



**HAL**  
open science

# Gélification d'un solvant supramoléculaire par des polysaccharides et application aux extraits végétaux

Benoît Caprin

► **To cite this version:**

Benoît Caprin. Gélification d'un solvant supramoléculaire par des polysaccharides et application aux extraits végétaux. Polymères. INSA de Lyon, 2023. Français. NNT : 2023ISAL0016 . tel-04220633

**HAL Id: tel-04220633**

**<https://theses.hal.science/tel-04220633>**

Submitted on 28 Sep 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.



N°d'ordre NNT : 2023ISAL0016

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon**

Ecole Doctorale matériaux de Lyon - ED34

Spécialité : Matériaux

Soutenue publiquement le 16 mars 2023, par :  
**Benoît Caprin**

---

**Gélification d'un solvant supramoléculaire  
par des polysaccharides et application aux  
extraits végétaux**

---

Devant le jury composé de :

Verpoorte, Robert	Professeur Emérite	Université de Leiden	<b>Président</b>
Amiel, Catherine	Professeure	Université de Paris-Est	<b>Rapporteure</b>
Picton, Luc	Professeur	Université de Rouen	<b>Rapporteur</b>
Fleury, Etienne	Professeur	INSA Lyon	<b>Directeur de thèse</b>
Charlot, Aurélia	Maître de Conférences	INSA Lyon	<b>Co-encadrante</b>
Da Cruz, Fernande	Ingénieure de Recherche	INSA Lyon	<b>Co-encadrante</b>
Charton, Virginie	R&D Chimie du Végétal	Gattefossé	<b>Invitée</b>

Laboratoire de recherche : Laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères - UMR 5223



Référence : TH0944\_CAPRIN

L'INSA Lyon a mis en place une procédure de contrôle systématique via un outil de détection de similitudes (logiciel Compilatio). Après le dépôt du manuscrit de thèse, celui-ci est analysé par l'outil. Pour tout taux de similarité supérieur à 10%, le manuscrit est vérifié par l'équipe de FEDORA. Il s'agit notamment d'exclure les auto-citations, à condition qu'elles soient correctement référencées avec citation expresse dans le manuscrit.

Par ce document, il est attesté que ce manuscrit, dans la forme communiquée par la personne doctorante à l'INSA Lyon, satisfait aux exigences de l'Établissement concernant le taux maximal de similitude admissible.

## Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
<b>CHIMIE</b>	<b>CHIMIE DE LYON</b> <a href="https://www.edchimie-lyon.fr">https://www.edchimie-lyon.fr</a> Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr	<b>M. Stéphane DANIELE</b> C2P2-CPE LYON-UMR 5265 Bâtiment F308, BP 2077 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69616 Villeurbanne <a href="mailto:directeur@edchimie-lyon.fr">directeur@edchimie-lyon.fr</a>
<b>E.E.A.</b>	<b>ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</b> <a href="https://edeea.universite-lyon.fr">https://edeea.universite-lyon.fr</a> Sec. : Stéphanie CAUVIN Bâtiment Direction INSA Lyon Tél : 04.72.43.71.70 secretariat.edeea@insa-lyon.fr	<b>M. Philippe DELACHARTRE</b> INSA LYON Laboratoire CREATIS Bâtiment Blaise Pascal, 7 avenue Jean Capelle 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.88.63 <a href="mailto:philippe.delachartre@insa-lyon.fr">philippe.delachartre@insa-lyon.fr</a>
<b>E2M2</b>	<b>ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION</b> <a href="http://e2m2.universite-lyon.fr">http://e2m2.universite-lyon.fr</a> Sec. : Bénédicte LANZA Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	<b>Mme Sandrine CHARLES</b> Université Claude Bernard Lyon 1 UFR Biosciences Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69622 Villeurbanne CEDEX <a href="mailto:sandrine.charles@univ-lyon1.fr">sandrine.charles@univ-lyon1.fr</a>
<b>EDISS</b>	<b>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ</b> <a href="http://ediss.universite-lyon.fr">http://ediss.universite-lyon.fr</a> Sec. : Bénédicte LANZA Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	<b>Mme Sylvie RICARD-BLUM</b> Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) - UMR 5246 CNRS - Université Lyon 1 Bâtiment Raulin - 2ème étage Nord 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne Cedex Tél : +33(0)4 72 44 82 32 <a href="mailto:sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr">sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr</a>
<b>INFOMATHS</b>	<b>INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES</b> <a href="http://edinfomaths.universite-lyon.fr">http://edinfomaths.universite-lyon.fr</a> Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr	<b>M. Hamamache KHEDDOUCI</b> Université Claude Bernard Lyon 1 Bât. Nautibus 43, Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne Cedex France Tél : 04.72.44.83.69 <a href="mailto:hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr">hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr</a>
<b>Matériaux</b>	<b>MATÉRIAUX DE LYON</b> <a href="http://ed34.universite-lyon.fr">http://ed34.universite-lyon.fr</a> Sec. : Yann DE ORDENANA Tél : 04.72.18.62.44 yann.de-ordenana@ec-lyon.fr	<b>M. Stéphane BENAYOUN</b> Ecole Centrale de Lyon Laboratoire LTDS 36 avenue Guy de Collongue 69134 Ecully CEDEX Tél : 04.72.18.64.37 <a href="mailto:stephane.benayoun@ec-lyon.fr">stephane.benayoun@ec-lyon.fr</a>
<b>MEGA</b>	<b>MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE</b> <a href="http://edmega.universite-lyon.fr">http://edmega.universite-lyon.fr</a> Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bâtiment Direction INSA Lyon mega@insa-lyon.fr	<b>M. Jocelyn BONJOUR</b> INSA Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69621 Villeurbanne CEDEX <a href="mailto:jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr">jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr</a>
<b>ScSo</b>	<b>ScSo*</b> <a href="https://edsciencessociales.universite-lyon.fr">https://edsciencessociales.universite-lyon.fr</a> Sec. : Mélina FAVETON INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.77.79 melina.faveton@univ-lyon2.fr	<b>M. Bruno MILLY</b> Université Lumière Lyon 2 86 Rue Pasteur 69365 Lyon CEDEX 07 <a href="mailto:bruno.milly@univ-lyon2.fr">bruno.milly@univ-lyon2.fr</a>

\*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

---

## Gélification d'un solvant supramoléculaire par des polysaccharides et application aux extraits végétaux

Les mélanges à transition de phase basse température d'origine naturelle (*NaLTTM*) sont des mélanges supramoléculaires qui répondent aux principes de la chimie verte. Gattefossé a développé un mélange composé de fructose, de glycérol et d'eau (noté FGE115) pour ses activités d'extraction végétale. Toutefois, la compréhension du mécanisme d'association des molécules constitutives de ce solvant restait insuffisante. Face à l'absence de consensus sur les méthodes de caractérisation de ce type de mélanges, une méthodologie de caractérisations physico-chimiques a été développée en s'inspirant des travaux disponibles dans la littérature. Cette stratégie basée sur la détermination des propriétés thermiques (ATG, DSC), des propriétés rhéologiques (viscosité, énergie d'activation) et sur la description des systèmes à l'échelle moléculaire (RMN 1D-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY), a permis d'identifier les mélanges FGE ayant les caractéristiques de *NaLTTM*. Comme tous les extraits végétaux liquides, les extraits obtenus avec le solvant FGE115 possèdent une durée de conservation limitée. La voie explorée pour répondre à cette problématique industrielle consiste à diminuer la mobilité des molécules en solution par le biais de la gélification. Pour ce faire, différents polysaccharides naturels (xanthane, alginates, carraghénanes) ont été sélectionnés en fonction de leur affinité avec le solvant FGE115. Une caractérisation fine des solutions viscoélastiques ou des matériaux de type gels obtenus est proposée dans ce manuscrit. Ces travaux démontrent la possibilité de concevoir et de caractériser des matériaux biosourcés aux propriétés rhéologiques modulables à base du solvant FGE115. Le potentiel applicatif industriel et les bénéfices apportés par la gélification sur la stabilité des extraits végétaux sont également discutés dans ce manuscrit.

**Mots-Clés:** Chimie verte, *NaLTTM*, polysaccharide, gel, extraits végétaux

---

## Gelation of a supramolecular solvent by polysaccharides and application to plant extracts

Natural Low Transition Temperature Mixtures (*NaLTTM*) are supramolecular liquids that meet the principles of green chemistry. Gattefossé developed a solvent composed of fructose, glycerol, and water (noted FGW115) for its plant extraction activities. The accurate understanding of the association mechanism of this solvent remained insufficient. To overpass the lack of consensus on the methods of characterization of *NaLTTM*, we developed a methodology of characterization, inspired by the works available in the literature, based on the determination of thermal properties (ATG, DSC), rheological properties (viscosity, activation energy) and, on the description of the systems at the molecular scale (1D-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY NMR). This strategy permitted to identify the FGW mixtures characteristics of the *NaLTTM* class. Like all liquid plant extracts, extracts obtained with the solvent FGW115 have a limited shelf life. The approach explored to answer this industrial problem consists in limiting the molecular mobility in solution by means of gelation techniques. Different natural polysaccharides (xanthan, alginates, carrageenans) have been selected according to their affinity with FGW115. A precise characterization of the viscoelastic solutions or gel-like materials obtained is proposed in this manuscript. This thesis highlights the possibility to design and characterize biosourced materials with tunable rheological properties based on the solvent FGW115. The industrial applicative potential and the benefits brought by gelation on the stability of plant extracts are also discussed in this manuscript.

**Keywords:** Green Chemistry, *NaLTTM*, polysaccharide, gel, vegetal extracts

**Benoît CAPRIN**

Thèse au sein de l'école doctorale matériaux (ED34), Université de Lyon / 2023  
UMR 5223, Laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères  
Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Cette thèse est accessible à l'adresse : <https://theses.insa-lyon.fr/publication/2023ISAL0016/these.pdf>

© [B. Caprin], [2023], INSA Lyon, tous droits réservés

---

## Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement de plus de quatre années de recherche, de rencontres, d'échanges, de débats et voici venue l'heure de remercier tous ceux qui ont permis à ce projet de devenir réalité.

Tout d'abord, j'adresse mes sincères remerciements à mes quatre encadrants : Etienne Fleury, Aurélie Charlot, Fernande Da Cruz et Virginie Charton. Vous m'avez constamment épaulé dans cette aventure. Votre soutien, vos conseils, votre implication et vos expertises ont été essentiels pour mener à bien ces travaux. Ensemble nous avons construit, déconstruit, adapté et reconstruit ce sujet ambitieux pour aboutir à trois publications, une demande de brevet et des avancées importantes dans la compréhension des LTTMs et dans le domaine des matériaux gélifiés biosourcés. Un grand merci également de m'avoir fait confiance et incité à encadrer des étudiantes (Maëlle Gobard, Guadalupe Viñado-Buil et Amélie Hoesch) que je remercie chaleureusement pour leur implication et la qualité des travaux effectués.

Je remercie également l'ensemble des personnes qui ont donné de leur temps pour me former, m'aider et me permettre d'obtenir des résultats expérimentaux probants sur des techniques diverses et variées. Je pense bien sûr à Ahmed et Raphaël pour les analyses thermiques, à Guilhem et Caroline pour les analyses rhéologiques, à Patrick et Carlos pour les analyses RMN, à Agnès pour les analyses de chromatographie d'exclusion stérique, à Laura pour les analyses spectrales, à Guillaume et Ruben pour les analyses de diffraction et/ou diffusion des rayons X mais aussi à Xavier pour m'avoir fait découvrir avec passion l'étude des propriétés mécaniques des matériaux. S'ajoute à cette liste les doctorants et post-docs avec qui j'ai pu avoir le plaisir d'échanger sur mes protocoles expérimentaux, l'exploitation des résultats, la chimie des matériaux, la formation doctorale et les formalités administratives mais également sur des choses bien plus légères lors de repas, du traditionnel goûter etc. Je pense particulièrement à Jeremy, Baptiste, David, Laurent, Gabriel, Emma, Younes, Pauline, Sylvain, Mélissa, Martin mais la liste est longue ! Une pensée particulière à mes trois acolytes de bureau : Ting, Alexei et Housseem avec qui nous avons débattu des méandres de la langue française, de la place de la science dans la société tout en partageant des viennoiseries, des chocolats biélorusses, des spécialités chinoises et algérienne autour d'un bon café. Merci à tous les trois de m'avoir accueilli, aidé et supporté tout au long de cette aventure !

Je remercie également les membres de mon jury de thèse pour le temps consacré à l'étude de ce manuscrit, pour leurs retours et commentaires enrichissants. Je remercie Catherine Amiel et Luc Picton d'avoir accepté la charge de rapporteur mais également pour la qualité de l'échange que nous avons pu avoir lors de la soutenance. En ce qui concerne Rob Verpoorte, c'est bien plus que des remerciements. Ce fût une joie immense et un honneur de vous avoir eu en tant que président du jury. Merci surtout d'avoir influencé mon parcours scientifique depuis de nombreuses années.

C'est avec beaucoup de gratitude que je remercie l'entreprise Gattefossé d'avoir financé l'intégralité de ces travaux. Une chaleureuse pensée à Frédéric Demarne qui a été l'instigateur de ce projet de thèse, repose en paix. Je remercie tout particulièrement Jean-David Rodier pour son accompagnement et son rôle de grand frère tout au long de cette aventure. Je remercie également tous mes collègues de Gattefossé pour leur soutien et leur adaptation pendant ces quatre années. Notamment tous ceux qui ont participé de près ou de loin aux résultats applicatifs de ces travaux ou à la mise en page de ce manuscrit : Nicolas, Sébastien, Clémence, Maxime, Hakime, Quentin, Murielle, Léa pour ne citer qu'eux.

Enfin, je remercie mes proches et amis qui m'ont permis d'arriver à la fin de ce projet ! Je ne me risquerai pas à citer des noms car les remerciements seraient plus longs que le manuscrit mais les concernés se reconnaîtront... Vous avez été présents pour moi bien que j'aie été accaparé par ce doctorat. Merci de m'avoir régulièrement ramené sur terre. Même si la gélification de mélanges supramoléculaires vous intéresse peu, merci de m'avoir écouté et soutenu surtout dans les moments difficiles.

Enfin, la cerise sur le gâteau 😊 ! Une immense gratitude à ma chère et tendre Mandine. Mille mercis pour ton soutien, tes encouragements, ton accompagnement et ton abnégation pendant ces longues années. Nous allons (enfin) pouvoir prendre la clé des champs...

