



HAL
open science

Huile native et huile traitée de *Ricinodendron heudelotii*: biodisponibilité, structure et réactivité chimio-enzymatique des acides gras linoléiques conjugués CLnA-(Alpha et bêta) éléostéarique.

Diakaridja Nikiema

► To cite this version:

Diakaridja Nikiema. Huile native et huile traitée de *Ricinodendron heudelotii*: biodisponibilité, structure et réactivité chimio-enzymatique des acides gras linoléiques conjugués CLnA-(Alpha et bêta) éléostéarique.. Génie chimique. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d'Ivoire), 2021. Français. NNT : 2021INPT0059 . tel-04170852

HAL Id: tel-04170852

<https://theses.hal.science/tel-04170852v1>

Submitted on 25 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 :

M. DIAKARIDJA NIKIEMA

le jeudi 18 mars 2021

Titre :

Huile native et huile traitée de Ricinodendron heudelotii: biodisponibilité, structure et réactivité chimio-enzymatique des acides gras linoléiques conjugués CLnA-(Alpha et bêta) éléostéarique.

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)

Directeur(s) de Thèse :

MME CHRISTINE RAYNAUD

M. KOUA OI KOUA

Rapporteurs :

M. KARIM TRAORE, UNIVERSITE NANGUI ABROGOUA

M. PHILIPPE GUEGAN, UNIVERSITE SORBONNE

Membre(s) du jury :

M. DOUBOU DANHO, UNIVERSITE FELIX-HOUPHOUET-BOIGNY, Président

M. ANÉ ADJOU, UNIVERSITE FELIX-HOUPHOUET-BOIGNY, Membre

M. KOUA OI KOUA, UNIVERSITE FELIX-HOUPHOUET-BOIGNY, Invité(e)

MME CAMILLE OGER, UNIVERSITE DE MONTPELLIER, Membre

MME CHRISTINE RAYNAUD, TOULOUSE INP, Membre

M. ZEPHIRIN MOULOUNGUI, TOULOUSE INP, Invité(e)

Résumé

Deux méthodes de décortilage (traitement thermique traditionnel et décortilage mécanique manuel) sont utilisées pour isoler les amandes des coques des graines de *Ricinodendron heudelotii*. L'huile modifiée extraite des amandes obtenues par traitement thermique traditionnel et l'huile brute extraite des amandes par décortilage mécanique manuel ont des profils acides gras différents.

L'huile modifiée révèle la présence de CLnA (acide α -éléostéarique 50,5 % \pm 0,1, acide β -éléostéarique 8,4% \pm 0,0 et acide catalpique 0,4). En revanche, l'huile brute est composée d'acide α -éléostéarique à 60,1 % \pm 0,2. Ces deux huiles sont des huiles polyinsaturées avec un taux très élevé (91% \pm 0.4) en AGPI riche en CLnA. Les CLnA sont des acides gras C18 caractérisés par la présence de trois doubles liaisons conjuguées sur les carbones 9, 11 et 13

Les résultats obtenus montrent que l'exposition des triglycérides de l'huile brute des amandes de *ricinodendron heudelotii* aux rayons ultraviolets ou au soleil entraîne l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique (C18 :3 9c, 11t, 13t) des triglycérides. Elle conduit à l'obtention des huiles constituées de CLnA (acides α -éléostéarique, β -éléostéarique et catalpique). Ainsi, ces deux méthodes de décortilage sont propices à l'obtention de deux huiles riches en acides gras polyinsaturés à des teneurs hautes en acides gras polyinsaturés de 95% enrichies en CLnA caractérisées par des indices d'iode élevés de 180 (huile modifiée) et 195 (huile brute).

L'association du traitement photochimique (rayons UV ou soleil) des triglycérides de l'huile brute suivi de leur hydrolyse enzymatique avec la lipase LCC conduit à la production d'acides gras libres CLnA-libre ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) riche en l'acide β -éléostéarique, acide α -éléostéarique et de l'acide linoléique.

L'hydrolyse enzymatique en présence de la lipase LCC des triglycérides de l'huile brute produit les CLnA-libre αE (61%) et l'hydrolyse des triglycérides de l'huile modifiée conduit à la synthèse de CLnA-libre βE (42%). Le fractionnement de CLnA-libre βE (42%) conduit à la production de deux fractions composées respectivement de 34,4% d'acide linoléique et de 82% d'acide β -éléostéarique.

Nous avons étudié les milieux réactionnels issus de la réactivité de deux types de CLnA-libre, CLnA-libre αE (61%) et CLnA-libre βE (42%) de l'huile brute et de l'huile modifiée par réaction d'estérification enzymatique directe avec le glycérol. Les réactions ont été catalysées par les lipases lypolyve CC et Novozym 435 dans un milieu sans solvant ou en milieu solvanté avec de tert-butanol. Les résultats montrent que les systèmes glycérol/ CLnA-libre ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) sont hétérogènes. Les lipases LCC et Novozym 435 agissent à l'interface glycérol/ CLnA-libre ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β). L'ajout de tert-butanol permet de rendre le système pseudo-homogène, monophasique et organisé. Les réactions d'estérification réalisées dans des systèmes sans solvant organique en présence de la lipase Novozym 435 orientent la formation des esters partiels dans le sens de production des 1,3-diglycérides (un mélange 1-monoglycéride-1,3-diglycéride : 30-60). Cependant, l'utilisation du tert-butanol favorise l'accumulation des esters partiels plus hydrophiles, les 1-monoglycérides (un mélange 1-monoglycéride-1,3-diglycéride : 61-30).

L'utilisation de la lipase Novozym 435 conduit à un degré d'avancement de la réaction d'estérification supérieur à 80 % pour les deux substrats et un degré d'estérification de 61,5% en présence de la lipase LCC dans des conditions opérationnelles interfaciales. Ces

deux lipases expriment une activité catalytique estérase comparable. Celle de la lipase Novozym 435 parait plus élevée en raison de sa mise en jeu sous forme d'enzyme immobilisée sur résine macroporeuse acrylique.

L'étude des fractions monoglycérides et diglycérides des esters partiels montre qu'ils sont riches en CLnA avec des teneurs comprises entre 50 à 70%. C'est l'enrichissement en groupes acyls linoléiques conjugués provoqué par les réactions d'estérifications chimio-catalysées.

L'étude de la réactivité des CLnA-libres ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) et d'EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) sous azote ou sous l'oxygène de l'air pour la synthèse de polymères à 70 °C montre que seul les EPG-CLnA βE polymérisent sous atmosphère inerte par une réaction de type Diels-Alder auto-initiée par le CLnA- β . En présence de l'oxygène de l'air les CLnA-libres ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) et EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) polymérisent. Deux types de polymérisations sont mise en œuvre, une polymérisation de type Diels-Alder auto-initiée par le CLnA- β et une polymérisation radicalaire. Ces polymérisations sont réalisées sur les trois doubles liaisons conjuguées des CLnA sous leur forme libre et sous forme d'esters partiels de glycérol.

Les substrats riches en β -éléostéarique polymérisent vite avec un ordre partiel par rapport au CLnA de 1 et les substrats riches en α -éléostéarique polymérisent lentement avec un ordre partiel par rapport au CLnA de 0.

L'étude des acides gras dans les extractibles a permis de montrer que les acides oléique et linoléique ne polymérisent pas, ils jouent le rôle de fluidifiant facilitant la polymérisation. Les propriétés physico-chimiques de ces polymères synthétisés montrent que tous ces polymères sont un mélange de macromolécules composées de polymères à poids moléculaire de 1860 g/mol, de polymères à poids moléculaire compris entre 1860 à 25000 g/mol et des polymères de poids moléculaire supérieur à 25000 g/mol. Ces polymères ont en outre des Tg inférieures à -30°C sont souples et sous forme de gel à température ambiante. L'ensemble de ces propriétés fait d'eux de bons candidats pour la formulation de biofertilisants phytosanitaires pour le cacaoyer et l'igname en y incorporant des oligo-éléments spécifiques.

Mots-clés : *Ricinodendron heudelotii*, CLnA : acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique, acide catalpique, hydrolyse enzymatique Lypolyve *Candida Rugosa*, Novozym435, glycérol, estérification enzymatique, polymérisation en masse, Biopolymères et gel.

Native and treated *Ricinodendron heudelotii* oil: bioavailability, structure and chemo-enzymatic reactivity of conjugated linolenic fatty acids CLnA- Δ E

Two methods (traditional thermal treatment and manual mechanical shelling) are used to isolate shell almonds from *Ricinodendron heudelotii* seeds. The modified oil extracted from the almonds obtained by traditional heat treatment and the crude oil extracted from the almonds by manual mechanical dehulling have different fatty acid profiles. The modified oil revealed the presence of CLnA (50.5 % α -eleostearic acid, 8.4 % β -eleostearic acid and 0.4 % catalpic acid). Crude oil, on the other hand, is composed of 60.1% α -eleostearic acid. Both oils were polyunsaturated oils with a very high rate in AGPI (91%) and rich in CLnA. CLnA were C18 fatty acids characterized by the presence of three double conjugate bonds on carbons 9, 11 and 13.

The results showed that the exposure of the triglycerides of the crude oil of *ricinodendron* almonds with ultraviolet rays or in the sun lead to the isomerization of α -eleostearic acid (C18:3 9c, 11t, 13t) isomerization to β -eleostearic acid (C18:3 9t, 11t, 13t) and % catalpic acid (C18:3 9t, 11t, 13c). We obtained oil CLnA (α -eleostearic acid, β -eleostearic acid and catalpic acid). Thus, these two dehulling methods were suitable to obtaining the two rich oils in polyunsaturated fatty acids with high levels of CLnA (95%) characterized by high iodine values of 180 (modified oil) and 195 (crude oil).

The combination of photochemical treatment (UV rays or sun light) of the crude oil triglycerides followed by their enzymatic hydrolysis with LCC lipase led to the free fatty acids free-CLnA Δ E ($\Delta = \alpha$ or β) rich in β -eleostearic acid, α -eleostearic acid and linoleic acid. Crude oil triglycerides hydrolysis produced free-CLnA α E (61%) and the hydrolysis of modified oil triglycerides led to free-CLnA β E (42%). The fractionation of the free-CLnA β E (42%) produced two moieties composed respectively of 34.4% linoleic acid and 82% β -eleostearic acid.

We studied reaction media resulting from the two free-CLnA (free-CLnA α E (61%) and free-CLnA β E (42%)) reactivity by direct enzymatic esterification reaction with glycerol.

These reactions were catalysed by lypolyve CC and Novozym 435 in a solvent-free medium or in a medium solvent containing with tert-butanol. The results showed that the glycerol/ free-CLnA systems Δ E ($\Delta = \alpha$ or β) were heterogeneous. LCC and Novozym 435 lipases acted at glycerol/free-CLnA Δ E ($\Delta = \alpha$ or β) interface.

The addition of tert-butanol allowed glycerol/free-CLnA system homogeneous, monophasic and organized media. Esterification carried out without organic solvents directed the formation of partial esters in the direction of production of 1,3-diglycerides (a mixture of 1-monoglyceride-1,3-diglyceride: 30-60). However, the use of tert-butanol promoted the accumulation of more hydrophilic partial esters, 1-monoglycerides (a mixture: 1-monoglyceride-1,3-diglyceride 61-30). The use of Novozym 435 lipase use led to a degree of esterification greater than 80% for both substrates (free-CLnA α E (61%) and free-CLnA β E (42%)) and a degree of esterification of 61.5% with LCC lipase. The study of the monoglyceride and diglyceride fractions of the partial esters showed that they were rich in CLnA from 50 to 70%.

The study of the reactivity of free CLnA Δ E ($\Delta = \alpha$ or β) and EPG-CLnA Δ E ($\Delta = \alpha$ or β) under nitrogen or oxygen in the air for polymer synthesis at 70°C showed that only EPG-CLnA β E polymerized under inert atmosphere by a Diels-Alder type reaction self-initiated by CLnA- β . With oxygen from the air, CLnA-free Δ E ($\Delta = \alpha$ or β) and EPG-CLnA Δ E ($\Delta = \alpha$ or β) polymerized. Two types of polymerizations are used, a self-initiated polymerization by CLnA- β and a radical polymerization. These polymerizations are carried out on the three conjugated double bonds of CLnA in their free form and in the form of partial glycerol esters. The β -eleostearic rich substrates polymerized quickly with a partial order relative to CLnA of 1 and the α -eleostearic rich substrates polymerized slowly with a partial order relative to CLnA of 0. The study of fatty acids in extractives has shown that oleic and linoleic acids did not polymerize, they played the role of fluidizer facilitating polymerization. The physico-chemical properties of these synthesized polymers showed that all polymers were a mixture of macromolecules composed of polymers having a molecular weight of 1860 g/mol, polymers having a molecular weight between 1860 and 25000 g/mol and polymers having a molecular weight above 25000 g/mol. These polymers also had Tg below -30°C, were flexible and in gel form at room temperature. All these properties made them good candidates for the formulation of phytosanitary biofertilizers for cocoa and yams by incorporating specific trace elements.

Keywords: *Ricinodendron heudelotii*, CLnA: α -eleostearic acid, β -eleostearic acid, catalpic acid, enzymatic hydrolysis Lypolyve *Candida Rugosa*, Novozym435, glycerol, enzymatic esterification, bulk polymerization, Biopolymers and gel.

Abréviations

GLOSSAIRE

ATR-IRTF	:Réflectance totale atténuée, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
CLnA	:Acide linoléique conjugué
CLnA- libre	:Acide linoléique conjugué libre
CLnA-αE	:Mélange d'acides linoléiques conjugués riche en acide α -éléostéarique
CLnA-βE	:Mélange d'acides linoléiques conjugués riche en acide β -éléostéarique
FAD2	:Delta (12)-Fatty-acid desaturase
FADX	:Delta(12)-oleate Fatty acid conjugase desaturase
EPG	:Esters partiels de glycérol
EPG-CLnA	:Esters partiels de glycérol à chaînes carbonées riches en acide linoléique conjuguée(s)
EPG-CLnA αE (di)	:Esters partiels de glycérol riches en diglycérides à chaînes carbonées composées majoritairement d'acide α -éléostéarique
EPG-CLnA αE (mono)	:Esters partiels de glycérol riches en monoglycérides à chaînes carbonées composées majoritairement d'acide α -éléostéarique
EPG-CLnA βE (di)	:Esters partiels de glycérol riches en diglycérides à chaînes carbonées composées majoritairement d'acide β -éléostéarique
EPG-CLnA βE (mono)	:Esters partiels de glycérol riches en monoglycérides à chaînes carbonées composées majoritairement d'acide β -éléostéarique
Lipase LCC	:Lypolyve de <i>Candida rugosa</i>
Lipase Novozym 435	:Lipase de <i>Candida antarctica</i> immobilisée sur résine acrylique macroporeuse anionique
PPARγ	:Propriété d'activer le récepteur γ des peroxyosomes

DEDICACES ET REMERCIEMENTS

Dédicaces et Remerciements

A ma famille qui m'a donné la force, le courage et l'inspiration pour réaliser ces travaux et écrire ce mémoire de thèse.

A mon père Feu NIKIEMA Ougo Issiaka

A ma mère M'BRA Aya Jeannette

A KABORE Oubri Adissa

A mes frères (NIKIEMA Mahadi, N Adama, M'BRA Kouadio Max)

A mes sœurs (NIKIEMA Rasmata, N Aïssata, N Lyza, Aya Angelle)

qui m'ont toujours soutenu, tant sur le plan moral que financier et qui m'ont toujours inculqué les qualités de persévérance, de dépassement de soi, de travail acharné et qui ont été une source de motivation.

Je tiens, c'est avec grande plaisir que je dédie ce travail:

À l'être le plus généreux que je connaisse.

À celui qui m'a soutenu et a fait de moi l'homme que je suis,

Mon Mentor

M. DANAN Régis.

Dédicaces et Remerciements

Les recherches qui font l'objet de ce mémoire ont été menées en co-direction dans le laboratoire de chimie organique et substances naturelles dirigé par Monsieur **KOUA oi Koua** et le laboratoire de Chimie Agro industrielle UMR 1010 INRA/INP-ENSIACET dans l'équipe Réactivité Chimique des Agro-molécules Lipochimie dirigée par Monsieur **Zéphirin MOULOUNGUI**.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements aux personnes suivantes:

Le doyen de l'Unité de Formation des Sciences des Structures de la Matière et technologies (SSMT) Monsieur **ADJOU Ané** de m'avoir accueilli dans son unité de recherches.

Le Directeur du Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle Monsieur **Gérard VILAREM** de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de l'UMR 1010.

J'adresse mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse, Monsieur **Zéphirin MOULOUNGUI**, Directeur de recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) et responsable de l'équipe Réactivité Chimique des Agro-moléculaires Lipochimie au Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA) et Monsieur **KOUA oi Koua**, Docteur-Ingénieur INPT, enseignant-chercheur, Directeur du Laboratoire de Chimie Organique et de Substances Naturelles (LCOSN) qui m'ont fait confiance pendant ces années de thèse. Merci pour l'encadrement, votre gentillesse, vos réflexions pertinentes, le partage de savoir et votre disponibilité tout au long de mes travaux. J'ai beaucoup appris à vos côtés.

Monsieur **Zéphirin MOULOUNGUI**, je suis honoré de vous avoir eu comme encadrant, je vous remercie pour la formation et le grand service que vous rendez aux étudiants africains.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse, mon encadreuse, **Mme Christine RAYNAUD**, rigueur, esprit critique, gentillesse, disponibilité sont les maîtres mots qui vous caractérisent. Docteur, votre implication dans cette thèse a été d'une importance capitale dans la finalisation dans cette thèse.

Dédicaces et Remerciements

Merci à Monsieur **Carlos VACA GARCIA**, Professeur des Universités, Directeur-Adjoint du Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle ; pour l'accueil chaleureux au sein du laboratoire, pour sa simplicité et les conseils précieux.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **GUEGAN Philippe**, Professeur des Universités et Madame **BENNEVAULT Véronique**, Maître de conférences, pour le travail important que nous avons pu réaliser sur la caractérisation des biopolymères au sein de leur équipe de recherche de l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire de Sorbonne Université Campus Pierre et Marie Curie .

Aux membres de la commission d'examen

Professeur **DANHO Doubou**, président du jury ; merci d'avoir accepté de présider cette commission d'évaluation de ce travail de recherche scientifique.

Professeur **TRAORE Karim Sory**, rapporteur; pour avoir accepté de consacrer votre temps si précieux à la lecture de ce manuscrit, au jugement et au rapport sur le forme et le fond de ce travail, je vous exprime toute ma reconnaissance.

Docteur **OGER Camille**, examinateur ; merci d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Un grand merci à **Muriel CERNY**, ma formatrice (CPG, HPLC-ELSD, SEC), sur ces instruments analytiques. Tu m'as été d'une aide précieuse.

Merci à **Éric LACROUX** (mon ami), pour l'aide dans la production des matières et le soutien tout au long de la rédaction des articles et de mon manuscrit de thèse.

Merci à **Romain VALENTIN**, pour l'aide dans l'étude des systèmes réactionnels et le soutien tout au long de la rédaction de mon manuscrit de thèse.

Un très grand merci à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle. Je remercie particulièrement **Mireille JUAN**, **Christina LABEJOF**, **Karine TREMAUVILLE**, **Didier DANGLA**, **Emmanuelle DAO**, **ARMENGAU**, et **Ingrid PELLETIER** pour l'aide administrative et pour l'approvisionnement en solvants et en réactifs.

Dédicaces et Remerciements

Ce projet de thèse a bénéficié des appuis financiers qui m'ont permis de mener à termes les travaux. J'exprime mes vifs remerciements :

- À campus France qui a mis à ma disposition une bourse doctorale pour la recherche sur une période de 15 mois
- Au ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour m'avoir accordé une bourse de 7 mois pour finir les travaux
- Au C2D (Contrat de Désendettement et du Développement) qui, à travers son programme AMRUGE I, m'a fait bénéficier d'une bourse doctorale pour mener à bien mes travaux de recherches.

Merci à vous Monsieur **DANAN Régis** pour votre aide financière précieuse, vos conseils avisés qui m'ont donné du courage dans les moments difficiles de cette thèse.

Merci à mes ami(e)s et collègues **YOH Toussaint, BITCHI Michel, DOUE Guy Blanchard, Camara Tchambaga, Koné Aboudramane, Anne Lyse, NEA Fatimata, DEGNY, TEKI Evans, Vincent ORIEZ, Sékou DIOMANDE, KIMOU claver.**

Merci à Monsieur et Madame **BROU Daniel** pour votre écoute, vos conseils et pour avoir toujours été là à chaque fois que j'ai eu besoin de vous.

Enfin, je remercie toute ma famille et mes proches qui ont toujours répondu présent, et ce, malgré la distance qui nous séparait.

Sommaire

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractérisation des amandes.....	16
Tableau 2: Caractéristiques physico-chimiques de l'huile.....	17
Tableau 3: Compilation des résultats de la littérature sur la composition chimique de l'huile de Ricinodendron heudelotii	19
Tableau 4: Caractéristiques chimiques des composants mineurs de l'huile	21
Tableau 5 : Profils acides gras et viscosité dynamique à 20°C des huiles polyinsaturées.....	41
Tableau 6: Comparaison du profil acides gras de l'huile brute avant et après hydrolyse.....	51
Tableau 7: Comparaison de la composition chimique des huiles avant et après hydrolyse	53
Tableau 8: Profils acides gras des deux matrices de concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et de concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifié par UV.....	55
Tableau 9: Les principales bandes d'absorption ATR-IRTF relevées des structures constituantes du concentrat d'acide gras libre huile brute et de la fraction intermédiaire composé de 82% d'acide β -éléostéarique.	59
Tableau 10: Composition en acides gras des concentrats utilisés dans les réactions d'estérification enzymatique.	71
Tableau 11: Temps de rétention des standards pour l'étalonnage	76
Tableau 12: Temps de rétention des esters et des acides gras.....	76
Tableau 13: Coefficients Méthode de Davies [64].	78
Tableau 14: Profil des groupes acyls des fractions de EPG-CLnA α E (di)	100
Tableau 15: Profil des groupes acyls des différentes fractions des monoacylglycérols-, diacylglycérols de EPG-CLnA α E (mono).....	102
Tableau 16: Profil des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols et diacylglycérols de EPG-CLnA β E (di)	103
Tableau 17: Profil des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols-, diacylglycérols de EPG-CLnA β E (mono).....	105
Tableau 18: Récapitulatifs des valeurs de tension de surface et de concentration micellaire critique des esters partiels de glycérol.	108
Tableau 19: Coefficients des groupes chimique du monoester de CLnA (C18 :3)	110
Tableau 20: Coefficients des groupes chimique du diester de CLnA (C18 :3).....	110
Tableau 21: Valeurs des Balances Lipophile Hydrophile des esters partiels de glycérol(s).....	111

Sommaire

Tableau 22: Résultat de la stabilité thermique des différents EPG-CLnA.....	112
Tableau 23: récapitulatif des températures de cristallisation, de fusion et des températures de transitions vitreuses	116
Tableau 24: Profil acides gras de l'huile brute des amandes de <i>Ricinodendron heudelotii</i> déterminé par CPG .	125
Tableau 25: Profil acide gras de l'huile brute modifiée déterminée par CPG	126
Tableau 26: Profil glycérique des EPG obtenus à partir du concentrat d'acide gras de l'huile brute déterminé par HPLC-ELSD	128
Tableau 27: Profil acides gras des fractions monoglycérides et diglycérides des EPG-CLnA obtenus à partir du concentrat d'acides gras de l'huile brute	129
Tableau 28: Profil glycérique de EPG obtenus à partir du concentrat d'acide gras de l'huile brute modifiée	130
Tableau 29: Profil acides gras des EPG obtenu à partir du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée .	131
Tableau 30: Les hauteurs moyennes de la dérivée seconde négative des étalons en fonction de la teneur en CLnA (acides α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique)	144
Tableau 31: Résumé du profil CLnA par analyse ATR-IRTF et par analyse CPG	146
Tableau 32: Profil acides gras des milieux réactionnels de CLnA- α E et de CLnA- β E à t=0h et t =9h.....	157
Tableau 33 : Comparaison de l'évolution de l'empreinte IR des CLnA au cours de la polymérisation de l'AGL- β E (42%)	160
Tableau 34 : Comparaison de l'évolution de l'empreinte des CLnA au cours de la polymérisation de l'EPG-CLnA α E (mono).....	171
Tableau 35 Comparaison de l'évolution de l'empreinte des CLnA au cours de la polymérisation de l'EPG-CLnA α E(Di)	174
Tableau 36: Paramètres cinétiques de la polymérisation de EPG-CLnA sous air.	179
Tableau 37: Pourcentages des extractibles et des non extractibles des polymères.....	180
Tableau 38: Répartition des masses moléculaires et concentration en macromolécule des polymères de EGP-CLnA β E obtenus sous atmosphère inerte à 70°C contenus dans les extractibles	183
Tableau 39 : Répartition des masses moléculaires et concentration en macromolécule des polymères de EGP-CLnA obtenus sous air à 70°C contenus dans les extractibles	183
Tableau 40 : Extractibles du polymère EPG- CLnA α E (monoglycérides).....	189
Tableau 41 : Extractibles du polymère EPG- CLnA α E (diglycérides).....	190
Tableau 42 : Extractibles du polymère EPG- CLnA β E (mono).....	191
Tableau 43 : Extractibles du polymère EPG- β E (di).....	192

Sommaire

Tableau 44: Constantes de vitesse de l'évolution de CLnA/AGS en fonction du temps de réaction	195
Tableau 45: Analyse DSC des polymères et des échantillons EPG.....	207

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Ricinodendron heudelotii (graines, amandes et coques)	9
Figure 2: Cartographie des localités visitées	15
Figure 3: Acides gras de la famille des CLnA	27
Figure 4: Schémas de biosynthèse de l'acide α -éléostéarique dans les graines de l'Aleurites fordii (tung) et de Momordica charantia de et l'acide punique dans les graines de Trichosanthes kirilowii et Punica granatum..	31
Figure 5: Schéma directeur des travaux réalisés sur l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique.....	33
Figure 6: Chromatogrammes des esters méthyliques d'acides gras de l'huile brute (A) et de l'huile brute modifiée au Sun test (B) de Ricinodendron heudelotii.	38
Figure 7: Huile brute (A), huile brute modifiée (B)	40
Figure 8 : Evolution des profils acides gras de l'huile brute modifiée par UV Sun Test	44
Figure 9 : Evolution des profils acides gras de l'huile brute modifiée par le soleil.....	45
Figure 10 : Suivi cinétique de l'hydrolyse (2h) de l'huile brute de Ricinodendron heudelotii	47
Figure 11: Suivi cinétique de l'hydrolyse de l'huile brute modifiée de Ricinodendron heudelotii.	48
Figure 12: Centrifugation du milieu réactionnel brut de l'huile brute modifiée par hydrolyse enzymatique.....	52
Figure 13 : Structures des acides α -éléostéarique et β -éléostéarique	56
Figure 14 : Spectre ATR-IR du concentrat d'acides gras après hydrolyse enzymatique de l'huile brute de Ricinodendron heudelotii.	57
Figure 15 : Spectre ATR-IRTF du concentrat acide gras libre composé de 82% d'acide β -éléostéarique obtenu après hydrolyse enzymatique de l'huile brute modifiée.....	58
Figure 16: Courbes d'étalonnage de AG (l'acide linoléique), MG (1 linoléoyl-rac glycérol), DG (1,3-Dilinoleoyl-rac -glycérol) et TG (Trilinoléine)	75
Figure 17: Courbes de l'évolution de la conversion des acides gras [Acide gras] et de la formation d'esters dans la réaction d'estérification des acides gras de l'huile brute dans un système sans solvant en présence de Novozyme 435.....	82
Figure 18: Courbes de l'évolution de la conversion des acides gras [Acide gras] et de la formation d'esters dans la réaction d'estérification des acides gras de l'huile brute modifiée dans un système sans solvant en présence de Novozyme 435.	82

Sommaire

Figure 19: Courbes de l'évolution de la conversion des acides gras [Acide gras] et de la formation d'esters dans la réaction d'estérification des acides gras de l'huile brute dans un système sans solvant en présence de LCC.....	83
Figure 20: Courbes de l'évolution de la conversion d'acides gras [Acide gras] et de la formation d'esters dans la réaction d'estérification d'acides gras de l'huile brute modifiée dans un système sans solvant en présence LCC.	83
Figure 21: Suivi cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute en présence de Novozyme 435.....	89
Figure 22: Suivi cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée en présence de Novozyme 435.	90
Figure 23: Suivi cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute par la lipase LCC	91
Figure 24: Suivi cinétique de l'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée par la lipase LCC	92
Figure 25: Suivi cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute en présence de Novozyme 435 dans du tert-butanol.....	94
Figure 26: Cinétique d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée en présence de Novozyme 435 dans du tert-butanol.....	95
Figure 27: Spectre UV-Vis d'esters partiels de glycérol de l'huile brute de <i>Ricinodendron heudelotii</i>	99
Figure 28: Suivi cinétique de la valeur à l'équilibre de la tension de surface en fonction de \ln (concentration) en ester partiel de glycérol. (EPG-1 (■), EPG-3 (◆), EPG-5 (▲), et EPG-7 (●)).	107
Figure 29: Etude de la stabilité thermique des esters partiels de glycérol (EPG) en fonction de leur teneur en monoglycérides polyinsaturés.....	113
Figure 30: Thermogrammes DSC d'esters partiels de glycérol, EPG 1 (□)] et EPG 7(●)]	115
Figure 31: Thermogrammes DSC de esters partiels de glycérol EPG 3 (⋈) et EPG 5(●)	115
Figure 32: Structures des acides gras des concentrats d'acides gras libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée des amandes de <i>Ricinodendron heudelotii</i>	127
Figure 33 : 1-monoglycéride d'acide α -éléostéarique, 2-monoglycéride d'acide α -éléostéarique, 1,3-diglycéride d'acide α -éléostéarique et 1,2-diglycéride d'acide α -éléostéarique.....	132
Figure 34 : 1-monoglycéride C _{Ln} A- β E, 2-monoglycéride C _{Ln} A- β E , 1,3-diglycérides C _{Ln} A- β E et 1,2-diglycéride C _{Ln} A- β E	132
Figure 35: 1-monoglycéride d'acide catalpique, 2-monoglycéride d'acide catalpique, 1,3-diglycéride d'acide catalpique et 1,2-diglycéride d'acide catalpique.....	133
Figure 36: Spectre ATR-IRTF du concentrat C _{Ln} A- libres à 42% d'acide β -éléostéarique.....	137

Sommaire

Figure 37: Spectre ATR-IRTF de EPG-CLnA β E (EPG5).....	138
Figure 38: Spectre ATR-IRTF, la dérivée seconde négative de EPG-CLnA β E (EPG5)	140
Figure 39: Spectre ATR-IRTF, la dérivée seconde négative de CLnA-libres β E (42%).....	140
Figure 40: La courbe de régression de la hauteur de la dérivée seconde négative en fonction de la teneur en CLnA dans les échantillons	145
Figure 41: Evolution de la viscosité des substrats CLnA-libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée au cours de leur polymérisation sous atmosphère inerte à 70°C.....	147
Figure 42: Evolution de la viscosité du concentrat de CLnA- α E libres de l'huile brute au cours de la polymérisation sous air à 70°C.....	148
Figure 43: Evolution de la viscosité du concentrat de CLnA- β E libres de l'huile brute modifiée au cours de la polymérisation sous air à 70°C.....	149
Figure 44 : Evolution de la viscosité des esters partiels de glycérol (EPG1 et EPG7) des acides gras de l'huile brute au cours de leur polymérisation sous atmosphère inerte à 70°C.....	150
Figure 45: Evolution de la viscosité de EPG5 : EPG-CLnA- β E (mono) de l'huile brute modifiée au cours de la polymérisation sous atmosphère inerte à 70°C.....	151
Figure 46: Evolution de la viscosité de EPG3:EPG-CLnA- β E (di) au cours de la polymérisation sous atmosphère inerte à 70°C.....	152
Figure 47: Evolution de la viscosité de EPG7 : EPG- CLnA- α E (mono) et EPG5 : EPG- CLnA- β E (mono) au cours de la polymérisation sous air à 70°C.....	153
Figure 48 : Spectre ATR-IRTF de CLnA- β E (42%) à t=0h.....	155
Figure 49 : Spectre ATR-IRTF du milieu réaction à t9 h de polymérisation de CLnA- β E (42%) - sous atmosphère inerte à 70°C.....	155
Figure 50 : Suivi cinétique de l'évolution de la hauteur de la dérivée seconde de la bande à 986 cm ⁻¹ au cours de la réaction à 70°C sous azote des CLnA-libres	156
Figure 51 : Spectre ATR-IRTF de l'échantillon CLnA- β E (42%) à t ₀	158
Figure 52 : Spectre ATR-IRTF du milieu réaction à t =9 heures de polymérisation de l'échantillon CLnA- β E (42%) sous air.....	159
Figure 53 : Suivi de l'évolution de la hauteur de la dérivée seconde à 986 cm ⁻¹ au cours de la polymérisation de CLnA- β E (42%) et de CLnA- α E (60%) sous air (1,2L/mn) à 70°C.....	161
Figure 54: Evolution de la [CLnA- α E (60%)] dans la réaction de polymérisation sous air à 70°C.....	163
Figure 55 : Évolution du ln (Absorbance CLnA- β E (42%)) au cours de la réaction de polymérisation sous air à 70°C.....	164

Sommaire

Figure 56: Suivi de l'évolution de la hauteur de la dérivée seconde à 986 cm^{-1} au cours de la polymérisation de l'EPG sous azote	165
Figure 57: Évolution du \ln (Absorbance EPG-CLnA) au cours de la réaction de polymérisation entre 5 et 9 heures sous azote	166
Figure 58 : Evolution de la viscosité du milieu réactionnel à 25°C à $t=0$ et après 9 heures de réaction.....	168
Figure 59: Spectre ATR-IRTF de EPG-CLnA $\alpha\text{E}(\text{mono})$ à (t_0).....	169
Figure 60: Spectre ATR-IRTF du milieu réactionnel après 3 h de réaction d'EPG-CLnA $\alpha\text{E}(\text{mono})$ à 70°C sous air à un débit de $1,2\text{L}/\text{min}$	170
Figure 61 : Spectre ATR-IRTF de la matrice EPG- $\alpha\text{E}(\text{di})$ à (t_0).....	172
Figure 62 : Spectre ATR-IRTF du milieu réactionnel après 4 h de réaction d'EPG- $\alpha\text{E}(\text{Di})$ à 70°C sous air à un débit de $1,2\text{L}/\text{min}$	173
Figure 63: Suivi cinétique de l'évolution de la dérivée seconde en ATR-IRTF de l'empreinte des CLnA pour les différents EPG-CLnA à 70°C sous air ($1,2\text{L}/\text{min}$)	176
Figure 64: Évolution de la dérivée seconde d'EPG-CLnA $\alpha\text{E}(\text{mono ou di})$ au cours de la réaction de polymérisation sous air	177
Figure 65: Évolution de \ln (Dérivée seconde d'EPG-CLnA $\beta\text{E}(\text{mono ou di})$) au cours de la réaction de polymérisation sous air	178
Figure 66: Chromatogramme CPG de poly EPG-CLnA $\alpha\text{E}(\text{di})$	182
Figure 67: Evolution du rapport CLnA/AGS dans les extractibles en fonction du temps de réaction	194
Figure 68 : Polymère de β -éléostéarique dans EPG-CLnA $\beta\text{E}(1,3\text{-di})$	200

Liste des schémas

Schéma 1 : Isomérisation par réarrangement de l'acide β -éléostéarique dans l'huile brute	61
Schéma 2 : Mécanismes de modification structurale de l'acide α -éléostéarique dans le concentrat d'acide gras de l'huile brute modifiée	62
Schéma 3. Illustration de la réaction d'estérification des CLnA en 2-EPG-CLnA par la lipase <i>Candida rugosa</i> (LCC).....	85
Schéma 4 : Mécanisme de polymérisation β -éléostéarique dans EPG-CLnA $\beta\text{E}(\text{mono})$	199
Schéma 5 : Initiation de l'acide β -éléostéarique	205
Schéma 6 : Propagation de la réaction de polymérisation de CLnA- βE	206

Sommaire

Table des matières

TABLE DES MATIERES	
DEDICACES ET REMERCIEMENTS	I
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES SCHÉMAS	XII
TABLE DES MATIÈRES	XIII
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : AMANDES, HUILE BRUTE ET HUILE BRUTE MODIFIEE DES GRAINES RICINODENDRON HEUDELOTII.	5
1. MATERIEL ET METHODES	8
1.1. Matériel.....	8
1.2. Méthodes d'isolement des graines.....	8
1.2.1. Traitement thermique traditionnelle.....	8
1.2.2. Décorticage mécanique manuel.....	9
1.3. Expression d'huile de l'amande de ricinodendron heudelotii.....	10
1.3.1. Extraction des lipides au Soxhlet.....	10
1.3.2. Extraction à froid au cyclohexane.....	10
1.4. Caractérisation physico-chimique des amandes par la méthode ADF-NDF.....	11
1.5. Détermination de la teneur en protéines.....	11
1.6. Détermination des indices normés des huiles.....	12
1.7. Détermination du profil en acides gras par CPG.....	12
1.8. Détermination de la teneur en tocophérols par HPLC.....	12
1.9. Détermination de la teneur en stérols par CPG.....	13
2. RESULTATS ET DISCUSSIONS	14
2.1. Cartographie du ricinodendron heudelotii en COTE D'IVOIRE.....	14
2.2. Composition des amandes de ricinodendron heudelotii.....	15
2.3. Caractérisation physico-chimique de l'huile de ricinodendron heudelotii.....	17
2.4. Profil acides gras des huiles.....	18
2.5. Caractérisation des constituants mineurs des huiles de ricinodendron heudelotii.....	21
CHAPITRE 2 : ISOMERISATION DE L'ACIDE α-ELEOSTEARIQUE DE L'HUILE DE RICINODENDRON HEUDELOTII	25
1. Plateforme oleo chimique des plantes a graines riches en acides gras CLnA.....	26
1.1. Utilisation des CLnA.....	26

Sommaire

1.2. Production des CLnA par voie de biosynthèse.....	29
1.2.1. Voie chimique.....	32
1.2.2. Voie photochimique.....	32
2. Travaux réalisés.....	33
2.1. Isomérisation en cascade par couplage des UV et de l'hydrolyse enzymatique de l'huile brute de ricinodendron heudelotii.....	34
2.1.1. Traitement aux sun Test.....	34
2.1.2. Isomérisation par les rayons du soleil.....	35
2.2. Libération des acides gras natifs de l'huile par hydrolyse enzymatique.....	35
2.2.1. Profils d'esters partiels de glycérol et de triglycérides par HPSEC-ELSD.....	36
2.2.2. Profils acides gras des huiles et des concentrats d'acides gras libres.....	36
2.2.3. Caractérisation par analyse ATR-IRTF.....	37
2.2.4. Viscosité dynamique des matrices huiles.....	37
3. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	37
3.1. Etude de l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique dans des huiles.....	37
3.2. Suivi de l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique par chromatographie en phase gazeuse dans les triglycérides de l'huile de ricinodendron heudelotii.....	37
3.2.1. Aspect des huiles avant et après exposition aux rayons uv (cas du sun Test).....	40
3.2.2. L'isomérisation de l'acide α -éléostéarique en masse.....	43
3.3. Etude de l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique dans les concentrats d'acides gras libres.....	46
3.3.1. Production d'acides gras libres par hydrolyse enzymatique.....	46
3.3.2. Production des concentrats d'acides gras libres.....	49
3.3.3. Traitement de l'hydrolysate de la matrice huile brute.....	50
3.3.4. Séparation de l'hydrolysat de l'huile brute modifiée.....	51
3.3.5. Etude de l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique des acides gras libres de l'huile brute.....	54
3.3.6. Caractérisation chimique des concentrats en acides gras libres par ATR-IRTF.....	56
3.4. Mécanisme d'isomérisation et/ou de réarrangement de l'acide α -éléostéarique dans les structures de triglycérides.....	61
CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE DE MONO ET DIGLYCÉRIDE A CHAINES CARBONÉES COMPOSÉES DE CLnA (ACIDE α-ELEOSTEARIQUE, ACIDE β- ELEOSTEARIQUE ET ACIDE CATALPIQUE) ISSUS DE L'HUILE DE RICINODENDRON HEUDELOTII.....	66
1. MATERIEL ET METHODES.....	70
1.1. Matériel.....	70
1.1.1. Lipase candida rugosa (Lypolyve CC).....	70
1.1.2. Lipase novozyme 435.....	70

Sommaire

<i>1.1.3. Concentrats d'acides gras libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée de ricinodendron heudelotii</i>	70
<i>1.2. Méthodes</i>	72
<i>1.2.1. Procédé de synthèse enzymatique des esters partiels de glycérol</i>	72
<i>1.2.1.1. Estérification en milieu sans solvant</i>	72
<i>1.2.1.2. Estérification en milieu solvanté</i>	72
<i>1.2.2. Profil d'esters partiels de glycérol et de triglycérides par HPSEC-ELSD</i>	73
<i>1.2.2.1. Etalonnage de HPLSEC-ELSD</i>	74
<i>1.2.2.2. Préparation des solutions étalons</i>	74
<i>1.2.2.3. Courbe l'étalonnage</i>	75
<i>1.2.2.4. Exemple d'analyse de suivi de la réaction d'estérification de concentrats d'acides gras de l'huile modifiée</i>	76
<i>1.2.2.5. Etudes des epg par tensiomètre à goutte automatisé</i>	77
<i>1.2.2.6. Méthodes de détermination de la balance hydrophile-lipophile (HLB)</i>	77
<i>1.2.2.7. Caractérisation par analyse thermogravimétrique (ATG)</i>	79
<i>1.2.2.8. Caractérisation par calorimétrie différentielle à balayage</i>	80
2. RESULTATS ET DISCUSSIONS	81
<i>2.1. Degré d'avancement de la réaction d'estérification des acides gras pendant les réactions d'estérification</i>	81
<i>2.2.1. Evolution des teneurs des acides gras libres et des esters formés au cours des différentes réactions d'estérification</i>	81
<i>2.2.2. Degré d'avancement de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute par la lipase LCC (candida rugosa)</i>	85
<i>2.2.3. Degré d'avancement de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée par la lipase LCC (candida rugosa)</i>	86
<i>2.2.4. Degré d'avancement des réactions d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute en présence de la lipase novozyme 435</i>	86
<i>2.2.5. Degré d'avancement de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée en présence de novozyme 435</i>	87
<i>2.2. Le profil glycérique des milieux réactionnels des réactions d'estérifications enzymatiques sans solvant</i>	89
<i>2.2.1. Teneur en monoglycérides et diglycérides au cours de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute en présence de novozyme 435 dans un milieu sans solvant</i>	89
<i>2.2.2. Teneur en monoglycérides et diglycérides au cours de l'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée avec novozyme 435 dans un milieu sans solvant</i>	90
<i>2.2.3. Teneur en monoglycérides et diglycérides au cours de l'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute par LCC dans un milieu sans solvant</i>	91

Sommaire

2.2.4. Teneur en monoglycérides et diglycérides au cours de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée par LCC dans un milieu sans solvant.....	92
2.3. Profil glycérique des milieux réactionnels des réactions d'estérifications enzymatiques dans du tert-butanol.....	93
2.3.1. Teneurs en monoglycérides diglycérides au cours de réactions d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute par novozyme 435 dans du tert-butanol.....	93
2.3.2. Teneurs en monoglycérides et diglycérides au cours de l'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée en présence de novozyme 435 dans du tert-butanol.....	95
2.4. Analyse des monoglycérides diglycérides des clna par chromatographie préparative sur plaque de silice et identification des groupes acyls des chaînes carbonées des monoglycérides et diglycérides par CPG/DIF.....	96
2.4.1. Problématique :.....	96
2.4.2. Composition des monoglycérides- diglycérides dans les esters partiels de CLnA.....	97
2.4.3. Profil des groupes acyls des différentes fractions des mono-diacylglycériques de EPG-CLnA α E (di)	100
2.4.4. Profil des groupes acyls des différentes fractions des monoacylglycérols, diacylglycérols de EPG-CLnA α E (mono)	101
2.4.5. Profil des groupes acyls des différentes fractions des monoacylglycérols-, diacylglycérols de EPG-CLnA β E (di)	103
2.4.6. Profil des groupes acyls des différentes fractions des monoacylglycérols-, diacylglycérols de EPG-CLnA β E (mono).....	104
2.5. Concentration micellaire critique et tension de surface	106
2.6. Détermination de la HLB (balance lipophile hydrophile) des EPG.....	109
2.7. Analyses des propriétés physiques des esters partiels.....	112
2.7.1. Caractérisation physique des epg par thermogravimétrie (ATG).....	112
2.7.2. Stabilité thermique en fonction de la teneur en monoglycérides.....	113
2.7.3. Caractérisation physique des epg-clna par DSC	114
2.8. utilisation des esters partiels des glycérol (EPG)	118
CHAPITRE 4 : POLYMERISATION EN MASSE DES CLnA ET DES EPG-CLnA (α OU β)E A CHAINES CARBONEES COMPOSES D'ACIDE α-ELEOSTEARIQUE, D'ACIDE β-ELEOSTEARIQUE ET D'ACIDE CATALPIQUE ISSUS DE L'HUILE DE RICINODENDRON HEUDELOTII.....	122
1. MATERIELS ET METHODES.....	125
1.1. Matériels.....	125
1.1.1. l'huile brute	125
1.1.2. l'huile brute modifiée	126
1.1.3. concentrats d'acides gras libre de l'huile brute (CLnA- α E).....	127
1.1.4. concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée (CLnA- β E)	127

Sommaire

1.1.5. Esters partiels du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute.....	128
1.1.6. Esters partiels du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée.....	130
1.2. Méthodes de polymérisation.....	133
1.2.1. Méthodes de polymérisation sous atmosphère inerte.....	134
1.2.1.1. Protocole de polymérisation sur le plateau du rhéomètre sous atmosphère inerte	134
1.2.1.2. Protocole en réacteur batch agité sous atmosphère inerte	134
1.2.2. Méthodes de polymérisation sous air.....	135
1.2.2.1. Protocole in situ sur le plateau du rhéomètre sous air	135
1.2.2.2. Méthodes de polymérisation en masse en réacteur batch agité	135
1.3. Caractérisation des polymères.....	135
1.3.1. La viscosité des polymères	135
1.3.2. Caractérisation des polymères par spectroscopie ATR-IRTF.....	136
1.3.2.1. Acquisition des spectres infrarouges par ATR-IRTF	136
1.3.2.2. Suivi cinétique de la polymérisation par analyse ATR-IRTF.....	136
1.3.2.3. Les empreintes des CLnA dans les CLnA-libres et EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β).....	136
1.3.2.4. Méthodes de la hauteur de dérivée seconde de CLnA-libres ou de EPG-CLnA βE (EPG5) ..	139
1.3.2.5. Etalonnage des clna-libres et des EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) par la méthode ATR-IRTF	141
1.3.3. Analyse des extractibles des polymères par CPG et ATR-IRTF	142
1.3.4. Chromatographie d'exclusion stérique	142
1.3.5. Analyse thermique par calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	143
2. RESULTATS ET DISCUSSIONS	144
2.1. Estimation de la teneur en clna libres (acide α -éléostéarique, β -éléostéarique et acide catalpique) la méthode ATR-IRTF et par analyse CPG.....	144
2.2. Suivi cinétique des réactions de polymérisation par rhéologie.....	146
2.2.1. Polymérisation des CLnA-libres ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) de l'huile brute et de l'huile brute modifiée. .	147
2.2.1.1. Suivi cinétique de la polymérisation des CLnA-libres ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) sous atmosphère inerte par rhéomètre.....	147
2.2.1.2. Suivi cinétique des réactions de polymérisation des CLnA-libres ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) sous air. ...	148
2.2.2. Polymérisation des esters partiels de l'huile brute et de l'huile brute modifiée (EPG-CLnA- ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β))	150
2.2.2.1. Suivi cinétique de la polymérisation des esters partiels de glycérol de l'huile brute, EPG-CLnA- αE (mono) et EPG-CLnA- αE (di) sous atmosphère inerte.	150
2.2.2.2. Suivi cinétique de polymérisation de EPG- CLnA- βE (mono) et de EPG- CLnA- βE (di) sous atmosphère inerte.	150
2.2.2.3. Suivi cinétique de la polymérisation de EPG-CLnA- βE (mono) et de EPG- CLnA- βE (di) sous air	152

Sommaire

2.3. polymérisation en masse des CLnA- ΔE libres ($\Delta=\alpha$ ou β) et EPG-CLnA ΔE ($\Delta=\alpha$ ou β) en réacteur batch agité.....	154
2.3.1.Essai de polymérisation sous atmosphère inerte des CLnA βE (42%) et CLnA- αE (60%).....	154
2.3.2.Essai de polymérisation sous air des CLnA βE (42%) et CLnA- αE (60%).....	158
2.3.3.Détermination des paramètres cinétiques de la polymérisation de CLnA- αE (60%) sous air à 70°C.....	162
2.3.4.Détermination des paramètres cinétiques de la polymérisation de CLnA- βE (42%) sous air à 70°C.....	163
2.3.5.Essai de polymérisation des EPG-CLnA sous atmosphère inerte.....	165
2.3.6.Essai de polymérisation des EPG-CLnA sous air.....	167
2.3.6.1.Etude de la viscosité du milieu réactionnel.....	167
2.3.6.2.Les spectres atr-irtf de l'échantillon EPG-CLnA αE (mono).....	169
2.3.6.3.Suivi cinétique de la polymérisation des EPG par ATR-IRTF.....	176
2.3.7.Analyse des composés non extractibles des milieux réactionnels (matière solide).....	180
2.3.8.La masse moléculaire et la concentration macromolécule dans les extractibles des polymères.....	181
2.3.9.Analyse des extractibles des milieux réactionnels.....	187
2.4.Mécanismes de polymérisation.....	195
2.4.1.Polymérisation sous atmosphère inerte.....	197
2.4.2.Polymérisation sous air des CLnA-libres et des EPG-CLnA ΔE ($\Delta= \alpha$ ou β).....	204
2.5.Analyses thermiques DSC.....	207
conclusion partielle	209
CONCLUSIONS GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	212
REFERENCE BIBLIOGRAPHIE	216

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

La chimie des composés biosourcés contribue largement à réduire la dépendance des industriels vis-à-vis des ressources fossiles. Parmi ceux-ci, les acides gras libres, les esters partiels de glycérol, et les triglycérides, composés majoritaires des huiles végétales, occupent une part importante dans l'industrie alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, des polymères, des biocarburants et des Bâtiments et Travaux Publics (BTP).

Les biomasses lipidiques constituées de triglycérides à acides gras mono et /ou polyinsaturés telles que les huiles de soja, de colza, de lin et de tung sont de plus en plus utilisées pour mettre au point des produits de substitution des polymères synthétiques par des polymères biodégradables [1,2]. Ces biopolymères sont aujourd'hui très largement utilisés comme produits de base dans la formulation de nouveaux produits tels que les biofertilisants, les produits cosmétiques par dispersions stables de particules de ces polymères. Les masses molaires généralement élevées de ces polymères confèrent aux produits des propriétés uniques adaptées à des applications variées dans divers domaines.

La biodisponibilité des acides gras mono et /ou polyinsaturés dans les amandes des plantes oléoprotéagineuses est la clé de la production et de la transformation des triglycérides.

Trois raisons essentielles nous ont guidés dans le choix de l'huile des amandes de *Ricinodendron heudelotii* pour ce projet de thèse:

➤ Premièrement, cette plante est disponible sur toute la zone intertropicale partant du Sénégal à Madagascar. En Côte d'Ivoire, elle est présente dans la quasi-totalité des régions. De ce fait, sa domestication et sa vulgarisation comme culture de rente seront facilement tolérées. Cette tolérance constitue un avantage certain pour la dissémination des résultats finaux issus de nos travaux.

➤ Deuxièmement, le *Ricinodendron heudelotii* est toléré par les planteurs comme arbre de couverture dans les plantations de cacaoyers. L'idée est venue d'utiliser les produits des amandes de *Ricinodendron heudelotii* notamment les esters partiels de glycérol de l'huile et/ou leurs biopolymères dans la protection, la bio-fertilisation et la nutrition de la culture de cacaoyers et de l'igname.

Introduction

C'est sur ces hypothèses de travail que ces travaux ont été soutenus par le programme AMURGE I à l'issue de l'appel à projet 2013. Signalons tout de suite que cette partie des travaux n'a pas été réalisée par manque de partenaires motivés en Côte-d'Ivoire dans la mise en œuvre des essais techniques et itinéraires cultureux *in vitro* ou *in vivo* au bénéfice de ces deux cultures de rente et vivrière du pays.

➤ Troisièmement, cette huile est riche en CLnA, l'acide α -éléostéarique C18:3 à 60%, donc homologue à l'huile de tung (*Aleurites fordii*) connue comme substrat de choix dans la fabrication de peintures, de vernis, de revêtements, de laques, etc [3]

La similarité de la composition en acides gras de l'huile de tung et de celle de *Ricinodendron heudelotii* et les travaux de valorisation de cette dernière nous ont confortés dans le choix de mener des recherches sur la transformation des triglycérides de l'huile des amandes de *Ricinodendron heudelotii*. Ces transformations chimiques font l'objet de la présente thèse.

Ces transformations de synthèse se feront par des techniques d'isomérisation de l'acide α -éléostéarique des triglycérides, d'hydrolyse enzymatique des triglycérides, d'estérification enzymatique des acides gras et polymérisation en masse des acides gras libres et des esters partiels de glycérol (EPG) de l'huile des amandes de *Ricinodendron heudelotii*. Les différentes stratégies sont présentées dans les chapitres suivants :

Le premier chapitre rappelle tout d'abord les généralités sur le *Ricinodendron heudelotii*. Cette partie traite de la biodisponibilité du *Ricinodendron heudelotii*, de la technique d'isolement des amandes par la méthode traditionnelle, de la place de ces amandes sur le marché africain, en particulier en Côte d'Ivoire et enfin l'utilisation alimentaire et non alimentaire de ces amandes. La deuxième partie de ce chapitre sera consacrée à la caractérisation chimique et physico-chimique des amandes et huiles des amandes de *Ricinodendron heudelotii*. Une place particulière est accordée aux travaux sur l'isomérisation des acides linoléiques conjugués CLnA et leur enrichissement dans les différents substrats lipochimiques (huile native, huile traitée, concentrats d'acides gras libres, esters partiels de glycérol de CLnA).

Introduction

Le second chapitre présente les différentes modifications chimiques, thermiques et photochimiques subies par les CLnA dans les triglycérides et dans les acides gras libres de l'huile de *ricinodendron heudelotii*. Les acides gras libres sont obtenus par hydrolyse enzymatique avec la lipase LCC. Cette étude s'est avérée très importante, car elle a permis d'imposer la stratégie de recherche, à travers le choix des futures réactions. Elle a donc permis d'opter pour des conditions opératoires par voie enzymatique et à basse température, en vue de l'obtention de produits contrôlés sans la modification et la destruction de la matière végétale. Ces transformations chimiques feront l'objet d'étude dans le chapitre 3.

Dans ce chapitre en effet, nous étudions des procédés de synthèse (estérification enzymatique) et établissons des méthodes d'analyse et de caractérisation des esters partiels de CLnA. Ces protocoles permettront d'obtenir des mélanges réactionnels avec différentes compositions en monoglycérides et en diglycérides à chaînes carbonées formées principalement d'acides gras polyinsaturés.

Enfin le chapitre quatrième est consacré à la synthèse des biopolymères par polymérisation en masse à partir des acides gras libres et esters partiels de glycérol à chaînes carbonées riches en CLnA, sous atmosphère inerte en présence d'azote ou sous oxygène de l'air. La caractérisation des biopolymères, en particulier, la détermination des caractéristiques physiques, des paramètres cinétiques et des propriétés thermiques contribue à établir des relations structure réactivité et à comprendre les mécanismes de formation de ces biopolymères.

Enfin, nous présentons la conclusion générale et les perspectives.

CHAPITRE 1 :
AMANDES, HUILE BRUTE ET HUILE BRUTE MODIFIEE
DES GRAINES *RICINODENDRON HEUDELOTII*.

Introduction

Le *Ricinodendron* ou *Jatropha heudelotii* est un arbre qui fait partie de la famille de Euphorbiaceae. Il est connu sous les noms vernaculaires communs Djansan au Cameroun, Akpi en Côte-d'Ivoire, et Wama au Ghana. Cet arbre atteint près d'une trentaine de mètres de hauteur avec des fruits en forme de drupes à l'intérieur desquels se trouvent aux maximums quatre graines. Il pousse dans les zones tropicales humides. Sur le continent africain, son aire de répartition part du Sénégal jusqu'au Kenya. Les fruits de *Ricinodendron heudelotii* arrivent à maturité dans la période de juin à septembre. Leur collecte est réalisée par ramassage périodique sous les arbres par des femmes.

Depuis la Conférence des Nations-Unies sur l'Environnement et le Développement (CNUED) tenue à Rio en 1992, l'importance écologique et socio-économique des Produits Forestiers Non Ligneux (PFNL) est reconnue dans l'aménagement des écosystèmes forestiers. Récemment, au Cameroun, un modèle économique et social sur les PFLN a été mis en place pour structurer les filières de PFNL dont la filière *Ricinodendron heudelotii* choisie pour ses propriétés lipidiques, son importance culturelle, son intérêt alimentaire et son potentiel de rentabilité [4].

Des fruits, on obtient des graines que l'on ébouillante pour en extraire des amandes utilisées comme condiments aromatisants dans la cuisine traditionnelle. L'huile a une saveur agréable. Elle est très prisée dans l'alimentation. En Côte-d'Ivoire, depuis quelques années, le *Ricinodendron heudelotii* est utilisé par le Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) au sein d'un système d'agroforesterie dans les plantations cacaoyères, ainsi qu'à travers des champs expérimentaux dans le but d'une domestication de cette plante.

Ceci pour deux raisons essentielles : premièrement, pour ses fruits dont les amandes, riches en huile, sont vendues sur la plupart des marchés de l'Afrique de l'Ouest pour être utilisées comme assaisonnement et épaississants dans divers mets africains [5]. Deuxièmement, le *Ricinodendron heudelotii* est accepté par les planteurs ivoiriens comme arbre de couverture dans les plantations de cacaoyers.

Chapitre I

Le *Ricinodendron heudelotii* a fait l'objet de plusieurs études scientifiques au cours des années antérieures. Des études réalisées sur les amandes issues du fruit montrent qu'elles ont une teneur en huile variant de 42 à 60 % selon la technique d'extraction [6].

C'est donc une plante oléagineuse qui constitue une ressource naturelle, potentiellement importante en raison de la teneur élevée en huile de ces graines. Selon les études réalisées par César Kapseu *et al.*, (1995) et confirmées par Tchiégang *et al.*, (1996), l'huile des amandes isolées par le traitement thermique traditionnel contient deux acides gras majeurs : l'acide α -éléostéarique (51%) et l'acide linoléique (28%) [7] [8].

En revanche, les études de Yeboah *et al.*, (2011) sur l'huile des amandes isolées dans les mêmes conditions montrent que l'acide linoléique (58,7%) est majoritaire [9]. Quant aux travaux de Leudeu *et al.*, 2009 sur de l'huile des amandes isolées par traitement thermique traditionnel, l'acide gras majoritaire est toujours l'acide linoléique mais avec une teneur moindre de 36% [10]. Par contre, pour Sompila *et al.*, (2014), l'acide gras majoritaire de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* est l'acide α -éléostéarique avec une teneur de 35% [11].

La variabilité de profils en acides gras des huiles d'amandes isolées selon le traitement thermique traditionnel est due à certains facteurs tels que la chaleur, l'humidité, les rayons ultraviolets. Le temps et les conditions de conservation peuvent également changer la composition chimique de ces huiles.

Outre la structuration des filières, l'étude menée au Cameroun par Roques *et al.*, (2019) montre qu'il faut construire une expertise autour des produits et des procédés de transformation pour cibler et optimiser les paramètres susceptibles d'influencer la qualité des produits notamment les facteurs d'oxydation auxquels l'huile de *Ricinodendron heudelotii* est très sensible par sa haute siccativité caractérisée par sa valeur la plus élevée de l'échelle à 195.

L'acide α -éléostéarique est un acide gras à dix-huit atomes de carbone porteur de trois doubles liaisons conjuguées C18:3 n-5 (9c, 11t, 13t), avec des propriétés physico-chimiques suivantes : poids moléculaire 278,42 g/mol, température de fusion 49°C, point d'ébullition 235/12 (C/MM Hg), densité 0,902 (g/ mL à 50°C), indice d'iode 274. Cet acide gras et ses isomères, acide punique, acide catalpique, acide β -éléostéarique et l'acide jacarique sont bénéfiques pour la santé humaine.

Chapitre I

En effet, des études ont montré que ces acides gras polyinsaturés conjugués sont des molécules bioactives pouvant être utilisées en tant que compléments alimentaires dans le traitement des maladies telles que l'obésité, le cancer et le diabète [12,13].

Le travail présenté ici est une étude comparative de caractérisation des propriétés chimiques (teneurs en huiles, profils acides gras, composés mineurs, teneur en protéines) et physico-chimiques (viscosité dynamique, indice d'iode, indice d'acide) des huiles et des amandes obtenues par le traitement thermique traditionnel et isolées par décorticage mécanique manuel. Parallèlement à cette étude comparative, nous avons mené une prospection pour obtenir des données fiables sur la localisation et la production d'amande de *Ricinodendron heudelotii* dans 23 régions de la Côte d'Ivoire.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel

Les graines de *Ricinodendron heudelotii* utilisées dans ces travaux proviennent de la région du Marahoué (ville de Sinfra) en Côte d'Ivoire, pays situé en Afrique de l'Ouest. La collecte des fruits a été réalisée au cours du mois d'août 2014 sous les arbres (6°36'29.4"N 6°01'18.2"W). Les graines ont été retirées de la pulpe à la main et séchées sous un abri d'habitat ventilé pendant 5 jours. Ces graines sont ensuite conservées au congélateur à +4°C dans des sacs en vrac pour aliments avant leur transport en France au laboratoire de chimie agro-industrielle (LCA), à Toulouse. Elles ont été maintenues dans une chambre froide à +4°C.

1.2. Méthodes d'isolement des graines

Deux méthodes d'isolement des amandes ont été utilisées au cours des travaux. Il s'agit du traitement thermique traditionnel réalisé sous un abri d'habitat ventilé et le décorticage mécanique manuel réalisé au laboratoire (LCA).

1.2.1. Traitement thermique traditionnel

Les graines de *Ricinodendron heudelotii* sont formées d'une coque dans laquelle on trouve une amande (Figure 1).

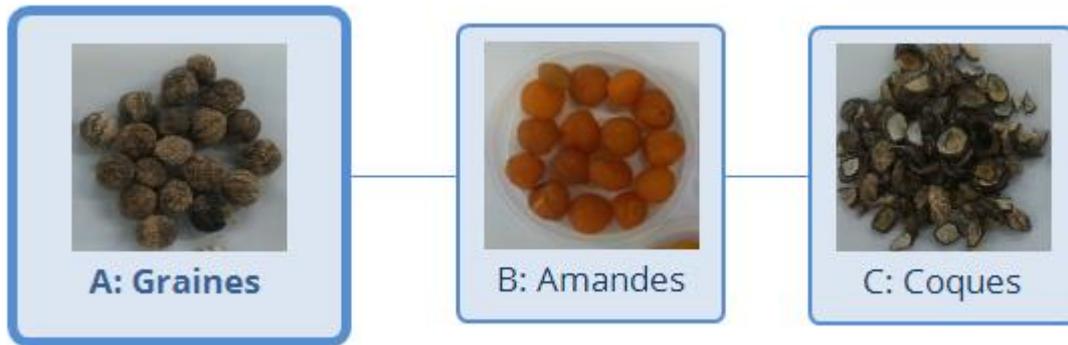


Figure 1: *Ricinodendron heudelotii* (graines, amandes et coques)

Pour libérer cette amande, la technique la plus utilisée est le traitement thermique traditionnel. Celui-ci est réalisé selon trois étapes. Le trempage qui consiste à laisser immerger dans une cuvette ronde en inox de 20 litres, 5 kilogrammes de graines dans de l'eau à température ambiante pendant 24 heures.

La cuisson apporte la chaleur nécessaire pour ébouillanter les graines et fissurer la coque. Elle se réalise dans de l'eau en ébullition chauffée au feu de bois pendant 12 heures. Enfin, la libération des amandes est effectuée à l'aide d'un clou ou un petit couteau. Ainsi, les graines sont décortiquées, puis les amandes sont séchées au soleil environ 10 jours avant stockage au congélateur à +4°C dans des sacs en vrac pour aliments.

1.2.2. Décorticage mécanique manuel

Cette technique consiste à libérer les amandes des graines sans traitement préalable. Les graines (**Figure 1**) des fruits de *Ricinodendron heudelotii* sont directement décortiquées à la main une à une.

La graine est placée dans l'écartement prévu du casse noix « pinces ». Les deux bras de la pince sont serrés en jugeant la pression émise sur la graine, afin de la briser sans émettre l'amande à l'intérieur. L'amande est ensuite isolée des coques avec une petite spatule en inox.

Chapitre I

1.3. Expression d'huile de l'amande de *ricinodendron heudelotii*

Selon les besoins et la qualité d'huile désirée pour les différentes analyses, nous avons effectué deux méthodes d'extraction. L'extraction de lipides avec solvant au Soxhlet pour mesurer la teneur en huile et l'extraction à froid des lipides au cyclohexane qui servira à la caractérisation chimique et physico-chimique. Les différentes extractions des lipides faites avec le solvant ont été répétées au moins trois fois avec la même matière sèche.

1.3.1. Extraction des lipides au Soxhlet

Les amandes sont broyées à l'aide d'un broyeur à couteau. Une masse de 15 g de ce broyat est mise dans la cartouche d'extraction et placée dans le Soxhlet. A l'aide de 150 mL de cyclohexane contenu dans un ballon de 200 mL, on épuise la matière grasse contenue dans le broyat par chauffage à reflux du solvant (environ 80°C) pendant 6 heures.

L'huile est obtenue après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif à 40°C sous vide. Le taux d'extraction de l'huile est ensuite déterminé par rapport à la masse de broyat.

1.3.2. Extraction à froid au cyclohexane

Une masse de 2,5 g d'amandes broyées à l'aide d'un broyeur à couteau est placée dans un tube à centrifuger de 30 mL avec 25 mL de cyclohexane. Les tubes sont agités 30 secondes au vortex et ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 10000 g. Après décantation de la solution, la phase organique (matière grasse) est récupérée. Le processus est répété deux fois.

L'ensemble des phases organiques est rassemblé et filtré à l'aide d'un système de filtration constitué d'un entonnoir en verre muni d'un filtre en papier de verre dans lequel on a déposé quelques grammes de sulfate de sodium anhydre. L'huile est récupérée après évaporation du cyclohexane à l'évaporateur rotatif à 40°C sous vide. Le taux d'extraction est ensuite déterminé par rapport à la masse de broyat.

Chapitre I

1.4. Caractérisation physico-chimique des amandes par la méthode ADF-NDF

Teneur en cellulose

La méthode d'analyse séquentielle composée de trois parties de Van Soest révisée le 23 mars 2011 est utilisée pour obtenir la composition ligno-cellulosique des amandes de *Ricinodendron heudelotii*.

La première partie consiste à déterminer les fibres insolubles contenues dans 1 g d'amandes de *Ricinodendron heudelotii* broyées, délipidées au Soxhlet (cyclohexane) par solubilisation et élimination des protéines et matières hydrosolubles avec une solution détergente neutre, le lauryl sulfate de sodium à 95°C. Le résidu obtenu est appelé NDF. Il est composé d'hémicelluloses, de celluloses, de lignines et de cendres. Il est filtré et lavé à l'eau déminéralisée préchauffée à 90°C. Une étape de calcination à 450 °C pendant 6 heures permet de déterminer la teneur en cendres.

La seconde partie consiste à solubiliser l'hémicellulose dans une solution détergente acide constituée par le bromure d'acétyle triméthyl ammonium dans de l'acide sulfurique 0,5 M. Le résidu constitue l'ADF, composé de cellulose et de lignine. Il est filtré, lavé à l'eau chaude déminéralisée et séché.

Enfin, le résidu ADF est traité par du permanganate de potassium pour oxyder et éliminer les lignines permettant ainsi son dosage et l'estimation de la teneur en cellulose.

1.5. Détermination de la teneur en protéines

La méthode utilisée est une méthode indirecte qui consiste à déterminer le pourcentage en azote total (% N) par la méthode de Kjeldahl selon la norme NF V 18-100. La méthode de Kjeldahl consiste à minéraliser l'azote organique contenu dans l'échantillon sous la forme d'ammoniaque et ensuite à le doser par un acide. Pour la minéralisation, une masse de 0,8 g d'amandes séchées et délipidées au soxhlet, est placée dans un tube de verre additionné de 12,5 mL d'acide sulfurique concentré à 95%.

Le mélange est mis sous une hotte pendant 16 heures. Le mélange est ensuite minéralisé à 400 °C pendant 1 heure. Enfin, l'analyse est effectuée par un analyseur de type Kjeltect™ 8400.

Chapitre I

1.6. Détermination des indices normés des huiles

Indice d'acide et indice d'iode

La détermination des indices d'acide, d'iode, et l'acidité/équivalent acide éléostéarique s'est faite par les méthodes de dosages volumétriques suivant les protocoles des normes : NF EN ISO 3961 pour l'indice d'iode et NF EN ISO 660 pour l'indice d'acide et l'acidité/équivalent acide éléostéarique. La détermination de l'acidité a été réalisée par la méthode théorique basée sur le profil en acides gras de l'huile de *Ricinodendron heudelotii*.

1.7. Détermination du profil en acides gras par CPG

La détermination du profil en acides gras de l'huile a été réalisée suivant la méthode de Tri Méthyl Sulfonium Hydroxide (TMSH) [14]. L'huile (15 mg) a été solubilisée dans 1 mL de TBME (Tert-Butyl Méthyl Ether) et, après méthylation à l'aide du Tri Méthyl Sulfonium Hydroxide (TMSH, à 0,2mL/L dans le méthanol), les esters méthyliques d'acides gras obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

L'appareil utilisé est de type Varian 3900, 1 μ L de la solution est injecté dans ce chromatographe selon les paramètres suivants : Injecteur en mode split, rapport de 1/100, 250°C (55 min). Colonne de type CP-Select CB for FAME fused silica WCOT, 50 mx 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 μ m. Gaz vecteur : l'hélium avec un débit de 1,2 mL/min. Température du four : initial 185°C pendant 40 minutes, puis augmentée de 15°C/min jusqu'à 250°C, et maintenue à 250°C pendant 11 min.

L'identification des esters méthyliques d'acides gras est basée sur la comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux d'un mélange de standards commerciaux, le Mix 37 (Sigma Aldrich), de l'huile de Tung, l'huile de grenade et l'huile de *Catalpa bignoniaceae*.

1.8. Détermination de la teneur en tocophérols par HPLC

La teneur en tocophérol contenu dans l'huile a été déterminée par HPLC- fluorimètre en utilisant la méthode d'analyse décrite dans la norme AFNOR NF ISO 9936. L'appareil utilisé est un chromatographe en phase liquide couplé à un détecteur de fluorescence Dionex et d'un four dont la température est fixée à 22°C. 20 μ L de solution à 10 mg d'huile / mL de cyclohexane ont été injectés en HPLC.

Chapitre I

La phase mobile est un mélange d'isooctane et d'isopropanol (99,5 : 0,5, v/v) avec un débit de 0,5 mL min⁻¹. La quantification est réalisée par étalonnage externe (α -tocophérol, γ - tocophérol, et δ -tocophérol) de chez Sigma.

1.9. Détermination de la teneur en stérols par CPG

Elle commence par la préparation d'une solution de cholestanol (étalon interne) à 2 mg/mL en pesant 5 mg de cholestanol dans 2,5 mL de chloroforme. Dans un tube à vis de 10mL on pèse exactement 50 μ L de la solution de cholestanol dans le chloroforme soit environ 100 μ g de cholestanol, le chloroforme est par la suite évaporé.

Dans le tube à vis contenant le cholestanol, on ajoute 100 mg d'huile et 2 mL de KOH (1M) dans l'éthanol, le mélange est ensuite agité au vortex et chauffé pendant 20 minutes au bain marie à la température de 75 °C.

Après refroidissement du mélange réactionnel, on y ajoute 1 mL d'eau déminéralisée et 6 mL de cyclohexane, puis le mélange est agité au vortex. Après décantation, la phase organique contenant les insaponifiables est récupérée. 160 μ L de cette solution sont mélangés à 40 μ L de réactif de silylation 99% N, O-bis [triméthyl silyl trifluoro acétamide] avec 1% triméthyl chlorosilane (BSTFA/TMCS, 99/1) puis chauffés pendant 3 minutes au four à une température de 103 \pm 2 °C.

Le dosage des stérols a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec un appareil de type Perkin Elmer Auto system XL. Celui-ci est équipé d'une colonne de type CPSil 8CB (Varian), 30m x 0,25 mm, l'épaisseur de film 0,25 μ m. Le gaz vecteur est l'hélium porté à une pression de tête de colonne de 100 KPa. L'injection est en mode on-column de 1 μ L. La température du four est maintenue à 160 °C pendant 0,5 minutes puis est portée progressivement jusqu'à 260 °C à une vitesse de 20 °C/min pendant 5,5 min, ensuite portée à 300 °C à une vitesse de 2°C/min pendant 10 minutes et finalement portée à 350°C à une vitesse de 45°C/min pendant 3 min. Le temps d'analyse total est de 50 minutes. Les températures du détecteur et de l'injecteur sont fixées respectivement à 365°C et 340°C[15].

2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

2.1. Cartographie du *Ricinodendron heudelotii* en Côte d'Ivoire

Les études de localisation et de collecte de *Ricinodendron heudelotii* ont été conduites dans 23 localités à savoir : Abidjan, Yamoussoukro, Sinfra, Gagnoa, Tiassalé, Toumodi, Oumé, Divo, Danané, Man, Lakota, San Pedro, Soubré, Adiaké, Adzopé, Kotobi, Bouaké, Arrah, Akoupé, Daloa, Sikensi, Agboville, Rubino. Dans l'optique d'obtenir un maximum d'informations, 3 villages ont été choisis par localité afin de recueillir des informations sur la présence et la production des amandes de *Ricinodendron heudelotii*.

A la suite de cette enquête, nous avons observé que cette plante est présente dans toutes les localités prospectées. La récolte des graines et la production des amandes de *Ricinodendron heudelotii* restent fortement liées aux habitudes alimentaires de la population locale.

Nous avons identifié deux grandes zones de production, le Sud-Est et le Sud-Ouest. Ainsi, 82,5 % des localités prospectées produisent les amandes de *Ricinodendron heudelotii* et 17,5% n'ont aucune activité de récolte et transformation **Figure 2**.

En Côte d'Ivoire, la récolte annuelle de graines de *Ricinodendron heudelotii* (Apki) permet l'obtention environ de 100 tonnes d'amandes. Elle est réalisée par des femmes dans certaines zones du pays. Elle est destinée presque exclusivement à la consommation alimentaire des populations locales.

Cette production sert, en grande partie, à ravitailler les grandes villes telles que, Abidjan, Yamoussoukro et Bouaké. Dans ces villes les acheteurs sont solvables donc les amandes sont vendues à 8000 Francs CFA le kilogramme, soit environ 12 euros le kilogramme. Ces amandes sont vendues à 3000 Francs CFA le Kilogramme, soit 4,5 euros le kilogramme.

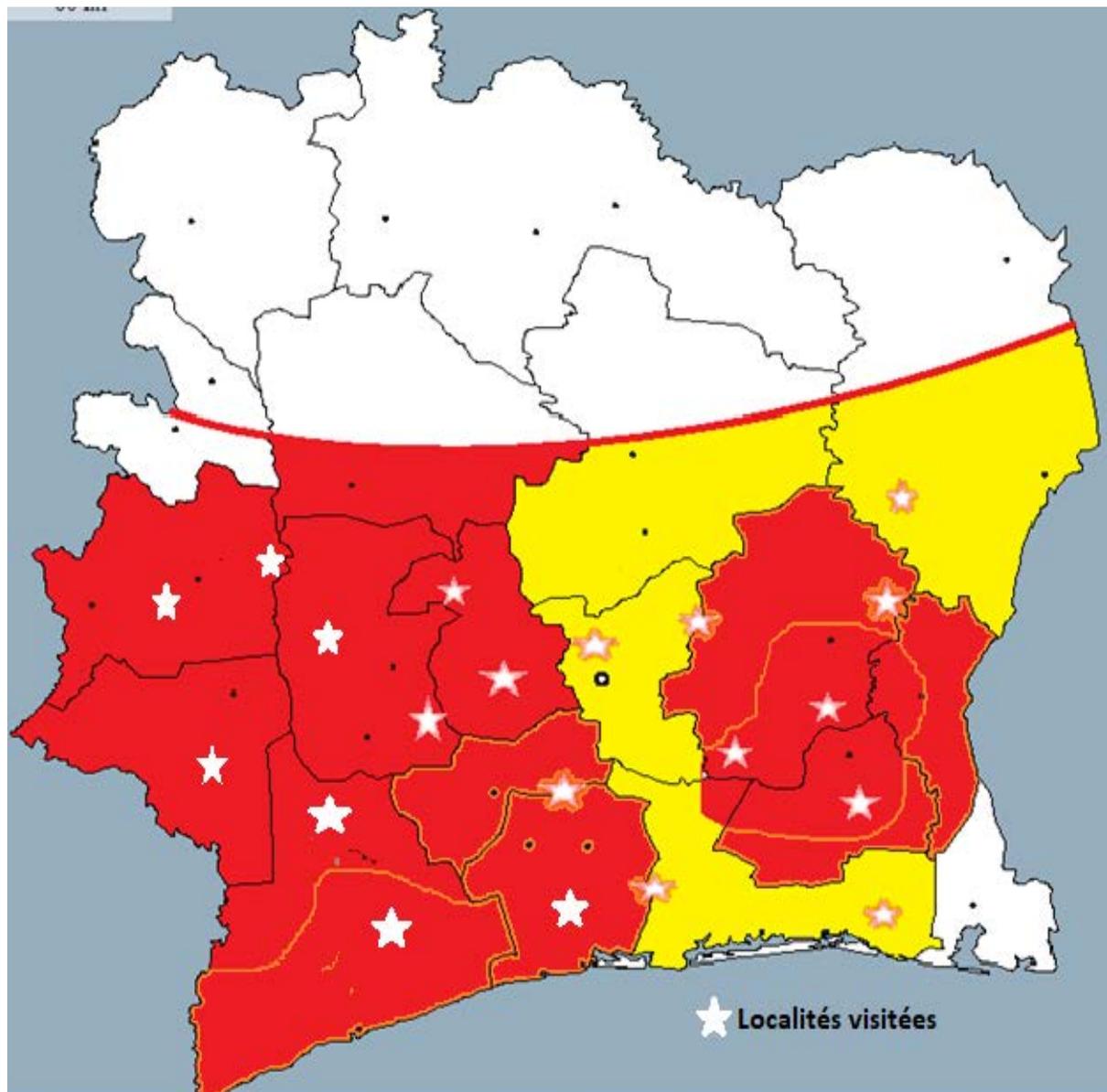


Figure 2: Cartographie des localités visitées

2.2. Composition des amandes de *Ricinodendron heudelotii*

Le Tableau 1 rassemble les constituants principaux contenus dans les amandes issues des deux méthodes de décorticage avec leurs teneurs respectives.

Tableau 1: Caractérisation des amandes

Valeurs déterminées des teneurs des constituants (%)	Echantillons d'amandes isolées :	
	Par le traitement thermique traditionnel	Par le décorticage mécanique manuel
Teneur en eau	7,3± 0,2	7,5± 0,1
Matière sèche	93,1± 0,2	92,5± 0,1
Teneur en cendres	7,3± 0,2	7,5± 0,1
Cellulose	6,5±0,2	6,1±0,3
Hémicellulose	7,8±0,3	7,5±0,2
Lignine	3,0±0,2	3,2±0,2
Protéines	21,3±1,9	21,1± 0,2
Teneur en huiles (soxhlet)	47,4 ± 0,2	47,3 ± 0,6

Quelle que soit la méthode d'isolement des amandes, les valeurs des teneurs déterminées (teneur en eau, en matière sèche, en cendre, en cellulose en hémicellulose en lignine, en protéines et en huiles) ne présentent pas de différences significatives. Ainsi, les teneurs en eau et en matière sèche sont de 7 % et de 93%, celles en cellulose, en hémicellulose et lignine sont respectivement de 6% de 7,5% et de 3%.

Ces valeurs montrent que les amandes de *Ricinodendron heudelotii* sont pauvres en cellulose, en hémicellulose et en lignine.

En revanche, les teneurs en protéines sont élevées de l'ordre de 21,3% ± 1,9. Ces amandes sont riches en protéines. Ces teneurs en protéines corroborent celles déterminées par Saki *et al.*, (2005) ; Coulibaly *et al.*, (2018) avec des valeurs respectives de 21% et de 24%.

D'après ces résultats, nous observons que quelle que soit la méthode d'isolement des amandes, on obtient un taux d'extraction de lipides identique et égal à 47,4 ± 0,2%.

Chapitre I

Des résultats comparables ont été obtenus par Dandjouma *et al.*, en 2008 et par Saki *et al.*, en 2005 respectivement avec des taux d'extraction de l'huile au Soxhlet de 50% et 48,9% sur des amandes isolées par le traitement thermique traditionnel.

Les résultats relatifs à la teneur en protéine et le taux d'extraction en lipides permettent de considérer le *Ricinodendron heudelotii* comme une plante oléo-protéagineuse. Ses graines sont donc une bonne source naturelle de lipides et de protéines.

2.3. Caractérisation physico-chimique de l'huile de *Ricinodendron heudelotii*.

Dans le **Tableau 2** sont reportés la viscosité dynamique, les indices d'iode, d'acide et l'acidité par rapport à l'acidité α -éléostéarique des huiles extraites des amandes par traitement thermique traditionnel et par décorticage mécanique manuel.

Tableau 2: Caractéristiques physico-chimiques de l'huile

Caractéristiques physique des huiles	Echantillons d'huiles d'amandes isolées :	
	par le traitement thermique traditionnel	par le décorticage mécanique manuel
Masse volumique (g /mL à 25°C)	0,92	0,94
Viscosité dynamique (mPa.s)	169±0,5	128,0±0,1
Indice d'acide	5,7± 0,3	3,7± 0,3
Acidité (% massique)	2,8± 0,2	1,8± 0,1
Indice d'iode (g I ₂ / 100 g de matière sèche)	179,6±1,1	195,2±1,7

Les masses volumiques des échantillons d'huiles issues des deux méthodes de décorticage sont quasi identiques, 0,92 g/mL et 0,94 g/mL. Ce qui montre une reproductibilité de la masse volumique de l'huile obtenue à partir des deux méthodes de décorticage.

