiredo, I. M. Brasil, C. L. Gomes, *Food Chem.* **2014**, 143, 398.
- [6] B. S. Ferreira, C. G. de Almeida, L. P. Faza, A. de Almeida, C. G. Diniz, V. L. da Silva, R. M. Grazul, M. Le Hyaric, *Molecules* **2011**, 16, 5875.
- [7] R. C. De Oliveira, S. De Barros, M. Gimenes, *J. Food. Eng.* **2013**, 117, 458.
- [8] G. Piombo, N. Barouh, B. Barea, R. Boulanger, P. Brat, M. Pina, P. Villeneuve, *OCL* **2006**, 13, 195.
- [9] F. M. Barrales, C. A. Rezende, J. Martinez, *J. Supercritic. Fluids.* **2015**, 104, 183.
- [10] J. A. Pino, R. Marbot, C. Vasquez, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 5883.
- [11] A. Luximon-Ramma, T. Baborun, A. Crozier, *J. Sci. Food Agric.* **2003**, 83, 496.
- [12] R. Biegelmeier, J. Andrade, A. Aboy, M. Apel, R. Dresch, R. Marin, M. do Carmo Bassols Raseira, A. Henriques, *J. Food Sci.* **2011**, 76, 991.
- [13] M. Kobelnik, D. L. Cassimiro, D. dos Santos Dias, C. A. Ribeiro, M. S. Crespi, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2012**, 108, 1281.
- [14] J. Roche, A. Bouniols, Z. Mouloungui, T. Barranco, M. Cerny, *Eur. Lip. Sci. Technol.* **2006**, 108, 287.

- [15] AFNOR, NF EN ISO 9936: Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography, 2016.
- [16] R. C. De Oliveira, R. M. Rossi, M. L. Gimenes, S. Jagadevan, W. Machado Giufrida, S. T. Davantel de Barros, *Grasas y aceites* 2013, 64, 400.
- [17] G. Zahedi, A. Azarpour, *J Supercrit. Fluids*. 2011, 58, 40.
- [18] S. Naz, H. Sheikh, R. Siddiqi, S. A. Sayeed, *Food Chem.* 2004, 88, 253.
- [19] Codex Stan., Codex Alimentarius, 1999, Rome, Italy.
- [20] L. de França, G. Reber, M. Meireles, N. Machado, G. Brunner, *J. Supercrit. Fluid.* 1999, 14, 247.
- [21] K. Szentmihályi, P. Vinkler, B. Lakatos, V. Illes, M. Then, *Bioresour. Technol.* 2002, 82, 195.
- [22] A. C. Da Silva, N. Jorge, *Food Res. Int.* 2013, 66, 493.
- [23] C. R. Malacrida, N. Jorge, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2012, 55, 127.
- [24] F. Lavedrine, A. Revel, A. Poupard, J. Alary, *Food Chem.* 1997, 58, 135.
- [25] D. Huang, B. Ou, R. Prior, *J Agri Food Chem.* 2005, 53, 1841.
- [26] M. Isabelle, B. Lee, C. Ong, X. Liu, D. Huang, *Food Chem.* 2010, 120, 993.
- [27] A. Septembre-Malaterre, G. Stanislas, E. Douraguia, M. P. Gonthier, *Food Chem.* 2016, 212, 225.
- [28] R. Guimarães, L. Barros, J. Barreira, M. Sousa, A. Carvalho, I. Ferreira, *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48, 99.
- [29] J. Vinholes, G. Lemos, R. Barbieri, R. Franzon, M. Vizzotto, *Food Bioscience* 2017, 19, 92.
- [30] A. Medina, L. Haas, F. Chaves, M. Salvador, R. Zambiasi, W. da Silva, L. Nora, C. Rombaldi, *Food Chem.* 2010, 128, 916.
- [31] E. Middleton, C. Kandaswami, *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*, (Ed. J. B. Harborne), Chapman and Hall, London 1994, pp. 619.
- [32] S. Dragan, F. Andrica, M. Serban, R. Timar, *Curr. Med. Chem.* 2014, 22, 14.
- [33] T. Buran, A. Sandhu, Z. Li, C. Rock, W. Yang, L. Gu, *J Food Eng.* 2014, 128, 167.
- [34] O. Zillich, U. Schweiggert-Weisz, P. Eisner, M. Kershet, *Int. J. Cosmet. Sci.* 2015, 37, 455.
- [35] J. Cardoso, P. Oliveira, N. Bona, F. Vasconcellos, J. Baldissarelli, M. Vizzotto, M. Soares, V. Ramos, R. Spanevello, C. Lencina, R. Tavares, F. Stefanello, *Redox Rep.* 2017, 23, 1.
- [36] M. Zeraik, D. Serteyn, G. Deby-Dupont, J. N. Wauters, M. Tits, J. Yariwake, L. Angenot, T. Franck, *Food Chem.* 2011, 128, 259.