**Benoît CAPRIN**

Thèse au sein de l'école doctorale matériaux (ED34), Université de Lyon / 2023  
UMR 5223, Laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères  
Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Cette thèse est accessible à l'adresse : <https://theses.insa-lyon.fr/publication/2023ISAL0016/these.pdf>

© [B. Caprin], [2023], INSA Lyon, tous droits réservés

---

## Liste des symboles et abréviations

R&D = Recherche et Développement

*DES* = solvants eutectiques profonds ou « Deep Eutectic Solvents »

*NaDES* = solvants eutectiques profonds naturels ou « Natural Deep Eutectic Solvents »

*LTTM* = mélange à transition de phase basse température ou « *Low Transition Temperature Mixture* »

IMP = ingénierie des Matériaux Polymères

RMN = résonance Magnétique Nucléaire

NOESY = Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

ChCl = chlorure de cholinium

*HBA* = accepteur de liaison hydrogène ou « *Hydrogen Bond Acceptor* »

*HBD* = donneur de liaison hydrogène ou « *Hydrogen Bond Donor* »

$T_g$  = température de transition vitreuse

$T_f$  = température de fusion

$T_d$  = température de décomposition

$T_{amb}$  = température ambiante

DSC = calorimétrie différentielle à balayage ou « Differential Scanning Calorimetry »

ATG = analyse thermogravimétrique (ATG)

$E_a$  = énergie d'activation



*« Je pense que tout est possible à qui rêve, ose, travaille et n'abandonne jamais ».*

Xavier Dolan

# Sommaire

Introduction générale .....	p.8
Chapitre I. Etat de l'art .....	p.14
I.1 Chimie verte, solvants verts et liquides ioniques .....	p.15
I.2 Les mélanges à transition de phase basse température .....	p.19
I.3 Les matériaux gélifiés à base de <i>LTTM</i> .....	p.48
I.4 Références bibliographiques .....	p.72
I.5 Liste des figures et des tableaux .....	p.79
I.6 Annexes .....	p.81
Chapitre II. Caractérisation de <i>NaLTTM</i> et rôle essentiel de l'eau .....	p.85
II.1 Contexte et enjeux .....	p.86
II.2 Scrutiny of the supramolecular structure of bio-sourced Fructose / Glycerol / Water ternary mixtures : towards green Low Transition Temperature Mixtures .....	p.87
II.3 Caractérisation d'un second système : BPE115 .....	p.109
II.4 Conclusion et perspectives .....	p.116
II.5 Références .....	p.117
II.6 Liste des figures .....	p.120
Chapitre III. Ajout de polysaccharides dans des <i>NaLTTM</i> à base de Fructose, de glycérol et d'eau .....	p.122
III.1 Sélection des polysaccharides adaptés aux objectifs .....	p.123
III.2 Incorporation de xanthane dans le FGE115 .....	p.138
III.3 Ajout d'alginate de sodium dans des <i>LTTM</i> FGE .....	p.158
III.4 k-carrageenan associated with Fructose / Glycerol / Water <i>LTTM</i> : towards natural thermosensitive physical gels .....	p.200
Chapitre IV. Application aux extraits végétaux.....	p.223
IV.1 Contexte et enjeux .....	p.224
IV.2 L'extraction végétale et son application industrielle .....	p.225
IV.3 The use of NaDES to support innovation in the cosmetic industry .....	p.228
IV.4 Evaluation de la performance d'extraction de solvants FGE .....	p.248
IV.5 Incorporation de polysaccharides dans des extraits végétaux supramoléculaires ....	p.262
IV.6 Bibliographie .....	p.283
IV.7 Liste des figures et des tableaux .....	p.285
Conclusion générale .....	p.287

# Introduction générale

L'utilisation thérapeutique des plantes est aussi ancienne que la civilisation humaine et a évolué en même temps qu'elle. Depuis des décennies, les découvertes scientifiques ont permis d'affirmer que les plantes sont de véritables usines naturelles capables de fabriquer des molécules très complexes et de structures très variées : les métabolites secondaires. Les effets positifs des plantes et extraits végétaux sur la santé humaine et animale s'expliquent en grande partie par la présence de ces métabolites secondaires <sup>[1]</sup>. Les substances actives telles que le taxol, la quinine, la morphine ou encore l'acide acétylsalicylique sont quelques exemples de molécules disponibles dans le monde végétal que l'Homme utilise en quantité industrielle. Le marché cosmétique est également un pourvoyeur important d'extraits végétaux pour des applications topiques. Les exigences réglementaires et sociétales qui encadrent la mise sur le marché d'un ingrédient cosmétique se durcissent continuellement et la pression exercée sur l'industrie pour qu'elle fournisse des actifs issus du végétal de façon plus durable a augmenté de la même manière. Le point commun entre tous les procédés d'extraction végétale développés depuis des millénaires repose sur la capacité d'un solvant à solubiliser les extractibles recherchés dans la plante afin d'obtenir un extrait, le plus souvent sous forme liquide. L'avantage d'une forme liquide pour un extrait végétal réside dans la simplicité de son incorporation dans une formule cosmétique. Le principal inconvénient de cette forme physique liquide est la durée de conservation d'un extrait végétal. En effet, celle-ci est nécessairement limitée dans le temps en raison de nombreuses instabilités qui peuvent être physiques, chimiques et/ou microbiologiques <sup>[2]</sup>. Ce constat a fait émerger la question suivante : **peut-on augmenter la stabilité d'un extrait végétal liquide en diminuant la mobilité moléculaire des différents composés en solution par un phénomène de gélification ?**

Depuis leur introduction, les solvants eutectiques profonds naturels ou *NaDES* pour « *Natural Deep Eutectic Solvents* » sont apparus comme une alternative prometteuse et respectueuse de l'environnement aux produits pétrochimiques pour dissoudre des métabolites secondaires <sup>[3]</sup>. Ces solvants représentent des opportunités inexplorées pour développer des extraits innovants avec des empreintes phytochimiques et des activités biologiques uniques. En adaptant le concept des *NaDES* au contexte cosmétique, la société Gattefossé a identifié plusieurs mélanges permettant d'obtenir des extraits végétaux sous forme liquide pour ensuite les industrialiser <sup>[4]-[6]</sup>. Gattefossé, dont le siège social est situé près de Lyon, est une entreprise indépendante et familiale qui est spécialisée dans le développement, la fabrication et la vente d'ingrédients de spécialité destinés à deux grands marchés : la pharmacie et la cosmétique.

Le solvant *NaDES* le plus employé par Gattefossé correspond à un mélange ternaire composé de Fructose, de Glycérol et d'Eau en proportions molaires 1:1:5, noté FGE115. Ce mélange ainsi que les extraits qui résultent de son utilisation en tant que solvant d'extraction sont liquides à température ambiante. Comme pour tous les extraits liquides, Gattefossé rencontre des problématiques de stabilité à long terme, et plus particulièrement en ce qui concerne l'instabilité chimique des composés phytochimiques. C'est dans ce contexte que Gattefossé s'est tourné vers le laboratoire Ingénierie des Matériaux Polymères (IMP), Unité mixte de recherche (UMR5223) rattachée à l'INSA de Lyon pour étudier et développer différentes approches pour gélifier le solvant ternaire FGE115 et, par extension, un extrait végétal obtenu avec celui-ci.

Outre le critère de proximité géographique, ce choix repose sur les thématiques récentes développées à l'IMP. Au sein des pôles « Chimie » et « Physico-chimie » des polymères, certains chercheurs (Etienne Fleury, Aurélie Charlot) s'intéressent tout particulièrement à l'émergence de matériaux biosourcés innovants à base de gels intégrant des polymères d'origine naturelle : les polysaccharides [7]-[10]. L'IMP a également développé différents types de ionogels physiques à base de gomme de guar, galactomannane d'origine végétale par simple mélange avec des liquides ioniques d'imidazolium utilisés comme solvants et agents structurants. Des chaînes de poly(liquide ionique) y ont ensuite été insérées afin de générer des matériaux à plus hautes performances (en termes de propriétés rhéologiques, thermiques, de conductivité ionique, de stabilité dimensionnelle...) [10]. L'IMP a récemment décrit la possibilité d'utiliser la gomme de guar comme gélifiant de solvants eutectiques à base de chlorure de cholinium via les travaux de thèse de Jérémie Depoorter [7]. La plupart des matériaux mis au point par le laboratoire IMP répondent aux exigences de l'industrie cosmétique (procédés d'élaboration simples, hydrophilicité, biodégradabilité, biocompatibilité, caractère renouvelable et durable). Ainsi, le savoir-faire et les expertises de l'IMP en termes de préparation et de caractérisation de gels à base de polysaccharides servira de socle de connaissances pour répondre à la question suivante : **est-il possible d'obtenir des matériaux biosourcés aux propriétés rhéologiques intéressantes (gel, viscoélasticité) par association de polysaccharides avec le mélange FGE115 et avec les extraits utilisés par Gattefossé ?**

De plus, le laboratoire IMP possède une équipe spécialisée en analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) dirigée par Fernande Da Cruz-Boisson. Cette technique, et plus particulièrement l'expérience NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*), fait office de référence dans la caractérisation de la structure supramoléculaire des solvants *NaDES*. Cette expertise sera un atout majeur pour établir une stratégie de caractérisation fine des solvants ternaires à base de fructose, de glycérol et d'eau. En effet, bien que Gattefossé se soit appuyé sur les travaux de thèse de Yuntao Dai (Université de Leiden, 2013) [11] pour caractériser les solvants *NaDES* adaptés au

marché cosmétique <sup>[12]</sup>, la compréhension du mécanisme d'obtention de ces mélanges particuliers restait insuffisante. De plus, l'existence de ces solvants et les méthodes permettant de les caractériser étaient loin de faire consensus dans la littérature scientifique lorsque les travaux de Dai *et al.* ont été publiés. **Face à l'absence de consensus sur la nature et le rôle de ces solvants, il est encore légitime aujourd'hui de se demander ce qu'est un NaDES et comment le caractériser ?**

Finalement, la complémentarité de ces problématiques de recherche et des expertises relevées est à l'origine de l'émergence de ce projet de thèse intitulé : « **Gélification d'un solvant supramoléculaire par des polysaccharides et applications aux extraits végétaux** ».

Les objectifs principaux de ce travail de thèse sont les suivants :

- 1) Développer une méthodologie de caractérisations physico-chimiques des solvants ternaires FGE de compositions variées afin d'établir un lien entre la structure supramoléculaire et le comportement à l'échelle micro et macroscopique.
- 2) Concevoir et caractériser de façon approfondie des matériaux composés d'un solvant supramoléculaire (FGE115) et de polysaccharides.
- 3) Etudier le bénéfice de l'ajout d'un polysaccharide sur la stabilité globale (physico-chimique et/ou microbiologique) des extraits végétaux obtenus avec le solvant FGE115.

En pratique, le potentiel applicatif de ces recherches sera discuté et éprouvé par Gattefossé en continu tout au long de ce travail de thèse en s'intéressant notamment à la caractérisation et à la gélification d'extraits végétaux déjà industrialisés. Pour des raisons de clarté, nous avons choisi de rassembler tous les travaux applicatifs dans un chapitre indépendant qui se nourrira des résultats et conclusions obtenus dans les chapitres précédents. Ce manuscrit est donc divisé en quatre chapitres qui se décomposent comme suit :

Après une introduction au principe de la chimie verte, le **chapitre I** décrira un état de l'art relatif aux deux grandes thématiques abordées dans ce manuscrit. D'une part, les différents solvants supramoléculaires rencontrés dans la littérature seront présentés. Nous détaillerons les méthodes de préparation et de caractérisation de ces solvants. Une attention particulière sera portée sur les techniques qui permettent de décrire la structure supramoléculaire de ces mélanges afin d'établir une méthodologie de caractérisation. Nous discuterons également du rôle primordial joué par l'eau dans l'établissement de liaisons hydrogène qui régissent les associations au sein de ces mélanges particuliers.

D'autre part, nous dresserons un état de l'art des matériaux ayant été obtenus avec des solvants supramoléculaires et différents gélifiants comme des polymères de synthèse, des acides aminés ou encore des polysaccharides. Les techniques de préparation et de caractérisation seront également discutées. Une attention particulière sera portée aux techniques mettant en œuvre des gélifiants d'origine naturelle compatibles avec les exigences cosmétiques et les principes de la chimie verte.

Comme énoncé précédemment, Gattefossé a initié la caractérisation d'un mélange composé de Fructose, de Glycérol et d'Eau en proportions molaires 1:1:5, noté FGE115. Cependant, les connaissances acquises n'étaient pas suffisamment approfondies pour comprendre les phénomènes intermoléculaires qui gouvernent l'assemblage supramoléculaire au sein de ce solvant. La majeure partie du **chapitre II** portera sur la caractérisation fine de différents mélanges à base de fructose, de glycérol et d'eau. Ces travaux ont été publiés dans *Journal of Molecular Liquids* et seront présentés sous ce format <sup>[12]</sup>. Dans la suite de ce second chapitre, la stratégie de caractérisation développée sur les systèmes FGE sera, en partie, appliquée à d'autres systèmes composés de bétaine, de propanediol et d'eau.

Dans le **chapitre III**, nous étudierons la faisabilité de viscosifier, voire de gélifier, le solvant FGE115 en incorporant des polysaccharides de structures variées. Ce chapitre débutera par une sélection des polysaccharides adaptés aux exigences de cette thèse. Une attention particulière sera accordée à la mise en oeuvre d'un procédé simple et peu énergivore afin de discriminer les polysaccharides et sélectionner une liste réduite des plus prometteurs. Pour plus de clarté, chacun des polysaccharides sélectionnés sera considéré de manière indépendante. Chaque sous-partie du chapitre III sera construite selon un schéma similaire, qui est le suivant :

- (i) Compléments bibliographiques et comportement en solution aqueuse du polysaccharide,
- (ii) Caractérisation du polysaccharide,
- (iii) Caractérisation des mélanges FGE + polysaccharide
- (iv) Discussion de la possibilité d'obtention de matériaux (gels, solutions viscoélastiques) et étude détaillée de leurs propriétés (en termes de rhéologie et de structure principalement).

Les polysaccharides sélectionnés et utilisés sont le xanthane, l'alginate de sodium et le  $\kappa$ -carraghénane. Les travaux relatifs à l'introduction de  $\kappa$ -carraghénane dans le solvant FGE115 ont été publiés dans *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* et seront présentés sous ce format, dans la dernière sous-partie du chapitre III <sup>[13]</sup>.

Le **chapitre IV** commencera par une introduction à l'extraction végétale, en particulier à son application industrielle pour l'obtention d'actifs cosmétiques. Une synthèse des travaux de conception et de développement industriel d'extraits végétaux obtenus avec les solvants *NaDES* menés par Gattefossé entre 2012 et 2018 sera ensuite présentée. Cette dernière visera à souligner les difficultés techniques rencontrées mais présentera également les bénéfices de l'utilisation de tels solvants. Cette revue a été publiée dans l'ouvrage *Advances in Botanical Research Eutectic Solvents and Stress in Plants* et sera présentée sous ce format <sup>[14]</sup>. Nous nous demanderons également s'il est possible d'obtenir des matériaux aux propriétés physiques intéressantes à partir d'un extrait végétal supramoléculaire (solvant ternaire + principe actif) ? La comparaison de ces propriétés avec celles des matériaux obtenus avec le solvant sans principe actif sera entreprise. Enfin, nous étudierons l'impact de l'ajout d'un polysaccharide sur la stabilité (physico-chimique et/ou microbiologique) des extraits végétaux comparativement à la forme liquide, employée usuellement.