L'huile obtenue des amandes issues du traitement thermique traditionnel a une viscosité plus élevée, 169 mPa.s, un indice d'acide plus élevé de $5,7 \pm 0,3$, une acidité élevée de $2,8 \pm 0,2$ et un indice d'iode plus bas de $179,6 \pm 1,1$ Ces valeurs sont différentes de celles obtenues de l'huile isolée des amandes issues par décorticage manuel.

Chapitre I

Ces résultats montrent une légère modification de l'huile au cours du processus d'obtention de l'huile par la technique de traitement thermique traditionnel.

En effet, l'isolement traditionnel des amandes des graines de *Ricinodendron heudelotii* utilise des techniques non contrôlées telles que l'ébouillantage des graines dans l'eau et le séchage des amandes au soleil qui sont des facteurs d'oxydation de l'huile.

Nous notons à partir de ces résultats que le mode de traitement des graines pour isoler les amandes influence significativement l'indice d'iode des huiles extraites. La valeur de l'indice d'iode diminue avec le traitement des graines par la méthode traditionnelle. Ces indices d'iode diffèrent de celles relevées de la littérature. Selon les études réalisées par Tchiégang et al. et Assanvo et al, cette valeur est de 150 [16,17].

Les valeurs de l'indice d'iode de $179,6 \pm 1,1$ et de $195,2 \pm 1,7$ des huiles issues de nos deux méthodes d'isolement sont élevées. Elles font de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* une huile hautement siccative en comparaison avec celle de l'huile de *Aleurites fordii* (tung). Son indice d'iode de 170 selon les études de Samadzadeh *et al.*, réalisées en 2011 [3].

2.4. Profil acides gras des huiles

L'huile de *Ricinodendron heudelotii* est l'une des rares huiles végétales hautement polyinsaturées avec une teneur en acides gras polyinsaturés égale ou supérieure à 90% quelle que soit la méthode de décorticage des amandes. L'acide α -éléostéarique et l'acide linoléique sont les deux principaux acides gras majeurs. Néanmoins, leurs teneurs varient en fonction de la méthode utilisée pour l'obtention des amandes.

Ainsi, l'huile des amandes isolées par décorticage mécanique manuel sans traitement préalable contient l'acide α -éléostéarique à une teneur de $60,1 \pm 0,2$ %, l'acide linoléique à une teneur de $22,8 \pm 0,1$ % alors que l'huile extraite à partir des amandes obtenues par traitement thermique traditionnel donne des valeurs respectives de $50,5 \pm 0,1$ % et $24 \pm 0,0$ %.

Ces deux huiles issues des deux modes d'isolement des amandes contiennent également l'acide β - éléostéarique avec une teneur de $1,1 \pm 0,1$ dans l'huile des amandes isolées par le décorticage mécanique manuel et de $8,4 \text{ \%} \pm 0,0$ dans l'huile des amandes isolées par le traitement thermique traditionnel ; l'acide catalpique est aussi présent mais uniquement dans l'huile des amandes isolées par le traitement thermique traditionnel avec une teneur de $0,40 \pm 0,1$.

Chapitre I

Les résultats relevés dans la littérature sur les teneurs en acides gras polyinsaturés des huiles de *Ricinodendron heudelotii* sont rassemblés dans le **Tableau 3** et comparés aux nôtres.

Tableau 3: Compilation des résultats de la littérature sur la composition chimique de l'huile de *Ricinodendron heudelotii*

Acides gras	Kapseu, 1995*	Dandjouma, 2007*	Sompila 2014*	Yeboah , 2010*	Travaux en cours	
					Amande ^a	Amande ^b
Acide palmitique	5,5	6,35	5,4	12,1	3,8 ± 0,0	4,1 ± 0,0
Acide stéarique	6,4	7,5	8	15	5,1 ± 0,0	5,3 ± 0,0
Acide oléique	7,4	7,18	11,2	14,2	6,7 ± 0,0	7,1 ± 0,0
Acide linoléique	28,3	30,7	28,1	58,7	22,8 ± 0,1	24,0 ± 0,0
Acide α-éléostéarique C18 :3n-5 (c,t,t)	51,1	48,37	35	----	60,1 ± 0,2	50,5 ± 0,1
Acide catalpique C18 :3n-5 (t,t,c)	----	----	1,3	----	0,0	0,40 ± 0,1
Acide β-éléostéarique C18 :3n-5 (t,t,t)	----	----	9,7	----	1,1 ± 0,1	8,4 ± 0,0
Acides gras saturés	11.,9	13,85	13,4	27,1	8,9 ± 0,1	9,4 ± 0,0
Acides gras monoinsaturés	7,4	7,18	11,2	14,2	6,7 ± 0,0	7,0 ± 0,0
Acides gras polyinsaturés	79,4	79,07	74,1	58,7	84,4 ± 0,4	83,3 ± 0,1

* amandes achetées au marché ; ^a amandes isolées par décorticage mécanique manuel ; ^b amandes isolées par traitement thermique traditionnel

Chapitre I

Les huiles des amandes obtenues par traitement thermique traditionnel ont un pourcentage en acide α -oléostéarique compris entre 32,5 % à 51,1 % et en acide linoléique variant de 28 % à 58,7 %. Cette composition est identique à celles des profils en acides gras polyinsaturés de l'huile issue des amandes obtenues par traitement traditionnel ($50,5 \% \pm 0,1$) en acide α -oléostéarique et $24,0\% \pm 0,0$ en acide linoléique.

Deux paramètres sont donc à prendre en compte dans cette étude comparative : la localisation géographique des sites de ramassage des fruits et la voie de production des amandes. Ainsi, pour la même méthode d'extraction de l'huile au Soxhlet avec le même solvant, les variations des teneurs en acides gras polyinsaturés sont importantes.

Elles se situent dans une fourchette de 35% à 60% pour les teneurs en acide α -oléostéarique et de 22% à 58% pour les teneurs en linoléique. De plus, notre étude et celle de Yeboah *et al.*, (2010) révèlent la présence de l'acide β -oléostéarique et de l'acide catalpique.

En examinant les données issues de nos travaux et celles de Sompila *et al.* (2014), nous observons une diminution de la teneur en acide α -oléostéarique et une augmentation de la teneur en acide linoléique d'une part et une augmentation en acide β -oléostéarique d'autre part.

Dans ces deux études, la teneur en acide β -oléostéarique est de 8,4% pour l'huile obtenue du décorticage des amandes par la méthode traditionnelle contre 9,7% pour la deuxième méthode.

La méthode traditionnelle de décorticage entraîne l'isomérisation de l'acide α -oléostéarique. Celui-ci est converti en acide β -oléostéarique et en acide catalpique, sous forme de triglycérides dans l'huile native.

Chapitre I

2.5. Caractérisation des constituants mineurs des huiles de *Ricinodendron heudelotii*

Le **Tableau 4** regroupe la composition en tocophérols des huiles.

Tableau 4: Caractéristiques chimiques des composants mineurs de l'huile

Composés mineurs	Echantillons d'huiles d'amandes isolées :	
	par traitement thermique traditionnel	par décorticage manuel manuellement
Tocophérols (%)		
α -Tocophérol	4,0 \pm 0,01	7,9 \pm 0,02
γ - Tocophérol	92,9 \pm 0,02	89,9 \pm 0,18
δ - Tocophérol	3,1 \pm 0,02	2,5 \pm 0,46
Total (mg/100g)	135,0	178,3
Stérols %		
Campestérol (%)	7,2 \pm 0,11	7,2 \pm 0.19
Stigmastérol (%)	3,1 \pm 0.1	2,9 \pm 0,2
B Sitostérol(%)	83,6 \pm 0,5	83,7 \pm 0,3
Stigmastanol(%)	1,7 \pm 0.01	1,5 \pm 0,9
d5 Avénastérol (%)	4,3 \pm 0,11	4,6 \pm 0,4
Stérols totaux (mg/100g)	412,0	402,5

La valeur de la teneur en tocophérols totaux est de 178,3 mg/100g pour l'huile des amandes isolée par le décorticage mécanique manuel, et de 135 mg/g pour l'huile des amandes obtenues par traitement thermique traditionnel. Nous constatons que cette valeur est fortement influencée par le traitement des graines avant l'extraction de l'huile des amandes.

Chapitre I

Cette teneur en tocophérols est comparable à celle de l'huile de lin qui est de l'ordre de 110-280 mg/100 g. Quelle que soit la méthode de prétraitement utilisé avant le décorticage, le constituant majeur est le γ -tocophérol avec une teneur d'environ 92%. Nous remarquons que le traitement thermique traditionnel subi par les graines dégrade aussi les tocophérols de l'huile.

La composition en stérols de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* montre que le β -sitostérol constitue le composé majeur avec une teneur d'environ 83% et une teneur en stérols totaux qui varie en fonction du traitement effectué sur les graines. Cette valeur varie entre 400 et 410 mg/100 g. L'huile de *Ricinodendron heudelotii* est donc moyennement riche en stérols avec un taux en β -sitostérol de 84%.

Chapitre I

Conclusion partielle

Cette étude a porté sur la caractérisation de deux sortes d'huiles issues des amandes de graines *Ricinodendron heudelotii* : celle obtenue par la méthode de traitement thermique traditionnel et celle obtenue par la méthode de décorticage mécanique manuel.

Le traitement traditionnel consiste à isoler les amandes après traitement à l'eau bouillante alors que le décorticage mécanique permet d'isoler les amandes sans contrainte thermique.

En termes d'analyse et de caractérisation, nous retenons que chaque méthode de décorticage engendre une composition chimique différente, surtout au niveau des teneurs en acides gras polyinsaturés.

L'huile des amandes isolées par décorticage mécanique manuel contient une teneur de $60,1 \pm 0,2$ % en acide α -oléostéarique, de $22,8 \pm 0,1$ % en acide linoléique et de $1,1 \pm 0,1$ en acide β -oléostéarique alors que l'huile des amandes obtenues par le traitement thermique traditionnel donne des valeurs des teneurs de $50,5 \pm 0,1$ % pour l'acide α -oléostéarique, $24 \pm 0,0$ % pour l'acide linoléique, $8,4$ % pour l'acide β -oléostéarique et de $0,40 \pm 0,1$ pour l'acide catalpique. L'une est très riche en α -oléostéarique et l'autre s'enrichit en acide β -oléostéarique et en acide catalpique, nous semble-t-il, par isomérisation de l'acide α -oléostéarique.

Nous observons ainsi que ces deux méthodes de décorticage sont propices à l'obtention de deux huiles riches en acides gras polyinsaturés à des teneurs en acides gras polyinsaturés de 95%, et caractérisées par des indices d'iode élevés respectivement de 180 et 195 (g I₂/ 100 g de matière sèche).

Les constituants mineurs sont conservés, notamment les teneurs en gamma-tocophérols et en β - sitostérols.

La caractérisation physico-chimique des constituants chimiques des amandes révèle une source de protéines de teneur de $21,3 \pm 1,9$ % et d'huile de teneur $47,4 \pm 0,2$ %. De ce fait, cette plante est une source de graines oléoprotéagineuses.

Elle est aussi source de fibre alimentaire et d'huiles polyinsaturées équivalentes aux huiles riches en ALA et en DGA avec 60 % d'acide α -oléostéarique. Ce qui en fait un bon candidat pour des diètes alimentaires et nutritionnels.

La composition de l'huile enrichie en β -oléostéarique mérite d'être isolée et caractérisée pour des études approfondies en nutrition humaine.

CHAPITRE 2 :
ISOMERISATION DE L'ACIDE α -ELEOSTEARIQUE
DE L'HUILE DE *RICINODENDRON HEUDELOTII*

Introduction

Les travaux présentés dans le **chapitre 1** relatifs à l'influence de la méthode de décorticage des graines de *Ricinodendron heudelotii* sur la composition chimique des constituants de l'huile ont permis de montrer que la méthode de traitement thermique traditionnel utilisée pour isoler les amandes des graines entraîne l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique et en acide catalpique.

De ce fait, la présente étude a pour objectif l'étude de l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique au niveau des triglycérides des huiles et dans les concentrats d'acides gras libres. Cette étude est divisée en deux parties.

La première partie est consacrée aux usages des CLnA et à la présentation de leurs voies de synthèses (biosynthèse, synthèse chimique et synthèse photochimique).

La deuxième partie s'est focalisée sur la conversion de l'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique et en acide catalpique par transformation des triglycérides en concentrats d'acides gras libres à partir de l'huile de *Ricinodendron heudelotii*.

1. PLATEFORME OLEO CHIMIQUE DES PLANTES A GRAINES RICHES EN ACIDES GRAS CLNA

1.1. Utilisation des CLnA

Actuellement, la communauté scientifique s'est focalisée au niveau de la recherche sur l'intérêt des acides gras polyinsaturés de la famille des CLnA à partir des espèces végétales représentées sur la **Figure 3**

Acide gras	Source	Teneur %	Réf.
 Acide α -éléostéarique (C18 :3 9c, 11t, 13t)	<i>Aleurite fordii</i>	80	[18]
 Acide β -éléostéarique (C18 :3 9t, 11t, 13t)	<i>Ricinodendron heudelotii</i>	60	[19]
 Acide catalpique (C18 :3 9t, 11t, 13c)	<i>Momordica charantia</i>	3,9	[20]
 Acide punique (C18 :3 9c, 11t, 13c)	<i>Ricinodendron heudelotii</i>	8,4	[19]
 Acide jacarique (C18 :3 8c, 10t, 12c)	<i>Catalpa bignonioides</i>	31	[21]
 Acide calendique (C18 :3 8t, 10t, 12c)	<i>Punica granatum</i>	79,3	[22]
 Acide alpha-calendique (C18 :3 8t, 10t, 12c)	<i>Jacaranda mimosifolia</i>	62	[23]
 Acide alpha-calendique (C18 :3 8t, 10t, 12c)	<i>Calendula officinalis</i>	60	[21]

Figure 3: Acides gras de la famille des CLnA

Chapitre 2

Les CLnA sont naturellement présents dans les huiles végétales. Ils sont caractérisés par la présence de trois doubles liaisons conjuguées sur les carbones 9, 11 et 13 dans les huiles des graines d'*Aleurites fordii*, *Ricinodendron heudelotii*, *Momordica charantia*, *Catalpa bignonioides*, *Punica granatum* ; ou sur les carbones 8, 10, 12 dans les huiles des graines de *Jacaranda mimosifolia* et *Calendula officinalis*, avec des configurations différentes.

Certains de ces acides gras (Figure 3) sont des composés majeurs des huiles de ces graines, par exemple l'acide α -éléostéarique (C18:3 9c, 11t, 13t) dans le Tung (80%), l'acide punique (C18:3 9c, 11t, 13c) dans le *Punica granatum* (79,3%), l'acide jacarique (C18:3 8c, 10t, 12c) dans le *Jacaranda mimosifolia* (62%) et l'acide catalpique (C18:3 9t, 11t, 13c) dans le *Catalpa bignonioides* (31%). Certains acides gras polyinsaturés sont présents en petite quantité dans certaines huiles, en particulier, l'acide β -éléostéarique qu'on retrouve dans *Momordica charantia* (3,9 %).

De récents travaux montrent que les acides gras de la famille des CLnA ont un effet bénéfique (régulation du métabolisme des lipides) sur la santé. Certains possèdent des activités biologiques (activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité anti-carcinogénique) [13,24]. Ils ont, en outre, des effets physiologiques favorables, de par leur activité anti-artériosclérose, anti-obésité, anti-tumeur et anti-hypertension [13,25].

Moon *et al.*, (2010) ont montré que l'acide α -éléostéarique est un agent thérapeutique potentiel dans le traitement du cancer du sein. Selon les résultats de ses travaux, l'acide α -éléostéarique agirait comme une substance médicamenteuse qui a la propriété d'activer le récepteur γ des peroxysomes (PPAR γ). L'acide α -éléostéarique pourrait ainsi induire la suppression de tumeur des cellules cancéreuses du sein par le récepteur (PPAR γ) [26].

Les études réalisées par Yumiko *et al.*, (2005) montrent que l'huile de graine de *Momordica charantia*, riche en acide α -éléostéarique à 50,0 %, peut entraîner l'autodestruction de cellules du cancer du côlon (Caco-2) [25]. Ces résultats mettent en exergue les effets anti-cancéreux remarquables de l'acide α -éléostéarique.

Suzuki *et al.*, (2001) ont rapporté, de leur côté, la toxicité des CLnA (l'acides α -éléostéarique, l'acide punique et l'acide catalpique) pour les cellules leucémiques monocytes humaines en chimiothérapie.

Chapitre 2

L'acide β -éléostéarique a été utilisé par Sun *et al.*, (2012) pour induire l'autodestruction des cellules cancéreuses T24 de la vessie humaine. En effet, il a montré à travers ses résultats que l'incubation des cellules T24 avec des concentrations en acide β -éléostéarique de 10 à 80 $\mu\text{mol} / \text{L}$ diminue fortement la viabilité de ces cellules [27].

Nekooeian *et al.*, (2014) ont obtenu des résultats très prometteurs dans le cadre de l'étude sur le traitement de diabète à partir des CLnA, en particulier l'acide punique de l'huile de pépins de grenade. Ces travaux ont montré que l'alimentation de rats diabétiques de type 2 avec de l'huile riche en acide punique améliorait la sécrétion d'insuline sans modifier la glycémie à jeun [28].

Le même résultat a été obtenu par Hontecillas *et al.*, (2008), avec l'acide catalpique de l'huile des graines de catalpa. En effet, ses résultats montrent que la consommation de l'acide catalpique chez la souris diabétique de type 2 entraîne une diminution de la glycémie à jeun et de l'insuline [29].

1.2. Production des CLnA par voie de biosynthèse

Les isomères des CLnA proviennent de sources naturelles. Ils sont généralement obtenus par biosynthèse dans des graines de plantes. Mais certains CLnA, tel que l'acide β -éléostéarique sont obtenus par synthèse photochimique ou chimique.

La synthèse des CLnA peut se faire suivant deux voies :

- par biosynthèse au cours de la croissance et de la maturation de la graine,
- par transformation (isomérisation) des acides gras après extraction de l'huile des graines.

La biosynthèse des acides CLnA se fait par la conversion des CLA (Conjugated Linoleic Acid) par une enzyme. Le CLA est un acide gras à 18 atomes de carbone avec 2 doubles liaisons. Les acides α -éléostéarique, catalpique et punique sont des produits de la conversion de l'acide linoléique (C18:2 9c, 12c) par des enzymes spécifiques (les conjugases) [30].

Selon Koba *et al.*, (2007) les plantes à l'origine de la production des acides gras de la famille de l'acide linoléique conjugué (CLnA) ont chacune des enzymes spécifiques de type conjugase qui permet leur synthèse [31].

Chapitre 2

Les enzymes FAD2 et FADX ont été identifiées comme étant celles qui convertissent respectivement l'acide oléique (C18 :1) en CLA et le CLA en CLnA, tandis que le DGFAT2 est l'enzyme qui a une propension à la synthèse de la triéléostéarine, le triglycéride principal de l'huile de tung [32,33].

Aruna *et al.*, (2016) ont décrit la biosynthèse de CLnA à partir de CLA à l'aide d'enzyme. L'enzyme utilisée, le Δ 15-linoléate désaturase a démontré à la fois une activité de désaturase du carbone 15 de l'acide linoléique et une activité conjugase des doubles liaisons formées. La conjugase modifie les doubles liaisons en position 9, 12 et 15 pour produire les doubles liaisons conjuguées en position 9, 11, et 13, formant ici le CLnA [34].

Linsen *et al.*, (1997) ont étudié *in vitro* la biosynthèse des CLnA en particulier l'acide α -éléostéarique dans les graines de *Momordica charantia*. Le suivi de l'évolution des radiotraceurs (acide oléique, acide linoléique et l'acide linoléique marqués au ^{14}C) dans des graines de *Momordica charantia* a permis de montrer que l'acide linoléique est le précurseur de l'acide α -éléostéarique. L'analyse des acides gras produits montre que l'acide linoléique est converti en acide α -éléostéarique avec une teneur de 59,8%. Le profil glycérique de l'huile montre que les triglycérides formés de trois molécules de l'acide α -éléostéarique (triéléostéarine) représente 62,2% et les triglycérides avec deux molécules de l'acide α -éléostéarique est de 29,6% [35].

John *et al.*, (2002) ont étudié la formation de l'acide α -éléostéarique dans l'huile des graines de tung par conversion de l'acide oléique par voie génie génétique. Cette étude a été basée sur le clonage de l'ADN des enzymes FAD2 et FADX. Ces enzymes ont été obtenues à partir de l'ARN extrait de graines de tung par la méthode de Bugos *et al.*, (1995) [36]. La conversion de l'acide oléique en acide α -éléostéarique a été réalisée en deux étapes : la FAD2 a permis la conversion de l'acide oléique (C18:2 9c) en acide linoléique (C18:2 9c, 12c) par la formation d'une double liaison entre le carbone 12 et 13 de l'acide oléique.

Chapitre 2

Ensuite, l'acide linoléique est transformé en acide α -éléostéarique par FADX qui a un rôle bi-fonctionnel. Il possède des activités à la fois désaturase et conjugase **Figure 4** [32].

Dans les graines riches en acide punique (C18:3, 9c,11t,13t), *Trichosanthes kirilowii* (38,2%) et *Punica granatum* (79,3%), TkFac et PgFac ont été définis respectivement comme étant les enzymes bi-fonctionnelles de ces plantes. Elles ont été obtenues à partir de l'ARN isolé des graines de *Trichosanthes kirilowii* et *Punica granatum* en cours de la maturation selon les méthodes de Carpenter *et al.*,(1998) [37].

Ces enzymes ont à la fois une activité désaturase et une activité conjugase permettant de convertir l'acide oléique en acide linoléique et l'acide linoléique en acide punique **Figure 4** [38], [39].

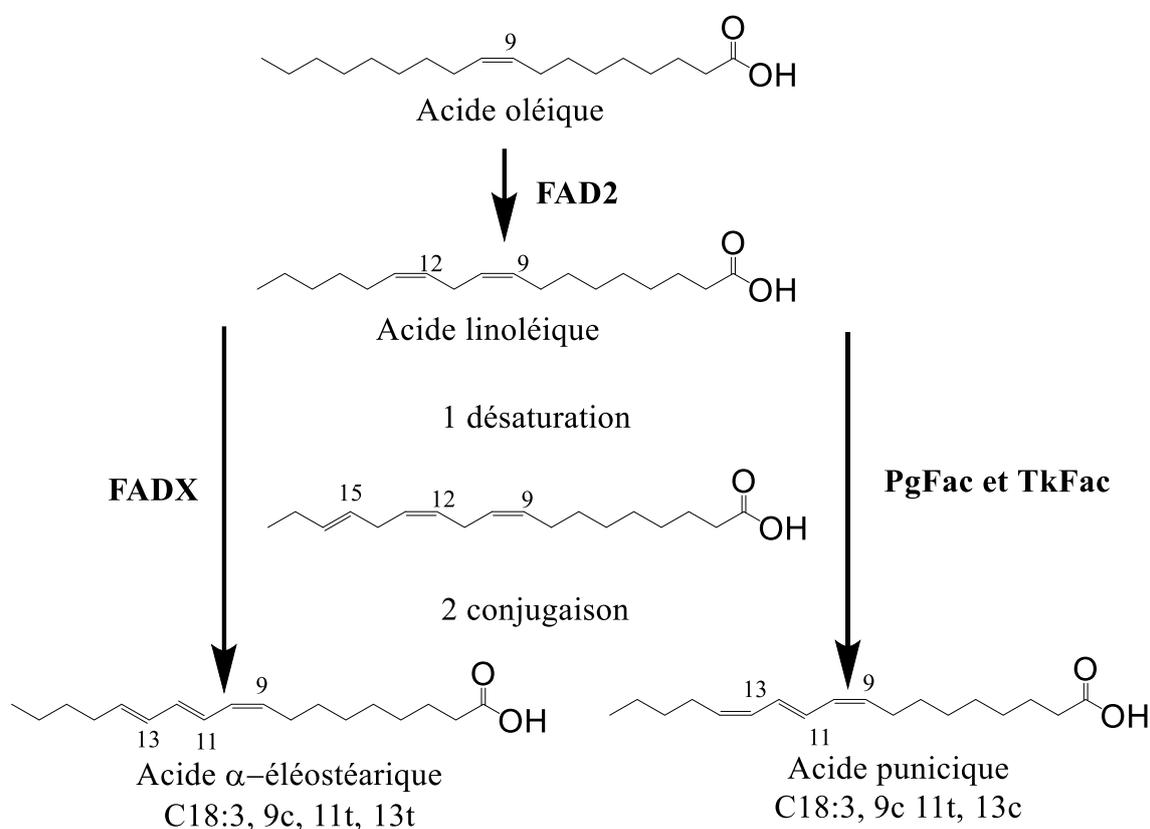


Figure 4: Schémas de biosynthèse de l'acide α -éléostéarique dans les graines de l'*Aleurites fordii* (*tung*) et de *Momordica charantia* de et l'acide punique dans les graines de *Trichosanthes kirilowii* et *Punica granatum*

Chapitre 2

1.2.1. Voie chimique

Des études d'isomérisation de l'acide α -éléostéarique à partir de l'huile de tung ont été rapportées dans la littérature. Ainsi, la conversion de l'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique a été réalisée par Ying *et al.*, (2007) par réaction de l'huile de tung avec de l'iode I_2 pendant 10 jours. Le mélange a été ensuite traité dans du KOH, 0,3 M (24 heures) et acidifié à pH 1,0 (H_2SO_4). Les acides gras libres de l'huile de tung dans le mélange sont extraits avec de l'hexane. L'acide β -éléostéarique dans le mélange a été purifié par recristallisation à deux reprises dans de l'éthanol à 90% à $-20^\circ C$ [40].

Takagi *et al.*, (1981) ont isomérisé l'acide α -éléostéarique de l'huile de tung en acide β -éléostéarique, en ajoutant de l'iode dans une solution de disulfure de carbone (CS_2) avec de l'huile de tung, en exposant le mélange est exposé à la température ambiante pendant 10 heures [41]

L'isomérisation de l'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique à partir de l'huile de tung a été rapportée par Hoffmann *et al.*, (1957). Cette isomérisation a été réalisée en mélangeant 500 mL d'huile avec 1 mL de solution saturée d'iodure de potassium sous agitation pendant trois ou quatre minutes. Le mélange est ensuite exposé à une lumière diffuse jusqu'à observation de la séparation du glycéride solide. L'acide β -éléostéarique dans le mélange a été purifié à 93,2% [42].

1.2.2. Voie photochimique

Schönemann *et al.*, (2013) ont converti l'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique en exposant de l'huile de tung à la lumière. Selon cette étude, l'exposition de l'huile de tung à une lumière de longueur d'onde ($\lambda=366$ nm), d'intensité $195 \mu W.cm^{-2}$ pendant 72 heures entraîne la conversion de 97% de l'acide α -éléostéarique de cette l'huile en acide β -éléostéarique.

2. TRAVAUX REALISES

Dans la deuxième partie de notre étude, nous nous intéressons maintenant à la transformation des acides gras de la famille des CLnA, en particulier l'acide α -éléostéarique (C18 :3 9c, 11t, 13t), issu de l'huile des graines de *Ricinodendron heudelotii* **Figure 5**.

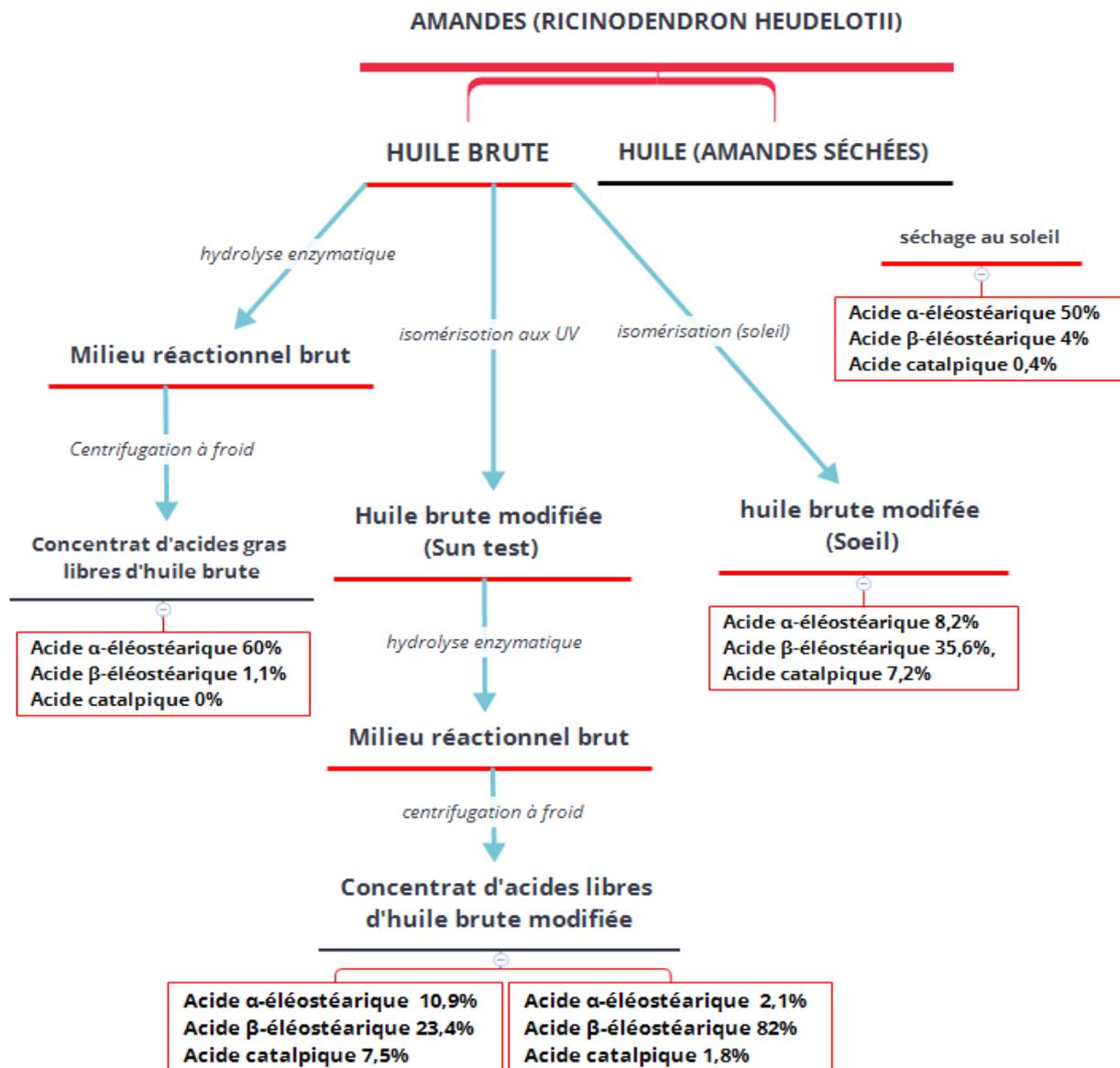


Figure 5: Schéma directeur des travaux réalisés sur l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique

Chapitre 2

Nous allons présenter les travaux sur l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique dans l'huile et dans les concentrats d'acides gras libres de *Ricinodendron heudelotii* en acide β -éléostéarique et en acide catalpique. L'isomérisation a été réalisée par exposition des échantillons aux rayons ultraviolets naturels (soleil) et artificiels (Sun Test).

A ce stade, le schéma directeur de nos travaux de recherche met en exergue 6 substrats impliqués dans la préparation d'huiles de *Ricinodendron heudelotii* et de ses acides gras libres. Il s'agit de :

- Huile brute des amandes isolées par la méthode de décorticage mécanique manuel,
- Huile brute modifiée extraite à partir des amandes obtenues par la méthode de traitement thermique traditionnel (séchage des graines et des amandes au soleil),
- Huile brute modifiée par séchage au soleil pendant 6 mois,
- Huile brute modifiée par exposition accélérée aux UV au moyen du Sun test pendant 12 heures,
- Concentrat d'acides gras libres de l'huile brute,
- Concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée.

Sur chacun de ces substrats nous pratiquons l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique.

Cette étude s'appuie sur l'analyse des spectres des profils d'acides gras obtenus par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Des données cinétiques (temps de réaction, rendement, taux de conversion) sont collectées avec en prime le suivi de l'évolution de la teneur en acides gras polyinsaturés conjugués, l'acide α -éléostéarique, l'acide β -éléostéarique et l'acide catalpique.

2.1. Isomérisation en cascade par couplage des UV et de l'hydrolyse enzymatique de l'huile brute de *Ricinodendron heudelotii*

2.1.1. Traitement aux Sun test

100 g d'huile brute ou 100 g de concentrat d'acides gras libres obtenu par hydrolyse enzymatique (Lipase *Candida rugosa*) de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* sont introduits séparément dans deux cristallisoirs de 200 mL. Les échantillons sont ensuite introduits dans un appareil SUNTEST de type CPS+. Cet appareil est utilisé pour l'étude du vieillissement accéléré des huiles dans les conditions suivantes : le système est réglé sur une immersion permanente (12 h), la température de la chambre d'exposition est régulée de 30°C à 55°C,

Chapitre 2

l'intensité de l'irradiation est contrôlée et varie de 300 à 800 nm avec une puissance oscillant entre 250 et 765 W/m². Le système de filtrage (filtre C) utilisé simule l'exposition de l'échantillon derrière une vitre de 3 millimètres d'épaisseur.

2.1.2. Isomérisation par les rayons du soleil

Dans cette expérience, la source de rayons ultraviolets utilisée est le soleil. Dans deux flacons de 15 mL, nous avons introduit 10 mL d'huile dans chaque flacon. Un flacon enveloppé par du papier aluminium est utilisé comme témoin. Les deux flacons sont ensuite placés à la lumière du jour (longueur d'onde du visible 400-800 nm) pendant 6 mois (septembre 2015 à février 2016) au laboratoire de chimie agro-industrielle, à Toulouse. Les échantillons (huile brute) sont exposés à une irradiation moyenne de 3470 Wh/m² par mois [43].

2.2. Libération des acides gras natifs de l'huile par hydrolyse enzymatique

Les huiles des amandes de *Ricinodendron heudelotii* (huile brute et huile brute modifiée) ont été hydrolysées en milieu aqueux, suivant la méthode mise au point par Mouloungui et Mechling en 2004 et utilisée pour l'hydrolyse des huiles végétales [44,45].

L'hydrolyse enzymatique des triglycérides des huiles est réalisée dans un réacteur double enveloppe de 1 litre relié à un bain thermostaté régulé 37°C. Cette température est la température d'activation de la lipase utilisée (lipase CC). Le réacteur est équipé d'un homogénéisateur (Model L4RT, Silverson Machines LTD. Chelsam, England).

Le rapport huile/Eau utilisé est de 1/1. 500 g d'huile brute ou d'huile brute modifiée et 400 mL d'eau sont introduits dans le réacteur. Une quantité de 5 g de la lipase LCC a été dispersée dans 100 mL d'eau sous agitation (400 rpm) pendant 10 min et l'ensemble est ajouté dans le réacteur, et homogénéisé pendant 2 heures à une vitesse de 1000 rpm.

A la fin de l'hydrolyse de chaque huile (2 heures), le milieu réactionnel est centrifugé deux fois à 15°C pendant 15 minutes. Les phases organiques sont ensuite séparées de la phase aqueuse et conservées à 4°C.

Chapitre 2

2.2.1. Profils d'esters partiels de glycérol et de triglycérides par HPSEC-ELSD

HPSEC-ELSD est utilisé pour suivre la conversion des triglycérides des huiles et la formation/conversion des mono et des diglycérides. Les conditions d'analyse sont précisées ci-après. L'éluant utilisé est le tétrahydrofurane (THF) avec un débit de 0,8 mL/min. La température du four est maintenue à 35°C. Un détecteur de type ELSD de marque ALLTECH 3300 est utilisé. Il est réglé à 35°C avec un débit du gaz (air) de 1,6 mL/min. Le gain de l'appareil est fixé à 1.

L'identification et la quantification des différents esters partiels (monoglycérides MG, diglycérides DG), de triglycérides (TG) et d'acides gras libres (AGL) est basée sur la comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux de standards commerciaux (Trilinolein, 1,3-dioléoyl-glycérol, 1-linoléoyl-rac glycérol et acide linoléique) de chez Sigma-Aldrich.

2.2.2. Profils acides gras des huiles et des concentrats d'acides gras libres

La détermination du profil en acides gras des produits a été réalisée par dérivation des acides gras suivant la méthode de Tri Méthyl Sulfonium Hydroxide (TMSH) [46].

Le produit (15 mg) a été solubilisé dans 1 mL de TBME (Tert-Butyl Méthyl Ether). 100 µL de cette solution sont méthylés à l'aide de 50 µL TMSH (Tri Méthyl Sulfonium Hydroxide) à 0,2 mol/L dans le méthanol. Les esters méthyliques d'acides gras obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

L'appareil utilisé est de type Varian 3900. 1 µL de la solution est injecté dans ce spectromètre, sous les paramètres suivants : injecteur en mode split, rapport de 1/100, 250°C (55 min); Colonne de type CP-Select CB for FAME fused silica WCOT, 50 m x 0,25 mm, épaisseur du film 0,25 µm; gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1,2 mL/min. Température du four : T initial 185°C pendant 40 minutes, puis augmentée de 15°C/min jusqu'à 250°C, et maintenue à 250°C pendant 11 min.

L'identification des esters méthyliques d'acides gras est basée sur la comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux d'un mélange de standards commerciaux, le Mix 37 (Sigma Aldrich) qui est un mélange de FAME à 37 composantes.

Chapitre 2

Le Mix 37 est composé de standards d'esters méthyliques en C18:3 (l'acide α -linoléniq ue et γ -linoléniq ue). Ces esters méthyliques en C18:3 permettent d'identifier les esters méthyliques de CLnA dans l'analyse GC de l'huile brute et dans les concentrats d'acides gras libres.

2.2.3. Caractérisation par analyse ATR-IRTF

Les spectres infrarouges des produits sont obtenus à partir d'un spectromètre à transformée de Fourier IR-TF (Spectrum 65, Perkin Elmer) associé à un appareil ATR équipé d'un cristal de diamant ATR avec des caractéristiques suivants (type IIa Diamant 45°, dimension 2 mm x 2 mm, profondeur de pénétration de 2,0 μm).

Les spectres sont recueillis en triple à partir de portions différentes dans chaque produit. Toutes les mesures ont été réalisées à température de la salle (22°C). Tous les spectres ATR-IRTF sont recueillis à une résolution de 4 cm^{-1} sur la gamme de 4000 à 600 cm^{-1} avec 16 scans. Les données sont traitées à l'aide du logiciel ATR-FTIR (la correction ATR ensuite la dérivée seconde à 5 points). La technique ATR-IRTF est utilisée pour suivre la conversion des triglycérides de l'huile et la formation des acides gras. Il s'en suit la caractérisation des acides gras libres par ATR-IRTF.

2.2.4. Viscosité dynamique des matrices huiles

Les mesures de viscosité ont été réalisées sur un rhéomètre MCR-302 Anton Paar en utilisant une géométrie de cône en acier de diamètre 50 mm avec un angle de 1,998°. La viscosité de l'huile brute et celle de l'huile brute modifiée ont été mesurées en déposant directement 1,4 g de matière sur le plateau à 20 °C contrôlé par un bain thermostaté.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Etude de l'isomérisation de l'acide α -éléostéariq ue dans des huiles

Dans cette partie, trois substrats ont été étudiés à savoir l'huile brute, l'huile brute exposée et modifiée au soleil et l'huile brute exposée aux rayons UV et modifiée par Sun test.

3.2. Suivi de l'isomérisation de l'acide α -éléostéariq ue par chromatographie en phase gazeuse dans les triglycérides de l'huile de *Ricinodendron heudelotii*

Le résultat des chromatogrammes des esters d'acides gras de l'huile brute et de l'huile brute modifiée issues des amandes de *Ricinodendron heudelotii* est affiché dans la **Figure 6**.

Chapitre 2

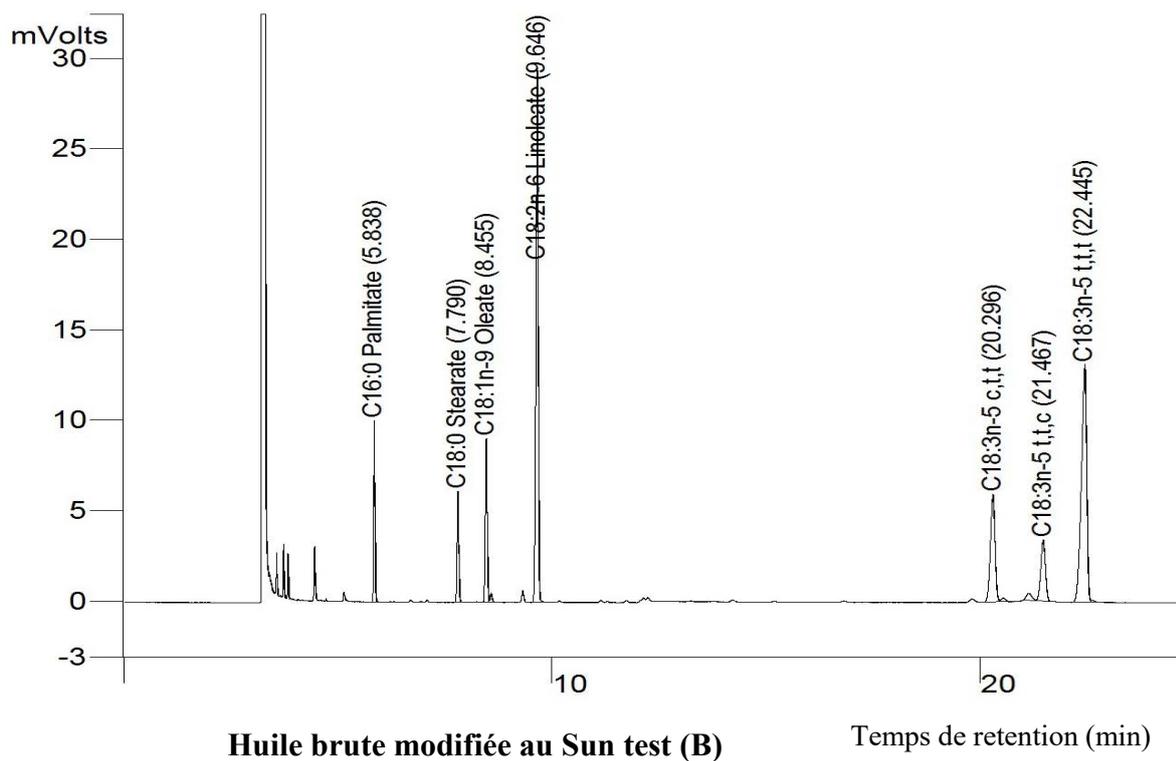
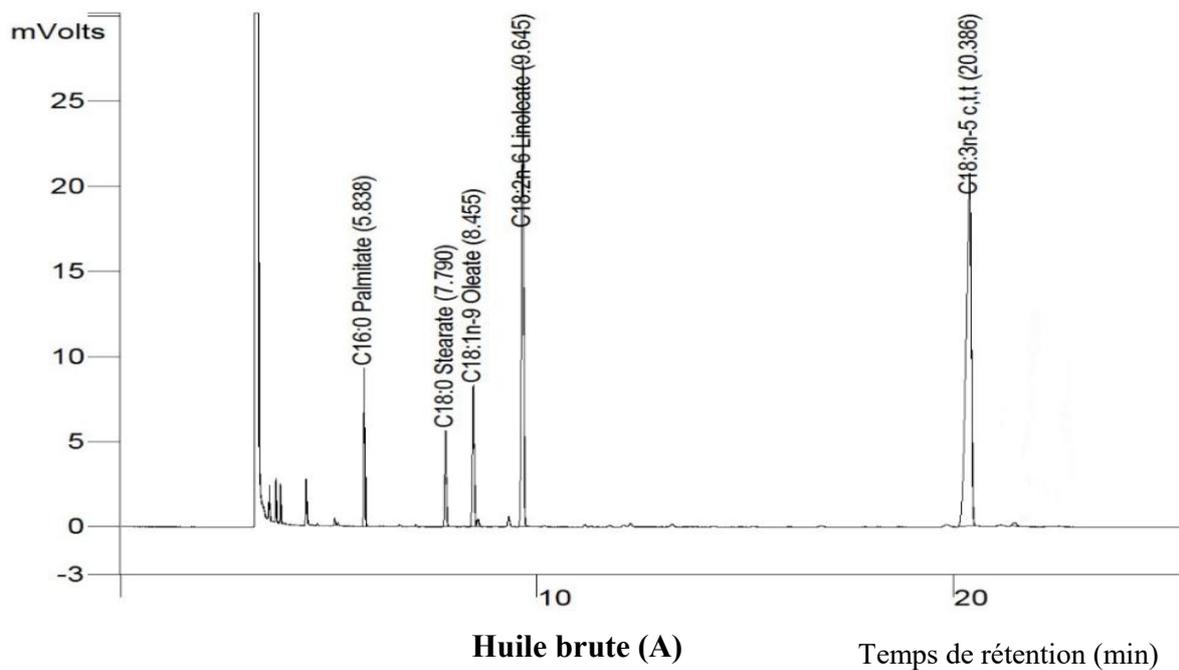


Figure 6: Chromatogrammes des esters méthyliques d'acides gras de l'huile brute (A) et de l'huile brute modifiée au Sun test (B) de *Ricinodendron heudelotii*.

Chapitre 2

Les constituants figurant sur ce spectre sont des esters d'acides gras. Ils sont retenus en fonction du nombre d'atomes de carbone. Cette rétention se fait suivant l'ordre croissant du nombre d'atomes de carbone des composés. Les constituants ayant de petits nombres d'atomes apparaissent les premiers, ceux avec des nombres d'atomes élevés sont les plus retenus.

Dans une même famille d'esters d'acides gras de même nombre d'atomes de carbone, les constituants sont retenus en fonction de leur polarité engendrée par les insaturations des doubles liaisons sur les chaînes d'acides gras. Les molécules avec des doubles liaisons polaires sont les premières à être retenues. Pour un même composé, la rétention des isomères se fait en fonction de la configuration des doubles liaisons *cis* et *trans*.

Le chromatogramme du profil d'esters d'acides gras de l'huile brute est composé de deux familles d'acides gras C16 et C18 dans les triglycérides.

Dans la famille des esters d'acides gras saturés, l'acide palmitique C16:0 est bien séparé par rapport à l'acide stéarique C18:0 avec un $\Delta RT=1,95$ min. Le temps de rétention est fonction du nombre d'atomes de carbone.

Dans la famille des esters acides gras insaturés en C18, les temps de rétention se resserrent entre eux avec l'acide oléique (C18:1) à 8,455 min, l'acide linoléique (C18:2) à 9,646 min et l'acide α -éléostéarique (C18:3) à 20,386 min. Il s'avère que l'acide α -éléostéarique $t_r=20,386$ min par ses trois doubles liaisons est le plus retenu par rapport à l'acide oléique $t_r=8,455$ min et l'acide linoléique $t_r=9,646$ min. L'ordre de rétention est influencé par la polarité générée par l'insaturation des doubles liaisons. Plus la chaîne carbonée est chargée en double liaison, plus le temps de rétention est long.

L'ordre de rétention des constituants sous la forme d'ester d'acides gras de l'huile brute modifiée, **Figure 6 B** est la suivante ; l'acide palmitique (C16:0) à 5,838 min, l'acide stéarique (C18:0) à 7,790 min, l'acide oléique (C18:1) à 8,445 min et l'acide linoléique (C18:2) à 9,646 min.

La zone de rétention des composés CLnA (C18:3) compris entre 20 et 23 min. Elle est caractérisée par la présence de 3 pics identifiés comme étant l'acide α -éléostéarique (C18:3n-5 9c,11t,13t) à 20,296 min, l'acide catalpique (C18:3n-5 9t,11t,13c) à 21,467 min et l'acide β -éléostéarique (C18:3n-5 9t, 11t,13t) à 22,445 min.

Chapitre 2

Ces acides gras polyinsaturés conjugués (CLnA) ont le même nombre de carbone (18) et de doubles liaisons (3). Les acides gras CLnA de l'huile brute et de l'huile brute modifiée des amandes de *Ricinodendron heudelotii* (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) ont été formellement identifiés par comparaison avec le profil acides gras de l'huile de tung (80% d'acide α -éléostéarique), de l'huile de grenade (80% d'acide punicique) et l'huile de catalpa (30% d'acide catalpique).

En comparant les temps de rétention des CLnA, on observe que les temps de rétention se resserrent entre les CLnA aux doubles liaisons de configuration alternée (acide α -éléostéarique C18:3n-5 9c,11t,13t tr = 20,296 min ; acide catalpique C18:3n-5, 9t,11t,13c tr = 21,467 min) par rapport au temps de rétention de l'acide β -éléostéarique C18 :3n-5 9t,11t,13t avec tr=22,445 min.

Ce dernier contient trois doubles liaisons conjuguées de configuration homogène (*trans*). Ainsi, l'ester d'acide gras le moins retenu est celui portant un système de doublets avec plus de liaisons de configuration *trans*.

Ces résultats montrent clairement que l'exposition de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* aux rayons UV entraîne la conversion de l'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique et acide catalpique. Donc le mode d'extraction des amandes détermine la composition chimique des huiles obtenues de ces amandes.

3.2.1. Aspect des huiles avant et après exposition aux rayons UV (cas du Sun test)

L'huile brute et l'huile brute modifiée par Sun test pendant 12 heures sont représentées par la Figure 7.



Figure 7: Huile brute (A), huile brute modifiée (B)

Chapitre 2

La différence entre les deux huiles est nette. L'huile brute est un liquide fluide à température ambiante avec une coloration jaunâtre (A). Elle change d'aspect après son exposition aux UV (Sun test). Elle devient pâteuse, très visqueuse avec une coloration blanchâtre (B).

Le **Tableau 5** regroupe les profils acides gras et la viscosité dynamique des huiles de lin, de soja, de tung, et de l'huile brute, de l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii* à 20°C.

Tableau 5 : Profils acides gras et viscosité dynamique à 20°C des huiles polyinsaturées

Profil acides gras (%)	Lin	Soja	Tung	<i>Ricinodendron heudelotii</i>	
				Huile brute	Huile brute modifiée
Acides gras saturé	9,3	16	5,2	8,9±0,1	10,5±0,0
Acide oléique C18:1	16,7	23,5	11,2	7,1±0,1	8,4±0,0
Acide linoléique C18:2	14,2	53	14,6	22,8±0,0	29,5±0,2
Acide linoléique C18:3	59,8	7,5	--	--	--
Acide α -éléostéarique C18:3c, t, t	--	--	69	60,1±0,2	12,6±0,0
Acide catalpique C18:3t, t, c,	--	--	--	0±0,1	7±0,1
Acide β -éléostéarique C18:3t, t, t	--	--	--	1,1±0,0	32±0,1
Viscosité dynamique (mPa.s)	57	75	363	142,9 ± 0,3	502,5± 0,5

Le choix de l'huile de lin, de l'huile de soja et de l'huile de tung représente un bon support pour montrer le rôle respectif des acides gras polyinsaturés fluides des CLA par rapport aux acides gras polyinsaturés des CLnA sur les propriétés physiques des huiles respectives les contenant. Les triglycérides des CLA sont constitués d'acides C18:2 et C18:3 contre les CLnA qui contiennent des C18:3 5n avec une configuration conjuguée. Leur configuration diverse est responsable de la variation de la viscosité

Chapitre 2

Selon les études de Blayo *et al.*, (2001) les huiles riches en CLA, l'huile de lin à une viscosité dynamique de 57 mPa.s et l'huile de soja une viscosité dynamique de 75 mPa.s. L'huile de tung riche en CLnA (acide α -éléostéarique) a une viscosité dynamique de 363 mPa.s [47].

Les résultats présentés dans le **Tableau 5** montrent que l'huile brute de *ricinodendron heudelotii* riche en CLnA (acide α -éléostéarique) a une viscosité dynamique de $142,9 \pm 0,3$ mPa.s et l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii* riche en CLnA (acide β -éléostéarique) a une viscosité dynamique de $502,5 \pm 0,5$ mPa.s.

L'huile de tung, l'huile brute et l'huile brute modifiée riches en CLnA (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) ont une viscosité dynamique significativement plus élevée que celles de l'huile de lin et de l'huile de soja. Cette différence de viscosité peut s'expliquer par la présence du système des trois doubles liaisons conjuguées dans les molécules de CLnA.

La viscosité dynamique des huiles riches en CLnA est fonction de la configuration des doubles liaisons conjuguées. L'huile brute modifiée par exposition aux UV a une viscosité dynamique ($502,5 \pm 0,5$ mPa.s). Cette valeur est plus élevée que celle de l'huile brute ($142,9 \pm 0,3$ mPa.s). Cela peut s'expliquer par la configuration *trans-trans-trans* des trois doubles liaisons conjuguées de l'acide β -éléostéarique présent dans cette huile, dont cette famille s'enrichit par isomérisation photochimique. La disposition particulière de ces trois doubles liaisons conjuguées de l'acide β -éléostéarique dans l'huile brute modifiée entraîne un arrangement structural organisé du milieu ce qui entraîne une augmentation de la viscosité dynamique de l'huile brute modifiée.

Dans l'huile brute, en ce qui concerne les AGPI, l'acide linoléique (22,8%), l'acide α -éléostéarique C18 :3 c, t, t (60%) confèrent le caractère fluide. La fluidité observée de cette huile brute semble conforme aux structures chimiques et aux propriétés physiques des triglycérides linoléique/linolénique de ces huiles dans lesquels les AGPI sont *cis-cis* et *trans-cis-cis*.

Chapitre 2

Dans les huiles brutes modifiées par exposition aux UV, en ce qui concerne les AGPI, on identifie l'acide linoléique dont la teneur est restée inaltérée, l'acide α -éléostéarique très réactif vis-à-vis des UV dont la teneur a fortement baissé et l'acide β -éléostéarique dont la teneur connaît une hausse considérable et l'acide catalpique.

Ce dernier est le deuxième isomère identifié comme acides gras linoléiques conjugués CLnA. Il est engendré par l'action des UVs sur l'huile de *Ricinodendron heudelotii* riche en acide α -éléostéarique.

Rappelons que ces AGPIs sont sous forme de triglycérides dans ces huiles brutes modifiées. La non-fluidité observée de l'huile brute modifiée semble conforme aux structures chimiques et aux propriétés physiques des triglycérides de ces huiles linoléiques conjuguées.

La tendance est prononcée vers la cristallisation de ces huiles via l'état pâteux. En ne tenant compte que des modifications structurales observées sur la double liaison *cis* de l' α -éléostéarique vers la double liaison *trans* dans les acides β -éléostéarique et catalpique, il apparaît que l'évolution des structures des triglycérides s'effectue de façon contradictoire en termes de stabilité. La double liaison *trans* évolue vers la double liaison *cis* par contre les huiles passent de l'état fluide (huile brute) à l'état pâteux/solide (huile brute modifiée). Cet état physique donne des matrices lipidiques hautement stables.

En revanche, l'huile brute et l'huile brute modifiée ont quasiment le même indice d'iode avec des valeurs élevées respectivement de $195,2 \pm 1,7$ et $192,8 \pm 2,1$. Ce qui est normal puisque leur nombre d'insaturations conjuguées reste le même.

3.2.2. L'isomérisation de l'acide α -éléostéarique en masse

Pour étudier l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique C18:3n-5 à partir des triglycérides de l'huile brute, les variations (Δ AG) de la teneur de chaque acide gras dans les huiles brutes et huiles brutes modifiées ont été calculées à l'aide de l'équation suivante :

$$\Delta \text{ AG} = \%AG_{(final)} - \%AG_{(initial)}$$

Δ AG représente la variation de la teneur de l'acide gras entre la fin de l'expérience (4h, 8h, 12h) et le début de l'expérience (t_0).

Les résultats des expériences réalisées au Sun Test simulant une exposition à la lumière du jour de l'huile brute sont regroupés sur **la Figure 8**.

Chapitre 2

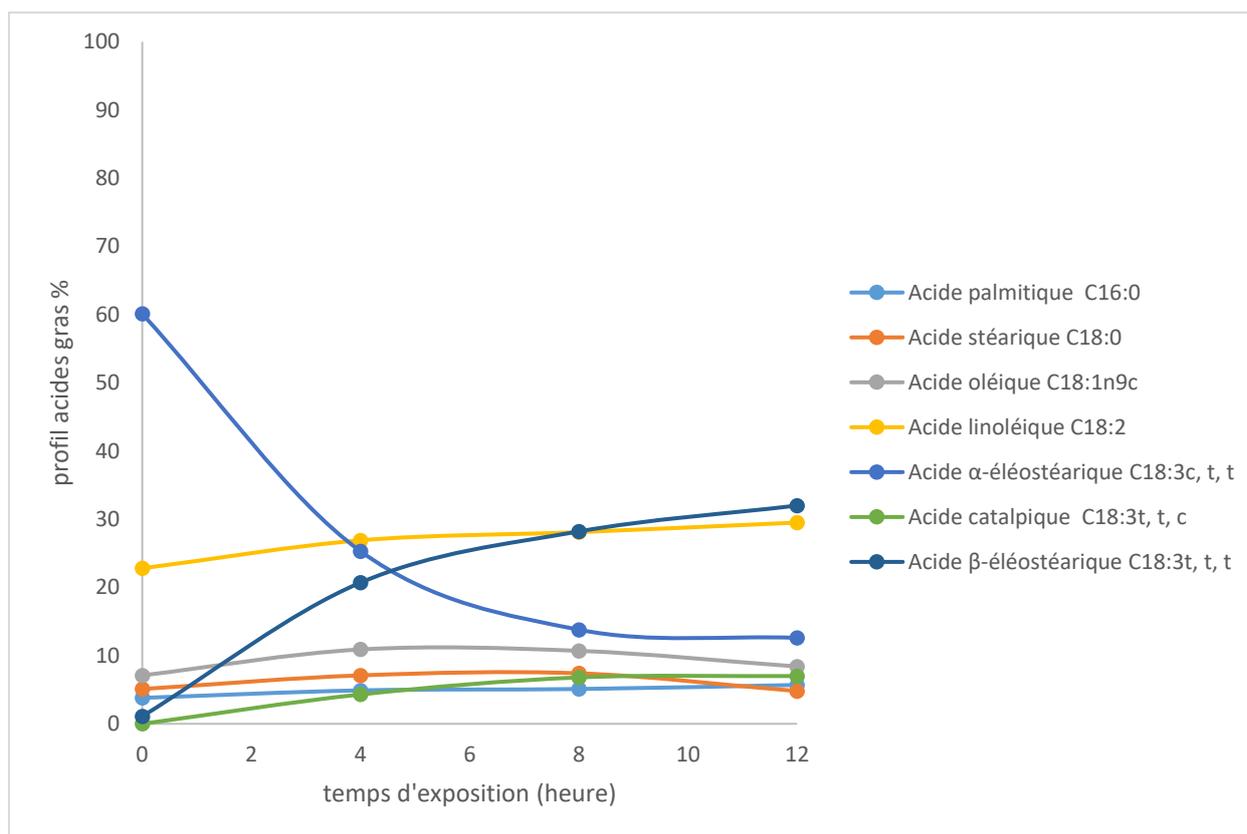


Figure 8 : Evolution des profils acides gras de l'huile brute modifiée par UV Sun Test

Les différents prélèvements des milieux d'huiles végétales exposées aux UV en 4h, 8h, 12h permettent de tracer des profils d'acides gras. Il apparaît pour les acides gras saturés et monoinsaturés une tendance à l'augmentation de leurs compositions.

Dans la famille des acides gras conjugués, la tendance baissière des teneurs en acide α -élostéarique est manifeste. La chute est forte en 4h d'exposition aux UV. Puis sa concentration se stabilise après 8h et 12h. Cette chute de concentration est au bénéfice de celles de l'acide β -élostéarique et de l'acide catalpique.

On note une diminution de 46,3 % en acide α -élostéarique au profil d'une augmentation de 27,1 % en acide β -élostéarique et de 6,8 % en acide catalpique.

En somme, l'exposition de l'huile brute aux UV pendant 12 heures au Sun Test entraîne l'isomérisation de 63% de l'acide α -élostéarique dans l'huile pour donner l'acide β -élostéarique 51,4 % et l'acide catalpique 11,6%.

Chapitre 2

Les différents prélèvements des milieux d'huiles végétales exposées aux UV naturels du soleil en 3 et 6 mois se traduisent par les profils en acides gras répertoriés sur la **Figure 9**.

Les résultats laissent paraître sans ambiguïté que l'acide α -oléostéarique diminue de 51,9 % entraînant une augmentation de l'acide catalpique de 7,2%, et de l'acide β -oléostéarique de 34,5%. Les résultats montrent clairement que l'exposition de l'huile aux rayonnements lumineux du soleil entraîne l'isomérisation de l'acide α -oléostéarique en acide β -oléostéarique et acide catalpique. En résumé, 69% de l'acide α -oléostéarique de l'huile brute s'isomérisent pour donner l'acide β -oléostéarique 57,4% et l'acide catalpique 12,0% après 6 mois d'exposition au soleil.

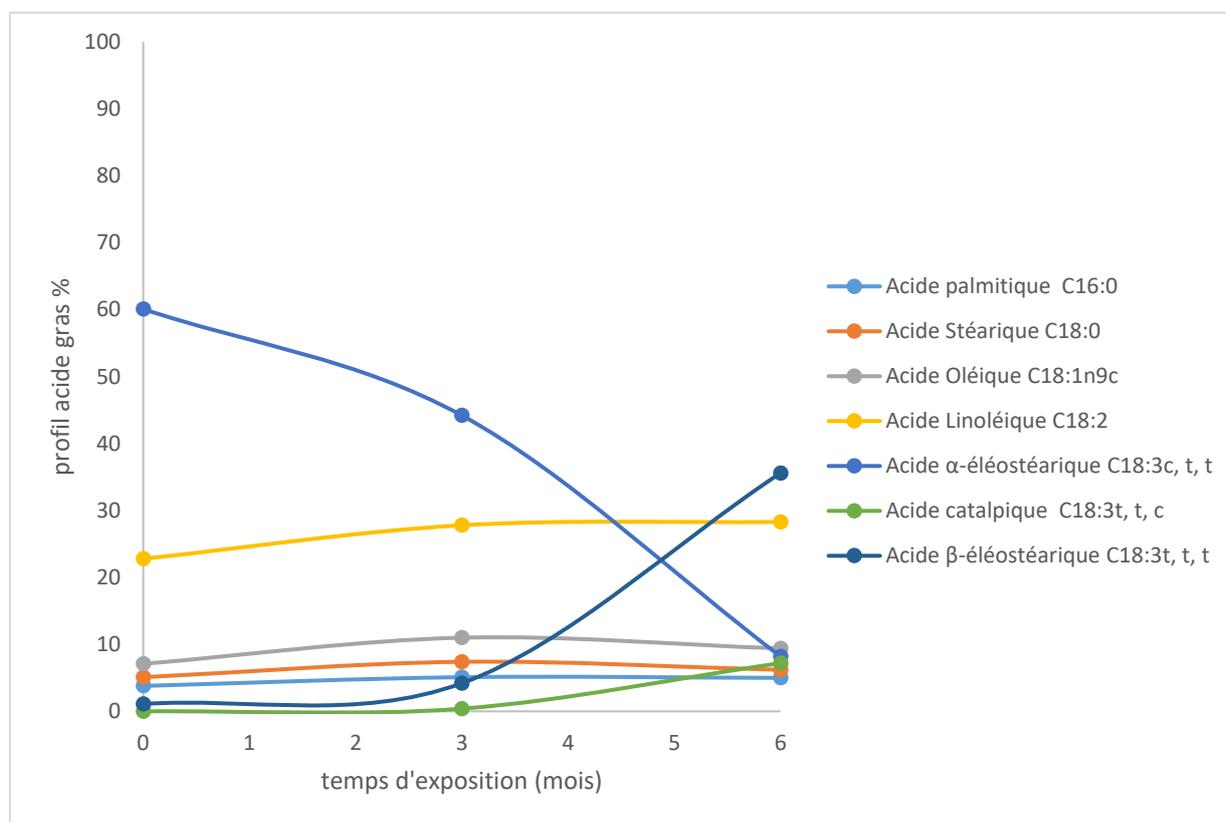


Figure 9 : Evolution des profils acides gras de l'huile brute modifiée par le soleil

De ces observations, on constate que la dose d'énergie reçue par l'huile brute dans le Sun Test après 12h ou au soleil pendant 6 mois entraîne les conversions comparables de l'acide α -oléostéarique.

Chapitre 2

Selon les études réalisées par Anna *et al.*, en 2013, l'exposition de l'huile de tung à une lumière ($\lambda=366$ nm), d'intensité $195 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ transforme en 72 heures 97% de l'acide α -éléostéarique de l'huile en deux composés identifiés comme étant des isomères [48].

Les résultats obtenus confirment la conversion de l'acide α -éléostéarique en deux acides gras isomères, l'acide β -éléostéarique et l'acide catalpique ; de plus, ceux-ci ont permis de déterminer la quantité des deux isomères formés avec un rapport acide β -éléostéarique/acide catalpique d'environ (5/1) pour les deux méthodes de conversion étudiées.

3.3. Etude de l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique dans les concentrats d'acides gras libres

3.3.1. Production d'acides gras libres par hydrolyse enzymatique

Les triglycérides de l'huile brute et huile brute modifiée par UV au Sun Test pendant 12 heures ont été hydrolysées pour former deux concentrats d'acides gras libres ; le concentrat d'acides gras libres d'huile brute et le concentrat d'acides gras libres d'huile brute modifiée. Les réactions d'hydrolyse ont été réalisées en présence de la lipase *Candida rugosa* (LCC).

Cette lipase est disponible en vrac. Elle se présente sous la forme de poudre blanchâtre lyophilisée de plus 40 000 Unité/mg. Elle a été fournie par la société Lyven (France).

L'hydrolyse de chaque huile est effectuée par catalyse dans un milieu aqueux constitué de 500 grammes d'huile, 500 mL d'eau et 5 grammes de lipase à la température de 37°C . Le système initial est hétérogène dû à la différence de polarité de l'eau, liquide polaire et de l'huile, liquide apolaire. Le système est constitué de deux phases distinctes, la phase organique (huile) au-dessus de la phase aqueuse (eau) avec la lipase de nature hydrosoluble à l'interface de l'eau et de l'huile. Le système est agité à une vitesse de 1000 rpm avec un Ultra Turrax.

Cette agitation entraîne le cisaillement du milieu pour la production de particules de petites tailles et homogène. Elle augmente les surfaces de contact entre les molécules ce qui est propice à l'activation des processus élémentaires.

A la fin de la réaction (120 minutes) le système est un mélange homogène composé d'eau, de lipase, et d'acides gras libres, de glycérol libérés *in situ*. Les mélanges obtenus après hydrolyse sont ensuite centrifugés deux fois à 15°C pendant 15 minutes à 10000 g.

Chapitre 2

On obtient d'une part deux phases (organique et aqueuse) pour l'hydrolyse de l'huile brute et d'autre part trois phases (2 phases organiques et 1 phase aqueuse) pour hydrolyse de l'huile brute modifiée. Les phases organiques sont récupérées séparément et analysées par chromatographie en phase gazeuse. La lipase de *candida rugosa* (LCC) est récupérée et réutilisée.

Les profils cinétiques des hydrolyses de l'huile brute et de l'huile brute modifiée sont représentés sur les **Figure 10** et **Figure 11**.

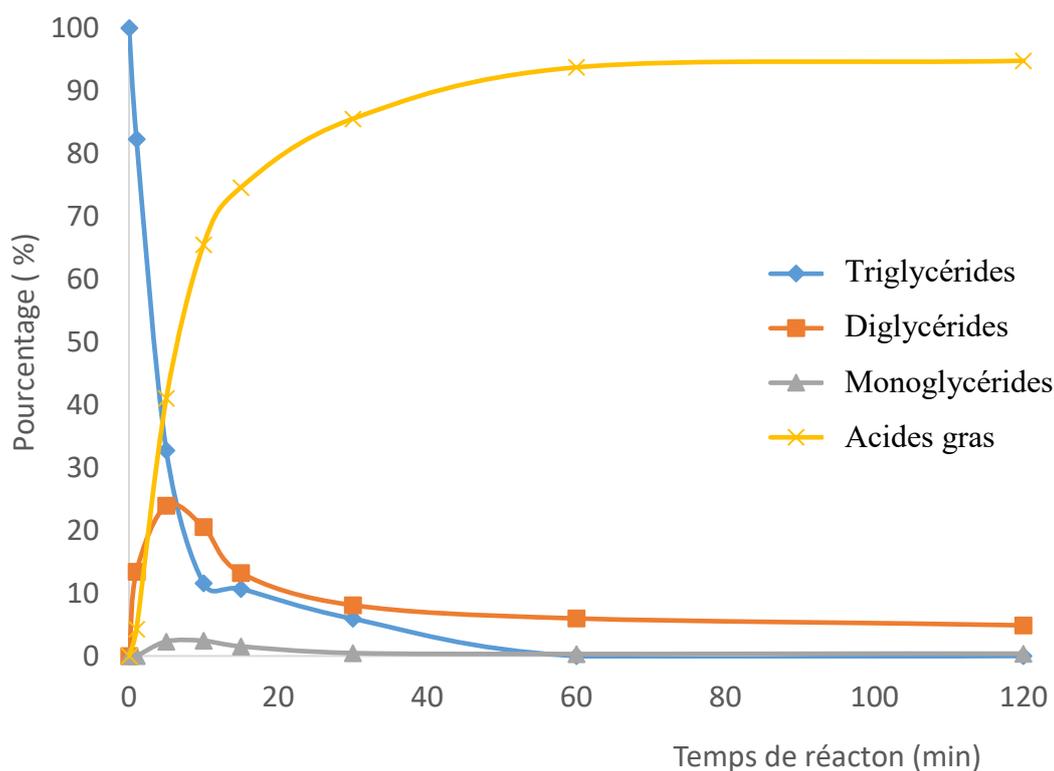


Figure 10 : Suivi cinétique de l'hydrolyse (2h) de l'huile brute de *Ricinodendron heudelotii*

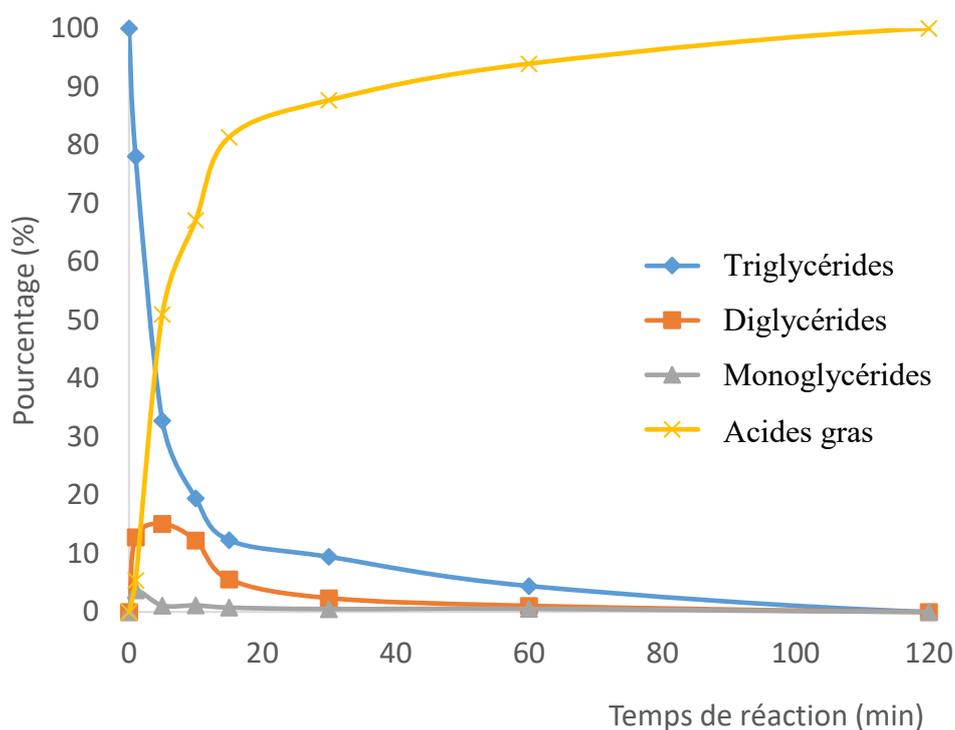


Figure 11: Suivi cinétique de l'hydrolyse de l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii*.

Le suivi cinétique des réactions, effectué à partir de différents prélèvements (1, 5, 10, 15, 30, 60 et 120 minutes) montrent que l'hydrolyse est complète au bout de 30 min pour l'huile brute et l'huile brute modifiée.

En effet, l'analyse approfondie des **Figure 10** et **Figure 11** montre qu'au bout de 30 minutes de réaction, l'hydrolyse de l'huile brute donne 85,5 %, en acides gras libres, 0,5% de monoglycérides et 8,1% de diglycérides. L'hydrolyse de l'huile brute modifiée dans les mêmes conditions donne des résultats similaires, 87,7 % d'acides gras libres, 0,5% de monoglycérides et 2,4% de diglycérides. La formation de ces intermédiaires est le résultat de la conversion des triglycérides suite à la rupture des liaisons esters.

Après 1 heure, la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'huile brute et de l'huile brute modifiée des amandes de *Ricinodendron heudelotii* produit les acides gras libres.

L'analyse HPSEC-ELSD permet de déterminer la teneur en acides gras libres à une valeur de 93,70% pour l'huile brute et une valeur de 93,95% pour l'huile brute modifiée.

Chapitre 2

L'hydrolyse de l'huile brute et celle de l'huile brute modifiée montrent que la coupure des liaisons esters complexes des triglycérides (TG) est instantanée. On n'observe pas de période d'induction. Ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'accumulation des esters partiels mono et diglycérides. Leur formation et conversion en acides gras libres se produit dans les vingt premières minutes de la réaction d'hydrolyse. L'hydrolyse de ces huiles par la lipase LCC donne lieu à une réaction complète.

Ces résultats montrent que la lipase LCC a une grande capacité lipolytique sur l'huile brute composée à 84% d'acides gras polyinsaturés avec 60,1% d'acide α -oléostéarique et de 1,1% d'acide β -oléostéarique et sur l'huile brute modifiée composée de 82% d'acides gras polyinsaturés, constituée 12,6% d'acide α -oléostéarique, de 32% d'acide β -oléostéarique et de 7% d'acide catalpique.

La lipase LCC a donc une bonne capacité lipolytique sur l'huile des amandes de *Ricinodendron heudelotii* sans observer des limitations liées à la typosélectivité ni à la régiosélectivité.

3.3.2. Production des concentrats d'acides gras libres

La séparation des acides gras repose sur la température de fusion des acides gras qui composent l'huile brute et celle des acides gras de l'huile brute modifiée. Selon les études de Albert *et al.*, (2013) et de Güner *et al.*, (2006) sur les corps gras, les acides gras polyinsaturés conjugués sont des composés à haut point de fusion, l'acide α -oléostéarique ($T_f=49^\circ\text{C}$), de l'acide β -oléostéarique ($T_f=72^\circ\text{C}$) et l'acide catalpique ($T_f=32^\circ\text{C}$), tandis que l'acide oléique ($T_f = 13^\circ\text{C}$) et l'acide linoléique ($T_f = -6,9^\circ\text{C}$) sont des composés liquides à température ambiante [31] [32].

A partir de ces valeurs nous avons séparé les acides gras libres de l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii* par centrifugation à froid. Après hydrolyse des matrices d'huile, les milieux réactionnels bruts ont été directement centrifugés à 15°C .

Chapitre 2

3.3.3. Traitement de l'hydrolysate de la matrice huile brute

Après centrifugation, le milieu réactionnel issu de l'hydrolyse de l'huile brute présente un système bi-phasique. Il est constitué par une phase inférieure liquide composée d'eau, de lipase et de glycérol et une phase organique supérieure solide.

Le **Tableau 6** rassemble les profils en acides gras des deux concentrats en AGL issus de l'huile brute et de l'huile brute modifiée. On observe la conservation de masse en acides gras avant et après hydrolyse quel que soit le concentrat.

L'acide α -oléostéarique avec une teneur de 60,1% reste l'acide gras majeur dans les triglycérides de l'huile brute et dans les acides gras libres du concentrat d'AGL de *Ricinodendron heudelotii*.

De ces résultats, nous pouvons dire que la lipase *Candida rugosa* n'induit pas la conversion de l'acide α -oléostéarique dans les conditions opérées. Elle a pour rôle la coupure des liaisons esters complexes dans les triglycérides de l'huile des amandes de *Ricinodendron heudelotii*.

Chapitre 2

Tableau 6: Comparaison du profil acides gras de l'huile brute avant et après hydrolyse

Acides gras (%)	Temps de rétention (min)	Huile brute	Concentrat d'acides gras libres de l'huile brute hydrolysée
Acide palmitique C16:0	5,84±0,001	3,8±0,0	4,2±0,0
Acide stéarique C18:0	7,79±0,004	5,1±0,1	4,8±0,0
Acide oléique C18:1	8,45±0,002	7,1±0,1	7,6±0,2
Acide linoléique C18:2	9,65±0,000	22,8±0,0	22,2±0,0
Acide α -éléostéarique C18:3c, t, t	20,27±0,605	60,1±0,2	60±0,1
Acide catalpique C18:3t, t, c	21,11±0,001	0±0,1	0±0,1
Acide β -éléostéarique C18:3t, t, t	22,41±0,002	1,1±0,0	1,2±0,0
AGS		8,9	9
AGMI		7,1	7,6
AGPI		84	83,4
CLnA		61,1	61,2

3.3.4. Séparation de l'hydrolat de l'huile brute modifiée

Le milieu réactionnel issu de l'hydrolyse de l'huile modifiée après centrifugation donne un système réactionnel tri-phasique constitué d'une phase inférieure, liquide, composée d'eau, de lipase et de glycérol, d'une phase intermédiaire organique solide de couleur blanchâtre et d'une phase supérieure organique liquide de coloration jaunâtre **Figure 12**.

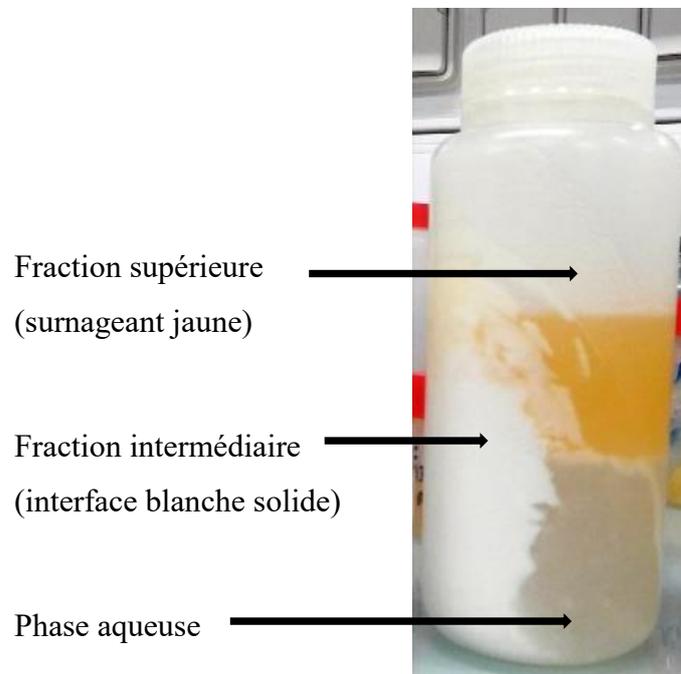


Figure 12: Centrifugation du milieu réactionnel brut de l'huile brute modifiée par hydrolyse enzymatique

Les profils acides gras de la fraction intermédiaire et de la fraction supérieure sont présentés dans le **Tableau 7**. Ces deux phases organiques (supérieure et intermédiaire) présentent des compositions différentes en acides gras par rapport au profil acides gras du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée.

Chapitre 2

Tableau 7: Comparaison de la composition chimique des huiles avant et après hydrolyse

Profils acides gras (%)	Temps de rétention (min)	Huile modifiée par UV		
		Concentrat acide gras libre milieu réactionnel brut	Hydrolysée et fractionnée	
			surnageant	Interface
Acide palmitique C16:0	5,84±0,001	5,0 ±0,2	7,2±0,0	1,8±0,0
Acide stéarique C1 :0	7,79±0,004	6,1 ±0,1	8,4±0,0	2,0±0,1
Acide oléique C18:1n9	8,45±0,002	9,4 ±0,0	8,2±0,1	2,2±0,1
Acide linoléique C18:2n6	9,64±0,000	28,7 ±0,1	34,4±0,0	7,9±0,0
Acide α-éléostéarique C18:3c, t, t	20,27±0,605	8,9±0,0	10,9±0,1	2,1±0,2
Acide catalpique C18:3t, t, c	21,11±0,001	8,0±0,1	7,5±0,1	1,8±0,0
Acide β-éléostéarique C18:3t, t, t	22,41±0,002	33,9±0,0	23,4±0,2	82,1±0,1
AGS		11,1	15,6	3,8
AGMI		9,4	8,4	2,2
AGPI		79,5	76,2	93,9
CLnA		50,8	41,8	86,0

En effet, l'hydrolyse de l'huile modifiée aux UV riche en acide β-éléostéarique (32 %) conduit à deux autres fractions de compositions différentes. On observe dans la fraction supérieure une légère variation de la teneur en acides gras saturés (l'acide palmitique et l'acide stéarique) et en acide gras monoinsaturé (acide oléique).

Par contre, on observe une forte variation des teneurs en acides gras polyinsaturés en particulier l'acide linoléique (34,4%) et acide β-éléostéarique de (23,4%).

Chapitre 2

A l'opposé, la fraction intermédiaire est caractérisée par une forte teneur en acide β -éléostéarique (82 %).

Ces résultats montrent que nous avons préparé de nouvelles fractions avec des compositions chimiques en CLnA différentes, l'une composée de 23,4% d'acide β -éléostéarique, de 10,9 % d'acide α -éléostéarique et de 7,5 % d'acide catalpique et l'autre composée 82 % d'acide β -éléostéarique.

C'est pour la première fois que nous visualisons à l'interface une teneur aussi élevée en acide β -éléostéarique.

Le traitement de l'huile brute des amandes de *Ricinodendron heudelotii* suivi de son hydrolyse par voie enzymatique permet l'obtention de fractions lipidiques enrichies en CLnA.