# Références bibliographiques

- [1] Anton R. Plantes thérapeutiques Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2. éd. française. Paris, Cachan: Ed. Tec et Doc; Ed. Médicales Internat, 2003, XCVI, 692 S p. ISBN 9782743006310.
- [2] Gafner S., Bergeron C. The Challenges of Chemical Stability Testing of Herbal Extracts in Finished Products Using State-of-the-Art Analytical Methodologies. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2005, 1, 2, pp. 203–215.
- [3] Caprin B., Charton V., Demarne F. Extraits végétaux destinés à la cosmétique, solvants et procédés pour les obtenir, FR 3 036 618 B1. 26/05/2015.
- [4] Charton V., Caprin B., Bechetoille N. Extrait d'*Aesculus hippocastanum*, FR 3 053 890 B1; EP 3 269 426 B1; US 10 363 212 B2. 13/07/2016.
- [5] Bechetoille N., Demarne F., Metral E., et al. EXTRAIT DE *Sechium edule* POUR LUTTER CONTRE LES EFFETS NOCIFS DES RAYONNEMENTS ULTRAVIOLETS, FR 3 066 118 B1. 15/05/2017.
- [6] Bechetoille N., Lopis-Presle S. Extrait de *Withania somnifera* pour lutter contre les effets nocifs des rayonnements visibles sur la peau, FR 3 067 939 B1. 26/06/2017.
- [7] Depoorter J., Mourlevat A., Sudre G., et al. Fully Biosourced Materials from Combination of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents and Guar Gum. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7, 19, pp. 16747–16756.
- [8] Pettignano A., Charlot A., Fleury E. Carboxyl-functionalized derivatives of carboxymethyl cellulose: towards advanced biomedical applications. *Polymer Reviews*, 2019, 59, 3, pp. 510–560.
- [9] Tizzotti M., Labeau M.-P., Hamaide T., et al. Synthesis of thermosensitive guar-based hydrogels with tunable physico-chemical properties by click chemistry. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2010, 48, 13, pp. 2733–2742.
- [10] Zhang B., Sudre G., Quintard G., et al. Guar gum as biosourced building block to generate highly conductive and elastic ionogels with poly(ionic liquid) and ionic liquid. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157, pp. 586–595.
- [11] Dai Y. Draft's thesis of Yuntao Dai (Leiden University) about NaDES technology. PhD. 01/01/2013 1-190 p.
- [12] Charton V., Clairet A. Using nades extraction to create natural, sustainable, high-performance actives. *Household and Personal Care Today*, 2018, 13, 2, pp. 37–40.
- [13] Caprin B., Viñado-Buil G., Sudre G., et al.  $\kappa$ -Carrageenan Associated with Fructose/Glycerol/Water LTTM: Toward Natural Thermosensitive Physical Gels. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022,
- [14] Caprin B., Charton V., Vogelgesang B. Chapter Twelve - The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. *Advances in Botanical Research Eutectic Solvents and Stress in Plants (Volume 97)*. Academic Press. 2021, pp. 309–332. ISBN 978-0-12-821691-0.



# Chapitre I : Etat de l'art

---

## Table des matières

<b>CHAPITRE I : ETAT DE L'ART.....</b>	<b>14</b>
I.1 CHIMIE VERTE, SOLVANTS VERTS ET LIQUIDES IONIQUES .....	15
<i>I.1.1 Introduction à la chimie verte .....</i>	<i>15</i>
<i>I.1.2 Introduction aux solvants « verts » .....</i>	<i>16</i>
<i>I.1.3 Les liquides ioniques, solvants verts ? .....</i>	<i>17</i>
I.2 LES MELANGES A TRANSITION DE PHASE BASSE TEMPERATURE .....	19
I.2.1 Les LTTM .....	19
I.2.2 Les LTTM d'origine naturelle.....	23
I.2.3 Préparation des NaLTTM .....	26
I.2.4 Propriétés des NaLTTM.....	28
I.2.4.1 Propriétés thermiques.....	28
I.2.4.2 Propriétés rhéologiques .....	32
I.2.4.3 Densité.....	35
I.2.4.4 Autres propriétés spécifiques à des applications.....	35
I.2.5 Structure supramoléculaire des NaLTTM .....	37
I.2.6 Effet de l'eau sur la structure supramoléculaire .....	40
I.2.7 Conclusion .....	47
I.3 LES MATERIAUX GELIFIES A BASE DE LTTM .....	48
I.3.1 Introduction à la gélification et classification des gels .....	48
I.3.2 Caractérisation d'un gel par ses propriétés rhéologiques .....	51
I.3.3 Champs d'applications et classification des hydrogels .....	52
I.3.4 La gélification d'un LTTM liquide .....	54
I.3.4.1 Gélification de LTTM par des gélifiants biosourcés de faibles masses molaires .....	59
I.3.4.2 Gélification de LTTM par des polymères d'origine naturelle .....	63
I.3.5 Conclusion .....	71
I.4 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	72
I.5 LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....	79
ANNEXE I .....	81
ANNEXE II .....	84

## I.1 Chimie verte, solvants verts et liquides ioniques

### I.1.1 Introduction à la chimie verte

Le développement de l'industrie chimique au cours du XX<sup>ème</sup> siècle fut considérable, si bien qu'aujourd'hui, la chimie fait partie intégrante de notre quotidien. L'essentiel des biens et produits de consommation (vêtements, voitures, téléphones, matériaux, etc.) ont, au moins à une étape de leur fabrication, un lien avec l'industrie chimique. Cependant, l'essor de l'industrie chimique a toujours été entaché de catastrophes aux conséquences humaines ou écologiques lourdes (scandales de santé publique, rejets et pollutions, pesticides, etc.) qui ont dégradé son image. Une prise de conscience, collective et internationale, de l'étendue des effets de la pollution engendrée par cette industrie a imposé la nécessité de changer le mode de développement des produits chimiques. Plutôt que de traiter les déchets et produits secondaires, il s'agit d'envisager de ne pas les produire tout en diminuant la consommation d'énergie des procédés de fabrication. Un des outils de conception d'une chimie plus durable, ou chimie verte, repose sur 12 principes développés par Anastas et Warner dans l'ouvrage de référence du domaine : « *Green Chemistry Theory and Practice* » [1]. Le concept de chimie verte est défini par les auteurs comme suit : « *La chimie verte a pour but de concevoir et de développer des produits et des procédés chimiques permettant de réduire ou d'éliminer l'utilisation et la synthèse de substances dangereuses* ». Une illustration de ces 12 principes issue de la littérature est présentée en figure I.1 [2]. Sur la figure I.1, des termes faisant dorénavant partie de notre quotidien apparaissent comme : efficacité énergétique, prévention ou utilisation de ressources renouvelables.

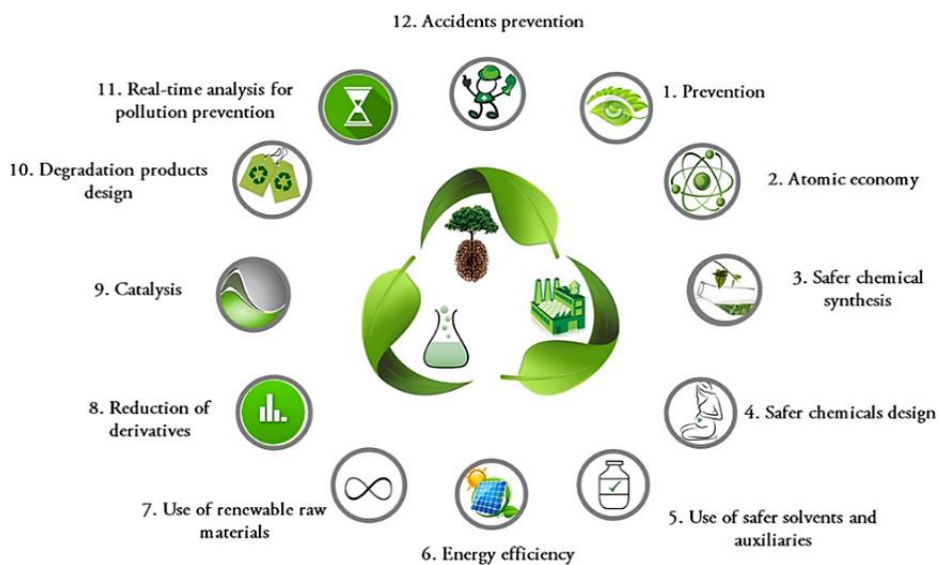


Figure I.1 Illustration des 12 principes de la chimie verte [2]

D'autres termes plus spécifiques à l'industrie chimique (catalyse, économie d'atomes, limitation de l'utilisation de solvants et de réactifs nocifs ou encore définition de conditions de réactions moins dangereuses) sont devenus des piliers dans la modernisation de l'industrie chimique. Les douze principes de la chimie verte correspondent donc à des critères de conception qui fournissent un cadre à une innovation plus durable. En plein essor depuis le début du XXI<sup>ème</sup> siècle, les réalisations dans le domaine de la chimie verte sont majeures [3]. Cependant, elles ne sont qu'un prélude aux grands défis qu'il reste à relever pour inclure efficacement l'industrie chimique dans la transition énergétique et écologique. L'application des principes de la chimie verte comme source d'innovation constitue une pièce maîtresse pour mener le principal défi des chercheurs et ingénieurs contemporains qu'est l'adaptation des pratiques et la limitation du dérèglement climatique. Ces grandes lignes directrices constitueront le socle des choix et orientations qui seront développés dans ce manuscrit pour la réalisation de ce projet de thèse.

### I.1.2 Introduction aux solvants « verts »

Puisque la majorité des réactions et procédés chimiques sont réalisés à l'état liquide, les solvants occupent une place stratégique dans le développement du concept de chimie verte. Pour être qualifié de solvant « vert », un solvant doit répondre à différents critères comme être non toxique, biodégradable, recyclable, ou encore non inflammable [4]. Dans une démarche originale, Jessop a réalisé en 2011 une enquête auprès de chercheurs spécialisés dans l'utilisation de solvants verts basée sur la question suivante : « *Si l'adoption de solvants verts [...] permet de réduire les dommages environnementaux causés par les activités humaines, alors l'adoption de quelle classe de solvants sera responsable de la plus grande réduction des dommages environnementaux ?* » [5]. Il a ensuite comparé les résultats aux classes de solvants retrouvées dans les publications de 2010 du journal *Green Chemistry*.

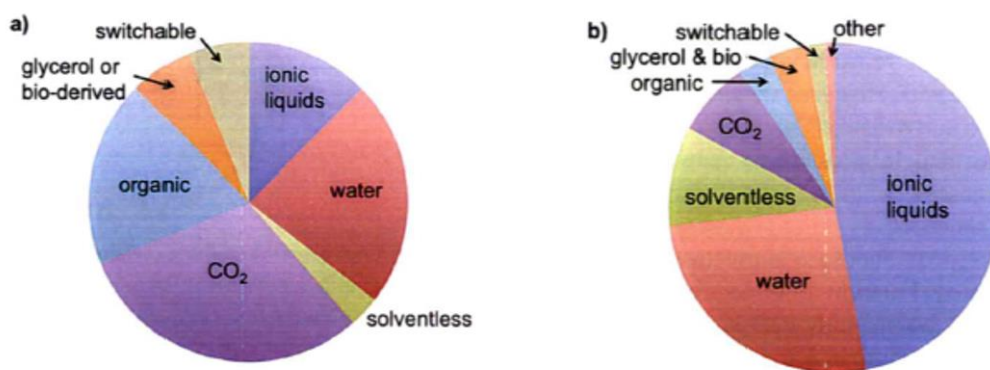


Figure I.2 Comparaison entre les solvants verts cités par des scientifiques dans le cadre d'une enquête (a) et les solvants verts cités dans *Green Chemistry* en 2010 (b) [5]

En réalisant cette comparaison, Jessop a mis en évidence que les solvants les plus cités dans les publications (Figure I.2b) ne sont pas en adéquation avec les solvants cités dans le cadre de son enquête auprès des scientifiques (Figure I.2a). En effet, parmi les solvants verts les plus prometteurs pour diminuer l'impact environnemental des activités humaines, les scientifiques consultés citent par ordre décroissant le CO<sub>2</sub>, l'eau, les solvants organiques (choisis avec précautions), les liquides ioniques et les dérivés biosourcés du glycérol. Or, près de la moitié des publications traitaient, en 2010, de l'utilisation de liquides ioniques. Le CO<sub>2</sub> ne se situant qu'à la quatrième place après l'eau et le sans-solvant. L'auteur explique ces résultats divergents par le fait que les scientifiques s'orientent plus volontiers vers la découverte de nouvelles propriétés pour un solvant plutôt que vers la réduction des impacts environnementaux. Il serait très intéressant de réaliser cette comparaison 10 ans après pour voir l'évolution des orientations des scientifiques. Finalement, en 2011, Jessop interpellait la communauté scientifique sur l'orientation massive vers les liquides ioniques et se demandait si ces derniers sont effectivement de bons solvants verts.

---

### I.1.3 Les liquides ioniques, solvants verts ?

L'appellation liquide ionique est utilisée pour décrire un sous-ensemble de la vaste famille des sels fondus. Les liquides ioniques se caractérisent par une température de fusion inférieure à 100°C. La plupart de ces mélanges sont d'ailleurs liquides à température ambiante ce qui facilite leur mise en œuvre. L'obtention d'un liquide ionique repose sur l'association d'un cation, le plus souvent organique, et d'un anion organique ou inorganique. D'après cette définition, les combinaisons cations / anions possibles sont multiples et les nouveautés nombreuses. Depuis le début des années 1990, plusieurs générations de liquides ioniques ont vu le jour comme le résume la figure I.3 issue des travaux de Kudlack *et al* <sup>[6]</sup>. Les sels d'imidazolium diversement substitués sont les plus étudiés. Les anions fluorés (BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>) sont très utilisés en catalyse organométallique alors que les dérivés sulfonique (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>-</sup>) sont plus étudiés pour leur stabilité thermique. De manière générale, les liquides ioniques se caractérisent par une grande stabilité chimique et thermique à l'état liquide. Ils sont généralement visqueux, non volatils, plus denses que l'eau et conducteurs. Ainsi, le remplacement de solvants générateurs de composés organiques volatils (COV) par des liquides ioniques dont la pression de vapeur est pratiquement nulle a été une des principales motivations ayant conduit à leur essor. Leurs propriétés spécifiques et le nombre de combinaisons quasiment infini de liquides ioniques a suscité un intérêt dans de nombreux domaines d'activité au cours des 20 dernières années.

Les domaines de l'électrochimie [7], des matériaux [8] et de la catalyse enzymatique [9] sont les plus documentés. Plus récemment, les liquides ioniques ont également trouvé des applications dans le traitement de la biomasse [10], la production de biodiesel [11], les techniques séparatives [12], la pharmacie [13] ou encore l'extraction sélective de flavonoïdes des racines de pois d'Angole [14]. Du fait de leurs propriétés physiques facilitant leur recyclage (faible tension de vapeur et bas point de fusion), les liquides ioniques ont rapidement été classés comme solvants verts. Toutefois, cette affiliation est souvent remise en cause, voire contestée. Des publications signalent une très mauvaise biodégradabilité et une toxicité potentielle de certains liquides ioniques [6]. De plus, la synthèse des liquides ioniques requiert souvent des grandes quantités de sels et de solvants utilisés dans des procédés peu respectueux de l'environnement (synthèse multi-étapes). Finalement, malgré un intérêt important de la communauté scientifique pour les liquides ioniques, ces derniers ne satisfont pas à l'ensemble des exigences de la chimie verte. Dans la continuité des travaux de recherche sur les liquides ioniques, d'autres mélanges plus en accord avec les principes de la chimie verte ont vu le jour : les mélanges à transition de phase basse température.