Il pourrait constituer, de ce fait, un moyen original de préparation et de séparation de ces trois fractions issues de l'hydrolyse des triglycérides (huile brute et huile brute modifiée) des amandes de *Ricinodendron heudelotii*.

L'huile extraite des amandes de *Ricinodendron heudelotii* se présente comme une source majeure de CLA par l'acide linoléique et de CLnA par l'acide α -éléostéarique et en particulier par l'acide β -éléostéarique.

3.3.5. Etude de l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique des acides gras libres de l'huile brute.

Le **Tableau 8** regroupe le profil acides gras du concentrat d'acides gras de l'huile brute et du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiés par les rayons UV.

Chapitre 2

Tableau 8: Profils acides gras des deux matrices de concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et de concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifié par UV.

Profils acides gras (%)	Temps de rétention (min)	Concentrat d'acides gras libres de l'huile brute	Concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifié
Acide palmitique C16 :0	5,84±0,001	4,2±0,0	6,6±0,0
Acide stéarique C18 :0	7,79±0,004	4,8±0,0	8,4±0,1
Acide oléique C18:1n9	8,45±0,002	7,6±0,2	6,7±0,0
Acide linoléique C18:2n6	9,64±0,000	22,2±0,0	22,8±0,1
Acide α -éléostéarique C18:3c, t, t	20,27±0,605	60±0,1	7±0,1
Acide catalpique C18:3t, t, c	21,11±0,001	0±0,1	5,8±0,0
Acide β -éléostéarique C18:3t, t, t	22,41±0,002	1,2±0,0	42,8±0,2
AGS		9	15
AGMI		7,6	6,7
AGPI		83,4	78,4
CLnA		61,2	55,6

Sous l'influence des rayons ultraviolets le profil acides gras des concentrats de l'huile brute des amandes de *Riciodendron heudelotii* avant et après exposition change. On observe que les teneurs en acides gras saturés (acide palmitique +2,8% et acide stéarique +3,3%), de l'acide oléique -0,4% varient peu. Celles de l'acide linoléique restent quasi identiques. Par contre, la teneur en CLnA subit une forte modification. On observe une diminution de 53,1 % en acide α -éléostéarique et une augmentation de 41,7% en acide β -éléostéarique et de 5,8 % en acide catalpique **Tableau 8**.

Chapitre 2

L'exposition du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute aux rayons UV (Sun Test) pendant 12 heures entraîne l'isomérisation de 80 % de l'acide α -éléostéarique dans le concentrat. Cette portion d'acide α -éléostéarique se convertit en acide β -éléostéarique à 70 % et en acide catalpique à 10 %.

3.3.6. Caractérisation chimique des concentrats en acides gras libres par ATR-IRTF.

Le concentrat d'acides gras libres d'huile brute composée de 60% d'acide α -éléostéarique (C18:3n5 9c, 11t, 13t) et la fraction intermédiaire issue de l'hydrolyse de l'huile brute modifiée composée de 82 % d'acide β -éléostéarique (C18:3n5 9t, 11t, 13t) (**Figure 13**) ont été analysées par ATR-IRTF.

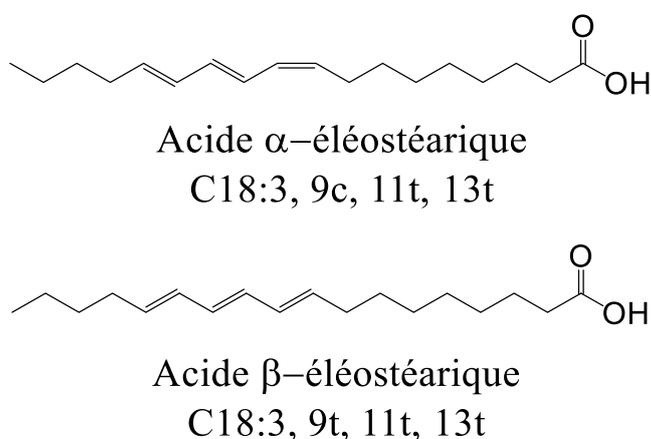


Figure 13 : Structures des acides α -éléostéarique et β -éléostéarique

La caractérisation structurale de ces deux CLnA a été réalisée par couplage de ATR et de IRTF dans un appareil intégré. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier par la méthode de la réflectance totale atténuée (ATR-IRTF). L'analyse est effectuée à 25°C directement sur les concentrats d'acides gras libres sans préparation préalable.

La méthode ATR est idéale pour l'analyse des échantillons composés d'acides gras insaturés avec une double liaison de configuration *trans* de forte absorbance qui produisent souvent des pics intenses. C'est le cas par exemple de l'acide élaïdique C18:1 n-9 avec une double liaison *trans* qui a un pic d'absorption intense à 966 cm^{-1} .

Chapitre 2

Cette méthode d'analyse (ATR-IRTF) est donc adaptée à nos échantillons qui sont composés de CLnA, de l'acide α -éléostéarique et acide catalpique avec 2 doubles liaisons *trans* conjuguées et de l'acide β -éléostéarique avec 3 doubles liaisons *trans* conjuguées.

Les **Figure 14** et **Figure 15** représentent les spectres ATR-IRTF du concentrat en acides gras de l'hydrolyse de l'huile brute et le concentrat en acide gras libre composé de 82% d'acide β -éléostéarique obtenu après hydrolyse de l'huile brute modifiée.

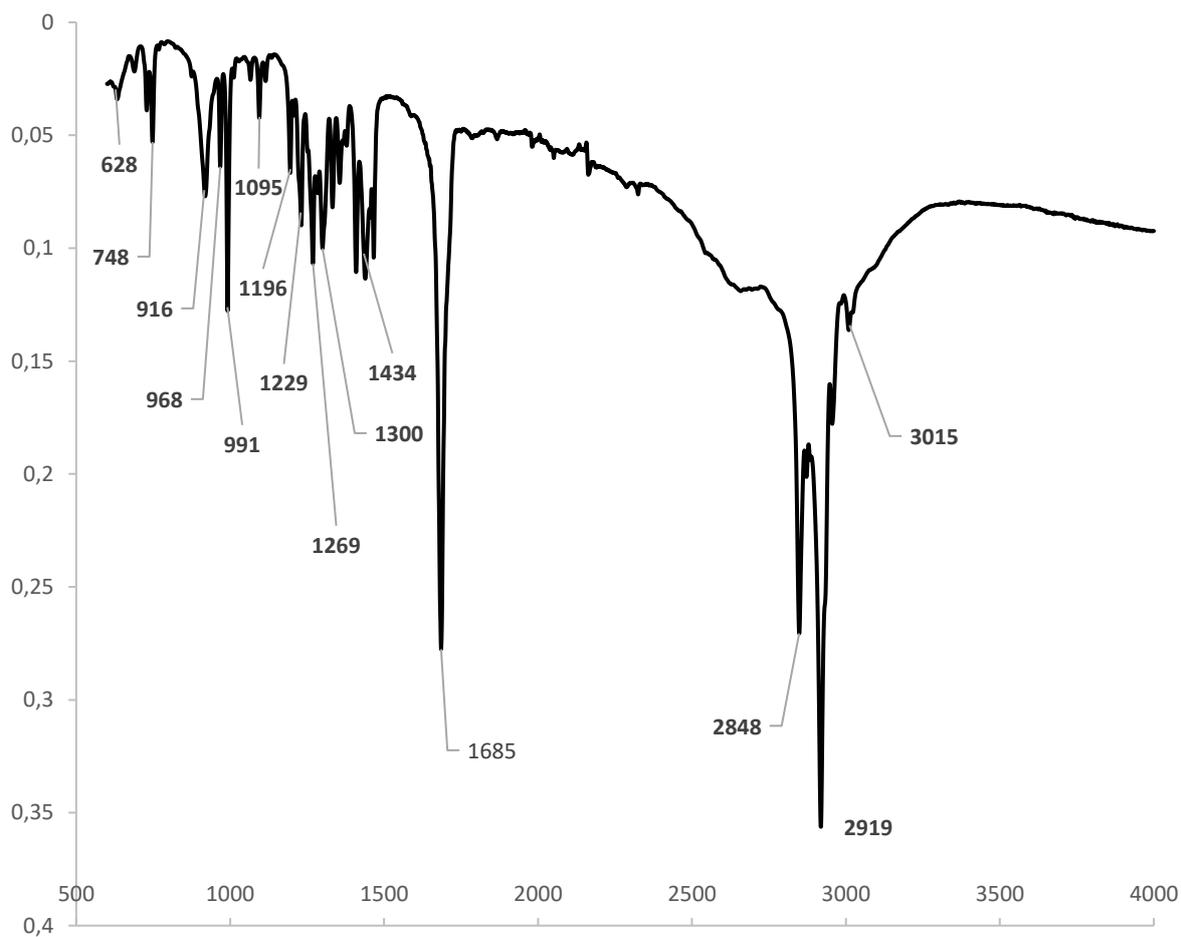


Figure 14 : Spectre ATR-IR du concentrat d'acides gras après hydrolyse enzymatique de l'huile brute de *Ricinodendron heudelotii*.

Chapitre 2

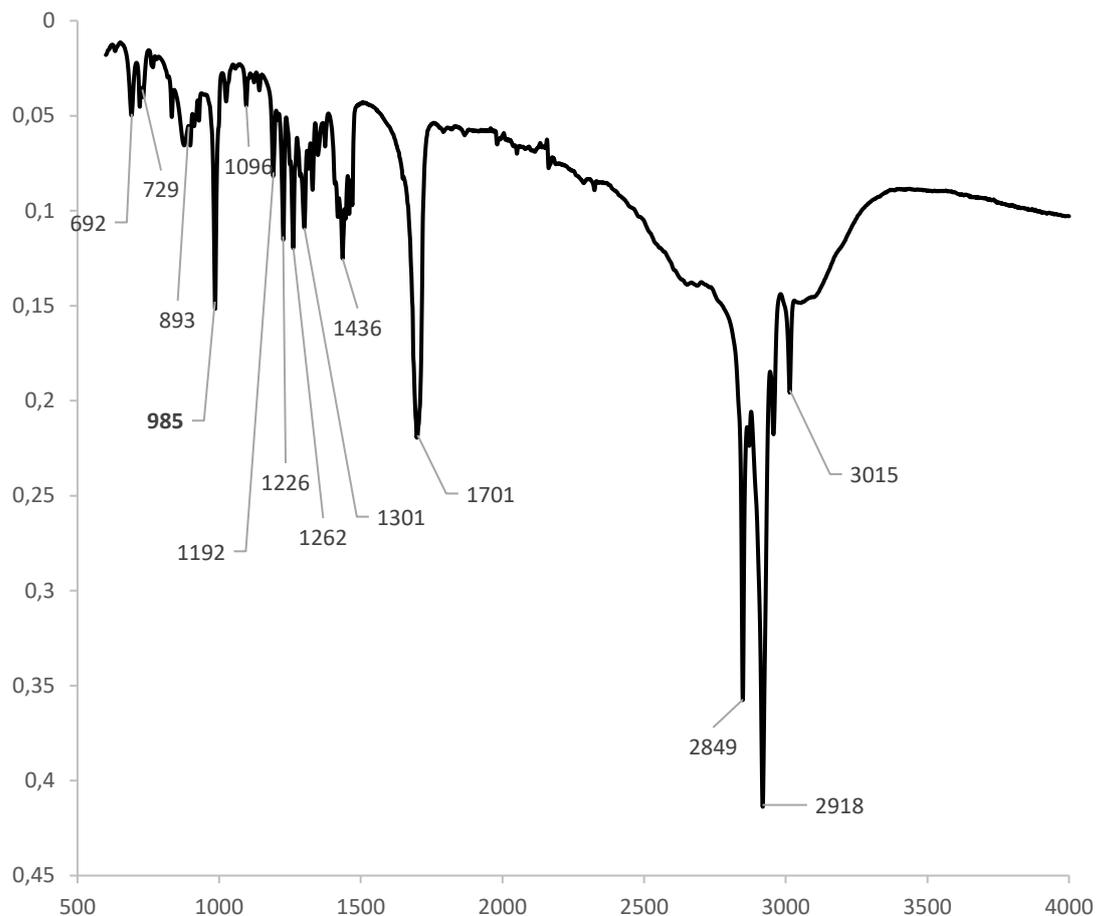


Figure 15 : Spectre ATR-IRTF du concentrat acide gras libre composé de 82% d'acide β -élostéarique obtenu après hydrolyse enzymatique de l'huile brute modifiée.

Le **Tableau 9** rassemble les différentes valeurs de bandes observées sur les spectres des deux échantillons analysés.

Les spectres du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et du concentrat d'acides gras libres composé de 82% d'acide β -élostéarique de l'huile brute modifiée peuvent être divisés en quatre zones de bandes d'absorption caractéristiques.

Chapitre 2

Tableau 9: Les principales bandes d'absorption ATR-IRTF relevées des structures constituantes du concentrat d'acide gras libre huile brute et de la fraction intermédiaire composé de 82% d'acide β -éléostéarique.

Zones	Concentrat d'acide gras libre huile brute	fraction intermédiaire	Intensité	Attribution
(500-1000 cm^{-1})	628	692	Faible	
	746	729	Faible	Déformation -CH-
	916	893	Faible	
	968	----	Faible	Elongation HC=CH
	991	985	Forte	
(1000-1500 cm^{-1})	1095	1096	Faible	
	1199	1192	Moyenne	
	1229	1226	Moyenne	Elongation C-O
	1269	1262	Moyenne	
	1300	1301	Moyenne	
(1600-1700 cm^{-1})	1434	1436	Moyenne	Déformation C-H, CH ₃
	1685	1701	Forte	Elongation C=O
(2800-3100 cm^{-1})	2848	2849	Forte	Elongation CH
	2919	2918	Forte	
	3015	3015	Faible	Elongation HC=CH

La zone (2800-3100 cm^{-1}) correspond aux élongations des C-H pour les chaînes saturées et insaturées. Dans cette zone on observe la présence de la bande à 3015 cm^{-1} avec une intensité faible. Cette bande est caractéristique des doubles liaisons *cis* de l'acide oléique C18:1, 9c et de l'acide linoléique C18:2, 9c, 12c qui sont des composants du concentrat des acides gras libres de l'huile brute et du concentrat composé de 82% d'acide β -éléostéarique.

Chapitre 2

– La zone (1600-1700 cm^{-1}) correspond aux élongations C=O de la fonction carboxylique des acides gras. Elles révèlent une forte intensité.

– La zone (1000-1500 cm^{-1}) est caractéristique des élongations C-O des acides carboxylique et les déformations C-H (Csp^3).

– La zone (500-1000 cm^{-1}) est caractéristique des élongations HC=CH et des déformations $(\text{CH})_n$ avec n supérieure à 4. Cette zone représente l’empreinte des doubles liaisons éthyléniques. On observe que le spectre ATR-IRTF du concentrat d’acides gras libres de l’huile brute (60% d’acide α -éléostéarique) présente deux bandes d’absorption à μ ($\text{C} = \text{C}$) $\simeq 968 \text{ cm}^{-1}$ faible et à μ ($\text{C} = \text{C}$) $\simeq 991 \text{ cm}^{-1}$ forte. Elles indiquent la présence des doubles liaisons de configuration *trans*. Le spectre ART-IRTF du concentrat d’acides gras libres de l’huile brute modifiée (fraction intermédiaire), composé de 82% d’acide β -éléostéarique présente une bande intensité forte à μ ($\text{C} = \text{C}$) $\simeq 985 \text{ cm}^{-1}$ caractérisant les trois double liaisons *trans* conjuguées.

Par l’absence des fréquences des liaisons esters, ces spectres infrarouges sont caractéristiques des réactions d’hydrolyses complètes de l’huile brute et de l’huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii*. L’absence des fréquences des liaisons OH des hydroxyles du glycérol traduit l’hydrolyse totale de triglycérides et leur conversion en acides gras polyinsaturés.

Ces résultats montrent qu’il n’y a donc pas d’esters partiels (mono, diglycérides) et de triglycérides dans le milieu, cela confirme que l’hydrolyse de l’huile brute ou de l’huile modifiée de *Ricinodendron heudelotii* avec la lipase LCC conduit à une hydrolyse complète par la rupture des liaisons esters. Les valeurs des bandes d’absorption des fonctions éthyléniques confirment l’isomérisation de l’acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique et en acide catalpique.

Chapitre 2

3.4. Mécanisme d'isomérisation et/ou de réarrangement de l'acide α -éléostéarique dans les structures de triglycérides.

Le **Schéma 1** est une illustration de la conversion de l'acide α -éléostéarique dans les triglycérides de l'huile brute. Le triglycéride choisi est la triéléostéarine avec 3 α -éléostéarique.

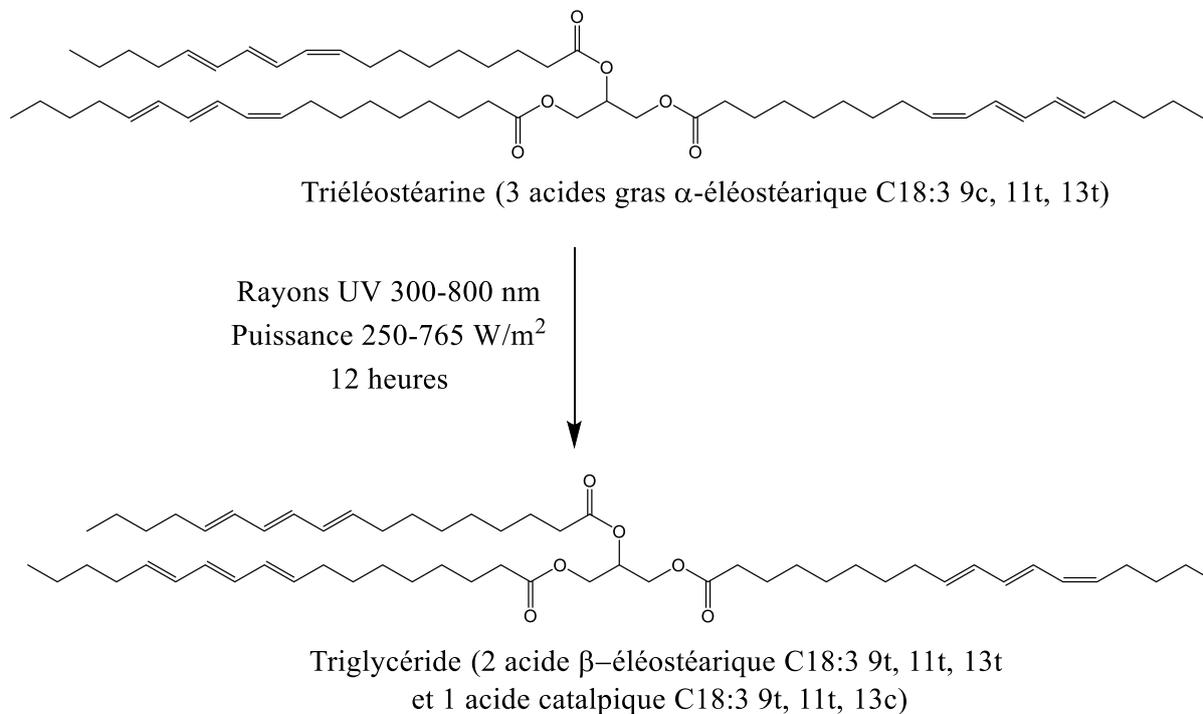


Schéma 1 : Isomérisation par réarrangement de l'acide β -éléostéarique dans l'huile brute

Le **Schéma 2** est une illustration de la conversion de l'acide α -éléostéarique dans le concentrat d'acide gras libres de l'huile brute.

Chapitre 2

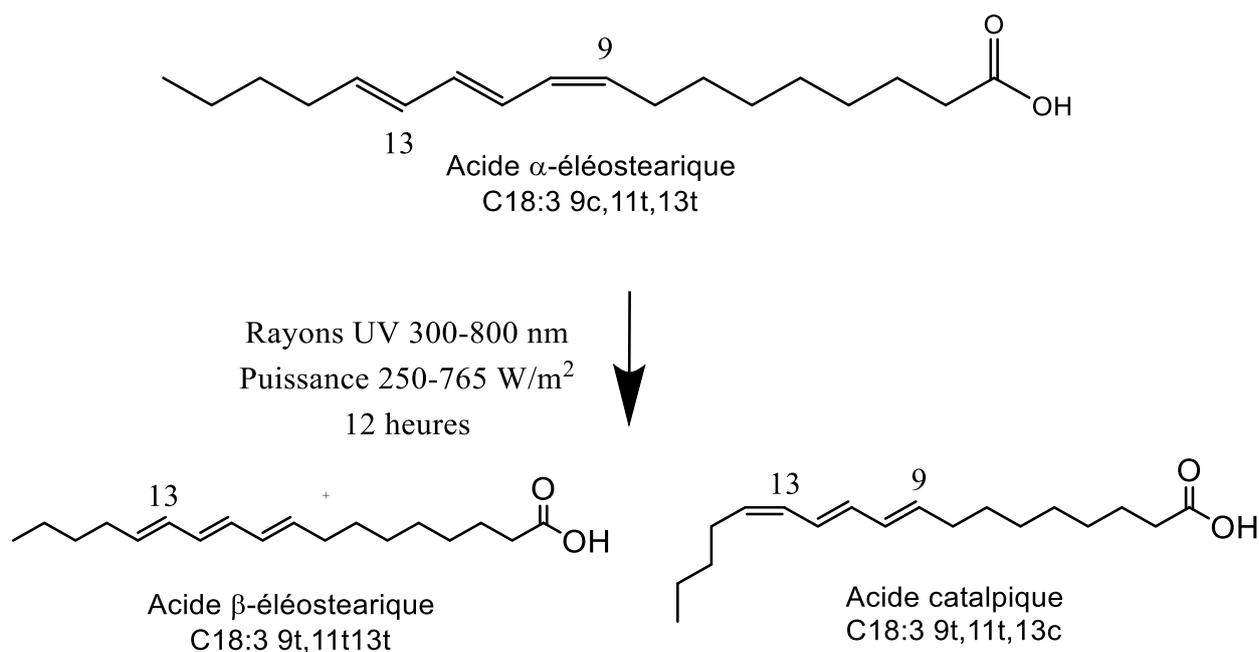


Schéma 2 : Mécanismes de modification structurale de l'acide α -éleostéarique dans le concentrat d'acide gras de l'huile brute modifiée

L'isomérisation de l'acide α -éleostéarique dans les triglycérides et dans le concentrat d'acide gras de l'huile brute se déroule selon des mécanismes et des cinétiques différents.

L'isomérisation de l'acide α -éleostéarique dans les triglycérides semble être le résultat de réarrangements compte tenu des contraintes structurales (encombrement, interactions moléculaires spatiales, répulsions en mode stacking). En se référant à l'exposition des triglycérides dans l'huile brute au rayonnement UV (soleil) sur 3 et 6 mois, les arrangements se font avec des cinétiques lentes.

Par contre, l'exposition des triglycérides dans l'huile brute aux UV (Sun Test), entraîne l'isomérisation de façon accélérée de l'acide α -éleostéarique. Le degré de liberté de leurs structures chimiques, l'état physique des acides gras dans leur configuration stable orientent l'isomérisation et engendrent des cinétiques rapides.

Chapitre 2

Le soleil ou le Sun Test fournit l'énergie ($E = \frac{hc}{\lambda}$) nécessaire permettant le réarrangement de la configuration de ces doubles liaisons cibles. Ces isomérisations se réalisent simultanément conduisant à la formation d'acides gras plus stables.

La première possibilité d'isomérisation est la conversion de la double liaison *cis* en position 9 en une double liaison *trans*, favorisant la formation de l'acide β -éléostéarique (C18:3 **9t**, 11t, 13t), cette isomérisation est prédominante car thermiquement plus stable.

La deuxième possibilité est un changement simultané de la double liaison *cis* en position 9 en une double liaison *trans* et de la double liaison *trans* en position 13 en une double liaison *cis*. Cette isomérisation entraîne la conversion de l'acide α -éléostéarique (C18:3 **9c**, 11t, **13t**) en acide catalpique (C18:3 **9t**, 11t, **13c**).

L'isomérisation de l'acide α -éléostéarique dans le concentrat d'acides gras libres répond à un mécanisme de réarrangement de degré de liberté par rapport au mécanisme d'isomérisation de l'acide α -éléostéarique dans les triglycérides de l'huile brute.

L'énergie fournie par le Sun Test permet de changer la configuration du carbone 9 *cis* en 9 *trans* et/ou le changement du carbone 13 *trans* en 13 *cis*, cela permet la conversion de l'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique et acide catalpique.

Dans le cas de la conversion de l'acide α -éléostéarique des acides gras libres, l'isomérisation est plus importante, elle conduit à un taux de conversion plus élevé en acide β -éléostéarique avec un rapport acide β -éléostéarique/acide catalpique de 7/1. Cela pourrait résulter d'une isomérisation chimio-enzymatique par la lipase *Candida rugosa* (LCC) à l'interface.

La lipase LCC réalise la bioconversion des acides C18:1 et C18:2 directement en acide β -éléostéarique et de l'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique. Cette voie de conversion simultanée est la preuve du degré de liberté des acides gras fluides propices à l'isomérisation.

Chapitre 2

Conclusion partielle

L'exposition des triglycérides de l'huile brute des amandes de *Ricinodendron heudelotii* aux rayons ultraviolets (λ 300-800 nm) avec une puissance de 250-765 w/m² ou au soleil avec une irradiation moyenne de 3470 Wh/m²/mois pendant 3 à 6 mois entraîne l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique (C18:3 9c, 11t, 13t) des triglycérides. Cette isomérisation est régie par un mécanisme de réarrangement intramoléculaire.

Elle conduit à l'obtention des huiles enrichies en CLnA constitués des acides α -éléostéarique, β -éléostéarique et en acide catalpique. Elle a lieu au niveau des carbones 9 *cis* et/ou 11 *trans* conduisant en un mélange d'acides gras CLnA, l'acide β -éléostéarique, (C18:3 9t, 11t, 13t) composé majoritaire et l'acide catalpique (C18:3 9c, 11t, 13c).

Une exposition de 12 h aux UV de l'huile convertit 63% de l'acide α -éléostéarique des triglycérides en acide β -éléostéarique à 51,4% et de l'acide catalpique à 11,6%.

L'hydrolyse enzymatique de l'huile brute par la lipase *Candida rugosa* (LCC) conduit à une hydrolyse complète des triglycérides après 1 heure de réaction avec un rendement en acides gras libres de 94%. Le concentrat d'acides gras libres obtenu après hydrolyse par la lipase LCC de l'huile brute a la même composition chimique que l'huile brute avec l'acide α -éléostéarique (60%), pour acide gras majeur.

L'exposition du concentrat d'acides gras libres obtenu après hydrolyse par la lipase LCC de l'huile brute aux rayons ultraviolets (λ 300-800 nm) avec une puissance de 250-765 w/m² pendant 12 heures entraîne la conversion de 80% d'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique à 70% et de l'acide catalpique à 10%.

L'hydrolyse enzymatique de l'huile brute modifiée par la lipase LCC conduit à une hydrolyse complète des triglycérides après 1 heure de réaction avec un rendement en acides gras libres de 94%. L'hydrolyse de l'huile brute modifiée a conduit à la production de deux fractions composées respectivement de 34,4% d'acide linoléique et de 82% d'acide β -éléostéarique.

Chapitre 2

L'association d'un traitement photochimique des triglycérides de l'huile brute suivie de leur hydrolyse enzymatique avec la lipase LCC constitue une bonne méthode de production et de fractionnement de l'acide β -éléostéarique, acide α -éléostéarique et de l'acide linoléique.

Ce procédé permet de faire la diversification et le fractionnement raisonné des acides gras polyinsaturés conjugués de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* en fonction du type d'acides gras recherchés. L'huile de *Ricinodendron heudelotii* devient donc une source originale et importante des acides gras polyinsaturés CLnA (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) et de l'acide linoléique.

CHAPITRE 3 :

***SYNTHESE DE MONO ET DIGLYCERIDE A CHAINES
CARBONEES COMPOSEES DE CLNA (ACIDE α -
ELEOSTEARIQUE, ACIDE β - ELEOSTEARIQUE ET
ACIDE CATALPIQUE) ISSUS DE L'HUILE DE
RICINODENDRON HEUDELOTII***

Chapitre 3

Introduction

Les EPGs sont des esters d'acides gras et de glycérol. Ils sont formés d'acides gras fixés en position 1, 2 et 3 du glycérol. Lorsqu'un acide gras est fixé sur le glycérol l'ester partiel est un monoglycéride. Il est appelé diglycéride lorsque deux acides gras sont fixés sur le glycérol.

Du fait de leurs propriétés émulsionnantes, ces molécules sont utilisées dans des industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. En raison de la faible teneur de ces molécules à l'état naturel, la synthèse des monoglycérides et diglycérides s'est développée. Des procédés sont mis en place pour optimiser la production de ces molécules par voie chimique ou enzymatique tels que l'estérification, la glycérolyse et l'alcoololyse.

Généralement par voie chimique, les esters partiels de glycérol (monoglycérides et diglycérides) sont produits dans des conditions réactionnelles drastiques exigeant des catalyseurs acides ou basiques à des températures élevées (260°C). Ces méthodes chimiques classiques sont remplacées par des méthodes enzymatiques plus douces, plus sélectives et qui offrent de meilleurs rendements [51,52].

Ainsi, de nouveaux procédés de synthèse et de purification des EPGs sont mis en place. Les lipases sont utilisées pour catalyser des réactions d'estérification pour leur typo-sélectivité et régiosélectivité. En exemple, Novozyme 435 s'avère appropriée pour la formation des 1-3 diglycérides [53], [54]. Martinez et *al.*, (2005) ont obtenu un taux en diester supérieur à 80% en utilisant la lipase Novozyme 435 pour catalyser la réaction du glycérol avec de l'acide linoléique conjugué (CLA)[55]. Novozyme 435 a été utilisée par Guo et *al.*, en 2007 pour la production des 1,3-diglycérides dans une réaction d'estérification entre l'acide linoléique et le glycérol [56].

Par catalyse chimique, la synthèse de monoglycérides à partir des CLnA (acide α -éléostéarique) a été réalisée à partir de l'huile de tung ou l'huile de *Riciodendron heudelotii*. Ces synthèses ont été réalisées à des hautes températures entre 190 à 300°C avec un réactif chimique (l'hydroxyde de lithium) [17,57].

Chapitre 3

Il est connu que, dans certaines applications, les teneurs en monoglycérides et en diglycérides ont un impact sur la texture des produits. Selon les études de Moonen *et al.*, (2014) les EPGs avec les acides gras polyinsaturés ont des CMC de 30 mg/L.

Ils montrent ainsi une grande capacité de réduction de la tension superficielle autant que les monoglycérides saturés ; il faudra donc moins de molécules pour stabiliser une émulsion [58].

Ces EPGs avec des acides gras polyinsaturés peuvent être utilisés comme des surfmers, c'est-à-dire des monomères et des tensioactifs polymérisables.

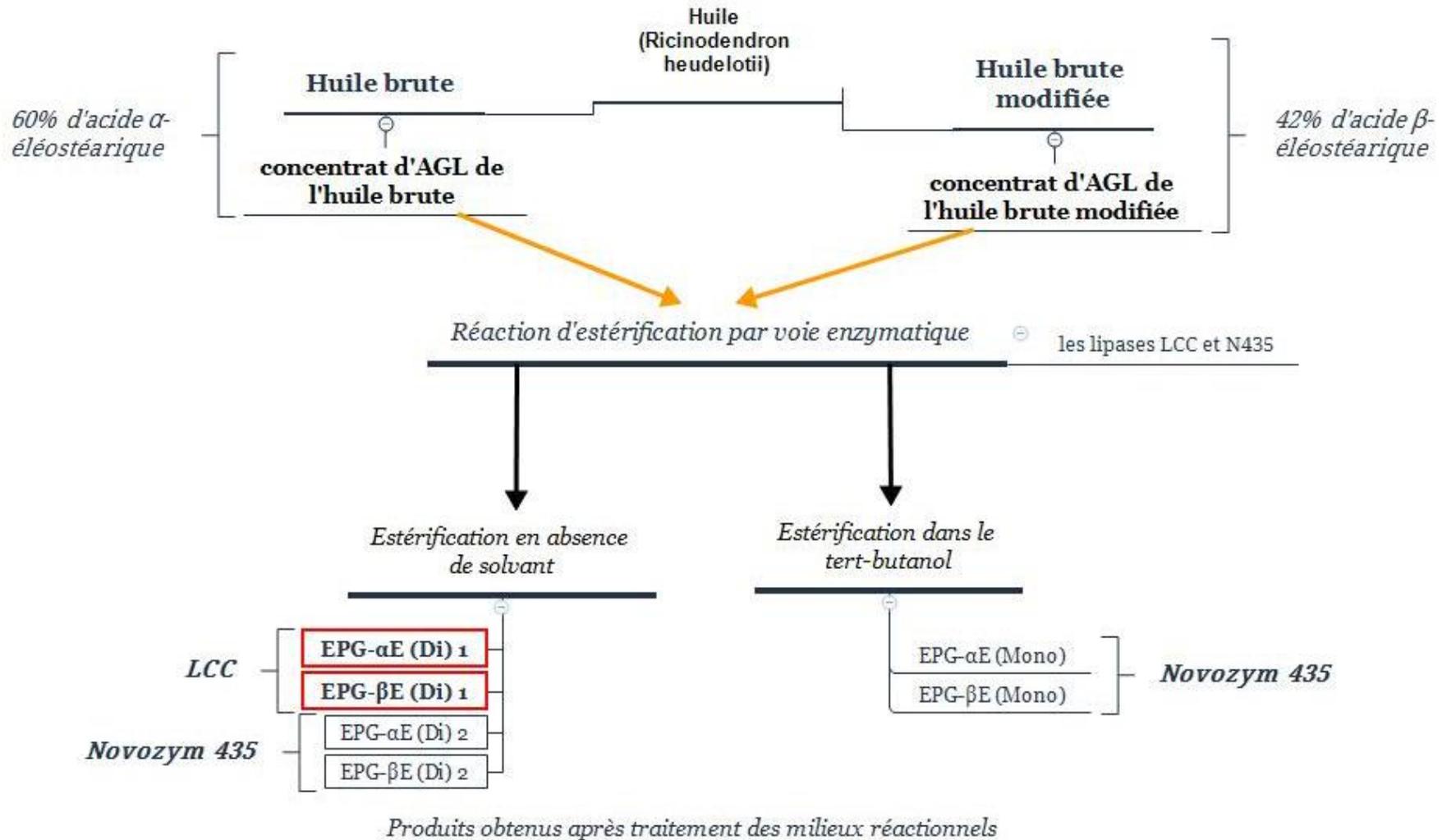
Etant donné la disponibilité des CLnA, l'objectif de ce travail est d'étudier des procédés de synthèse et d'établir des méthodes d'analyse et de caractérisation des esters partiels de CLnA. Ces protocoles permettront d'obtenir des mélanges réactionnels avec différentes compositions en monoglycérides et en diglycérides à chaînes carbonées formées d'acides gras polyinsaturés (l'acide α -éléostéarique, l'acide β -éléostéarique et l'acide catalpique).

La production des esters partiels se fera par estérification enzymatique entre les acides gras libres issus de l'huile brute, de l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii* et le glycérol, catalysée par les lipases Novozyme 435 et Lypolyve CC. Le profil glycérique sera contrôlé par HPLC-ELSD.

Les effets des paramètres de chaque procédé tels la nature des acides gras polyinsaturés majeurs, la nature de la lipase, l'utilisation du *tert*-butanol sont étudiés. Enfin, une étude approfondie du degré d'avancement des réactions d'estérifications, de l'effet de la teneur en monoglycérides et de l'effet de l'unité propènique des acides gras linoléiques conjugués (acide α -éléostéarique et β -éléostéarique) sur la CMC, sur la tension de surface, sur la HLB, sur la viscosité et le comportement thermique (stabilité thermique, température de transition vitreuse, de cristallisation, et de fusion) sera proposée.

Chapitre 3

Résumé graphique



Chapitre 3

Les deux concentrats d'acides gras libres issus de l'huile brute et de l'huile brute modifiée sont utilisés comme sources de substrats de base dans des réactions d'estérifications enzymatiques catalysées par les lipases de *Candida rugosa* et *Novozyme 435*.

Deux modes de mise en œuvre ont été utilisés pour la production des EPG-CLnA (α ou β) E :

- L'estérification catalysée en masse en l'absence de solvant
- L'estérification réalisée dans le *tert*-butanol.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel

1.1.1. Lipase *Candida Rugosa* (Lypolyve CC)

C'est une lipase non immobilisée, disponible en vrac. Elle se présente sous la forme de poudre blanchâtre lyophilisée de plus 40 000 Unité/mg. Elle est fournie par la société Lyven (France). La lypolyve CC est une lipase (EC 3.1.1.3) qui agit en milieu hétérogène. C'est une alpha/béta hydrolase comprenant 11 brins bêta entourés par 8 hélices alpha.

La triade catalytique est dans un volet constitué de 26 résidus d'acides aminés [59]. Elle se compose de trois acides aminés Ser-His-Glu [60]. Son site actif est exposé à la phase aqueuse et s'active à pH=7. Cette lipase catalyse l'hydrolyse des liaisons esters des triglycérides à l'interface huile/eau.

1.1.2. Lipase *Novozyme 435*

La lipase *Novozyme 435* (*Candida antarctica*) est une lipase immobilisée sur de la résine acrylique. Elle est sous forme de microgranulés. *Novozyme 435* a un poids moléculaire de 33 kDa. C'est une protéine alpha/béta avec une structure qui montre une triade catalytique Ser-His-Asp dans son site actif [61]. Elle a une capacité à être adsorbée sur des surfaces hydrophobes. *Novozyme 435* ne forme pas d'agrégats dimères lorsqu'elle est utilisée dans des réactions de synthèse, ce qui rend la manipulation simple et facile.

1.1.3. Concentrats d'acides gras libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée de *ricinodendron heudelotii*.

Les substrats utilisés sont des concentrats d'acides gras natifs et d'acides gras modifiés par Sun Test des huiles de *ricinodendron heudelotii*. Ils ont été obtenus par la réaction d'hydrolyse enzymatique des triglycérides de l'huile brute et de l'huile brute modifiée aux UV en présence de la lipase lypolyve CC.

Chapitre 3

L'analyse chromatographique en phase gazeuse des acides gras de ces concentrats est déjà décrite dans le **chapitre 2**. Nous rappelons dans le **Tableau 10** la composition des acides gras des concentrats.

Tableau 10: Composition en acides gras des concentrats utilisés dans les réactions d'estérification enzymatique.

Acides gras (%)	concentrat d'acide gras natifs	concentrat d'acides gras modifié
Acide palmitique C16:0	4,2±0,0	4,5±0,1
Acide stéarique C18:0	4,8±0,0	5 ±0,0
Acide oléique C18:1n9	7,6±0,2	8,1±0,0
Acide linoléique C18:2n6	22,2±0,0	24,4±0,2
Acide α -éléostéarique C18:3n5 c, t, t	60±0,1	8,1±0,0
Acide catalpique C18:3n5 t, t, c	0±0,1	8,2±0,1
Acide β -éléostéarique C18:3n5 t, t, t	1,2±0,0	41,7±0,0

Le concentrat d'acides gras libres obtenu après l'hydrolyse enzymatique des triglycérides de l'huile brute native est composé de 60% d'acide α -éléostéarique (CLnA) et 22,2% d'acide linoléique.

Le concentrat d'acides gras brut modifié obtenu après hydrolyse enzymatique des triglycérides de l'huile brute modifiée au Sun Test est composé de 58% de CLnA (8,1 % d'acide α -éléostéarique, de 8,2% d'acide catalpique, de 41,7% d'acide β -éléostéarique) et de 24,4% d'acide linoléique.

Chapitre 3

1.2. Méthodes

1.2.1. Procédé de synthèse enzymatique des esters partiels de glycérol

1.2.1.1. Estérification en milieu sans solvant

Sauf indication contraire, cette approche d'estérification enzymatique a été utilisée pour les deux types d'échantillons (concentrat d'acides gras d'huile brute et concentrat d'acides gras d'huile brute modifiée).

Dans un réacteur de 250 mL, on place le concentrat d'acides gras libres (61,7 g) et du glycérol (37,45 g) sous agitation mécanique. Le mélange est chauffé à 40°C pendant 20 minutes pour obtenir un milieu fondu homogène. Ensuite, la lipase et le tamis moléculaire (3 Å) (6,5 g) sont ajoutés. La quantité de lipase ajoutée dépend du type de lipase.

Pour la lipase Novozyme 435, 7,56 g d'enzyme sont ajoutés directement dans le milieu réactionnel, soit 15% par rapport à la masse d'acides gras libres

En ce qui concerne la lipase LCC, 0,7 g d'enzyme est ajouté au mélange acides gras libres, soit 1% par rapport à la masse d'acides gras libres.

La température est maintenue à 40°C sous agitation pendant 4 heures. A la fin de la réaction (4 heures) le système est un mélange hétérogène biphasique solide (tamis moléculaire) / liquide composé de lipase, d'EPGs, de glycérol et d'acides gras libres n'ayant pas réagi. Le mélange est ensuite centrifugé deux fois à 15°C pendant 15 minutes à 10000 g.

On obtient deux phases. Une phase organique supérieure composée d'EPGs et d'acides gras libres est récupérée puis analysée par HPSEC-ELSD. Une phase inférieure est soutirée. Elle est composée des tamis moléculaires, de la lipase et du glycérol. Cette phase inférieure est lavée au cyclohexane (3 x 30 mL). Les tamis moléculaires sont récupérés, séchés à l'étuve à 50°C et réutilisés pour d'autres réactions.

1.2.1.2. Estérification en milieu solvanté

Des essais de réaction d'estérification avec la lipase Novozyme 435 ont été réalisés en utilisant le *tert*-butanol comme solvant organique 1 et un protocole opératoire a été validé.

Chapitre 3

Ce protocole consiste à homogénéiser préalablement (61,7 g) de concentrat d'acides gras libres avec (37,5 g) de glycérol et 120 mL de *tert*-butanol. Le mélange est chauffé à 40°C sous agitation mécanique jusqu'à obtenir un milieu homogène de coloration jaune claire. Ensuite, la lipase (7,6 g) et le tamis moléculaire (6,5 g) sont ajoutés. La température du milieu réactionnel est maintenue à 40°C sous agitation (200 rpm) pendant un temps supplémentaire de 4 heures.

A la fin de la réaction (4 heures) le système est un mélange hétérogène bi-phasique solide (tamis moléculaire) / liquide composé de lipase, d'EPGs, de glycérol, de *tert*-butanol et d'acides gras libres n'ayant pas réagi. Le milieu réactionnel est centrifugé deux fois à 15°C pendant 15 minutes à 10000 g.

Après décantation du mélange, la phase organique supérieure composée des EPGs, des acides gras libres, de glycérol et du *tert*-butanol est récupérée. Le *tert*-butanol contenu dans la phase organique est éliminé à l'évaporateur rotatif à 40°C sous vide.

Le brut réactionnel restant est ensuite séché sous un courant d'azote jusqu'à masse constante. Il est récupéré dans un flacon en verre. Dans le flacon, on observe deux phases, une phase inférieure contenant le glycérol et une phase supérieure composée des EPG récupérés. Ils sont conservés à 4°C pour les analyses. La phase inférieure composée de lipase, de tamis moléculaire est lavée au cyclohexane (3 x 30 mL).

Les tamis moléculaires sont récupérés, séchés à l'étuve à 50°C et réutilisés pour d'autres réactions. La lipase est récupérée et réutilisée dans d'autres réactions d'estérification.

1.2.2. Profil d'esters partiels de glycérol et de triglycérides par HPSEC-ELSD

Il s'avère que les CLnA C18:3 n-5 (l'acide α -éléostéarique, l'acide β -éléostéarique et l'acide catalpique) par la nature propènique conjuguée de leurs chaînes hydrocarbonées susceptibles de se fixer sur le squelette glycérol sont polymérisables dans les conditions d'analyses chromatographiques utilisées aux températures du détecteur de 360°C.

De ce fait, la méthode CPG réalisée à 360°C, habituellement utilisée pour l'analyse du profil glycérique des échantillons n'est pas appropriée pour l'analyse des esters partiels de glycérol des acides gras de l'huile brute et de l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii*.

Chapitre 3

Pour résoudre ce problème nous avons mis au point une technique d'analyse par HPLC d'exclusion. Nous avons utilisé la chromatographie liquide HPSEC-ELSD dans des conditions analytiques suivantes dans deux colonnes montées en série, PLgel, 3 μ m, MIXED-E, 300 x 7,5 mm, 25000 Da. L'éluant utilisé est le tétrahydrofurane (THF) 100% à un débit de 0,8 mL/min. La température du four est maintenue à 35°C. Un détecteur de type ELSD de marque ALLTECH 3300 est utilisé. Il est réglé à 35°C avec un débit du gaz (air) de 1,6 mL/min. Le gain de l'appareil est fixé à 1.

L'observation de la formation et la quantification des différents esters partiels (monoglycérides et diglycérides) et esters totaux (TG) résultant de la réaction d'estérification a nécessité l'obtention des standards purs (Merck (Sigma-Aldrich)).

1.2.2.1. Etalonnage de HPLSEC-ELSD

Les standards utilisés pour l'étalonnage de la HPSEC-ELSD sont composés de l'acide linoléique (C18:3), de monoglycéride: 1 linoléoyl-rac glycérol (C18:2), de diglycéride: 1,3-dilinoléoyl- rac -glycérol (C18:2) et de triglycéride : trilinoléine (C18:3).

Le choix de ces standards est déterminé en référence à la composition des acides gras libres des concentrats de l'huile brute et de l'huile brute modifiée. Le concentrat d'acides gras libres de l'huile brute est composé majoritairement de CLnA à 61,2% et d'acide linoléique à 22,2% avec de faibles pourcentages en acide palmitique 4%, acide stéarique 5% et acide oléique 7%.

Le concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée est composé majoritairement de CLnA (58%) et d'acide linoléique (24%) et de faibles pourcentages en acide palmitique (4%), acide stéarique (5%) et acide oléique (8%).

1.2.2.2. Préparation des solutions étalons

Les solutions sont préparées en deux étapes. La première étape consiste à préparer une solution mère (SM) de concentration 1 mg/mL. Pour chaque standard, elle est réalisée en ajoutant 10 mL de tétrahydrofurane (THF) à 10 mg de standard et homogénéisée au vortex. À partir de cette solution mère, des solutions filles à différentes concentrations de 20 à 200 μ g/mL sont préparées et 20 μ L de chacune des solutions est ensuite injectée.

Chapitre 3

1.2.2.3. Courbe l'étalonnage

La Figure 16 représente les courbes d'étalonnage de chaque standard. Chaque courbe représente l'aire des pics en fonction de la concentration ($\mu\text{g/mL}$) de chaque standard.

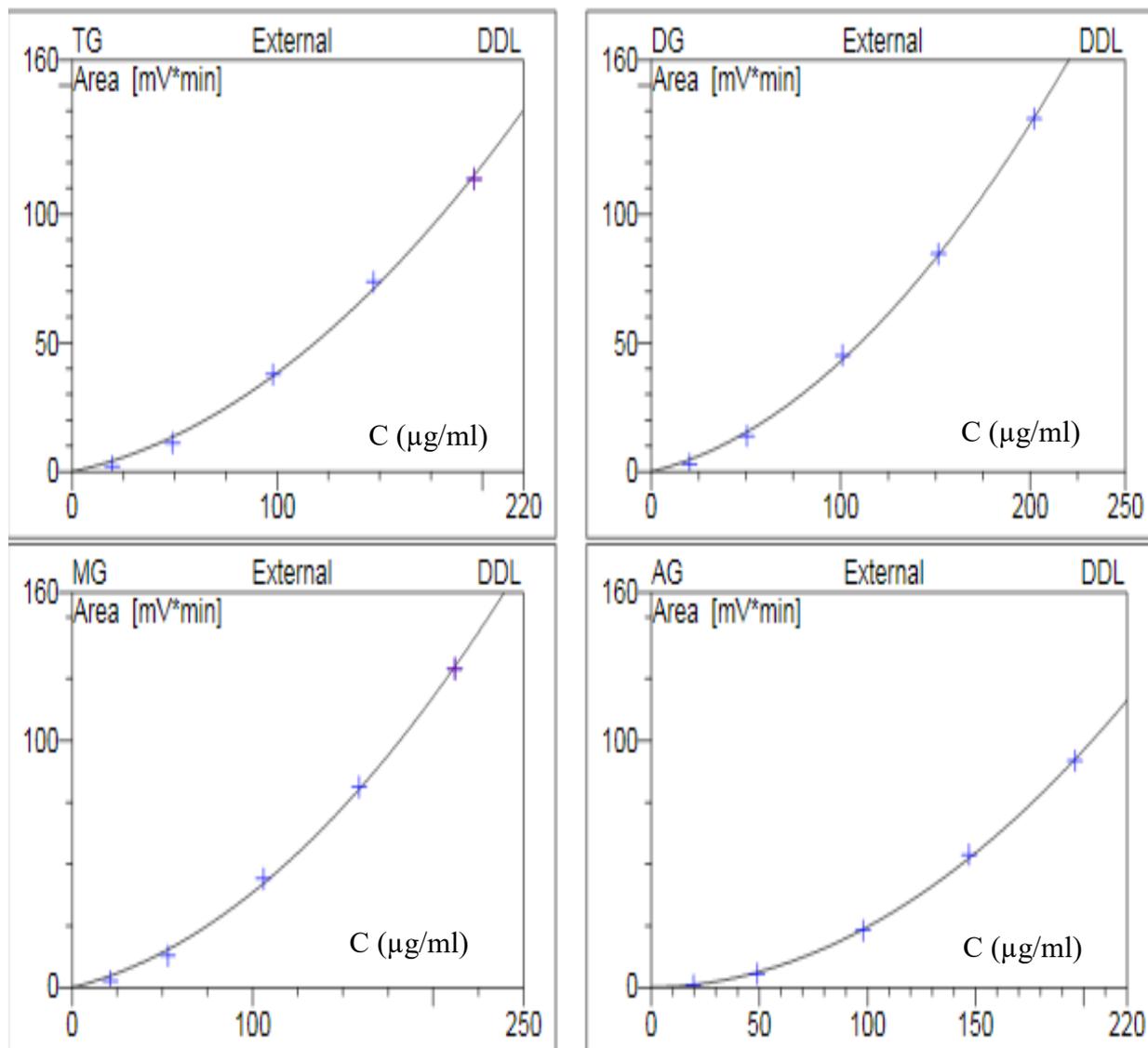


Figure 16: Courbes d'étalonnage de AG (l'acide linoléique), MG (1 linoléoyl-rac glycérol), DG (1,3-Dilinoléoyl-rac-glycérol) et TG (Trilinoléine)

Les courbes d'étalonnage montrent un calibrage de type quadratique avec des coefficients de corrélation suivants TG (0,9909) ; DG (0,9885) ; MG (0,9906) et AG (0,9972). L'ajustement des points est parfait, ce qui traduit un bon étalonnage et une corrélation entre l'aire des pics et les concentrations des solutions de chaque standard.

Chapitre 3

De ce fait, la concentration des échantillons à l'analyse est fixée à 200 µg/mL. L'analyse des standards a permis de déterminer leurs temps de rétention (Tableau 11).

Tableau 11: Temps de rétention des standards pour l'étalonnage

Produits standards	Temps de rétention (min)
Trilinolénine	14,30
1,3-Dilinoéoyl- rac -glycérol	14,99
1 linoléoyl-rac glycérol	15,90
Acide linoléique C18:3	16,75

La trilinolénine (triglycéride C18:3) a un temps de rétention de 14,30 min, le 1,3-dilinoéoyl- rac-glycérol (diglycéride C18:2) a un temps de rétention de 14,99 min, le 1- linoléoyl-rac glycérol (monoglycéride C18:2) a un temps de rétention de 15,90 min et l'acide linoléique (acide gras libre C18:3) a un temps de rétention de 16,75 min.

1.2.2.4.Exemple d'analyse de suivi de la réaction d'estérification de concentrats d'acides gras de l'huile modifiée.

Le chromatographe obtenu permet de suivre la conversion des acides gras libres, catalysée par la lipase LCC, en esters partiels de glycérol (mono-, di- et triglycéride). Les esters partiels de glycérol sont identifiés par mimétisme par rapport aux temps de rétention des standards commerciaux dans le **Tableau 12**.

Tableau 12: Temps de rétention des esters et des acides gras

Les produits esters et acides gras	Temps de rétention (min)
Triglycéride (TG)	14,39
Diglycéride (DG)	14,93
Monoglycéride (MG)	15,90
Acide Gras libre (AG)	16,53

Chapitre 3

La séparation des esters partiels de glycérol se fait selon la taille des molécules. Le pic des molécules de haut poids moléculaire, les triglycérides est le premier à apparaître (14,39 min) suivi des pics des diglycérides (14,93 min), des monoglycérides (15,90 min) et celui des acides gras libres à 16,33 min.

Cette méthode d'analyse permet de suivre la synthèse des esters partiels de glycérol. Elle permet de les séparer et de les quantifier au cours des essais des réactions d'estérification enzymatiques.

1.2.2.5. Etudes des EPG par tensiomètre à goutte automatisé

Les mesures de tension superficielle ont été effectuées à l'aide d'un tensiomètre à goutte automatisé (Tracker, S Teclis instrument Concept, France). La méthode à goutte pendante a été utilisée pour déterminer en temps réel la tension superficielle eau/air.

Dans le tracker, une bulle d'émulsion se forme sur une aiguille de seringue placée dans une cellule en verre ouverte et vide. A l'aide d'une caméra vidéo l'évolution de l'image de la gouttelette est enregistrée. Le volume de la gouttelette d'émulsion est de 8 μ L.

La gouttelette est analysée par un programme informatique permettant de surveiller les variations de la tension superficielle dans le temps. La cinétique de mesure de la tension superficielle dynamique est réalisée au bout de 5 minutes, temps nécessaire pour atteindre l'équilibre.

1.2.2.6. Méthodes de détermination de la Balance Hydrophile-Lipophile (HLB)

La solubilité d'un émulsifiant dans un milieu est caractérisée par sa Balance Hydrophile-Lipophile (HLB). Cette notion a été développée par Griffin en 1949 suivant des méthodes de calculs théoriques réalisés grâce à des équations mathématiques semi-empiriques basées sur la structure moléculaire des émulsifiants [62].

Les études de Griffin ont montré que la solubilité d'un émulsifiant est liée à la valeur de l'indice de saponification par rapport à celle de l'indice d'acide [63]. Cependant, la méthode de calcul ne faisant pas l'unanimité, d'autres méthodes de calculs ont été développées. Tel que la méthode de Davies utilisé dans nos travaux pour prédire les valeurs de HLB des esters partiels de glycérol synthétisés.

Chapitre 3

Méthode de Davies

La méthode proposée par Davies est une étude théorique basée sur la nature chimique des groupements constituant chaque partie de la molécule. En effet, dans sa méthode de calcul, Davies a affecté des coefficients aux groupements chimiques (**Tableau 13**) [64].

De façon générale, les coefficients des groupes chimiques de la partie hydrophile sont de valeurs positives et celles des fonctions chimiques de la partie lipophile sont négatives. Les valeurs de HLB sont ensuite déterminées par l'équation suivante [65,66].

$$HLB = 7 + \sum \text{Coefficients fonctions hydrophobe} + \sum \text{Coefficients fonctions hydrophile}$$

Tableau 13: Coefficients Méthode de Davies [64].

Groupes hydrophiles		Groupes lipophiles	
Groupe	Coefficient	Groupe	Coefficient
$-SO_4N_a$	38,7	$-CH -$	-0,475
$-COOK$	21,1	$-CH_2-$	-0,475
$-COON_a$	19,1	$-CH_3$	-0,475
SO_3N_a	11	$= CH -$	-0,475
N (Amine tertiaire)	9,4	$-CF_2-$	-0,87
Ester libre	2,4	phényle	-1,662
$-COOH$	2,1	$-[CH_2]_3 -O-$	-0,15
$-OH$ libre	1,9	$-CH(CH_3)CH_2 -O-$	-0,15
$-[CH_2]_n -OH$ (n=1 ;2 ;3)	1,9	$CH_2 - CH(CH_3) -O$	-0,15
$-O -$	1, 3		
$-[CH_2]_2 -O-$	0,33		
$-[CH_2]_2 -O-O-$	----		
-OH (sorbitan)	0,5		
Ester (sorbitan)	6,8		

Les esters partiels de glycérol issus de l'huile brute et de l'huile brute modifiée des amandes de *Ricinodendron heudelotii* sont des mélanges de monoglycérides et de diglycérides.

Chapitre 3

Il est possible d'estimer de manière approximative la valeur de la HLB de ces mélanges d'émulsifiants à l'aide de cette équation.

$$HLB = x\%HLB_1 + y\%HLB_2$$

$x =$ la fraction de monoglycéride ; $y =$ la fraction de diglycéride

Le profil acides gras des esters partiels de glycérol synthétisés à partir du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et de celui des acides gras libres de l'huile modifiée de *Ricinodendron heudelotii* est composé de 96% en acides gras C18.

De plus, le coefficient affecté aux groupements de chaîne carbonée des acides gras dans la méthode de calcul de Davies ne tient pas compte de l'hybridation du carbone et de la présence de doubles liaisons. Les coefficients des fonctions de la chaîne carbonée des acides gras en C18 sont les mêmes (-0,475) (Tableau 4). Pour ces raisons, les calculs de HLB sont basés sur des monoglycérides et diglycérides en C18.

1.2.2.7. Caractérisation par analyse thermogravimétrique (ATG)

Les analyses thermogravimétriques ont été effectuées avec un analyseur TA instruments TAG Q50. Chaque expérience a nécessité une masse d'environ 5 mg de chaque concentrat d'EPG.

Les échantillons ont été chauffés dans une gamme de températures allant de 25°C à 600°C avec une vitesse de chauffage de 10°C/min sous atmosphère inerte. L'azote est réglé avec un module de distribution comportant deux molettes, une, réglée à 60 mL et l'autre à 40mL.

La perte de poids est enregistrée en continu en fonction de l'augmentation de la température. A la fin de l'analyse, les températures de dégradation à 5% et 30% de perte en poids ont été enregistrées. A partir de ces températures, l'indice statistique de résistance à la chaleur a été déterminé théoriquement avec l'équation suivante [67,68] :

$$T_s = 0,49 [T_{d_{5\%}} + 0,6(T_{d_{30\%}} + T_{d_{5\%}})]$$

$T_s =$ température de stabilité thermique

$T_{d_{5\%}} =$ température de dégradation à 5% de perte en poids

$T_{d_{30\%}} =$ température de dégradation à 30% de perte en poids

Chapitre 3

1.2.2.8. Caractérisation par calorimétrie différentielle à balayage

L'analyse calorimétrique différentielle à balayage permet d'étudier les transitions d'état des matériaux. L'appareil est constitué d'un four dans lequel on place deux capsules, une capsule vide servant de référence et une autre capsule scellée contenant l'échantillon à analyser.

Le principe repose sur la détermination de la différence d'énergie à fournir pour maintenir la capsule d'échantillon à la même température que la référence. Un instrument TA DSC Q 2000 a été utilisé, couplé à un système de refroidissement externe à haute performance, le Liquid Nitrogen Pump (LN Pump). Cette pompe offre une grande flexibilité dans le refroidissement, facilite une température de fonctionnement très basse (jusqu'à -180°C). Sa capacité de refroidissement la plus élevée est de $140^{\circ}\text{C}/\text{min}$, avec un équilibrage ambiant rapide et une limite supérieure de température de 550°C .

Le programme de température dans le calorimètre commence par un premier cycle isotherme à 50°C pendant 2 minutes. Ensuite, un refroidissement de 50°C à -170°C , à une vitesse de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et un réchauffement à 80°C à une vitesse de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Un deuxième cycle a été effectué avec une vitesse de refroidissement et de chauffage $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Au total, deux cycles ont été effectués.

Les caractéristiques de l'échantillon après analyse DSC sont décrites pour différentes températures: les températures de cristallisation (T_c), les températures fusion (T_f), les températures de transition vitreuse (T_g).

Chapitre 3

2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

2.1. Degré d'avancement de la réaction d'estérification des acides gras pendant les réactions d'estérification

Pendant la réaction d'estérification, les acides gras libres sont transformés en esters partiels de glycérol (monoglycérides, diglycérides) et en triglycérides. Ces esters résultent de la jonction des acides gras libres sur les sites 1, 2 et 3 de la molécule de glycérol.

Le suivi de la consommation de ces acides gras par analyse HPSEC-ELSD permet de déterminer la teneur en esters au cours de la réaction. Le suivi cinétique des réactions est effectué à partir des analyses de différents prélèvements dont le premier après 30 minutes de réaction ensuite à chaque heure jusqu'à la fin de la réaction.

Avec les teneurs en acides gras libres initiaux et acides gras libres dans chaque prélèvement, la teneur en esters peut être calculée. Il est exprimé par la relation suivante :

$$TE\% = \frac{AG\%_{initial} - AG\%}{AG\%_{initial}} * 100$$

$AG\%_{initial}$: Pourcentage massique initial en acides gras

$AG\%$: Pourcentage massique en acides gras pour chaque prélèvement.

$TE\%$: Teneur en esters

2.2.1. Evolution des teneurs des acides gras libres et des esters formés au cours des différentes réactions d'estérification.

Les réactions d'estérifications enzymatiques des concentrats d'acides gras libres de l'huile brute ou de l'huile brute modifiée avec le glycérol dans un milieu sans solvant sont réalisées en présence de la lipase de *Candida rugosa* ou de Novozyme 435.

Ces lipases sont utilisées comme biocatalyseurs dans ces systèmes hétérogènes. Ces réactions d'estérification conduisent à la formation d'eau et d'esters de glycérol. Pour maintenir ces réactions enzymatiques dans le sens de la production des esters partiels de glycérol des tamis moléculaires sont utilisés en tant qu'agents de déshydratation par piégeage de la quantité d'eau produite dans le milieu [69].

Chapitre 3

Les évolutions des teneurs en acides gras libres et en esters (esters partiels et/ou triglycérides) au cours des réactions d'estérification en présence de la lipase *Candida rugosa* (LCC) et de Novozyme 435 (N435) sont représentées sur **Figure 17**, **Figure 18**, **Figure 19** et **Figure 20**

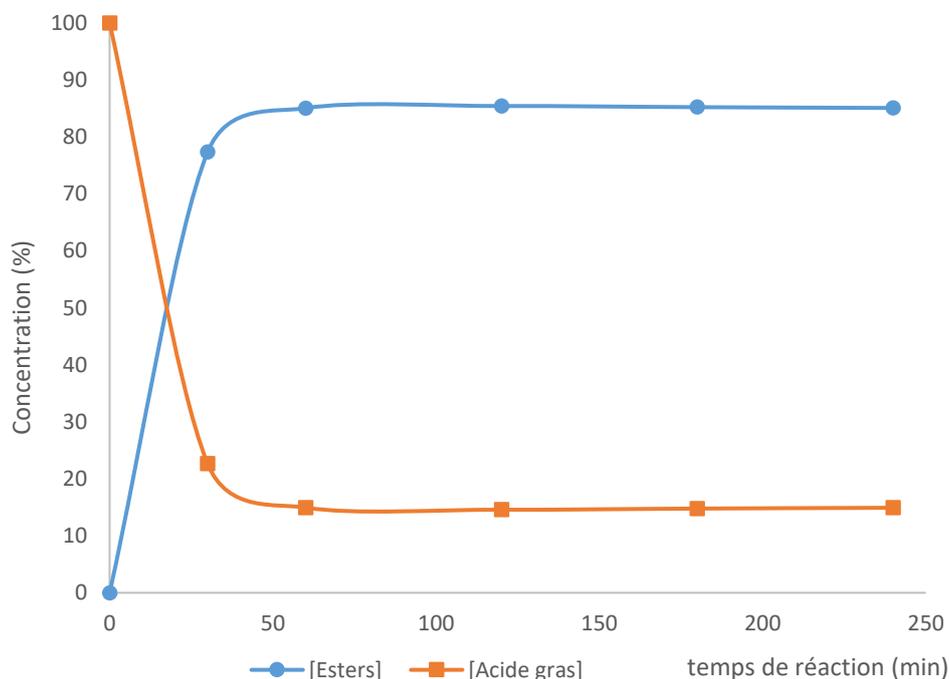


Figure 17: Courbes de l'évolution de la conversion des acides gras [Acide gras] et de la formation d'esters dans la réaction d'estérification des acides gras de l'huile brute dans un système sans solvant en présence de Novozyme 435.

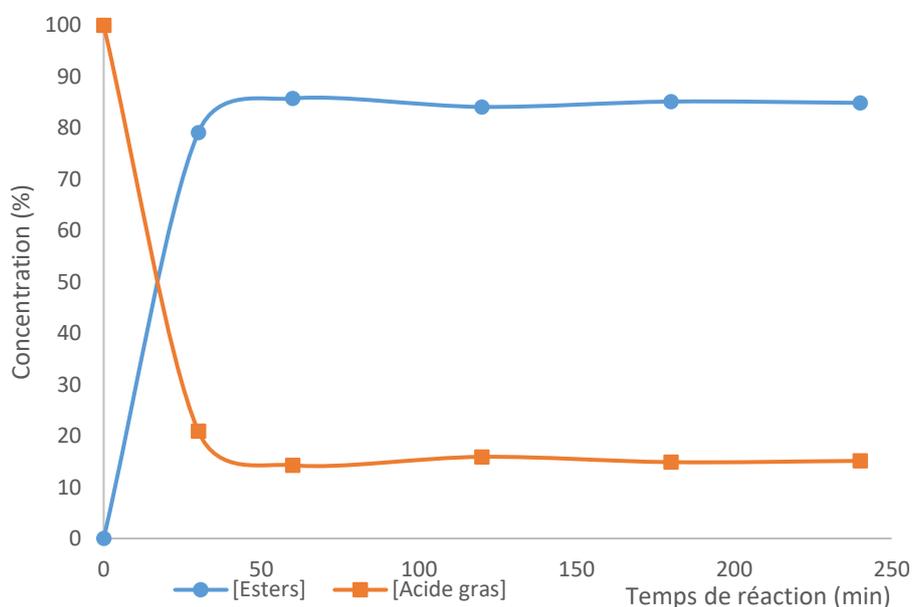


Figure 18: Courbes de l'évolution de la conversion des acides gras [Acide gras] et de la formation d'esters dans la réaction d'estérification des acides gras de l'huile brute modifiée dans un système sans solvant en présence de Novozyme 435.

Chapitre 3

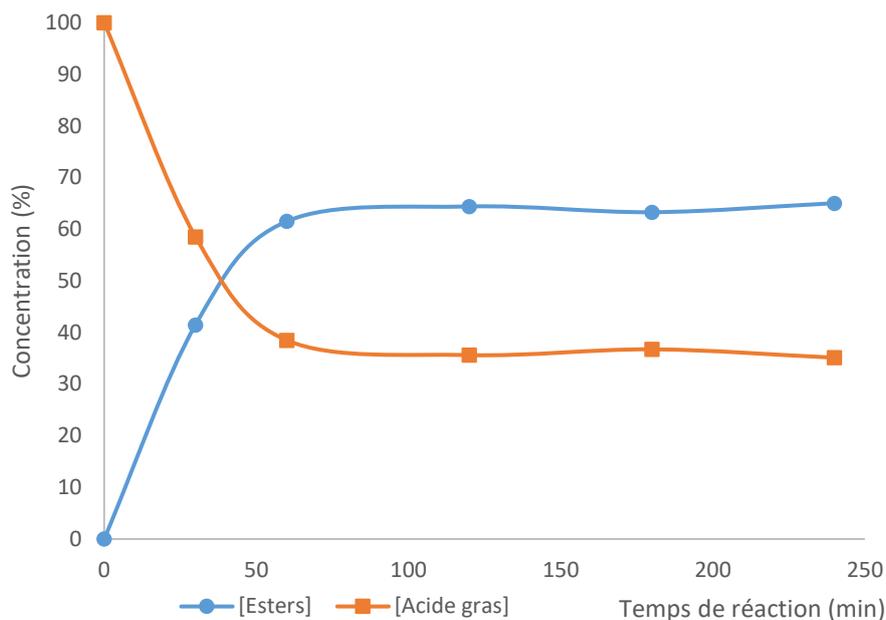


Figure 19: Courbes de l'évolution de la conversion des acides gras [Acide gras] et de de la formation d'esters dans la réaction d'estérification des acides gras de l'huile brute dans un système sans solvant en présence de LCC.

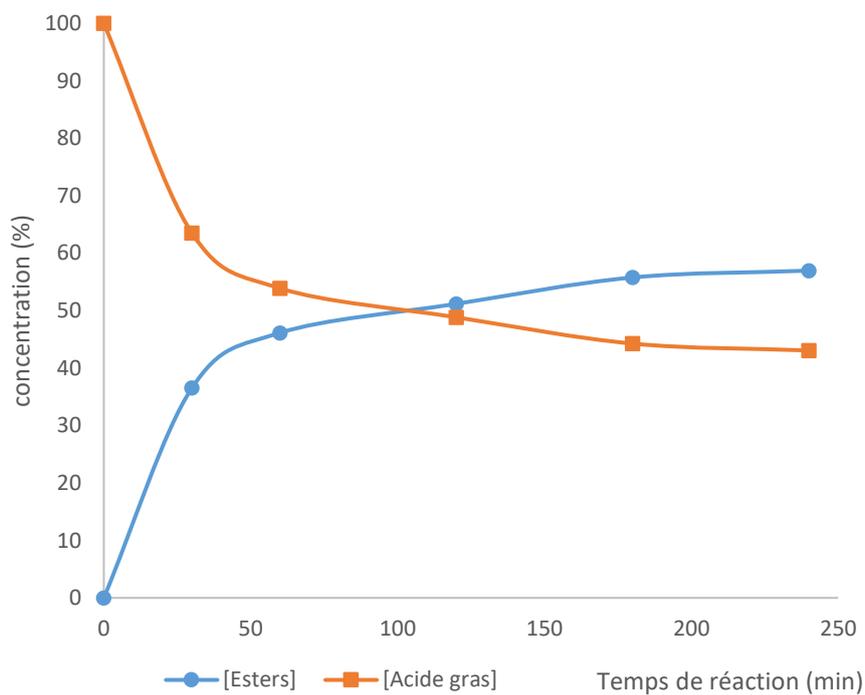


Figure 20: Courbes de l'évolution de la conversion d'acides gras [Acide gras] et de la formation d'esters dans la réaction d'estérification d'acides gras de l'huile brute modifiée dans un système sans solvant en présence LCC.

Chapitre 3

Les courbes des **Figure 17**, **Figure 18**, **Figure 19** et **Figure 20** traduisent l'évolution de la concentration des substrats (acides gras) et des produits (esters) en fonction du temps au cours des réactions d'estérifications catalysées en présence des deux enzymes Novozyme 435 et LCC.

Les courbes mettent en évidence l'efficacité catalytique des deux lipases dans les réactions d'estérification enzymatiques de concentrat d'acides gras libres constitués principalement par des acides linoléiques conjugués CLnA de l'huile brute native et l'huile brute modifiée du ricinodendron avec le glycérol.

Au début de chaque réaction d'estérification (**Figure 17**, **Figure 18**, **Figure 19** et **Figure 20**), la consommation du substrat (acides gras libres) et la production des esters évoluent rapidement au cours du temps pour se stabiliser au cours du temps.

L'allure de ces courbes montre que les lipases sont des *enzymes de types Michaeliennes* [70]. Les lipases (LCC et Novozyme 435) se lient aux acides gras libres et au glycérol pour former un complexe lipase-substrats de type Glycérol-LCC-Acide gras dans le cas de l'estérification avec la lipase LCC ou de type Glycérol-N435-Acide gras dans le cas de l'estérification avec Novozyme 435. Les lipases se dissocient ensuite pour donner les produits (esters partiels de glycérol) avec régénération de la lipase qui est recyclée et réutilisée.

Le **Schéma 1** illustre l'exemple de formation de 2-EPG-CLnA au cours de l'estérification des concentrats d'acides gras libres (CLnA-libres) de l'huile brute avec la lipase LCC.

Chapitre 3

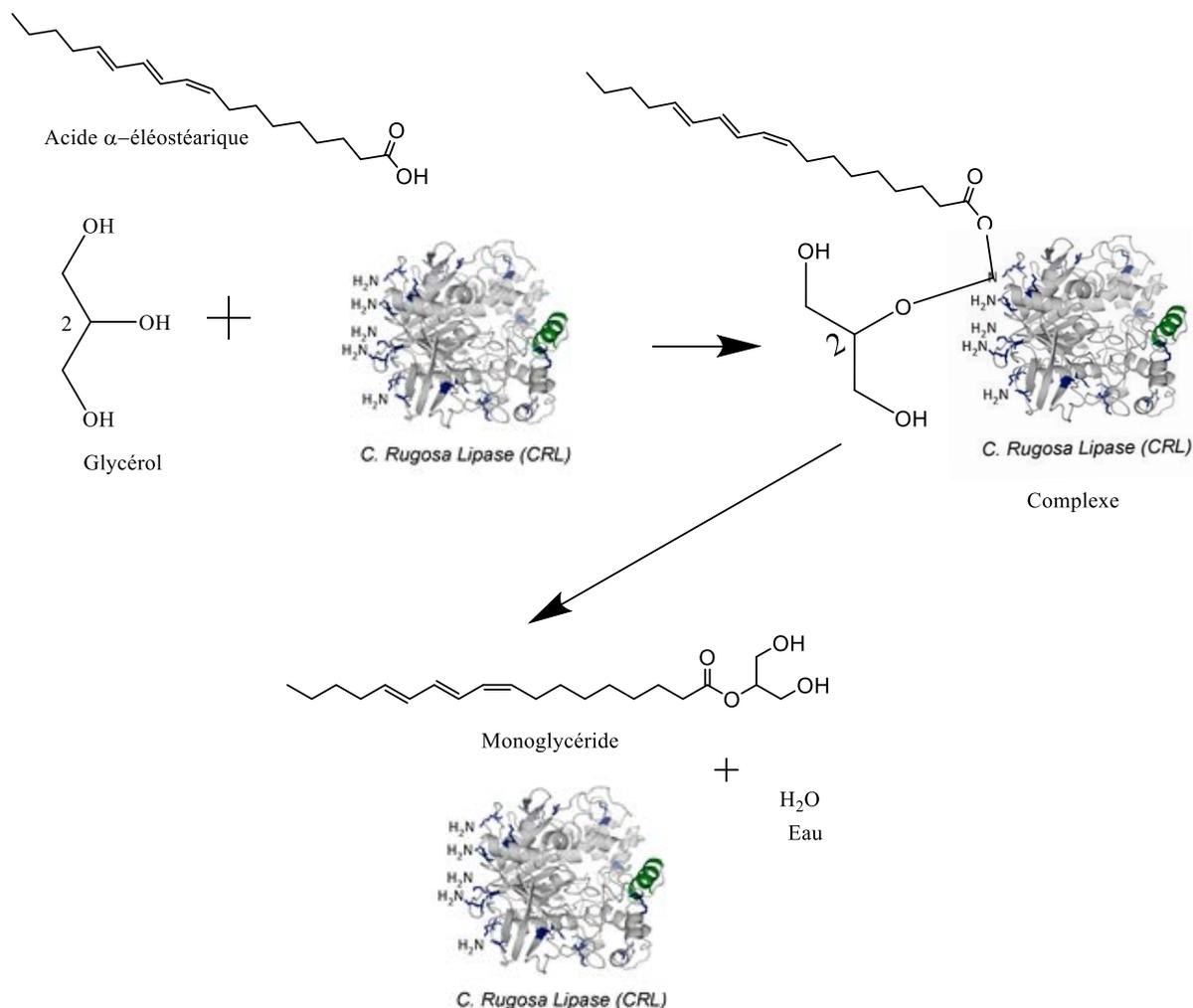


Schéma 3. Illustration de la réaction d'estérification des CLnA en 2-EPG-CLnA par la lipase *Candida rugosa* (LCC)

2.2.2. Degré d'avancement de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute par la lipase LCC (*Candida rugosa*)

Les réactions d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute réalisées en présence de la lipase LCC donnent un rendement d'estérification de 61,5 % après une heure (Figure 19). Durant la première heure, on observe une forte production d'esters.

L'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute en présence de la lipase LCC a lieu en 1 heure. Au-delà d'une heure de réaction, un plateau est atteint avec un taux d'estérification maximum de 64% qui reste constant jusqu'à la fin de la réaction.

Chapitre 3

2.2.3. Degré d'avancement de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée par la lipase LCC (*Candida rugosa*).

La courbe de la cinétique du degré d'avancement de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée aux UV en présence de LCC est présentée par la **Figure 20**.

En présence de la LCC, la production d'esters partiels de glycérol est représentée par une pente forte traduisant un degré d'avancement de 45% en 50 minutes. A l'allure de la courbe, l'avancement de la réaction devient très lent à partir de 3 heures. La réaction se poursuit au-delà de 5-6 heures. Il semble que l'activité catalytique de la LCC faiblit.

Rappelons que la LCC est une poudre dispersible dans ce milieu lipophile. En l'état, nous avons montré précédemment dans le chapitre 2 que cette lipase de CC de chez Lyven acquiert une capacité hydrolytique remarquable dans des systèmes hétérogènes huile/ eau. Elle hydrolyse en 30 minutes près de 87-98% des triglycérides des huiles de colza, de tournesol, de ramboutan, et de ricinodendron. Dans ces nouvelles conditions de réactions d'estérification, nous nous demandons si la LCC est appropriée à l'estérification des CLnA avec le glycérol en termes de pouvoir discriminant vis-à-vis de CLnA ou de typo-spécificité par rapport aux positions des hydroxyles du glycérol. Les résultats obtenus au cours de ces réactions d'estérification sont très encourageants. Est-ce que les cinétiques rapides puis lentes ne seraient pas liées à ces contraintes qui provoquent l'inhibition de l'activité de LCC? Il suffirait peut-être d'activer la lipase sous sa forme immobilisée.

2.2.4. Degré d'avancement des réactions d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute en présence de la lipase Novozyme 435

La réaction d'estérification de concentrats d'acides gras libres de l'huile brute par la lipase Novozyme 435 (**Figure 17**) est efficace. Le degré d'avancement de la réaction d'estérification atteint 77,4% en 30 minutes de réaction. Cette valeur reste constante jusqu'à la fin de la réaction.

L'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute en présence Novozyme 435 est menée jusqu'à un degré d'avancement élevé de 85% correspondant à la fin de la réaction. Novozyme 435 a donc une bonne activité estérase sur le concentrat d'acides gras de l'huile brute riche en acide α -éléostéarique à 60% et acide linoléique à 22,2%.

Chapitre 3

2.2.5. Degré d'avancement de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée en présence de Novozyme 435

La Figure 18 présente la cinétique du degré d'avancement de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée aux UV en présence de Novozyme 435. Le degré d'avancement de la réaction d'estérification atteint 80% en 30 min puis 85% en 50 min. Au bout des 50 min, il se forme un plateau. Cette allure du degré d'avancement est assimilée aux cinétiques et mécanismes des réactions catalysées par des enzymes immobilisées répondant au mécanisme de Michaëlis-Mentens [71].

Il est clair que la lipase immobilisée dope l'activité enzymatique et le degré d'avancement de la réaction d'estérification atteint son maximum à 85,5% en 50 min contre 64% d'esters formés en présence des réactions d'estérification catalysées en présence de la LCC dispersée en milieu lipophile.

Suivant l'allure de la courbe de l'évolution de la formation de monoglycérides diglycérides en présence de Novozyme 435 dans laquelle l'enzyme est supportée par des résines macroporeuses échangeuses d'anions, il semble que les interactions covalentes et électrostatiques entre les CLnA et les acides aminés de la triade catalytique sont fortes.

L'adsorption des CLnA paraît être une étape clé en faveur de la synthèse des monoglycérides-diglycérides. Le recyclage de l'enzyme immobilisée et ses performances catalytiques permettent de mettre en évidence un mécanisme efficace de surface avec adsorption réversible des complexes Substrats/Enzyme et régénération de la triade catalytique.

Chapitre 3

Conclusion sur les degrés d'avancement des réactions d'estérification catalysées en présence de LCC et Novozyme 435

Dans les conditions de mise en œuvre des réactions d'estérification réalisées à partir de concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et de concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée et en présence de la LCC, les degrés d'avancement des réactions d'estérification atteignent respectivement 62% et 46% après une heure de réaction.

La différence de composition entre ces deux milieux réactionnels réside au niveau de la nature des CLnA. Le premier concentrat d'acides gras libres est constitué entre autres de groupe acyl de CLnA α -éléostéarique tandis que le deuxième est constitué entre autres de groupe acyl de CLnA- β -éléostéarique. Il apparaît que l'activité estérase de la lipase de *C. rugosa* de LCC est ralentie par la présence de l'acyl de CLnA- β -éléostéarique.

Le plateau observé peut s'expliquer par l'inhibition de l'activité de la lipase LCC vis-à-vis des configurations C18 :3 t,t,t des doubles liaisons de l'acide β -éléostéarique..

Dans les conditions des réactions d'estérification effectuées à partir de concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et de concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée et en présence de Novozyme 435, les degrés d'avancement des réactions d'estérification atteignent des valeurs de 85% d'esters partiels de glycérol en 50 min quelle que soit la composition des groupes acyls des CLnA.

Il en découle que Novozyme 435 avec sa lipase immobilisée est un bon compromis pour estérifier ces concentrats d'acides gras libres en C16:0 ; C18:0 ; C18:1 ; C18:2 ; C18:3 c,t,t ; C18:3 t,t,c ; C18:3 t,t,t.

En définitive, les réactions d'estérification impliquent à la fois les sites carboxyliques pour la formation des groupes carboxyesters et les groupes acyls dans la triade catalytique et leur transfert sur les hydroxyles du glycérol pour engendrer des mélanges de monoglycérides-diglycérides. Ce sont ces mélanges de monoglycérides et diglycérides qui vont faire l'objet d'études de séparation par chromatographie préparative et d'analyse par CPG/DIF.

Chapitre 3

2.2. Le profil glycérique des milieux réactionnels des réactions d'estérifications enzymatiques sans solvant

2.2.1. Teneur en monoglycérides et diglycérides au cours de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute en présence de Novozyme 435 dans un milieu sans solvant

Les suivis cinétiques de la formation des monoglycérides et des diglycérides au cours de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute en présence de la lipase Novozyme 435 dans un milieu sans solvant sont observables sur les courbes de la **Figure 21**

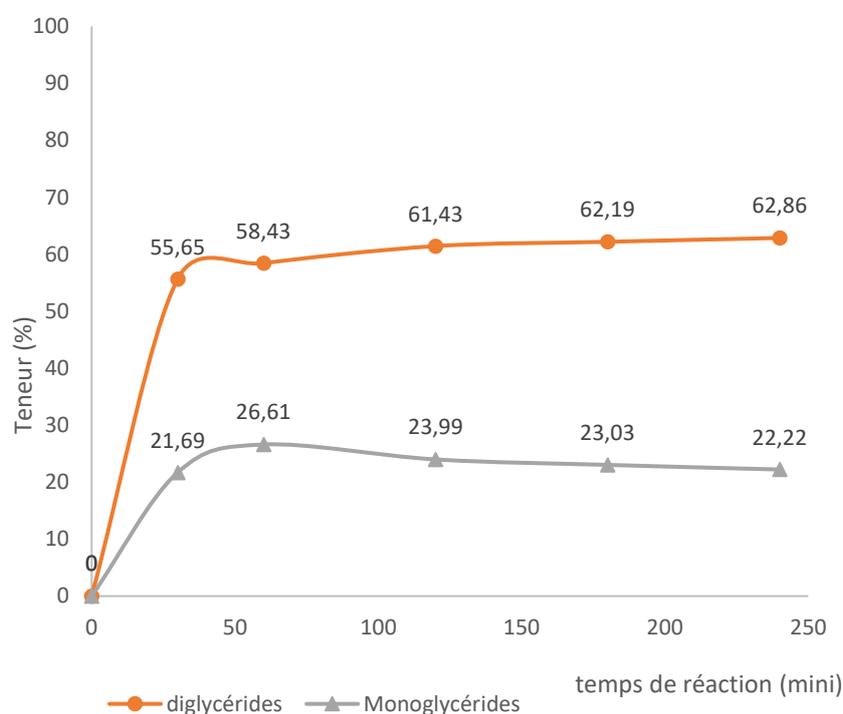


Figure 21: Suivi cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute en présence de Novozyme 435.

La réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute de *Ricinodendron heudelotii* est réalisée en 45 minutes. Elle conduit à la formation d'un mélange de mono-diglycérides : 30-60 (en pourcentage massique).

La forte accumulation de diglycérides pourrait s'expliquer par une estérification rapide du monoglycéride et une formation retardée des triglycérides. L'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute par Novozyme 435 ne produit pas de triglycérides.

2.2.2. Teneur en monoglycérides et diglycérides au cours de l'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée avec Novozyme 435 dans un milieu sans solvant

La cinétique de formation des monoglycérides et des diglycérides au cours de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée en présence de Novozyme 435 est observable sur les courbes de la **Figure 22**.

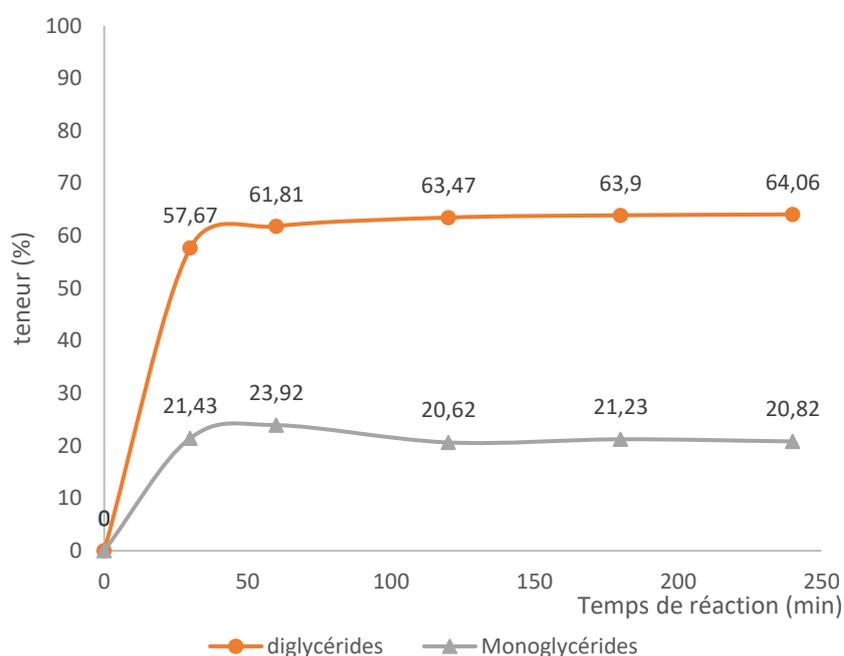


Figure 22: Suivi cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée en présence de Novozyme 435.

La réaction d'estérification enzymatique du concentrat d'acides gras libres d'huile brute modifiée est de 45 minutes. Les produits obtenus sont composés d'un mélange mono-diglycéride : 62-24 en pourcentage massique.

L'utilisation de Novozyme 435 pour catalyser la réaction d'estérification des acides gras libres de l'huile brute modifiée ne produit pas de triglycérides.

On a plutôt une accumulation de diglycérides. Après les 45 minutes de réaction le mélange mono-diglycérides dans le milieu reste constant jusqu'à la fin de réaction.

Chapitre 3

L'estérification des acides gras libres riches en CLnA issus de l'hydrolyse des triglycérides natifs ou modifiés de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* dans des milieux sans solvant catalysée par Novozyme 435 conduit principalement à la formation de diglycérides (60%) en 45 minutes.

2.2.3. Teneur en monoglycérides et diglycérides au cours de l'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute par LCC dans un milieu sans solvant

La **Figure 23** rend compte de la cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute en présence de LCC.

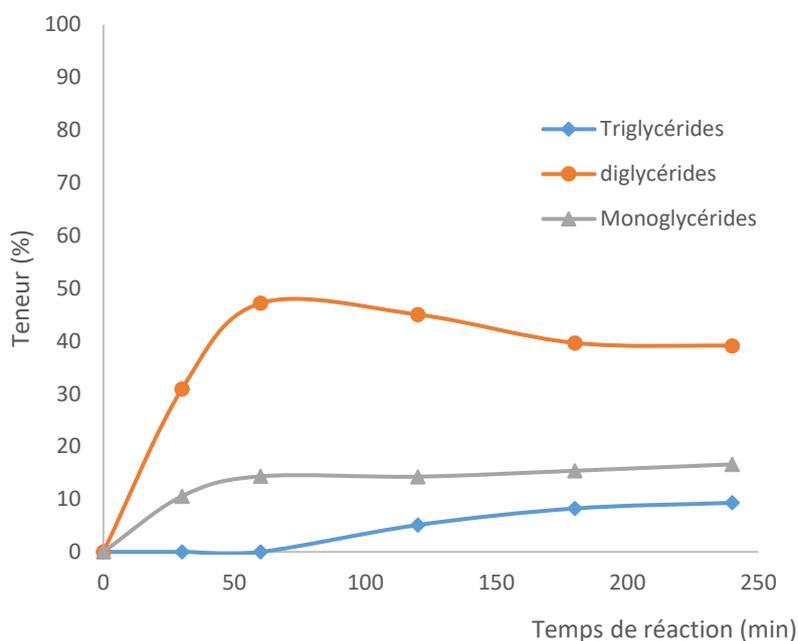


Figure 23: Suivi cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute par la lipase LCC

La réaction d'estérification atteint le maximum de production de diglycérides (48%) après une heure de réaction. Le milieu réactionnel à une heure est composé de mélange mono-diglycéride : 14,4 - 47,2 en pourcentage massique.

Cependant, les prélèvements effectués après une heure jusqu'à la fin de la réaction (4 heures) montrent une légère diminution de la teneur en diglycérides de 47,2% à 39,1% et la formation lente de triglycérides jusqu'à la fin de la réaction (9,3%).

Chapitre 3

2.2.4. Teneur en monoglycérides et diglycérides au cours de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée par LCC dans un milieu sans solvant

La cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée, catalysée par la lipase LCC, est présentée par les courbes de la **Figure 24**.

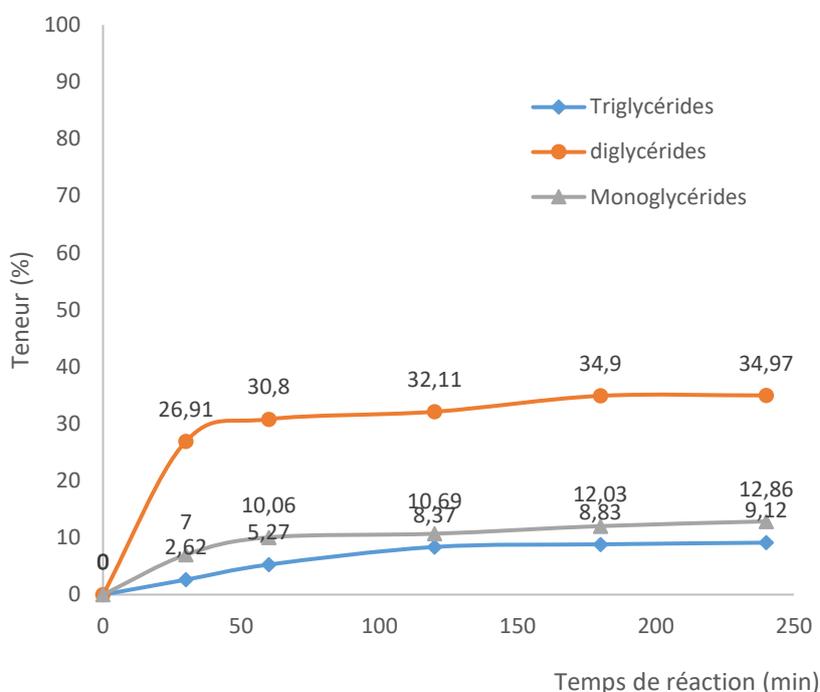


Figure 24: Suivi cinétique de l'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée par la lipase LCC

Cette réaction d'estérification conduit à la production de monoglycérides, de diglycérides et de triglycérides. Les résultats montrent que la lipase LCC estérifie la molécule de glycérol pour former les triglycérides.

L'allure de la cinétique des diglycérides est une courbe formée de deux pentes différentes avec un point de rupture situé à 45 minutes. La première phase en 45 minutes correspond à la formation rapide et de diglycérides.

Après les 45 minutes, il se produit la formation lente mais croissante de diglycérides alors que la formation des monoglycérides et de triglycérides stagne au-delà de 120 min. Après 4 heures de réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres en présence de LCC, il

Chapitre 3

se produit un mélange de mono/di/triglycérides avec un rapport (13/35/9) en pourcentage massique.

2.3. Profil glycérique des milieux réactionnels des réactions d'estérifications enzymatiques dans du *tert*-butanol

Le résultat attendu de ces études des réactions d'estérification en milieu solvant alcoolique lipophile, le *tert*-butanol $\log P=0,80$ est de synthétiser des mélanges monodiglycérides à différents teneurs et d'orienter la synthèse des esters partiels dans le sens de la production des monoglycérides.

Novozyme 435 est choisie pour la suite des travaux. Cette lipase permet, en effet, d'obtenir des degrés d'avancement de la réaction de 85% pour l'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée. En outre, Novozyme 435 permet la synthèse de monoglycérides et des diglycérides, mais pas de triglycérides.

Les réactions d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée est réalisée en milieu solvanté avec du *tert*-butanol catalysé par Novozyme 435.

Wang *et al.*, (2016) ont observé que Novozyme 435 a une activité enzymatique élevée lorsqu'elle est utilisée dans une estérification en présence de solvants organiques tels que le 2-butanol ou le *tert*-butanol [72]. Ces études ont montré que les solvants à $\log(P)$ faible, par exemple le *tert*-butanol avec un $\log P=0,80$ favorise la production et l'accumulation de produits plus hydrophiles à savoir les monoglycérides que les diglycérides et les triglycérides [72].

2.3.1. Teneurs en monoglycérides diglycérides au cours de réactions d'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute par Novozyme 435 dans du *tert*-butanol.

La cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute catalysée par Novozyme 435 dans du *tert*-butanol est représenté par les courbes de la **Figure 25**

Chapitre 3

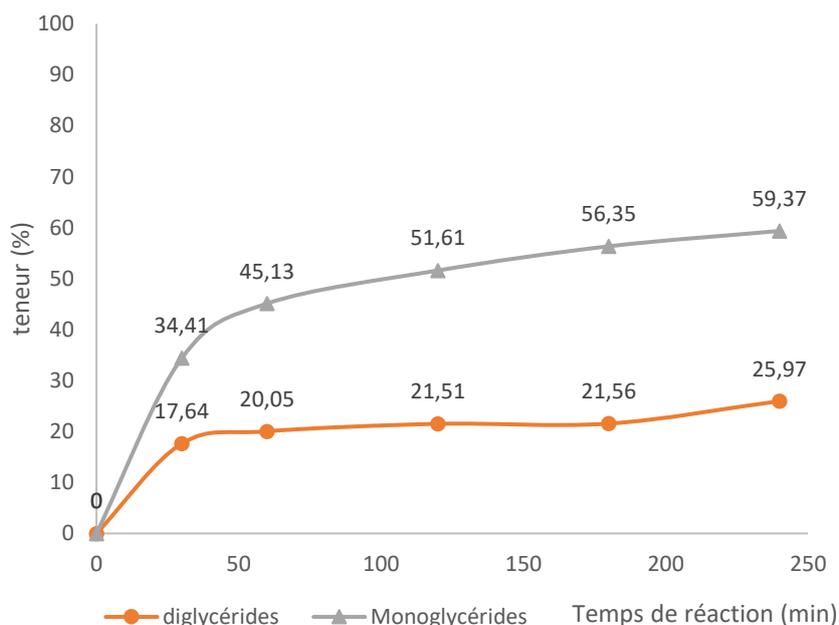


Figure 25: Suivi cinétique de la réaction d'estérification du concentré d'acides gras de l'huile brute en présence de Novozyme 435 dans du *tert*-butanol

L'allure des courbes montre que la réaction d'estérification se déroule en deux phases. La première phase dure 30 minutes et la deuxième phase commence après les 30 minutes jusqu'à la fin de la réaction (4 heures). La réaction d'estérification conduit à la formation de mélange de monoglycérides et de diglycérides.

La cinétique de formation des monoglycérides montre une production d'ester partiels de glycérol forte dans la première phase. Cette production devient lente dans la deuxième phase (après 30 minutes jusqu'à la fin de la réaction), elle atteint 60%.

La première phase de production des diglycérides conduit à la formation de 17,6% de diglycérides. Cette production devient lente dans la deuxième phase et atteint une valeur de 26%. Après 4 heures de réaction on a un mélange mono-diglycérides : 60-26 en pourcentage massique

Chapitre 3

2.3.2. Teneurs en monoglycérides et diglycérides au cours de l'estérification du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée en présence de Novozyme 435 dans du *tert*-butanol.

La Figure 26 résume la cinétique de la réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée catalysée par Novozyme 435 dans du *tert*-butanol.

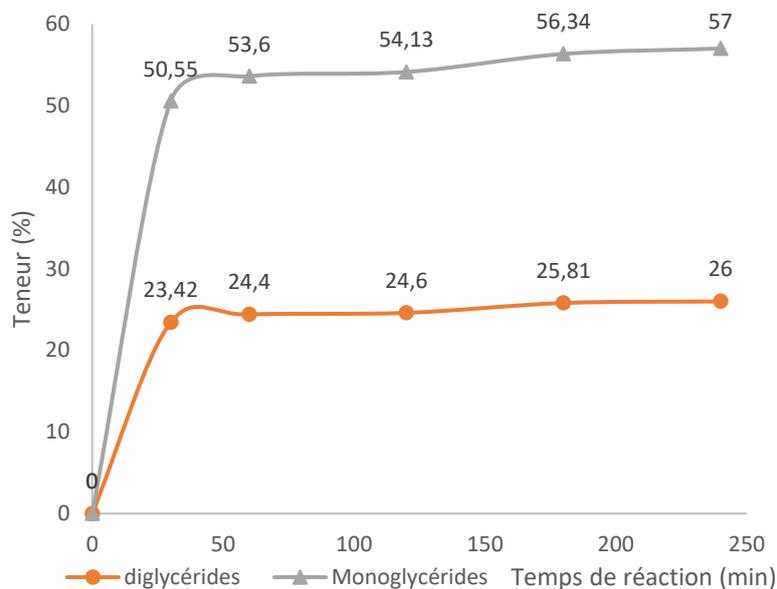


Figure 26: Cinétique d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée en présence de Novozyme 435 dans du *tert*-butanol

L'allure de la cinétique des courbes montre que la réaction d'estérification se déroule au bout de 45 minutes de réaction. Cette estérification conduit à la formation de mélange de monoglycérides et de diglycérides sans triglycérides. Après 45 minutes d'estérification on obtient un mélange mono-diglycérides : 54-24 en pourcentage massique.

La réaction d'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute riche en CLnA (acide β -éléostéarique 41,7%, acide α -éléostéarique 8,1 %, et acide catalpique 8,2%) catalysée par Novozyme 435 dans du *tert*-butanol conduit à la formation d'un mélange mono-diglycérides : 57-26.

L'utilisation de *tert*-butanol dans les réactions d'estérification solubilise le concentrat d'acides gras libres de l'huile brute ou le concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée et le glycérol. Cela rend le mélange acide gras/glycérol immiscible homogène, et facilite ainsi les transferts de matières et les interactions entre les substrats et la lipase Novozyme 435.

Chapitre 3

Les sites actifs de la lipase favorisent la création d'un complexe acide gras-lipase-glycérol sur les positions 1, 2 et 3 de la molécule de glycérol et les produits (monoglycérides et diglycérides) sont libérés au fur et à mesure du déroulement de la réaction.

2.4. Analyse des monoglycérides diglycérides des CLnA par chromatographie préparative sur plaque de silice et identification des groupes acyls des chaînes carbonées des monoglycérides et diglycérides par CPG/DIF.

2.4.1. Problématique :

La nécessité d'analyser les monoglycérides et diglycérides des CLnA est liée au fait que leurs propriétés sont impactées par les conditions de leur préparation et leur utilisation potentielle. En effet ces esters partiels de glycérol sont issus de plusieurs protocoles de synthèse par estérification enzymatique des CLnA de l'huile brute ou traitée de *Ricinodendron heudelotii*. Il est nécessaire de contrôler les conditions de leur préparation d'autant plus qu'elles vont fournir des glycérides partiels nouveaux.

De plus, ils sont constitués par des mélanges d'espèces chimiques individuelles nouvelles qui diffèrent par le degré d'estérification, la longueur de chaîne carbonée de l'acide gras, le degré et le type d'insaturation, le degré et le type d'isomérisation, la position de l'isomère 1- ou 2- de l'acide gras sur le squelette du glycérol dans le cas des monoglycérides et par les positions 1,2- ou 1,3- ou 2,3- des acides gras sur le squelette du glycérol dans le cas des diglycérides.

Bon nombre de méthodes analytiques sont disponibles dans la littérature. Les méthodes chimiques d'oxydation de monoglycérides sont imprécises. Les chimistes ont développé des méthodes plus sophistiquées avec le souci de moins consommer du temps de réaction et les quantités de réactifs chimiques.

La chromatographie sur couche mince TLC est adaptée à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons où il est souhaité l'obtention des données semi-quantitatives pour distinguer le changement de l'isomère α en β -éléostéarique dans un échantillon pour le contrôle de la qualité de l'huile [73,74].

Chapitre 3

Nous avons exploité la chromatographie sur couche mince couplée à l'ionisation chimique TLC/FID pour suivre la formation des monoglycérides purs contaminés par des diglycérides et triglycérides qui perturbent la sélectivité de la réaction catalytique de condensation de l'acide oléique avec le glycidol en présence des résines échangeuses d'anions. Les produits et les réactifs ne nécessitent pas d'être dérivés par des agents chimiques toxiques. Le degré de séparation de ces molécules est très sensible aux ratios des gradients de mélanges de solvants hexane/diéthyl éther ou hexane/diéthyl éther/acide formique faiblement acidifié et adapté pour la séparation de mono-, di-, triglycérides acide oléique, glycidol et glycérol [75].

Dans une autre étude, nous avons réalisé la séparation des esters partiels de glycérol (monoglycérides et diglycérides), triglycérides et l'acide undécylénique par chromatographie sur gel de silice en utilisant le mélange cyclohexane/acétate éthyle : 60:40 (v/v) comme éluant. Ce système a permis de séparer dans un même mélange des fonctions esters de polarité différente (monoundécénoate de glycérol, diundécénoate de glycérol, triundécénoate de glycérol) et l'acide undécylénique ionisable [76]. Ce système d'éluion est retenu pour séparer les monoglycérides, les diglycérides, les triglycérides et les acides gras libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii*.

Deux méthodes de séparation ont été choisies pour le fractionnement des esters partiels (mono et diglycérides), des triglycérides et des acides gras libres des huiles de *Ricinodendron heudelotii* à savoir : la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie préparative sur plaques.

2.4.2. Composition des monoglycérides- diglycérides dans les esters partiels de CLnA

L'analyse et l'identification des chaînes d'acides gras portées par les monoglycérides et les diglycérides obtenus par estérification enzymatique est réalisée sur quatre produits appelés esters partiels de glycérol : EPG 1, EPG 3, EPG 5 et EPG 7. Leur mode de préparation est présenté succinctement.

Chapitre 3

Il s'agit :

d'esters partiels de glycérol d'acides gras de l'huile brute de *Ricinodendron heudelotii* :

- **EPG1:** EPG-CLnA α E (di). Ce sont des esters partiels de glycérol obtenus par estérification enzymatique du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute riche en α -éléostéarique (60%) en présence de Novozyme 435 dans un milieu sans solvant. EPG1 est un mélange monoglycérides-diglycérides : 30-60 en pourcentage massique.

- **EPG7:** EPG-CLnA α E (mono) esters partiel de glycérol produits par estérification enzymatique du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute riche en acide α -éléostéarique (60%) en présence de Novozyme 435 dans du *tert*-butanol. EPG7 un mélange monoglycéride-diglycérides : 60-30 en pourcentage massique.

d'esters partiels de glycérol d'acides gras de l'huile brute modifiée au Sun Test :

- **EPG3 :** EPG-CLnA β E (di). Ce sont des esters partiels de glycérol obtenus par estérification enzymatique du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée riche en acide β -éléostéarique (42%) en présence de Novozyme 435 dans un milieu sans solvant. EPG3 est un mélange monoglycérides-diglycérides : 25,5-63,0 en pourcentage massique.

- **EPG5:** EPG-CLnA β E (mono). Ce sont des esters partiels de glycérol obtenus par estérification enzymatique du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée riche en β -éléostéarique (42%) en présence de Novozyme 435 dans du *tert*-butanol. EPG5 est un mélange monoglycérides-diglycérides : 60-30 en pourcentage massique.

Selon toute vraisemblance, les esters partiels de glycérol (monoglycérides et diglycérides), les triglycérides et les acides gras libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii* sont composés majoritairement des CLnA (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique).

Ces esters partiels de glycérol absorbent en UV entre 253 à 300 nm (**Figure 27**). De ce fait, la révélation des plaques CCM et des plaques préparatives est réalisée par une lampe UV à deux longueurs d'ondes 254 nm et 365 nm.

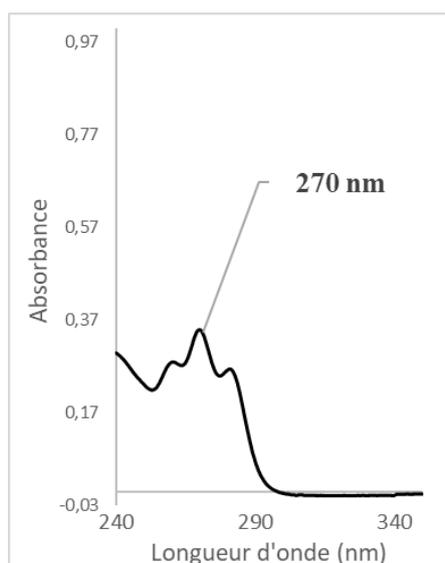


Figure 27: Spectre UV-Vis d'esters partiels de glycérol de l'huile brute de *Ricinodendron heudelotii*

La séparation par chromatographie préparative est réalisée sur une plaque chromatographique de dimension 20 X 20 cm.

Pour chaque produit (EPG-CLnA), 50 mg est dissous dans 1 mL de chloroforme et déposé sur la ligne de base (ligne de dépôt) de la plaque préparative. La plaque est ensuite introduite dans une cuve CCM contenant 100 mL d'éluant constitué d'un mélange de solvants cyclohexane/acétate d'éthyle 60/40 en volume.

Ce système de solvants permet d'élué les molécules en les séparant. Une fois l'éluant atteint la ligne de front de la plaque, celle-ci est retirée de la cuve et séchée sous une hotte pour laisser évaporer les solvants (cyclohexane et acétate d'éthyle). La plaque est ensuite révélée à l'UV à la longueur d'onde 254 nm.

L'analyse des spots sur plaques CCM des mélanges des esters partiels (EPG-CLnA) permet de mettre en évidence la présence de triglycérides, d'acides gras libres, de diglycérides et de monoglycérides qui sont caractérisés par des rapports frontaux respectifs : $R_f = 0,9$; $R_f = 0,6$; $R_f = 0,38$; $R_f = 0,15$.

Les spots d'acides gras libres, de diglycérides et de monoglycérides sont grattés. La silice imprégnée de molécules est récupérée dans des bocaux de 30 mL. Les produits sont désorbés de la silice avec du *tert*-butyle-méthyl-éther (TBME).

Chapitre 3

Le profil acides gras des produits est ensuite déterminé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur par ionisation de flamme CPG/DIF.

Nous nous sommes principalement intéressés aux fractions des monoacylglycérols et diacylglycérols des différents EPG-CLnA obtenus selon que le CLnA porte l'acide éléostéarique en α - Δ ou en β - Δ .

2.4.3. Profil des groupes acyls des différentes fractions des mono-diacylglycériques de EPG-CLnA α E (di)

Les différents profils des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols ou monoglycérides -diacylglycérols ou diglycérides de EPG1 sont présentés dans le **Tableau 14**.

Tableau 14: Profil des groupes acyls des fractions de EPG-CLnA α E (di)

Profil des groupes acyls	EPG 1 : EPG-CLnA α E (di)	
	Teneurs des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols	Teneurs des groupes acyles des fractions des diacylglycérols
Acide palmitique C16:0	7,1 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2
Acide stéarique C18:0	15,0 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
Acide oléique C18:1	5,6 \pm 0,0	7,2 \pm 0,0
Acide linoléique C18:2	23,1 \pm 0,1	23,9 \pm 0,1
Acide α -éléostéarique C18:3c, t, t	46,9 \pm 0,1	62,8 \pm 0,2
Acide catalpique C18:3t, t, c,	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Acide β -éléostéarique C18:3t, t, t	2,1 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1
CLnA/ AGPI	67,96	72,78

A la lecture des résultats de ce Tableau 16, les changements et les contributions des teneurs en groupes acyls dans les EPG-CLnA s'opèrent particulièrement au niveau des groupes acyls du CLnA- α -éléostéarique. En effet, l'acide α -éléostéarique est inséré simultanément dans les groupes acyls des monoacylglycérols avec une teneur de 46,9 \pm 0,1 % et dans les groupes acyls des diacylglycérols avec une teneur plus élevée à la valeur de 62,8 \pm 0,2%.

Chapitre 3

Dans les diacylglycérols, cette teneur est similaire à celle des groupes acyls de l'acide α -oléostéarique trouvée à 61,1% dans l'huile de *Ricinodendron heudelotii* native. Il apparaît ainsi un enrichissement de groupes acyls de l'acide α -oléostéarique dans les diacylglycérols.

Les sommes des teneurs des groupes acyls du LA (acide linoléique C18:2 $23,9 \pm 0,1\%$) et du CLnA (acide α -oléostéarique $62,8 \pm 0,2\%$) sont quasi identiques dans les diacylglycérols que dans les triacylglycérols ou triglycérides (LA, acide linoléique 23% ; CLnA acide α -oléostéarique 61,0%) de l'huile native.

La réaction d'estérification transfère aux diacylglycérols l'intégralité du groupe acyl de CLnA-de l'acide α -oléostéarique des triacylglycérols ou triglycérides. Quant aux groupes acyls des monoacylglycérols, leur teneur en CLnA- α -oléostéarique est réduite par rapport à celle de l'huile native. Néanmoins la teneur cumulée en CLA (acide linoléique $23,1 \pm 0,1\%$) et en CLnA (acide α -oléostéarique $46,9 \pm 0,1\%$) est significative dans ces lipides polaires constitués de 70% de groupes acyls des acides gras polyinsaturés et de 22% de groupes acyls des acides gras saturés. Ce qui augure des fonctionnalités intéressantes dans les usages de ces esters partiels de glycérol de CLnA en mélange avec les esters partiels de glycérol de CLA dans le cas des diacylglycérols.

Les groupes acyls des chaînes saturées devaient contribuer favorablement aux comportements techno-fonctionnels de l'ensemble des esters partiels de glycérol des AGS (Acyls Gras Saturés C16:0, C18:0), des CLA et des CLnA.

2.4.4. Profil des groupes acyls des différentes fractions des monoacylglycérols, diacylglycérols de EPG-CLnA α E (mono)

Les différents profils des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols, diacylglycérols de EPG7 sont présentés dans le **Tableau 15**.

Chapitre 3

Tableau 15: Profil des groupes acyls des différentes fractions des monoacylglycérols-, diacylglycérols de EPG-CLnA α E (mono)

Profil des groupes acyls	EPG 7 : EPG-CLnA α E (mono)	
	Teneurs des groupes acyls de fractions des monoacylglycérols	Teneurs des groupes acyls des fractions des diacylglycérols
Acide palmitique C16:0	8,6 \pm 0,1	1,2 \pm 0,0
Acide stéarique C18:0	17,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1
Acide oléique C18:1	5,9 \pm 0,2	6,1 \pm 0,1
Acide linoléique C18:2	22,1 \pm 0,0	22,9 \pm 0,2
Acide α -éléostéarique C18:3c, t, t	44,3 \pm 0,1	67,1 \pm ,01
Acide catalpique C18:3t, t, c,	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Acide β -éléostéarique C18:3t, t, t	1,8 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0
CLnA/ AGPI	67,76	74,86

La lecture des résultats de ce **Tableau 15** amène à des commentaires similaires. Il se produit le transfert de la fonctionnalité de triacylglycérols ou triglycérides de l'huile native vers les diacylglycérols ou diglycérides. L'enrichissement en groupes acyls de l'acide α -éléostéarique dans les diacylglycérols ou diglycérides s'opère via la réaction d'estérification.

Nous remarquons que les teneurs des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols ou monoglycérides sont quasi-identiques par rapport à celles obtenues précédemment. Dans ces deux études, la réaction d'estérification est répétable en faveur du transfert de groupes acyls de l' α -éléostéarique de manière prépondérante vers les groupes acyls des fractions des diacylglycérols ou diglycérides.

Chapitre 3

2.4.5. Profil des groupes acyls des différentes fractions des monoacylglycérols-, diacylglycérols de EPG-CLnA β E (di)

Le **Tableau 16** regroupe les différents profils des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols et de diacylglycérols de EPG 3.

Tableau 16: Profil des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols et diacylglycérols de EPG-CLnA β E (di)

Profil groupes acyls	EPG3 : EPG-CLnA β E (di)	
	Teneurs (%) des groupes acyls de fractions de monoacylglycérols	Teneurs (%) des groupes acyls de fractions de diacylglycérols
Acide palmitique C16:0	9,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1
Acide stéarique C18:0	12,3 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1
Acide oléique C18:1	6,8 \pm 0,1	11,1 \pm 0,0
Acide linoléique C18:2	22,9 \pm 0,1	35,7 \pm 0,2
Acide α -éléostéarique C18:3c, t, t	6,9 \pm 0,2	8,9 \pm 0,1
Acide catalpique C18:3t, t, c,	5,0 \pm 0,0	8,6 \pm 0,2
Acide β -éléostéarique C18:3t, t, t	38,4 \pm 0,1	33,4 \pm 0,1
CLnA/ AGPI	68,72	58,78

L'examen des teneurs des groupes acyls dans les fractions de monoacylglycérols ou monoglycérides révèle une tendance haussière des AGS C16:0 et C18:0 respectivement avec des valeurs de 9,3 \pm 0,1% et 12,3 \pm 0,0% contre les valeurs de 4,7% et 5,2% dans l'huile native de *Ricinodendron heudelotii*. Les teneurs des groupes acyls de LA et CLnA baissent légèrement.

Chapitre 3

Ce qui donne un rapport entre les groupes acyls des CLnA et ceux de l'ensemble des groupes acyls polyinsaturés de 68,71% contre 70,73% dans l'huile native. Cette valeur montre la tendance dominante des groupes acyls des CLnA dans les monoacylglycérols ou monoglycérides. En ce qui concerne les teneurs des groupes acyls dans les fractions des diacylglycérols ou diglycérides la tendance haussière est remarquable dans les teneurs de groupe acyl de CLA avec une valeur de $35,7 \pm 0,2\%$ contre 23,9% dans l'huile native.

Par contre les valeurs des teneurs des groupes acyls des CLnA restent stables pour les groupes acyls des CLnA α -éléostéarique et catalpique. La teneur de groupe acyl de β -éléostéarique chute à $33,4 \pm 0,1\%$ contre 42,3% dans l'huile native. Ce qui donne un rapport entre les groupes acyls des CLnA et ceux de l'ensemble des groupes acyls polyinsaturés de 58,78 % contre 70,73% dans l'huile native.

En comparaison, la réaction d'estérification transfère plus quantitativement les groupes acyls des CLnA dans les monoacylglycérols ou monoglycérides que dans les diacylglycérols ou diglycérides. Le groupe acyl de β -éléostéarique domine par sa teneur élevée de $38,4 \pm 0,1\%$. Ainsi, le groupe acyl de l'acide β -éléostéarique exprime une typosélectivité au cours de la réaction d'estérification indépendamment de celle attendue de Novozyme 435.

2.4.6. Profil des groupes acyls des différentes fractions des monoacylglycérols, diacylglycérols de EPG-CLnA β E (mono)

Le **Tableau 17** résume les différents profils des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols ou monoglycérides-diacylglycérols ou diglycérides de EPG5.

Chapitre 3

Tableau 17: Profil des groupes acyls des fractions des monoacylglycérols-, diacylglycérols de EPG-CLnA β E (mono)

Profil des groupes acyls	EPG 5 : EPG-CLnA β E (mono)	
	Teneurs des groupes acyls des fractions de monoacylglycérols	Teneurs des groupes acyls des fractions de diacylglycérols
Acide palmitique C16:0	6,4 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1
Acide stéarique C18:0	7,8 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0
Acide oléique C18:1	6,7 \pm 0,2	10,4 \pm 0,1
Acide linoléique C18:2	19,3 \pm 0,1	31,7 \pm 0,2
Acide α -éléostéarique C18:3c, t, t	6,2 \pm 0,1	9,7 \pm 0,10
Acide catalpique C18:3t, t, c,	6,9 \pm 0,0	9,4 \pm 0,0
Acide β -éléostéarique C18:3t, t, t	46,8 \pm 0,1	36,3 \pm 0,1
CLnA/ AGPI	75,63	63,61

Le **Tableau 17** montre que les principaux changements structuraux s'opèrent autour des groupes acyls de LA et CLnA. Dans les monoacylglycérols, la teneur du groupe acyl de LA diminue. Elle est de 19,3 \pm 0,1% contre 23,9% dans l'huile native. Le groupe acyl du CLnA de l'acide β -éléostéarique s'élève à 46,8 \pm 0,1% contre 42,3% dans l'huile native.

La réaction d'estérification est favorable au transfert de groupe acyl de CLnA-de l'acide β -éléostéarique dans les monoacylglycérols. Ceux-ci connaissent un enrichissement en groupe acyl de CLnA particulièrement en groupe acyl de CLnA- β -éléostéarique. Le cumul des groupes acyls de LA C18:2 et de CLnA engendre des monoacylglycérols avec une teneur en groupes acyls CLnA dominants soit 75,63% dans les monoacylglycérols s contre 70,85% dans l'huile native.

Chapitre 3

Dans les diacylglycérols, la teneur du groupe acyl de CLA C18:2 s'élève à $31,7 \pm 0,2\%$ contre 23,9% dans l'huile native. L'enrichissement en LA s'opère dans les diacylglycérols. Les teneurs des groupes acyls des CLnA de l'acide α -éléostéarique et acide catalpique augmentent légèrement. Mais leur impact ne peut pas masquer la chute du rapport entre la teneur des groupes acyls de CLnA par rapport aux groupes acyls de polyinsaturés totaux. Ce ratio s'élève à 63,60% dans les diacylglycérols contre 70,85% dans l'huile native. Enfin, les diacylglycérols présentent des teneurs quasi-équivalentes en groupe acyl LA de $31,7 \pm 0,2\%$ et en groupe acyl CLnA- β -éléostéarique. La réaction d'estérification n'est pas typosélective.

En définitive, on observe dans les monoacylglycérols, l'enrichissement en groupe acyl de CLnA- α -éléostéarique. Il est provoqué par la typo-sélectivité exercée par la lipase de Novozyme 435 vis-à-vis de l'acide α -éléostéarique. Par contre dans les diacylglycérols, les groupes acyls de LA et de CLnA- β -éléostéarique ont des teneurs comparables.

En comparaison, on assiste au transfert de ces deux groupes d'acyls sans discrimination. La lipase de Novozyme 435 n'est pas discriminante par rapport au groupe acyl de CLnA- β -éléostéarique. Cependant, ce groupe acyl β -éléostéarique introduit à lui seul la typosélectivité indépendamment de ce rôle attribué à l'enzyme de Novozyme 435.

2.5. Concentration micellaire critique et tension de surface

Les esters partiels de glycérol sont des tensioactifs non-ioniques. Ils ont pour rôle premier de stabiliser des émulsions dans diverses formulations. La connaissance des paramètres que sont la concentration micellaire critique (CMC) et tension de surface est très importante, car ces derniers permettent de savoir si le tensioactif est capable de s'auto-organiser dans une solution aqueuse pour former des micelles, des agrégats.

La **Figure 28** rassemble les courbes obtenues après l'étude cinétique de la tension de surface des 4 produits obtenus par estérification enzymatique:

Chapitre 3

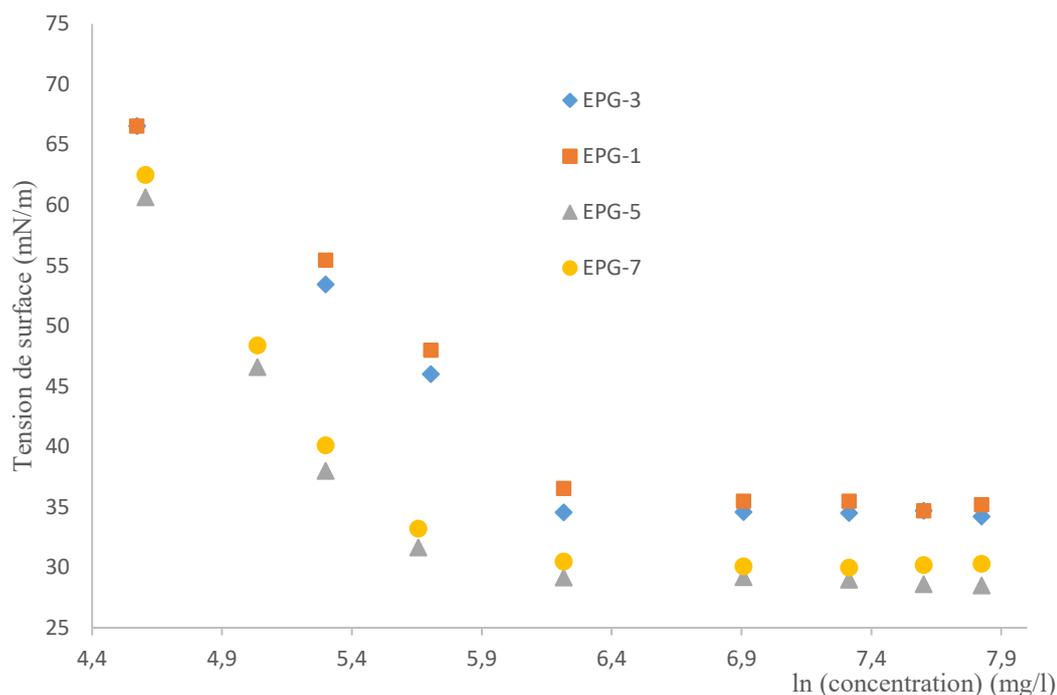


Figure 28: Suivi cinétique de la valeur à l'équilibre de la tension de surface en fonction de $\ln(\text{concentration})$ en ester partiel de glycérol. (EPG-1) (■), EPG-3 (◆), EPG-5 (▲), et EPG-7 (●).

Les courbes ci-dessus représentent la tension de surface à l'équilibre en fonction de différentes $\ln(\text{concentrations})$ des esters partiels de glycérol. Sur ces courbes, on observe une diminution de la tension de surface avec l'augmentation de la concentration en esters partiels de glycérol de la solution, puis, à partir d'une certaine concentration de la solution en EPG qui sera fixée comme la valeur de la concentration micellaire critique (CMC), les courbes restent constantes. La tension de surface et la concentration micellaire critique (CMC) des EPGs sont présentés dans le **Tableau 18**.

Ces résultats montrent que les courbes de EPG 1 et EPG 3 ont des allures comparables avec une pente descendante de la tension interfaciale de 67-65 mN/m jusqu'à 35 mN/m, à la rupture et à la valeur de CMC puis, suit un plateau de densification de micelles. Dans le cas des EPG 5 et EPG 7, l'allure de la pente est forte. Elle passe de la tension interfaciale de 67-65 mN/m jusqu'à 32-30 mN/m.

Les valeurs des tensions interfaciales des deux groupes de EPG se confondent à 30 mN/m. L'examen de ces courbes montre des valeurs de CMC plus faibles dans le cas des EPG 5 et EPG 7 de valeurs de 0,215 g/L contre celles du groupe de EPG 1 et EPG 3 de valeurs 0,380 g/L. EPG 5 et EPG 7 devraient afficher des propriétés tensioactives meilleures que celles de EPG 1 et EPG 3.

Chapitre 3

Selon les compositions chimiques des groupes acyls de EPG 5 et EPG 7, ce sont les teneurs en monoglycérides ou monoacylglycérols notamment leurs teneurs élevées en groupes acyl de l'acide α -éléostéarique ou β -éléostéarique qui dirige les propriétés tensioactives. L'enrichissement en groupe acyl α - ou β -éléostéarique opéré par estérification enzymatique en présence de Novozyme 435 aboutit à une nouvelle méthode d'obtention des esters partiels de glycérol structurés aux propriétés techno-fonctionnelles.

Dans le cas des EPG 1 et EPG 3, la composition des groupes acyls montre une teneur élevée en diacylglycérols ou diglycérides avec un enrichissement en groupe acyl α -, ou β -éléostéarique. Les réactions d'estérifications enzymo-catalytiques en présence de Novozyme 435 ont permis l'élaboration des esters partiels de diacylglycérols ou diglycérides structurés dotés des propriétés tensioactives.

Dans le domaine de la recherche biologique, ces diacylglycérols sont des lipides bioactifs recherchés en tant que composants structurels de la membrane cellulaire, réservoirs de molécules de signalisation et de régulation cellulaires [77].

Tableau 18: Récapitulatifs des valeurs de tension de surface et de concentration micellaire critique des esters partiels de glycérol.

Echantillons	Profil glycérique (%)		Tension de surface (mN/m)	CMC (g/L)
	Monoacylglycérols	Diacylglycérols		
EPG1: EPG-CLnA α E (di)	30	60	34	0,380
EPG3: EPG-CLnA β E (di)	25,5	63	35	0,380
EPG5 : EPG-CLnA β E (mono)	63	26	29	0,215
EPG7 : EPG-CLnA α E (mono)	61	30	30	0,215

Chapitre 3

Les résultats du **Tableau 18** regroupent les valeurs de la tension de surface et de la CMC. Ils montrent que les valeurs des concentrations micellaires critiques sont de 0,380 g/L pour EPG1, 0,380g/L pour EPG3, 0,215g/L pour EPG5 et 0,215 g/L pour EPG7.

Les EPG ont des tensions de surfaces comprises entre 29 et 35 mN/m au-dessus de la valeur de la CMC. Les résultats montrent que EPG5 a une tension de surface de 29 mN/m et EPG7 une tension de surface de 30 mN/m. EPG1 a une tension de surface de 34 mN/m et EPG3 une tension de surface 35 mN/m.

En effet, des études de Moonen *et al.*, (2014) relèvent que la tension de surface des surfactants riches en monoglycérides polyinsaturés est de 30 mN/m, ce qui est conforme aux valeurs de tension de surface de EPG5 et EPG7 synthétisés avec des concentras d'acides gras composés de 85% d'acides gras polyinsaturés [58]. En effet, EPG5 et EPG7 sont des esters partiels riches en monoglycérides à chaînes carbonées polyinsaturées (CLnA et acide linoléique).

Cependant, les valeurs de tension de surface de EPG1 et EPG3 riches en diglycérides sont différentes de celles de la littérature. Moonen *et al.*, (2014) ont aussi révélé que la valeur de tension surface des surfactants riches en diglycérides polyinsaturés est de 45mN/m.

Nos résultats montrent bien que les valeurs obtenues pour EPG1 et EPG3 sont plus faibles, avec des valeurs de 35mN/m, soit une différence de 10 mN/m. Cette différence de CMC pourrait s'expliquer par la présence d'acides gras polyinsaturés avec trois doubles liaisons conjuguées, l'acides α -éléostéarique, l'acide β -éléostéarique et acide catalpique.

Ces résultats montrent également que les esters partiels de glycérol obtenus à partir du concentrat d'acides gras de l'huile brute et du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée des amandes de *Ricinodendron heudelotii* riche en acides gras polyinsaturés (85%) sont de bons tensioactifs non-ioniques.

2.6. Détermination de la HLB (Balance Lipophile Hydrophile) des EPG

Le profil acide gras des esters partiels de glycérol synthétisés à partir du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et du concentrat d'acides gras libres de l'huile modifiée de *Ricinodendron heudelotii* est composé de 96% en acides gras C18.

Chapitre 3

Les calculs de HLB ont été réalisés par la méthode de Davies en se basant sur les groupements chimiques des acides gras en C18 et la proportion en monoester et diester des mélanges. Les calculs des coefficients des différentes fonctions chimiques des parties hydrophile et lipophile sont regroupés dans les **Tableau 19** et **Tableau 20**

Tableau 19: Coefficients des groupes chimique du monoester de CLnA (C18 :3)

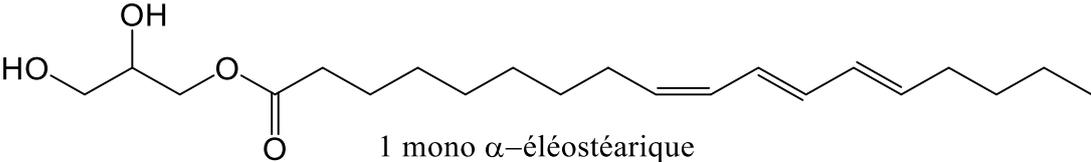
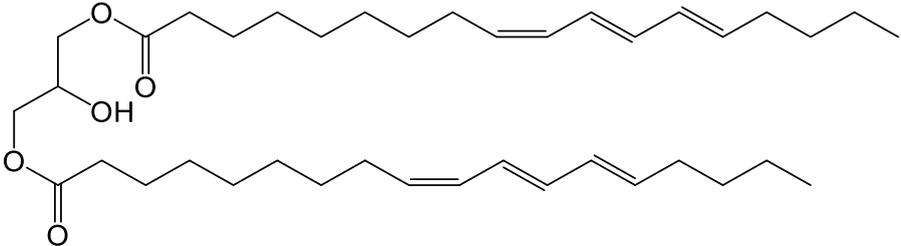
1-mono α -éléostéarate de glycérol			
 <p>1 mono α-éléostéarique</p>			
Partie hydrophile		Partie lipophile	
Fonctions chimiques et nombre	Coefficient de Davies	Fonctions chimiques et nombres	Coefficient de Davies
<i>Ester</i> (1)	2,4	$-CH_2-$ (9)	-4,75
$-CH_2 - OH$ (1)	1,9	$-CH_3$ (1)	-0,475
$-CH - O$ (1)	1,9	$= CH -$ (6)	-2,85

Tableau 20: Coefficients des groupes chimique du diester de CLnA (C18 :3)

1,3-di α -éléostéarate de glycérol			
			
Partie hydrophile		Partie lipophile	
Fonctions chimiques et nombre	Coefficient de Davies	Fonctions chimiques et nombre	Coefficient de Davies
<i>Ester</i> (2)	4,8	$-CH_2$ (18)	-8,55
$-CH-OH$ (1)	1,9	$-CH_3$ (2)	-0,95
$-CH_2 - O -$ (2)	3,8	$= CH -$ (12)	-5,7

Chapitre 3

A partir des coefficients affectés aux fonctions chimiques obtenues par la méthode de Davies et des pourcentages massiques des fractions en monoglycéride et diglycéride des EPGs les valeurs de HLB ont été calculées et regroupées dans le **Tableau 21**.

Tableau 21: Valeurs des Balances Lipophile Hydrophile des esters partiels de glycérol(s)

Produits	Fraction des émulsifiants (%)		Coefficients Méthode Davies		HLB
	mono	Di	Monoester	Diester	
	EPG1: EPG-CLnA α E (di)	0,3	0,6	1,54	
EPG3: EPG-CLnA β E (di)	0,255	0,63	1,31	1,449	2,76
EPG5 : EPG-CLnA β E (mono)	0,63	0,26	3,23	0,598	3,83
EPG7 : EPG-CLnA α E (mono)	0,61	0,3	3,13	0,69	3,82

Les résultats obtenus donnent des valeurs théoriques de HLB comprises entre 2 et 4. EPG5 et EPG 7 ont la même valeur de HLB 3,82. EPG1 a une valeur de HLB de 2,92 et une valeur de 2,76 pour EPG3. Ces valeurs des HLB sur l'échelle de classification des HLB de 0 à 20 sont attribuées à des émulsifiants lipophiles qui favorisent des émulsions de type eau dans huile (E/H).

Les esters partiels de glycérol EPG5 et EPG 7 riches en monoglycéride à chaînes polyinsaturées ont des valeurs de HLB 3,82 identiques à celles de HLB de l'oléate de glycérol 3,7 et du stéarate de glycérol 3,7 obtenues dans les études de Guo *et al.*, 2006[64].

La méthode de Davies a permis de prédire les valeurs de HLB des esters partiels de glycérol synthétisés. Ces valeurs sont théoriques, donc ne tiennent pas compte de la configuration des trois doubles liaisons conjuguées des CLnA C18:3 (acide α -éléostéarique, acide catalpique et acide β -éléostéarique), de la température et du pH des esters partiels de glycérol.

Chapitre 3

2.7. Analyses des propriétés physiques des esters partiels

2.7.1. Caractérisation physique des EPG par thermogravimétrie (ATG)

Les résultats de l'analyse TGA (Tableau 22) montrent que tous les esters partiels de glycérol (EPG) subissent une dégradation initiale à une température comprise entre 150 et 180°C et présentent une stabilité thermique T_s entre 210 et 230° C. Ces EPG ont une résistance à la chaleur et une stabilité thermique faible. Cela est le résultat de la décomposition des fonctions esters et des doubles liaisons conjuguées des acides gras polyinsaturés (acide linoléique, acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique).

Tableau 22: Résultat de la stabilité thermique des différents EPG-CLnA

Nom de l'échantillon	$T_{d5\%}$	$T_{d30\%}$	T_s
EPG1: EPG-CLnA α E (di)	178,0	299,0	230,5
EPG3: EPG-CLnA β E (di)	162,9	318,7	224,4
EPG7 : EPG-CLnA α E (mono)	168,9	290,8	217,9
EPG5 : EPG-CLnA β E (mono)	152,0	309,3	210,1

$T_{d5\%}$ est la température de dégradation initiale de 5% de perte de poids du produit et $T_{d30\%}$ la température de dégradation de 30% de perte de poids du produit. A partir de ces deux valeurs l'indice de résistance à la dégradation thermique (T_s) est déterminé. Cet indice est été utilisé pour spécifier la stabilité thermique des produits. Ces résultats indiquent que les EPG-CLnA Δ E présentent une stabilité thermique moyenne avec des valeurs comprises entre 210 °C jusqu'à 230 °C

Ces essais de dégradation des esters partiels de glycérol (EPG) sous atmosphère contrôlée montrent que les acides gras polyinsaturés des chaînes carbonées (acide linoléique, acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) des EPG ont une stabilité thermique moyenne.

Chapitre 3

L'utilisation de ces esters partiels dans des réactions des synthèses chimiques doit tenir compte de la grande sensibilité des acides gras (acide linoléique, acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) qui les composent. Ces réactions doivent se faire sous atmosphère contrôlée et à de basses températures.

2.7.2. Stabilité thermique en fonction de la teneur en monoglycérides

La stabilité thermique des esters partiels de glycérol en fonction de la teneur en monoglycéride est présentée dans la **Figure 29**.

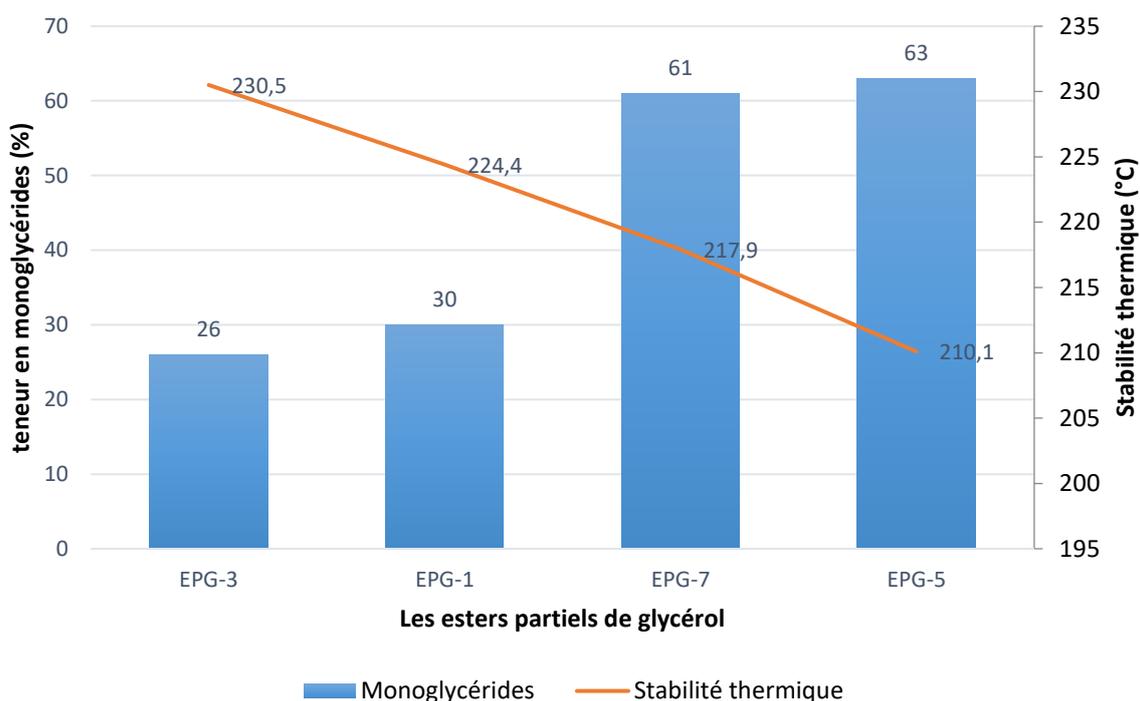


Figure 29: Etude de la stabilité thermique des esters partiels de glycérol (EPG) en fonction de leur teneur en monoglycérides polyinsaturés

Les résultats issus de la **Figure 29** ci-dessus montrent que les valeurs de la stabilité thermique des EPG diffèrent pour chaque produit. Dans l'ordre de stabilité thermique croissant, nous avons EPG5, EPG7, EPG1 et EPG3 avec des valeurs de T_s respectivement de 210,1°C, 217,9°C, 224,4 °C et 230,5 °C.

Chapitre 3

Les stabilités thermiques des esters partiel de glycérol EPG3 et EPG5 obtenus à partir du même concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée composée de 8,1% d'acide α -éléostéarique, de 42% d'acide β -éléostéarique et de 8,2% d'acide catalpique, sont respectivement de 210,1 et de 230,5°C. Celles de EPG7 et EPG1, esters partiels obtenus à partir des acides gras d'huile de *Ricinodendron heudelotii* composée de 60% d'acide α -éléostéarique et de 1,2 % d'acide β -éléostéarique, sont respectivement de 217,9 et de 224,4°C.

La corrélation entre le profil acide gras en CLnA et la stabilité thermique des EPG ne permet pas de dégager les observations claires. L'interprétation de la dégradation thermique de ces composés pourrait se justifier par le fait que nous sommes en présence d'un mélange complexe composé de 91% d'acides gras insaturés (acide oléique, acide linoléique, acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) et que les composants mineurs (acide palmitique et acide stéarique) sont dans des proportions trop faibles pour contrebalancer cette tendance.

Ces résultats montrent que la dégradation de ces esters partiels de glycérol riche en acides gras polyinsaturés de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* pourrait être dictée aussi par la teneur en monoglycérides que par la nature des acides gras de l'huile.

En effet, quelle que soit la composition en acides gras polyinsaturés de ces esters partiels, les EPG riche en monoglycéride, esters partiels constitués par des OH libres ont une stabilité thermique plus faible (EPG7 et EPG5). Ces produits sont donc plus sensibles à la chaleur.

Ces résultats montrent également que la stabilité thermique des EPG diminue lorsque la teneur en monoglycérides augmente et ainsi que lors de l'introduction de diglycérides dans les EPG.

2.7.3. Caractérisation physique des EPG-CLnA par DSC

Le comportement thermique observé à partir des courbes sur les **Figure 30** et **Figure 31** des esters partiels de glycérol est regroupé dans le **Tableau 23**.

Chapitre 3

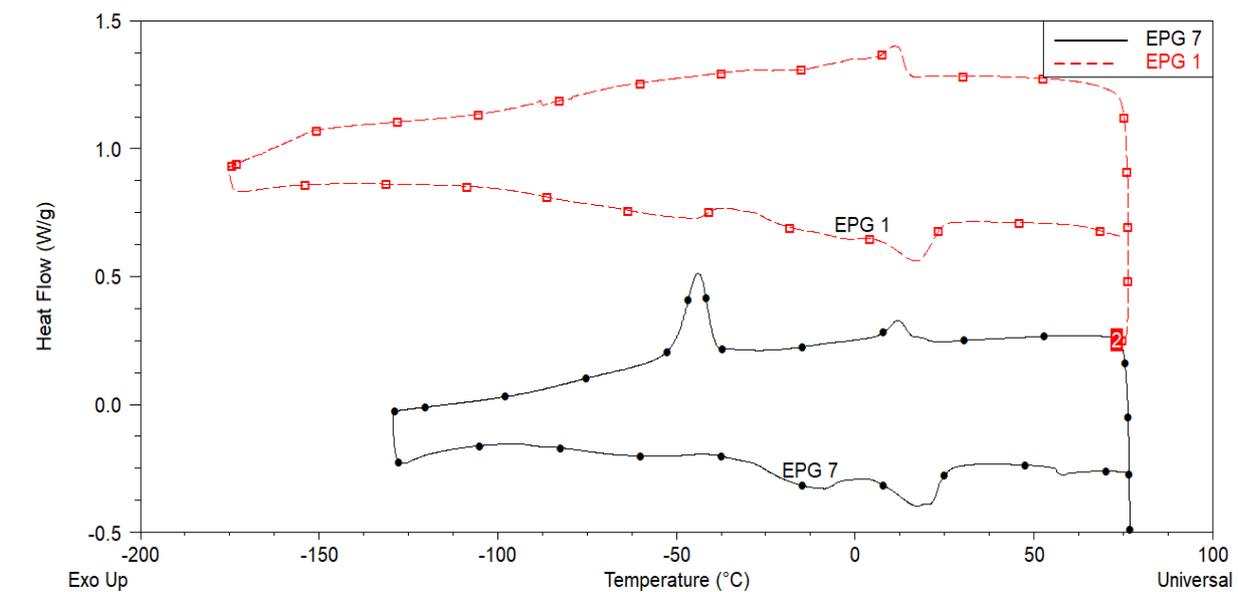


Figure 30: Thermogrammes DSC d'esters partiels de glycérol, EPG 1 (□) et EPG 7(●)

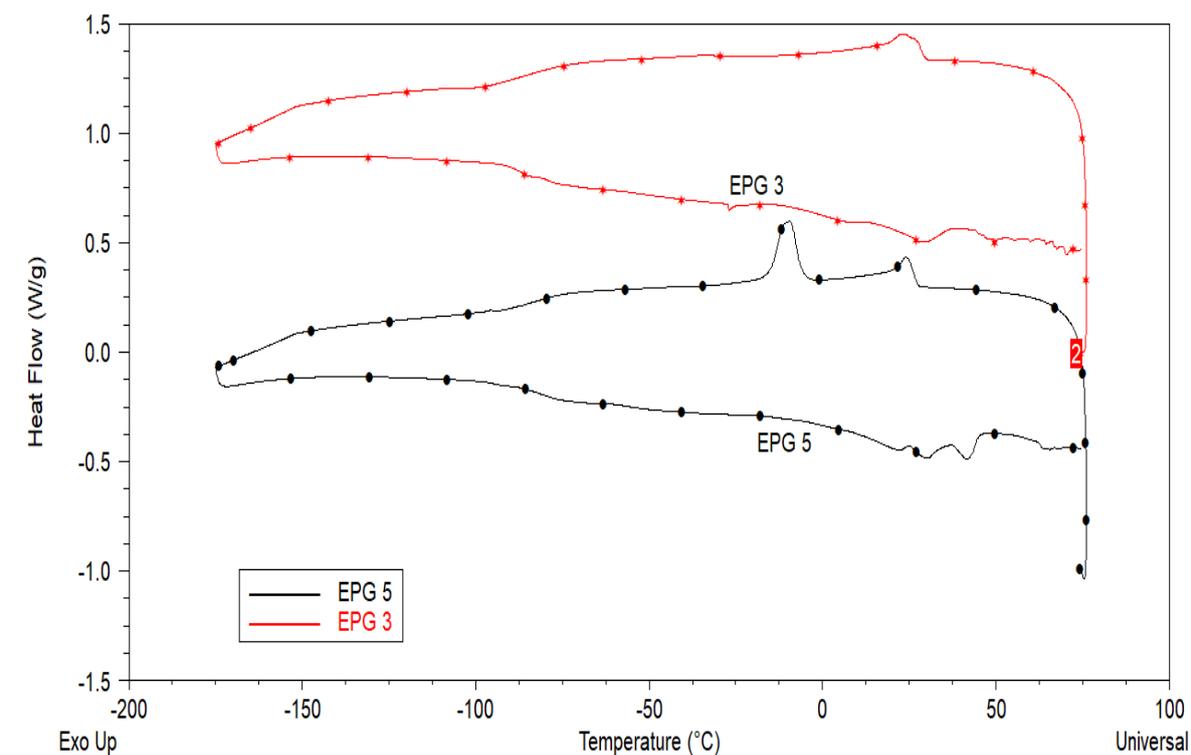


Figure 31: Thermogrammes DSC de esters partiels de glycérol EPG 3 (ж) et EPG 5(●)

Chapitre 3

Tableau 23: récapitulatif des températures de cristallisation, de fusion et des températures de transitions vitreuses

Echantillons	Cristallisation		Fusion	
	Tc (°C)	Tg1	Tf	Tg2
EPG1: EPG-CLnA α E (di)	11	-78,7	17,8	-78,2
EPG3: EPG-CLnA β E (di)	24	-85,8	27,8	-87,1
EPG5 : EPG-CLnA β E (mono)	24,2	-81,4	29,5	-80,8
	-9,5		42,1	
EPG7: EPG-CLnA α E (mono)	14,2	-76,8	-13,3	-75,4
	-44		18,7	

Ces résultats (figures 29 et 30) montrent que l'allure des courbes de cristallisation et de fusion est liée au profil glycérique (monoglycérides et diglycérides) des EPG étudiés. Les esters partiels avec de forte teneur en diglycérides, EPG1 (60%) et EPG3 (63%) ont une seule région de cristallisation et de fusion quel que soit le profil acide gras du produit.

Cependant, les EPG5 et EPG7 qui ont des teneurs en monoglycérides plus élevées respectivement de 61% et de 63% ont deux régions de cristallisation et deux régions de fusion. Les résultats montrent la présence des transitions vitreuses (Tg) pour chaque EPG à la descente de température (cristallisation) comme à la montée (fusion) figures 29 et 30.

Le thermographe de produit EPG1 présente le pic représentant la cristallisation des esters partiels à Tc= 11 °C. La courbe de fusion de ce produit montre une zone de fusion à Tf= 17,8°C

Le thermographe de EPG7 présente son premier pic de cristallisation à 14,2°C, son deuxième pic de cristallisation est à -44°C. La courbe de fusion de EPG7 présente un pic de fusion à - 13,3°C et l'autre pic de fusion est à 18,7°C.

Le thermographe de EPG3 présente son pic représentant la cristallisation à 24°C et le pic de fusion à 27,8°C.

Chapitre 3

Quant à l'échantillon EPG5 le pic représentant la première cristallisation est à 24,2°C, son second pic de cristallisation est à -9,5°C. Sa courbe de fusion présente son premier pic de fusion à 29,5°C et le deuxième pic de fusion de cette courbe est à 42,1°C.

Ces résultats montrent que les valeurs des températures de transition vitreuse (T_g) à la cristallisation et à la fusion ne varient pas. Cette valeur se situe autour de -78°C pour EPG7, de -86°C pour EPG3, de -81°C pour EPG-5 et -76°C pour EPG-7.

En général, le comportement thermique des esters partiels (cristallisation et fusion) est lié à la longueur de chaîne, aux différents degrés d'insaturation des acides gras et à la présence des fonctions OH [78–80]. Les esters partiels issus de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* étudiés sont composés de 97% d'acides gras à 18 atomes de carbone, de 85% d'acides gras polyinsaturés (deux et trois doubles liaisons) et de fonctions OH fixés sur la molécule de glycérol. Ces trois facteurs vont donc contribuer à dicter le comportement thermique des EPG (températures de cristallisation, de fusion et de transition vitreuse).

La comparaison des résultats relatifs à la température de cristallisation des échantillons EPG-1 (60 % DG) et EPG-3 (63% DG) montre que ces deux échantillons n'ont pas le même comportement thermique. Ils cristallisent à différentes températures, EPG1 (11 °C), EPG3 (24°C) et présentent des températures de fusion différentes EPG1 (17,8°C), EPG3 (27,8°C). Ces mêmes comportements thermiques s'observent avec les échantillons EPG7 (61% MG) et EPG5 (63 % MG) mais deux températures de cristallisation et de fusion différentes. Cette différence de comportement thermique est liée à la nature des acides gras polyinsaturés composant ces esters partiels.

En effet, EPG1 est composé de 60% d'acide α -éléostéarique et EPG3 de 8,1% d'acide α -éléostéarique, de 42% d'acide β -éléostéarique et de 8,2% d'acide catalpique. La configuration des trois doubles liaisons conjuguées de ces acides CLnA influe profondément sur la cristallisation et la fusion des EPG. Les températures de cristallisation et de fusion augmentent avec la teneur en acide β -éléostéarique.

Ces résultats montrent également la présence de transition vitreuse pour les 4 produits et cela, quelle que soit leur composition en acides gras polyinsaturés et leur profil glycérique. Ces transitions vitreuses se produisent à des températures très basses autour de -80°C.

Chapitre 3

Il est à noter que ces températures de transitions vitreuses n'ont pas été observées avec les acides gras qui ont été utilisés pour la synthèse de ces EPG.

En général, la présence de transition vitreuse sur les courbes de cristallisation et de fusion implique le passage d'un état vitreux à l'état caoutchouteux et vice versa. De ce fait, ces esters partiels de glycérol obtenus à partir de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* se comportent comme des matériaux semi-cristallins. Il est possible que ces esters partiels à basse température se réorganisent pour changer de structure. Ces températures de transitions vitreuses très basses pourraient s'expliquer par la présence des molécules de glycérol et par la grande mobilité des chaînes d'acides gras autour de ces molécules.

Cette étude est, à notre connaissance, l'une des premières à révéler la présence de transition de phase dans les échantillons d'esters partiels de glycérol.

Les 4 produits par profil glycérique, leur profil acides gras et leur comportement thermique sont totalement différents.

2.8. Utilisation des esters partiels des glycérol (EPG)

Les esters partiels de glycérol (mono et diglycéride) sont des molécules de lipide composées de deux parties, une partie constituée de chaîne hydrophobe provenant d'acides gras libres estérifiés sur la molécule de glycérol. Dans le cas de monoglycéride, la molécule dispose d'une tête polaire glycérol, la partie hydrophile et d'une queue hydrophobe qui constitue la partie lipophile. Quant à la molécule de diglycéride elle est constituée de deux queues hydrophobes.

Ces esters partiels sont caractérisés par la valeur de HLB « Hydrophilic - Lipophilic Balance », qui permet de classer et de déduire le type d'émulsion que ces esters partiels peuvent stabiliser. Ces molécules présentent des propriétés émulsifiantes et d'auto-assemblage. Ils peuvent s'auto-organiser dans l'eau et former des phases organisées de types cubiques, lamellaire et hexagonales [81].

Les esters partiels de glycérol sont utilisés dans l'industrie alimentation, cosmétique, pharmaceutique, plastique, fibre et textile. L'efficacité de l'ester partiel se détermine en fonction de la nature la chaîne carbonée de l'acide gras.

Chapitre 3

Les acides gras de longues chaînes rendent les esters partiels plus liposolubles, ils sont appropriés pour fabriquer les plastiques ; ils peuvent aussi être utilisés comme agents émulsifiants ou lubrifiants dans des formulations.

Au cours de nos travaux, les EPG-CLnA obtenus à partir du concentrat d'acides gras de l'huile brute et du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée des amandes de *Ricinodendron heudelotii* sont composées à 85 % d'acides gras polyinsaturés majoritaires avec 63% de CLnA (acide α -éléostéarique, β -éléostéarique et catalpique). Ces acides gras possèdent trois doubles liaisons conjuguées, la disposition de ces liaisons permettant leur utilisation comme monomères et émulsifiants dans des réactions de polymérisation.

Chapitre 3

Conclusion partielle

Des concentrats d'esters partiels d'acides linoléiques conjugués ou EPG - CLnA (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) ont été préparés dans deux systèmes. Les résultats obtenus montrent que la lipase Novozyme 435 donne des degrés d'avancement de la réaction d'estérification de 86% quelle que soit la composition du substrat en CLnA (acide α -éléostéarique, β -éléostéarique et acide catalpique).

Les estérifications réalisées dans des systèmes sans solvant organique orientent la formation des esters partiels dans le sens de la production EPG-CLnA enrichis en 1,3-diglycérides (DG). Cependant, l'utilisation du *tert*-butanol favorise l'accumulation des esters partiels plus hydrophiles, les 1-monoglycérides (MG).

Dans les conditions optimales, en utilisant la lipase Novozyme 435, le système sans solvant donne un mélange 1-monoglycérides-1,3-diglycéride : 30-60 en pourcentage massique par estérification du concentrat d'acides gras libres d'huile brute. L'estérification du concentrat d'acides gras d'huile brute modifiée dans les mêmes conditions conduit à un mélange :1-monoglycéride-1,3-diglycéride: 25,5-63, en pourcentage massique.

Quant à l'estérification du concentrat d'acides gras libres d'huile brute dans du *tert*-butanol, le produit obtenu est un mélange 1-monoglycéride-1,3-diglycéride : 61-30 en pourcentage massique. L'estérification du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée dans les mêmes conditions donne un mélange: 1-monoglycéride-1,3-diglycéride : 63-26 en pourcentage massique.

Cette étude permet de mettre en place un protocole de synthèse et d'analyse des esters partiels de glycérol riches en acides gras CLnA. Elle a conduit à la préparation de quatre types d'esters partiels de glycérol EPG 1, EPG 3, EPG 5, EPG 7. Il a été mis en évidence l'enrichissement en monoglycérides ou monoacylglycérols d'une part et en diglycérides ou diacylglycérols d'autre part. Dans chaque groupe de monoacylglycérols ou de diacylglycérols, l'enrichissement en groupe acyl α -éléostéarique ou β -éléostéarique est mis en évidence. Ces approches expérimentales permettent d'élaborer des esters partiels de glycérol et de CLnA structurés aux propriétés tensioactives avérées.

Chapitre 3

Ce sont des lipides bioactifs potentiels. De nombreux travaux récents soutiennent cette voie de synthèse enzymatique de diacylglycérols enrichis avec l'acide linoléique conjugué, un mélange d'acides linoléique, linoléique conjugué et acide pinoléique en présence de Novozyme 435 et autres lipases pour la production des glycérides enrichis en tant que huiles fonctionnelles utilisées en industrie pharmaceutique [82–84]. L'étude de la séparation des EPGs par chromatographie préparative sur plaque de silice suivie de l'analyse par CPG/DIF a permis d'appréhender les mécanismes de transfert de groupes acyls vers les sites hydroxyles du glycérol. Nous avons mis en évidence dans les réactions d'estérification la typosélectivité de la lipase de Novozyme 435 et son caractère discriminant quand les groupes acyles de CLnA portent l' α -éléostéarique. Il en découle l'enrichissement des monoacylglycérols ou diacylglycérols en groupe acyle de α -éléostéarique.

Par contre, lorsque la teneur du groupe acyle de CLnA est dominée par l'acide β -éléostéarique, la lipase Novozyme 435 n'est plus typosélective et non plus discriminant entre les groupes acyles de CLA C18:2 et de CLnA- β -éléostéarique. La typosélectivité est provoquée par la configuration du groupe acyl de l'acide β -éléostéarique. Son enrichissement en découle.

La caractérisation de ces esters partiels de glycérol montre que ces EPGs ont des valeurs de tension de surface comprises entre 29 à 35 mN/m avec des HLB comprises entre 2 et 4. Ces esters partiels sont de bons tensioactifs avec des comportements thermiques inédits du fait de la présence de température de transition vitreuse obtenue à -80°C . Ces EPGs qui sont des tensioactifs réactifs peuvent être utilisés dans des réactions de polymérisation comme émulsifiants et monomères (constituants du squelette du polymère).

CHAPITRE 4 :

**POLYMERISATION EN MASSE DES CLNA ET DES
EPG-CLNA (α OU β) E A CHAINES CARBONEES
COMPOSES D'ACIDE α -ELEOSTEARIQUE, D'ACIDE
 β -ELEOSTEARIQUE ET D'ACIDE CATALPIQUE
ISSUS DE L'HUILE DE *RICINODENDRON*
*HEUDELOTII.***

Chapitre 4

Introduction

Les polymères synthétisés à partir des huiles végétales, substances naturelles, renouvelables et bio disponibles ont beaucoup attiré l'attention des chercheurs et des industriels au cours de ces dernières années. Ces polymères sont avantageux en raison de leur biodégradabilité. Ces polymères sont peu toxiques et polluent peu, ce qui explique l'intérêt que l'on leur porte.

Certaines huiles sont utilisées comme substrats de base pour la synthèse de ces polymères : l'huile de lin, l'huile de tung, l'huile de soja, l'huile de ricin, et l'huile de tournesol [85–89]. Ces huiles sont composées d'acides gras polyinsaturés (acide oléique, acide linoléique, acide linolénique, acide α -éléostéarique), ou possèdent des groupements hydroxyles (acide ricinoléique) ou groupements époxydés (huiles de soja ou de lin époxydées). Ces différentes fonctions chimiques sont des sites favorables à des réactions de polymérisation.

Nos travaux en cours ont montré qu'à partir des amandes de *Ricinodendron heudelotii* deux types d'huiles de compositions chimiques différentes en CLnA ont été obtenus [19]. L'huile brute issue des amandes des graines de *Ricinodendron heudelotii* est composée d'acide α -éléostéarique C18:3n-5 (9c, 11t, 13t) à 60% et d'acide linoléique C18:2n-6 (9c, 12c) à 22%. Lorsque les triglycérides de cette huile sont irradiés par des rayons UV de longueur d'onde comprise entre $\lambda=300-800$ nm, avec une puissance de 250-765 w/m², pendant 12 heures, l'huile s'enrichit en acides β -éléostéarique C18:3 n-5 (9t, 11t, 13t) à 42% et catalpique C18:3 n-5 (9t, 11t, 13c) à 8%.

La présence de ces acides gras à trois doubles liaisons conjuguées dans l'huile brute et dans l'huile brute modifiée justifie la siccativité de ces huiles avec des valeurs élevées d'indice d'iode respectivement de $195,2 \pm 1,7$ et $192,8 \pm 2,1$. La propriété siccative de certaines huiles (huile de tung) a permis leur utilisation comme matière première de choix dans la préparation de polymères [18,86,90].

Cependant, à partir des données de la littérature, la polymérisation de l'acide α -éléostéarique de l'huile de tung est thermique. Elle est effectuée à des températures relativement élevées entre 150 à 300°C suivant les protocoles opératoires.

Chapitre 4

La plupart des études soulignent l'utilisation de l'huile de tung en faible quantité (0,1 à 2,0%) avec des co-monomères tels que le styrène, le divinyl-benzène, l'anhydride phtalique et maléique pour la synthèse des résines alkydes [91–93].

A notre connaissance la littérature ne révèle pas la production de polymères avec des esters partiels de glycérol ayant pour composés majeurs les CLnA (l'acide α -l'éléostéarique et l'acide β -éléostéarique) comme unique monomère à de basses températures (70°C).

Dans ce travail, les polymères seront synthétisés à partir d'échantillons de concentrats d'acides gras libres et d'esters partiels de glycérol issus des huiles (huile brute et huile brute modifiée) de *Ricinodendron heudelotii*. Ces échantillons sont majoritairement composés d'acide α -éléostéarique et d'acide β -éléostéarique.

Les objectifs visés dans cette étude sont de déterminer les conditions et le mécanisme de polymérisation des concentrats acides gras libres CLnA et des esters partiels de glycérol (EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β)) de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* sans ajout de co-monomères et sans amorceur chimique dans des conditions de température douce.

Un suivi cinétique des réactions de polymérisation a été réalisé par analyse spectroscopique (ATR-IRTF) pour déterminer les constantes de vitesse des réactions et la nature des acides gras dans la polymérisation. Le rôle joué par les CLnA et les autres acides gras (acide palmitique, acide stéarique, acide oléique, acide linoléique) dans le milieu a été étudié. Enfin, l'influence de la teneur en acides gras polyinsaturés conjugués (CLnA) et de la composition en monoglycérides et en diglycérides sur la vitesse de polymérisation a été aussi étudiée.

Chapitre 4

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériels

Huit échantillons ont été utilisés comme substrats dans les réactions de polymérisation. Ces échantillons sont composés de 2 substrats d'huile (huile brute et huile brute modifiée au sun Test), de 2 substrats de concentrats d'acides gras libres obtenues par hydrolyse enzymatique des deux huiles et de 4 substrats formés d'esters partiels de glycérol avec des profils acides gras et glycéridique différents. Ces substrats proviennent des amandes de *Riciodendron heudelotii*.

1.1.1. L'huile brute

Le substrat huile brute a été obtenu par pressage des amandes de *Riciodendron heudelotii* libérées des graines sans traitement préalable. Le profil des acides gras (analyse CPG) de cette huile est consigné dans le **Tableau 24**.

Tableau 24: Profil acides gras de l'huile brute des amandes de *Riciodendron heudelotii* déterminé par CPG

Acides gras	Temps de rétention (min)	(%)
Acide palmitique C16:0	5,836±0,001	3,8±0,0
Acide Stéarique C18:0	7,785±0,004	5,1±0,1
Acide Oléique C18:1n9c	8,445±0,002	7,1±0,1
Acide Linoléique C18:2	9,635±0,000	22,8±0,0
Acide α -éléostéarique C18:3c, t, t	20,271±0,605	60,1±0,2
Acide catalpique C18:3t, t, c	21,107±0,001	0±0,1
Acide β -éléostéarique C18:3t, t, t	22,405±0,002	1,1±0,0
CLnA/AGPI		72,86

L'huile brute a pour constituant majeur l'acide α -éléostéarique C18:3 c,t,t à 60% suivi de l'acide linoléique 22,8 ± 0,0%.

Chapitre 4

1.1.2. L'huile brute modifiée

L'huile brute modifiée a été obtenue par exposition de l'huile brute au Sun Test pendant 12 heures dans les conditions suivantes : la température de la chambre d'exposition est régulée de 30°C à 55°C, l'intensité de l'irradiation est contrôlée et se situe entre 300 et 800 nm avec une puissance oscillant entre 250 et 765 W/m² le système de filtrage (filtre C) utilisé simule l'exposition de l'échantillon derrière une vitre transparente aux rayonnements de 3 millimètres d'épaisseur. Le profil acide gras de l'huile brute modifiée est résumé dans le **Tableau 25**.

Tableau 25: Profil acide gras de l'huile brute modifiée déterminée par CPG

Acides gras	Temps de rétention (min)	(%)
Acide palmitique C16:0	5,836±0,001	4,5±0,1
Acide Stéarique C18:0	7,785±0,004	5±0,0
Acide Oléique C18:1n9c	8,445±0,002	8,1±0,1
Acide Linoléique C18:2	9,635±0,000	24,4±0,1
Acide α -éléostéarique C18:3c, t, t	20,271±0,605	8,1±0,2
Acide catalpique C18:3t, t, c	21,107±0,001	8,2±0,0
Acide β -éléostéarique C18:3t, t, t	22,405±0,002	41,7±0,0
CLnA/AGPI		70,39

L'huile brute modifiée a pour constituant majeur l'acide β -éléostéarique C18:3t, t, t à 41,7 %. L'acide α -éléostéarique C18:3c, t, t et acide catalpique isomères de l'acide β -éléostéarique sont présents dans cette huile respectivement à 8,1% et à 8,2%.

Chapitre 4

1.1.3. Concentrats d'acides gras libre de l'huile brute (CLnA- α E)

Le concentrat d'acides gras libres de l'huile brute a été obtenu par hydrolyse enzymatique avec la lipase de *candida rugosa* (LCC) de l'huile brute. Ce substrat a la même composition chimique que l'huile brute avec l'acide α -éléostéarique (60%), comme acide gras majeur.

1.1.4. Concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée (CLnA- β E)

Le concentrat d'acides gras libres de l'huile brute modifiée a été obtenu par hydrolyse enzymatique de l'huile brute avec la lipase de *candida rugosa* (LCC). Ce substrat a la même composition chimique que l'huile brute modifiée avec l'acide α -éléostéarique (8,1%), l'acide β -éléostéarique (41,7%) et acide catalpique (8,2%).