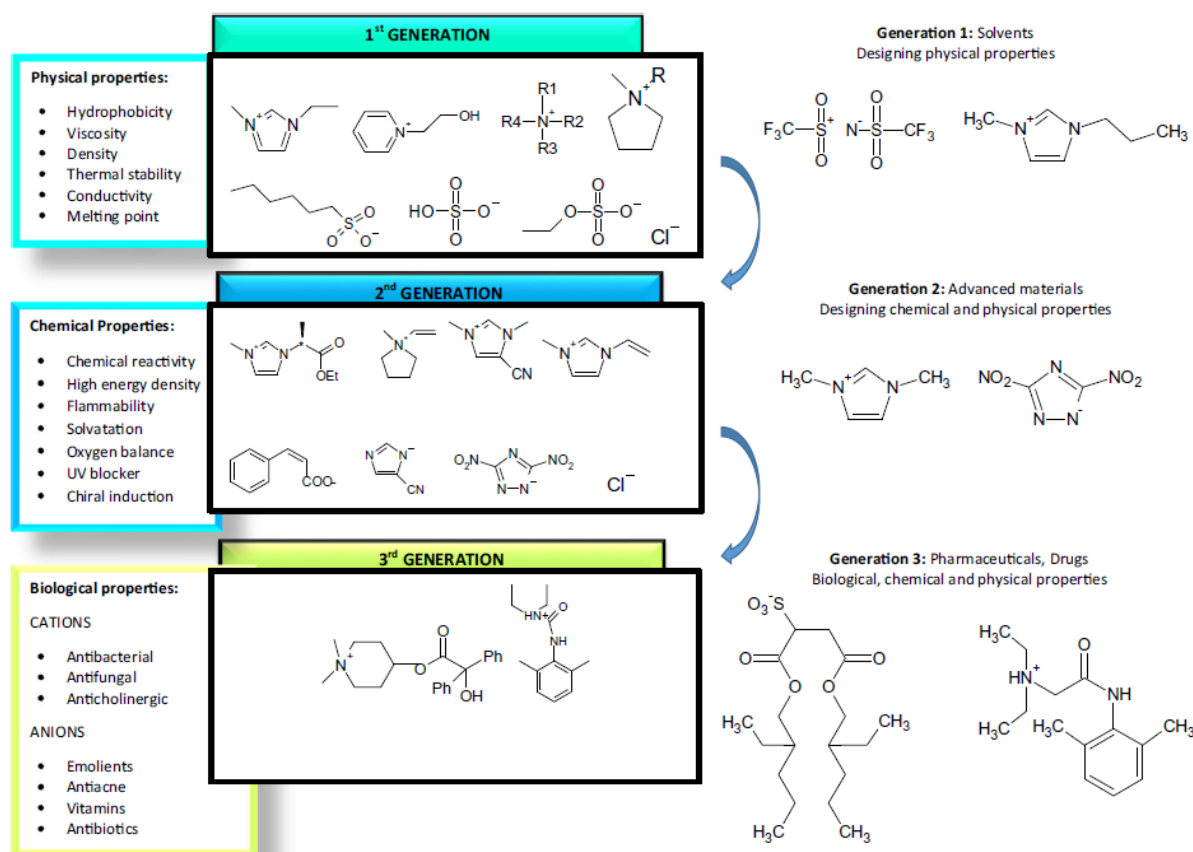
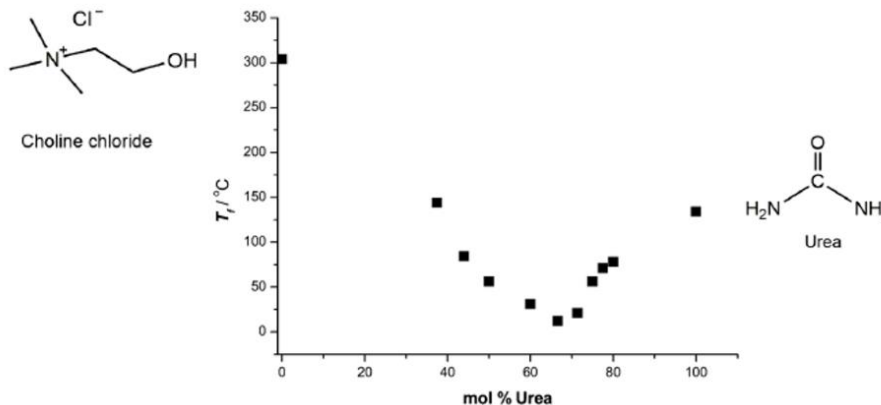


Figure I.3 Classification et propriétés des différentes générations de liquides ioniques proposée par Kudlack *et al.* en 2015 [6]

## I.2 Les mélanges à transition de phase basse température

### I.2.1 Les LTTM

Les mélanges à transition de phase basse température, ou *Low Transition Temperature Mixtures (LTTM)* [15], sont des mélanges à température de fusion ( $T_f$ ) et/ou à température de transition vitreuse ( $T_g$ ) plus basse que celle de chacun des constituants de départ. Les liquides ioniques font partie des premiers *LTTM* décrits dans la littérature. Dans l'objectif de diminuer la toxicité de ces derniers, l'utilisation de sels organiques non dangereux pour l'Homme et l'environnement a permis l'obtention de mélanges ioniques et liquides à température ambiante au début des années 2000. Le Pr. Abbott est reconnu comme étant le pionnier dans la découverte de ces mélanges qu'il a appelés les solvants eutectiques profonds ou *Deep Eutectic Solvent (DES)* dans la littérature Anglosaxonne [16]. Le chlorure de cholinium (ChCl), est de loin le composé le plus utilisé pour la formation de *DES*. Il s'agit d'un ammonium quaternaire peu cher, biodégradable et non toxique utilisé principalement en alimentation animale. Ce composé permet de former des solvants eutectiques avec des composés tels que l'urée, les acides aminés, les acides carboxyliques et les polyols [17]. Citons par exemple le mélange ChCl / urée dont le diagramme de phase a été publié en 2003 (figure I.4) [16].



**Figure I.4 Evolution du point de fusion de mélanges ChCl/urée en fonction de la composition molaire et structures des composés, adaptée de Abbott et al. [16]**

Sur la figure I.4, on remarque que les points de fusion des composés purs sont respectivement de 302°C et 133°C alors que le point de fusion du mélange en proportion molaire 1:2 (66 % mol d'urée) est de 12°C. La diminution significative du point de fusion s'explique par l'existence de liaisons hydrogène entre l'accepteur de liaisons hydrogène, ou *HBA* pour « *Hydrogen Bond Acceptor* » : ici le ChCl, et le donneur de liaisons hydrogène, ou *HBD* pour « *Hydrogen Bond Donor* » : ici l'urée.

Ce mécanisme a été plus précisément décrit depuis par la réalisation de simulations de dynamique moléculaire [18]. Les auteurs indiquent qu'avec l'augmentation de la proportion en urée, les interactions entre le cation cholinium et l'anion chlorure ( $R-OH \cdots Cl$ ) diminuent au profit d'interactions avec l'urée ( $NH \cdots Cl$ ). Ils confirment que la proportion molaire 1:2 entre ChCl et l'urée correspond à la composition qui permet de maintenir un équilibre de force entre toutes les liaisons hydrogène, ce qui conduit au point de fusion le plus faible, autrement dit, à la composition eutectique. De nombreuses combinaisons eutectiques impliquant un *HBA* et un *HBD* ont été développées sur le même modèle. Ces nombreux systèmes se répartissent en quatre catégories dépendantes de la nature des composés (tableau I.1) [19].

Type	Formule générale	Terminologie	Exemple
I	$Cat^+X^-zMCl_x$	M = Zn, Sn, Fe, Al, Ga, In	ChCl + ZnCl <sub>2</sub>
II	$Cat^+X^-zMCl_x \cdot yH_2O$	M = Cr, Co, Cu, Ni, Fe	ChCl + CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
III	$Cat^+X^-zRZ$	Z = CONH <sub>2</sub> , COOH, OH	ChCl + Urée
IV	$MCl_x + RZ$	M = Al, Zn and Z = CONH <sub>2</sub> , OH	ZnCl <sub>2</sub> + Urée

**Tableau I.1 Classification des *Deep Eutectic Solvents* selon le type de précurseurs** [19]

Bien que les *DES* de type I et II soient très proches des liquides ioniques, ils ne sont pas considérés en tant que tels car des interactions de type liaisons hydrogène complémentaires aux interactions ioniques ont été mises en évidence entre les composés [20]. Les *DES* de type III sont les plus décrits dans la littérature. Ils sont généralement composés d'un sel organique en association avec un acide carboxylique, un polyol, ou un amide. Leurs avantages résident dans l'association de composés organiques non dangereux, peu onéreux et biodégradables conduisant à une phase liquide non volatile et présentant une biodégradabilité accrue [19]. Ces mélanges particuliers permettent, dans une proportion molaire précise, d'obtenir un mélange eutectique comme explicité précédemment pour le mélange ChCl:urée (1:2 mol).

Pourtant, d'après les travaux de Martins *et al.*, l'existence de liaisons hydrogène entre les composés constitutifs d'un mélange est insuffisante pour pouvoir utiliser l'appellation de *Deep Eutectic Solvents*. En effet, les auteurs ont démontré que seuls les mélanges présentant un point de fusion inférieur au point de fusion calculé par la loi de mélange idéal pouvaient entrer dans cette classification [21]. La figure I.5 proposée par Tracy El Achkar dans son manuscrit de thèse est adaptée des travaux de Martins *et al.* et illustre la différence de température de fusion entre un mélange idéal et un solvant eutectique profond (*DES*) [22].

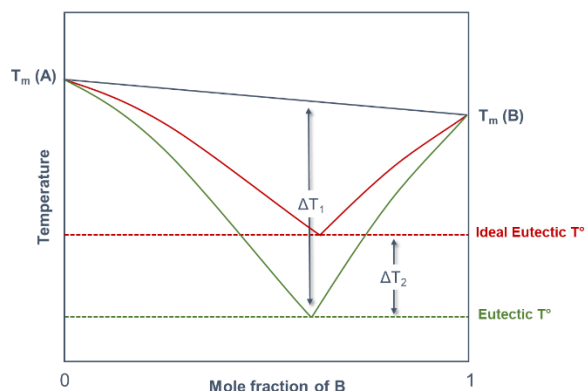


Figure I.5 Diagramme de phase solide-liquide représentant un point eutectique idéal (ligne rouge) et un solvant eutectique profond (DES) (ligne verte) [22]

D'autre part, certains mélanges binaires ne possèdent pas uniquement un point de fusion mais également une température de transition vitreuse ( $T_g$ ). C'est notamment le cas pour les mélanges contenant des monoterpènes pour lesquels une classe V de DES a été introduite par Abranches *et al.* [23]. Le diagramme de phase correspondant aux mélanges thymol / menthol permet d'illustrer cette cinquième classe de DES (figure I.6).

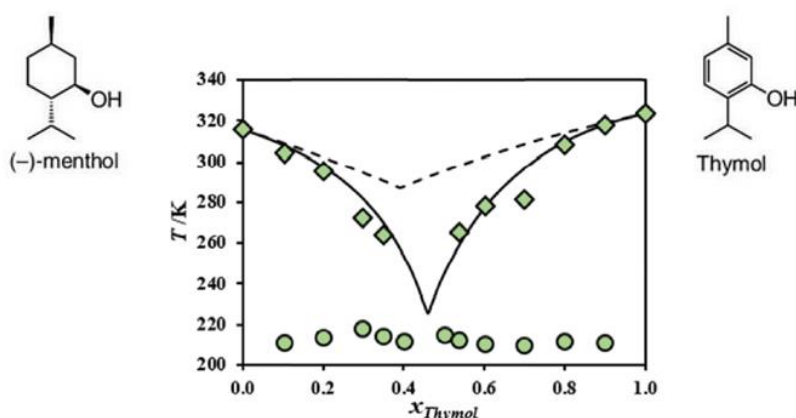


Figure I.6 Diagramme de phase du système binaire menthol/thymol. Les prédictions par loi de mélange idéal (ligne pointillée) et par COSMO-RS (ligne pleine) sont indiquées ainsi que les  $T_f$  (◆) et les  $T_g$  (●) [23]

Sur la Figure I.6, on remarque que les valeurs expérimentales de  $T_f$  sont inférieures à celles modélisées par la loi de mélange idéal (ligne pointillée). Les auteurs démontrent la non-idéalité du système par l'établissement de liaisons hydrogène entre le thymol et le menthol. La modélisation par COSMO-RS (ligne pleine) confirme qu'il existe une composition eutectique pour le mélange thymol/menthol ( $x_{thymol} \approx 0,46$ ). Expérimentalement, il apparaît également que toutes les compositions présentent une  $T_g$  comprise entre  $-50$  et  $-70^\circ\text{C}$ . Le terme *DES* tel que défini précédemment est uniquement adapté à la combinaison eutectique. Il est par conséquent inexact de l'utiliser pour décrire l'ensemble des combinaisons thymol/menthol bien qu'elles présentent de faibles températures de transition de phase.



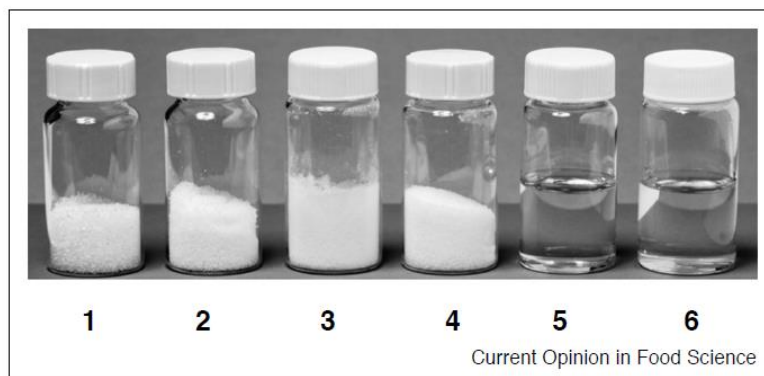
Enfin, d'autres combinaisons ne permettent pas d'obtenir un diagramme de phase. C'est notamment le cas pour le mélange ChCl:acide malonique (*DES* de type III) pour lequel aucune cristallisation n'est observée jusqu'à  $-80^{\circ}\text{C}$  [24]. Les auteurs ont indiqué que la viscosité importante des mélanges peut empêcher la croissance de cristaux. Les auteurs ont donc pointé l'impossibilité d'utiliser le terme eutectique stricto sensu pour ce type de mélange et ils ont introduit l'appellation plus générale de « *Low Transition Temperature Mixtures (LTTM)* » [15].