La structure des acides gras des différents concentrats d'acides gras libres sont les suivants **Figure 32**:

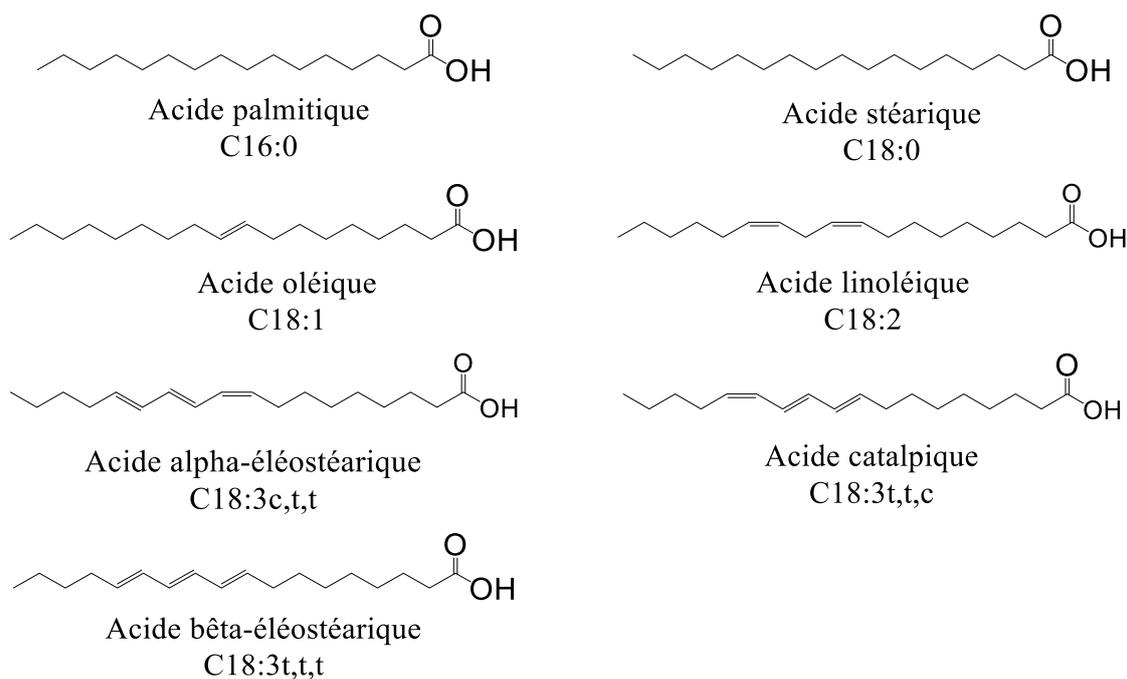


Figure 32: Structures des acides gras des concentrats d'acides gras libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée des amandes de *Ricinodendron heudelotii*.

Chapitre 4

1.1.5. Esters partiels du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute

Les EPG-CLnA α E sont des produits de synthèse obtenus par estérification enzymatique avec le concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et du glycérol catalysée par la lipase Novozyme 435. La réaction d'estérification réalisée sans solvant organique oriente la synthèse vers la production de diglycérides (EPG1). L'utilisation de *tert*-butanol dans le milieu favorise la synthèse de monoglycérides (EPG7). Les **Tableau 26** et **Tableau 27** regroupent le profil acides gras et profil glycériques des esters partiels de glycérol (analyse HPSEC-ELSD).

Tableau 26: Profil glycérique des EPG obtenus à partir du concentrat d'acide gras de l'huile brute déterminé par HPLC-ELSD

Profil glycérique	EPG-CLnA α E (di) (EPG1) (%)	EPG-CLnA α E (mono) (EPG7) (%)
Acides gras libre	10	9
Monoglycérides	30	61
Diglycérides	60	30
Triglycérides	0	0

EPG-CLnA α E (di) EPG1 est un mélange de mono- et diglycéride : 30-60 en pourcentage massique.

EPG-CLnA α E (mono) EPG7 est un mélange de monoglycérides et diglycéride : 61-30 en pourcentage massique.

Chapitre 4

Tableau 27: Profil acides gras des fractions monoglycérides et diglycérides des EPG-CLnA obtenus à partir du concentrat d'acides gras de l'huile brute

Acides gras	EPG1: EPG-CLnA α E (diglycérides)		EPG7: EPG-CLnA α E (monoglycérides)	
	Fraction monoglycérides (%)	Fraction Diglycérides (%)	Fraction monoglycérides (%)	Fraction Di glycérides (%)
Acide palmitique	7,1 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	8,6 \pm 0,1	1,2 \pm 0,0
Acide stéarique	15,0 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	17,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1
Acide oléique C18:1	5,6 \pm 0,0	7,2 \pm 0,0	5,9 \pm 0,2	6,1 \pm 0,1
Acide linoléique C18:2	23,1 \pm 0,1	23,9 \pm 0,1	22,1 \pm 0,0	22,9 \pm 0,2
Acide α -éléostéarique C18:3	46,9 \pm 0,1	62,8 \pm 0,2	44,3 \pm 0,1	67,1 \pm ,01
Acide catalpique C18:3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Acide β -éléostéarique C18:3	2,1 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	1,1 \pm 0,0
CLnA	49	63,9	46,1	68,2

Les fractions monoglycérides et diglycérides de EPG 1 sont majoritairement composées de CLnA respectivement à 49 % et à 63,9%, ainsi que d'acide linoléique à 23,1%. Les fractions mono et diglycérides de EPG 7 sont majoritairement composés de CLnA respectivement à 46,1% et 68,2% et de d'acide linoléique à 22,9 %.

Chapitre 4

1.1.6. Esters partiels du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée

Les EPG-CLnA β E sont des produits obtenus par estérification enzymatique avec le concentrat d'acides gras libre de l'huile brute modifiée et du glycérol, catalysée par la lipase Novozyme 435. La réaction d'estérification réalisée sans solvant organique donne le produit EPG 3. L'utilisation de *tert*-butanol dans le milieu conduit au produit EPG5. Les **Tableau 28** et **Tableau 29** regroupent le profil acides gras et profil glycérique des esters partiels de glycérol

Tableau 28: Profil glycérique de EPG obtenus à partir du concentrat d'acide gras de l'huile brute modifiée

Profil glycérique	EPG-CLnA β E (di) EPG3	EPG-CLnA β E (mono) EPG5
Acides gras libres %	11,5	11
Monoglycérides %	25,5	63
Diglycérides %	63	26
Triglycérides %	0	0

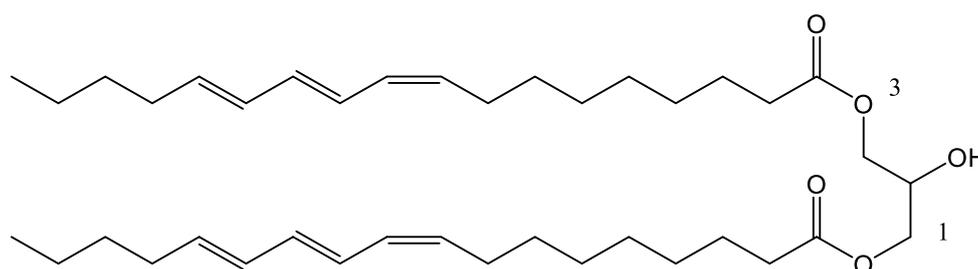
Les fractions monoglycérides et diglycérides de EPG 3 sont majoritairement composés de CLnA respectivement à 50,3 % et à 50,9%, ainsi que d'acide linoléique à 22,9% et à 35,7%. Les fractions monoglycérides et diglycérides de EPG 5 sont majoritairement composés de CLnA respectivement à 59,9% et 55,4% et de d'acide linoléique à 19,3 % et à 31,7%

Chapitre 4

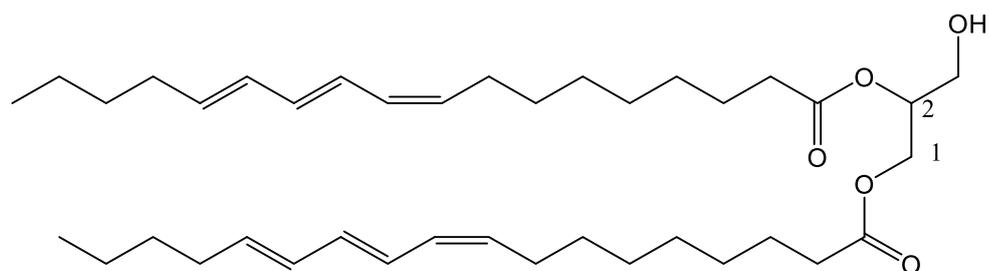
Tableau 29: Profil acides gras des EPG obtenu à partir du concentrat d'acides gras de l'huile brute modifiée.

Profil acides gras (%)	EPG-CLnA β E (di) (EPG3)		EPG-CLnA β E (mono) EPG5	
	Fraction monoglycérides	Fraction diglycérides	Fraction monoglycérides	Fraction diglycérides
Acide palmitique	9,3 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1	1,5 \pm 0,1
Acide stéarique	12,3 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1	7,8 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0
Acide oléique C18:1	6,8 \pm 0,1	11,1 \pm 0,0	6,7 \pm 0,2	10,4 \pm 0,1
Acide linoléique C18:2	22,9 \pm 0,1	35,7 \pm 0,2	19,3 \pm 0,1	31,7 \pm 0,2
Acide α -éléostéarique C18:3	6,9 \pm 0,2	8,9 \pm 0,1	6,2 \pm 0,1	9,7 \pm 0,1
Acide catalpique C18:3	5,0 \pm 0,0	8,6 \pm 0,2	6,9 \pm 0,0	9,4 \pm 0,0
Acide β -éléostéarique C18:3	38,4 \pm 0,1	33,4 \pm 0,1	46,8 \pm 0,1	36,3 \pm 0,1
CLnA	50,3	50,9	59,9	55,4

Les structures des esters partiels CLnA (α -éléostéarique : α E, β -éléostéarique : β E, acide catalpique : Ac) avec des sites polymérisables sont regroupées dans les **Figure 33**, **Figure 34**, et **Figure 35**.

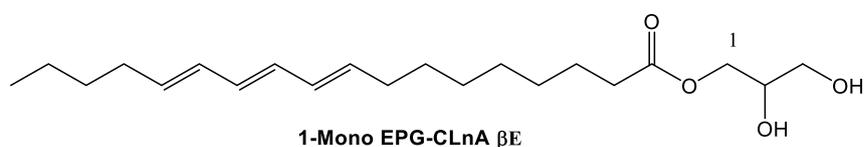


1,3-Di EPG-CLnA α E

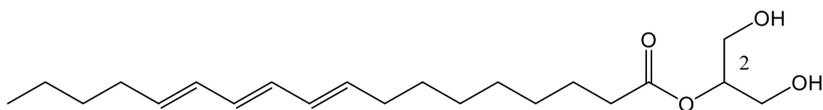


1,2-Di EPG-CLnA α E

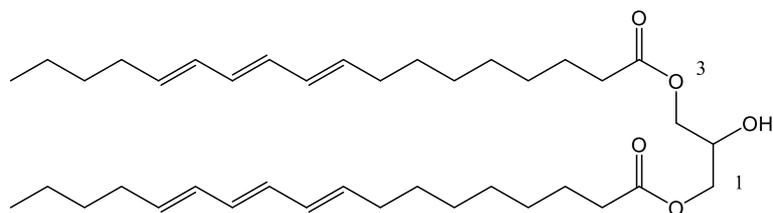
Figure 33 : 1-monoglycérade d'acide α -élostéarique, 2-monoglycérade d'acide α -élostéarique, 1,3-diglycérade d'acide α -élostéarique et 1,2-diglycérade d'acide α -élostéarique



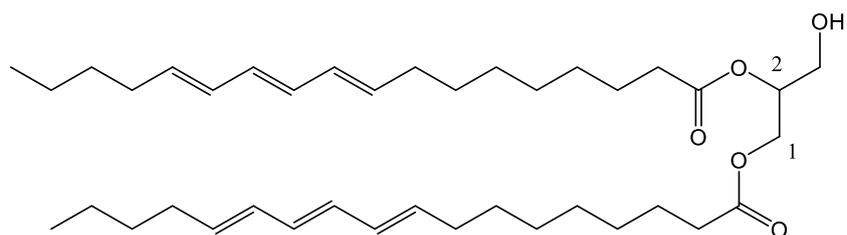
1-Mono EPG-CLnA β E



2-Mono EPG-CLnA β E



1,3-Di EPG-CLnA β E



1,2-Di EPG-CLnA β E

Figure 34 : 1-monoglycérade CLnA- β E, 2-monoglycérade CLnA- β E , 1,3-diglycérades CLnA- β E et 1,2-diglycérade CLnA- β E

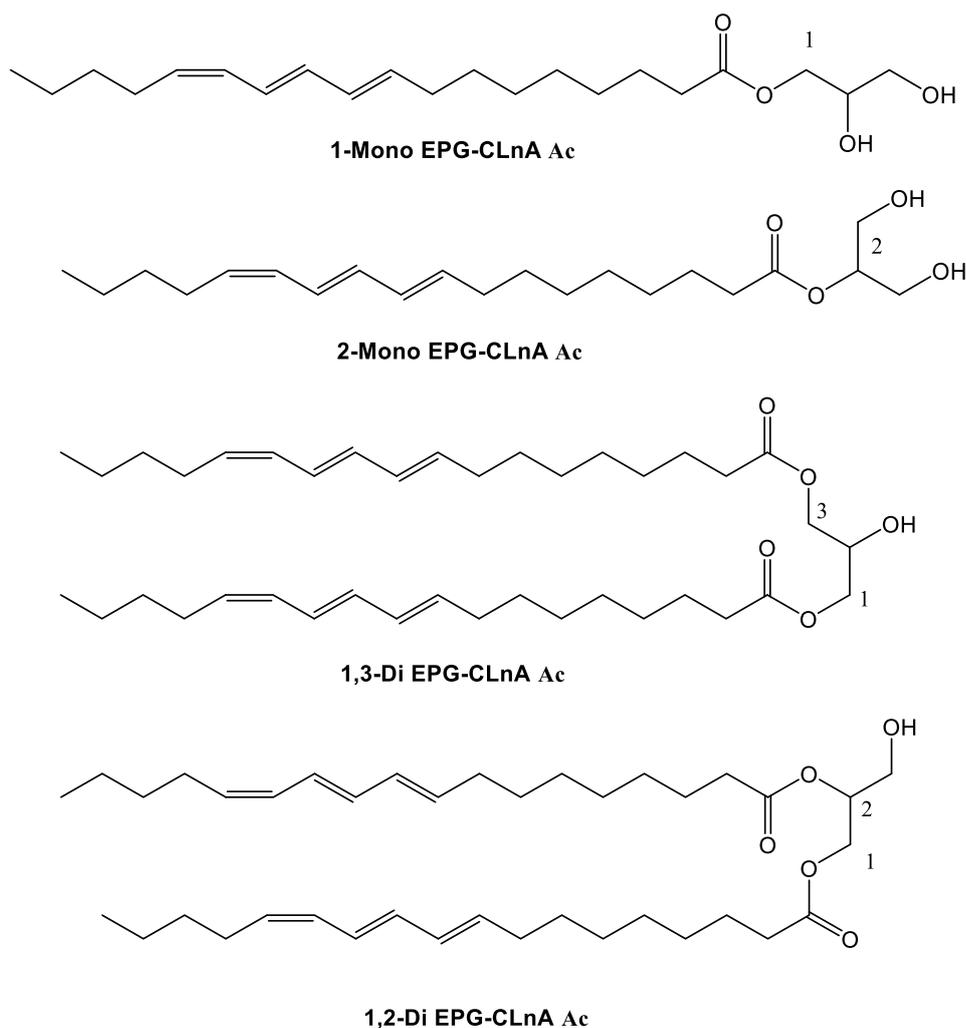


Figure 35: 1-monoglycéride d'acide catalpique, 2-monoglycéride d'acide catalpique, 1,3-diglycéride d'acide catalpique et 1,2-diglycéride d'acide catalpique.

1.2. Méthodes de polymérisation

Deux modes de mise en œuvre sont utilisés pour la synthèse des polymères :

- La polymérisation *in situ* sur le plateau d'un rhéomètre (Anton Paar MCR 302). Ce mode de mise en œuvre est réalisée pour confirmer ou infirmer la polymérisation à travers le suivi cinétique de l'évolution de la viscosité des milieux réactionnels au cours de la réaction.

- La polymérisation en masse en réacteur batch agité.

Pour chaque mode de mise en œuvre, deux types de polymérisation ont été réalisés, une polymérisation sous atmosphère inerte et une polymérisation sous oxygène à l'air.

Chapitre 4

1.2.1. Méthodes de polymérisation sous atmosphère inerte.

1.2.1.1. Protocole de polymérisation sur le plateau du rhéomètre sous atmosphère inerte

Dans ce mode de mise en œuvre, les réactions de polymérisation sont directement réalisées sur le plateau du rhéomètre (Anton Paar MCR 302).

1,4 gramme de substrat est placé sur le plateau du rhéomètre chauffé à 70°C. Pour éviter tout contact entre le substrat et l'air, le cône du rhéomètre est maintenu en continu sur le plateau pendant la réaction de polymérisation.

Les paramètres du rhéomètre sont les suivants : fréquence à 1 hertz, amplitude (1%), le temps de l'expérience (9 heures). La quantité de substrat est fixée 1,4g pour éviter un débordement sur la partie du plateau exposée à l'air.

1.2.1.2. Protocole en réacteur batch agité sous atmosphère inerte

Le réacteur utilisé pour les réactions batch est une enceinte de 100 mL équipée d'un agitateur mécanique chauffée par un bain d'huile. Le couvercle du réacteur est percé de trois trous qui servent de voie d'alimentation des substrats, de l'azote, de l'air et de contrôle de la température du milieu réactionnel.

Dans ce réacteur, on place 15 g de substrat (CLnA-libres ou EPG-CLnA) sous agitation mécanique. Ce milieu réactionnel est dégazé sous vide. A la fin de cette opération, un courant d'azote de débit 1,2 L/min est maintenu dans le réacteur jusqu'à la fin des expériences. Le milieu réactionnel est chauffé avec un bain d'huile, la température s'élève jusqu'à 70°C et l'agitation est maintenue à la même vitesse de 500 rpm pendant 9 heures.

Des prélèvements sont effectués en continu chaque heure pour analyse ATR-IR et analyse chromatographique en phase gazeuse. Le temps de la réaction de polymérisation est fixé à 9 heures pour éviter toute réticulation conduisant à la formation de produits figés, impossible à dissoudre.

Chapitre 4

1.2.2. Méthodes de polymérisation sous air.

1.2.2.1. Protocole *in situ* sur le plateau du rhéomètre sous air

Sur le plateau du rhéomètre (Anton Paar MCR 302) 1,4 gramme de substrat est placé et chauffé à 70°C. Le substrat est exposé à l'air en relevant le cône et les mesures de la viscosité complexe du milieu sont réalisées *in situ* par cycle 10 minutes. Les paramètres du rhéomètre utilisés sont fixés: fréquence (1 hertz), amplitude (1%), la durée de la réaction (9 heures).

1.2.2.2. Méthodes de polymérisation en masse en réacteur batch agité

Dans un réacteur de 100 mL, on place 15 g de substrat (CLnA-libres ou EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β)) sous agitation mécanique. Le substrat une fois placé dans le réacteur, un courant d'air (O₂/N) (80/20) de débit 1,2 L/min est maintenu dans le réacteur jusqu'à la fin des expériences.

Le milieu réactionnel est chauffé avec un bain d'huile, la température s'élève jusqu'à 70°C et l'agitation est maintenue à la même vitesse de 500 rpm pendant 9 heures. Des prélèvements sont effectués en continu chaque heure pour analyse ATR-IR et analyse CPG.

1.3. Caractérisation des polymères

1.3.1. La viscosité des polymères

Toutes les mesures de viscosité ont été réalisées sur un rhéomètre MCR-302 Anton Paar en utilisant une géométrie cône-plateau en acier inoxydable. Le plateau est de diamètre 50 mm avec un angle du cône de 1,998°.

La viscosité des milieux réactionnels des polymérisations réalisées sur le rhéomètre a été mesurée *in situ* pendant la réaction.

La viscosité des milieux réactionnels de polymérisation en batch de chaque échantillon avant et après réaction a été mesurée en déposant directement 1,4 g de produit sur le plateau à 25 °C contrôlé par un bain thermostaté. La fréquence de la contrainte est fixée à 1 hertz et l'amplitude 1%.

Chapitre 4

1.3.2. Caractérisation des polymères par spectroscopie ATR-IRTF

1.3.2.1. Acquisition des spectres infrarouges par ATR-IRTF

Les spectres infrarouges des échantillons sont obtenus à partir d'un spectromètre à transformée de Fourier IR-TF (Spectrum 65, Perkin Elmer) associé à un appareil ATR équipé d'un cristal de diamant ATR avec des caractéristiques suivantes (type IIa Diamant 45°, dimension 2mm X 2mm, profondeur de pénétration de 2,0 μ m). La technique d'analyse utilisée est la réflectance totale atténuée (ATR).

Les spectres ont été recueillis en triple à partir de portions différentes dans chaque échantillon. Toutes les mesures ont été réalisées à température ambiante (22°C). Tous les spectres ATR-IRTF ont été recueillis avec une résolution de 4 cm⁻¹ dans la gamme de 4000 à 600 cm⁻¹ avec 16 scans.

1.3.2.2. Suivi cinétique de la polymérisation par analyse ATR-IRTF.

L'hypothèse de travail dans cette partie est basée sur le fait que les concentrats de CLnA-libres et les esters partiels de glycérol (EPG-CLnA ΔE ($\Delta=\alpha$ ou β)) composés de CLnA utilisent les trois doubles liaisons conjuguées dans la réaction de polymérisation.

La méthode ATR-IRTF a montré un pic intense à la bande d'absorption 987cm⁻¹ qui est l'empreinte des trois doubles liaisons conjuguées des CLnA dans les échantillons issus des huiles des amandes de *Riciodendron heudelotii* (chapitre 2, isomérisation). Le suivi cinétique de l'évolution de cette bande par la méthode de la dérivée seconde est donc possible au cours de la réaction de polymérisation des substrats composés de CLnA.

1.3.2.3. Les empreintes des CLnA dans les CLnA-libres et EPG-CLnA ΔE ($\Delta=\alpha$ ou β)

A titre d'exemple, l'analyse ATR-IRTF de CLnA-libres riches en acide β -éléostéarique (C18:3 9t, 11t, 13t) à 42% et de EPG-CLnA βE (EPG5) riches en acide β -éléostéarique (C18:3 9t,11t,13t) à 42% ont donné les spectres suivants (Figure 36 et Figure 37).

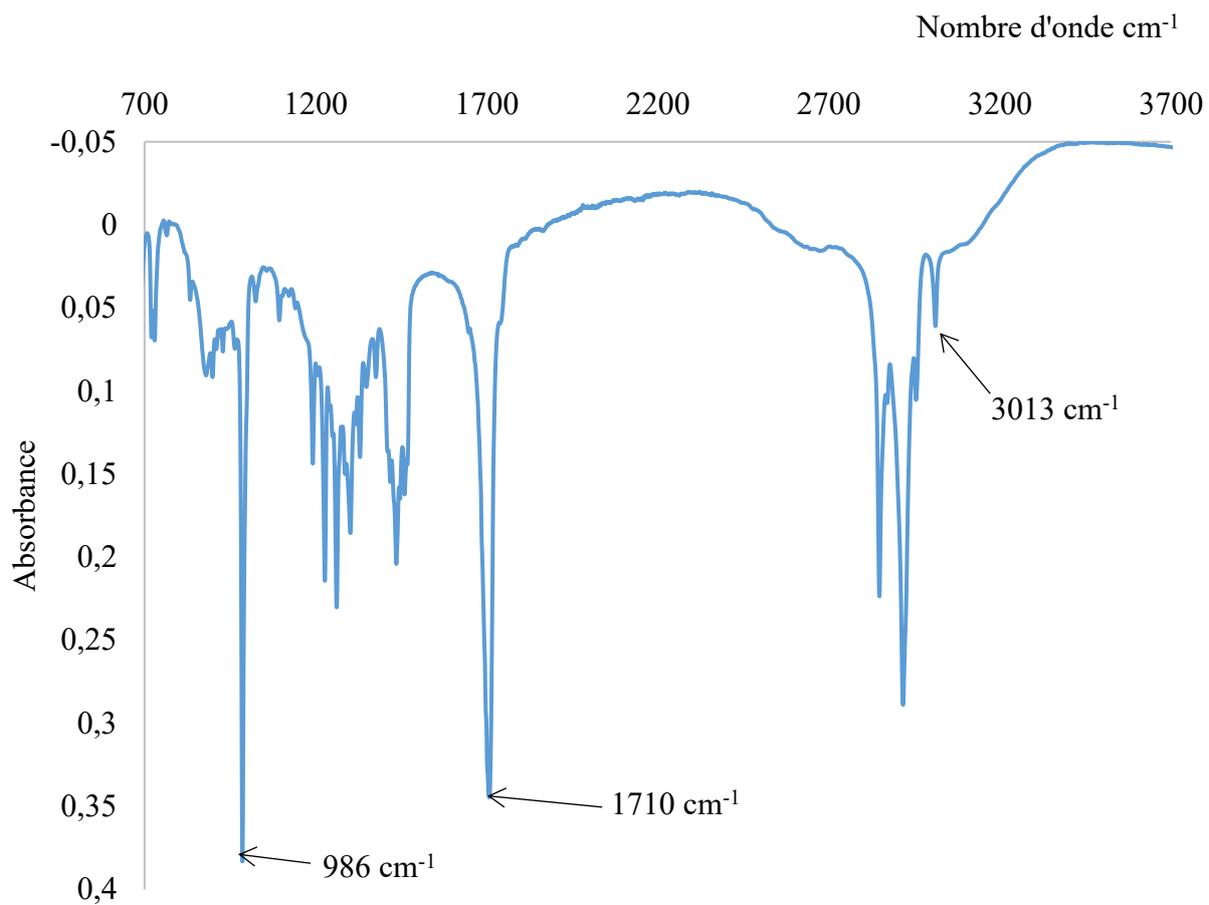


Figure 36: Spectre ATR-IRTF du concentrat ClnA- libres à 42% d'acide β -oléostéarique

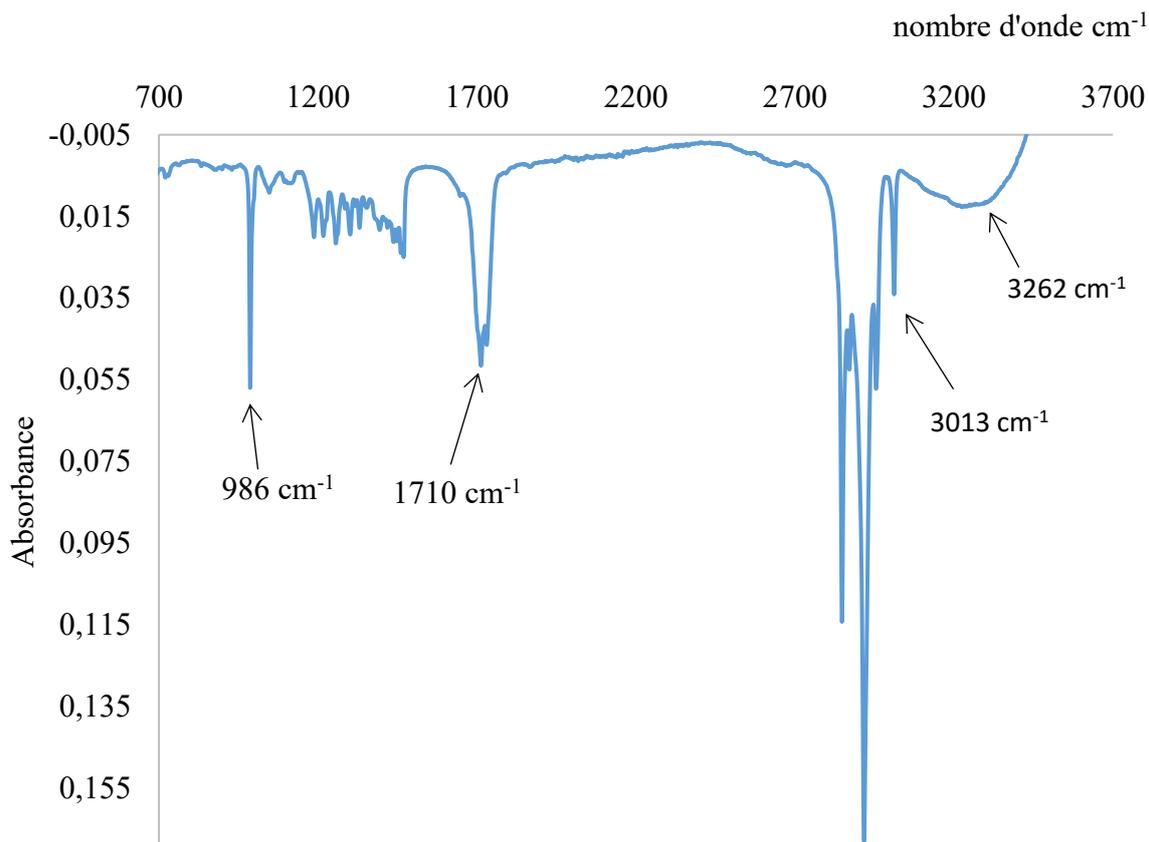


Figure 37: Spectre ATR-IRTF de EPG-CL_nA βE (EPG5)

Les deux spectres (**Figures 36 et 37**) peuvent être divisés en six zones de bandes d'absorption caractéristiques :

- La zone (3700-3100 cm^{-1}) correspond aux élongations des O-H ;
- La zone (3100-2700 cm^{-1}) correspond aux élongations des C-H pour les chaînes saturées et insaturées ;
- La zone (1740-1720 cm^{-1}) correspond aux fréquences de C=O de la fonction carboxyester de forte intensité ;
- La zone (1720-1600 cm^{-1}) correspond aux élongations C=O de la fonction acide carboxylique avec de forte intensité ;
- La zone (1500-1200 cm^{-1}) est caractéristique des élongations C-O et des déformations C-H ;
- Enfin, la zone (1000-500 cm^{-1}) est caractéristique des élongations HC=CH et des déformations (CH)_n, avec n supérieure à 4.

Chapitre 4

Selon notre hypothèse de travail, quatre zones feront l'objet d'une attention particulière dans le cadre de notre étude. La zone (3100-2750 cm^{-1}), qui présente la bande d'absorption à environ 3013 cm^{-1} . Elle est caractéristique des doubles liaisons, avec une intensité moyenne. Ensuite, la zone (1000-700 cm^{-1}), cette zone représente l'empreinte des trois doubles liaisons éthyléniques conjuguées.

Elle est caractérisée par la présence d'une bande d'absorption autour de $\mu (C = C)$ 986 cm^{-1} , avec une intensité forte, indiquant la présence des trois doubles liaisons conjuguées des CLnA-libres ou des CLnA bloqués dans les EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β).

C'est à partir de l'empreinte des CLnA (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) à $\mu (C = C)$ 986 cm^{-1} , que le suivi cinétique de la polymérisation par la méthode de détermination de la hauteur de la dérivée seconde ATR-IRTF a été réalisé.

Les bandes situées dans les zones (1740-1720 cm^{-1}) et (1710-1600 cm^{-1}) seront étudiées pour suivre le comportement et l'évolution des groupements des fonctions carboxyester et carboxylique au cours des réactions de polymérisation.

1.3.2.4. Méthodes de la hauteur de dérivée seconde de CLnA-libres ou de EPG-CLnA βE (EPG5)

Les analyses sont réalisées directement sur les échantillons bruts. Elles sont simples, faciles et rapides à réaliser [94]. Les avantages de cette méthode ATR-IRTF ont conduit à sa normalisation et à sa validation sur l'acide élaïdique en 2009 (AOCS Cd 14e-09) [95].

Nous nous inspirons des travaux de ces auteurs (Firestone David.) pour mener à bien nos expériences.

Après acquisition des spectres (partie 3.3), ceux-ci sont corrigés (correction ATR) ensuite intégrés par la dérivée seconde négative à 5 points pour obtenir les spectres des **Figure 38** et **Figure 39**

Chapitre 4

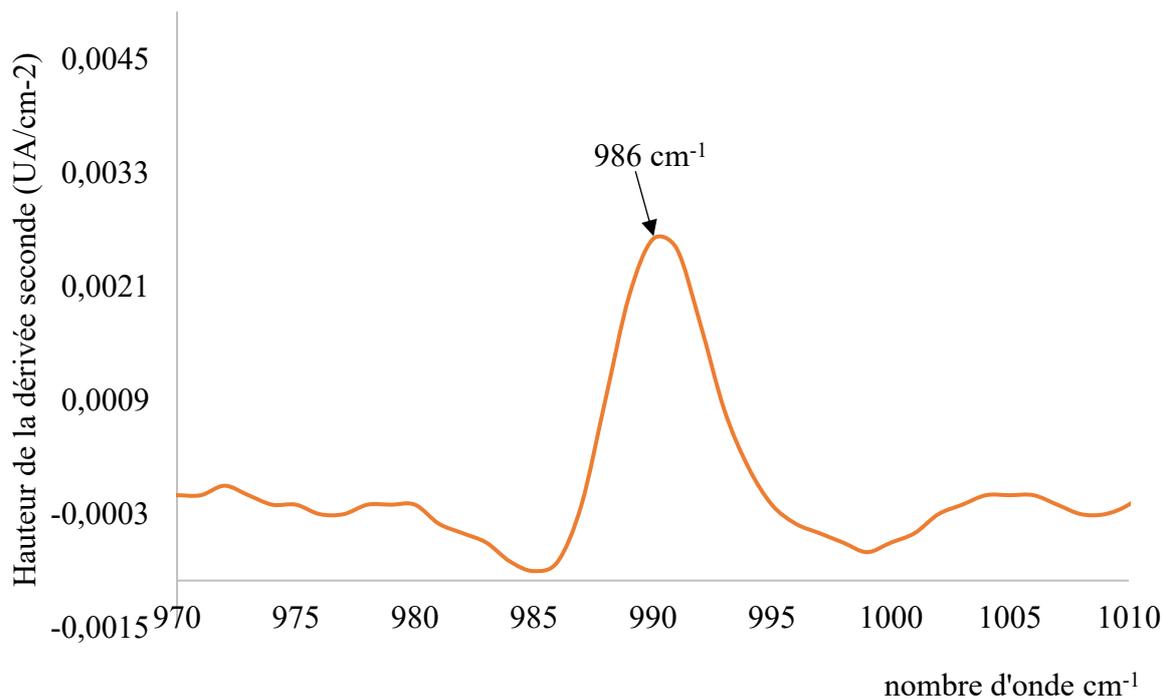


Figure 38: Spectre ATR-IRTF, la dérivée seconde négative de EPG-CLnA βE (EPG5)

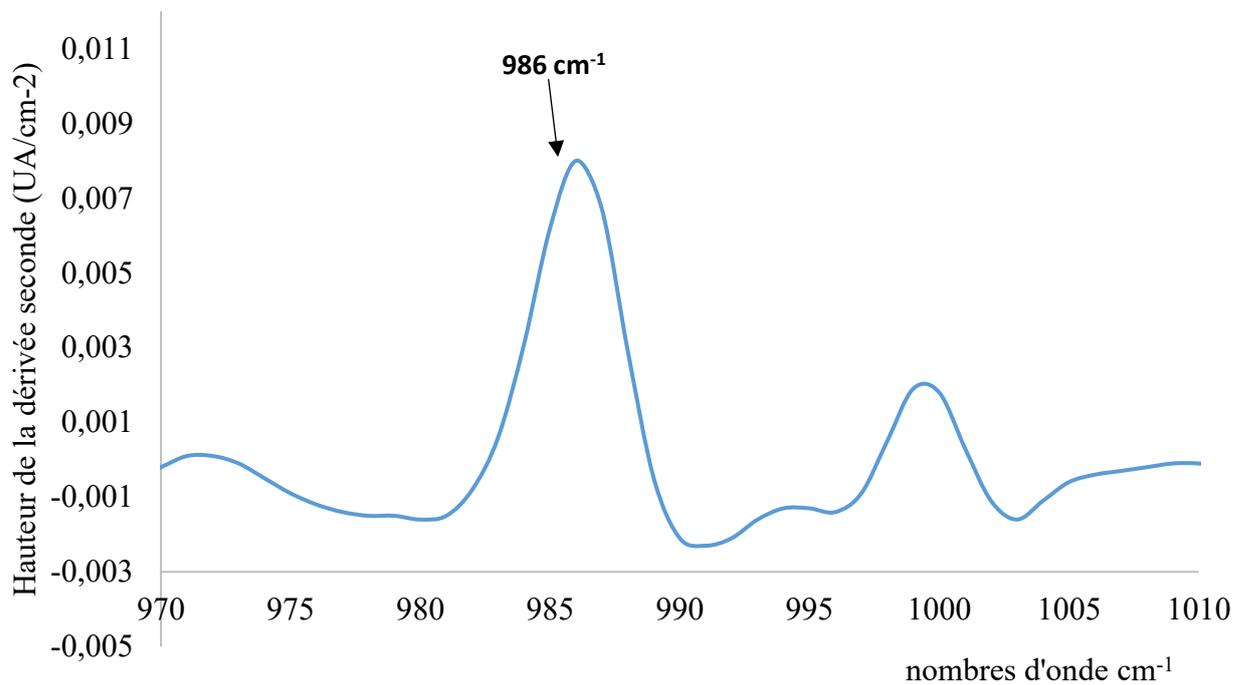


Figure 39: Spectre ATR-IRT, la dérivée seconde négative de CLnA-libres βE (42%)

Chapitre 4

L'étude cinétique de la réaction de polymérisation à différents concentrats de CLnA-libres et des EPG-CLnA ΔE ($\Delta=\alpha$ ou β) se fait à travers le suivi de l'évolution de cette bande (986 cm^{-1}) au cours de la réaction de polymérisation.

Les spectres ATR-IRTF obtenus par la méthode de la dérivée seconde négative après analyse de CLnA-libres et des EPG-CLnA βE (42%) présentent des pics de fortes intensités à 986 cm^{-1} . La hauteur de cette bande est fonction de la teneur en CLnA-libres (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) contenus dans les substrats.

1.3.2.5. Etalonnage des CLnA-libres et des EPG-CLnA ΔE ($\Delta=\alpha$ ou β) par la méthode ATR-IRTF

Le protocole a été réalisé comme le décrit la norme officielle AOCS pour l'étude de l'acide élaïdique C18:1 n-9 avec une double liaison *trans* qui a un pic d'absorption intense à 966 cm^{-1} [95,96]. Les étalons de CLnA- βE ont été préparés par gravimétrie en pesant des masses précises de CLnA à 86 % et d'acide stéarique à 99% à des concentrations allant de 0 à 86% dans des flacons de 2 mL. Les échantillons composés de CLnA-libres sont solides à température ambiante. La température de fusion de l'acide stéarique est de $68,8^\circ\text{C}$, celle de l'acide α -éléostéarique de 49°C de l'acide β -éléostéarique de 72°C et l'acide catalpique de 32°C .

Les mélanges sont homogénéisés en chauffant les échantillons dans les flacons à l'étuve à 50°C pendant 20 minutes. Chaque cinq minutes, ils sont agités et remis à l'étuve. A la fin de l'expérience, les échantillons sont refroidis à la température de la salle et analysés ensuite par un spectromètre ATR-IRTF par la méthode de la dérivée seconde négative. A partir des spectres de la dérivée seconde négative, la hauteur de la bande de l'empreinte des CLnA à 986 cm^{-1} est déterminée. Une courbe d'étalonnage est générée à partir de ces données.

Cinq échantillons d'essai (CLnA 1, CLnA 2, CLnA 3, CLnA 4, CLnA 5) avec la somme des profils acides gras en CLnA (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) respectivement de 61,2%, 25,7%, 11,1%, 58,1% et 44,8% sont utilisés pour une étude comparative entre l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la méthode de la dérivée seconde négative de l'ATR-IRTF.

Chapitre 4

L'objectif est de vérifier la corrélation entre la hauteur de la dérivée seconde de la bande de l'empreinte des CLnA à 986 cm^{-1} avec la teneur en CLnA dans les échantillons.

1.3.3. Analyse des extractibles des polymères par CPG et ATR-IRTF

Des expériences d'extraction par solvant ont été utilisées pour déterminer la quantité de polymères formée et le profil acides gras de la phase soluble dans le solvant qui contient les acides gras non polymérisés pendant la réaction. Ils sont appelés extractibles. Environ 1 g du milieu réactionnel est prélevé chaque heure et extrait dans 50 mL de TBME pendant au moins 5 min en agitant en continu au vortex.

L'utilisation du TBME a été motivée par le fait que ce solvant entraîne une extraction sélective des acides gras en affectant moins les polymères formés. Les solutions ont ensuite été filtrées à l'aide d'un filtre PTFE (13 mm, $0,45\mu\text{m}$, petit diamètre). Les filtres avec les particules ont été séchés à la température ambiante et analysés par ATR-IRTF.

100 μL de chaque solution filtrée sont méthylés à l'aide de 50 μL TMSH (Tri Méthyl Sulfonium Hydroxide) à 0,2 mol/L dans le méthanol et analysée par CPG [46].

1.3.4. Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC : Size exclusion chromatography) permet d'accéder à la distribution des masses molaires et aux masses moléculaires moyennes.

Pour nos analyses, un détecteur réfractomètre (RI) a été utilisé. Il permet d'accéder à la masse molaire et à la concentration des macromolécules. Le dispositif de SEC comporte un dégazeur, une pompe, un injecteur automatique ASI-100, une pré-colonne, un four permettant de réguler la température des colonnes et deux colonnes de type PLgel $3\mu\text{m}$ MIXED-E, $7,5 \times 300\text{ mm}$, 25000 Da montées en série. Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- solvant : tétrahydrofurane (THF)
- débit : 1,0 mL/min
- température des colonnes : 35°C
- volume de solution injecté : 20 μL
- concentration de la solution : 200 $\mu\text{g/mL}$

Chapitre 4

L'observation de la formation et la quantification des différents polymères résultant de la réaction de polymérisation a nécessité l'utilisation des standards de Polystyrènes (PM=580, 1660, 2960, 3790, 4750, 7000, 10050, 32500 g/mol)

Les solutions de polymères sont agitées au vortex, puis aux ultrasons pendant au moins 30 minutes et filtrées sur des filtres à membrane en PTFE de porosité 0,45 μm avant injection en GPC.

1.3.5. Analyse thermique par calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

L'analyse DSC permet d'étudier les transitions d'état des matériaux. L'appareil est constitué d'un four dans lequel on place deux capsules, une capsule vide servant de référence et une autre capsule scellée contenant l'échantillon à analyser. Le principe repose sur la détermination de la différence d'énergie à fournir pour maintenir la capsule d'échantillon à la même température que la référence. Un instrument TA DSC Q 2000 a été utilisé, couplé à un système de refroidissement externe à haute performance, le « Liquid Nitrogen Pump » (LN Pump). Cette pompe offre une grande flexibilité dans le refroidissement et facilite une température de fonctionnement plus basse (jusqu'à $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sa capacité de refroidissement la plus élevée est de $140^{\circ}\text{C}/\text{min}$, avec un équilibrage ambiant rapide et une limite supérieure de température de 550°C .

Le programme de température dans le calorimètre commence par une isotherme à 50°C pendant 2 minutes. Ensuite, un refroidissement de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$, à une vitesse de $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ et un réchauffage à $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ à une vitesse de $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Un deuxième cycle a été effectué avec une vitesse de refroidissement de chauffage $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Les caractéristiques de l'échantillon par analyse DSC sont décrites par différentes températures: la température de cristallisation (T_c), la température fusion (T_f), la température de transition vitreuse (T_g). Le deuxième cycle de refroidissement et chauffage a été choisi pour la détermination des valeurs des températures de cristallisation, de fusion et de transition vitreuse.

Chapitre 4

2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

2.1. Estimation de la teneur en CLnA libres (acide α -oléostéarique, β -oléostéarique et acide catalpique) la méthode ATR-IRTF et par analyse CPG

Le **Tableau 30** présente les valeurs de la hauteur de la dérivée seconde des spectres ATR-IRFT des 9 étalons. La méthode d'acquisition des spectres a été réalisée 3x pour une meilleure répétabilité.

Tableau 30: Les hauteurs moyennes de la dérivée seconde négative des étalons en fonction de la teneur en CLnA (acides α -oléostéarique, acide β -oléostéarique et acide catalpique).

Etalons	Teneur en CLnA (%)	Haute moyenne de la dérivée seconde négative
Etalon 1	0,0	0,0000 \pm 0,0000
Etalon 2	18,6	0,0014 \pm 0,0002
Etalon 3	25,5	0,0020 \pm 0,0001
Etalon 4	29,1	0,0023 \pm 0,0002
Etalon 5	37,5	0,0031 \pm 0,0003
Etalon 6	47,1	0,0040 \pm 0,0002
Etalon 7	62,3	0,0054 \pm 0,0001
Etalon 8	70,3	0,0061 \pm 0,0003
Etalon 9	86,0	0,0073 \pm 0,0002

La calibration des hauteurs des dérivées secondes négatives par rapport à la composition en CLnA (trois doubles liaisons conjuguées) a été générée et un ajustement par régression linéaire a été obtenu (**Figure 40**).

Chapitre 4

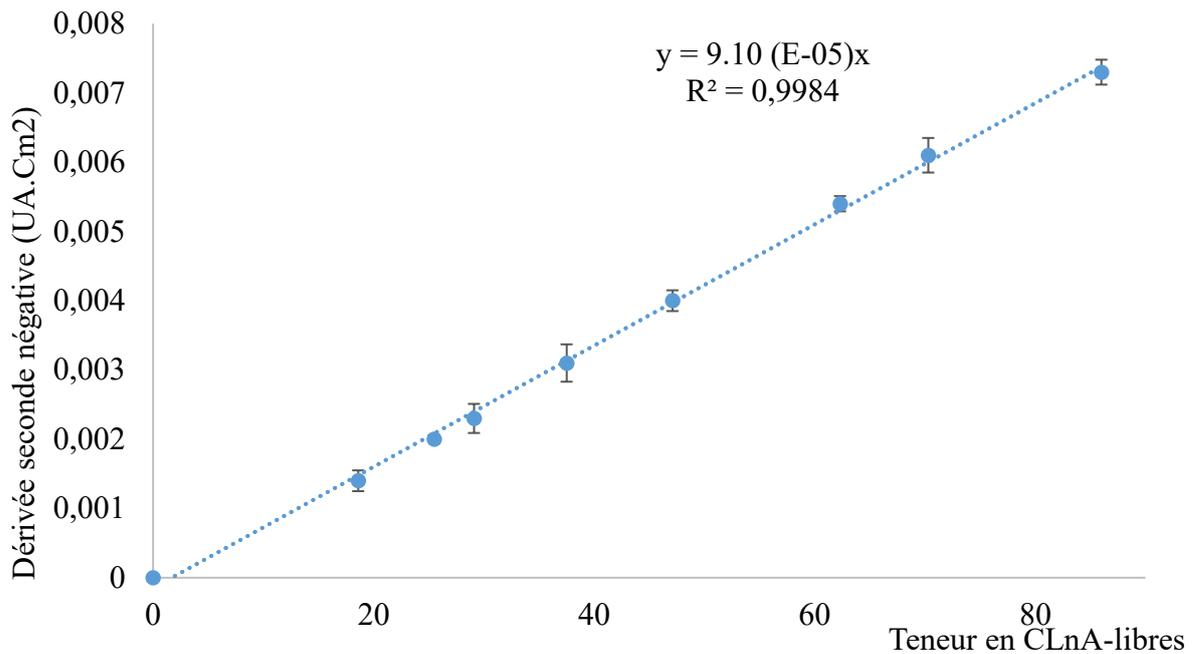


Figure 40: La courbe de régression de la hauteur de la dérivée seconde négative en fonction de la teneur en CLnA dans les échantillons

La hauteur de la dérivée seconde ($[HD^{2^{nd}}]$) est proportionnelle à la concentration massique des CLnA dans les échantillons.

$$[HD^{2^{nd}}] = 9 \times 10^{-05} [\text{CLnA-libres}]$$

Cette équation est utilisée pour déterminer la teneur en CLnA dans les échantillons (CLnA1, CLnA 2, CLnA 3, CLnA 4, et CLnA 5).

La teneur en CLnA de ces échantillons est consignée dans le **Tableau 31**.

Chapitre 4

Tableau 31: Résumé du profil CLnA par analyse ATR-IRTF et par analyse CPG

Échantillons	Méthode ATR-IRTF	Méthode CPG	Différence (%)
	CLnA (%)	CLnA (%)	
CLnA 1	62,3±0,1	61,2±0,0	-1,1±0,2
CLnA 2	24,4±0,3	25,7±0,1	1,3±0,1
CLnA 3	10,6±0,0	11,1±0,4	0,5±0,1
CLnA 4	57,8±0,2	58,1±0,1	0,3±0,1
CLnA 5	45,6±0,5	44,8±0,3	-0,8±0,3

Les résultats montrent une concordance entre les valeurs de référence déterminées par CPG et les valeurs prédites par la méthode ATR-IRTF. En effet, les teneurs en CLnA déterminées dans les cinq échantillons par les deux méthodes sont très proches. La différence entre les valeurs moyennes obtenues par l'analyse CPG et par l'analyse ATR-IRTF est inférieure à 1,3%. Ces deux méthodes s'accordent et peuvent permettre de suivre la teneur en CLnA dans chaque échantillon.

Ces résultats montrent clairement que la hauteur de la dérivée seconde négative de l'empreinte des CLnA à la bande d'absorption 987cm^{-1} est fonction de la teneur en CLnA dans les échantillons.

La diminution de la hauteur de la dérivée seconde négative de cette bande, pourra être utilisée pour confirmer la consommation des doubles liaisons conjuguées, lors des réactions de polymérisation.

2.2. Suivi cinétique des réactions de polymérisation par rhéologie

Au cours de la réaction de polymérisation, les monomères (CLnA) sont directement chauffés avec ou sans oxygène de l'air. L'augmentation de la viscosité traduit la formation de polymères. Le suivi cinétique de l'évolution de la viscosité des substrats au cours des différentes réactions par rhéologie permet donc de confirmer une possible polymérisation de ces substrats CLnA.

Chapitre 4

2.2.1. Polymérisation des CLnA-libres ΔE ($\Delta=\alpha$ ou β) de l'huile brute et de l'huile brute modifiée.

2.2.1.1. Suivi cinétique de la polymérisation des CLnA-libres ΔE ($\Delta=\alpha$ ou β) sous atmosphère inerte par rhéomètre

Le suivi cinétique de la réaction de polymérisation sous atmosphère inerte du concentrat CLnA-libres (αE) de l'huile brute et du concentrat CLnA-libres (βE) de l'huile brute modifiée est représenté sur la Figure 41.

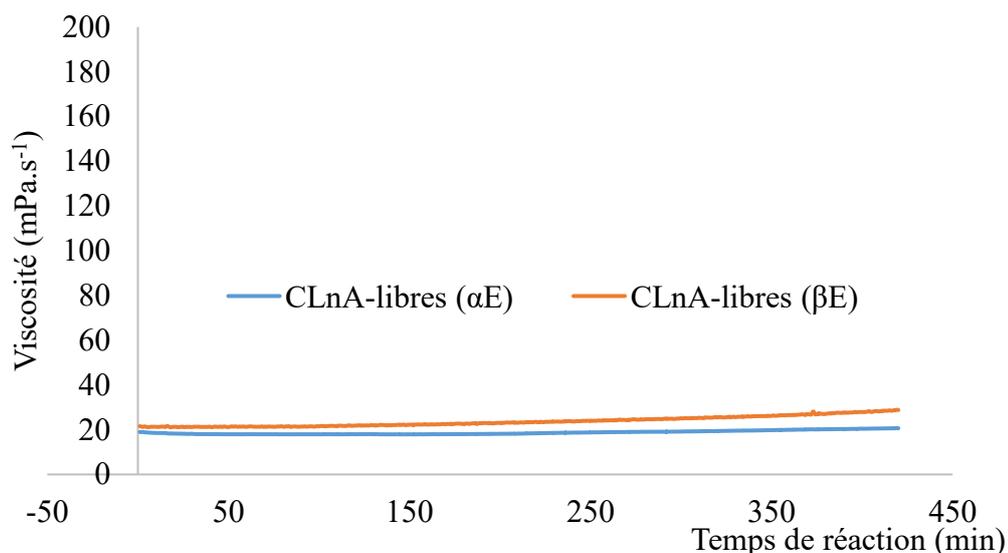


Figure 41: Evolution de la viscosité des substrats CLnA-libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée au cours de leur polymérisation sous atmosphère inerte à 70°C.

Les résultats de la Figure 41 montrent que la viscosité du milieu réactionnel au cours des essais de polymérisation du concentrat CLnA-libres αE de l'huile brute et du concentrat CLnA-libres βE de l'huile brute modifiée reste inchangée. La valeur de la viscosité est de 21 mPa.s pour le milieu réactionnel du concentrat d'acides gras libres de l'huile brute et de 28 mPa.s pour CLnA-libres βE de l'huile brute modifiée sous atmosphère inerte à 70°C.

Ces résultats montrent que les concentrats CLnA-libres ΔE ($\Delta=\alpha$ ou β) riches en acide α -éléostéarique ou en acide β -éléostéarique de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* ne polymérisent pas sous atmosphère inerte à 70°C.

Chapitre 4

2.2.1.2. Suivi cinétique des réactions de polymérisation des CLnA-libres ΔE ($\Delta=\alpha$ ou β) sous air.

❖ Suivi cinétique de la polymérisation de CLnA-libres αE de l'huile brute.

Le suivi cinétique de la réaction d'essai de polymérisation du concentrat de CLnA-libres αE de l'huile brute sous air à 70°C est représenté par la courbe de la **Figure 42**.

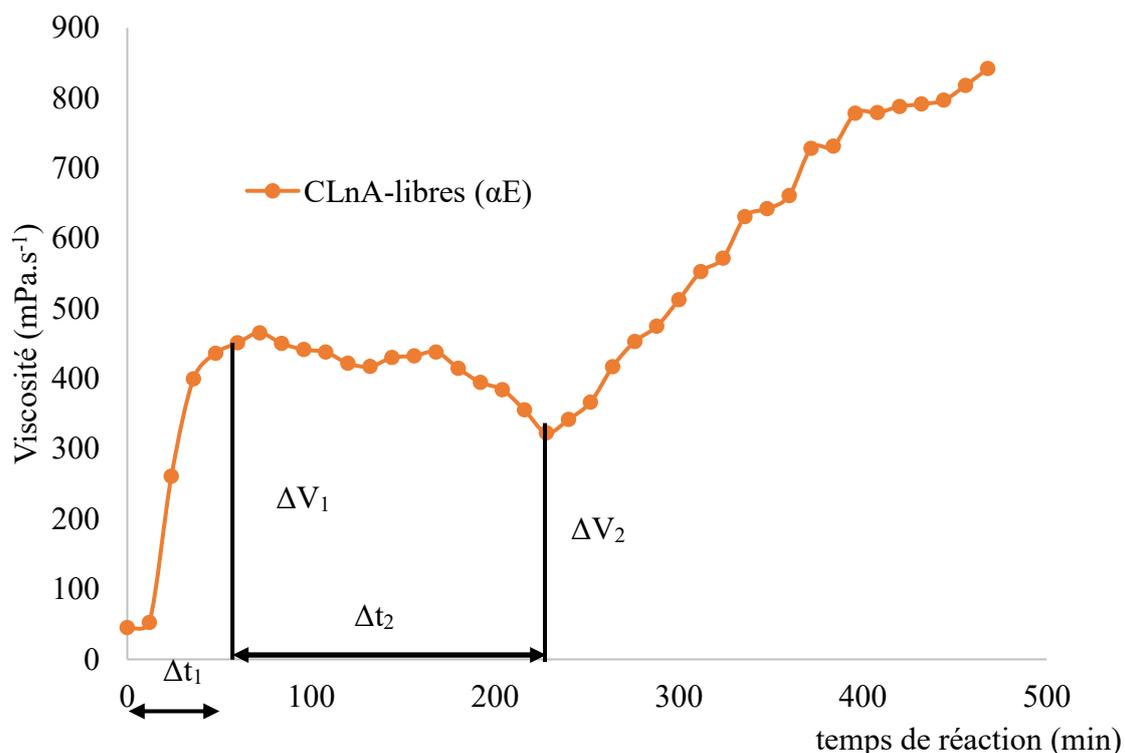


Figure 42: Evolution de la viscosité du concentrat de CLnA- αE libres de l'huile brute au cours de la polymérisation sous air à 70°C

L'allure de la courbe montre que la viscosité du milieu réactionnel augmente après 8 heures de réaction de 45,32 mPa.s à une valeur de 845 mPa.s. La variation de la viscosité se fait en trois étapes. La première variation est une forte augmentation de la viscosité de $\Delta V_1 = 391$ mPa.s sur une durée $\Delta t_1 = 50$ mn. Elle est réalisée à une vitesse de 8,1 mPa.s/mn. Au niveau de la deuxième étape d'une durée de 3 heures, la viscosité stagne, elle varie très peu. La dernière étape montre une forte augmentation de la viscosité jusqu'à une valeur de 842,1 mPa.s avec une vitesse moyenne de 2,1 mPa.s/mn pendant 4 heures.

Cette augmentation de la viscosité du milieu réactionnel confirme la polymérisation du concentrat de CLnA-libres αE de l'huile brute sous air à 70°C.

Chapitre 4

❖ Suivi cinétique de la polymérisation de concentrat de CLnA-βE libres de l'huile brute modifiée

La Figure 43 présente la cinétique de la réaction de polymérisation CLnA-libres βE. L'allure de la cinétique révèle un profil composé de trois étapes.

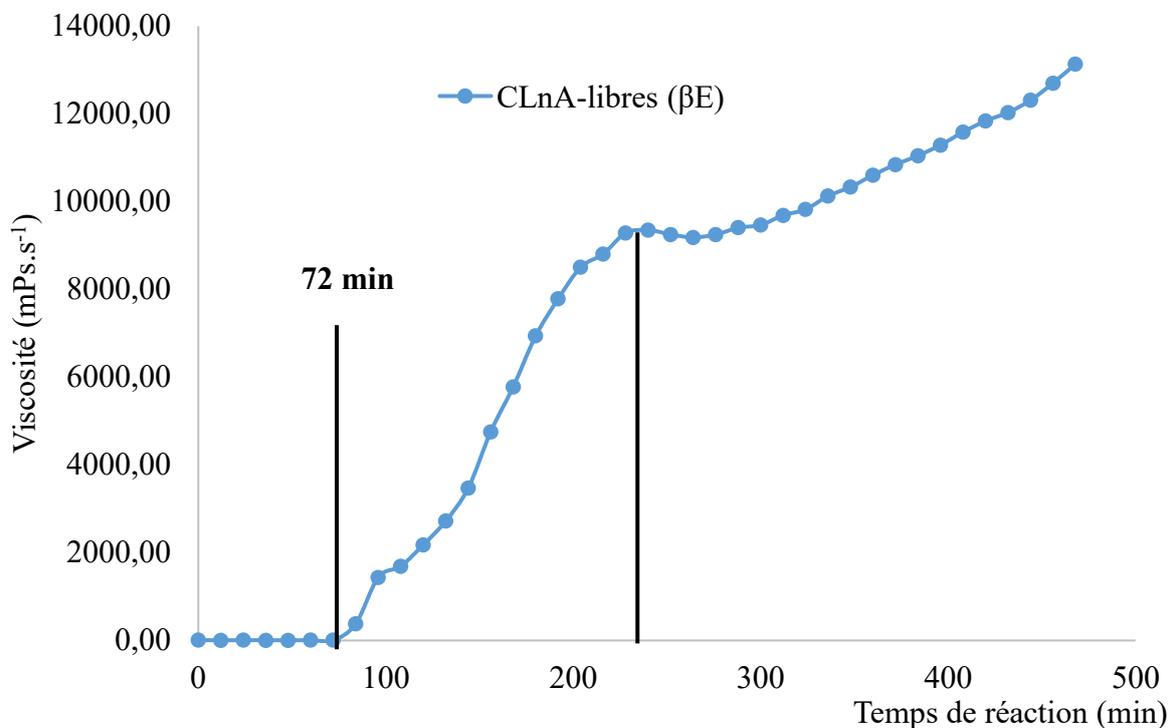


Figure 43: Evolution de la viscosité du concentrat de CLnA- βE libres de l'huile brute modifiée au cours de la polymérisation sous air à 70°C.

La viscosité du milieu réactionnel n'évolue pas jusqu'à 72 minutes, après 72 minutes de chauffage on observe une forte augmentation de la viscosité jusqu'à une valeur de 9300 mPa.s avec une vitesse moyenne de 59,45 mPa.s/mn. Après la quatrième heure la viscosité augmente mais avec une vitesse moyenne de 19,36 mPa.s/ mn. Cette augmentation de viscosité du milieu réactionnel montre que le concentrat de CLnA- βE libres de l'huile brute modifiée polymérise sous air à 70°C.

Chapitre 4

2.2.2. Polymérisation des esters partiels de l'huile brute et de l'huile brute modifiée (EPG-CLnA- Δ E ($\Delta=\alpha$ ou β))

2.2.2.1. Suivi cinétique de la polymérisation des esters partiels de glycérol de l'huile brute, EPG-CLnA- α E (mono) et EPG-CLnA- α E (di) sous atmosphère inerte.

La Figure 44 présente la cinétique de la réaction de polymérisation des esters partiels EPG1 : EPG- CLnA- α E (di) et EPG 7 : EPG- CLnA- α E (mono) des acides gras libres de l'huile brute.

L'allure de la courbe montre que la viscosité des milieux réactionnels n'évolue pas. La viscosité reste constante tout au long de réaction d'essai de polymérisation de EPG1 et de EPG7.

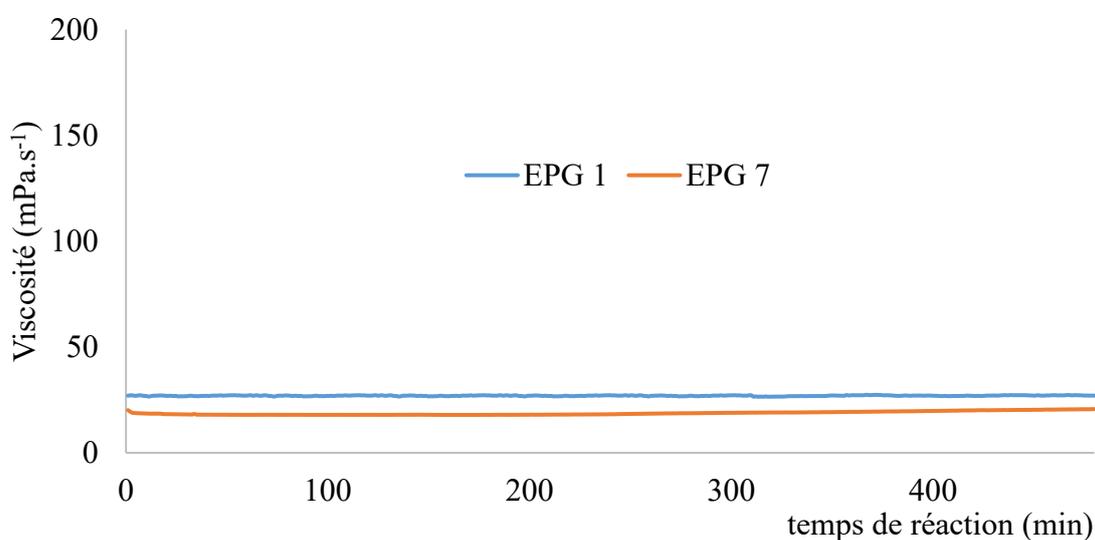


Figure 44 : Evolution de la viscosité des esters partiels de glycérol (EPG1 et EPG7) des acides gras de l'huile brute au cours de leur polymérisation sous atmosphère inerte à 70°C.

Les résultats montrent clairement que EPG1 (EPG- CLnA- α E (di)) et EPG 7 (EPG- CLnA- α E (mono)) composés de mélanges de mono-diglycérides riches en acide α -oléostéarique ne polymérisent pas sous atmosphère inerte à 70°C.

2.2.2.2. Suivi cinétique de polymérisation de EPG- CLnA- β E (mono) et de EPG- CLnA- β E (di) sous atmosphère inerte.

Les Figure 45 et Figure 46 présentent les cinétiques de la réaction de polymérisation des esters partiels EPG3 : EPG- CLnA- β E (di) et EPG5 : EPG- CLnA- β E (mono) des acides gras libres de l'huile brute modifiée.

Chapitre 4

La variation de la viscosité en fonction du temps lors de l'essai de polymérisation de EPG 5 montre que la viscosité du milieu réactionnel augmente fortement après 5 heures de réaction pour atteindre une valeur de 1880 mPa.s à la fin de la réaction 8 (heures).

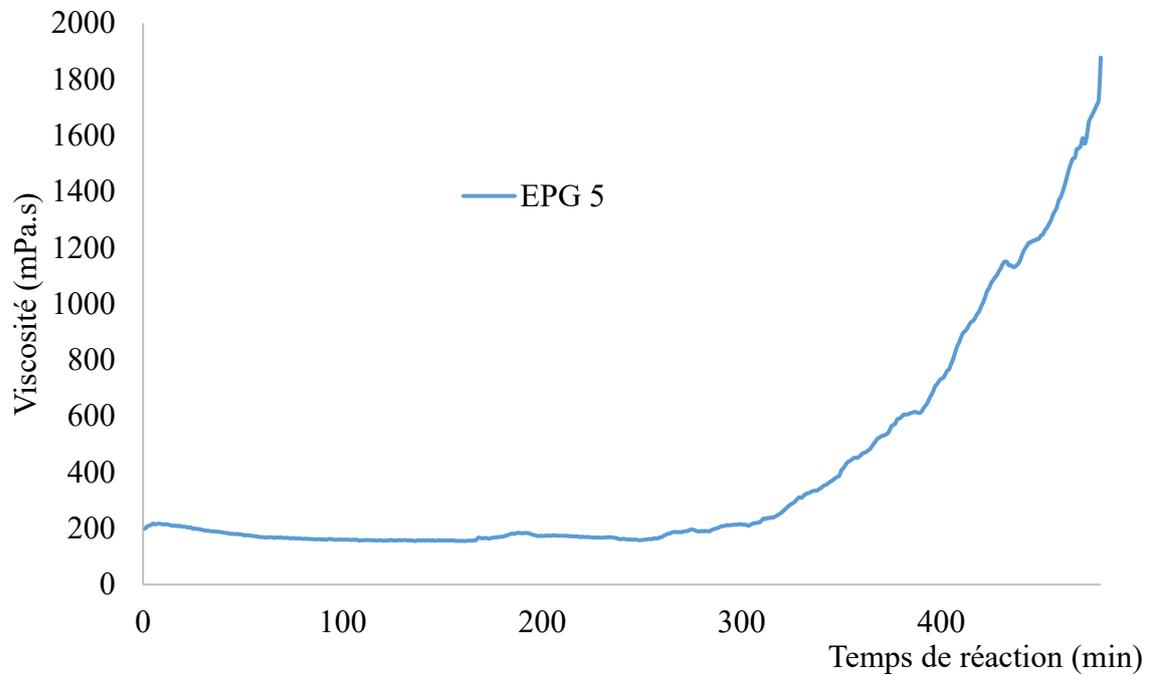


Figure 45: Evolution de la viscosité de EPG5 : EPG-CLnA- β E (mono) de l'huile brute modifiée au cours de la polymérisation sous atmosphère inerte à 70°C

L'évolution de la viscosité au cours de l'essai de polymérisation de EPG3 : EPG- CLnA- β E (di) sous atmosphère inerte à 70°C est présentée sur la **Figure 46**. La courbe montre qu'au-delà de 5 heures de réaction, la viscosité augmente fortement jusqu'à une valeur de 41700 mPa.s⁻¹.

Chapitre 4

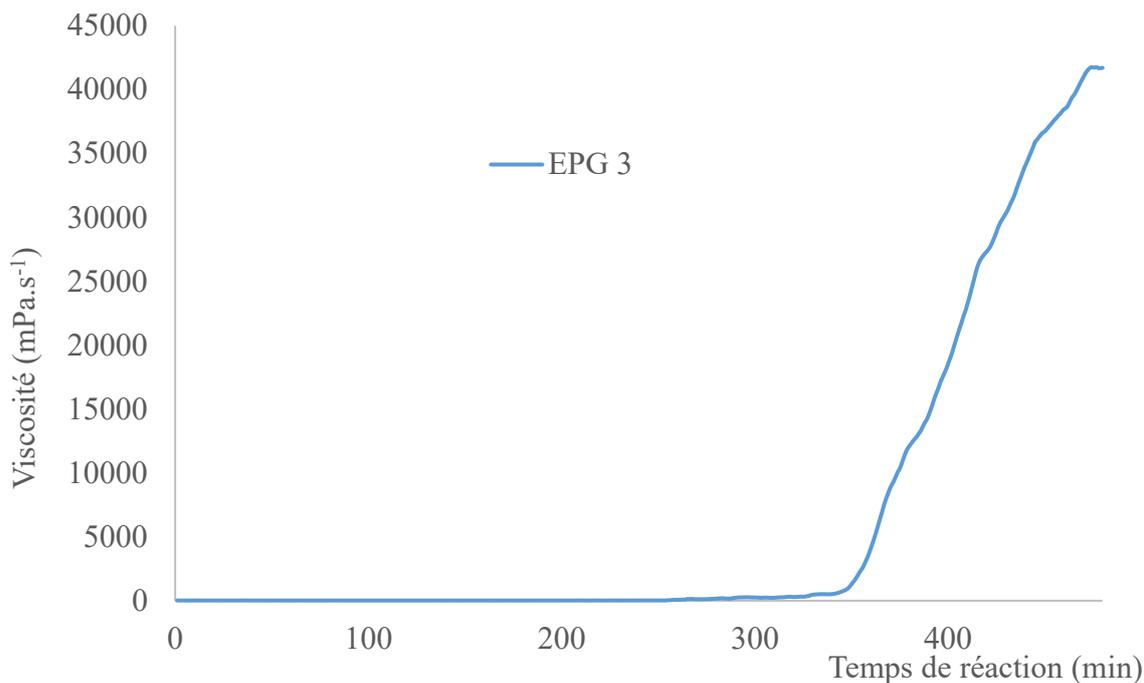


Figure 46: Evolution de la viscosité de EPG3:EPG-CLnA- β E (di) au cours de la polymérisation sous atmosphère inerte à 70°C

L'évolution de la viscosité des substrats EPG3 et EPG5 au cours des essais de polymérisation montrent que ces esters partiels de glycérol (mélange mono-diglycérides) riches en CLnA β E polymérisent sous atmosphère inerte à 70°C.

2.2.2.3. Suivi cinétique de la polymérisation de EPG-CLnA- β E (mono) et de EPG-CLnA- β E (di) sous air

Les substrats EPG5 : EPG- CLnA- β E (mono) et EPG7 : EPG- CLnA- α E (mono) sont choisis pour les essais de polymérisation sous air à 70°C. Le choix de ces substrats est guidé par le fait qu'ils sont riches en monoglycérides. Le suivi cinétique de leur polymérisation est possible *in situ* à l'aide d'un rhéomètre.

En revanche, le suivi cinétique de la polymérisation des substrats EPG3 : EPG- CLnA- β E (di) et EPG1 : EPG- CLnA- α E (di) riches en diglycérides n'est pas possible. La polymérisation de ces substrats sous air non contrôlé conduit très vite à la formation de polymères dont la viscosité ne peut être mesurée par le rhéomètre utilisé. On atteint la limite de mesure de l'appareil.

Chapitre 4

La **Figure 47** présente les cinétiques de la réaction de polymérisation des esters partiels EPG7 : EPG- CLnA- α E (mono) et EPG5 : EPG- CLnA- β E (mono).

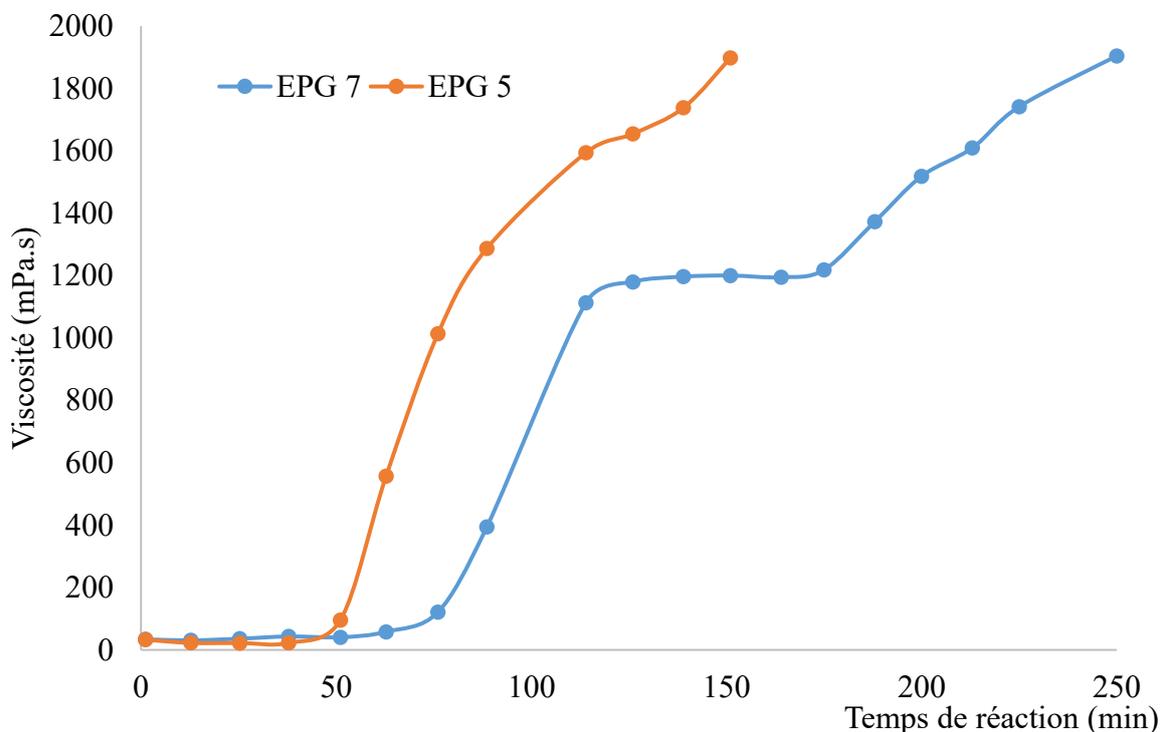


Figure 47: Evolution de la viscosité de EPG7 : EPG- CLnA- α E (mono) et EPG5 : EPG- CLnA- β E (mono) au cours de la polymérisation sous air à 70°C

L'évolution de la viscosité au cours de l'essai de polymérisation de EPG 5 montre que la viscosité du milieu réactionnel augmente fortement après 50 minutes de réaction pour atteindre une valeur de 2000 mPa.s après 2 h30 mn.

L'allure de l'essai de polymérisation montre une réaction en trois phases avec un début d'augmentation de la viscosité après 60 min de réaction jusqu'à atteindre une viscosité de 1100 mPa.s en 2 h de réaction. Au-delà des 2 h, la viscosité reste constante pendant 50 min et ensuite augmente pour atteindre une viscosité de 1900mPa.s après 4 h de réaction.

Chapitre 4

En résumé, le suivi cinétique de l'évolution de la viscosité des milieux réactionnels au cours des essais de polymérisation montre que sous atmosphère inerte à 70°C :

- les substrats CLnA- α E libres et CLnA-libres β E ne polymérisent pas.
- les substrats EPG-CLnA- α E (mono) et EPG-CLnA- α E (di) ne polymérisent pas.
- les substrats EPG- CLnA- β E (mono) et EPG- CLnA- β E (di) polymérisent.

Sous air à 70°C:

- les substrats CLnA- α E libres et CLnA- β E libres polymérisent.
- les substrats EPG-CLnA- α E (mono) et EPG-CLnA- α E (di) polymérisent.
- les substrats EPG- CLnA- β E (mono) et EPG- CLnA- β E (di) polymérisent.

2.3.Polymérisation en masse des CLnA- Δ E libres ($\Delta=\alpha$ ou β) et EPG-CLnA Δ E ($\Delta=\alpha$ ou β) en réacteur batch agité.

2.3.1. Essai de polymérisation sous atmosphère inerte des CLnA β E (42%) et CLnA- α E (60%).

Les spectres des **Figure 48** et **Figure 49** représentent respectivement le milieu réactionnel à t=0 h et après t=9 heures de la réaction de polymérisation des CLnA-libres riches à 42% d'acide β -éléostéarique, CLnA- β E (42%) sous azote à 70°C.

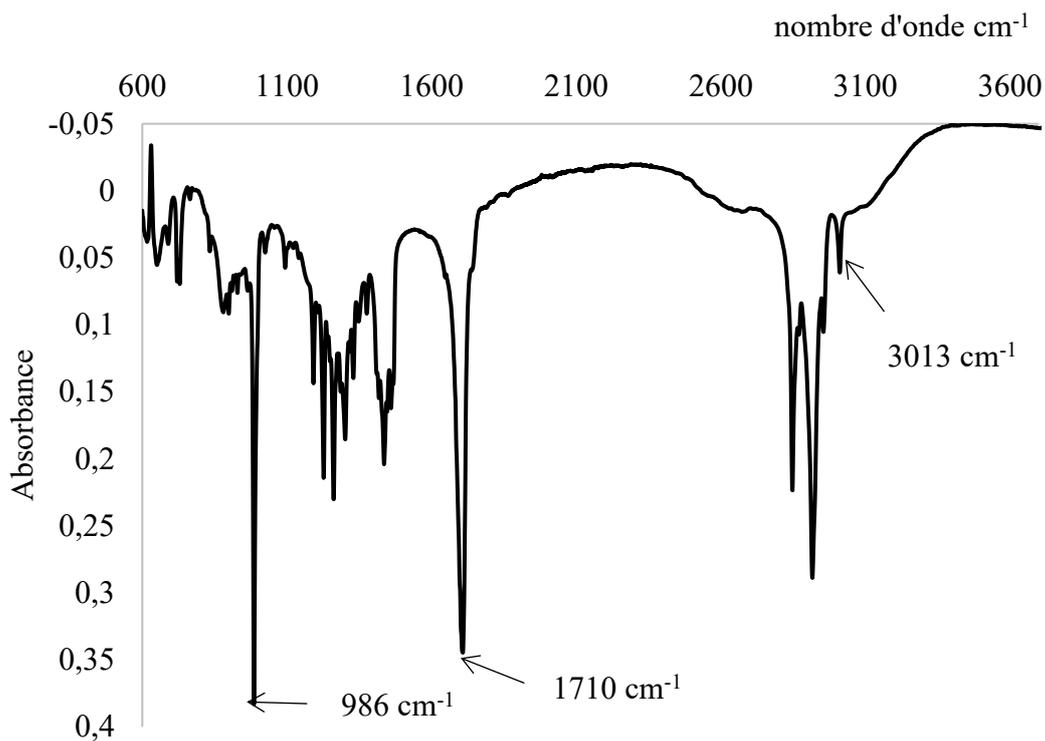


Figure 48 : Spectre ATR-IRTF de CLnA-βE (42%) à t=0h

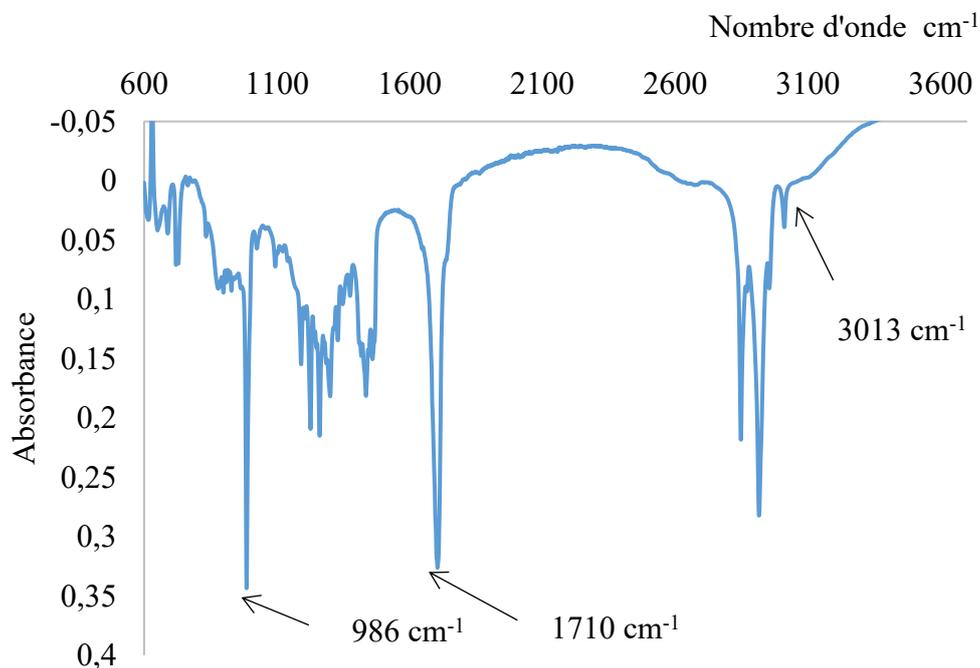


Figure 49 : Spectre ATR-IRTF du milieu réaction à t9 h de polymérisation de CLnA-βE (42%) - sous atmosphère inerte à 70°C.

Chapitre 4

Le spectre ATR-IRTF à $t=0$ h comparé au spectre obtenu après $t=9$ heures de réaction à 70°C sous azote de l'échantillon CLnA- βE (42 %), montre que les 4 zones de bandes d'absorption caractéristiques sont identiques. Les différentes fonctions chimiques des CLnA n'ont pas été modifiées. L'intensité du pic de l'empreinte des CLnA (986 cm^{-1}) reste forte.

Le suivi cinétique de l'évolution de cette empreinte (986 cm^{-1}) dans les échantillons CLnA- βE (42 %) et CLnA- αE (60 %) a été réalisé au cours des 9 heures de la réaction de polymérisation.

La variation de la hauteur de la dérivée seconde de l'empreinte (986 cm^{-1}) des CLnA des échantillons CLnA- αE (60%) et CLnA- βE (42%) au cours des 9 heures de réaction est représentée sur la **Figure 50**.