Finalement, la littérature scientifique regroupe pléthore d'articles mentionnant le terme de *DES* sans que le mélange étudié remplisse les critères énumérés précédemment. Il y a lieu d'être vigilant d'autant que la diversité des constituants pouvant entrer dans la constitution de *DES* a fait apparaître différentes sous-catégories depuis la publication des travaux du Pr. Abbott en 2003. On citera par exemple les appellations suivantes : *Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES)* [25] lorsque les composés de départ sont d'origine naturelle, *Hydrophobic Deep Eutectic Solvents (HDES)* [26] quand le mélange obtenu est hydrophobe (menthol/thymol), les *Therapeutic Deep Eutectic Solvents (THEDES)* [27] si un des composés de départ est un principe actif pharmaceutique (ex : ibuprofen), les *Bronsted Acidic Deep Eutectic Solvent (BADES)* [28] pour les mélanges contenant des acides de Lewis ou encore les *Supramolecular Deep Eutectic Solvents (SUPRADES)* [29] obtenus via l'utilisation de cyclodextrines. En dépit de leur introduction relativement récente dans la littérature, ces diverses appellations ont déjà conduit à des milliers de publications scientifiques. Toutefois, certains mélanges peuvent être retrouvés sous différentes terminologies dans la littérature. A titre d'exemple, le mélange ChCl:urée (1:2 mol) correspond à la composition eutectique avec une  $T_f$  de  $12^{\circ}\text{C}$  (*DES*), la  $T_g$  de ce mélange est de  $-75,55^{\circ}\text{C}$  [30] (*LTTM*) et les composés de départ sont d'origine naturelle (*NaDES*). Les différentes appellations utilisées pour un même mélange peuvent parfois être source de confusion. Les auteurs ayant pointé ces incohérences suggèrent de regrouper ces différentes appellations sous le terme *LTTM* afin d'éliminer les sources de confusions dans les dénominations [31]-[33]. Nous sommes en accord avec cette interprétation et c'est pourquoi l'utilisation du terme *LTTM* sera privilégiée autant que faire se peut dans la suite de ce manuscrit.

En raison de l'essor des principes de la chimie verte, les chercheurs académiques et industriels s'orientent de plus en plus vers les systèmes *LTTM* obtenus avec des composés d'origine naturelle, également appelés *NaLTTM*. Si une interrogation similaire à celle réalisée par Jessop 10 ans plus tôt (cf. Figure I.2) était réalisée aujourd'hui, les termes *NaDES* et *NaLTTM* apparaîtraient nécessairement dans les résultats. Dans le cadre des enjeux de cette thèse, ces mélanges *NaLTTM* ont fait l'objet d'une attention toute particulière.

### I.2.2 Les LTTM d'origine naturelle

Dans la littérature, la majorité des *LTTM* d'origine naturelle est retrouvée sous l'appellation de *Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES)* [25]. Cette appellation a été introduite en 2011 par une équipe de l'Université de Leiden spécialisée en métabolomique : une science qui étudie la formation et le devenir des métabolites présents dans une cellule, un organe ou un organisme végétal. L'analyse métabolomique repose principalement sur l'utilisation de la chromatographie gazeuse et de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) afin d'obtenir une cartographie qualitative et quantitative des composés contenus dans un organisme [34]. Les données collectées par les équipes des Pr. Verpoorte et Pr. Choi ont mis en évidence que certains métabolites primaires (acides aminés, sucres, acides organiques et surtout le chlorure de cholinium) sont présents en quantité très importante dans de nombreux organismes végétaux. Ils ont alors formulé une hypothèse selon laquelle ces composés joueraient le rôle de solvant dans les voies biochimiques du développement des métabolites [25]. En effet, tous les composés caractérisés dans leurs travaux semblaient être d'excellents candidats à l'obtention de *DES*. Comme illustré par la figure I.7, les auteurs ont démontré que des liquides visqueux présentant des similitudes avec les *DES* pouvaient être obtenus par simple mélange de solides (sucrose, fructose, glucose, acide malique) dans des proportions molaires adéquates [35]. C'est notamment le cas pour les mélanges sucrose-fructose-glucose (1:1:1 mol) et sucrose-acide malique (1:1 mol).



**Figure I.7 Illustration de LTTM obtenus à partir de molécules naturelles : sucrose (1), fructose (2), glucose (3), acide malique (4), sucrose-fructose-glucose (1:1:1 mol) (5) et sucrose-acide malique (1:1 mol) (6) [35]**

De plus, des études de solubilité de composés naturels peu solubles dans l'eau (rutine, quercétine, acide cinnamique, carthamine, anthraquinone, taxol) et de macromolécules d'origine naturelle (gluten, ADN et amidon) ont montré que certains *NaDES* à base de chlorure de cholinium ou d'acide organique présentent des aptitudes à solubiliser et à stabiliser les composés dissous nettement supérieures à celles de l'eau (Tableau I.2) [36].

Solubility of small molecules (m mole) including rutin, quercetin, cinnamic acid, carthamin, 1,8-dihydroxyl-anthraquinone, taxol, ginkgolide B and macromolecules (g/mole<sub>solvent</sub>) including gluten, DNA and starch in different natural deep eutectic solvents or ionic liquids (n=3).

	Compounds	H <sub>2</sub> O	PCH <sup>d</sup>	GCH <sup>d</sup>	LGH <sup>d</sup>	XoCH <sup>d</sup>
Small molecules	Rutin <sup>a</sup>	0.01	107.09	120.6	20.36	114.15
	Quercetin <sup>a</sup>	0.0004	117.60	106.19	2.57	166.95
	Cinnamic acid <sup>a</sup>	0.13	128.47	40.54	124.6	44.29
	Carthamin <sup>a</sup>	0.02	4.21	2.77	0.41	6.77
	1,8-Dihydroxyl anthraquinone <sup>a</sup>	0.00	0.12	0.26	0.41	0.14
	Taxol <sup>a</sup>	0.0002	2.95	0.46	3.45	0.13
	Ginkgolide B <sup>a</sup>	0.01	38.34	6.51	2.49	11.62
Macromolecules	Gluten <sup>a</sup>	0.03	0.06	0.10	2.64	0.23
	DNA <sup>a</sup>	4.56	0.92	1.20	157.01	1.81
	Starch <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	2.47	7.55	1.67	- <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Detection temperature at 40 °C.

<sup>b</sup> Detection temperature at 100 °C.

<sup>c</sup> Not detected.

<sup>d</sup> 1,2-Propanediol–choline chloride–water (PCH), glucose–choline chloride–water (GCH), lactic acid–glucose–water (LGH) and xylitol–choline chloride–water (XoCH).

Tableau I.2 Solubilité de molécules dans des NaDES comparativement à l'eau [36]

Les différents exemples décrits dans la tableau I.2 attestent bien qu'en fonction des composés constitutifs d'un mélange *NaDES*, il est possible de solubiliser des molécules naturelles qu'elles soient apolaires, de polarité intermédiaire ou polaires. Autrement dit, un choix judicieux des composés de départ permet d'adapter la polarité d'un mélange à son application. Par exemple, González *et al.* ont étudié la solubilité de la vanilline dans 14 *NaDES* différents [37]. Les auteurs concluent que les *NaDES* peuvent représenter des solvants alternatifs pour l'extraction d'arômes naturels (comme la vanilline) ou la solubilisation d'arômes alimentaires. Gattefossé a adapté le concept des *NaDES* aux contraintes du marché cosmétique afin d'innover dans le développement d'actifs biologiques obtenus par extraction végétale (cf. Chapitre IV) [38]. L'extraction de macromolécules d'origine naturelle (protéines, polysaccharides, lipides) par des solvants de types *DES* et *NaDES* a récemment fait l'objet d'une revue publiée par Ling et Hadinoto [39]. Enfin, les *NaDES* sont également décrits comme des milieux permettant de stabiliser des enzymes et des protéines (ADN, ARN) [40]. L'ensemble de ces données semble valider l'hypothèse formulée par Choï *et al.*, selon laquelle les *NaDES* joueraient un rôle majeur dans les cellules végétales [25]. Plus particulièrement, ces mélanges pourraient constituer des phases liquides permettant la biosynthèse de métabolites secondaires peu solubles dans l'eau [36]. On peut toutefois regretter que peu de travaux étudient véritablement leur rôle dans les organismes végétaux [41].

Finalement, nous avons vu que la littérature scientifique recense des centaines de combinaisons permettant d'obtenir des *LTTM* à partir de précurseurs biosourcés [15]; [36]; [42]; [43]. Afin de réduire le champ de ces recherches bibliographiques et, en accord avec la définition d'un *NaLTTM*, nous nous sommes attachés à faire la revue des combinaisons pour lesquelles une valeur de température de transition vitreuse ( $T_g$ ) est explicitement reportée. Les résultats de ces recherches ont permis d'identifier 139 combinaisons différentes qui sont décrites dans le tableau placé en annexe I. Une première exploitation globale de l'annexe I est détaillée sur la figure I.8.

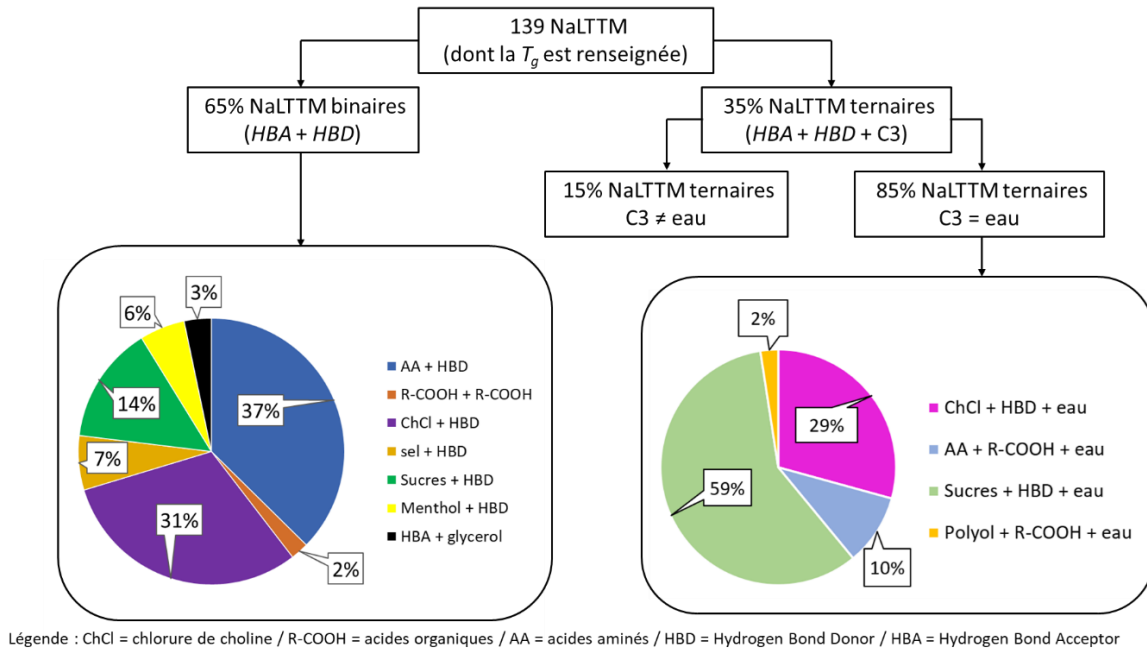


Figure I.8 Interprétation graphique du recensement des NaLTTM dont la  $T_g$  est renseignée dans la littérature (cf. Tableau Annexe I)

D'après la figure I.8, la majorité des combinaisons identifiées sont des systèmes binaires *HBA + HBD* (65%). Parmi elles, 37% concernent des associations acides aminés + *HBD* et 31% des *DES* de type III (*ChCl + HBD*). Les mélanges sucres + *HBD* représentent 14% des systèmes *NaLTTM* binaires et les autres combinaisons sont nettement moins documentées ( $\leq 7\%$ ). En ce qui concerne les *NaLTTM* ternaires, dans plus de 85% des cas le troisième composé (noté C3) est de l'eau. Parmi eux, 59% correspondent à des combinaisons sucres + *HBD* + H<sub>2</sub>O alors que près d'un tiers (29%) sont obtenues par ajout d'eau dans des *DES* de type III (*ChCl + HBD + H<sub>2</sub>O*). Cette première lecture macroscopique des résultats permet de faire ressortir que les systèmes (avec ou sans eau) les plus décrits dans la littérature sont :

1. les *DES* de type III (*ChCl + HBD*)
2. les *NaLTTM* acides aminés + *HBD* (majoritairement des acides organiques)
3. les *NaLTTM* composés de sucres et d'un *HBD*

Ces recherches bibliographiques ont également permis d'identifier un intérêt croissant pour l'étude et la mise au point de *NaLTTM* apolaires (à base de menthol principalement). Grâce à la diversité des systèmes identifiés, une exploitation plus fine permettra de détecter des tendances quant à l'impact de la composition (nature, rapport molaire, quantité d'eau) sur les propriétés de ces mélanges (§ I.2.4). Mais intéressons-nous tout d'abord aux méthodes de préparation de ces *NaLTTM*.

### I.2.3 Préparation des NaLTTM

Nous avons vu précédemment que la littérature pouvait être source de confusion quant à la composition de mélanges décrits comme des *NaLTTM*. Concernant la préparation de ces mélanges, les méthodes sont générales et non spécifiques à une appellation. Quatre méthodes de préparation ont été identifiées pour l'obtention des *NaLTTM* décrits dans l'annexe I. Ces méthodes diffèrent selon la nature des composants et l'application envisagée pour ces mélanges.

1. La méthode la plus décrite conjugue agitation et chauffage des composés de départ <sup>[16]; [36]</sup>. Ces derniers sont placés dans un flacon et agités à l'aide d'un barreau magnétique. Le chauffage est réalisé par immersion dans un bain thermostaté ou à l'aide d'une plaque chauffante. Les températures de préparation peuvent varier selon les auteurs mais une gamme de température allant de 50 à 90°C est classiquement retrouvée. L'agitation sous chauffage est souvent maintenue jusqu'à ce qu'une solution limpide et homogène soit obtenue. Lorsque les temps de préparation sont précisés, ils se situent généralement entre 30 et 120 minutes.

2. Une seconde méthode particulièrement adaptée aux mélanges ne comportant pas ou peu d'eau fait intervenir l'évaporation de cette dernière <sup>[36]</sup>. Dans ce cas, les composés de départ sont dissous dans un excès d'eau. Le mélange est ensuite placé dans un évaporateur rotatif sous vide pour éliminer l'eau. Le liquide obtenu après évaporation est placé dans un dessiccateur jusqu'à ce que sa masse reste constante. Cette méthode de préparation ne permet pas de contrôler la teneur en eau du mélange, elle est donc souvent couplée à un dosage de l'eau résiduelle par titration Karl-Fischer <sup>[57]; [63]</sup>.

3. Une troisième méthode intitulée « *freeze-drying method* » est également reportée <sup>[64]</sup>. Les composés sont premièrement dissous dans un excès d'eau. La solution aqueuse est ensuite congelée puis lyophilisée. Le liquide obtenu après lyophilisation est placé dans un dessiccateur jusqu'à ce que sa masse reste constante. Cette méthode couplant congélation et lyophilisation est très énergivore, longue et nécessite un dosage de l'eau résiduelle en fin de préparation.

4. Plus récemment, des techniques d'intensification de la méthode couplant chauffage et agitation ont été proposées avec l'utilisation de micro-ondes <sup>[65]</sup> ou d'ultrasons <sup>[66]</sup>. Dans les deux cas, les auteurs visent à réduire le temps et la consommation d'énergie de l'étape de préparation du mélange. Les travaux de Gomez *et al.* comparent les temps de préparation d'un mélange acide lactique / glucose / eau par la méthode conventionnelle et par une méthode assistée par micro-ondes <sup>[65]</sup>.