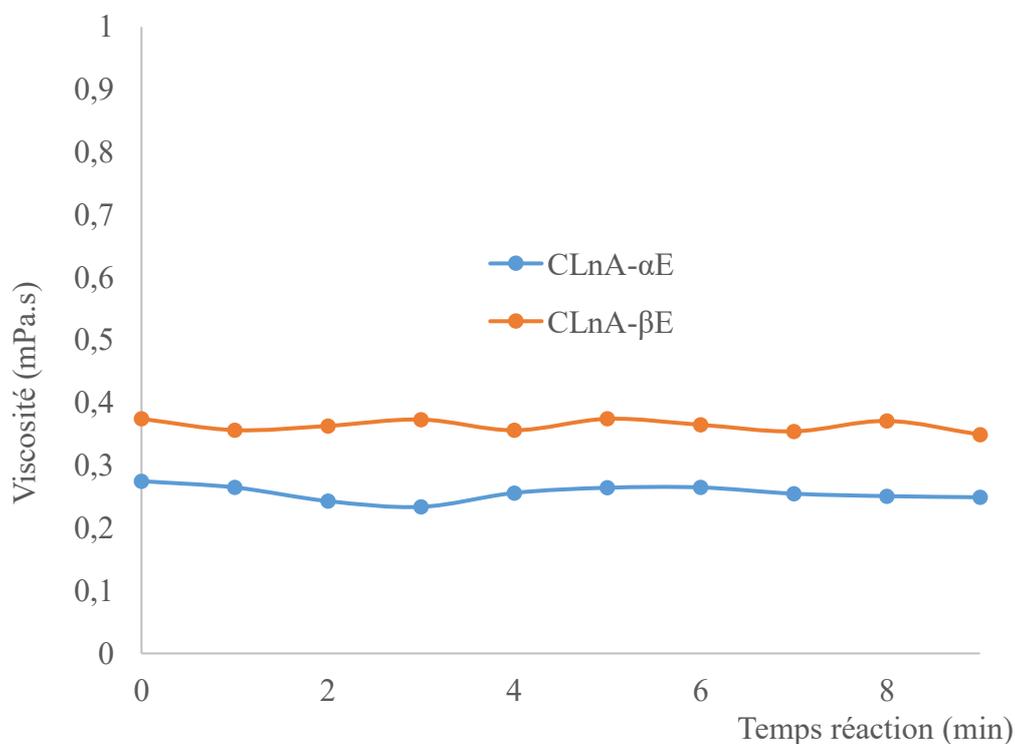


Figure 50 : Suivi cinétique de l'évolution de la hauteur de la dérivée seconde de la bande à 986 cm^{-1} au cours de la réaction à 70°C sous azote des CLnA-libres

Chapitre 4

Les valeurs issues de la mesure de la hauteur de la dérivée seconde négative en fonction du temps de la bande à 986 cm^{-1} ne varient pas. L'absorbance des trois doubles liaisons conjuguées des acides CLnA (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique) reste inchangée.

Le traitement des CLnA-libres quel que soit le profil acide gras à 70°C sous atmosphère inerte ne favorise pas la consommation des doubles liaisons conjuguées des CLnA.

Dans ces conditions opératoires la polymérisation des échantillons CLnA- α E (60%) et CLnA- β E (42%) n'est donc pas possible.

Le profil acide gras des milieux réactionnels de CLnA- α E et de CLnA- β E à $t=0\text{h}$ et à $t=9\text{h}$ est réalisé par analyse chromatographie en phase gazeuse et regroupé dans le **Tableau 32**.

Tableau 32: Profil acides gras des milieux réactionnels de CLnA- α E et de CLnA- β E à $t=0\text{h}$ et $t=9\text{h}$

Profil acides gras (%)	CLnA- α E		CLnA- β E	
	0h	9h	0h	9h
Acide palmitique C16:0	4,2 \pm 0,0	4,6 \pm 0,1	4,5 \pm 0,1	5,7 \pm 0,0
Acide stéarique C18:0	4,8 \pm 0,0	5,2 \pm 0,2	5 \pm 0,0	6,4 \pm 0,1
Acide oléique C18:1n9	7,6 \pm 0,2	6,5 \pm 0,0	8,1 \pm 0,0	7,4 \pm 0,2
Acide linoléique C18:2n6	22,2 \pm 0,0	23,1 \pm 0,1	24,4 \pm 0,2	23,2 \pm 0,3
Acide α -éléostéarique C18:3n5 c t t	60 \pm 0,1	59,5 \pm 0,1	8,1 \pm 0,0	7,4 \pm 0,0
Acide catalpique C18:3n5 t t c	0 \pm 0,1	0 \pm 0,0	8,2 \pm 0,1	7,9 \pm 0,1
Acide β -éléostéarique C18:3n5 t t t	1,2 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1	41,7 \pm 0,0	42,1 \pm 0,2
CLnA	61,2	60,6	58	57,4

Chapitre 4

Les résultats montrent que le profil acides gras de CLnA- α E et de CLnA- β E entre $t=0$ h et $t=9$ h reste constant. Les acides gras pris indépendamment dans les conditions opérées ne réagissent pas.

2.3.2. Essai de polymérisation sous air des CLnA β E (42%) et CLnA- α E (60%)

Les spectres, **Figure 51** et **Figure 52**, représentent le milieu réactionnel à $t=0$ et après $t=9$ heures de polymérisation des CLnA-libres (CLnA- β E 42%) sous air.

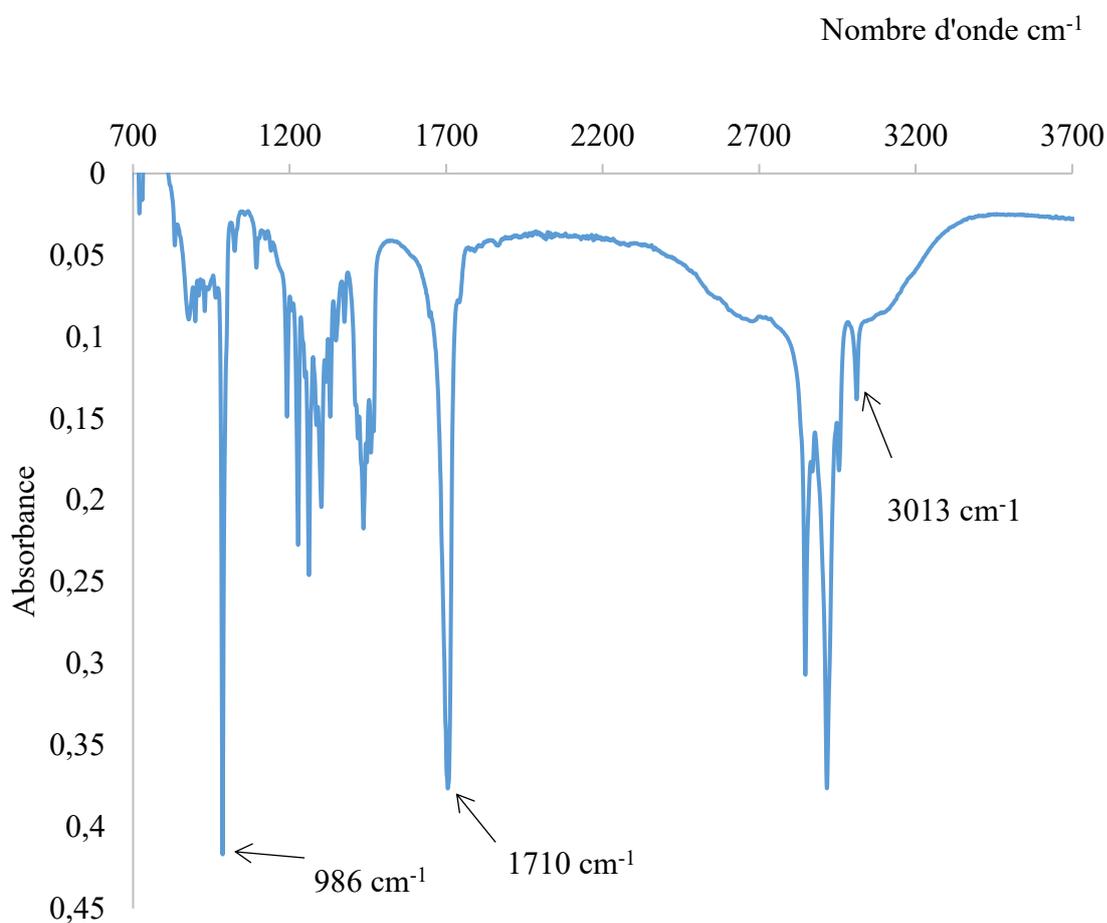


Figure 51 : Spectre ATR-IRTF de l'échantillon CLnA- β E (42%) à t_0 .

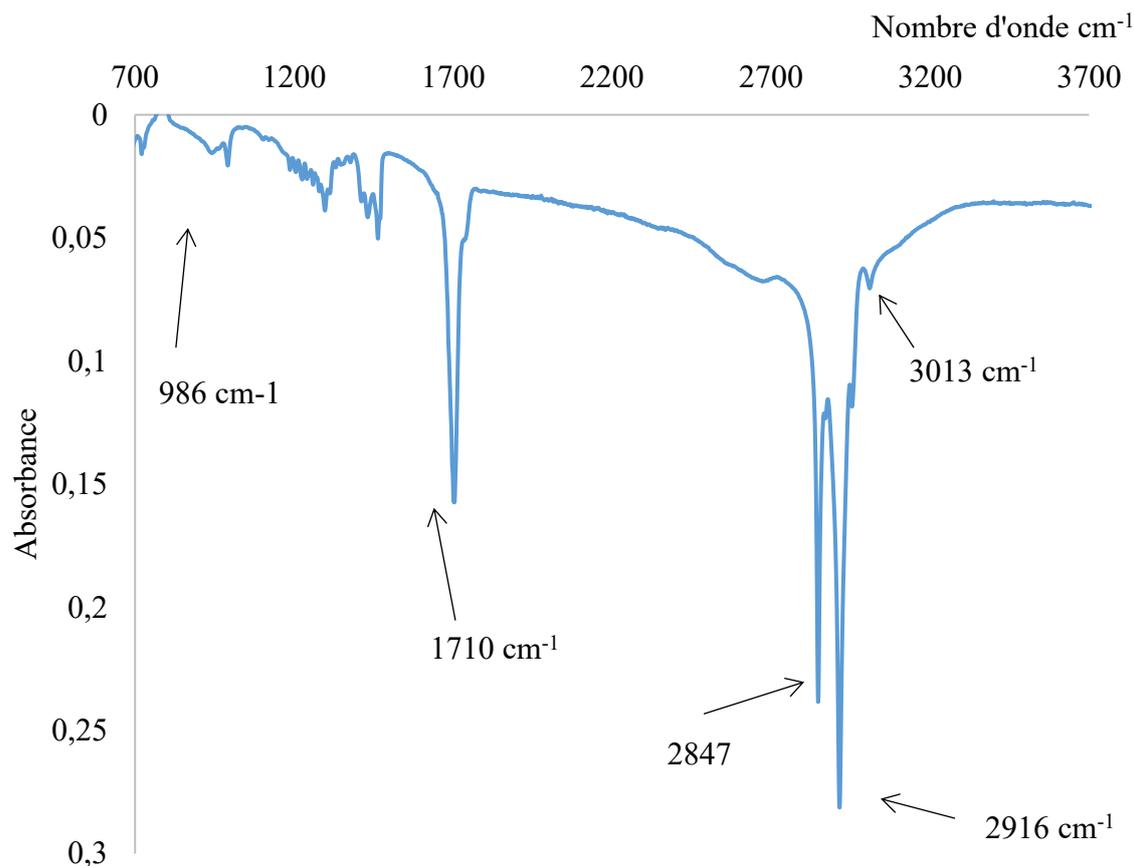


Figure 52 : Spectre ATR-IRTF du milieu réactionnel à $t=9$ heures de polymérisation de l'échantillon CLnA-βE (42%) sous air.

Les spectres ATR-IRTF de CLnA-βE (42%) en début ($t=0$ heure) et à la fin ($t=9$ heures) de la réaction sont différents. La comparaison des spectres montre clairement que des zones sont fortement modifiées après le traitement de CLnA-βE (42%) à 70°C sous air pendant 9 heures. En particulier, la zone de l'empreinte des CLnA aux fréquences μ (986 cm^{-1}) et μ (3013 cm^{-1}) caractéristique de doubles liaisons éthyléniques.

L'étude comparative des pics sur les spectres ATR-IRTF de l'échantillon CLnA-βE (42%) à $t=0$ et à $t=9$ heures est rassemblée dans le **Tableau 33**. Les résultats montrent une forte diminution des bandes d'absorption caractéristiques des substrats polyéthyléniques.

Chapitre 4

Tableau 33 : Comparaison de l'évolution de l'empreinte IR des CLnA au cours de la polymérisation de l'AGL- β E (42%)

Zones	CLnA- β E		Poly CLnA- β E		Attribution
	$\mu(\text{cm}^{-1})$	Intensité	$\mu(\text{cm}^{-1})$	Intensité	
(500-1000 cm^{-1})	729	Faible	729	faible	Déformation $n>4$ C-H
	893	Faible	893	Rien	
	986	Forte	986	Rien	Elongation HC=CH
(1000-1500 cm^{-1})	1192	Moyenne	1192	Faible	Elongation C-O
	1226	Moyenne	1226	Faible	
	1262	Moyenne	1262	Faible	
	1301	Moyenne	1300	Faible	
	1436	Moyenne	1461	Moyenne	
(1600-1700 cm^{-1})	1710	Forte	1710	Forte	Elongation C=O
(2800-3100 cm^{-1})	2849	Forte	2847	Forte	Elongation CH
	2918	Forte	2916	Forte	
	3015	Fine	3015	Faible	Elongation HC=CH

Chapitre 4

Les résultats confirment la consommation des CLnA (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) dans les milieux réactionnels. En présence de l'air à 70°C, la polymérisation est démontrée par rhéologie, elle est concomitante à la consommation des doubles liaisons conjuguées comme le témoigne l'analyse ATR-IRTF.

L'évolution de la hauteur de la dérivée seconde négative de l'empreinte 986 cm^{-1} par la méthode ATR-IRTF est représentée en fonction du temps par les courbes de la **Figure 53**. Quel que soit le profil acide gras libre en CLnA, les échantillons sous air à 70°C polymérisent. Le suivi cinétique de l'évolution de la bande à 986 cm^{-1} témoigne de la disparition des doubles liaisons conjuguées au cours du temps, ce qui est attribué à la consommation des CLnA lors de la polymérisation des échantillons CLnA- β E (42%) et CLnA- α E (60%).

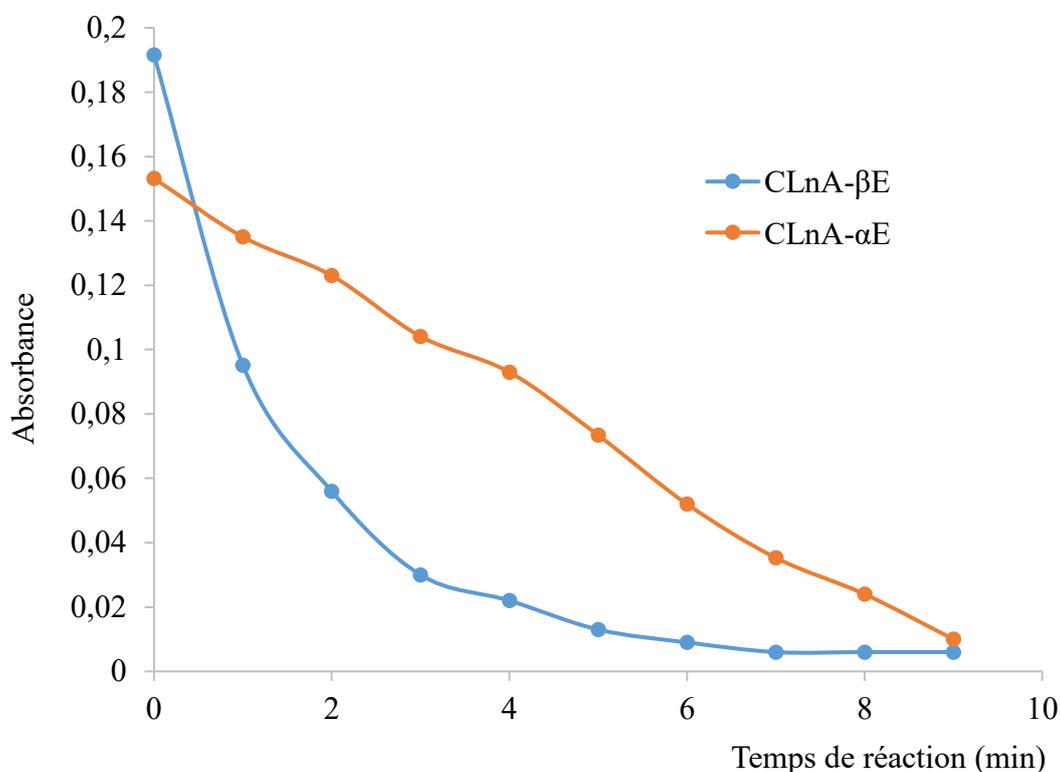


Figure 53 : Suivi de l'évolution de la hauteur de la dérivée seconde à 986 cm^{-1} au cours de la polymérisation de CLnA- β E (42%) et de CLnA- α E (60%) sous air (1,2L/mn) à 70°C

Chapitre 4

Les courbes d'évolution de la hauteur de la dérivée seconde négative de CLnA-βE (42%) et de CLnA-αE (60%) en fonction du temps de réaction de la polymérisation montrent que les paramètres de polymérisation (vitesse de polymérisation et ordre de réaction) sont différents pour les deux substrats.

Pour déterminer la vitesse de polymérisation et l'ordre de la réaction, la loi cinétique de Van't Hoff est utilisée. Selon cette loi, la vitesse de polymérisation des monomères dans un système est déterminée par l'équation :

$$V = k[A]^\alpha[B]^\beta$$

k étant la constante de vitesse

α et β étant les ordres partiels des réactifs A et B

α + β = ordre global de la réaction

A et B étant des monomères

A partir de la représentation graphique de la variation de la concentration de monomère en fonction du temps, la constante de vitesse et l'ordre de la réaction sont déterminés.

Cette méthode intégrale est utilisée pour déterminer graphiquement la constante de vitesse et l'ordre d'une réaction. Les données cinétiques des réactions ont été traitées sur un tableur Excel.

2.3.3. Détermination des paramètres cinétiques de la polymérisation de CLnA-αE (60%) sous air à 70°C.

La Figure 54 représente l'évolution de la concentration des CLnA-αE (60%) en fonction du temps au cours de la réaction de polymérisation.

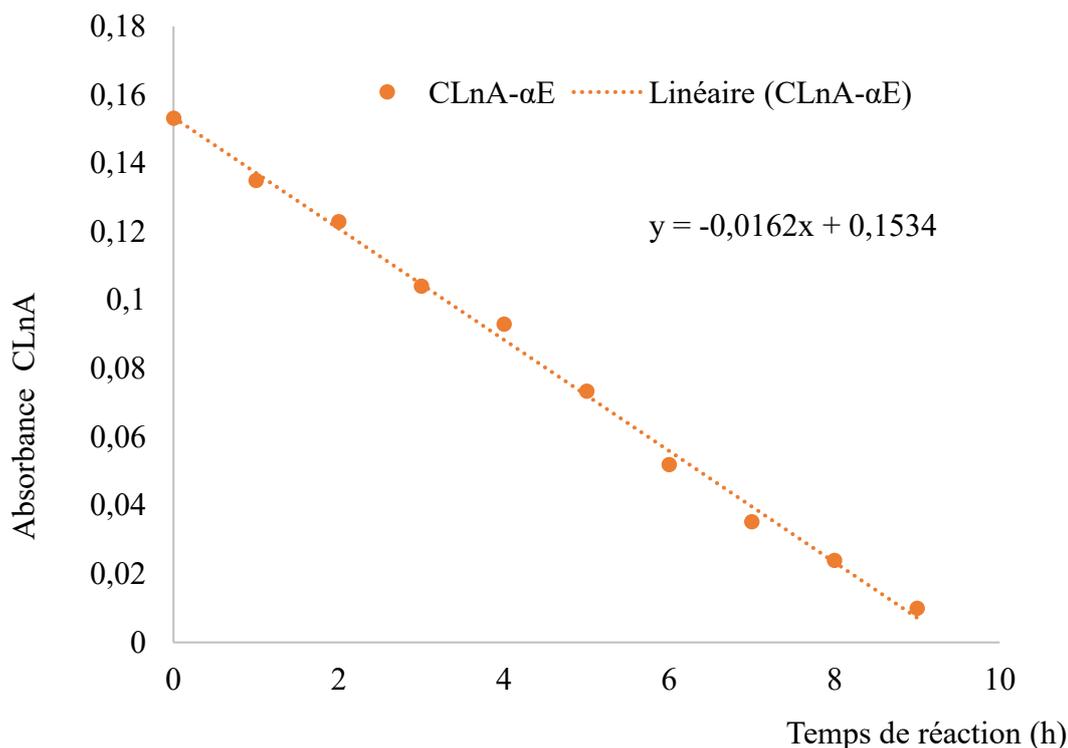


Figure 54: Evolution de la [CLnA-αE (60%)] dans la réaction de polymérisation sous air à 70°C

L'allure de la cinétique de consommation de CLnA-αE (60%) est une droite. Selon la loi cinétique, la vitesse de cette réaction est de la forme :

$$V = k[\text{CLnA} - \alpha\text{E}]^0$$

La constante de vitesse (k) de la réaction de polymérisation est la pente de la droite.

En somme, la polymérisation de CLnA-αE (60%) est une réaction lente avec une constante de vitesse de $16,2 \times 10^{-3} \text{UA.h}^{-1}$ et un ordre partiel de CLnA de 0.

2.3.4. Détermination des paramètres cinétiques de la polymérisation de CLnA-βE (42%) sous air à 70°C.

La hauteur de la dérivée seconde négative de CLnA-βE (42%) au cours de la polymérisation diminue jusqu'à atteindre une valeur de 0,013 UA en 5 heures. Pour déterminer les paramètres cinétiques (constante de vitesse et ordre de réaction) la courbe de ln (absorbance CLnA) en fonction du temps de réaction a été tracée (**Figure 55**).

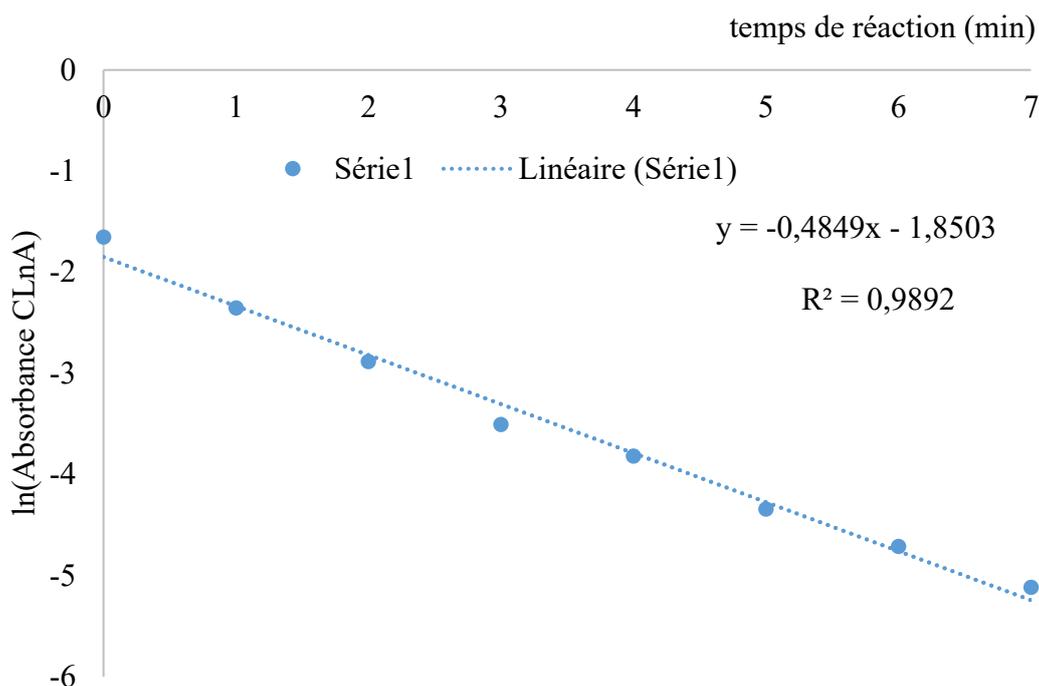


Figure 55 : Évolution du ln (Absorbance CLnA-βE (42%)) au cours de la réaction de polymérisation sous air à 70°C

L'allure de cette courbe est une droite. Selon la loi cinétique, la vitesse est déterminée par la relation :

$$V = k[CLnA - \beta E]^1$$

La réaction de polymérisation de CLnA-βE (42%) est rapide avec une constante de vitesse d'environ $484,9 \times 10^{-3} \text{ UA. cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ et un ordre partiel de CLnA-βE (42%) de 1.

Ces modèles seront utilisés dans la suite du travail pour la détermination des paramètres cinétiques de réaction (constante de vitesse et ordre de réaction).

Sous air et à une température de 70°C, CLnA-libres βE polymérise plus vite que son isomère CLnA-libres αE. En effet, CLnA-libres βE a une constante de vitesse de $484,9 \times 10^{-3} \text{ UA. cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ et un ordre partiel de 1. Quant à CLnA-libres αE, il a une constante de vitesse de $16,2 \times 10^{-3} \text{ UA. cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$ et un ordre partiel de CLnA de 0.

Chapitre 4

Ces résultats montrent, sans ambiguïté, que le CLnA- β E libre est un monomère nettement plus réactif de polymérisation que le CLnA-libre α E. Cette réactivité résulte de la configuration des doubles liaisons conjuguées des CLnA. Le CLnA- β E libre (acide β -éléostéarique) présente toutes ses trois doubles liaisons en configurations *trans, trans, trans* quant à CLnA- α E libre (acide α -éléostéarique) la configuration des trois doubles liaisons est de (*cis, trans, trans*).

2.3.5. Essai de Polymérisation des EPG-CLnA sous atmosphère inerte

Le suivi cinétique de la variation de l'absorbance de la bande à 986 cm^{-1} pendant la polymérisation des différents EPG-CLnA est représenté sur la **Figure 56**.

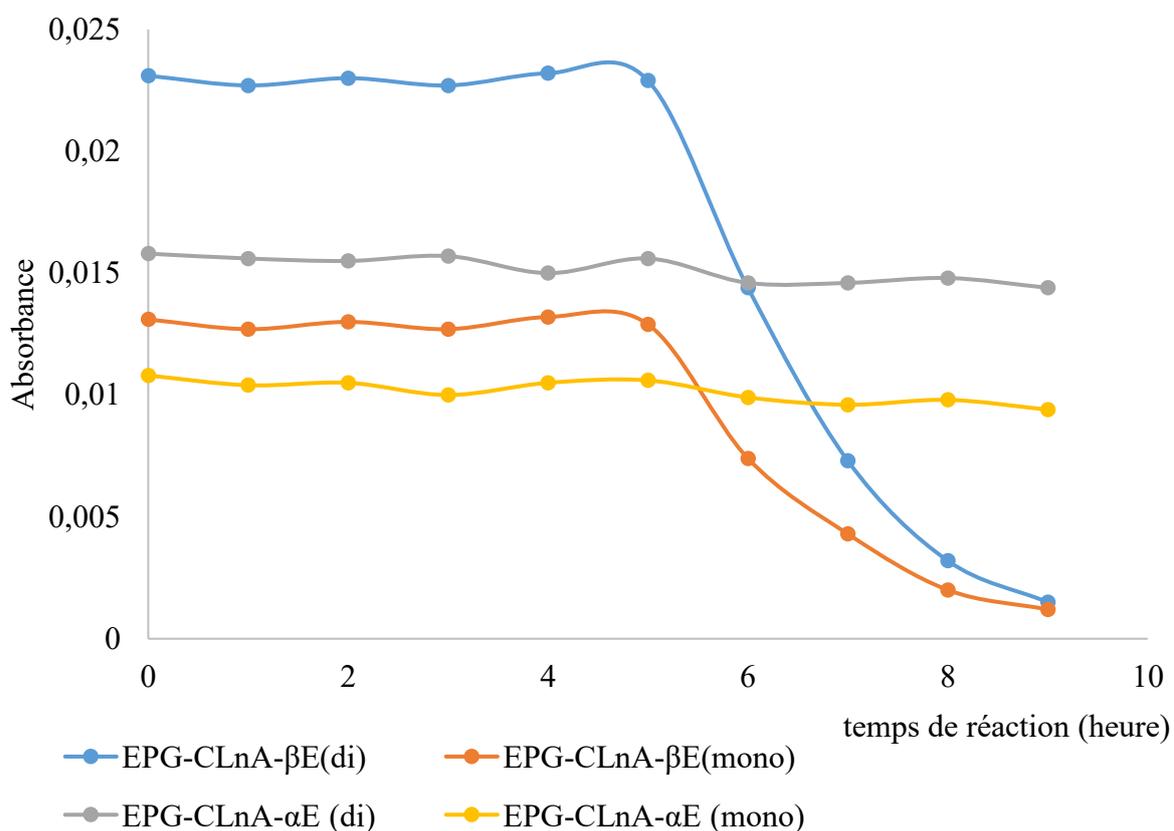


Figure 56: Suivi de l'évolution de la hauteur de la dérivée seconde à 986 cm^{-1} au cours de la polymérisation de l'EPG sous azote

Chapitre 4

A 70°C, sous azote avec un débit de 1,2 L/min, le suivi cinétique de la variation de l'absorbance au cours de la réaction de polymérisation des substrats EPG-CLnA β E (mono) et EPG-CLnA β E (di) sous atmosphère inerte montre une évolution en deux phases. De $t=0$ h jusqu'à 5 heures, la hauteur de la dérivée seconde négative de l'empreinte (986cm^{-1}) des CLnA des deux substrats reste inchangée. Les CLnA dans ces substrats ne sont pas consommés pendant les 5 premières heures de la réaction.

Par contre, après la cinquième heure de la réaction, les CLnA sont consommés, ce qui se traduit sur les courbes par une rapide diminution de la hauteur de la dérivée seconde négative à 986 cm^{-1} jusqu'à atteindre la valeur de $12 \times 10^{-4}\text{UA}$ pour EPG-CLnA- β E (mono) et de $25 \times 10^{-4}\text{UA}$ pour EPG-CLnA β E (di).

Le suivi cinétique de la variation de la hauteur de la dérivée seconde négative de EPG-CLnA β E (mono) et EPG-CLnA β E (di) a permis de tracer $\ln(\text{Absorbance CLnA})$ en fonction du temps entre la cinquième heure et la neuvième heure (Figure 57).

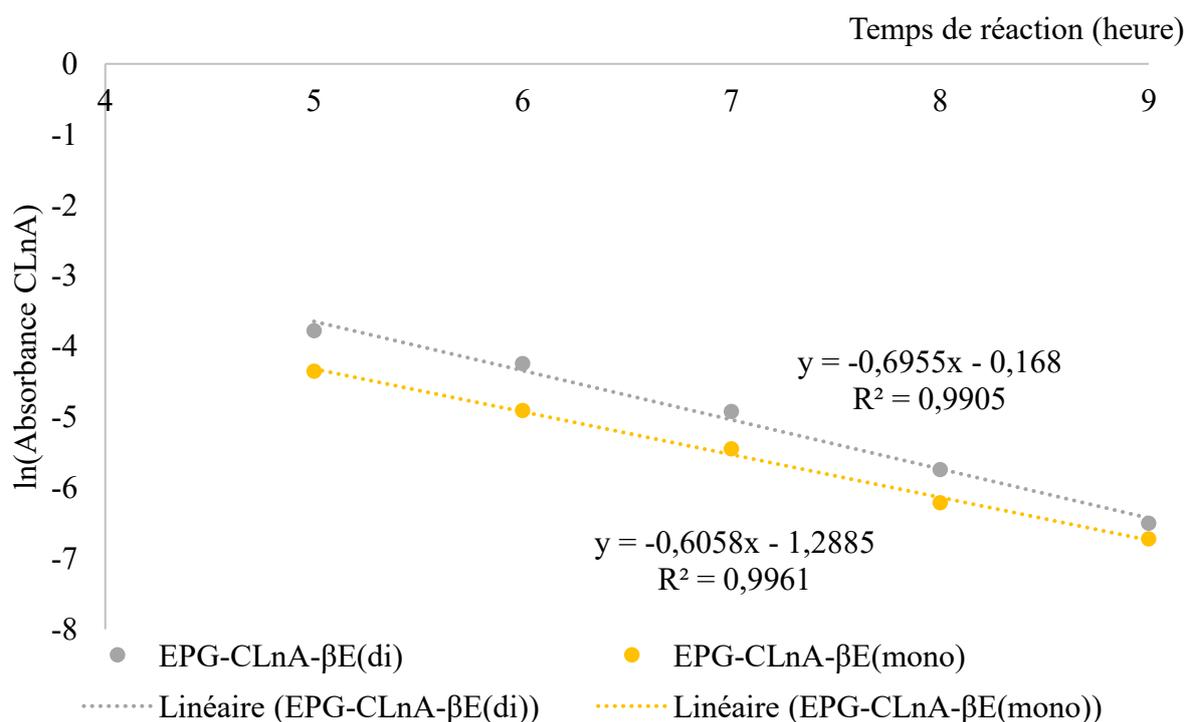


Figure 57: Évolution du $\ln(\text{Absorbance EPG-CLnA})$ au cours de la réaction de polymérisation entre 5 et 9 heures sous azote

Chapitre 4

A partir de ces tracées, les paramètres cinétiques des réactions de polymérisation de EPG-CLnA β E (mono) et EPG-CLnA β E (di) sont déterminés.

La polymérisation de EPG-CLnA β E (di) est réalisée avec une constante de vitesse de $695,5 \times 10^{-3} \text{ UA.h}^{-1}$ et l'ordre partiel de EPG-CLnA β E (di) est de 1. Le substrat EPG-CLnA β E (mono) polymérise avec une constante de vitesse de $605,8 \times 10^{-3} \text{ UA.h}^{-1}$ et un ordre partiel de 1 pour EPG-CLnA β E (mono).

En revanche, les échantillons EPG-CLnA α E (mono) et EPG-CLnA α E (di) avec l'acide α -éléostéarique comme composé majeur ne polymérisent pas dans ces conditions opératoires. La hauteur de leur dérivée seconde négative reste inchangée pendant les 9 heures de réaction.

En résumé, sous atmosphère inerte, les EPG-CLnA β E mono ou di avec des chaînes carbonées majoritairement formées de l'acide β -éléostéarique débutent leur polymérisation après 5h de réaction à 70°C . Les EPG-CLnA α E (mono ou di) riches en acide α -éléostéarique ne polymérisent pas dans les conditions opérées.

2.3.6. Essai de Polymérisation des EPG-CLnA sous air.

Des essais de polymérisation ont été réalisés avec les EPG-CLnA à savoir EPG-CLnA α E (mono), EPG-CLnA α E(di), EPG-CLnA β E(mono) et EPG-CLnA β E(di) à 70°C sous air avec un débit de 1,2L/min sous agitation (500 rpm) mécanique dans un réacteur de 100 mL.

2.3.6.1. Etude de la viscosité du milieu réactionnel

La **Figure 58** montre une représentation graphique des résultats de mesure de la viscosité des échantillons EPG au début et à la fin des réactions.

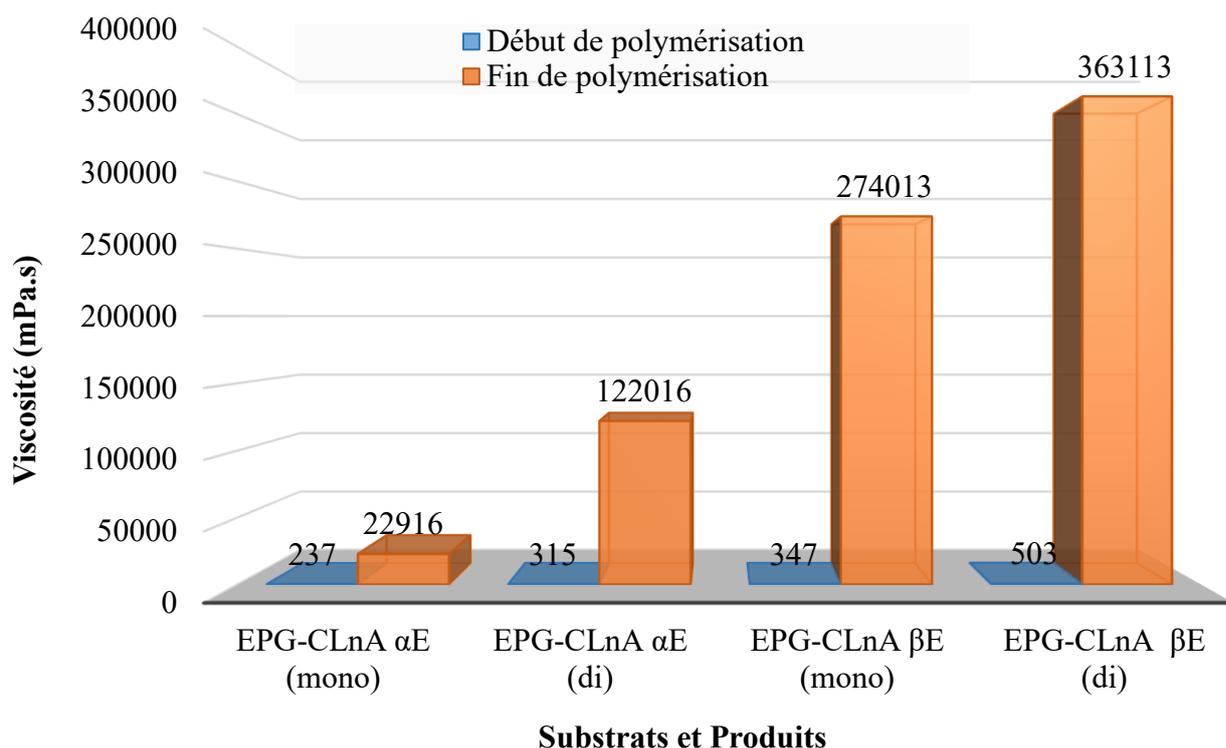


Figure 58 ; Evolution de la viscosité du milieu réactionnel à 25°C à t=0 et après 9 heures de réaction

Pour chaque échantillon on constate que la différence de viscosité entre la fin et le début de la réaction est très significative. Elle est de 22 679 mPa.s pour EPG-CLnA α E (mono), de 121 701 mPa.s pour EPG-CLnA α E (di) de 273 666 mPa.s pour EPG-CLnA β E (mono) et de 362 610 mPa.s pour EPG-CLnA β E (di). Cette augmentation de la viscosité montre que les esters partiels dans les conditions opérées ont polymérisé.

Pour illustrer les changements observés sur les spectres ART-IRTF entre le début (t 0) et la fin de la réaction de polymérisation, les échantillons EPG-CLnA α E (mono) et EPG-CLnA α E(di) ont été choisis à titre d'exemples.

Chapitre 4

2.3.6.2. Les spectres ATR-IRTF de l'échantillon EPG-CLnA α E (mono)

La Figure 59 représente le spectre ATR-IRTF de EPG-CLnA α E (mono) avant la réaction de polymérisation ($t=0$ h) et Figure 60 le spectre ATR-IRTF du milieu réactionnel après 3 heures de réaction de l'échantillon EPG-CLnA α E(mono).

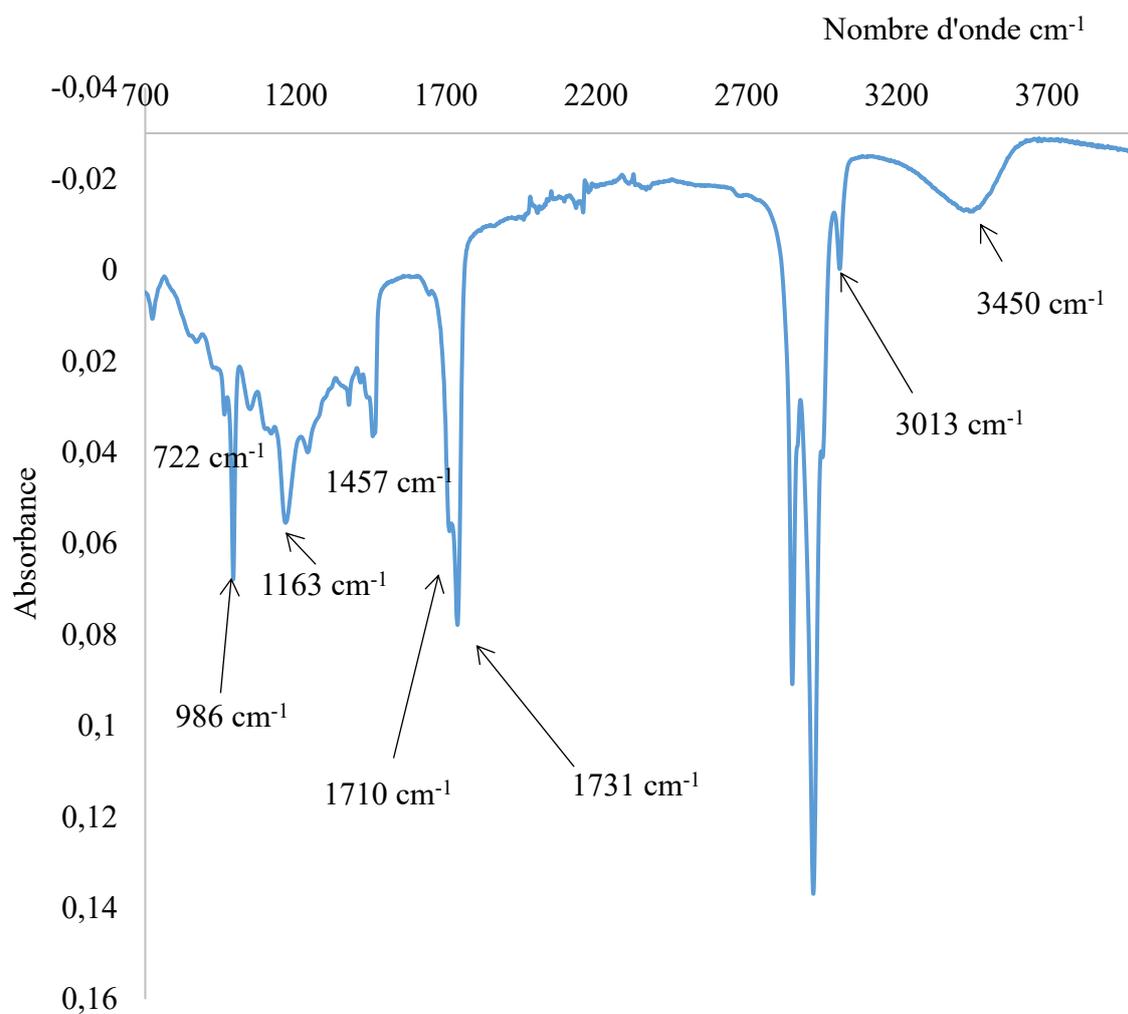


Figure 59: Spectre ATR-IRTF de EPG-CLnA α E(mono) à (t_0)

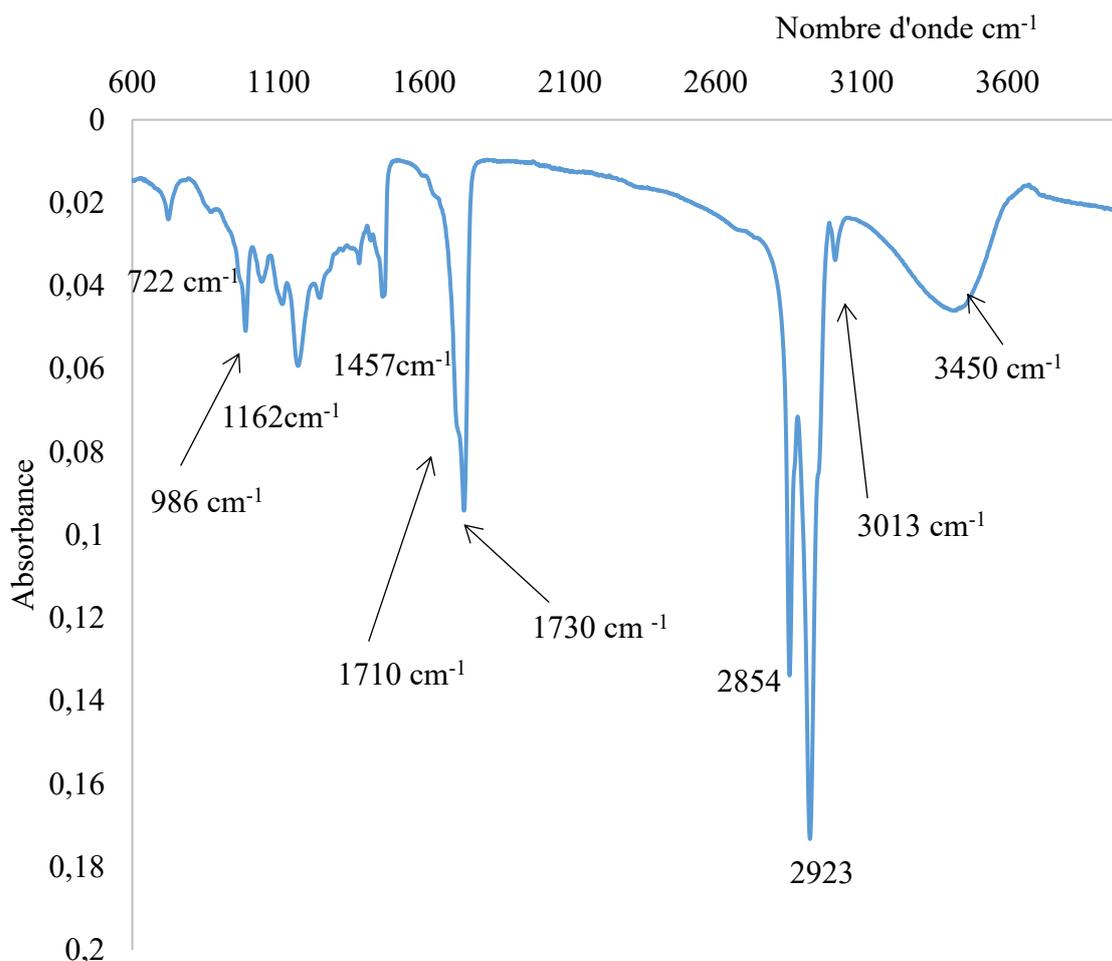


Figure 60: Spectre ATR-IRTF du milieu réactionnel après 3 h de réaction d'EPG-CLnA α E (mono) à 70°C sous air à un débit de 1,2L/min

Le **Tableau 34** rassemble les valeurs des différentes bandes sur la caractérisation ATR-IRTF du substrat EPG-CLnA α E (mono) avant et après réaction.

Les résultats obtenus montrent qu'au cours de la polymérisation des EPG-CLnA α E (mono) les bandes d'absorption à 986 cm^{-1} et 3013 cm^{-1} caractéristiques des doubles liaisons de CLnA évoluent. La bande d'absorption à 986 cm^{-1} caractéristique de l'élongation des doubles liaisons *trans* dans les CLnA diminue fortement.

Au niveau de la bande à 3013 cm^{-1} , caractérisant l'élongation des doubles liaisons *cis* dans les CLnA, on observe une légère diminution de cette bande.

Chapitre 4

En présence d'air à 70°C, EPG-CLnA α E (mono) polymérise en faisant réagir les doubles liaisons conjuguées, comme le témoigne l'analyse ATR-IRTF. Les doubles liaisons *trans* et *cis* participent à la polymérisation.

Tableau 34 : Comparaison de l'évolution de l'empreinte des CLnA au cours de la polymérisation de l'EPG-CLnA α E (mono)

Zones	EPG-CLnA α E(mono)		Poly EPG-CLnA α E(mono)		Attribution
	μ (cm ⁻¹)	Intensité	μ (cm ⁻¹)	Intensité	
(500-1000cm ⁻¹)	722	Faible	722	Faible	Déformation, C-H
	986	Forte	986	Faible	Elongation HC=CH
(1000-1500cm ⁻¹)	1163	Moyenne	1162	Moyenne	Elongation C-O
	1457	Moyenne	1457	Moyenne	Déformation C-H, CH ₃
(1600-1800cm ⁻¹)	1710	Faible	1710	Faible	Elongation C=O acide
	1730	Forte	1730	Forte	Elongation C=O ester
(2800-3100cm ⁻¹)	2853	Forte	2854	Forte	Elongation CH
	2920	Forte	2923	Forte	Elongation HC=CH
	3013	Fine	3013	Fine	
(3100-4000cm ⁻¹)	3450	Forte	3450	Forte	Elongation OH

Chapitre 4

Les spectres ATR-IRTF des échantillons EPG CLnA- α E (di)

Les **Figure 61** et **Figure 62** représentent les spectres ART-IRTF de EPG-CLnA α E (di) au début($t=0$ h) et après 4 heures de réaction à 70°C sous air à un débit de 1,2L/min.

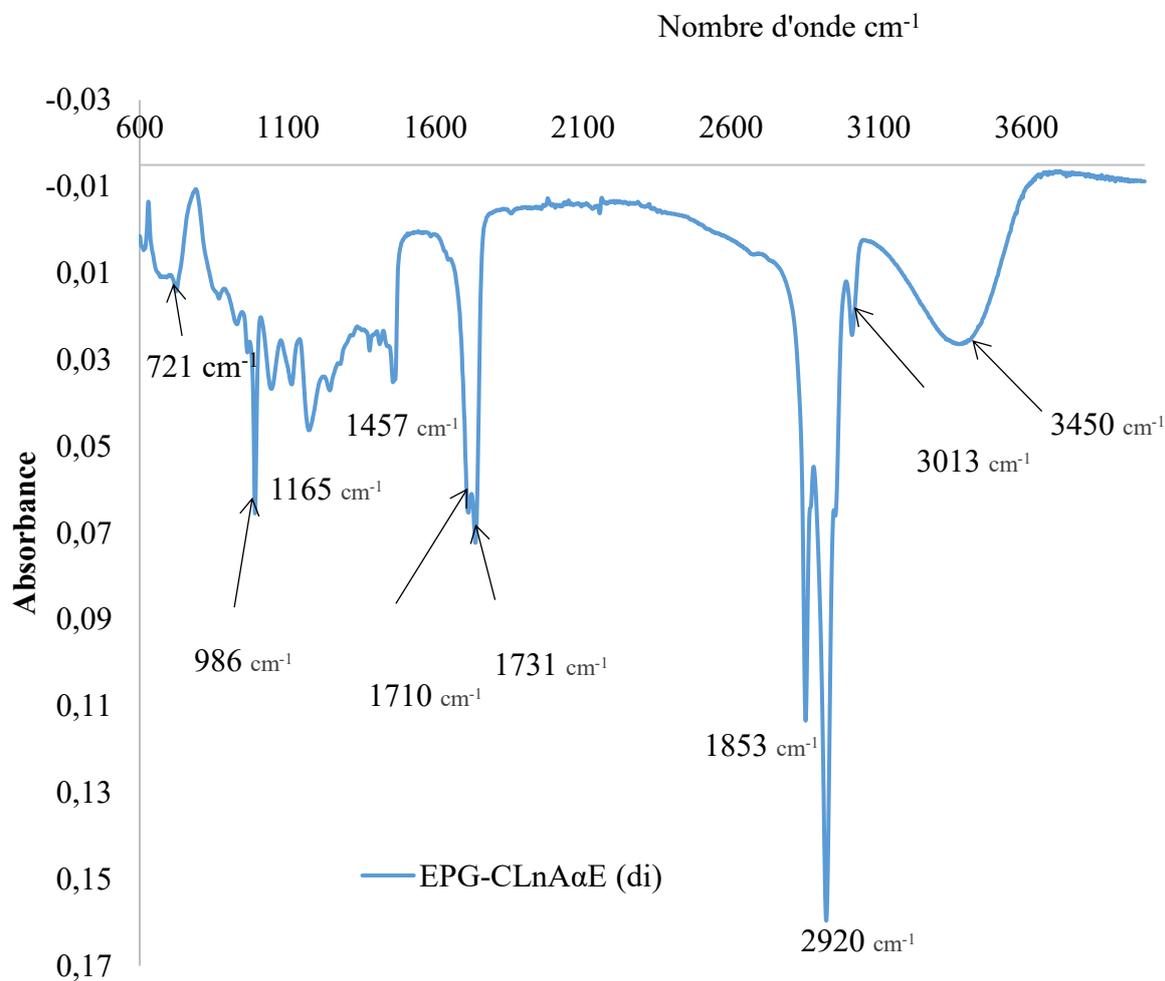


Figure 61 : Spectre ATR-IRTF de la matrice EPG- α E (di) à (t_0)

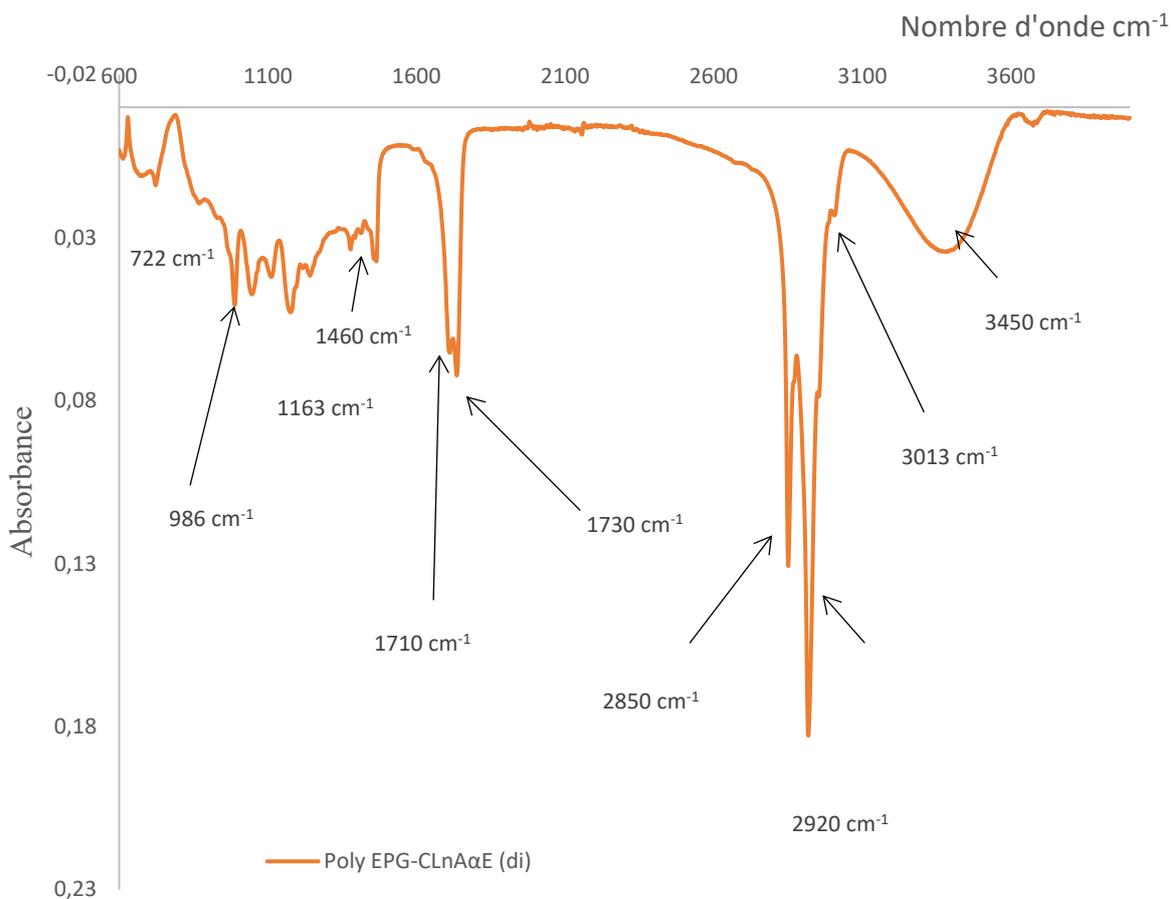


Figure 62 : Spectre ATR-IRTF du milieu réactionnel après 4 h de réaction d'EPG-αE(Di) à 70°C sous air à un débit de 1,2L/min

Les valeurs des différentes bandes caractéristiques des fonctions déterminées par analyse ATR-IRTF du substrat EPG-CLnA αE (mono) avant et après réaction sont rassemblées dans le **Tableau 35**.

Chapitre 4

Tableau 35 Comparaison de l'évolution de l'empreinte des CLnA au cours de la polymérisation de l'EPG-CLnA α E(Di)

Zones	EPG-CLnA α E (mono)		Poly EPG-CLnA α E(mono)		Attribution
	μ (cm^{-1})	Intensité	μ (cm^{-1})	Intensité	
(500-1000 cm^{-1})	722	Faible	722	Faible	Déformation, C-H
	986	Forte	986	Faible	Elongation HC=CH
(1000-1500 cm^{-1})	1163	Moyenne	1162	Moyenne	Elongation C-O
	1457	Moyenne	1457	Moyenne	Déformation C-H, CH ₃
(1600-1800 cm^{-1})	1710	Faible	1710	Faible	Elongation C=O acide
	1730	Forte	1730	Forte	Elongation C=O ester
(2800-3100 cm^{-1})	2853	Forte	2854	Forte	Elongation CH
	2920	Forte	2923	Forte	
	3013	Fine	3013	Faible	Elongation HC=CH
(3100-4000 cm^{-1})	3450	Forte	3450	Forte	Elongation OH

Chapitre 4

Les spectres ATR-IRTF des substrats (EPG-CLnA α E(mono-), EPG-CLnA α E(di-)) et des produits après la polymérisation (Poly EPG-CLnA α E(mono-), Poly EPG-CLnA α E(di-)) peuvent être divisés en 5 zones de bandes d'absorption caractéristiques.

- la zone (1000-500 cm^{-1}) est caractéristique des élongations HC=CH et des déformations (CH)_n, avec n supérieure à 4.
- la zone (1500-1200 cm^{-1}) est caractéristique des élongations C-O et des déformations C-H.
- la zone (1720-1600 cm^{-1}) correspond aux élongations C=O de la fonction acide avec de forte intensité.
- la zone (1740-1720 cm^{-1}) correspond aux fréquences μ (C=O) de la fonction ester de forte intensité.
- la zone (3100-2700- cm^{-1}) correspond aux élongations des C-H pour les chaînes saturées et insaturées.
- la zone (3700-3100 cm^{-1}) correspond aux élongations des O-H. Dans le cas de EPG-CLnA α E(mon) et de EPG-CLnA α E(Di) cette zone à une bande d'absorption (3450 cm^{-1}) à forte intensité du fait de la présence de OH sur la structure des diglycérides (1 OH) et des monoglycérides 2 (OH).

La polymérisation de EPG-CLnA α E (mono-) et EPG-CLnA α E(di-) à 70°C sous air, quel que soit le profil glycérique est liée à la disparition des doubles liaisons *trans* conjuguées ($\mu = 986 \text{ cm}^{-1}$) des CLnA dans le milieu. Les résultats montrent que la bande d'absorption des doubles liaisons de configuration *cis* à $\mu = 3013 \text{ cm}^{-1}$) diminue également au cours de la polymérisation.

Cela traduit le fait que les liaisons *cis* dans les CLnA de EPG-CLnA α E (mono-) et EPG-CLnA α E(di-) sont consommées. Le suivi de la réaction de polymérisation de EPG-CLnA α E (mono-) et EPG-CLnA par ATR-IRTF montrent clairement que les fonctions OH ne sont pas impliquées

Chapitre 4

2.3.6.3. Suivi cinétique de la polymérisation des EPG par ATR-IRTF

Le suivi cinétique de la consommation des doubles liaisons trans conjuguées dans la série de polymérisation des EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) (mono- ou di-) à 70°C en présence d'air (1,2 L/mm) est représenté par les courbes, **Figure 63**.

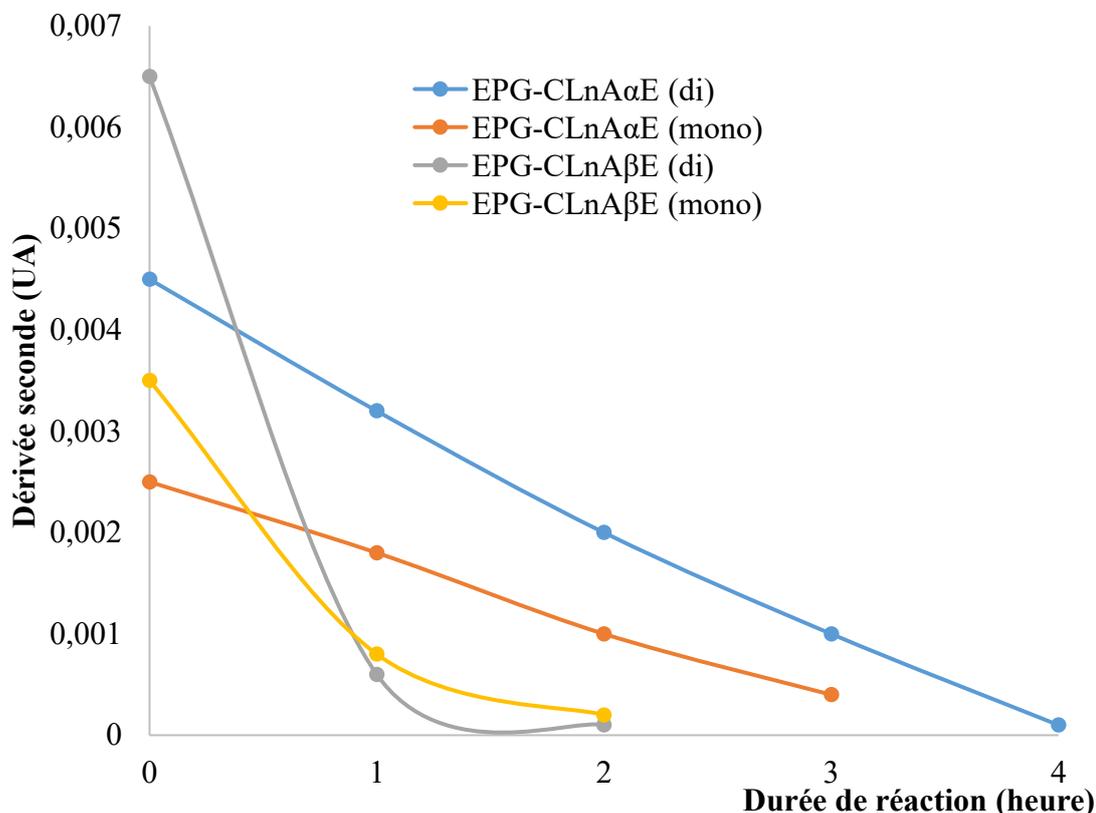


Figure 63: Suivi cinétique de l'évolution de la dérivée seconde en ATR-IRTF de l'empreinte des CLnA pour les différents EPG-CLnA à 70°C sous air (1,2L/min)

En présence de l'air à 70°C, les EPG-CLnA (EPG-CLnA α E (mono), EPG-CLnA α E (di), EPG-CLnA β E (mono), EPG-CLnA β E (di)) polymérisent comme confirmé par rhéologie. L'allure des courbes présentées sur la **Figure 63** dépend fortement de la composition en CLnA.

La hauteur de la dérivée seconde négative de l'empreinte des CLnA μ (986 cm^{-1}) dans EPG-CLnA β E (di), EPG-CLnA β E (mono), EPG-CLnA α E (di) et EPG-CLnA α E (mono) diminue au cours de la réaction de polymérisation.

Chapitre 4

Cette diminution de la hauteur de la dérivée seconde négative confirme la consommation des doubles liaisons conjuguées des CLnA au cours du temps.

L'application de la méthode intégrale de la loi cinétique de Van't Hoff, la dérivée seconde d'EPG-CLnA α E (mono ou di)] = f(t) d'ordre 0 et ln (dérivée seconde d'EPG-CLnA β E (mono ou di) = f(t) d'ordre 1 donnent les courbes représentées sur les figures suivantes :

La **Figure 64** représente la loi cinétique de la dérivée seconde d'EPG-CLnA α E (mono ou di) = f(t) et la **Figure 65** la loi cinétique ln (dérivée seconde d'EPG-CLnA β E (mono ou di)] = f(t).

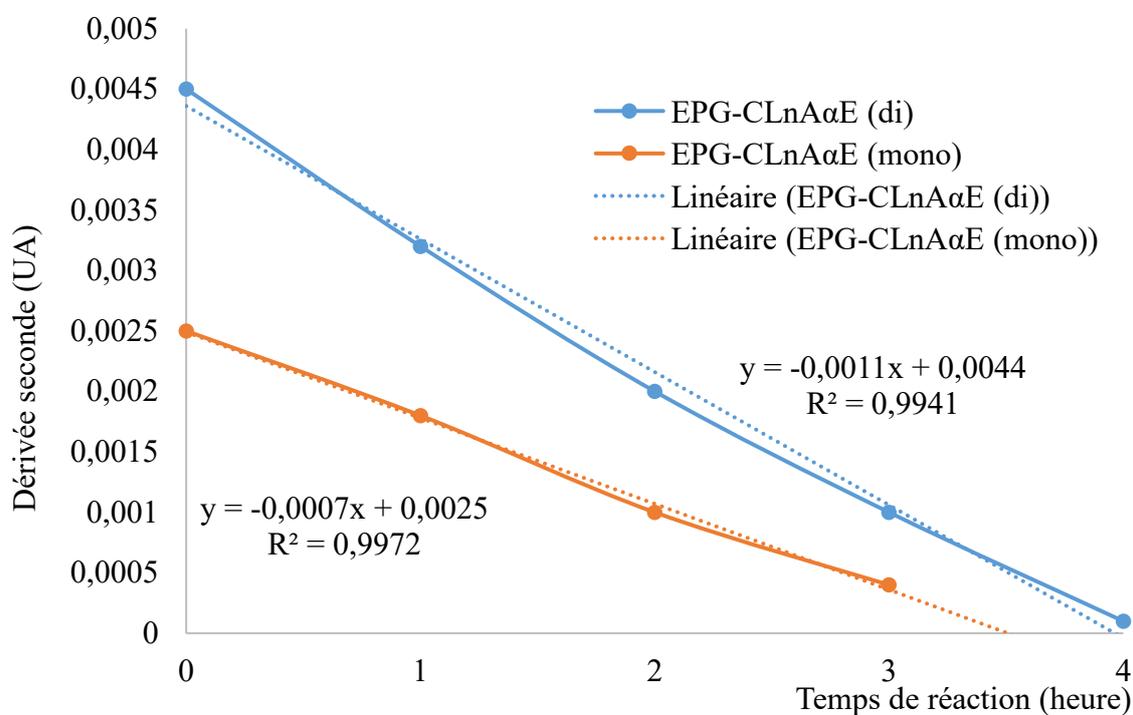


Figure 64: Évolution de la dérivée seconde d'EPG-CLnA α E (mono ou di) au cours de la réaction de polymérisation sous air

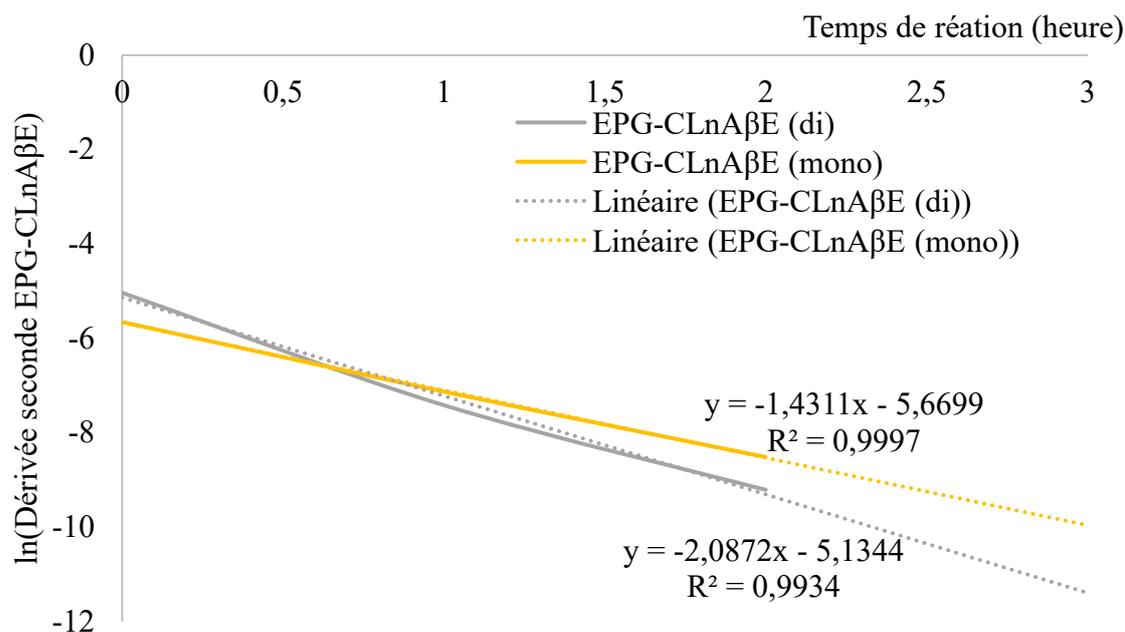


Figure 65: Évolution de $\ln(\text{Dérivée seconde d'EPG-CLnA } \beta\text{E (mono ou di)})$ au cours de la réaction de polymérisation sous air

La constante de vitesse et l'ordre partiel de chaque réaction ont été estimés graphiquement à partir des courbes de l'évolution de la hauteur de la dérivée seconde négative des bandes d'absorption des doubles liaisons conjuguées μ (986 cm^{-1}) en fonction du temps de réaction. Les EPG-CLnA n'ont pas la même constante de vitesse de consommation et le même ordre de réaction. Ces paramètres sont étroitement liés au profil acides gras polyinsaturés conjugués en particulier la teneur en acide α -éléostéarique versus l'acide β -éléostéarique.

Les EPG-CLnA riches en acide α -éléostéarique à EPG-CLnA αE (diglycériques) et EPG-CLnA αE (mono) présentent des courbes d'évolution de la dérivée seconde d'EPG-CLnA αE (monoglycériques ou diglycériques) $= f(t)$ linéaires (droites) avec des constantes de vitesse $11 \times 10^{-4} \text{UA.h}^{-1}$ et un ordre partiel de réaction de 0 pour EPG-CLnA αE (di).

La constante de vitesse de EPG-CLnA αE (mono) est de $7 \times 10^{-4} \text{UA.h}^{-1}$ avec un ordre partiel de réaction de 0.

Chapitre 4

En revanche, les EPG-CLnA riches en acide β -oléostéarique (EPG-CLnA β E (di) et EPG-CLnA β E (mono) présentent des courbes d'évolution de la dérivée seconde d'EPG-CLnA β E (monoglycérides ou diglycérides) = $f(t)$ logarithmique (courbe de concavité dirigée vers le haut). Le tracé de \ln (dérivée seconde d'EPG-CLnA β E (monoglycérides ou diglycérides) = $f(t)$) donne des droites.

A partir de ces droites, les paramètres cinétiques sont déterminés. Ainsi, la constante de vitesse est de $1431,1 \times 10^{-3} \text{ UA.h}^{-1}$ pour EPG-CLnA β E (mono) avec un ordre partiel de réaction de 1 et une constante de vitesse de $2087,2 \times 10^{-3} \text{ UA.h}^{-1}$ avec un ordre partiel de 1 pour EPG-CLnA β E (di). Les esters partiels de glycérol riches en l'acide β -oléostéarique réagissent plus rapidement que ceux riches en acide α -oléostéarique.

La constante de vitesse de la réaction de la polymérisation de ces échantillons (EPG) est fonction de la composition des substrats en CLnA (acides α -oléostéarique et β -oléostéarique). Par contre, le temps de la réaction de polymérisation est fortement lié au profil glycérique (mono et di) des différents substrats **Tableau 36**

Tableau 36: Paramètres cinétiques de la polymérisation de EPG-CLnA sous air.

Substrats	Mélange : mono-di	k (UA.h ⁻¹)	Ordre partiel de réaction
EPG-CLnA α E (di)	30-60	11×10^{-4}	0
EPG-CLnA α E (mono)	61-30	7×10^{-4}	0
EPG-CLnA β E (di)	25,5-63	$2087,2 \times 10^{-3}$	1
EPG-CLnA β E (mono)	63-26	$1431,1 \times 10^{-3}$	1

Ces différents résultats montrent que l'enrichissement des EPG-CLnA en acide β -oléostéarique augmente la vitesse de la réaction de polymérisation.

Chapitre 4

Les EPG-CLnA β E sont plus réactifs que les EPG-CLnA α E. Dans les deux cas de polymérisation de EPG-CLnA α E (mono ou di) et de EPG-CLnA β E (mono ou di) la polymérisation des EPG-CLnA (di) est plus rapide que celle de EPG-CLnA (mono) comme le montre le **Tableau 36**.

L'augmentation de degré de substitution (DS) des CLnA sur le glycérol favorise le rapprochement de fonctions réactives (trois doubles liaisons conjuguées) et augmente ainsi la cinétique dans les deux cas de polymérisation de EPG-CLnA α E (mono ou di) et de EPG-CLnA β E (mono ou di).

2.3.7. Analyse des composés non extractibles des milieux réactionnels (matière solide)

La teneur en matière solide non extractible au tert-butyle méthyle éther (TBME), des différents milieux réactionnels à la fin des réactions, a été déterminée et regroupée dans le **Tableau 37**.

Tableau 37: Pourcentages des extractibles et des non extractibles des polymères

Polymérisation	Polymères	Matière extractible (%)	Matière solide %
Sous azote	Poly EGP-CLnA β E (mono)	39,5	60,5
	Poly EGP-CLnA β E (di)	34,7	65,3
Sous oxygène	Poly EGP-CLnA α E (mono)	27,8	72,2
	Poly EGP-CLnA α E (di)	21,2	78,8
	Poly EGP-CLnA β E (mono)	15,7	84,3
	Poly EGP-CLnA β E (di)	12,6	87,4

Chapitre 4

Les résultats montrent clairement que la teneur en matière solide augmente lors de la polymérisation sous air. Les teneurs en matière solide les plus faibles sont obtenues pour Poly EGP-CLnA β E (mono) (60,5%) et Poly EGP-CLnA β E (di) (65,5%) synthétisés sous atmosphère inerte d'azote. Les teneurs en matière solide les plus élevées sont obtenues avec les polymères synthétisés sous air.

Ainsi, pour Poly EGP-CLnA α E (mono) la teneur est de 72,2%, de 78,8 % pour Poly EGP-CLnA α E (di), de 84,3% pour Poly EGP-CLnA β E (mono) et de 87,4% Poly EGP-CLnA β E (di).

Ces résultats suggèrent que la polymérisation des substrats issus de l'huile brute et de l'huile brute modifiée conduit à la formation de polymères de très hautes masses moléculaires qui ne sont pas analysables par chromatographie d'exclusion stérique et que l'on considère donc comme des polymères de masses moléculaires supérieures à celles mesurables par chromatographie d'exclusion stérique.

Les résultats de polymérisation du Poly EGP-CLnA β -éléostéarique sous air par rapport à l'essai sous azote (tableau 39) montrent clairement que le mécanisme de Diels-Alder est privilégié. C'est la raison fondamentale pour laquelle les polymères solides identifiés dans ce tableau comme matière solide se forment en quantité importante.

2.3.8. La masse moléculaire et la concentration macromolécule dans les extractibles des polymères

Pour illustrer les analyses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) nous avons choisi les chromatogrammes des polymères : Poly EGP-CLnA α E (di). La **Figure 66** montre le chromatogramme obtenu après analyse SEC de poly EGP-CLnA α E (di).

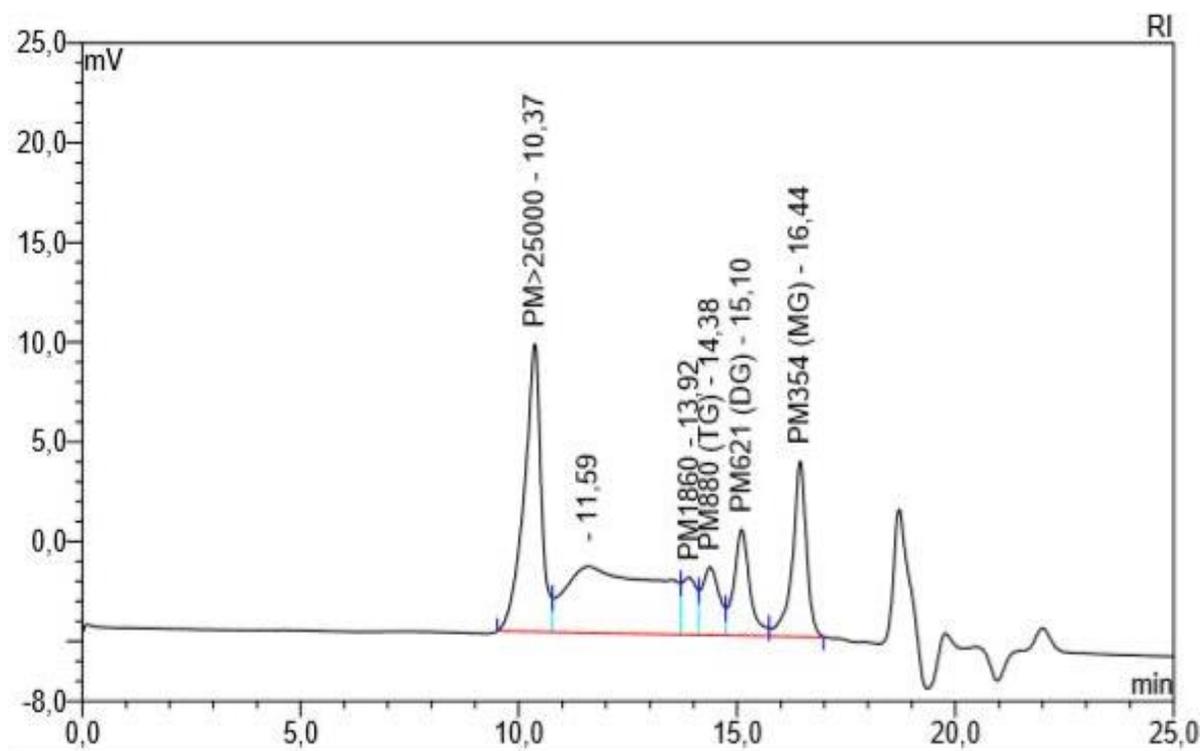


Figure 66: Chromatogramme CPG de poly EPG-CLnA α E (di)

Le chromatogramme du produit poly EPG-CLnA α E (di) indique la formation de trois groupes de polymères différents.

Nous avons des polymères de masse moléculaire supérieure à 25000 g/mol avec un temps de rétention de 10,37 minutes. Le deuxième groupe avec des PM compris entre 1860 et 25000 g/mol et des polymères de PM 1860 g/mol avec un temps de rétention de 13,92 minutes.

Les valeurs de la masse moléculaire moyen (M_w), et de la concentration des macromolécules des polymères à base d'huile de *Ricinodendron heudelotii* dans les extractibles sont données dans le **Tableau 38** et **Tableau 39**

Chapitre 4

Tableau 38: Répartition des masses moléculaires et concentration en macromolécule des polymères de EGP-CLnA β E obtenus sous atmosphère inerte à 70°C contenus dans les extractibles

Polymères	Masse moléculaire	Concentration en macromolécule %
	>25000	9 \pm 0,3
Poly EGP-CLnA β E (mono)	1860 < PM < 25000	36 \pm 0,0
	1860	5,2 \pm 0,2
	>25000	11,7 \pm 0,1
Poly EGP-CLnA β E (di)	1860 < PM < 25000	35 \pm 0,1
	1860	4,6 \pm 0,2

Tableau 39 : Répartition des masses moléculaires et concentration en macromolécule des polymères de EGP-CLnA obtenus sous air à 70°C contenus dans les extractibles

Polymères	Masses moléculaires	Concentration en macromolécule %
	>25000	15,5 \pm 0,3
Poly EGP-CLnA α E (mono)	1860 < PM < 25000	41,5 \pm 0,4
	1860	3,6 \pm 0,1
	>25000	12 \pm 0,3
Poly EGP-CLnA α E (di)	1860 < PM < 25000	28 \pm 0,1
	1860	4,4 \pm 0,4
	>25000	21,7 \pm 0,3
Poly EGP-CLnA β E (mono)	1860 < PM < 25000	45,2 \pm 0,0
	1860	6,7 \pm 0,2
	>25000	28,3 \pm 0,2
Poly EGP-CLnA β E (di)	1860 < PM < 25000	34,8 \pm 0,1
	1860	4,8 \pm 0,2

Chapitre 4

Les résultats montrent que les réactions de polymérisation des EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) conduisent à la formation d'un mélange de polymères avec des masses moléculaires différentes. En effet, les substrats EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) sont un mélange de mono, de diglycéride, acide gras avec des chaînes carbonées CLnA. Ce foisonnement de molécules polymérisables dans le milieu réactionnel augmente la probabilité de copolymérisation entre les molécules à chaînes carbonées CLnA. Il en résulte des polymères de masses moléculaires différentes.

La polymérisation de EPG-CLnA βE (mono ou di) sous atmosphère inerte à 70°C conduit majoritairement à la formation de macromolécules de masses moléculaires comprises entre 1860 et 25000 g/mol. Les extractibles de poly EPG-CLnA βE (mono) contiennent 36% en pourcentage massique de macromolécules à masses moléculaires comprises entre 1860 et 25000 g/mol et les extractibles de poly EPG-CLnA βE (di) 35%. Ces résultats montrent également la présence de macromolécules à masses moléculaires élevées, supérieures à 25000 g/mol, 9% dans les extractibles de poly EPG-CLnA βE (mono) et 11,7% dans les extractibles de poly EPG-CLnA βE (di).

L'analyse des extractibles des poly EPG-CLnA αE (mono ou di) obtenus sous air à 70°C montre que le poly EPG-CLnA αE (mono) est composé de 41,5% de polymères à masses moléculaires comprises entre 1860 et 25000 g/mol et de 15,5% de polymères à masses moléculaires supérieures à 25000 g/mol. De même, dans le cas du poly EPG-CLnA αE (di), les extractibles sont composés de 28% de polymères à masses moléculaires comprises entre 1860 et 25000 g/mol et 12% de polymères supérieur à 25000 g/mol.

L'analyse des extractibles des poly EPG-CLnA βE (mono ou di) permet de déduire que les extractibles de poly EPG-CLnA βE (mono) sont composés de polymères à masses moléculaires comprises entre 1860 à 25000g/mol et de polymères à masses moléculaires supérieures à 25000g/mol respectivement 45,2 et 21,7 %.