Les auteurs ont rapporté une diminution du temps de préparation considérable (20 s vs 1 h) et une consommation d'énergie 650 fois plus faible. Cependant, les auteurs ont également décrit des différences significatives concernant le pH et la conductivité des mélanges obtenus par les deux méthodes. Cela est certainement dû à une dégradation du glucose en milieu acide. Les travaux de Santana *et al.* concernent la préparation de mélanges à base de xylitol, d'acide citrique, d'acide malique et d'eau [66]. Les mélanges ont été préparés par agitation et chauffage (méthode 1) et en utilisant les ultra-sons ou les micro-ondes. Les auteurs ont comparé les propriétés physiques (densité, viscosité), les profils de dégradation thermique (analyse thermogravimétrique) et les bandes caractéristiques par spectroscopie infra-rouge des mélanges obtenus. Très peu de différences ont été mises en évidence par les auteurs qui concluent que les techniques d'intensification sont prometteuses pour préparer des *NaLTTM*. Toutefois, les auteurs tempèrent leur conclusion en insistant sur les avantages de la méthode couplant agitation et chauffage (simplicité et application industrielle). Bien que prometteuses, les techniques de préparation assistées par micro-ondes ou ultrasons sont encore trop peu décrites dans la littérature pour pouvoir être généralisées.

En conclusion, la méthode couplant chauffage et agitation apparaît comme la plus en accord avec les principes de la chimie verte puisque les opérations énergivores (congélation, lyophilisation, évaporation) sont évitées. Cette méthode nécessite du matériel standard et peut aisément être appliquée industriellement. La plupart des auteurs utilisant cette approche maintiennent chauffage et agitation jusqu'à ce qu'une solution optiquement limpide et homogène soit obtenue. D'autres chercheurs, comme Aroso *et al.*, démontrent l'absence de cristaux par observation du liquide en microscopie à lumière polarisée, validant ainsi la préparation des *LTMM* [67]. Il est également possible de démontrer l'absence de cristaux au sein d'un *LTTM* par analyses de diffraction des rayons X [46]. La validation d'une méthode de préparation peut également être discutée par la caractérisation des propriétés physico-chimiques d'un mélange puisque chaque système *LTTM* se caractérise par des grandeurs physiques propres. Typiquement, la détermination de la viscosité, de la densité ou des températures de transition est un moyen adapté pour valider la préparation d'un mélange déjà décrit.

Dans la prochaine partie, nous allons détailler les différentes propriétés décrites pour les *NaLTTM*. Compte-tenu des définitions énoncées précédemment pour les mélanges à transition de phase basse température (§ I.2.1 et I.2.2) et du recensement des  $T_g$  de ces mélanges (Annexe I), les propriétés thermiques de ces mélanges seront discutées de façon plus approfondie, avant d'être reliées aux autres propriétés physico-chimiques.

---

## I.2.4 Propriétés des NaLTTM

Le nombre important de composés pouvant entrer dans la composition de mélanges *NaLTTM* fait que la littérature regroupe une multitude de travaux de caractérisation des propriétés physico-chimiques. De nombreuses revues plus ou moins récentes sont d'ailleurs disponibles [20]; [68]–[72]; [43]. Ce paragraphe détaille les principales caractéristiques physico-chimiques décrites pour les mélanges *NaLTTM* recensés en annexe I.

---

### I.2.4.1 Propriétés thermiques

#### I.2.4.1.1 Les températures de transition

La détermination des températures de transition ( $T_f$  et/ou  $T_g$ ) des *NaLTTM* est primordiale pour estimer la plage de température dans laquelle ces mélanges sont liquides. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) est classiquement utilisée à cet effet. En ce qui concerne la détermination des points de fusion de mélanges binaires, l'analyse par DSC de différentes compositions permet de construire des diagrammes de phase comme nous l'avons vu pour le mélange ChCl:urée en figure I.4 et pour le mélange menthol:thymol en figure I.6. Zhang *et al.* ont publié une revue faisant état des  $T_f$  de 33 combinaisons ChCl + *HBD* [20]. En fonction de l'*HBD*, les  $T_f$  varient entre  $-66^\circ\text{C}$  pour l'éthylène glycol et  $+149^\circ\text{C}$  pour la diméthylurée. Les auteurs ont également noté que des liquides à température ambiante sont obtenus lorsque des acides organiques (acide malonique, acide lévulinique) ou des polyols (xylitol, sorbitol) sont utilisés en combinaison avec le ChCl. La  $T_f$  d'un mélange dépend donc de la nature et des proportions des constituants impliqués dans le mélange. Il en est de même pour la température de transition vitreuse ( $T_g$ ). Afin de discuter ce point, nous allons nous appuyer sur le tableau de l'annexe I. On note tout d'abord que les *NaLTTM* recensés dans ce tableau se caractérisent par des  $T_g$  comprises entre  $+15^\circ\text{C}$  pour le système ChCl:maltitol (1:1 mol) et  $-110^\circ\text{C}$  pour le système ternaire ChCl:propanediol:eau (1:1:1 mol). Expérimentalement, l'utilisation d'une DSC avec un système de refroidissement à l'azote est souvent nécessaire pour pouvoir déterminer la  $T_g$  des systèmes *NaLTTM* compte-tenu des très basses valeurs de  $T_g$  identifiées dans la littérature.

Lorsque l'on se focalise sur les systèmes *NaLTTM* binaires en proportion équimolaire (1:1 mol) recensés dans le tableau de l'annexe I, il est possible de discuter de l'impact de la nature des constituants comme le montre la figure I.9.

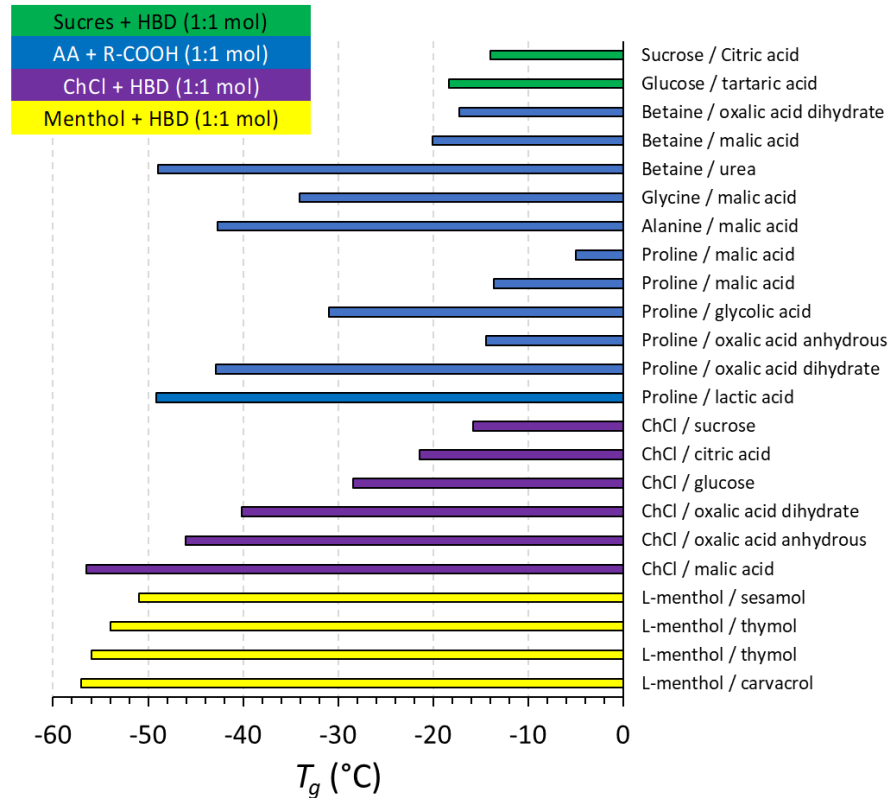


Figure I.9 Valeurs de  $T_g$  (issues de l'annexe I) des systèmes *NaLTTM* binaires en proportion molaire (1:1) en fonction du couple HBA / HBD

L'utilisation de barres de couleur différentes permet de distinguer les 3 catégories de systèmes *NaLTTM* identifiées auparavant. Bien qu'il y ait des contre-exemples, ces dernières peuvent être classées en fonction des valeurs de  $T_g$  comme suit:

$$T_g(\text{ChCl} + \text{HBD}) \approx T_g(\text{Acides Aminés} + \text{Acides organiques}) < T_g(\text{Sucres} + \text{HBD})$$

L'intérêt de comparer les systèmes équimolaires réside dans la possibilité de discuter de l'influence d'un composé sur la valeur de  $T_g$  obtenue pour un mélange binaire. Par exemple, dans les systèmes ChCl + acides, on observe que le système à base d'acide malique présente une  $T_g$  inférieure à celles obtenues avec l'acide oxalique et l'acide citrique. Ces observations sont cohérentes avec les travaux de Abbott *et al.* relatifs à l'étude des propriétés thermiques de mélanges ChCl + acides organiques [73]. En effet, les auteurs ont indiqué que pour les diacides (acides malique et oxalique), le point eutectique est obtenu pour un mélange (1:1 mol) alors que pour les triacides (acide citrique), le point eutectique se situe plutôt dans la région entre 30 et 35 % molaire d'acide, soit 1 mole d'acide pour 2 moles de ChCl. On en déduit que le mélange ChCl:acide citrique (1:1 mol) ne correspond à la composition eutectique. La  $T_g$  de ce mélange est par conséquent nettement supérieure à celles des autres combinaisons ChCl:acide organique qui, elles, correspondent à des proportions eutectiques.



En ce qui concerne les mélanges ChCl + sucres, on observe que la  $T_g$  du système ChCl + glucose est inférieure à celle du système ChCl + sucrose. Dans ce cas, les  $T_g$  des mélanges sont corrélables avec la valeur des  $T_g$  des sucres : glucose ( $T_g = 38^\circ\text{C}$ ) et sucrose ( $T_g = 62^\circ\text{C}$ ) [74]. La seconde catégorie de *NaLTTM* majoritaire dans la littérature correspond aux mélanges composés d'acides aminés et d'acides organiques. L'impact de la nature de l'acide aminé peut être commenté en s'intéressant aux combinaisons (1:1 mol) de différents acides aminés avec l'acide malique. Les  $T_g$  relevées évoluent comme suit :  $T_g$  (Alanine + Ac. malique) ( $-43^\circ\text{C}$ ) <  $T_g$  (Glycine + Ac. malique) ( $-34^\circ\text{C}$ ) <  $T_g$  (Bétaïne + Ac. malique) ( $-20^\circ\text{C}$ ) <  $T_g$  (Proline + Ac. malique) ( $-14^\circ\text{C}$ ). Cependant, les  $T_g$  des acides aminés purs évoluent dans l'ordre inverse :  $T_g$  Alanine ( $+347^\circ\text{C}$ ) >  $T_g$  Glycine ( $+325^\circ\text{C}$ ) >  $T_g$  Proline ( $+150^\circ\text{C}$ ) [75]. Dans le cas de ces mélanges acide malique:acide aminé (1:1 mol), il semblerait que ce soit la structure de l'acide aminé plutôt que sa  $T_g$  qui influence la valeur de  $T_g$  du mélange. De plus, l'azote d'un acide aminé peut se protoner en présence d'eau, il peut donc être *HBA* et/ou *HBD*. L'impact de la présence d'eau sur ce type de mélange peut être discuté à partir de la figure I.9. A titre d'exemple, 2 valeurs différentes de  $T_g$  sont rapportées pour le mélange proline:acide malique (1:1 mol), respectivement  $-5^\circ\text{C}$  [24] et  $-14^\circ\text{C}$  [61]. Dans le premier cas, les auteurs indiquent avoir séché sous vide les solides avant préparation du *NaLTTM* alors que dans le second cas, les auteurs n'indiquent pas avoir pris ces précautions. Ainsi, même une très faible quantité d'eau influence la  $T_g$  d'un mélange à base d'acide aminé. Les travaux de Dai *et al.* indiquent une  $T_g$  de  $-61^\circ\text{C}$  dans le cas d'un mélange proline:acide malique:eau (1:1:3 mol). L'impact de la quantité d'eau sur les propriétés thermiques est donc considérable. La même tendance est observée en comparant les valeurs obtenues en utilisant soit de l'acide oxalique anhydre, soit de l'acide oxalique dihydraté en mélange équimolaire avec la proline [61]. Lorsque l'acide dihydraté est utilisé, les auteurs rapportent une valeur de  $T_g$  de  $-43^\circ\text{C}$  contre  $-14^\circ\text{C}$  avec l'acide oxalique anhydre. Dans le second cas, la proline n'est pas sous forme protonée alors qu'elle le devient en présence d'eau ce qui favorise l'établissement de liaisons hydrogène. Toutefois, une observation inverse est effectuée par les auteurs en mélangeant ces acides oxaliques (anhydre et dihydraté) avec le ChCl en proportion molaire (1:1mol). La  $T_g$  du mélange anhydre ( $-46^\circ\text{C}$ ) est inférieure à celle obtenue avec la forme dihydratée ( $-40^\circ\text{C}$ ), ce qui peut paraître contre intuitif à première vue. Cela est dû aux interactions entre le cation cholinium et l'eau comme nous l'expliquerons plus en détail par la suite (§ I.2.6). Ainsi, la  $T_g$  d'un mélange dépend fortement de la quantité d'eau mais surtout de la manière dont l'eau va s'intégrer au système.

A travers cette catégorie de mélanges binaires équimolaires, il apparaît que les mécanismes d'association entre les composés sont complexes (liaisons hydrogène, forces de Van der Waals, etc.) et doivent être considérés pour expliquer la valeur de  $T_g$ . Les *NaLTTM* sont donc bien des mélanges complexes que les lois de mélanges classiques ne peuvent pas décrire avec précision.

A partir de l'annexe I, il est également possible de discuter l'impact de la proportion des composés qui constituent le mélange. Par exemple, les travaux de Zdanowicz *et al.* rapportent, entre autres, les  $T_g$  de systèmes binaires glycérol:fructose (de 2:1 à 6:1 mol) [53]. Les valeurs de  $T_g$  de ces systèmes sont comprises entre  $-56^\circ\text{C}$  pour le rapport 2:1 et  $-73^\circ\text{C}$  pour le rapport 6:1 (tableau I.3). Ces valeurs diminuent avec l'augmentation de la proportion molaire en glycérol. Ainsi, en augmentant la proportion du composé présentant la plus faible  $T_g$  il est possible de diminuer la  $T_g$  d'un mélange binaire.

LTTM	$T_g$ [ $^\circ\text{C}$ ]
Fruc:G 1:2	-55.7
Fruc:G 1:3	-62.9
Fruc:G 1:4	-68.2
Fruc:G 1:5	-69.9
Fruc:G 1:6	-72.5
Gluc:G 1:3	-64.0
Gluc:G 1:4	-68.5
Gluc:G 1:5	-67.0
Gluc:G 1:6	-68.9
Suc:G 1:6	-67.4

Tableau I.3 Valeurs de  $T_g$  rapportées par Zdanowicz *et al.* pour des systèmes sucre : glycérol [53]

L'impact de l'ajout d'un tiers corps dans un *NaLTTM* ressort également du tableau de l'annexe I. Par exemple, les travaux de Chemat *et al.* rapportent les  $T_g$  obtenues pour des mélanges ternaires composés de ChCl, d'urée et d'arginine [30] et les travaux de Craveiro *et al.* traitent de l'ajout d'eau dans un mélange ChCl:xylose (2:1 mol) [57] (Tableau I.4). Les travaux de Chemat indiquent que l'ajout de très faibles quantités d'arginine dans le *NaLTTM* ChCl:urée (1:2 mol) augmente significativement la valeur de  $T_g$  du mélange ternaire comparativement au mélange binaire sans arginine [30]. A l'inverse, les travaux de Craveiro *et al.* montrent que l'ajout progressif d'eau dans un système ChCl:xylose (2:1 mol) conduit à une diminution progressive de la valeur de  $T_g$  des mélanges ternaires ( $T_g = -61.3^\circ\text{C}$  pour 5% m/m d'eau) comparativement au mélange binaire ( $T_g = -51.2^\circ\text{C}$ ) [57].

	Hydrogen Bond Acceptor (HBA)	Hydrogen Bond Donor (HBD)	Third Compound	molar ratio	$T_g$ ( $^\circ\text{C}$ )	Référence
71	choline chloride	urea	/	1:2	-75.55	Chemat <i>et al.</i> 2016 [30]
72	choline chloride	urea	arginine	1:2:0.05	-62.67	
73	choline chloride	urea	arginine	1:2:0.10	-59.22	
74	choline chloride	urea	arginine	1:2:0.15	-59.11	
75	choline chloride	urea	arginine	1:2:0.20	-54.42	
86	choline chloride	xylose	/	2:1	-51.2	Craveiro <i>et al.</i> 2016 [57]
90	choline chloride	xylose	water	2:1 + 2.2 wt%	-58.5	
91	choline chloride	xylose	water	2:1 + 3.8 wt%	-59.1	
92	choline chloride	xylose	water	2:1 + 5.0 wt%	-61.3	

Tableau I.4 Extraction de données de  $T_g$  issues du tableau récapitulatif placé en annexe I

Pour ces exemples, les  $T_g$  observées sont corrélables avec la valeur de  $T_g$  du tiers corps ajouté dans ces mélanges binaires. En effet, l'eau ( $T_g = -137^\circ\text{C}$ )<sup>[74]</sup> présente une  $T_g$  inférieure à celle du système ChCl:xylose (2:1 mol) ( $T_g = -51^\circ\text{C}$ ) et va diminuer la  $T_g$  du mélange ternaire. A l'inverse, l'arginine ( $T_g = 137^\circ\text{C}$ )<sup>[75]</sup> se caractérise par une  $T_g$  supérieure à celle du mélange ChCl:urée (1:2 mol) ( $T_g = -75^\circ\text{C}$ ). Son ajout, même en très faible proportion, va ainsi conduire à l'augmentation de la  $T_g$  du mélange ternaire. L'exploitation de l'annexe I met donc en évidence que la nature des constituants, leur proportion molaire, la présence ou non d'un tiers corps mais surtout la nature des interactions (liaisons hydrogène, forces de Van der Waals, etc.) entre les composés influencent la valeur de  $T_g$  du mélange *NaLTTM*.

#### I.2.4.1.2 La température de dégradation

La détermination de la température de décomposition ( $T_d$ ) d'un *NaLTTM* est classiquement déterminée par analyse thermogravimétrique (ATG). Les auteurs ayant utilisé cette technique pour décrire des mélanges à base de ChCl ont rapporté que les  $T_d$  des *NaLTTM* sont proches de celles du donneur de liaisons hydrogène<sup>[76]; [77]</sup>. Cette observation est cohérente avec la nature des interactions puisque les liaisons hydrogène sont affaiblies lorsqu'elles subissent un traitement thermique<sup>[78]</sup>. Dans les cas des études citées, la  $T_d$  de l'*HBD* est inférieure à celle de l'*HBA* (le ChCl), c'est donc bien la nature du donneur qui fixe la  $T_d$  de ces mélanges. Cette observation peut être généralisée en disant que la  $T_d$  d'un mélange *NaLTTM* sera proche de celle du constituant ayant la plus faible  $T_d$ .

#### I.2.4.2 Propriétés rhéologiques

La plupart des *LTTM* décrits dans la littérature sont très visqueux à  $25^\circ\text{C}$  ( $\eta > 100$  mPa.s). La viscosité caractérise l'ensemble des phénomènes responsables de la résistance d'un fluide à son écoulement. Autrement dit, la viscosité d'un *LTTM* est une grandeur macroscopique qui dépendra directement des forces de cohésion existantes entre les molécules à l'échelle nanométrique. La viscosité importante de ces systèmes est principalement reliée au réseau de liaisons hydrogène établi entre les composants. A titre d'exemple, Zhao *et al.* rapportent les viscosités obtenues à  $30^\circ\text{C}$  pour 20 mélanges à base de ChCl (Tableau I.5)<sup>[79]</sup>.

DESs	salt/HBD molar ratio	water content wt %	viscosity <sup>a</sup> Pa·s	conductivity <sup>a</sup> μS·cm <sup>-1</sup>	density <sup>a</sup> g/cm <sup>3</sup>
ChCl/urea	1:2	1.89 ± 0.01	0.214	1287	1.1879
ChCl/acetamide	1:2	2.83 ± 0.02	0.127	2710	1.0852
ChCl/ethylene glycol	1:2	3.79 ± 0.01	0.025	9730	1.1139
ChCl/glycerol	1:2	1.68 ± 0.01	0.177	1647	1.1854
ChCl/1,4-butanediol	1:4	2.87 ± 0.01	0.047	2430	1.0410
ChCl/triethylene glycol	1:4	2.47 ± 0.03	0.044	1858	1.1202
ChCl/xylitol	1:1	1.21 ± 0.01	3.867	172.6	1.2445
ChCl/D-sorbitol	1:1	1.10 ± 0.02	13.736	63.3	1.2794
ChCl/ <i>p</i> -toluenesulfonic acid <sup>b</sup>	1:1	5.85 ± 0.01	0.183	1138	1.2074
ChCl/oxalic acid <sup>c</sup>	1:1	6.68 ± 0.02	0.089	2350	1.2371
ChCl/levulinic acid	1:2	2.55 ± 0.01	0.119	1422	1.1320
ChCl/malonic acid	1:1	3.36 ± 0.01	0.616	732	1.2112
ChCl/malic acid	1:1	1.72 ± 0.01	11.475	41.4	1.2796
ChCl/citric acid <sup>b</sup>	1:1	4.06 ± 0.01	45.008	18.4	1.3313
ChCl/tartaric acid	2:1	1.35 ± 0.05	66.441	14.3	1.2735
ChCl/xylose/water	1:1:1	9.85 ± 0.02	0.887	1092	1.2505
ChCl/sucrose/water	5:2:5	5.43 ± 0.03	3.939	147.2	1.2737
ChCl/fructose/water	5:2:5	9.35 ± 0.02	0.598	1399	1.2095
ChCl/glucose/water	5:2:5	9.35 ± 0.06	0.584	2820	1.2094
ChCl/maltose <sup>b</sup> /water	5:2:5	9.47 ± 0.01	3.122	421	1.2723

<sup>a</sup>Determined at 30 °C. <sup>b</sup>Monohydrate. <sup>c</sup>Dehydrate.

**Tableau I.5 Paramètres physico-chimiques de DES de type III (ChCl + HBD) à 30°C [79]**

Dans le tableau I.5, les valeurs de viscosité à 30°C sont comprises entre 0,025 Pa.s pour le mélange ChCl / éthylène glycol (1:2 mol) et 66 Pa.s pour le mélange ChCl / acide tartarique (2:1 mol). Le ChCl étant l'*HBA* commun à tous les mélanges cités par les auteurs, cette revue permet de relier la nature de l'*HBD* à la viscosité des *NaLTTM*. Dans le cas des polyols, les auteurs associent la viscosité du mélange au nombre de groupements hydroxyle pouvant créer des liaisons hydrogène. En effet, dans les mêmes proportions de mélange, la viscosité des systèmes à base de diols (éthylène glycol, butanediol, triéthylène glycol) est inférieure à celle obtenue avec le glycérol (triol), elle-même très inférieure à celles obtenus avec des polyols (xylitol, sorbitol). C'est également le cas concernant les mélanges à base d'acides. En association avec le ChCl, les acides qui comportent des groupements hydroxyle sur leur chaîne alkyle (acide citrique, acide tartrique, acide malique) conduisent à des mélanges beaucoup plus visqueux que ceux obtenus avec les acides qui n'en ont pas. A l'aide d'une titration Karl Fischer, les auteurs mettent en évidence que tous les mélanges caractérisés dans leurs travaux contiennent de l'eau. Ils indiquent également que l'absorption d'eau est inévitable durant la préparation des mélanges et que l'eau peut agir à la fois comme *HBD* et *HBA*. Cette présence d'eau, même en très faible quantité, va impacter la viscosité du mélange et par extension l'ensemble des propriétés physiques comme nous le verrons plus en détails au §2.1.6. Enfin, les auteurs ont montré que la viscosité des mélanges *NaLTTM* diminue avec l'augmentation de la température. Cela est dû à l'affaiblissement des interactions de type Van der Waals et/ou liaisons hydrogène et à l'augmentation de la mobilité moléculaire avec la température.

Des conclusions similaires sont retrouvées dans les travaux de Savi *et al.* relatifs à la mesure de la viscosité de mélanges composés d'acide citrique, de sucrose et d'eau (Figure I.10) [63].

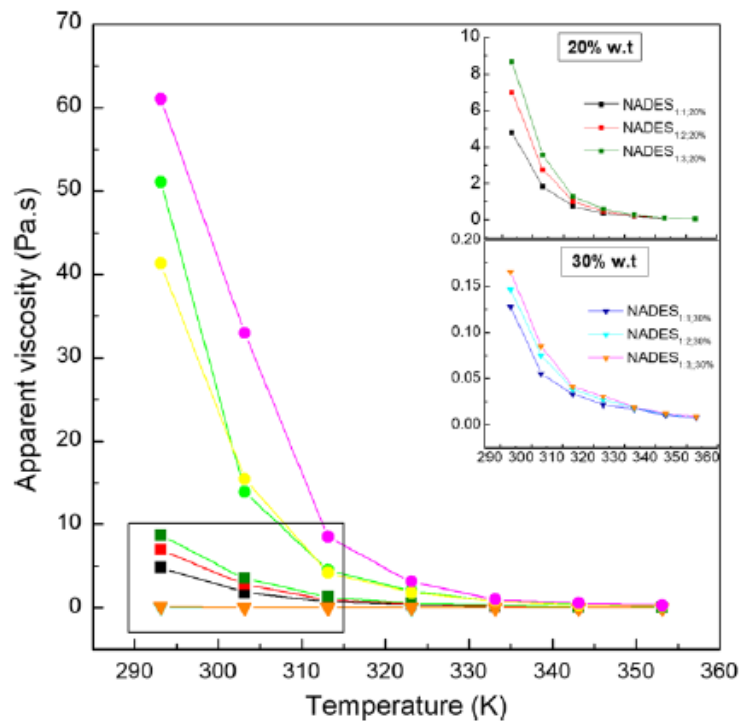


Figure I.10 Evolution de la viscosité en fonction de la température pour des mélanges composés d'acide citrique, de sucrose et d'eau [63]

Quelle que soit la quantité d'eau, on remarque que le mélange (1:1 mol) présente une viscosité inférieure à celles des mélanges (1:2 et 1:3 mol) à température ambiante. L'augmentation de la quantité de sucrose augmente directement le nombre de groupements hydroxyle disponibles pour la création de liaisons hydrogène et donc la valeur de la viscosité à température ambiante. Concernant l'effet de la température, on remarque que la diminution de la viscosité est très marquée entre 25 et 45°C (298 et 318K sur la figure I.10) puis de moins en moins importante à plus haute température. Les travaux de Savi confirment également que la viscosité est étroitement liée à la quantité d'eau. Pour les mélanges contenant 16% (m/m) d'eau, l'ordre de grandeur de la viscosité est de plusieurs dizaines de Pa.s. Avec 20% (m/m) d'eau, la viscosité est inférieure à 10 Pa.s et devient inférieure à 0,2 Pa.s pour une quantité d'eau de 30% (m/m). Puisque la viscosité dépend de la température, il est possible de déterminer l'énergie d'activation ( $E_a$ ) de ce type de mélange. Pour cela, il convient d'appliquer la loi d'Arrhénius suivante :  $\ln(\eta) = A + E_a / RT$  dans laquelle  $\eta$  est la viscosité,  $A$  est une constante,  $E_a$  l'énergie d'activation,  $R$  la constante des gaz parfaits et  $T$  la température en K. L'énergie d'activation d'un système informe sur la sensibilité de la viscosité à des variations de températures.

Les valeurs d' $E_a$  rapportées par Savi *et al.* pour les mélanges ternaires acide citrique, sucrose, eau sont comprises entre 35 kJ.mol<sup>-1</sup> pour les mélanges avec 30% (m/m) d'eau et 88 kJ.mol<sup>-1</sup> pour les mélanges avec 16% (m/m) d'eau. Ces ordres de grandeur sont très élevés pour des fluides. Cela s'explique par le fait que d'une part, les liaisons hydrogène mènent à une grande cohésion et qu'elles sont, d'autre part, très sensibles à la température.

---

### I.2.4.3 Densité

De manière générale, il est admis dans la littérature que les *LTTM* polaires ou contenant des sels métalliques sont plus denses que l'eau ( $d > 1$ ) [79]; [69]. Inversement, et à l'exception de quelques contre-exemples, les *LTTM* apolaires se caractérisent par une masse volumique inférieure à celle de l'eau [80]; [72]. Dans le tableau I.5 tiré des travaux de Zhao *et al.*, on observe que la densité des mélanges à base de ChCl augmente avec le nombre de groupements hydroxyle de l'*HBD*. Lorsqu'un acide est utilisé, la densité diminue lorsque la longueur de chaîne de l'*HBD* augmente. Enfin, différents travaux rapportent que la densité d'un système *LTTM* décroît linéairement avec l'augmentation de la température [81]; [82] ou de la quantité d'eau [83].

---

### I.2.4.4 Autres propriétés spécifiques à des applications

#### I.2.4.4.1 La conductivité

A l'instar des liquides ioniques, les *LTTM* qui contiennent des espèces ioniques peuvent être conducteurs. Puisque la viscosité d'un mélange influence défavorablement sur sa conductivité, la plupart des *LTTM* possède une faible conductivité ionique ( $< 2$  mS.cm<sup>-1</sup> à  $T_{amb}$ ). Par conséquent, l'augmentation de la température entraîne une augmentation de la conductivité. Etant reliée à la viscosité, la conductivité des *LTTM* dépend également de la nature des composés, de leur proportion et de la quantité d'eau [67]; [84].

#### I.2.4.4.2 La tension de surface

Les études relatives à la tension de surface des *LTTM* sont limitées dans la littérature comparativement à la description d'autres propriétés physico-chimiques [82]; [85]–[87]. Pourtant, il s'agit d'une caractéristique essentielle pour l'application industrielle d'un solvant [85]. En effet, la tension de surface est une grandeur qui permet de mieux appréhender les phénomènes d'interface (mouillabilité, coating, etc.). Cette grandeur caractéristique présente un grand intérêt dans les applications d'emballages et de lubrification mais aussi dans des domaines comme la pharmacie, le textile ou le traitement de surface [88].