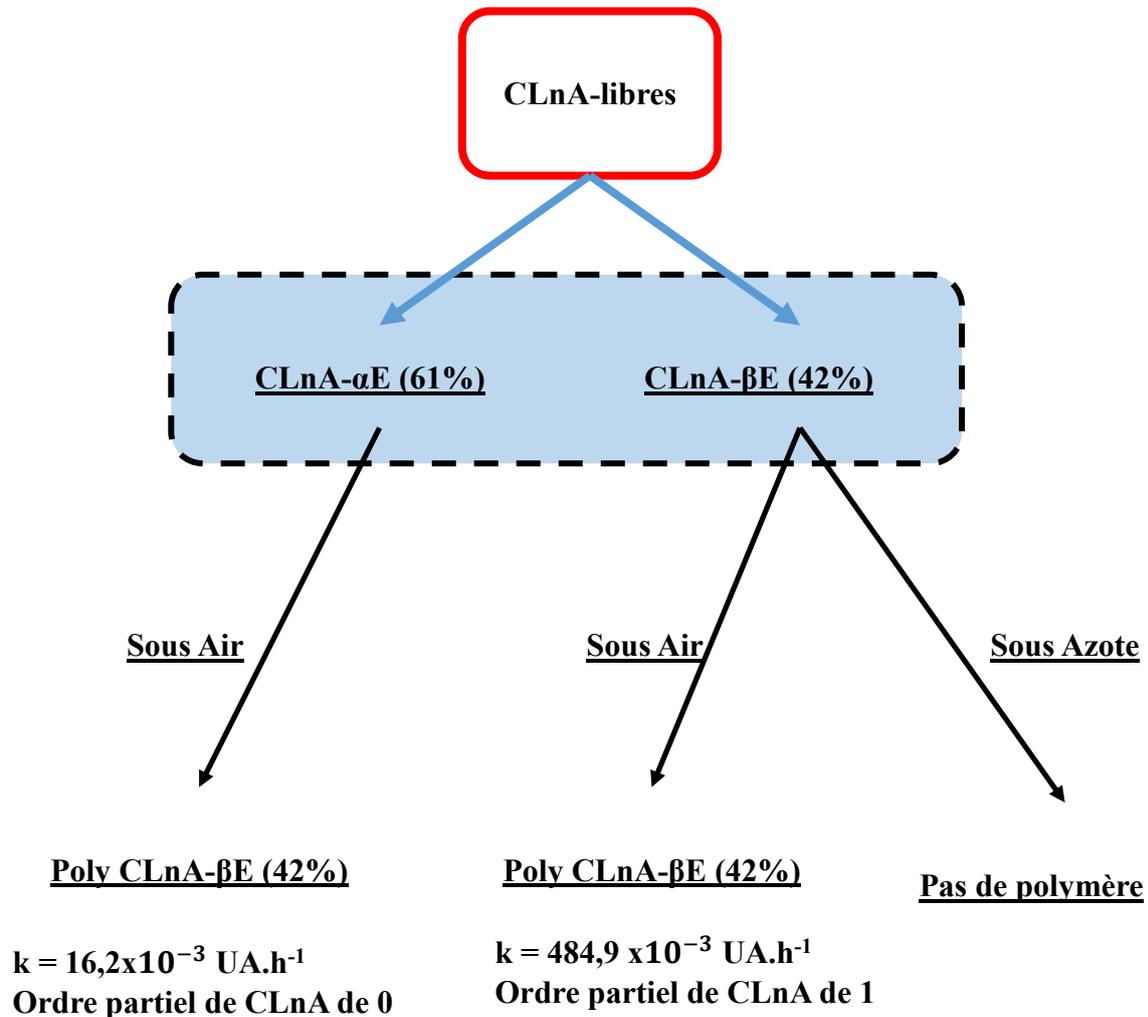
Les extractibles de poly EPG-CLnA βE (di) contiennent 34,8% de polymères à masses moléculaires comprises entre 1860 à 25000 g/mol et de 28,3 % de macromolécules à masses moléculaires supérieures à 25000 g/mol.

Chapitre 4

L'étude des extractibles par analyse SEC montre qu'il existe deux groupes de macromolécules majeurs ; des macromolécules à masses moléculaires comprises entre 1860 à 25000g/mol et des masses moléculaires supérieures à 25000 g/mol.

Résumé graphique des réactions de polymérisation

– Polymérisation des CLnA-libres

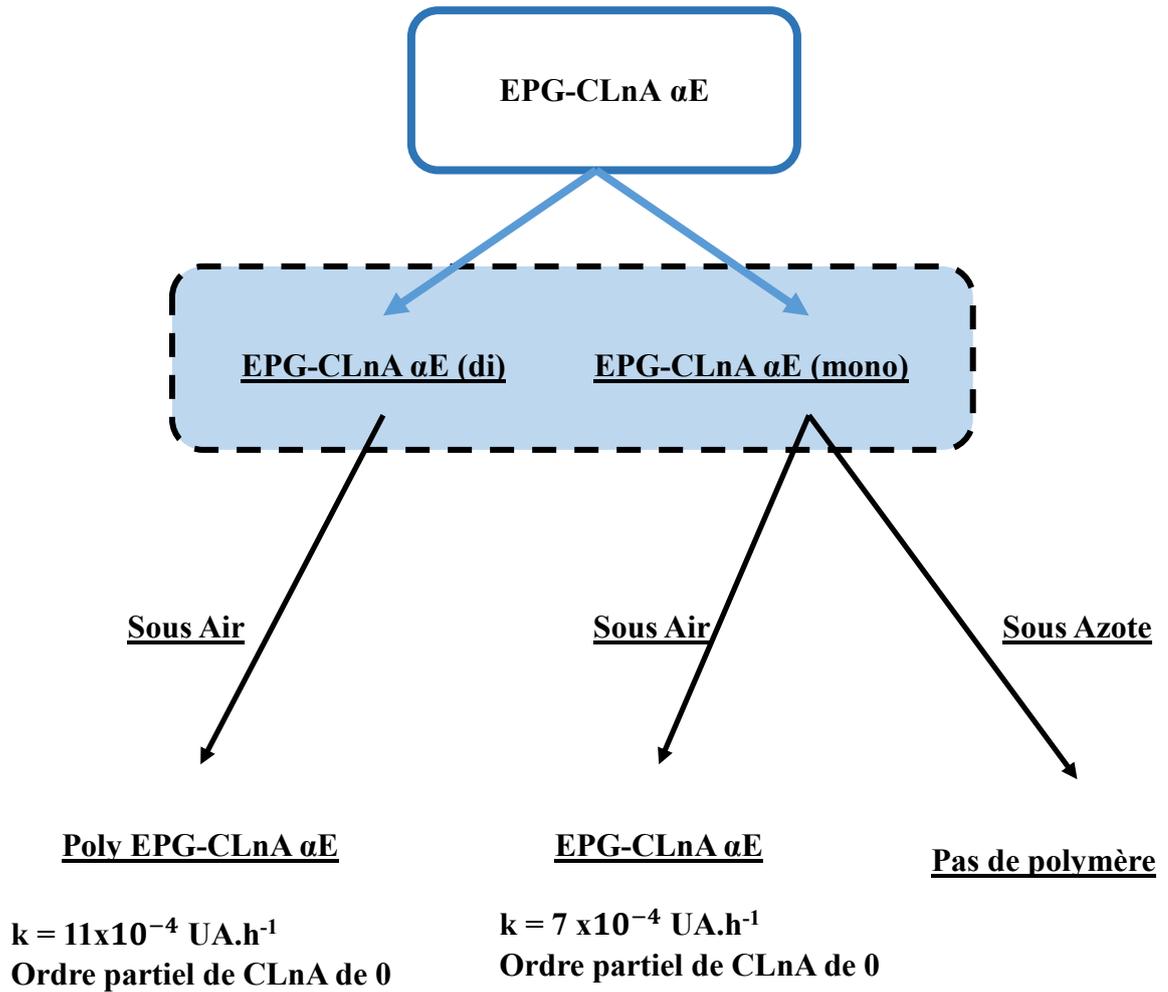


Les CLnA-libres ne polymérisent pas sous atmosphère inerte

Les CLnA Δ E (α ou β) polymérisent sous air à 70°C avec des cinétiques différentes.

–

– Polymérisation des EPG-CLnA α E (di ou mono)

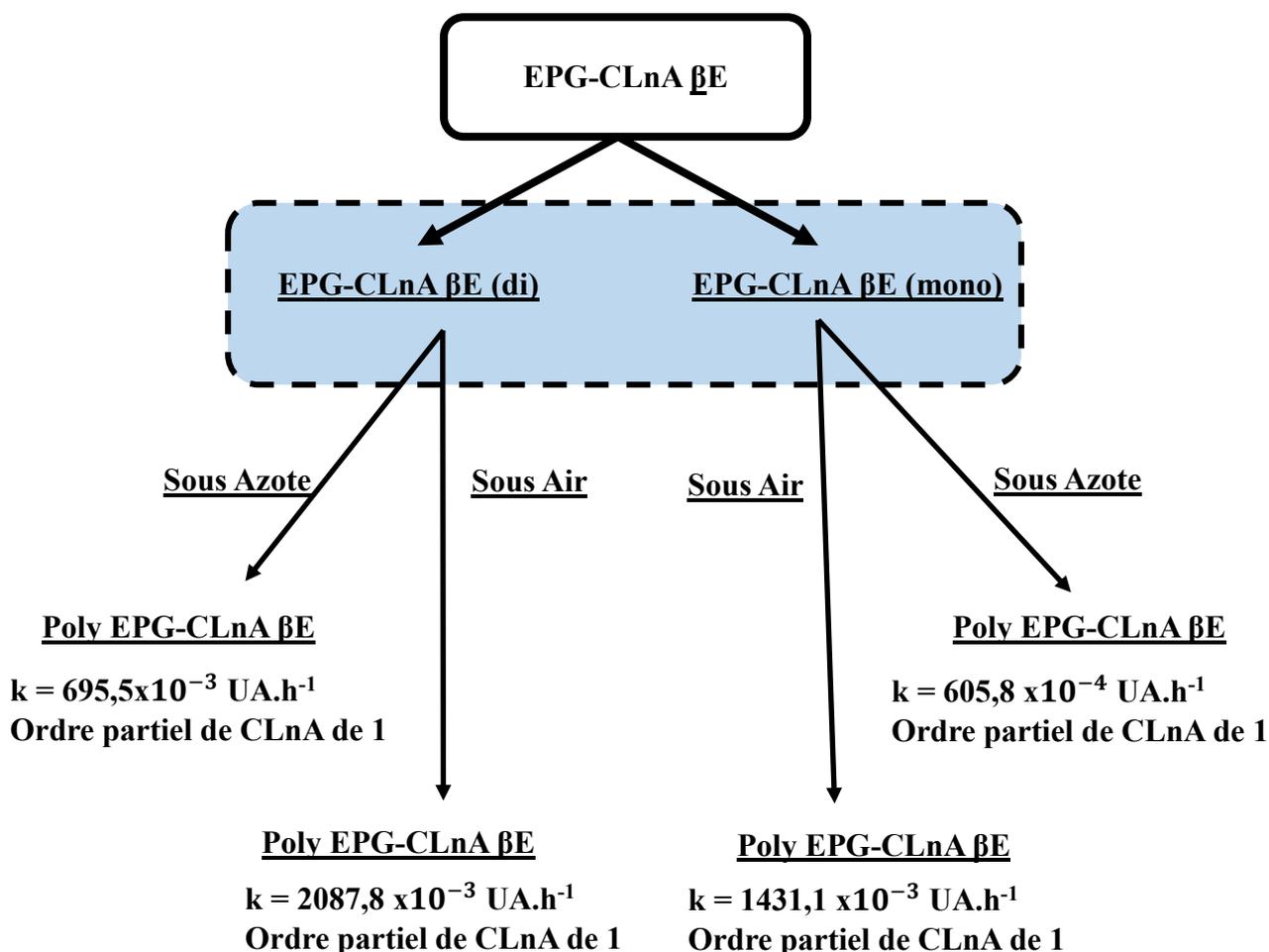


Les EPG-CLnA α E (diglycérides ou monoglycérides) ne polymérisent pas sous atmosphère inerte

Les EPG-CLnA α E (diglycérides ou monoglycérides) polymérisent sous air avec des cinétiques différentes

Chapitre 4

– Polymérisation des EPG-CLnA β E (diglycérides ou monoglycérides)



Les EPG-CLnA β E (di ou mono) polymérisent sous atmosphère inerte ou sous air avec des cinétiques différents

2.3.9. Analyse des extractibles des milieux réactionnels

Les différents EPG-CLnA issus des acides gras libres de l'huile brute et de l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii* utilisés pour la synthèse des polymères sont composés, en plus des CLnA, d'acide linoléique entre 21-25 % et d'acide oléique entre 6-8%.

Des études ont montré que du fait de la présence des doubles liaisons, ces acides polymérisent sous l'action de températures élevées et en présence de l'oxygène de l'air [97,98].

Chapitre 4

Pour s'assurer du rôle que joue ces acides gras présents dans le milieu réactionnel, l'étude de l'évolution de leur concentration au cours de la polymérisation a été réalisée à travers l'analyse des extractibles des milieux réactionnels.

Les résultats des analyses des profils acides gras des extractibles des polymères synthétisés à partir des substrats EPG-CLnA α E (mono), EPG- CLnA α E (di), EPG- CLnA β E (mono) et EPG- CLnA β E (Di) sont regroupés dans **le Tableau 40, Tableau 41, Tableau 42 et Tableau 43** .

Les acides palmitique C16:0 et stéarique C18:0 dans l'huile de *Ricinodendron heudelotii* ne participent pas à la polymérisation. Cela s'explique par l'absence de sites polymérisables sur les chaînes de ces acides gras saturés. Le (palmitique/stéarique) reste constant tout au long des réactions, autour de la valeur de 0,8, cela quel que soit le substrat polymérisé. L'implication de l'acide oléique et de l'acide linoléique dans les réactions de polymérisation peut être vérifiée en utilisant l'acide stéarique et l'acide palmitique comme étalons internes.

Le **Tableau 40** résume le profil acides gras des extractibles des prélèvements du milieu réactionnel de la réaction de polymérisation de l'EPG- CLnA α E (mono). Les rapports, acide oléique/AGS = 0,7 et acide linoléique/AGS = 2,4 restent inchangés pendant les 3 heures de réaction. Par contre, le rapport CLnA/AGS = 7,3 en début de réaction diminue jusqu'à atteindre la valeur de 0,2.

Chapitre 4

Tableau 40 : Extractibles du polymère EPG- CLnA α E (monoglycérides)

Profil acide gras (%)	EPG- CLnA α E (monoglycérides)			
	0h	1h	2h	3h
Acide palmitique C16:0	3,1 \pm 0,1	6,1 \pm 0,1	8,9 \pm 0,1	9,6 \pm 0,2
Acide stéarique C18:0	5,4 \pm 0,0	7,2 \pm 0,0	11 \pm 0,0	13,4 \pm 0,0
Acide oléique C18:1	6,3 \pm 0,2	10,8 \pm 0,2	14,2 \pm 0,2	17,3 \pm 0,1
Acide linoléique C18:2	23 \pm 0,1	31,2 \pm 0,1	46,5 \pm 0,1	55,4 \pm 0,1
Acide α -éléostéarique C18:3n-5	61,1 \pm 0,1	43,9 \pm 0,1	19,3 \pm 0,2	4,6 \pm 0,0
Acide catalpique C18:3n-5	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0
Acide β -éléostéarique C18:3n-5	1,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2	0 \pm 0,0	0 \pm 0,0
AGS	8,5	13,3	19,9	23
CLnA	62,2	44,8	19,3	4,6
Acide oléique/AGS	0,7	0,8	0,7	0,8
Acide linoléique/AGS	2,7	2,3	2,3	2,4
CLnA/AGS	7,3	3,4	1,0	0,2

Le **Tableau 41** résume le profil acides gras et des rapports entre les acides gras contenus dans les extractibles des prélèvements du milieu réactionnel de la réaction de polymérisation de l'EPG- α E (di).

Les rapports, acide oléique/AGS (0,8) et acide linoléique/AGS (2,5) restent inchangés jusqu'à la fin de la réaction (4 heures). Par contre, le rapport CLnA/AGS (6,7) au début de la réaction diminue jusqu'à atteindre la valeur de 0,2.

Chapitre 4

Tableau 41 : Extractibles du polymère EPG- CLnA α E (diglycérides)

Acides gras (%)	EPG- CLnA α E (diglycérides)				
	0h	1h	2h	3h	4h
Acide palmitique C16:0	4,2±0,1	5,4±0,2	8,6±0,2	9,1±0,0	10,3±0,1
Acide stéarique C18:0	4,8±0,1	7,1±0,1	9,8±0,1	12,7±0,1	12,7±0,2
Acide oléique C18:1	7,6±0,0	11±0,2	13,1±0,1	15±0,2	19,5±0,1
Acide linoléique C18:2	22,2±0,1	29,4±0,2	42,9±0,2	50,4±0,1	53±0,0
Acide α -éléostéarique C18:3n-5	60±0,1	46,4±0,1	25,7±0,1	12,6±0,1	4,1±0,1
Acide catalpique C18:3n-5	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0	0±0,0
Acide β -éléostéarique C18:3n-5	1,2±0,1	0,9±0,1	0±0,0	0±0,0	0±0,0
AGS	9	12,5	18,4	21,8	23
CLnA	61,2	47,3	25,7	12,6	4,1
Acide oléique/AGS	0,8	0,9	0,7	0,7	0,8
Acide linoléique/AGS	2,5	2,4	2,3	2,3	2,3
CLnA/AGS	6,7	3,7	1,4	0,6	0,2

Chapitre 4

Tableau 42 : Extractibles du polymère EPG- CLnA β E (mono)

Acide gars (%)	EPG- CLnA β E (mono)		
	0 heure	1 heure	2 heures
Acide palmitique C16:0	4,5 \pm 0,0	8,6 \pm 0,2	9,1 \pm 0,1
Acide stéarique C18:0	5 \pm 0,1	10,1 \pm 0,2	13,1 \pm 0,2
Acide oléique C18:1	8,1 \pm 0,1	15,0 \pm 0,0	21,2 \pm 0,1
Acide linoléique C18:2	24,4 \pm 0,2	46,8 \pm 0,1	54,2 \pm 0,1
Acide α -éléostéarique C18:3n-5	8,1 \pm 0,0	3,0 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2
Acide catalpique C18:3n-5	8,2 \pm 0,1	3,5 \pm 0,2	1 \pm 0,1
Acide β -éléostéarique C18:3n-5	41,7 \pm 0,1	13,0 \pm 0,1	0 \pm 0,0
AGS	9,5	18,7	22,2
CLnA	58	19,5	2,4
Acide oléique/AGS	0,9	0,8	1,0
Acide linoléique/AGS	2,6	2,5	2,4
CLnA/AGS	6,1	1,0	0,1

Le **Tableau 42** résume le profil acides gras et les rapports entre ces acides gras des extractibles des prélèvements du milieu réactionnel de la réaction de polymérisation de l'EPG-CLnA β E (mono).

Les rapports, acide oléique/AGS = 0,9 et acide linoléique/AGS = 2,6 restent inchangés pendant les 2 heures de réaction. Par contre, le rapport CLnA/AGS = 6,7 au début de la réaction diminue jusqu'à atteindre la valeur de 0,1.

Chapitre 4

Le **Tableau 43** résume le profil acides gras et des rapports entre ces acides de l'extractible des prélèvements du milieu réactionnel de la réaction de polymérisation de l'EPG- CLnA βE (di). Les rapports acides oléique/AGS = 0,9 et acide linoléique/AGS = 2,6 restent inchangés pendant les 2 heures de réaction. Par contre, le rapport CLnA/AGS = 5,9 au début de la réaction diminue pour atteindre une valeur très faible.

Tableau 43 : Extractibles du polymère EPG-βE (di)

Profil acide gras (%)	EPG- CLnA βE (di)			
	0h	1h	2h	3h
Acide palmitique C16:0	4,7±0,1	7,8±0,2	9,6±0,1	11,1±0,1
Acide stéarique C18:0	5,2±0,1	8,9±0,0	11,1±0,1	11,7±0,1
Acide oléique C18:1	8,1±0,0	14,9±0,1	16,6±0,1	19±0,1
Acide linoléique C18:2	23,9±0,1	39,8±0,1	51,7±0,0	57,1±0,1
Acide α-éléostéarique C18:3n-5	7,7±0,2	6,5±0,1	3±0,2	0±0,0
Acide catalpique C18:3n-5	8,1±0,1	6,2±0,1	3,1±0,1	1,1±0,1
Acide β-éléostéarique C18:3n-5	42,3±0,2	15,9±0,2	5±0,1	0±0,0
AGS	9,9	16,7	20,7	22,8
CLnA	58,1	28,6	11,1	1,1
Acide oléique/AGS	0,8	0,9	0,8	0,8
Acide linoléique/AGS	2,4	2,4	2,5	2,5
CLnA/AGS	5,9	1,7	0,5	0,0

L'étude des rapports acide linoléique/AGS et acide oléique/AGS en début et à la fin de toutes les réactions de polymérisation des substrats EPG- CLnA αE (mono), EPG- CLnA αE (di), EPG- βE (mono) et EPG- CLnA βE (di) montre que l'acide oléique et l'acide linoléique ne polymérisent pas dans ces conditions opératoires.

Chapitre 4

Ces acides gras restent en l'état dans le milieu. Ils agissent comme diluants diminuant ainsi la viscosité sans participer à la polycondensation.

Le profil acides gras des extractibles des milieux réactionnels permet de confirmer clairement que les acides polyinsaturés conjugués CLnA, l'acide α -éléostéarique, β -éléostéarique et catalpique sont consommés pendant la polymérisation.

En effet, quel que soit l'échantillon EPG-CLnA utilisé, le rapport entre les acides gras saturés et les acides gras polyinsaturés conjugués à trois doubles liaisons (AGS/CLnA) diminue de façon considérable au cours de la réaction de polymérisation. Pour EPG- CLnA α E (mono), et EPG- CLnA α E (di), ce rapport passe de 6,8 à 0,2. Ce rapport diminue de 6,1 à 0,1 pour les substrats EPG-CLnA β E (mono) et EPG-CLnA β E (di). Ces résultats confirment ceux obtenus par les analyses ATR-IRTF, la polymérisation des EPG issus de l'huile brute et de l'huile brute modifiée est liée à la disparition des trois doubles liaisons conjuguées des CLnA.

Le suivi cinétique de la réaction de polymérisation à partir de l'analyse CPG des extractibles des différents milieux réactionnels résumée dans les **Tableaux 42, 43, 44, et 45** ont permis l'étude du comportement des CLnA par rapport aux acides gras saturés.

A partir des données CPG, les courbes CLnA/AGS=f(t) ont été tracées (**Figure 67**).

Chapitre 4

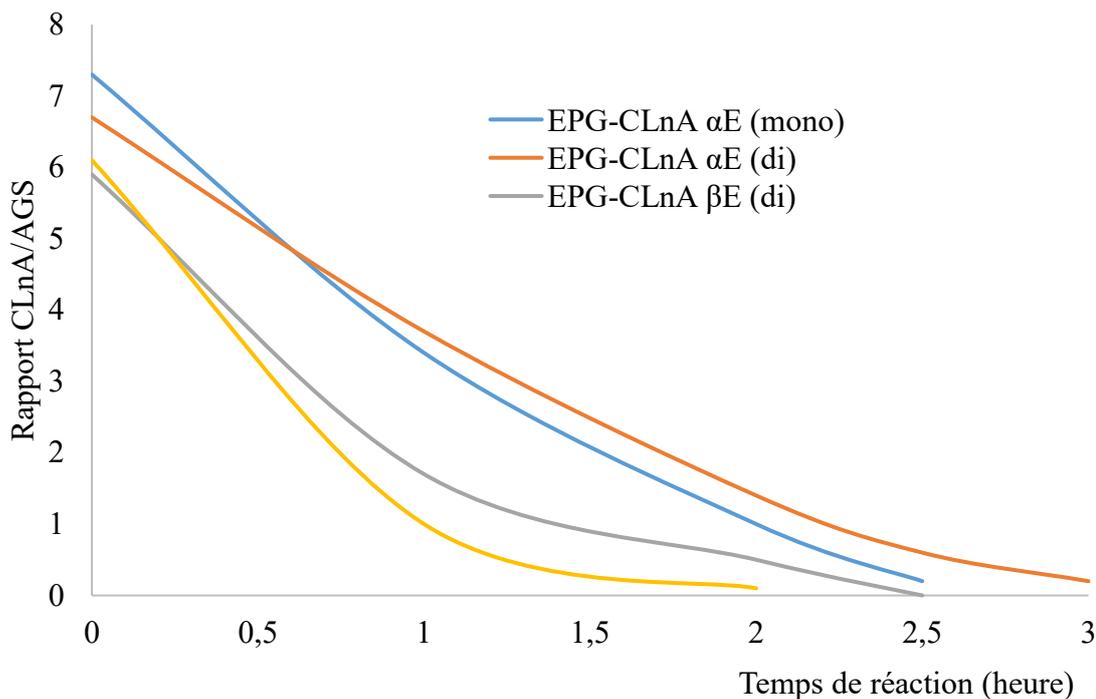


Figure 67: Evolution du rapport CLnA/AGS dans les extractibles en fonction du temps de réaction

L'allure des courbes $CLnA/AGS=f(t)$ montre que la variation du rapport CLnA/AGS au cours de la réaction de polymérisation est fonction de la teneur en acide α -éléostéarique ou en acide β -éléostéarique. La teneur en mono ou en diglycéride de chaque substrat constitue un autre paramètre qui influence la cinétique.

Les substrats riches en acide α -éléostéarique, EPG-CLnA α E (mono ou di) ont une cinétique linéaire alors que les substrats riches en acide β -éléostéarique, EPG-CLnA β E (mono ou di) ont une cinétique log arythmique. La méthode intégrale de la loi cinétique permet de déterminer les constantes de vitesse de l'évolution des CLnA/AGS, **Tableau 44**.

Chapitre 4

Tableau 44: Constantes de vitesse de l'évolution de CLnA/AGS en fonction du temps de réaction

Substrats	Mélange : mono-di	k (h ⁻¹)
EPG-CLnA αE (di)	30-60	2,454
EPG-CLnA αE (mono)	61-30	3,400
EPG-CLnA βE (di)	25,5-63	1,234
EPG-CLnA βE (mono)	63-26	2,055

La cinétique de la réaction de polymérisation donne des constantes de vitesse de l'évolution de CLnA/AGS de 2,055 h⁻¹ pour EPG-CLnA βE (mono) et de 1,234 h⁻¹ pour EPG-CLnA βE (di). Les substrats EPG-CLnA αE (mono) et EPG-CLnA αE (di) ont des constantes de vitesse de l'évolution des CLnA/AGS respectives de 3,400 h⁻¹ et de 2,454 h⁻¹.

Les constantes de vitesse de l'évolution des CLnA/AGS montrent qu'au cours de la polymérisation, les substrats riches en CLnA-βE réagissent vite que ceux riches en CLnA-αE.

Au cours des réactions de polymérisation des différents substrats EPG-CLnA ΔE (mono ou di), les substrats riches en diglycérides dans chaque groupe réagissent plus rapidement que les substrats riches en mono. Ces résultats confirment le fait que l'augmentation du degré de substitution (DS) des CLnA sur le glycérol favorise le rapprochement de fonctions réactives (trois doubles liaisons conjuguées) et augmente ainsi la cinétique de polymérisation de EPG-CLnA αE (di) et de EPG-CLnA βE (di).

2.4.Mécanismes de polymérisation

Rappelons l'état d'acquisition de nos connaissances à ce stade d'avancement de nos travaux : sous vieillissement accéléré exposé aux UV, le comportement physique observé au niveau de l'huile est l'isomérisation des systèmes polyéniques constitués par les triglycérides ou les acides gras libres appelés CLnA-libres issus de l'huile brute et de l'huile brute modifiée de *Ricinodendron heudelotii*.

Chapitre 4

La siccativité de ces substrats polyéniques n'est pas un fait expérimental indiscutable. Par ces traitements physiques, il en résulte des huiles traitées ne faisant intervenir que l'huile ou les huiles elles-mêmes.

A l'opposé des huiles modifiées dans lesquelles on met en jeu une réaction chimique provoquant d'importantes modifications chimiques, en particulier avec des amorceurs chimiques.

Quels sont les verrous pour élaborer des composés macromolécules par la mise en œuvre de ces huiles traitées ?

- Les propriétés chimiques générales dépendent essentiellement de la nature du motif du monomère.
- Les propriétés physiques générales sont fonction du degré de polymérisation, de la structure des macromolécules et de leur assemblage. Leurs structures seront-elles cristallines, amorphes?

La première difficulté correspond à la poly moléularité. Certains faits expérimentaux permettent de lever progressivement les équivoques des réactions attendues. D'après les observations faites dans les résultats des **Tableaux 14, 15, 16 et 17** les teneurs en acide oléique, en acide linoléique exprimées par les ratios de ces acides gras saturés AGS libres par rapport à la somme des acides gras restent constantes. On en déduit que ces acides gras monoinsaturés et di-insaturés n'influencent pas sur la non-saturation de l'ensemble. Nous les considérons comme des diluants non réactifs du système.

En revanche, la teneur des CLnA-libres rapportées par rapport aux AGS graphique 35 diminue proportionnellement en fonction du temps de réaction de polymérisation. Qui plus est, les CLnA-libres ne sont pas égaux ou n'ont pas le même comportement.

Rappelons que les **CLnA « conjugated linolenic acid »** est un terme générique pour indiquer les isomères de position et géométrique de l'acide octadécatriénoïque C18:3. Les trois doubles liaisons dans les CLnA sont en positions $\Delta 9, 11, 13$ et $\Delta 8, 10, 12$ et existent à la fois dans les formes isomères géométriques *cis* et *trans*. Ces huiles traitées contiennent les CLnA suivant :

Chapitre 4

– Acide α -oléostéarique C18:3 9c, 11t, 13, des faits expérimentaux innombrables renseignent sur la réactivité des substrats les contenant sous forme de CLnA-libres ou EPG-CLnA α E (mono), EPG-CLnA α E (di) que dans les conditions d'expositions à l'air de ces substrats et sous l'apport thermique à 70°C. Aucune réactivité de ces substrats n'est détectée dans des conditions inertes.

– Acide β -oléostéarique C18:3 9t, 11t, 13 les substrats les contenant sont hautement réactifs dans des conditions inertes. En termes de comparaison cinétique, l'acide β -oléostéarique accélère la vitesse de polymérisation.

Pour les résultats obtenus en spectroscopie infrarouge, par la détermination de la hauteur de la dérivée seconde négative de la bande empreinte des fréquences des liaisons conjuguées linoléiques d'une part et par l'analyse et la caractérisation des zones des bandes caractéristiques d'absorption des chromophores « cibles », d'autre part on observe de profonds remaniements structuraux opérés par la tendance baissière marquée de la non-saturation de l'ensemble.

La disparition progressive des acides polyéniques exprimés par le ratio CLnA/AGS qui passe de 7,3 (t=0 heure) à 1,0 (t=2 heures) et à 0,2 (t=3heures) (**Tableaux 14, 15, 16 et 17**) prouve que ces remaniements structuraux sont provoqués par les CLnA-libres ou CLnA estérifiés partiellement par le glycérol avec un degré d'estérification de 1 et de 2. Etant donné que les acides oléique et linoléique restent constants, ils sont exclus du système de construction de macromolécule.

Nous sommes bien obligés de constater que nous ne sommes pas en présence d'une réaction de polymérisation, mais plutôt d'une réaction de copolymérisation entre les molécules de CLnA-libres ou CLnA-estérifiés par le glycérol appelés EPG-CLnA.

2.4.1. Polymérisation sous atmosphère inerte

Sous atmosphère inerte, l'enchaînement covalent des molécules de EPG-CLnA va se faire selon le mécanisme de la réaction de Diels-Alder. Dans ces conditions, seuls les substrats contenant l'acide β -oléostéarique (9t, 11t, 13t) subissent la réaction de copolymérisation.

Chapitre 4

Cas de β -éléostéarique dans EPG-CLnA β E

Ces structures contribuent à la diminution de la non-saturation de l'ensemble. Il reste à chaque fois une ou deux doubles liaisons sur la ou les chaînes latérales qui réagira ou réagiront avec une autre molécule de β -éléostéarique. Des possibilités de formation des macromolécules sous formes de tétramères, pentamères voire plus sont offertes.

Sous atmosphère inerte, les résultats expérimentaux militent en faveur de la réaction des EPG-CLnA β E (mono) et EPG-CLnA β E (di) contenant l'acide β -éléostéarique. Sachant que les EPG-CLnA β E (mono) sont représentés par deux formes 1-mono et 2-mono et les EPG-CLnA β E (di) sont représentés par trois formes 1,2-di, 1,2-di et 2,3-di, il y a possibilité de croissance macromoléculaire d'aspect linéaire et/ou ramifié. Ces croissances permettront un accroissement de la masse moléculaire. Le CLnA- β E étant trifonctionnel, un réseau macromoléculaire tridimensionnel est attendu. Les polymères obtenus sont des gels flexibles partiellement solubles dans de THF et dans du benzène.

Un fait expérimental irréfutable est la destruction partielle des chaînes d'acides polyéniques qui a été démontrée par les analyses ART-IRTF. En effet, l'analyse ATR-IRTF des polymères ont montré que les bandes à 986 et 3010 cm^{-1} caractéristiques des trois doubles liaisons conjuguées des CLnA disparaissent au cours de la réaction de polymérisation, ce qui confirme la destruction des liaisons polyéniques des CLnA.

On peut conclure que ce n'est que dans la structure des esters partiels de glycérol que le site *trans* issu de l'isomérisation du site *cis* de α -éléostéarique démontre son rôle de réactif dans l'ensemble des 3 glycérides qui permettent l'obtention d'un réseau. Nous définissons ainsi des réseaux macromoléculaires tridimensionnels structurés totalement inédits.

Des enchainements linéaires et cycliques s'opèrent à cause de la trifonctionnalité des glycérides partiels β -éléostéarique. Chaque glycéride partiel contient un site réactif *trans*. La probabilité de rencontre entre deux sites réactifs appartenant à des molécules différentes est grande, tous les sites étant *trans*. Des enchainements cycliques sont réalisables.

Chapitre 4

Cas de β -élostéarique dans EPG-CLnA β E (mono) Schéma 4.

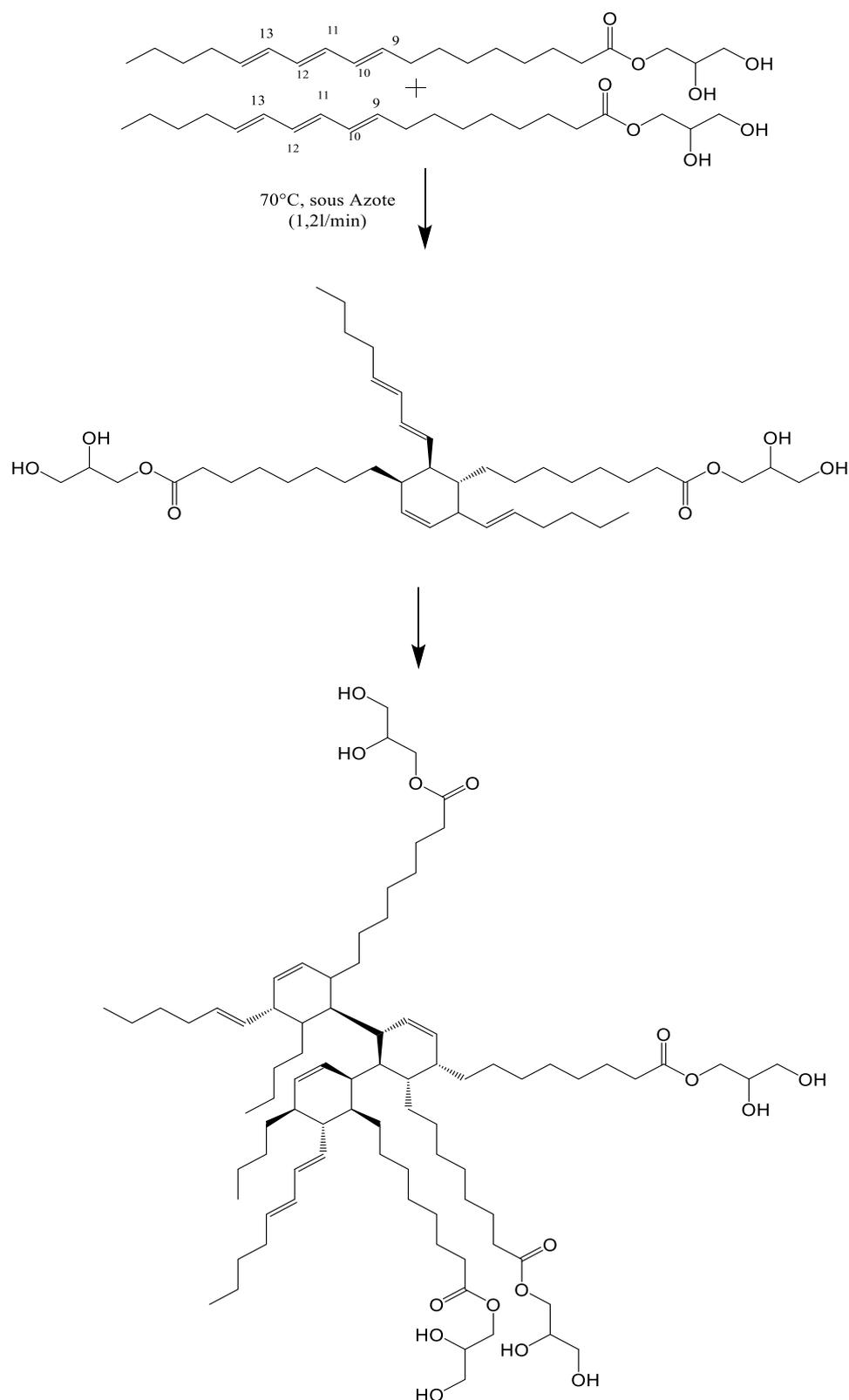


Schéma 4 : Mécanisme de polymérisation β -élostéarique dans EPG-CLnA β E (mono)

Cas de β -éléostéarique dans EPG-CLnA β E (1,3-di) Figure 68.

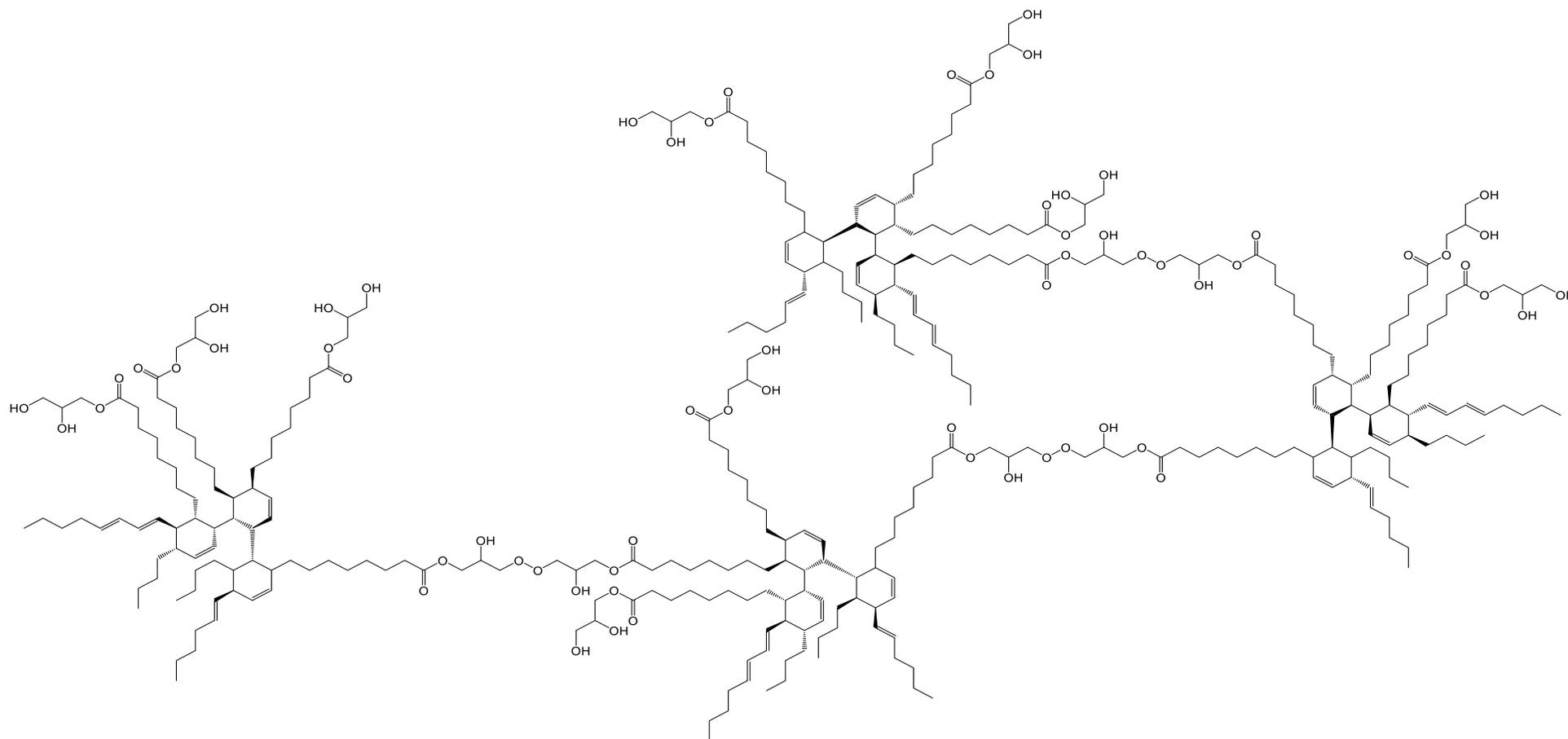


Figure 68 : Polymère de β -éléostéarique dans EPG-CLnA β E (1,3-di)

2.4.2. Polymérisation sous air des CLnA-libres et des EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β)

La copolymérisation des CLnA-libres ou des EPG-CLnA ΔE en présence de l'air à 70°C est réalisée selon deux mécanismes de polymérisation : la réaction Diels-Alder entre les CLnA et la polymérisation radicalaire initiée par l'oxygène.

Au cours de ces réactions de polymérisation, les trois doubles liaisons conjuguées des CLnA-libres et des EPG-CLnA ΔE issus de l'huile de *Ricinodendron heudelotii* sont utilisés comme sites de polymérisation.

La réaction sous atmosphère inerte a conduit uniquement à la polymérisation du CLnA βE . Cela s'explique par la super réactivité du CLnA- βE qui joue un double rôle : un rôle d'amorceur pour initier la réaction et un rôle de monomère pour alimenter les réactions de polymérisation. Le CLnA βE est l'un des éléments clés de la polymérisation: outre le fait qu'il permet à la réaction de démarrer, il conditionne largement la vitesse de ce processus.

Un autre facteur important dans cette série de réaction est la présence d'oxygène de l'air. En général, les acides gras ont un taux de réactivité relatif à l'oxygène qui est fonction des insaturations. L'acide linoléique (C18:3 9c, 12c, 15c) isomère des CLnA a un taux de réactivité avec l'oxygène de 25 [99]. Les CLnA possèdent trois doubles liaisons de configuration conjuguée, cette disposition confère un taux de réactivité relativement élevé en présence de l'oxygène de l'air.

Polymérisation radicalaire

La polymérisation radicalaire des CLnA- ΔE sous l'effet de la température (70°C) et en présence de l'oxygène de l'air conduit à la formation des hydroperoxydes qui sont des intermédiaires réactionnels. Ce mécanisme d'oxydation est propre aux lipides composés des acides gras insaturés ou polyinsaturés [100]. Au cours de la réaction des CLnA (l'acide α -éléostéarique, l'acide β -éléostéarique et l'acide catalpique) en présence d'oxygène d'air et à la température de 70°C, avec leurs trois doubles liaisons conjuguées, représentent des sites privilégiés de polymérisation.

Chapitre 4

Dans le cas de la polymérisation des substrats riches en CLnA, sous l'effet de la chaleur (70°C) le dioxygène dans le milieu réactionnel porteur d'un doublet réactif se transforme en un radical libre qui interagit avec le monomère (acide β -éléostéarique ou α -éléostéarique) voisin au niveau des trois doubles liaisons conjuguées pour former un hydroperoxyde, Schéma 5

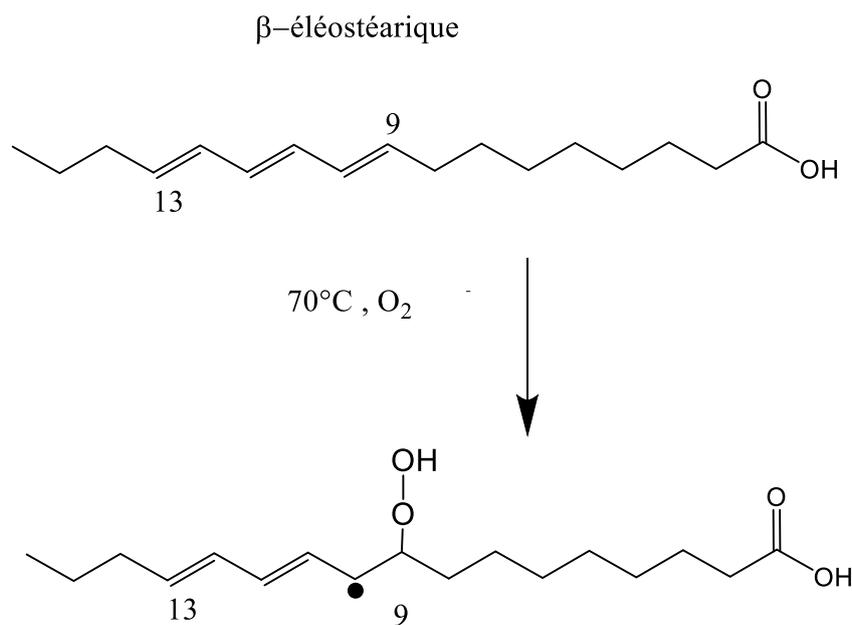


Schéma 5 : Initiation de l'acide β -éléostéarique

Cette molécule peroxydée va capter un électron d'un des doublets électroniques des trois doubles liaisons conjuguées du monomère pour former une liaison covalente carbone-carbone (Schéma 6). La réaction de polymérisation va se faire de proche en proche, entre des monomères voisins porteurs de trois doubles liaisons. Le radical (intermédiaire) réagit avec une autre molécule de β -éléostéarique ou d' α -éléostéarique et forme des liaisons covalentes.

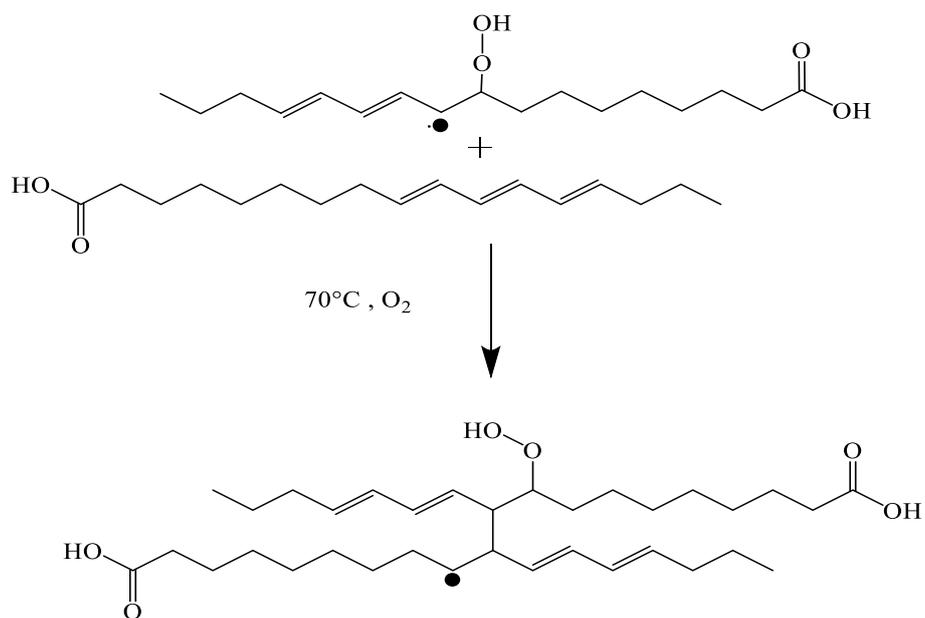
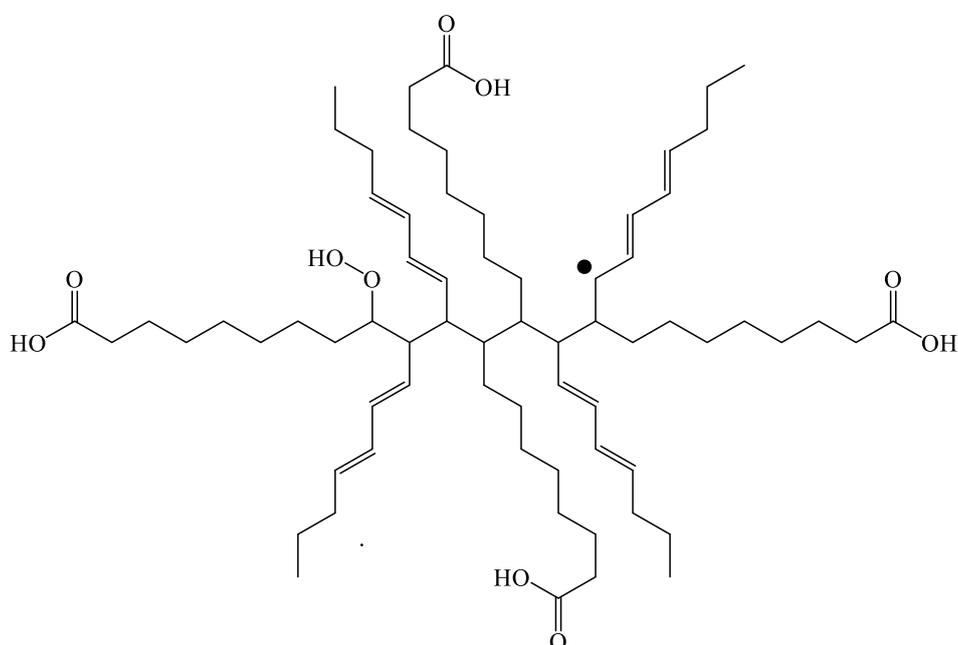


Schéma 6 : Propagation de la réaction de polymérisation de CLnA-βE

Au cours de cette réaction, les peroxydes formés vont se décomposer au fur et à mesure du déroulement de la réaction pour former des polymères avec des liaisons carbone - oxygène et carbone – carbone. Des enchainements linéaires et ramifiés s’opèrent.



Chapitre 4

Plusieurs sites de polymérisation sont possibles, les sites sur les groupes β -éléostérique, α -éléostérique et le catalpique. Cette grande possibilité de sites réactifs entraîne la réticulation des polymères lorsque la réaction est prolongée ou non contrôlée. Les polymères sont transformés en polymères tridimensionnels rigides, insolubles dans tous les solvants organiques (THF, benzène, méthanol, carbonate de glycérol etc....)

2.5. Analyses thermiques DSC

Le Tableau 45 présente les résultats des analyses DSC (**Differential Scanning Calorimetry**) des polymères synthétisés à partir des esters partiels de glycérol issus de l'huile brute et de l'huile brute modifiée et des échantillons (monomères) utilisés pour la synthèse.

Tableau 45: Analyse DSC des polymères et des échantillons EPG

Polymères	Paramètre des EPG avant	Paramètres des polymères à la fin de		
	polymérisation	la réaction		
	Tg (°C)	Tg (°C)	Tc (°C)	Tf (°C)
Poly EPG- α E (mono)	-78,2	-58,5	9,6	30,4
Poly EPG- β E (di)	-87,1	-33,8	25,2	59,2
Poly EPG- β E (mono)	-80,8	-34,2	21,5	56,5
Poly EPG- α E (di)	-75,4	-60,6	10,8	30,8

Les analyses DSC ont permis de déterminer la température de transition (T_g), la température de cristallisation (T_c) et la température de fusion (T_f) des polymères. Nous observons pour tous les échantillons une augmentation des températures de transition vitreuse après réaction de polymérisation, ce qui traduit une diminution de la mobilité des chaînes (macro)moléculaire avec l'augmentation de masse molaire, comme escompté.

Chapitre 4

Les polymères, Poly EPG- α E (mono) et de Poly EPG- α E (di) ont des pics de cristallisation et de fusion à des températures voisines. Poly EPG- α E (mono) et de Poly EPG- α E (di) cristallisent respectivement à 9,6°C et de 10,8°C et les fusions se situent respectivement à 30,4°C et à 30,8 °C. Les mêmes observations sont réalisées pour les polymères Poly EPG- β E (di) et Poly EPG- β E (mono), ces polymères ont respectivement leurs pics de cristallisation à 25,2°C et à 21,5°C et leurs pics de fusion à 59,2°C et à 56,5°C.

La comparaison des températures de transition vitreuse (T_g) montre clairement que Poly EPG- α E (mono) ($T_g = -58,5^\circ\text{C}$) et Poly EPG- α E (di) ($-60,6^\circ\text{C}$) ont sensiblement la même T_g et que Poly EPG- β E (di) ($-33,8^\circ\text{C}$) et Poly EPG- β E (mono) ($-34,2^\circ\text{C}$) ont des T_g très proches.

De ces résultats, on constate que les pics endothermiques, exothermiques et les transitions de phase des polymères d'esters partiels de glycérol sont fonction de leur teneur en acides gras polyinsaturés conjugués, les acides α -oléostéarique et β -oléostéarique.

Les polymères (Poly EPG- β E (di) et Poly EPG- β E (mono)) synthétisés à partir de d'esters partiels riches en acide β -oléostéarique ont le même comportement thermique, ils ont les T_c , T_f et des T_g supérieures aux polymères (Poly EPG- α E (mono) et de Poly EPG- α E (di)) préparés avec des esters partiels glycérol riches en acide α -oléostéarique.

La température de transition vitreuse (T_g) est un paramètre important pour caractériser le comportement des polymères, et donc les applications possibles.

Les polymères étudiés ont des températures de transition vitreuse (T_g) inférieure à -30°C, ces températures sont nettement inférieures à la température ambiante. Tous les polymères étudiés présentent donc des propriétés élastiques, ils sont souples, déformables à température ambiante[101]. Cependant, les polymères Poly EPG- α E (mono) et de Poly EPG- α E (di) préparés à partir des esters partiels riches en acide α -oléostéarique sont plus souples que Poly EPG- β E (di) et Poly EPG- β E (mono)).

Chapitre 4

La teneur en acides gras polyinsaturés conjugués (acide α -éléostéarique et β -éléostéarique) des monomères est un facteur important qui affecte la propriété élastique des polymères synthétisés.

Conclusion partielle

Des polymères ont été préparés à partir de deux types de matrices, les matrices de concentrats en acides gras libres et les matrices d'esters partiels de glycérol. Deux modes de mise en œuvre ont été utilisés pour la synthèse de ces polymères à 70°C : la synthèse sous atmosphère inerte et la synthèse en présence de l'air. Quel que soit le substrat (CLnA-libres et EPG-CLnA) utilisé, la réaction de polymérisation a lieu au niveau des doubles liaisons conjuguées des CLnA. La polymérisation des substrats est fonction de leur profil acide gras (acide α -éléostéarique et acide β -éléostéarique) et de leur profil glycérique.

Le suivi de la réactivité des deux isomères linoléniques conjugués de CLnA α -éléostéarique et CLnA β -éléostéarique a été réalisé par ATR-IRTF et par CPG. Ces méthodes d'analyses mises au point et mis en œuvre lors de ces travaux de polymérisation ont permis de mettre en évidence la différence de réactivité suivant la configuration de l'acide β -éléostéarique C18:3 9t, 11t, 13t par rapport à la configuration de l'acide α -éléostéarique C18:3 c, t, t. dans les réactions de polymérisation.

Les substrats riches en acide α -éléostéarique polymérisent lentement, en revanche, ceux riches en acide β -éléostéarique subissent une polymérisation rapide.

Les CLnA (CLnA- α E et CLnA- β E) ne polymérisent qu'en présence de l'air ; en atmosphère inerte ils ne polymérisent pas. Les matrices esters partiels de glycérol riches en acide α -éléostéarique, EPG-CLnA α E (monoglycérides) et Poly EPG-CLnA α E (diglycérides) polymérisent en présence de l'air et non sous atmosphère inerte. Par contre, les substrats EPG-CLnA riches en acide β -éléostéarique, EPG-CLnA β E (diglycérides) et EPG-CLnA β E (monoglycérides) polymérisent sous atmosphère inerte et sous air. Deux types de mécanismes de polymérisation sont mis en œuvre, la polymérisation auto-initiée réalisée sous atmosphère inerte et la polymérisation radicalaire, réalisée en présence de l'air.

Chapitre 4

Le suivi cinétique de la variation de la teneur en acides gras dans les extractibles observé par CPG a permis de montrer que les acides oléique et linoléique ne polymérisent pas. Ils jouent le rôle de fluidifiants facilitant la polymérisation.

Les polymérisations conduisent à un mélange de polymères composés de polymères à poids moléculaire de 1860 g/mol, de polymères à poids moléculaires entre 1860 à 25000 g/mol et des polymères de poids moléculaires supérieurs à 25000 g/mol.

Les analyses des thermogrammes DSC ont montré que les polymères ont des Tg inférieure à -30°C justifiant ainsi la grande souplesse de ces polymères à température ambiante. De nouveaux polymères différents suivant le profil acides gras des esters partiels en CLnA ont été synthétisés.

Conclusions générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les travaux de recherche menés dans le cadre de cette thèse sont constitués de plusieurs études de mises en œuvre qui sont :

- la méthode de décorticage des graines de *Ricinodendron heudelotii*. Elle influence la composition chimique des constituants lipidiques de l'huile. Le traitement thermique traditionnel et le décorticage mécanique manuel des graines engendrent une composition chimique différente bien identifiée au niveau des teneurs en acides gras poly-insaturés CLnA (acide α -éléostéarique, acide β -éléostéarique et acide catalpique) des huiles extraites.

- l'exposition des triglycérides de l'huile brute des amandes de *ricinodendron heudelotii* aux rayons ultraviolets ou au soleil entraîne l'isomérisation de l'acide α -éléostéarique (C18:3 9c, 11t, 13t) des triglycérides. Elle conduit la conversion de l'acide α -éléostéarique en acide β -éléostéarique et acide catalpique. Cette conversion est mise en évidence par suivi cinétique du profil d'acides gras par analyse CPG.

- Les triglycérides de l'huile brute ou huile native et de l'huile modifiée des amandes de *Ricinodendron heudelotii* sont les premières molécules à partir desquelles les CLnA-libres ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) ont été obtenus par hydrolyse enzymatique avec la lipase LCC. Le suivi cinétique de ces hydrolyses par HPLC-ELSD à travers la détermination du profil glycérique a montré que les réactions d'hydrolyse des triglycérides sont complètes après 1 heure de réaction avec un rendement en acides gras libres de 94%. La lipase LCC montre sa capacité hydrolytique totale sans discriminer les CLnA $-\Delta E$ et CLA C18:2.

- la synthèse des EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β -éléostéarique) a été réalisée en milieu sans solvant et en milieu solvanté avec du *tert*-butanol en présence de la lipase de LCC et de la lipase Novozyme 435. Les travaux réalisés sur la séparation des EPG-CLnA- ΔE sur plaque de silice préparative et l'analyse par CPG/DIF révèlent l'enrichissement des groupes acyls des CLnA dans les mélanges des groupes acyls de monoglycérides et diglycérides. De plus, la lipase Novozyme 435 montre une sélectivité vis-à-vis de CLnA α -éléostéarique notamment dans les diglycérides. Par contre la lipase Novozyme 435 n'est pas discriminante vis-à-vis de groupes acyls de l'acide β -éléostéarique. Les diglycérides contiennent des teneurs équivalentes en CLA C18:2 et CLnA- β -éléostéarique. Les comportements des activités catalytiques estérases des lipases de Novozyme 435 et LCC dans ces milieux sans solvant ou solvantés sont comparables à la grande différence que la lipase Novozyme 435 est plus adaptée au stade actuel de nos travaux à la réaction d'estérification parce qu'elle est une enzyme immobilisée sur résine macroporeuse acrylique.

Conclusion générale et perspectives

Les paramètres cinétiques, les constantes de vitesse, le profil glycérique et le profil en acides gras ont été déterminés. Il a été montré que la formation de monoglycérides et de diglycérides dépend de l'utilisation du *tert*-butanol. L'utilisation du *tert*-butanol a permis d'obtenir des produits avec des teneurs élevées en monoglycérides.

Le profil glycérique exacte(s) (acide gras, mono, diglycéride et triglycéride) et la composition chimique en acides gras de chaque EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) ont été quantifié(e)s dans chaque mélange d'esters partiels par analyse HPLC-ESLD et analyse CPG.

– la polymérisation des différents substrats (CLnA-libres et EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β)) a été confirmée par suivi cinétique de l'évolution de la viscosité par rhéologie. Cette polymérisation a lieu au niveau des doubles liaisons des CLnA, et conduit à la synthèse de mélange de bio macromolécules de tailles variables (1860 g/mol, entre 1860 à 25000 g/mol et supérieur à 25000 g/mol). La consommation des doubles liaisons des CLnA au cours des réactions a été confirmée par analyse ART-IRTF. De nouveaux polymères sont synthétisés par réaction de Diels-Alder ou par polymérisation radicalaire au niveau des trois doubles liaisons conjuguées. Le suivi de ces transformations chimiques a été réalisé par analyse ATR-IRTF et par analyse CPG des extractibles. L'obtention des biopolymères a été réalisée en trois étapes. Les triglycérides sont désassemblés pour donner les acides gras ensuite ces acides gras ont été assemblés en esters partiels et polymérisés en masse sous azote ou sous oxygène de l'air à 70°C. Les méthodes de calorimétrie différentielle à balayage a permis de comprendre le comportement thermique notamment leurs points de fusion, températures de cristallisation et températures de transitions vitreuses des EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) et des polymères synthétisés.

Ce travail a permis de synthétiser de nouveaux EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) avec des comportements inédits du fait, de la présence de transition vitreuse à -80°C. Ces EPG-CLnA ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) sont à la fois utilisés comme tensioactifs et monomère (surfmers) pour la synthèse de polymères. De nouveaux polymères souples, avec une température de transition vitreuse inférieure à -30°C ont été synthétisés.

A partir des molécules biosourcées (les triglycérides de l'huile des amandes de *Ricinodendron heudelotii*) des biopolymères ont été synthétisés à basse température (70°C) sans ajout d'amorceur chimique.

Conclusion générale et perspectives

En perspectives immédiates et dans le cadre de nos engagements auprès du programme AMURGE I, nous envisageons de poursuivre la formulation des biofertilisants par couplage des biopolymères obtenus avec des oligo-éléments spécifiques au bénéfice du développement et de la protection/production du cacaoyer et de l'igname. Les EPG-CLnA en émulsion resteront bioactifs dans les formulations actives rétentrices d'eau et les biopolymères par leur souplesse permettront de développer des couvertures protectrices éco-compatibles.

Le travail de purification des CLnA-libre ΔE ($\Delta = \alpha$ ou β) doit être poursuivi, notamment sur les CLnA-libre βE pour mettre en place un procédé de production et de purification de cette molécule bioactive rare.

La synthèse typosélective des EPG-CLnA est à poursuivre également du fait de l'intérêt croissant de ces molécules (surfmers). L'architecture de ces molécules permettront de les utiliser comme émulsifiants et/ou monomères dans des réactions de copolymérisation classiques avec les anhydrides maléique, phtalique etc...

Références

REFERENCE BIBLIOGRAPHIE

- [1] Salimon J, Salih N and Yousif E 2012 Industrial development and applications of plant oils and their biobased oleochemicals *Arabian Journal of Chemistry* **5** 135–145
- [2] Samadzadeh M, Boura S H, Peikari M, Ashrafi A and Kasiriha M 2011 Tung oil: An autonomous repairing agent for self-healing epoxy coatings *Progress in Organic Coatings* **70** 383–7
- [3] Samadzadeh M, Boura S H, Peikari M, Ashrafi A and Kasiriha M 2011 Tung oil: An autonomous repairing agent for self-healing epoxy coatings *Progress in Organic Coatings* **70** 383–387
- [4] Roques E, Lachaux C, Tournebize T, Epanda A M and Akongongol M M 2019 Un modèle économique et social pour la conservation de la biodiversité: des filières oléagineuses durables issues de produits forestiers non ligneux (PFNL) pour préserver la Réserve de Faune du Dja (RFD) au Cameroun *OCL* **26** 7
- [5] Coulibaly M, Kouamé C A, N'dri D Y, Kouassi N K, Pereko K K A and Amani G 2018 Effect of Post-Harvest Traditional Technologies on the Nutrient Content and Antioxidant Compounds of Defatted Flours from *Ricinodendron heudelottii* (Baill. Pierre ex Pax) Seed Kernels *Technologies* **6** 37
- [6] Dandjouma A K A, Tchiegang C, Kapseu C, Linder M and Parmentier M 2008 Enzyme-assisted hexane extraction of *Ricinodendron heudelottii* (Baill.) Pierre ex Pax seeds oil *International Journal of Food Science and Technology* **43** 1169–75
- [7] Tchiegang C, Kapseu C, Ndjouenkeu R and Ngassoum M B 1997 Amandes de *Ricinodendron heudelottii* (Baill.): Matière première potentielle pour les industries agro-alimentaires tropicales *Journal of Food Engineering* **32** 1–10
- [8] Kapseu C and Tchiegang C 1995 Chemical properties of *Ricinodendron heudelottii* (Baill.) seed oil *Journal of Food Lipids* **2** 87–98
- [9] Yeboah S O, Mitei Y C, Ngila J C, Wessjohann L and Schmidt J 2011 Compositional and Structural Studies of the Major and Minor Components in Three Cameroonian Seed Oils by GC–MS, ESI-FTICR-MS and HPLC *Journal of the American Oil Chemists' Society* **88** 1539–1549
- [10] Leudeu B C T, Tchiégang C, Barbé F, Nicolas B and Guéant J-L 2009 *Ricinodendron heudelottii* (Baill.) or *Tetracarpidium conophorum* Müll. Oils fed to male rats lower blood lipids *Nutrition research* **29** 503–509
- [11] Sompila A W G T, Maloumbi M G, Bleton J, Tchaplà A and Héron S 2014 Identification des triacylglycérols en HPLC. Comment se passer du couplage HPLC-SM? Dans quel cas la chromatographie est-elle encore indispensable? *OCL* **21** A601
- [12] Bialek M, Czauderna M and Bialek A 2017 Conjugated linolenic acid (CLnA) isomers as new bioactive lipid compounds in ruminant-derived food products. A review *Journal of Animal and Feed Sciences* **26** 3–17
- [13] Yuan G-F, Chen X-E and Li D 2014 Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review *Food & function* **5** 1360–1368

Références

- [14] AFNOR 2016 NF EN ISO 12966-3: Préparation des esters méthyliques à l'aide d'hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH)
- [15] Roche J, Bouniols A, Mouloungui Z, Barranco T and Cerny M 2006 Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components *European journal of lipid science and technology* **108** 287–297
- [16] Tchiegang C, Dandjouma A A, Kapseu C and Parmentier M 2003 Conditions for the extraction of oil by pressing of *Ricinodendron heudelotii* (Bail.) Pierre ex Pax *Journal of Food Engineering* **58** 363–71
- [17] Assanvo E F, Gogoi P, Dolui S K and Baruah S D 2015 Synthesis, characterization, and performance characteristics of alkyd resins based on *Ricinodendron heudelotii* oil and their blending with epoxy resins *Industrial Crops and Products* **65** 293–302
- [18] Samadzadeh M, Boura S H, Peikari M, Ashrafi A and Kasiriha M 2011 Tung oil: An autonomous repairing agent for self-healing epoxy coatings *Progress in Organic Coatings* **70** 383–7
- [19] Nikiema D, Mouloungui Z, oi Koua K, Cerny M, Lacroux É, Valentin R and Ané A 2019 Effect of dehulling method on the chemical composition of the lipid constituents of the kernels and oils of *Ricinodendron heudelotii* seeds *Industrial Crops and Products* **140** 111614
- [20] Prashantha M a. B, Premachandra J K and Amarasinghe A D U S 2009 Composition, Physical Properties and Drying Characteristics of Seed Oil of *Momordica charantia* cultivated in Sri Lanka *Journal of the American Oil Chemists' Society* **86** 27–32
- [21] Chisholm M J and Hopkins C Y 1965 Fatty acids of *Catalpa bignonioides* and other Bignoniaceae seed oils *Canadian Journal of Chemistry* **43** 2566–2570
- [22] Hernandez F, Melgarejo P, Olias J M and Artes F 2000 Fatty acid composition and total lipid content of seed oil from three commercial pomegranate cultivars *Production, Processing and Marketing of Pomegranate in the Mediterranean Region: Advances in Research and Technology. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza, Spain* 205–209
- [23] Takagi T and Itabashi Y 1981 Occurrence of mixtures of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: Analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography *Lipids* **16** 546–51
- [24] Pariza M W, Park Y and Cook M E 2001 the biologically active isomers of conjugated linoleic acid *Progress in Lipid Research* **40** 283–98
- [25] Yasui Y, Hosokawa M, Sahara T, Suzuki R, Ohgiya S, Kohno H, Tanaka T and Miyashita K 2005 Bitter gourd seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPAR γ in human colon cancer Caco-2 cells *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **73** 113–9
- [26] Moon H-S, Guo D-D, Lee H-G, Choi Y-J, Kang J-S, Jo K, Eom J-M, Yun C-H and Cho C-S 2010 Alpha-eleostearic acid suppresses proliferation of MCF-7 breast cancer cells via activation of PPAR γ and inhibition of ERK 1 / 2 *Cancer Science* **101** 396–402

Références

- [27] Sun Z, Wang H, Ye S, Xiao S, Liu J, Wang W, Jiang D, Liu X and Wang J 2012 Beta-eleostearic acid induce apoptosis in T24 human bladder cancer cells through reactive oxygen species (ROS)-mediated pathway *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **99** 1–8
- [28] Nekooeian A A, Eftekhari M H, Adibi S and Rajaeifard A 2014 Effects of Pomegranate Seed Oil on Insulin Release in Rats with Type 2 Diabetes *Iran J Med Sci* **39** 130–5
- [29] Hontecillas R, Diguardo M, Duran E, Orpi M and Bassaganya-Riera J 2008 Catalpic acid decreases abdominal fat deposition, improves glucose homeostasis and upregulates PPAR α expression in adipose tissue *Clinical Nutrition* **27** 764–72
- [30] Koba K, Belury M A and Sugano M 2007 Potential health benefits of conjugated trienoic acids *Lipid Technology* **19** 200–3
- [31] Koba K, Imamura J, Akashoshi A, Kohno-Murase J, Nishizono S, Iwabuchi M, Tanaka K and Sugano M 2007 Genetically modified rapeseed oil containing cis-9, trans-11, cis-13-octadecatrienoic acid affects body fat mass and lipid metabolism in mice *Journal of agricultural and food chemistry* **55** 3741–3748
- [32] Dyer J M, Chapital D C, Kuan J-C W, Mullen R T, Turner C, McKeon T A and Pepperman A B 2002 Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of plant fatty acid diversity *Plant Physiology* **130** 2027–2038
- [33] Shockey J M, Gidda S K, Chapital D C, Kuan J-C, Dhanoa P K, Bland J M, Rothstein S J, Mullen R T and Dyer J M 2006 Tung Tree DGAT1 and DGAT2 Have Nonredundant Functions in Triacylglycerol Biosynthesis and Are Localized to Different Subdomains of the Endoplasmic Reticulum *The Plant Cell* **18** 2294–313
- [34] Aruna P, Venkataramanamma D, Singh A K and Singh R P 2016 Health Benefits of Punicic Acid: A Review *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety* **15** 16–27
- [35] Liu L, Hammond E G and Nikolau B J 1997 In Vivo Studies of the Biosynthesis of [α]-Eleostearic Acid in the Seed of *Momordica charantia* L *Plant Physiology* **113** 1343–9
- [36] Bugos R 1995 RNA isolation from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine *BioTechniques* **19** 734–7
- [37] Carpenter C D and Simon A E 1998 Preparation of RNA *Arabidopsis Protocols Methods in Molecular Biology* TM ed J M Martinez-Zapater and J Salinas (Totowa, NJ: Humana Press) pp 85–9
- [38] Joh Y-G, Kim S-J and Christie W W 1995 The structure of the triacylglycerols, containing punicic acid, in the seed oil of *Trichosanthes kirilowii* *Journal of the American Oil Chemists' Society* **72** 1037–1042
- [39] Iwabuchi M, Kohno-Murase J and Imamura J 2003 Δ 12-Oleate Desaturase-related Enzymes Associated with Formation of Conjugated trans- Δ 11, cis- Δ 13 Double Bonds *J. Biol. Chem.* **278** 4603–10
- [40] Cao Y, Yang L, Gao H-L, Chen J-N, Chen Z-Y and Ren Q-S 2007 Re-characterization of three conjugated linolenic acid isomers by GC-MS and NMR *Chemistry and Physics of Lipids* **145** 128–33

Références

- [41] Takagi T and Itabashi Y 1981 Occurrence of mixtures of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: Analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography *Lipids* **16** 546–51
- [42] Hoffmann J S, O'Connor R T, Heinzelman D C and Bickford W G 1957 A simplified method for the preparation of α - and β -eleostearic acids and a revised spectrophotometric procedure for their determination *J Am Oil Chem Soc* **34** 338–42
- [43] Anon Ensoleillement et température sur Toulouse, la Mairie de Toulouse, sa commune et sa ville
- [44] Mouloungui Z and Mechling E 2004 Procédé de préparation d'acides gras par hydrolyse in situ des lipides contenus dans les graines d'une plante
- [45] Romain V, Ngakegni-Limbili A C, Mouloungui Z and Ouamba J-M 2013 Thermal Properties of Monoglycerides from *Nephelium Lappaceum* L. Oil, as a Natural Source of Saturated and Monounsaturated Fatty Acids *Ind. Eng. Chem. Res.* **52** 14089–98
- [46] AFNOR 2016 Préparation des esters méthyliques à l'aide d'hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH) *Organisation internationale de normalisation* NF EN ISO 12966-3
- [47] Blayo A, Gandini A and Le Nest J-F 2001 Chemical and rheological characterizations of some vegetable oils derivatives commonly used in printing inks *Industrial Crops and Products* **14** 155–167
- [48] Schönemann A, Frenzel W, Unger A and Kenndler E 2006 An investigation of the fatty acid composition of new and aged tung oil *Studies in conservation* **51** 99–110
- [49] DIJKSTRA A J 2013 Corps gras *Ti -Techniques de l'ingénieur. Constantes physico-chimiques*
Réf : K330 v3
- [50] Guner F S, Yagci Y and Erciyas A T 2006 Vegetable oil-based thermosetting polymers *Prog Polym Sci* **31** 633–670
- [51] Peng L, Xu X and Tan T 2000 Enzymatic production of high quality monoacylglycerols *Research Advances in Oil Chemistry* **1** 53–78
- [52] Nouredini H, Harkey D W and Gutsman M R 2004 A continuous process for the glycerolysis of soybean oil *Journal of the American Oil Chemists' Society* **81** 203–207
- [53] Duan Z-Q, Du W and Liu D-H 2010 Novozyme 435-catalyzed 1, 3-diacylglycerol preparation via esterification in t-butanol system *Process Biochemistry* **45** 1923–1927
- [54] Mouloungui Z 2004 Conférence Chevreul - Voies inhabituelles de synthèse de composés oléophiles à partir des substrats végétaux solides (graines oléoprotéagineuses), liquides (huiles végétales et dérivés, glycérol) pour l'industrie chimique *OCL* **11** 425–35
- [55] Martinez C E, Vinay J C, Brieva R, Hill C G and Garcia H S 2005 Preparation of mono- and diacylglycerols by enzymatic esterification of glycerol with conjugated linoleic acid in hexane *Appl Biochem Biotechnol* **125** 63–75
- [56] Guo Z and Sun Y 2007 Solvent-free production of 1,3-diglyceride of CLA: Strategy consideration and protocol design *Food Chemistry* **100** 1076–84

Références

- [57] Thanamongkollit N and Soucek M D 2012 Synthesis and properties of acrylate functionalized alkyds via a Diels–Alder reaction *Progress in Organic Coatings* **73** 382–391
- [58] Moonen H and Bas H 2014 Mono- and diglycerides *Emulsifiers in food technology* 73–92
- [59] Grochulski P, Li Y, Schrag J D, Bouthillier F, Smith P, Harrison D, Rubin B and Cygler M 1993 Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268** 12843–7
- [60] Benjamin S and Pandey A 1998 *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology *Yeast* **14** 1069–1087
- [61] Ortiz C, Luján Ferreira M, Barbosa O, and Santos J C S dos, C. Rodrigues R, Berenguer-Murcia Á, E. Briand L and Fernandez-Lafuente R 2019 Novozyme 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catalysis Science & Technology*
- [62] Griffin W C 1949 Classification of surface-active agents by "HLB" *J. Soc. Cos. Chemists* **1** 311–326
- [63] Malcouronne G 2015 *Transéthérification du glycérol par les alcools gras. Etude physico-chimique de la miscibilité des réactifs en présence de catalyseurs solides* phdthesis (Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON)
- [64] Guo X, Rong Z and Ying X 2006 Calculation of hydrophile–lipophile balance for polyethoxylated surfactants by group contribution method *Journal of Colloid and Interface Science* **298** 441–450
- [65] Davies J T 1957 A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent *Proc. 2nd Intern. Congr. Surface Activity, Butterworths Scientific Publication, London* **426**
- [66] Stauff J 1962 JT Davies und EK Rideal. Interfacial Phenomena. Academic Press, New York und London 1961. 474 S. Preis: \$14, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **66** 453–453
- [67] Wang C, Ding L, He M, Wei J, Li J, Lu R, Xie H and Cheng R 2016 Facile one-step synthesis of bio-based AESO resins *European Journal of Lipid Science and Technology* **118** 1463–1469
- [68] Aouf C, Nouailhas H, Fache M, Caillol S, Boutevin B and Fulcrand H 2013 Multi-functionalization of gallic acid. Synthesis of a novel bio-based epoxy resin *European Polymer Journal* **49** 1185–1195
- [69] Eychenne V and Mouloungui Z 1999 High concentration of 1-(3-)monoglycerides by direct partial esterification of fatty acids with glycerol *Lipid / Fett* **101** 424–7
- [70] Copeland R A 1996 Steady state kinetics of single substrate enzyme reactions *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* 93–119
- [71] Paiva A L, Balcao V M and Malcata F X 2000 Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases☆ *Enzyme and microbial technology* **27** 187–204
- [72] Wang Z, Du W, Dai L and Liu D 2016 Study on Lipozyme TL IM-catalyzed esterification of oleic acid and glycerol for 1, 3-diolein preparation *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **127** 11–17

Références

- [73] Emdur L I, Lyle C and Kabara J J 1977 Quantitation of Lipid Classes Following Thin-Layer Chromatography *Analytical Letters* **10** 21–27
- [74] Marzo A, Ghirardi P, Sardini D and Meroni G 1971 Simplified measurement of monoglycerides, diglycerides, triglycerides, and free fatty acids in biological samples *Clinical Chemistry* **17** 145–147
- [75] Peyrou G, Rakotondrazafy V, Mouloungui Z and Gaset A 1996 Separation and quantitation of mono-, di-, and triglycerides and free oleic acid using thin-layer chromatography with flame-ionization detection *Lipids* **31** 27–32
- [76] Boussambe G N M, Valentin R and Mouloungui Z 2015 Structural Analysis of Partial and Total Esters of Glycerol Undecenoate and Diglycerol Undecenoate *J Am Oil Chem Soc* **92** 1567–77
- [77] Becker K P and Hannun Y A 2012 Chapter 2 - Diacylglycerols *Bioactive Lipids* Oily Press Lipid Library Series ed A Nicolaou and G Kokotos (Woodhead Publishing) pp 37–61
- [78] Raghunanan L and Narine S S 2016 Branched Biobased Diesters with Exceptional Low Temperature and Flow Properties for Use in Lubricant Formulations *ACS Sustainable Chem. Eng.* **4** 2542–9
- [79] Rodrigues J de A, Cardoso F de P, Lachter E R, Estevão L R M, Lima E and Nascimento R S V 2006 Correlating chemical structure and physical properties of vegetable oil esters *Journal of the American Oil Chemists' Society* **83** 353–7
- [80] Windbergs M, Strachan C J and Kleinebudde P 2009 Investigating the Principles of Recrystallization from Glyceride Melts *AAPS PharmSciTech* **10** 1224
- [81] Mouloungui Z, Rakotondrazafy V, Peyrou G, Gachen C and Eychenne V 1998 Pure alpha-monoglycerides for industrial applications *Agro Food Industry Hi-Tech* **9** 10–14
- [82] Woo H, Kim J, Kim I-H, Choi H-D, Choi I-W and Kim B H 2016 Substrate selectivity of Novozyme 435 in the esterification of glycerol with an equimolar mixture of linoleic, conjugated linoleic, and pinolenic acids *European Journal of Lipid Science and Technology* **118** 928–37
- [83] Xu D, Sun L, Chen H, Lan D, Wang Y and Yang B 2012 Enzymatic synthesis of diacylglycerols enriched with conjugated linoleic acid by a novel lipase from *Malassezia globosa* *Journal of the American Oil Chemists' Society* **89** 1259–1266
- [84] Yazdi Z K and Alemzadeh I 2017 Kinetic mechanism of conjugated linoleic acid esterification and production of enriched glycerides as functional oil *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **95** 2078–2086
- [85] Çakmaklı B, Hazer B, Tekin İ Ö and Cömert F B 2005 Synthesis and Characterization of Polymeric Soybean Oil-g-Methyl Methacrylate (and n-Butyl Methacrylate) Graft Copolymers: Biocompatibility and Bacterial Adhesion *Biomacromolecules* **6** 1750–8
- [86] Ronda J C, Lligadas G, Galià M and Cádiz V 2011 Vegetable oils as platform chemicals for polymer synthesis *European Journal of Lipid Science and Technology* **113** 46–58
- [87] Xia Y, Quirino R L and Larock R C 2013 Bio-based Thermosetting Polymers from Vegetable Oils

Références

- [88] Dziczkowski J, Dudipala V and Soucek M D 2012 Investigation of grafting sites of acrylic monomers onto alkyd resins via gHMQC two-dimensional NMR: Part 1 *Progress in Organic Coatings* **73** 294–307
- [89] Ogunniyi D S 2006 Castor oil: A vital industrial raw material *Bioresource Technology* **97** 1086–91
- [90] Miao S, Wang P, Su Z and Zhang S 2014 Vegetable-oil-based polymers as future polymeric biomaterials *Acta Biomaterialia* **10** 1692–704
- [91] Li F and Larock R C 2003 Synthesis, structure and properties of new tung oil- styrene-divinylbenzene copolymers prepared by thermal polymerization *Biomacromolecules* **4** 1018–1025
- [92] Narin T, Kent R and Mark D 2012 Synthesis of UV-curable tung oil and UV-curable tung oil based alkyd *Progress in Organic Coatings* **73** 425–34
- [93] Seniha Güner F, Yağcı Y and Tuncer Erciyes A 2006 Polymers from triglyceride oils *Progress in Polymer Science* **31** 633–70
- [94] Mossoba M M, Azizian H and Kramer J K 2012 *Application of infrared spectroscopy to the rapid determination of total saturated, trans, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids*
- [95] AOCS 2009 AOCS Official Method Cd 14e-09 *Official methods and recommended practices of the AOCS*
- [96] AFNOR 2005 Determination of isolated *trans* isomers by infrared spectrometry Organisation internationale de normalisation NF EN ISO 13884
- [97] Alli A and Hazer B 2011 Synthesis and Characterization of Poly (N-Isopropyl Acryl Amide)-g-Poly (Linoleic Acid)/Poly (Linolenic Acid) Graft Copolymers *Journal of the American Oil Chemists' Society* **88** 255–63
- [98] Cillard J and Cillard P 2006 Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations *Oleagineux, corps gras, lipides* **13** 24–29
- [99] Shahidi F 2005 *Bailey's industrial oil and fat products* vol 1 (John Wiley & Sons New Jersey)
- [100] Timothy L. Mounts 1997 *Lipid Technologies and Applications* Taylor et Francis
- [101]Tanzi M C 2017 6 - Characterization of thermal properties and crystallinity of polymer biomaterials *Characterization of Polymeric Biomaterials* ed M C Tanzi and S Farè (Woodhead Publishing) pp 123–46

ANNEXE

Accumulation during fruit development of components of interest in seed of Chia (*Salvia hispanica* L.) cultivar Oruro[©] released in France[☆]

Gwendoline Gravé¹, Zéphirin Mouloungui^{1,*}, Frederic Poujaud², Muriel Cerny¹, Caroline Pauthe¹, Ibinga Sidrine Koumba¹, Nikiema Diakaridja¹ and Othmane Merah^{1,3}

¹ Laboratoire de chimie agro-industrielle, LCA, université de Toulouse, INRA, Toulouse, France

² Panam-France Company, Les Grèzes, 544, route de Villebrumier, 3134 Villemur-sur-Tarn, France

³ Université Paul Sabatier, IUT A, département génie biologique, Auch, France

Received 13 May 2019 – Accepted 20 September 2019

Abstract – This study aimed to examine the accumulation of oil, fatty acids, sterols and tocopherols contents and compositions during fruit development on the new cultivar of Chia Oruro (Panam Cie, France) cultivated in France. This cultivar is the first released genotype in Europe and for cultivation in Europe. The experiment was conducted in 2017, in south-western France at the Regional centre for organic agriculture, at Auch (near Toulouse, South-West of France). Four samplings were made at 17, 24, 27 and 35 days after flowering (DAF). These dates of sampling correspond to stages 7–8 (fruit development and maturity) of BBCH scale. Oil content, fatty acid composition and sterols and tocopherols contents and profiles were determined. The highest levels of oil and tocopherols were reached at 27 DAF. In contrast, phytosterols content was highest at 17 DAF (726.2 mg/100 g of oil) and decreased after this date. β -sitosterol was the main sterol in chia seed (63.4 to 89.1% of total sterols, depending of stage of fruit development). γ -tocopherol represented more than 92% of the total tocopherols present in the seed. High levels of polyunsaturated fatty acids (74.4 to 80% of total fatty acids) were observed in our study confirming those already reported in this species. High levels of saturated and monounsaturated fatty acids were reported at earlier stages and decreased gradually during fruit development. Polyunsaturated fatty acids followed an opposite trend. Their level was lowest at 17 DAF (74.4%) and increased gradually to reach their higher level at 35 DAF (80%). These results suggested clearly the interest to harvest and use of seed before entire maturity of the grain.

Keywords: Chia / fatty acids / phytosterols / tocopherols / fruit development / accumulation

Résumé – **Accumulation des composants d'intérêt durant le développement des fruits dans la graine du cultivar français Oruro[©] de Chia (*Salvia hispanica* L.).** Cette étude a examiné l'accumulation de l'huile, des acides gras, des stérols et des tocophérols durant le développement du fruit du nouveau cultivar de Chia Oruro (Panam Cie, France) cultivé en France. Ce cultivar est le premier génotype sélectionné en Europe et pour l'Europe. L'expérimentation a été réalisée en 2017, dans le sud-ouest de la France, au Centre régional d'expérimentation en agriculture biologique, à Auch (près de Toulouse, dans le sud-ouest de la France). Quatre prélèvements ont été effectués 17, 24, 27 et 35 jours après la floraison (DAF). Ces dates d'échantillonnage correspondent aux stades 7–8 (développement du fruit et maturité) de l'échelle BBCH. La teneur en huile, la composition en acides gras et les teneurs et profils en stérols et en tocophérols ont été déterminés. Les teneurs les plus élevées d'huile et de tocophérols ont été atteintes à 27 DAF. Au contraire, la teneur en phytostérols était la plus élevée à 17 DAF (726,2 mg/100 g d'huile) et a diminué après cette date. Le β -sitostérol a été le principal stérol contenu dans les graines de chia (63,4 to 89,1 % des stérols totaux et en fonction du stade de développement du fruit). Le γ -tocophérol représente plus de 92 % du total des tocophérols présents dans la graine. Des teneurs élevées d'acides gras polyinsaturés (74,4 à 80 % des acides gras totaux) ont été observées dans notre étude, ce qui confirme celles déjà signalées chez cette espèce. Des

[☆] Contribution to the Topical Issue “Lipids and health / Lipides et santé”

*Correspondence: zephirin.mouloungui@ensiacet.fr

teneurs plus élevées d'acides gras saturés et mono-insaturés ont été observées aux stades précoces du développement du fruit et ont diminué progressivement au cours de la maturation. Les acides gras polyinsaturés ont suivi une tendance opposée. Leur niveau était le plus bas à 17 DAF (74,4 %) et a augmenté progressivement pour atteindre leur niveau supérieur à 35 DAF (80 %). Ces résultats suggèrent clairement l'intérêt de récolter et d'utiliser les graines avant leur maturité complète.

Mots clés : Chia / acides gras / phytostérols / tocophérols / développement du fruit / accumulation

1 Introduction

Chia (*Silvia hispanica* L.), a Lamiaceae species, is an ancient Central American crop (Capitani *et al.*, 2012) recently promoted as a functional food and known as source of omega-3 and omega-6. Chia seeds contain more than 30% of oil (310 g/kg of seeds) and, particularly, a high proportion of unsaturated fatty acids present (PUFA: 82.0% and MUFA 6.9%). Chia oil also contains high levels of tocopherols and sterols (Ciftçi *et al.*, 2012). The proportions of these active compounds in chia seeds depend on several factors. Environmental differences, climatic change, the availability of essential nutrients, genotype, year of cultivation and soil type all play a crucial role in determining seed composition (Ayerza and Coates, 2009). For instance, protein levels decrease with increasing temperature (Ayerza and Coates, 2011). An inverse relationship has also been found between altitude and saturated fatty acid (SFA) levels. At low altitude, the proportion of SFA is higher in areas of higher temperature (Ayerza, 2010). In Argentina, temperature was found to influence greatly the fatty acids composition of chia oil (Ayerza, 1995). Seed coat, growing locations, genotypes were found to influence oil content, fatty acid composition of chia seed (Ayerza, 1995, 2010; Ayerza and Coates, 2009, 2011), which allowed to propose the use of these traits as criteria to determine the commercial origin of seeds of chia (Ayerza and Coates, 2011). Moreover, evolution of the quality of chia during plant growth was studied for its interest as forage in green plant part (Peiretti and Meineri, 2008). During plant development, in South America, from April to May, an increase in ambient temperature triggered a decrease in polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels in vegetative plant parts. In Europe, studies performed from May to September, showed a modification of PUFA according to genotypes and location (Grimes *et al.*, 2018). The amount of alpha-linolenic acid (ALA) (ω 3) has been shown to decrease by 23% from early development to the budding stage. This decrease is accompanied by increases in linoleic acid (LA) (ω 6) and lignin levels (Peiretti and Meineri, 2008). No information is available on the variation of fatty acid composition during fruit development of chia. Moreover, all the previous studies were carried out in South America. Few studies have been already performed for Chia cultivation in Europe using some genotypes released in America (Bochicchio *et al.*, 2015; Grimes *et al.*, 2018; Karkanis *et al.*, 2018). These works revealed the possibilities to cultivate, in Europe, some genotypes released in South America. Therefore, the aim of this work is to study the accumulation of oil, fatty acids composition, sterols and tocopherols content and composition during seed filling and maturation of one cultivar of Chia released in France in France.

2 Materials and methods

2.1 Plant material, trial and environmental conditions

Seeds of chia, genotype Oruro®, were provided by PANAM Cie (Villemur, France). The experiment was conducted in 2017, in south-western France at the Regional Centre for Organic Agriculture, at Auch (near Toulouse, south-west France, 43°38'47"N, 0°35'08"E). Field trial was carried out on a deep limestone clay silt soil with high water-holding capacity. The trial was sown at a density of 40 seeds by m² on June 6th, with 0.6 m between rows and at 1 cm of depth. The crops were completely managed under organic and rainfed conditions without any chemical supply. Crushed feathers were applied as an organic N fertiliser at a rate of 60 units ha⁻¹. Weeds were eliminated mechanically. Flowering occurred at end August and maturity took place at the end of September. Four samplings were made at 17 (71–73 BBCH stages), (Hack *et al.*, 1992), 24 (77 and 78 BBCH stages), 27 (80 and 81 BBCH stages) and 35 (83–84 BBCH stages) days after flowering (DAF). Sampling at full maturity was not released.

Table 1 presents rainfall and temperatures during the plant cycle and were compared to the weather data of the last 55 years. This comparison was done in order to explain that climatic conditions prevailed during 2017 were, almost as a “model year” of the last half century. Indeed, amount of rainfall in 2017 was quite similar to those recorded during 55 years in the same area. In contrast, the beginning of the cycle was 0.5 °C warmer than the half century temperature (Tab. 1).

2.2 Extraction and determination of fatty acid and sterol contents and compositions

Fatty acids were determined according to a method based on the oil solubility in cyclohexane and the transformation of fatty acids to their methyl esters (norm ISO 5509: 1990). Whole seeds (1 g) were ground with 10 mL of cyclohexane. After centrifugation at 10 000 g during 15 minutes, the organic phase is set aside and two others extractions are realised. Organic phases are met and filtered on anhydrous Na₂SO₄. Filtrate is dried by nitrogen flow. The fatty acid profile of the triglycerides present in the oil was determined after trans-methylation with TMSH (0.2 M trimethylsulfonium hydroxide in methanol) according to AFNOR Method NF EN ISO 12966-3. The fatty acids methyl esters (FAME) obtained by this transesterification reaction were analyzed with a gas chromatograph (Roche *et al.*, 2006) equipped with a CP-select CB column (50 m long, 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness); helium was used as the carrier gas, at a flow rate of 1.2 mL/min; split injector (1:100) and FID were maintained at 250 °C; the initial oven temperature was set at 185 °C for 40 min, increased

Table 1. Mean monthly temperatures and rainfall during the cropping season of 2017 and average of 55 years in Auch (near Toulouse, South West of France).

Month	Rainfall (mm)		Temperature (°C)	
	2017	55 years	2017	55 years
June	65,3	61,1	21,8	18,9
July	35,3	47,1	21,7	21,5
August	57,2	58,3	22,1	21,3
September	52,9	55,9	16,7	18,5
October	60,4	56,8	15	14,4
November	17,6	57,2	7,2	9
December	92,9	68,1	6,1	6,2
Mean June-Oct			19,46	18,92
Sum June-Oct	271,1	279,2		
Mean Aug-Sept			19,4	19,9
Sum Aug-Sept	110,1	114,2		

to 250 °C at a rate of 15 °C/min and maintained at this temperature for 10 min. Sterol content was determined by gas chromatography (Roche *et al.*, 2010a). We introduced 50 µL of a 2 mg/mL solution of cholestanol in chloroform in to a 15 mL screw top tube. The chloroform was then eliminated by evaporation. A test run was then carried out with the addition of 100 mg of oil to the tube, followed by 2 mL of 1 MKOH in ethanol. The mixture was vortexed and heated at 75 °C in a water bath for 30 min. It was then allowed to cool to room temperature; 1 mL of distilled water was added and the mixture was vortexed. The unsaponifiable material was then extracted in 6 mL of cyclohexane. We collected 160 µL of the cyclohexane phase, which we then silylated by adding 40 µL of BSTFA/TMCS (99/1 mixture). The sample was heated for a few minutes at 103 °C and then 1 µL was injected into a Perkin-Elmer gas chromatograph equipped with an Agilent VF-5ms column (30 m long, internal diameter of 0.25 mm, film thickness of 0.25 µm) and coupled to a flame ionization detector operating at 355 °C. The carrier gas was helium, at a column head pressure of 100 kPa. The thermal conditions were as follows: 55 °C for 0.5 min, an increase in temperature of 200 °C/min to 340 °C, then maintenance at 340 °C for 30 min for the injector; 160 °C for 0.5 min, then an increase of 20 °C/min to 260 °C, then of 2 °C/min to 300 °C and 45 °C/min to 350 °C for the oven. The various sterols were identified by comparing their retention times with those of commercial standards or reference values. The sterols were quantified against an internal standard.

Tocopherol content was determined by high-performance liquid chromatography. We solubilized 10 mg of oil in 1 mL of cyclohexane. We then injected 20 µL of the resulting solution into a liquid chromatography system (Dionex) equipped with a Kromasil 100 SIL 5 µ column (250 mm long, with an internal diameter of 4 mm). A mixture of 99.5% isooctane and 0.5% isopropanol (v/v) was used as the mobile phase, at a flow rate of 1.1 mL/min. Tocopherols were detected with a fluorimeter (Dionex), with an excitation wavelength of 290 nm and an emission wavelength of 317 nm. The tocopherols present in the oil were quantified against an external standard, and were identified by a comparison of retention times with those of reference standards.

2.3 Statistical data analysis

Statistical analyses were carried out on all the plots with three analytical replications. Analyses of variance and Duncan tests for means comparison between seed development stages were applied. The statistical analyses were performed using a statistical package (Sigmastat Version 2.0, USA).

3 Results and discussion

3.1 Oil yield

Table 2 presents oil content and fatty acid composition during seed fruit development of chia. Oil yield of chia seed has been found to vary between 23.3%–28.4% at different stages of seed fruit development (Tab. 2). Oil content increased gradually fruit development and reached the highest value at 27 days after flowering (DAF). Nevertheless, this value decreased slightly at 35 DAF. This result obtained under organic cultivation are quite in the range of values already reported for different genotypes cultivated in South America (Ayerza, 1995, 2010; Ayerza and Coates, 2009, 2011) or obtained by different extraction methods (Sayed-Ahmad, 2018) or by using different solvents (Segura-Campos *et al.*, 2014). Recent study conducted in Germany revealed higher oil yield than in our study (Grimes *et al.*, 2018). This result could be explained by genotypic, environmental factor, as well as method and solvent of extraction. Indeed, the genotype and locations of cultivation differed from their climatic conditions. Moreover, Grimes *et al.* (2018) used hexane while, cyclohexane was used in our study. This difference of chemical structure may induce difference in oil extraction (Oladipo and Betiku, 2019). Since, the seeds were harvested before full maturation, the slight decrease of oil content observed at 35 DAF could be, probably, due to respiration losses (Roche *et al.*, 2016; Belo *et al.*, 2018). Accumulation of oil in oilseed crops is regulated by the “Fatty Acid Synthetase” enzymatic system, which achieves differently during fruit development phases. Thus, at earlier phases, the FA-Synthetase system was induced, and oil content was increased. When oil content reached the plateau phase, these enzymes were less active and

Table 2. Fatty acids (%) and oil (%) accumulation during seed ripening of chia seed in 2017.

Fatty acid (%)	Days after flowering			
	17	24	27	35
OY	23.3d	26.9c	28.4a	27.4b
Saturated fatty acids (SFA)				
C16:0	9.2±0.0a	8.4±0.1b	8.2±0.0b	8.3±0.1b
C18:0	4.0±0.0a	3.4±0.0c	3.7±0.0b	3.4±0.0c
Total	13.2±0.0a	11.8±0.1b	11.9±0.0b	11.6±0.1b
Monounsaturated fatty acids (MUFA)				
C18:1n7	1.1±0.0c	1.0±0.0c	7.7±0.0a	7.4±0.1b
C18:1n9	11.3±0.1a	7.7±0.1b	0.9±0.0c	1.0±0.0c
Total	12.4±0.1a	8.7±0.1b	8.7±0.0b	8.4±0.1c
Polyunsaturated fatty acids (PUFA)				
C18:2n6	22.0±0.1a	19.9±0.1c	20.4±0.1b	20.0±0.1c
C18:3n3	52.4±0.2c	59.6±0.2a	59.0±0.0b	60.0±0.3a
Total	74.4±0.3b	79.5±0.3a	79.4±0.0a	80.0±0.4a
SFA/MUFA	1.06	1.36	1.37	1.38
SFA/PUFA	0.18	0.15	0.15	0.15
ω 6/ ω 3	0.42	0.33	0.35	0.33
Water content (%)	63.1±1.2a	52.7±1.0b	39.0±1.1c	25.2±0.9c

Data were means ± SD of three replicates. C16:0 (Palmitic acid); C18:0 (Stearic acid); C18:1n7 (vaccenic acid); C18:1n9c (oleic acid); C18:2n6c (linoleic acid); C18:3n3 a (linolenic acid); SFA/UFA (ratio saturated/unsaturated fatty acids); ω 3/ ω 6 (ratio linolenic acid/linoleic acid); OY (oil yield). In same line, means with the same letter are not significantly different at 0.05 probability.

less efficient; this in turn reduced the rate of oil accumulation (Msaada *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2015).

3.2 Fatty acid composition

Two saturated (palmitic and stearic acids), two monounsaturated (vaccenic and oleic acids) and two polyunsaturated (linoleic and linolenic acids) fatty acids were detected during chia fruit development (Tab. 2). Saturated fatty acids (SFA) constituted 13% of total fatty acids at 17 DAF, and decreased to reach 11.6% at 35 DAF. This decrease was more marked for the monounsaturated fatty acids (MUFA). Indeed, this trait decreased by 30% between 17 and 35 DAF (Tab. 2). In contrast, polyunsaturated fatty acids (PUFA) increased from 74% (at 17 DAF) to 80% (at 35 DAF). Linolenic acid, linoleic, oleic stearic and palmitic acids were the major fatty acids (Tab. 2). Nevertheless, the fatty acids accumulation did follow neither the same trend nor the same speed. Indeed, at earlier stages of fruit development (17 DAF), palmitic, stearic, oleic and linoleic acids were at their higher level in the seed. The content of these fatty acids declined to reach its lowest level around the 35th day after flowering. Moreover, while stearic, palmitic and linoleic acids decreased slightly oleic acid declined more than ten times between 17 and 35 DAF (Tab. 2). In the same time, linolenic and vaccenic acids followed the opposite path with a progression of their content to reach the highest content between 27 and 35 DAF (Tab. 2). The ratio of ω 6/ ω 3 followed similar trend. In fact, this ratio was highest at 17 DAF and decreased rapidly to reach a plateau at 24 DAF (Tab. 2). Similar trends have been reported in other species from different botanical families (Hamrouni-Sellami *et al.*, 2007; Msaada *et al.*, 2009; Sriti *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2015; Roche *et al.*, 2016). The ratio of unsaturated to saturated

fatty acids increased markedly from 6.6 (17 DAF) to 7.5 (24 DAF) and remained constant until complete maturity. These values are similar to those reported recently in Germany (Grimes *et al.*, 2018).

The fatty acids' accumulation seems to follow the biosynthesis dynamics as described in Kennedy pathway evolved acyl-CoA elongase and desaturases enzymes that could explain the decrease of saturated FA which served to synthesize polyunsaturated fatty acids. Moreover, in our study linoleic acid level was nearly 15% higher than results reported previously (Ayerza, 1995, 2010; Ayerza and Coates, 2009, 2011; Ciftçi *et al.*, 2012). This difference could be due to genotype and climatic conditions. Indeed, Oruro® is newly released genotype which was cultivated in France for the first time. The ratio of SFA/MUFA increased by more 40% (Tab. 2) from 17 to 24 DAF, while SFA/PUFA ratio decreased for the same period from 0.18 to 0.15. Both ratios remained constant until maturity (Tab. 2). These values are similar to those reported recently in Germany (Grimes *et al.*, 2018). Moreover, ω 3/ ω 6 ratio of the chia oils varied from 2.4 (17 DAF) to 3.0 (24–35 DAF) during the fruit development. These values are in lines with those previously reported results even in other growth conditions and other genotypes (Ayerza, 1995, 2010; Ayerza and Coates, 2009, 2011; Grimes *et al.*, 2018; Sayed-Ahmad, 2018). These values are significantly higher than those of most vegetable oils, e.g. canola oil (0.36), olive oil (0.08–0.12), soybean oil (0.15), Safflower (0.01) Atlas pistachio (0.10) and walnut oil (0.25) (Galão *et al.*, 2014; Ojeda-Amador *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2018; Beyzi *et al.*, 2019; Labdelli *et al.*, 2019; Roche *et al.*, 2019). The tocopherol content increased in same way between 17 to 24 DAF (Tab. 3). It is well known that these molecules act as antioxidant in order to protect lipids oxidation. This could explain the concomitant

Table 3. Phytosterol and tocopherols accumulation during seed ripening of chia seed in 2017.

Days after flowering (DAF)				
Phytosterols (mg/100 g of oil)	17	24	27	35
Campesterol	99.7±0.6a	92.2±0.8b	85.7±1.6c	86.3±1.1c
Stigmasterol	42.5±0.3a	37.5±0.9b	34.1±0.6c	34.6±0.7c
β-Sitosterol	460.7±4.3a	454.3±7.6a	431.2±6.1b	429.4±9.7b
Δ-5 Avenasterol	46.8±2.9a	39.7±0.1b	39.9±1.5b	36.6±0.7c
Total Desmethylsterols	649.7±5.9a	623.6±9.5b	590.9±8.7c	586.9±11.6c
Gramisterol	15.2±0.1c	14.1±0.2d	17.2±0.1a	15.9±0.2b
Citrostadienol	16.3±0.3b	14.8±0.0c	20.1±0.6a	18.3±1.5a
Cycloartenol	22.8±1.4a	16.8±1.0b	17.4±0.7b	18.9±1.4b
Methylen Cycloartanol	22.2±1.2a	15.11±0.5d	17.9±0.8b	16.0±0.2c
Total Di and Methylsterols	76.5±2.8a	60.8±1.4c	72.5±1.5a	69.1±1.9ab
Total Sterols	726.2±3.1a	684.4±8.1b	663.5±9.2c	656.0±13.2c
Days after flowering (DAF)				
Tocopherol (mg/100 g of oil)	17	24	27	35
α-tocopherol	1.5±0.1b	1.8±0.1a	1.4±0.0b	1.5±0.1b
γ-tocopherol	38.8±1.8b	45.3±2.7a	47.9±0.6a	47.9±1.7a
δ-tocopherol	1.6±0.0c	1.7±0.2b	2.0±0.0a	1.9±0.1ab
Total tocopherols	42.0±1.9b	48.8±3.0a	51.3±0.7a	51.4±1.9a

In same line, means with the same letter are not significantly different at 0.05 probability.

accumulation of both polyunsaturated fatty acids and tocopherols in same way.

Supply of chia seeds in alimentation on rat blood plasma resulted in significant reduction of triglycerides (TG) and low-density lipoproteins (LDL) were significantly reduced, while, high-density lipoproteins (HLD) and omega-3 (PUFA) have decreased (Ayerza and Coates, 2007; Fernandez *et al.*, 2008). Relationships between fatty acids composition of diet and some diseases, like cardiovascular diseases or diabetes, have been extensively reported (Betti *et al.*, 2009). This also true for chia seed (Nieman *et al.*, 2009; Guevara-Cruz *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2012). Indeed, PUFA are necessary for the proper functioning of the brain, the eyes, and the entire nervous system and to prevent the risk of cardiovascular diseases (Corley and Tinker, 2003; Vedtofte *et al.*, 2011). Mono and polyunsaturated present an effective action in lowering total cholesterol (Gretchen and Heather, 2014; Kratz *et al.*, 2002), and reducing the risk of breast cancer (Kushi and Giovannucci, 2002). Moreover, linoleic acid helps to prevent human diseases, particularly cardiovascular disease, and certain disorders like Alzheimer's disease (Khan *et al.*, 2015). The oil of chia is composed of 75% of mono and polyunsaturated fatty acids and therefore constitutes very healthy oil for human and could increase the lowering of risks of cardiovascular diseases. Furthermore, the recommendations of the FAO as well as Food and Alimentary national Agencies, concerning the ratio saturated to unsaturated and linoleic to linolenic acids, are clearly established (FAO, 2010; Kalonji *et al.*, 2012; Schwingshackl and Hoffmann, 2012). Indeed, minimum intake values PUFA to prevent deficiency symptoms are estimated to be 2.5% of energy for linoleic acid plus 0.5% of energy for linolenic acid (FAO, 2010). For MUFA intakes, international recommendations vary greatly between 12–25%. Moreover, the ratio of linoleic to linolenic must be lesser than five (Kalonji *et al.*, 2012; Ristić-Medić *et al.*, 2013; Labdelli *et al.*, 2019). Our results showed, at 24 DAF, the chia seeds

fulfill the recommendations mentioned above (Tab. 2). This fact reinforced the great interest to harvest and use seed of chia before maturity as reported in other studies (Msaada *et al.*, 2009; Roche *et al.*, 2010b, 2016; Sriti *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2015; Belo *et al.*, 2018).

3.3 Sterols and tocopherols contents and compositions

Chia seeds contain between 656 and 726 mg/100 g of oil of total sterols. Eighty-nine percent of them are desmethylsterols represented mainly by β-sitosterol and campesterol at a level of 140 mg/100 g SDM (Tab. 3). Sterols content observed in our study were quite higher than those reported by Ciftçi *et al.* (2012) Dąbrowski *et al.* (2017) and Sayed-Ahmad (2018), who observed a range of 402–508 mg.100 mL⁻¹ of oil. These differences can be explained by both genotypic and environmental effect. As already presented, our study was based on a new cultivar developed in Europe and cultivated in France for the first time.

During seed filling and maturation of chia seeds phytosterols content was higher at 17 DAF and followed the progressive and slight decrease to reach a minimum in the whole seed at 27 and 35 DAF (Tab. 3). Sterol concentration differed according to sterol category. Desmethylsterol concentration followed similar trend that total sterols and was the highest at 17 DAF. This result was expected since desmethylsterols represented more than 89% of total phytosterols (Tab. 3). In contrast, the concentration of dimethyl- and methylsterol content varied during grain filling with the highest values were observed at 17 and 27 DAF and the lowest ones at 24 DAF (Tab. 3). Methylcycloartanol and cycloartenol (dimethylsterol category) showed higher value at 17 DAF followed by a decrease (24 DAF) and an increase after this date. In the methylsterol category, citrostadienol and gramisterol content increased also until 27 DAF then

decreased until harvest (Tab. 3). Nevertheless, the dynamics of these two categories of sterols seems to be linked. Indeed, dimethylsterols serve as precursor for the synthesis of methylsterols (Merah *et al.*, 2012). The decrease of dimethylsterols observed at 24 DAF resulted in the increase of the level of methylsterols at 27 DAF, as reported in other species (Merah *et al.*, 2012; Roche *et al.*, 2016).

Tocopherols content and composition of chia during fruit development is presented in Tab. 3. Content of tocopherols varied slightly. High level of tocopherols was noticed along the fruit development. A slight decrease was observed at 24 DAF to increase again and reaching the highest value at 27 DAF. As for sterols, these results were higher than those reported in other works (Ciftçi *et al.*, 2012; Dąbrowski *et al.*, 2017; Sayed-Ahmad, 2018). The main isomer was γ tocopherol that represented more than 92 of the total tocopherols as already reported by (Ciftçi *et al.*, 2012; Sayed-Ahmad, 2018). In contrast, Dąbrowski *et al.* (2017), who used different methods of extraction, observed nearly 5 to 7% more γ tocopherol than in our study.

The level of these compounds is not only dependent on extraction method (Dąbrowski *et al.*, 2017), but also on genotype and environment (Sriti *et al.*, 2011; Msaada *et al.*, 2009; Roche *et al.*, 2010b).

4 Conclusion

This work aimed to investigate the fatty acid, sterols compositions and oil accumulation in Chia (*Salvia hispanica* L.) seed, cultivar Oruro© released in France, from onset of seed filling until maturation. This was the first report on bioaccumulation of oil and fatty acid in chia seed. Results demonstrated that the highest oil yield was achieved at 27 DAF. Fatty acid profile varied greatly during fruit development. Linolenic acid (60% of total fatty acids at maturity) reached its higher level at 35 days after flowering. In addition, polyunsaturated fatty acids increased, whereas saturated and monounsaturated fatty acids decreased significantly during fruit development. The ratio of $\omega 6/\omega 3$ was highest at 17 DAF and lowest at 35 DAF. Therefore, if the objective is to decrease the $\omega 6/\omega 3$ ratio of it will be preferable to harvest at 35 DAF (which is not the full maturity in our study). In contrast, if the aim is to harvest higher oil content and higher tocopherol level, seed should be harvest at 27 DAF or at full maturity. Our results highlighted the possibility to seeds of chia according their components concentration. Moreover, this requires the development of techniques for harvesting, storing and probably drying of fruits. These results need to be ascertained by other field experiments.

Acknowledgments. This work benefited from the support of the Occitanie Region, European support to through the Chia’Innov (RECH no. 16004168, 2017). The authors gratefully acknowledge C. Bonillo from the Mirandette experimental station in Marseube, Compagnie d’Aménagement des Coteaux de Gascogne (in Gascony, south of France) for his rigor and his help in the experiments.

Author contributions

Z.M. is the project Manager. Z.M. and O.M. conceptualization. G.G., M.C., C.P. and O.M developed the methodology

and performed the experiments and the measurements. M.C., G.G. and C.P. assisted with measurements. O.M., G.G. and Z.M. contributed to the analysis and interpretation of the data. G. G. Z.M. and O.M. contributed to data collection and to the writing of the manuscript.

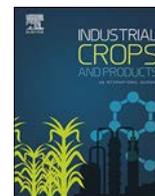
Conflicts of interest. The authors declare that they have no conflicts of interest in relation to this article.

References

- Ayerza R. 1995. Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *J Am Oil Chem Soc* 72: 1079–1081.
- Ayerza R. 2010. Effects of seed color and growing locations on fatty acid content and composition of two chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes. *J Am Oil Chem Soc* 87: 1161–1165.
- Ayerza R, Coates W. 2007. Effect of dietary alpha-linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *Ann Nutr Metabol* 51: 27–34. DOI: [10.1159/000100818](https://doi.org/10.1159/000100818).
- Ayerza R, Coates W. 2009. Influence of environment on growing period and yield, protein, oil and α -linolenic content of three chia (*Salvia hispanica* L.) selections. *Ind Crops Prod* 30: 321–324.
- Ayerza R, Coates W. 2011. Protein content, oil content and fatty acid profiles as potential criteria to determine the origin of commercially grown chia (*Salvia hispanica* L.). *Ind Crops Prod* 34: 1366–1371.
- Belo RG, Velasco L, Nolasco SM, Izquierdo NG. 2018. Dynamics of phytosterols content and concentration in sunflower grains. *Crop Pasture Sci* 69: 724–732.
- Betti M, Perez TI, Zuidhof MJ, Renema RA. 2009. Omega-3-enriched broiler meat: 3. Fatty acid distribution between triacylglycerol and phospholipid classes. *Poultry Sci* 88: 1740–1754.
- Beyzi E, Gunes A, Buyukkilic Beyzi S, Konca Y. 2019. Changes in fatty acid and mineral composition of rapeseed (*Brassica napus* ssp. *oleifera* L.) oil with seed sizes. *Ind Crops Prod* 129: 10–14.
- Bohicchio R, Phillips TD, Lovelli S, *et al.* 2015. Innovative crop productions for healthy food: the case Chia (*Salvia hispanica* L.). In: Vastola A, ed. The sustainability of agro-food and natural resource systems in the Mediterranean Basin. Basel, Switzerland: Springer International Publishing, pp. 29–45.
- Capitani MI, Spotorno V, Nolasco SM, Tomás MC. 2012. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT-Food Sci Technol* 45: 94–102.
- Ciftçi ON, Przybylski R, Rudzińska M. 2012. Lipid components of flax, perilla, and chia seeds. *Eur J Lipid Sci Technol* 114: 794–800.
- Corley RHV, Tinker PB. 2003. The oil palm. 4th ed. Oxford, Malden MA: Blackwell Science.
- Dąbrowski G, Konopka I, Czaplicki S, Tańska M. 2017. Composition and oxidative stability of oil from *Salvia hispanica* L. seeds in relation to extraction method. *Eur J Lipid Sci Technol* 119: 1–9.
- FAO. 2010. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation, 10–14 November 2008 in Geneva. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fernandez I, Videiros SM, Ayerza R, Coates W, Pallaro A. 2008. Impact of chia (*Salvia hispanica* L.) on the immune system: preliminary study. *Proc Nutr Soc* 67. DOI: [10.1017/S0029665108006216](https://doi.org/10.1017/S0029665108006216).
- Galão OF, Carrão-Panizzi MC, Mandarinino JMG, *et al.* 2014. Differences of fatty acid composition in Brazilian genetic and

- conventional soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) grown in different regions. *Food Res Int* 62: 589–594.
- Guevara-Cruz M, Tovar AR, Aguilar-Salinas CA, *et al.* 2012. A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* 142: 64–69.
- Gretchen V, Heather R. 2014. Position of the Academy of nutrition and dietetics: dietary fatty acids for healthy adults. *J Acad Nutr Diet* 114: 136–153.
- Grimes SJ, Phillips TD, Hahn V, Capezzone F, Graeff-Hönninger S. 2018. Growth, yield performance and quality parameters of three early flowering Chia (*Salvia hispanica* L.) genotypes cultivated in Southwestern Germany. *Agriculture* 8: 154. DOI: [10.3390/agriculture8100154](https://doi.org/10.3390/agriculture8100154).
- Hack H, Bleiholder H, Buhr L, *et al.* 1992. Einheitliche Codierung der phänologischen Entwicklungsstadien mono- und dikotyle Pflanzen – Erweiterte BBCH-Skala. *Allgemein –. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz* 44: 265–270.
- Hamrouni-Sellami I, Salah HB, Kchouk ME, Marzouk B. 2007. Variations in phytosterol composition during the ripening of Tunisian safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Pakistan J Biol Sci* 10: 3829–3834.
- Jin F, Nieman DC, Sha W, Xie G, Qiu Y, Jia W. 2012. Supplementation of milled chia seeds increases plasma ALA and EPA in postmenopausal women. *Plant Foods Hum Nutr* 67: 105–110.
- Kalonji E, Margaritis I, Morise A, Legrand P. 2012. Une nouvelle approche scientifique pour l’actualisation des références nutritionnelles en acides gras. Réalités cardiologiques. *Rev Gen* 4: 1–11.
- Karkanis AC, Kontopoulou CK, Lykas C, Kakabouki I, Petropoulos SA, Bilalis D. 2018. Efficacy and selectivity of pre- and post-emergence herbicides in chia (*Salvia hispanica* L.) under Mediterranean semi-arid conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 46: 183–189.
- Khan S, Choudhary S, Pandey A, Khan MK, Thomas G. 2015. Sunflower oil: efficient oil source for human consumption. *Emerg Life Sci Res* 1(1): 1–3.
- Kratz M, Cullen P, Kannenberg F, *et al.* 2002. Effects of dietary fatty acids on the composition and oxidizability of low-density lipoprotein. *Eur J Clin Nutr* 56: 72–81.
- Kushi L, Giovannucci E. 2002. Dietary fat and cancer. *Am J Med Sci* 113(9): 63s–70s.
- Labdelli A, Zémour K, Simon V, Cerny M, Adda A, Merah O. 2019. Pistacia atlantica Desf., a source of healthy vegetable oil. *Appl Sci* 9: 2552. DOI: [10.3390/app9122552](https://doi.org/10.3390/app9122552).
- Merah O, Langlade N, Alignan M, *et al.* 2012. Genetic control of phytosterol content in sunflower seeds. *Theoret Appl Genet* 125: 1589–1601.
- Msaada K, Hosni K, Ben Taarit M, Chahed T, Hammami M, Marzouk B. 2009. Effects of growing region and maturity stages on oil yield and fatty acid composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit. *Sci Horticult* 120: 525–531.
- Nguyen QH, Talou T, Cerny M, Merah O. 2015. Oil and fatty acid accumulation during coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit ripening under organic agriculture. *Crop J* 3: 366–369.
- Nieman DC, Cayea EJ, Austin MD, Henson DA, McAnulty SR, Jin F. 2009. Chia seed does not promote weight loss or alter disease risk factors in overweight adults. *Nutr Res* 29: 414–418.
- Ojeda-Amador RM, Salvador MD, Gómez-Alonso S, Fregapane G. 2018. Characterization of virgin walnut oils and their residual cakes produced from different varieties. *Food Res Int* 108: 396–404.
- Oladipo B, Betiku E. 2019. Process optimization of solvent extraction of seed oil from *Moringa oleifera*: an appraisal of quantitative and qualitative process variables on oil quality using D-optimal design. *Biocatal Agric Biotechnol* 20: 101187. DOI: [10.1016/j.cbab.2019.101187](https://doi.org/10.1016/j.cbab.2019.101187).
- Peiretti PG, Meineri G. 2008. Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (*Salvia hispanica* L.) seed supplements. *Meat Sci* 80: 1116–1121.
- Ristić-Medić D, Vučić V, Takić M, Karadžić I, Glibetić M. 2013. Polyunsaturated fatty acids in health and disease. *J Serbian Chem Soc* 78: 1269–1289.
- Roche J, Alignan M, Bouniols A, Cerny M, Mouloungui Z, Merah O. 2010a. Sterol concentration and distribution in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) during seed development. *Food Chem* 119: 1451–1456.
- Roche J, Alignan M, Bouniols A, *et al.* 2010b. Sterol content in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) as affected by genotypes and environmental conditions. *Food Chem* 121: 990–995.
- Roche J, Bouniols A, Cerny M, Mouloungui Z, Merah O. 2016. Fatty acid and phytosterol accumulation during seed ripening in three oilseed species. *Int J Food Sci Technol* 51: 1820–1826.
- Roche J, Mouloungui Z, Cerny M, Merah O. 2019. Effect of sowing date on fatty acid and phytosterols patterns of *carthamus tinctoria* L. *Appl Sci* 9(14): 2839. DOI: [10.3390/app9142839](https://doi.org/10.3390/app9142839).
- Rodrigues N, Casal S, Peres AM, *et al.* 2018. Effect of olive trees density on the quality and composition of olive oil from cv. Arbequina. *Sci Horticult* 238: 222–233.
- Sayed-Ahmad B. Étude de l’agro-raffinage de graines d’apiaceae, Lamiaceae et Chenopodiaceae pour la production de molécules biosourcées en vue d’application en industrie cosmétique. Thèse de Doctorat, INP Toulouse, 2018. 257 p.
- Schwingshackl L, Hoffmann G. 2012. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic review and meta-analyses. *Nutrients* 4: 1989–2007.
- Segura-Campos MR, Ciau-Solís N, Rosado-Rubio G, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. 2014. Chemical and Functional Properties of Chia Seed (*Salvia hispanica* L.) Gum. *Int J Food Sci* 49: 241053, 1–5.
- Sriti J, Talou T, Faye M, Vilarem G, Marzouk B. 2011. Oil extraction from coriander fruits by extrusion and comparison with solvent extraction processes. *Ind Crops Prod* 33: 659–664.
- Vedtofte MS, Jakobsen MU, Lauritzen L, Heitmann BL. 2011. Dietary α -linolenic acid, linoleic acid, and n-3 long-chain PUFA and risk of ischemic heart disease. *Am J Clin Nutr* 94: 1097–1103.

Cite this article as: Gravé G, Mouloungui Z, Poujaud F, Cerny M, Pauthe C, Koumba IS, Diakaridja N, Merah O. 2019. Accumulation during fruit development of components of interest in seed of Chia (*Salvia hispanica* L.) cultivar Oruro© released in France. *OCL* 26: 50.



Effect of dehulling method on the chemical composition of the lipid constituents of the kernels and oils of *Ricinodendron heudelotii* seeds

Diakaridja Nikiema^{a,b}, Zéphirin Mouloungui^{a,*}, KOUA oi Koua^b, Muriel Cerny^a, Éric Lacroux^a, Romain Valentin^a, ADJOU Ané^b

^a Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRA, Toulouse, France

^b Laboratoire de chimie organique et de substances naturelles, UFR SSMT, Université Félix Houphouët Boigny Cocody, Equipe « synthèses structurales », 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

ARTICLE INFO

Keywords:

Ricinodendron heudelotii
Traditional heat treatment
Manual mechanical dehulling
 α -eleostearic acid
 β -eleostearic acid
Catalpic acid

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the lipids present in the oil and kernels of *Ricinodendron heudelotii* seeds. Two dehulling methods were used to extract kernels from their husks: a heat treatment and a manual mechanical dehulling technique. Oil from kernels obtained by traditional heat treatment of seeds had a kinematic viscosity of 169 ± 0.5 mPa.s, and an iodine value of 175.6 ± 1.1 g/100 g oil. The oil from kernels isolated by mechanical dehulling had a kinematic viscosity of 128 ± 0.11 mPa.s and an iodine value of 195.2 ± 2.0 g/100 g oil. Determination of the minor compound profile of the oil revealed a total tocopherol content of 135.0 ± 0.4 mg oil from kernels isolated by traditional heat treatment. The oil obtained from kernels isolated by manual mechanical dehulling had a total tocopherol content of 178.3 ± 0.4 mg/100 g. An analysis of the fatty-acid profile of the oil from kernels isolated by traditional heat treatment revealed the presence of α -eleostearic acid ($50.5\% \pm 0.1$), linoleic acid ($24.0\% \pm 0.0$), β -eleostearic ($8.4\% \pm 0.0$) and catalpic acid ($0.40\% \pm 0.1$). By contrast, the fatty acid composition of oil from kernels isolated by manual mechanical dehulling was of α -eleostearic acid ($60.1\% \pm 0.2$), linoleic acid ($22.8\% \pm 0.1$).

Ricinodendron heudelotii oil has a very high level ($84.4 \pm 0.4\%$) of polyunsaturated fatty acids (CLnA). Some analysis of the triglycerides present in the oil revealed the potential isomerization of α -eleostearic acid to form β -eleostearic acid and catalpic acid.

1. Introduction

Ricinodendron or *Jatropha heudelotii* is a tree belonging to the Euphorbiaceae family. It is known under various common names in Africa: djansan in Cameroon, akpi in Côte d'Ivoire and wama in Ghana. It can grow to a height of almost 30 m, and it produces drupes, each of which contains no more than four seeds. It grows in humid tropical zones and its distribution range in Africa extends from Senegal to Kenya. The fruits of *Ricinodendron heudelotii* reach maturity between June and September. They are harvested periodically, under the trees, by women.

Since the United Nations Conference on Environment and Development (UNCED) in Rio in 1992, the ecological and socio-economic importance of non-ligneous forest products (NLFPs) has been recognized in the management of forest ecosystems. In Cameroon, an economic and social model based on NLFPs was recently implemented, in order to structure the NLFP sectors, including the *Ricinodendron*

heudelotii sector. This sector was included in the model based on the properties of the lipids this tree produces, its cultural importance, its dietary value and its potential profitability (Roques et al., 2019). The seeds are extracted from the fruits and boiled to extract the kernels, which are used as aroma-providing condiments in traditional African cooking. The oil has an agreeable flavor and is very popular for cooking. In the last few years, *Ricinodendron heudelotii* has been used by the National Center for Agronomic Research (CNRA) in Côte d'Ivoire as part of an agroforestry system based on cocoa plantations, and in experimental fields, with a view to its domestication. There are two main reasons for wanting to domesticate *Ricinodendron heudelotii*: (i) the fruits, the kernels of which are rich in oil and sold on most of the markets of West Africa for use as a seasoning and thickening agent in various African dishes (Coulibaly et al., 2018) and (ii) *Ricinodendron heudelotii* is accepted by foresters in Côte d'Ivoire as a canopy tree in cocoa plantations.

This tree has been the subject of several scientific studies in recent

* Corresponding author.

E-mail address: zephirin.mouloungui@ensiacet.fr (Z. Mouloungui).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111614>

Received 2 May 2019; Received in revised form 23 July 2019; Accepted 25 July 2019

0926-6690/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

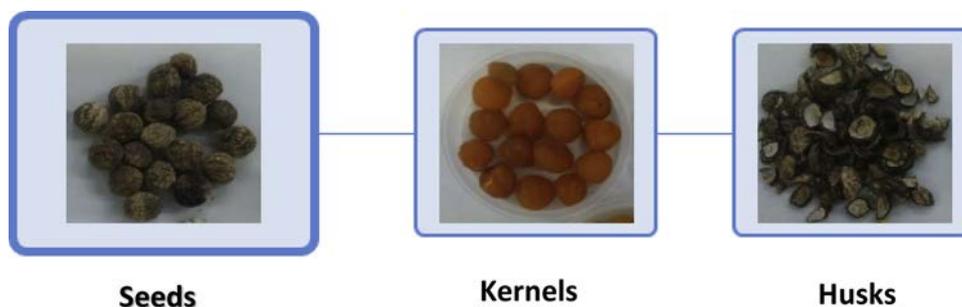


Fig. 1. *Ricinodendron heudelotii* (seeds, kernels, husks).

years. Studies of its kernels have reported an oil content of 42 to 60%, depending on the extraction technique used (Dandjouma et al., 2008). This is a potentially important oleaginous natural resource, due to the high oil content of its seeds. According to studies performed by César Kapseu in 1995 and confirmed by Tchiégang et al. in 1996, the oil from kernels isolated by traditional heat treatment has α -eleostearic acid (51%) and linoleic acid (28%) as its major fatty acids (Kapseu and Tchiegang, 1995; Tchiegang et al., 1997). By contrast, Samuel and coworkers found, in 2011, that the major fatty acid of the oil obtained from kernels isolated in the same conditions was linoleic acid (58.7%) (Yeboah et al., 2011). Leudeu et al., in their 2009 study on oil from kernels isolated by traditional heat treatment, found that the major fatty acid was linoleic acid, which accounted for 36% of the fatty acids present (Leudeu et al., 2009). By contrast, according to Sompila et al. (2014), the major fatty acid in *Ricinodendron heudelotii* oil is α -eleostearic acid, which accounts for 35% of the fatty acids present (Sompila et al., 2014).

The α -eleostearic acid (C18:3 n-5) is a fatty acid containing 18 carbon atoms and three conjugated double bonds (9c, 11 t, 13 t) with the following physico-chemical data : molecular weight 278.42 g/mol, melting point 49 °C, boiling point 235/12 (°C/mm Hg), density 0.902 g/ml (at 50 °C), iodine value 274. This polyunsaturated fatty acid and its isomers (punicic acid, catalpic acid, β -eleostearic acid and jacaric acid) have demonstrated many health benefits. Studies have shown that these bioactive molecules may be used as dietary supplements for treatment of diseases such as obesity, cancer and diabetes (Bialek et al., 2017; Yuan et al., 2014).

Ricinodendron heudelotii oil is a siccative oil, it can be used as a renewable raw material for the formulation of surface coating systems, paints and adhesives, as demonstrated by the work of Assanvo et al. (Assanvo et al., 2015). α -eleostearic acid, β -eleostearic acid and catalpic acid from this oil are polymerizable fatty acids. They can be used in the polymer industry for the synthesis of biodegradable polymers (biopolymers) like tung oil. The importance of CLnA in Phytomedicine may promote the use of *Ricinodendron heudelotii* oil in the pharmaceutical industry.

This overview of the state of the art reveals a variability of fatty-acid profiles for oils extracted from kernels isolated by traditional heat treatment. Certain factors, such as heat, humidity, ultraviolet radiation, and storage time and conditions, can change oil fatty acid composition.

In addition to contributing to the structuring of NLFP sectors, the study performed in Cameroon by Roques et al. in 2019 highlighted the need to improve knowledge of these products and the procedures for their transformation, to target and optimize the parameters likely to influence product quality, including, in particular, oxidation factors. We performed a survey to obtain reliable data concerning the sites at which *Ricinodendron heudelotii* is grown and fruits are harvested in 23 regions of Côte d'Ivoire. We present here a comparative study of the chemical (protein content, oil content, fatty-acid profiles, minor compounds) and physicochemical (kinematic viscosity, iodine value, acid value) properties of oils and kernels obtained by traditional heat treatment or by manual mechanical dehulling.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The seeds of *Ricinodendron heudelotii* used in this study came from Sinfra (6°36'29.4"N 6°01'18.2"W), a community in the Marahoué region of Côte d'Ivoire, in West Africa. The fruits were collected from under the trees, during the month of August 2014. The seeds were extracted from the pulp of the fruit by hand and dried in a ventilated shelter for five days. The seeds were then frozen and stored loose in freezer bags at +4 °C until their transport to the agro-industrial chemistry laboratory in Toulouse, France. They were then stored in a cold room at +4 °C.

2.2. Methods of kernel isolation

Two methods were used to isolate the kernels from the seeds during this study. The first was the traditional heat treatment, performed in a ventilated shelter, and the second was manual mechanical dehulling, performed in the agro-industrial chemistry laboratory in Toulouse, France.

2.2.1. Traditional heat treatment

The seeds of *Ricinodendron heudelotii* consist of a kernel surrounded by a husk (Fig. 1).

The most widely used technique for separating the kernel from the husk is the traditional three-step heat treatment. In the first step, soaking, 5 kg of seeds are immersed in tepid water in a round stainless steel 20-liter cuvette for 24 h. In the second stage, the seeds are boiled in water over a wood fire for 12 h. This process generates sufficient heat to fissure the husk. The final step is the release of the kernels with the aid of a nail or small knife. For the traditional heat treatment in this study, we dehulled the seeds in this way, then dried the kernels in the sun for about 10 days, after which they were frozen and stored in freezer bags at +4 °C.

2.2.2. Manual mechanical dehulling

In this technique, the kernels are released from the seeds without prior treatment. The seeds (Fig. 1) of *Ricinodendron heudelotii* fruits were directly dehulled by hand, one-by-one. A standard pincer-type nutcracker was used, with the seed placed where the walnut would usually be inserted. The two arms of the pincer were closed, exerting sufficient pressure on the seed to break the husk without shattering the kernel inside it. The kernel was then removed from the husk with a small stainless steel spatula.

2.3. Extraction of oil from the *Ricinodendron heudelotii* kernels by two methods

We used two methods of oil extraction, depending on the amount and quality of oil desired for the various analyses. We extracted lipids in solvent with a Soxhlet extractor for measurements of oil content, and

we used the cold extraction of lipids in cyclohexane to obtain oil for chemical and physicochemical characterization. The different solvent-mediated lipid extractions were performed at least three times.

2.3.1. Extraction of lipids with solvent in a soxhlet extractor

The kernels were ground with a bladed grinder. A mass of 15 g of ground kernels was placed in the extraction cartridge and inserted into the Soxhlet extractor. With the aid of 150 ml of cyclohexane in a 200 ml balloon flask, the lipid matter within the ground kernels was extracted by solvent reflux (at about 80 °C) for six hours. The oil was obtained by evaporating off the solvent in a rotary evaporator at 50 °C, under vacuum, at 200 mbars. The amount of oil extracted was then determined relative to the mass of ground material.

2.3.2. Cold extraction in cyclohexane

A mass of 2.5 g of ground kernels (ground in a bladed grinder, as described above) was placed in a 30 ml centrifuge tube with 25 ml of cyclohexane. The tube was vortexed for 30 s and then centrifuged for 15 min at 10,000 x g. The supernatant was decanted off and the organic phase (lipid matter) was recovered. This process was repeated twice. All of the organic phases collected were combined and filtered through a funnel containing a glass fiber filter paper on which a few grams of anhydrous sodium sulfate were placed. The oil was recovered by evaporating off the cyclohexane in a rotary evaporator at 50 °C, under vacuum, at 200 mbars. The amount of oil extracted was then determined relative to the mass of ground material.

2.4. Physicochemical characterization of the kernels by the ADF-NDF method

We used the revised version (March 23, 2011) of the Van Soest three-part sequential analysis procedure to determine the lignocellulosic composition of the *Ricinodendron heudelotii* kernels. The first step was the determination of the insoluble fiber content of 1 g of ground *Ricinodendron heudelotii* kernels from which the lipids had been removed by Soxhlet extraction (cyclohexane), by solubilizing and eliminating the proteins and water-soluble material with a neutral detergent solution (sodium lauryl sulfate) at 95 °C. The residue obtained is known as NDF (neutral detergent fiber). It consists of hemicelluloses, celluloses, lignins and ash. It was filtered and washed with demineralized water heated to 90 °C. Calcination at 450 °C for 6 h was performed to determine the ash content.

The second stage of the procedure was the solubilization of hemicellulose in an acid detergent solution consisting of acetyl trimethyl ammonium bromide in 0.5 M sulfuric acid. The residue obtained by this procedure is called the ADF (acid detergent fiber) and consists of cellulose and lignin. This residue was filtered, washed in hot water and dried.

Finally, the ADF residue was treated with potassium permanganate to oxidize and eliminate lignins, for the determination of cellulose content.

2.5. Determination of protein content

We used an indirect method based on the determination of the percent total nitrogen (% N) by the Kjeldahl method, in accordance with the NF V 18–199 standard. Kjeldahl's method involves mineralization of the organic nitrogen present in the sample to generate ammoniacal nitrogen, which is then determined by titration against acid. For mineralization, a mass of 0.8 g of dried kernels delipidated by the Soxhlet method was placed in a glass tube, to which 12.5 ml of 95% sulfuric acid was added. The mixture was placed in a fume hood for 16 h. It was then mineralized by heating at 400 °C for 1 h. Finally, the analysis was performed with a Kjeltect™ 8400 analyzer.

2.6. Determination of standard values for the oils

Acid value, iodine value, and acidity were determined by volumetric methods, according to the protocols of standards, NF EN ISO 3961 for iodine value and NF EN ISO 660 for acid value and acidity/eleostearic acid equivalent. Acidity was assessed by a theoretical method based on the fatty-acid profile of *Ricinodendron heudelotii* oil.

2.7. Fatty-acid composition determination by gas chromatography (GC)

The fatty-acid profile of the oil was determined by the trimethyl sulfonium hydroxide (TMSH) method (standard NF EN ISO 12966-3, 2016). The oil (15 mg) was solubilized in 1 ml of TBME (tert-butyl methyl ether), methylated with trimethyl sulfonium hydroxide (TMSH, 0.2 ml/l in methanol) and the resulting fatty acid methyl esters (FAMES) were analyzed with a gas chromatograph (Varian 3900) equipped with a CP Select CB column (50 m, 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). We injected 1 µl, using the following parameters: injector in split mode, ratio of 1/100, 250 °C (55 min). The carrier gas was helium, at a flow rate of 1.2 ml/min. The oven temperature was initially set at 185 °C for 40 min, then increased to 250 °C at a rate of 15 °C/minute and maintained at 250 °C for 11 min. The temperature of the flame ionisation detector was set at 360 °C. FAMES were identified by comparing the retention times obtained with those for a mixture of commercial standards, Mix 37 (Sigma Aldrich), tung oil and oil from *Catalpa bignonioides*.

2.8. Determination of tocopherol content by HPLC

The tocopherol content of the oil was determined by HPLC-fluorimetry, according to the analytical method described in the AFNOR NF ISO 9936 standard. We used a liquid-phase chromatograph coupled to a Dionex fluorescence detector ($\lambda_{ex}290$ nm; $\lambda_{em}317$ nm) and an oven heated to a fixed temperature of 22 °C. We injected 20 µl of a 10 mg/ml solution of oil in cyclohexane into the HPLC apparatus. The mobile phase was a mixture of isooctane and isopropanol (99.5/0.5 v/v), at a flow rate of 1.1 ml/minute. Quantification was based on external calibration with standards (α -tocopherol, γ -tocopherol, and δ -tocopherol) from Sigma.

2.9. Determination of sterol content by GC

The determination of sterol content began with the preparation of a 2 mg/ml solution of cholestanol (internal standard). We added precisely 50 µl of this solution (corresponding to 100 µg of cholestanol) to a 15 ml screw-top tube. After chloroform evaporation, 100 mg of oil was added. Saponification was carried out through addition of 2 ml of 1 M KOH in ethanol. The mixture was vortexed and heated for 20 min in a water bath at 75 °C. The reaction mixture was allowed to cool, 1 ml of demineralized water plus 6 ml of cyclohexane were added and the contents of the tube were mixed by vortexing. We allowed the mixture to separate and recovered the organic phase containing the unsaponifiable matter. We mixed 160 µl of this solution with 40 µl of silylation reagent (99% N,O-bis[trimethylsilyl]trifluoroacetamide] plus 1% trimethylchlorosilane: BSTFA/TMCS, 99/1). Sterol determinations were performed by GPC with a Perkin Elmer Auto System XL equipped with a CPSil 8CB (Varian) 30 m x0.25 mm column, with a film thickness of 0.25 µm. The carrier gas was helium, at a column head pressure of 100 kPa. We injected 1 µl of solution in the on-column mode. The oven temperature was maintained at 160 °C for 0.5 min and was then increased gradually to 260 °C at a rate of 20 °C/minute. Oven temperature was then increased to 300 °C at a rate of 2 °C/minute, and finally to 350 °C at a rate of 45 °C/minute. The total analysis time was 50 min. The temperature of the flame ionisation detector (FID) was set at 360 °C (Roche et al., 2006).

3. Results and discussion

3.1. Mapping *Ricinodendron heudelotii* in côte d'ivoire

The localization of *Ricinodendron heudelotii* trees and fruit harvesting was studied at 23 sites: Abidjan, Yamoussoukro, Sinfra, Gagnoa, Tiassalé, Toumodi, Oumé, Divo, Danané, Man, Lakota, San Pedro, Soubré, Adiaké, Adzopé, Kotobi, Bouaké, Arrah, Akoupé, Daloa, Sikensi, Agboville, and Rubino. With the aim of collecting as much information as possible, three villages were selected per site for the collection of information on the presence of *Ricinodendron heudelotii* and kernel production. According to this survey, this plant was present at all the sites evaluated. *Ricinodendron heudelotii* seed harvest and kernel production were strongly linked to the dietary habits of the local population. We identified two large production areas in the south east and south west of the country. Overall, 82.5% of the sites studied produced *Ricinodendron heudelotii* kernels, but there were no harvesting or transformation activities at the remaining 17.5% of the sites at which this plant was found.

In Côte d'Ivoire, the annual harvest of *Ricinodendron heudelotii* seeds generates about 100 tonnes of kernels. The fruits are harvested by the women in certain parts of the country. The kernels are almost exclusively destined for human consumption, by local populations. Much of this production is destined for the supply of large towns, such as Abidjan, Yamoussoukro and Bouaké, for reasons of profitability. The buyers in these towns are solvent and the kernels are sold at 8000 Francs CFA (equivalent to 12 Euros) per kilogram.

3.2. Composition of *Ricinodendron heudelotii* kernels

Table 1 shows a breakdown of kernel contents for kernels obtained by the two dehulling methods. Similar kernel content results were obtained for the two dehulling methods.

Water and dry matter contents were 7% and 93%, respectively, cellulose content was 6%, hemicellulose content was 7.5% and lignin content was 3%. These values indicate that *Ricinodendron heudelotii* kernels have low contents of cellulose, hemicellulose and lignin. By contrast, they have a high protein content, at $21.3 \pm 1.9\%$. This protein content is consistent with the protein contents of 21% reported by Saki et al. (2005), and 24% reported by Coulibaly et al. (2018). According to these results, regardless of the method of kernel isolation used, the same amount of lipid is extracted, corresponding to $47.4 \pm 0.2\%$ of the kernel contents. Similar results were obtained by Dandjouma et al. in 2008 and Saki et al. in 2005, with these authors reporting rates of oil extraction by the Soxhlet method of 50% and 48.9% for kernels isolated by the traditional heating method. The results obtained for protein content and lipid extraction rate indicate that *Ricinodendron heudelotii* seeds can be considered as oleoproteaginous. Such seeds are a good source of both lipids and proteins.

Table 1
Characterization of kernel components.

Kernel samples isolated:		
Constituent contents (%)	By traditional heat treatment	By manual mechanical dehulling
Water	7.3 ± 0.2	7.5 ± 0.1
Dry matter	93.1 ± 0.2	92.5 ± 0.1
Ash	7.3 ± 0.2	7.5 ± 0.1
Cellulose	6.5 ± 0.2	6.1 ± 0.3
Hemicellulose	7.8 ± 0.3	7.5 ± 0.2
Lignin	3.0 ± 0.2	3.2 ± 0.2
Protein	21.3 ± 1.9	21.1 ± 0.2
Oil (Soxhlet extraction)	47.4 ± 0.2	47.3 ± 0.6

Table 2
Physicochemical characteristics of the oils.

Samples of oil from kernels isolated:		
Physical characteristics of the oil	By traditional heat treatment	By manual mechanical dehulling
Density (g /ml at 25 °C)	0.92	0.94
Viscosity (mPa.s)	169 ± 0.5	128.0 ± 0.1
Acid value	5.7 ± 0.3	3.7 ± 0.3
Acidity (% by mass)	2.8 ± 0.2	1.8 ± 0.1
Iodine value	179.6 ± 1.1	195.2 ± 1.7

3.3. Physicochemical characterization of *Ricinodendron heudelotii* oil

Table 2 summarizes the results for kinematic viscosity, iodine value, acid value and acidity for the oils extracted from kernels by the traditional heating method and by manual mechanical dehulling.

The densities of the oil samples obtained following the two dehulling methods were almost identical, at 0.92 g/ml and 0.94 g/ml. This demonstrates the reproducibility of the mass of oil obtained from kernels isolated by the two methods of dehulling. The oil obtained from kernels isolated by traditional heat treatment had a higher viscosity (169 mPa.s), a higher acid value (5.7 ± 0.3) a higher acidity (2.8 ± 0.2) and a lower iodine value (179.6 ± 1.1) than the oil obtained from kernels isolated by manual hulling. This reflects a slight deterioration of the oil during the traditional heat treatment. Indeed, the traditional method for isolating kernels from *Ricinodendron heudelotii* seeds involves uncontrolled techniques, such as a long period of heating in boiling water and the drying of the kernels in the sun, both of which are factors favoring oxidation of the oil. These results demonstrate that the mode of seed treatment for kernel isolation has a significant influence on the iodine value of the extracted oil. Iodine value is lower following the traditional heat treatment of the seeds to isolate the kernels. The iodine values obtained here are different from those reported in previous studies. According to the studies performed by the groups of Tchiégang and Assanvo, the iodine value of this oil is 150 (Tchiégang et al., 2003; Assanvo et al., 2015). In this study, we obtained iodine values of 179.6 ± 1.1 and 195.2 ± 1.7 for the oils extracted from kernels isolated by the two dehulling methods. These values were thus high, for both methods. They indicate that this oil from *Ricinodendron heudelotii* is highly siccative, even more so than tung oil, which has an iodine value of 170 according to Samadzadeh et al. (2011).

3.4. Fatty-acid composition of the oils

Ricinodendron heudelotii is one of the rare highly polyunsaturated plant oils, with a CLnA content of at least 84%, depending on the method used to dehull the kernels. An analysis of the CLnA content of the oils obtained revealed that α -eleostearic acid and linoleic acid were the two principal fatty acids present. Nevertheless, their contents varied with the method used to obtain the kernels. Oil from kernels isolated by manual mechanical hulling without prior treatment contained $60.1 \pm 0.2\%$ α -eleostearic acid and $22.8 \pm 0.1\%$ linoleic acid, whereas oil extracted from kernels obtained by traditional heat treatment contained $50.5 \pm 0.1\%$ α -eleostearic acid and $24 \pm 0.0\%$ linoleic acid. These two oils also contained CLnA known to be isomers of α -eleostearic acid: β -eleostearic acid ($1.1 \pm 0.1\%$ in oil from kernels isolated by manual mechanical hulling and $8.4 \pm 0.0\%$ in oil from kernels isolated by traditional heat treatment) and catalpic acid, which was present only in oil from kernels isolated by traditional heat treatment ($0.40 \pm 0.1\%$). Published results for the CLnA content of *Ricinodendron* oils are shown in Table 3.

Oils extracted from kernels obtained by traditional heat treatment have α -eleostearic acid contents of 32.5% to 51.1% and linoleic acid contents of 28.1% to 36.0%. This composition is similar to the CLnA

Table 3
Published results concerning the chemical composition of *Ricinodendron heudelotii* oil.

Fatty acid	Kapseu 1995 ^c	Dandjouma 2007 ^c	Sompila 2014 ^a	Leudeu 2009 ^a	This study	
					Kernel ^a	Kernel ^b
Palmitic acid C16:0	5.5	6.4	5.4	9.4	3.8 ± 0.0	4.1 ± 0.0
Stearic acid C18:0	6.4	7.5	8.0	10.6	5.1 ± 0.0	5.3 ± 0.0
Oleic acid C18 :1n-9	7.4	7.18	11.2	10.3	6.7 ± 0.0	7.1 ± 0.0
Linoleic acid C18:2n-6	28.3	30.7	28.1	36.0	22.8 ± 0.1	24.0 ± 0.0
α-eleostearic acid C18:3n-5(c,t,t)	51.1	48.4	35	32.5	60.1 ± 0.2	50.5 ± 0.1
β-eleostearic acid C18:3n-5(t,t,t)	—	—	9.7	—	1.1 ± 0.1	8.4 ± 0.0
Catalpic acid C18 :3n-5 (t,t,c)	—	—	1.3	—	0.0	0.40 ± 0.1
Saturated fatty acids (SFAs)	11.9	13.9	13.4	20.0	8.9 ± 0.1	9.4 ± 0.0
Monounsaturated fatty acids (MUFAs)	7.4	7.18	11.2	10.3	6.7 ± 0.0	7.0 ± 0.0
Polyunsaturated fatty acids (CLnA)	79.4	79.07	74.1	68.5	84.4 ± 0.4	83.3 ± 0.1

* kernels bought on the market.

^a kernels isolated by manual mechanical dehulling.

^b kernels isolated by traditional heat treatment.

profile of our oil extracted from kernels obtained by traditional heat treatment: 50.5 ± 0.1% α-eleostearic acid and 24.0 ± 0.0% linoleic acid.

Two parameters must be factored into this comparative study: the location and type of kernel production. Even with the same method of oil extraction in solvent (Soxhlet extraction), CLnA content varied considerably, ranging from 35% to 60% for α-eleostearic acid and 22% to 36% for linoleic acid. Furthermore, another study have reported the presence of β-eleostearic acid and catalpic acid (Sompila et al., 2014). An examination of our data and those of Sompila and al revealed a clear tendency towards a decrease in α-eleostearic acid content in favor of linoleic acid and β-eleostearic acid. For an oil obtained by the traditional dehulling method, an 8.4% β-eleostearic acid content was determined in our study, and 9.7% were found by Sompila and al.

The traditional dehulling method involves some isomerization of α-eleostearic acid. This acid is isomerized into β-eleostearic acid and catalpic acid, in the form of triglycerides in native oil.

The oil enriched in β-eleostearic acid have beneficial effects on human health. According to some studies, this fatty acid may has cytotoxic effects on cancer cells (Shinohara et al., 2012; Sun et al., 2012).

Alpha-eleostearic acid, β-eleostearic acid and catalpic acid in *Ricinodendron heudelotii* oil are isomers of conjugated linolenic acid (CLnA). There are other isomeric fatty acids of CLnA, namely punicic acid (C18:3 9c, 11 t, 13c) in *Punica granatum* oil (79.3%), jacaric acid (C18:3 8 t, 10 t, 12 t) in *Jacaranda mimosifolia* seed oil (62%) (Hernandez et al., 2000; Takagi and Itabashi, 1981).

Recent research shows that these fatty acids from CLnA family are used in phytomedicine. They have a beneficial effect on health. They have favourable physiological effects, such as anti-arteriosclerosis, anti-obesity, anti-tumour, anti-hypertension and anti-cancer (Gasmi and Thomas Sanderson, 2013; Yuan et al., 2014).

α-eleostearic acid in *Momordica charantia* seed oil is a potential therapeutic agent in the treatment of breast cancer and leads to self-destruction of colon cancer cells (Caco-2) (Shinohara et al., 2012).

Punicic acid in *Punica granatum* improve insulin secretion without altering fasting blood sugar (Nekooeian et al., 2014). Catalpic acid in *Catalpa bignonioides* seed oil causes a decrease in fasting blood sugar and insulin (Hontecillas et al., 2008).

3.5. Characterization of the minor constituents of *Ricinodendron heudelotii* oils

Table 4 summarizes the tocopherol content of the oils.

Total tocopherol content was 178.3 mg/100 g for oil extracted from kernels isolated by manual mechanical dehulling and 135 mg/ 100 g for oil extracted from kernels isolated by traditional heat treatment. This value was influenced by the treatment of the seeds before oil extraction

Table 4
Chemical characteristics of the minor components of the oil.

Minor components	Samples of oil from kernels isolated:	
	By traditional heat treatment	By manual mechanical dehulling
Tocopherols (%)		
α-tocopherol	4.0 ± 0.01	7.9 ± 0.02
γ-tocopherol	92.9 ± 0.02	89.9 ± 0.18
δ-Tocopherol	3.1 ± 0.02	2.5 ± 0.46
Total (mg/100 g)	135.0 ± 0.4	178.3 ± 0.4
Sterols %		
Campesterol (%)	7.2 ± 0.11	7.2 ± 0.19
Stigmasterol (%)	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.2
β-sitosterol(%)	83.6 ± 0.5	83.7 ± 0.3
Stigmastanol (%)	1.7 ± 0.01	1.5 ± 0.9
5-avenasterol (%)	4.3 ± 0.11	4.6 ± 0.4
Total sterols (mg/100 g)	412.0 ± 8.0	402.5 ± 8.0

from the kernels. This tocopherol content is similar to that of polyunsaturated oils such as linseed oil, which contain 110–280 mg/100 g. Regardless of the pretreatment method during dehulling, the major constituent was γ-tocopherol, at 92 mg/100 g. However, these results show that the traditional heat treatment degrades the tocopherols present in the oil within the seeds.

An analysis of the sterol composition of *Ricinodendron heudelotii* oil showed that β-sitosterol was the major component, accounting for 83% of the sterols present, and that total sterol content stays the same between seed treatments, ranging from 402.5 ± 8.0 to 412.0 ± 8.0 mg/100 g. *Ricinodendron heudelotii* oil is, thus, moderately rich in sterols, including β-sitosterol in particular.

4. Conclusion

This study focused on the characterization of two sorts of oil from *Ricinodendron heudelotii* kernels: oil from kernels isolated by the traditional heat treatment and oil from kernels obtained by manual mechanical dehulling. The two dehulling methods tested resulted in a different chemical composition readily identifiable in terms of CLnA contents. Oil from kernels isolated by manual mechanical dehulling contained 60.1% ± 0.2 α-eleostearic acid, 22.8% ± 0.1 linoleic acid, and 1.1% ± 0.1 β-eleostearic acid, whereas oil from kernels isolated by the traditional method contained 50.5% ± 0.1 α-eleostearic acid, 24% ± 0.0 linoleic acid, 8.4% ± 0.0 β-eleostearic acid and 0.40% ± 0.1 catalpic acid. Thus, oils from mechanically dehulled kernels were very rich in α-eleostearic acid, whereas oils from kernels dehulled by the traditional method displayed enrichment in β-eleostearic acid and catalpic acid, due to the isomerization of α-eleostearic acid. Oils are rich in CLnA (84%), with high iodine values (180 and 195, respectively). The minor constituents, including γ-tocopherol and

β -sitosterol, were conserved. The kernels contained $21.3\% \pm 1.9$ protein and $47.4\% \pm 0.2$ oil. It is a source of dietary fiber and of polyunsaturated oils, rich in ALA and CLnA. These characteristics make this oil a good candidate for alimentary and nutritional uses.

Acknowledgments

This work was funded by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Côte d'Ivoire and the French government by the program entitled AMURGE-CI C2D.

References

- Assanvo, E.F., Gogoi, P., Dolui, S.K., Baruah, S.D., 2015. Synthesis, characterization, and performance characteristics of alkyd resins based on Ricinodendron heudelotii oil and their blending with epoxy resins. *Ind. Crops Prod.* 65, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.049>.
- Bialek, M., Czauderna, M., Bialek, A., 2017. Conjugated linolenic acid (CLnA) isomers as new bioactive lipid compounds in ruminant-derived food products. A review. *J. Anim. Feed Sci.* 26, 3–17. <https://doi.org/10.22358/jafs/68862/2017>.
- Coulibaly, M., Kouamé, C.A., N'dri, D.Y., Kouassi, N.K., Pereko, K.K.A., Amani, G., 2018. Effect of Post-harvest traditional technologies on the nutrient content and antioxidant compounds of defatted flours from Ricinodendron heudeloti (bail. Pierre ex Pax) Seed Kernels. *Technologies* 6, 37.
- Dandjouma, A.K.A., Tchiegang, C., Kapseu, C., Linder, M., Parmentier, M., 2008. Enzyme-assisted hexane extraction of Ricinodendron heudelotii (bail.) Pierre ex pax seeds oil. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43, 1169–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01583.x>.
- Gasmi, J., Thomas Sanderson, J., 2013. Jacaric acid and its octadecatrienoic acid geoisomers induce apoptosis selectively in cancerous human prostate cells: a mechanistic and 3-D structure–activity study. *Phytomedicine* 20, 734–742. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.01.012>.
- Hernandez, F., Melgarejo, P., Olias, J.M., Artes, F., 2000. Fatty acid composition and total lipid content of seed oil from three commercial pomegranate cultivars. *Production, Processing and Marketing of Pomegranate in the Mediterranean Region: Advances in Research and Technology*. CIHEAM-IAMZ, Zaragoza, Spain, pp. 205–209.
- Hontecillas, R., Diguado, M., Duran, E., Orpi, M., Bassaganya-Riera, J., 2008. Catalpic acid decreases abdominal fat deposition, improves glucose homeostasis and upregulates PPAR α expression in adipose tissue. *Clin. Nutr.* 27, 764–772. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.07.007>.
- Kapseu, C., Tchiegang, C., 1995. Chemical properties of Ricinodendron heudelotii (bail.) Seed oil. *J. Food Lipids* 2, 87–98.
- Leudeu, B.C.T., Tchiegang, C., Barbé, F., Nicolas, B., Guéant, J.-L., 2009. Ricinodendron heudelotii (bail.) Or tetracarpidium conophorum müll. Oils fed to male rats lower blood lipids. *Nutr. Res.* 29, 503–509.
- Nekooiean, A.A., Eftekhari, M.H., Adibi, S., Rajaeifard, A., 2014. Effects of pomegranate seed oil on insulin release in rats with type 2 diabetes. *Iran J Med Sci* 39, 130–135.
- Roche, J., Bouniols, A., Mouloungui, Z., Barranco, T., Cerny, M., 2006. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 287–297.
- Roques, E., Lachaux, C., Tournebize, T., Epanda, A.M., Akongongol, M.M., 2019. Un modèle économique et social pour la conservation de la biodiversité: des filières oléagineuses durables issues de produits forestiers non ligneux (PFNL) pour préserver la réserve de faune du dja (RFD) au Cameroun. *OCL* 26, 7.
- Shinohara, N., Tsuduki, T., Ito, J., Honma, T., Kijima, R., Sugawara, S., Arai, T., Yamasaki, M., Ikezaki, A., Yokoyama, M., Nishiyama, K., Nakagawa, K., Miyazawa, T., Ikeda, I., 2012. Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong antitumor effect in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821, 980–988. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.04.001>.
- Sompila, A.W.G.T., Maloumbi, M.G., Bleton, J., Tchaplá, A., Héron, S., 2014. Identification des triacylglycérols en HPLC. Comment se passer du couplage HPLC-SM? Dans quel cas la chromatographie est-elle encore indispensable? *OCL* 21 <https://doi.org/10.1051/ocl/2014039>. A601.
- Sun, Z., Wang, H., Ye, S., Xiao, S., Liu, J., Wang, W., Jiang, D., Liu, X., Wang, J., 2012. Beta-eleostearic acid induce apoptosis in T24 human bladder cancer cells through reactive oxygen species (ROS)-mediated pathway. *Prostaglandins & other lipid mediators* 99, 1–8.
- Takagi, T., Itabashi, Y., 1981. Occurrence of mixtures of geometrical isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils: analysis by open-tubular gas liquid chromatography and high performance liquid chromatography. *Lipids* 16, 546–551. <https://doi.org/10.1007/BF02535054>.
- Tchiegang, C., Dandjouma, A.A., Kapseu, C., Parmentier, M., 2003. Conditions for the extraction of oil by pressing of Ricinodendron heudelotii (bail.) Pierre ex pax. *J. Food Eng.* 58, 363–371. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00420-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00420-X).
- Tchiegang, C., Kapseu, C., Ndjouenkeu, R., Ngassoum, M.B., 1997. Ricinodendron heudelotii (bail) kernels: a novel ingredient for tropical food agro-industries. *J. Food Eng.* 32, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(97\)00094-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(97)00094-0).
- Yeboah, S.O., Mitei, Y.C., Ngila, J.C., Wessjohann, L., Schmidt, J., 2011. Compositional and structural studies of the Major and minor components in Three Cameroonians seed oils by GC–MS, ESI-FTICR-MS and HPLC. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88, 1539–1549.
- Yuan, G.-F., Chen, X.-E., Li, D., 2014. Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review. *Food & function* 5, 1360–1368.

Résumé

Deux méthodes de décortilage sont utilisées pour isoler les amandes des coques des graines de *Riciodendron heudelotii*. L'huile modifiée extraite des amandes obtenues par traitement thermique traditionnel et l'huile brute extraite des amandes par décortilage mécanique manuel ont des profils d'acides gras différents.

L'huile modifiée révèle la présence de CLnA (acide α -oléostéarique 50,5 % \pm 0,1, acide β -oléostéarique 8,4% \pm 0,0 et acide catalpique 0,4% \pm 0,0). En revanche, l'huile brute est composée d'acide α -oléostéarique à 60,1 % \pm 0,2 d'acide β -oléostéarique à 1,1% \pm 0,0 et d'acide catalpique 0,0% \pm 0). Ces deux huiles sont polyinsaturées avec un taux très élevé (91% \pm 0,4) en acides gras polyinsaturés riche en CLnA. Les résultats obtenus montrent que l'exposition des triglycérides de l'huile brute des amandes de *Riciodendron heudelotii* aux rayons ultraviolets ou au soleil entraîne l'isomérisation de l'acide α -oléostéarique (C18:3 9c, 11t, 13t) des triglycérides vers l'acide β -oléostéarique (C18:3 9t, 11t, 13t) et l'acide catalpique (C18:3 9t, 11t, 13c)).

L'hydrolyse enzymatique en présence de la lipase LCC des triglycérides de l'huile brute produit les CLnA-libre α E (61%) et l'hydrolyse des triglycérides de l'huile modifiée conduit à la synthèse de CLnA-libre β E (42%). Le fractionnement de CLnA-libre β E (42%) conduit à la production de deux fractions composées respectivement de 34,4% d'acide linoléique ((C18:2 n6) et de 82% d'acide β -oléostéarique.

Nous avons étudié les milieux réactionnels issus de la réactivité de deux types de CLnA-libre, CLnA-libre α E (61%) et CLnA-libre β E (42%) de l'huile brute et de l'huile modifiée par réaction d'estérification enzymatique directe avec le glycérol. Les réactions d'estérification réalisées dans des systèmes sans solvant organique en présence de la lipase Novozyme 435 orientent la formation des esters partiels dans le sens de production des 1,3-diglycérides (un mélange 1-mono-1,3-diglycéride : 30-60). Cependant, l'utilisation du *tert*-butanol favorise l'accumulation des esters partiels plus hydrophiles, les 1-monoglycérides (un mélange 1-mono-1,3-diglycéride : 61-30).

L'étude des fractions mono et diglycérides des esters partiels montre qu'ils sont riches en CLnA avec des teneurs comprises entre 50 à 70%.

L'étude de la réactivité des CLnA-libres Δ E ($\Delta = \alpha$ ou β) et d'Ester Partiel de Glycérol-CLnA Δ E ($\Delta = \alpha$ ou β) sous azote ou sous l'oxygène de l'air pour la synthèse de polymères à 70 °C montre que seul les EPG-CLnA β E polymérisent sous atmosphère inerte par une réaction de type Diels-Alder auto-initiée par le CLnA- β . En présence de l'oxygène de l'air les CLnA-libres Δ E ($\Delta = \alpha$ ou β) et EPG-CLnA Δ E ($\Delta = \alpha$ ou β) polymérisent. Deux types de polymérisations sont mise en œuvre, une polymérisation de type Diels-Alder auto-initiée par le CLnA- β et une polymérisation radicalaire. Ces polymérisations sont réalisées sur les trois doubles liaisons conjuguées des CLnA sous leur forme libre et sous forme d'esters partiels de glycérol. Les substrats riches en β -oléostéarique polymérisent vite avec un ordre partiel par rapport au CLnA de 1 et les substrats riches en α -oléostéarique polymérisent lentement avec un ordre partiel par rapport au CLnA de 0.

L'étude des acides gras dans les extractibles a permis de montrer que les acides oléique et linoléique ne polymérisent pas, ils jouent le rôle de fluidifiant facilitant la polymérisation.

Les propriétés physico-chimiques de ces polymères synthétisés montrent que tous ces polymères sont un mélange de macromolécules composées de polymères à poids moléculaire de 1860 g/mol, de polymères à poids moléculaire compris entre 1860 à 25000 g/mol et des polymères de poids moléculaire supérieur à 25000 g/mol. Ces polymères ont en outre des Tg inférieures à -30°C sont souples et sous forme de gel à température ambiante. L'ensemble de ces propriétés fait d'eux de bons candidats pour la formulation de biofertilisants phytosanitaires pour le cacaoyer et l'igname en y incorporant des oligo-éléments spécifiques.