Appliquée aux *DES* et *LTTM*, la détermination de la tension superficielle permet d'accéder de manière indirecte à l'intensité des forces intermoléculaires qui s'exercent entre les constituants [87]. Les liquides très visqueux présentent des tensions de surface élevées, ainsi, les valeurs rapportées varient généralement entre 35 et 75 mN.m<sup>-1</sup> à 25 °C [85]. Les valeurs les plus élevées correspondent à des *LTTM* à base de sucre comme les mélanges ChCl:Glucose et ChCl:Fructose [82]. D'après les travaux de Shahbaz *et al.*, il est possible de prédire la tension superficielle de solvants eutectiques [86]. La tension de surface étant reliée à la densité, les auteurs indiquent qu'il est également possible de prédire la densité de mélanges eutectiques. Aussi, la tension de surface varie en fonction de la nature et de la fraction molaire des composés. Cette grandeur diminue avec l'augmentation de la température [87].

### I.2.4.4.3 La polarité

La connaissance de la polarité d'un *NaLTTM* est très utile pour des applications ayant une étape de solubilisation comme l'extraction végétale par exemple. Les travaux de Dai *et al.* [36] décrivent une méthode de détermination de la polarité qui repose sur l'utilisation de molécules chromophores dont la bande d'absorption caractéristique ( $\lambda_{\max}$ ) va varier en fonction de la polarité du solvant [89]. Les auteurs rapportent que les *NaLTTM* comprenant des acides organiques sont plus polaires que ceux qui contiennent des acides aminés alors que les mélanges à base de sucres ou de polyols sont moins polaires. De façon attendue, l'ajout d'eau dans un *LTTM* augmente la valeur de la polarité.

En conclusion, le dénominateur commun à tous les travaux de caractérisation des *NaLTTM* réside dans le fait que les propriétés physico-chimiques sont ajustables en fonction de la nature et de la proportion des composés du mélange. Ainsi, une sélection judicieuse des constituants permet d'adapter un *NaLTTM* à une application. De plus, les propriétés de ces solvants peuvent être modulées par d'autres facteurs comme la température et la teneur en eau. Cela s'explique par le fait que ces mélanges se caractérisent par un réseau de liaisons hydrogène (structure supramoléculaire) qui est sensible à la température, et qui est fortement impacté par la présence d'eau, même en très faible quantité. Les effets de la température et de la teneur en eau sur les propriétés des *NaLTTM* sont de plus en plus discutés dans la littérature. Ce constat nous oriente vers la discussion des techniques et des méthodes qui permettent de mettre en évidence l'existence de forces de cohésion et vers les travaux qui étudient l'impact de la quantité d'eau sur cette structuration. Ces points seront discutés dans la partie suivante.

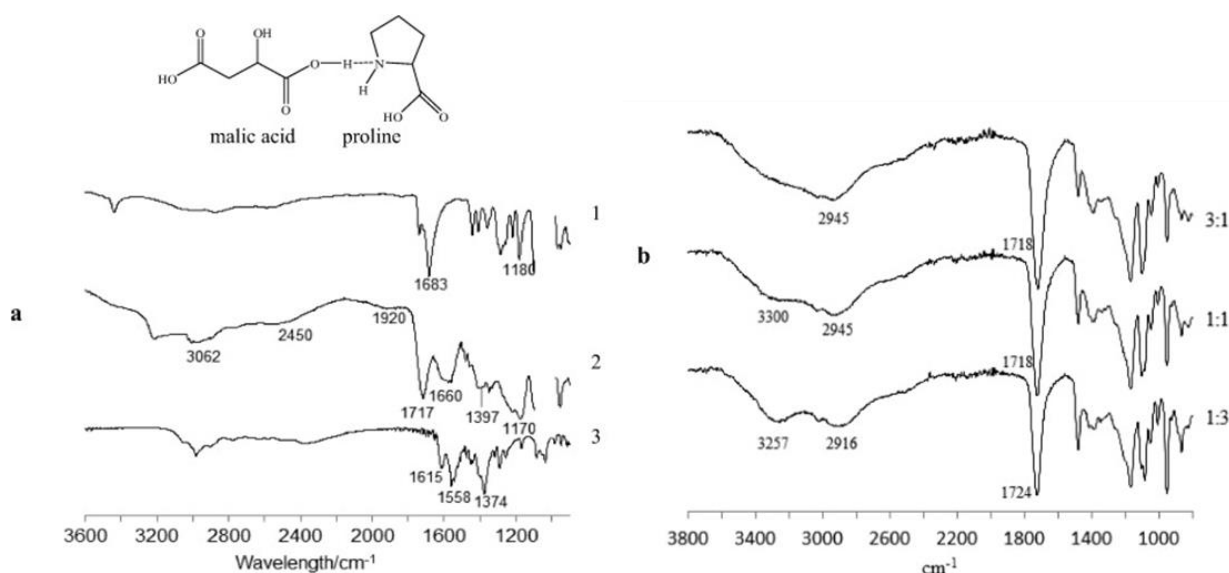
Avant cela, nous avons mis en évidence lors de ces recherches bibliographiques que plusieurs travaux recensés et commentés précédemment indiquent des teneurs en eau non négligeables pour des mélanges binaires (cf. Tableau I.5 ou [57]). Il semblerait également que pour les mélanges à

base de produits hygroscopiques (ChCl, bétaïne), l'adsorption d'eau soit difficilement évitable lors de la préparation des mélanges. Malgré cela, certains auteurs utilisent des quantités d'énergies considérables pour tenter de contrôler la teneur en eau (*i*) des constituants avant préparation et/ou (*ii*) du mélange après préparation. Dans une optique d'application des principes de la chimie verte, il semble plus raisonnable de maîtriser la quantité d'eau contenue dans le mélange et d'accepter que les *NaLTTM* soient des mélanges ternaires qui contiennent fatalement de l'eau.

### I.2.5 Structure supramoléculaire des *NaLTTM*

L'établissement du réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires peut, entre autres, être mis en évidence par spectroscopie infra-rouge (FT-IR) et par résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces deux techniques sont particulièrement complémentaires lorsque les composés comportent des fonctions hydroxyle (-OH), acide carboxylique (-COOH) ou carbonyle (-CO-).

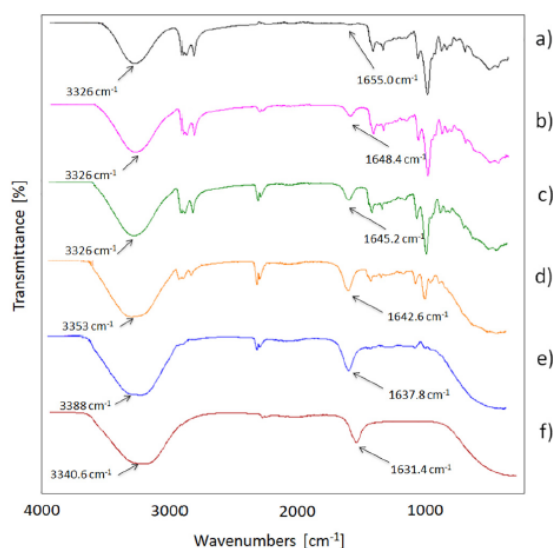
En ce qui concerne la spectroscopie infra-rouge, la méthodologie consiste à comparer les spectres des composés de départ avec celui du mélange. Un déplacement significatif des bandes de vibration caractéristique des groupements pouvant intervenir dans les liaisons hydrogène est alors recherché. Par exemple, Dai *et al.* ont étudié par spectroscopie IR un mélange binaire composé de proline et d'acide malique dans différentes proportions molaires (Figure I.11) [83].



**Figure I.11 Spectres Infra-Rouge de LTTM composés d'acide malique et de proline (a) 1 : acide malique, 2 : proline : acide malique (1:1 mol), 3 : proline et (b) effet de la proportion molaire [83]**



Comparativement aux composés seuls (spectres a1 et a3), les auteurs rapportent que la bande de vibration caractéristique du groupement -CO- de l'acide malique ( $1683\text{ cm}^{-1}$ ) est décalée à  $1717\text{ cm}^{-1}$  après mélange (spectre a2). D'autre part, la bande caractéristique des groupements -COOH et -NH- de la proline (respectivement  $1374$  et  $1558\text{ cm}^{-1}$ ) apparaissent respectivement à  $1397$  et  $1660\text{ cm}^{-1}$  dans le mélange 1:1 mol. Ces modifications du nombre d'onde des bandes de vibrations suggèrent l'établissement d'interactions hydrogène entre l'acide malique et la proline comme illustré en figure I.11 ( $\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{H}\cdots\text{N}$ ). Ce type de démonstration par spectroscopie IR est également décrit pour des mélanges à base de ChCl en association avec le tréhalose <sup>[81]</sup> ou le 1,3-propanediol <sup>[68]</sup>. Plus récemment, Chromà *et al.* ont étudié l'effet de l'eau sur un mélange *LTTM* composé de bromure de tétrabutylammonium (TBAB) et de glycérol (gly) en proportion molaire (1:3 mol) (Figure I.12) <sup>[90]</sup>.



**Figure I.12** Effet de l'addition progressive d'eau sur le spectre IR d'un LTTM composé de bromure de tétrabutylammonium et de glycérol (1:3 mol) (a). (b)=20%, (c)=50%, (d)=80%, (e)=90% et (f)=100% d'eau <sup>[90]</sup>

Sur la figure I.12, on remarque que le mélange TBAB:Gly (1:3 mol) présente une bande de vibration caractéristique des groupements -OH à  $3326\text{ cm}^{-1}$  et un faible signal à  $1655\text{ cm}^{-1}$ , attestant de la présence d'eau (a). Lorsque de l'eau est ajoutée de façon progressive au mélange TBAB:Gly (1:3 mol) (b à e), ces bandes caractéristiques se déplacent progressivement vers les signaux caractéristiques de l'eau :  $3340$  et  $1631\text{ cm}^{-1}$  (f). Ce résultat peut être expliqué par l'affaiblissement progressif des liaisons hydrogène entre le TBAB et le glycérol au profit d'interactions hydrogène avec l'eau. Finalement, l'utilisation de la spectroscopie IR présente l'avantage d'être rapide, non destructive et ne demande pas de préparation d'échantillon. Par contre, elle nécessite que les bandes de vibrations caractéristiques des composés de départ soient isolées comme par exemple, lorsqu'un acide carboxylique et une amine sont associés.

Pour toutes les autres combinaisons, la RMN constitue la technique de choix pour décrire la structure supramoléculaire de mélanges *NaLTTM*. La RMN est une technique spectroscopique non destructive qui permet de déterminer la structure et la dynamique des molécules à l'état solide ou en solution. Pour caractériser l'existence de liaisons hydrogène dans des mélanges *LTTM*, l'expérience NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) est majoritairement utilisée. L'effet NOE a été mis en évidence en 1953 par l'observation de la propagation de la polarisation des spins dans les métaux lorsqu'un noyau est irradié (ou excité) [91]. Autrement dit, lorsqu'un proton est excité, les signaux des protons proches dans l'espace peuvent subir une variation d'intensité due à la présence d'interactions dipolaires entre les spins à travers l'espace. En 1972, il a été observé que la polarisation des protons pouvait également se propager entre deux molécules en solution comme par exemple entre un ligand et une protéine [92]. L'expérience 2D-NOESY est donc remarquable parmi les méthodes d'analyses par RMN car les taches de corrélations (pics hors diagonale) qu'elle révèle traduisent, soit une interaction dipolaire entre les spins considérés, soit un échange chimique. Plus simplement, l'intensité de l'effet NOE apporte des informations sur la proximité spatiale de deux protons qu'ils soient présents sur la même molécule ou sur deux molécules en interaction. Les distances caractéristiques permettant d'observer un effet NOE sont de l'ordre de 5Å maximum [93]. La figure I.13, issue des travaux de Choi *et al.*, décrit l'application de cette technique pour caractériser les interactions dans un *LTTM* composé de sucrose et d'acide malique [25].

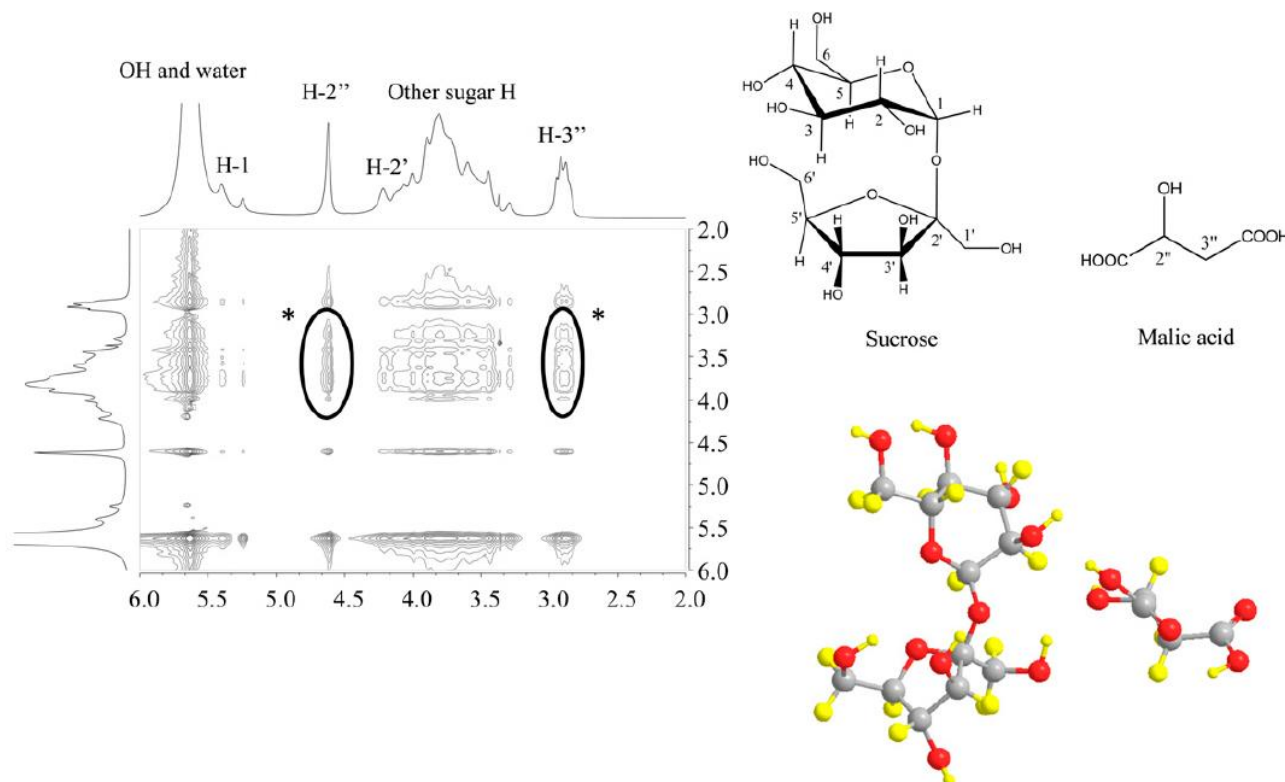


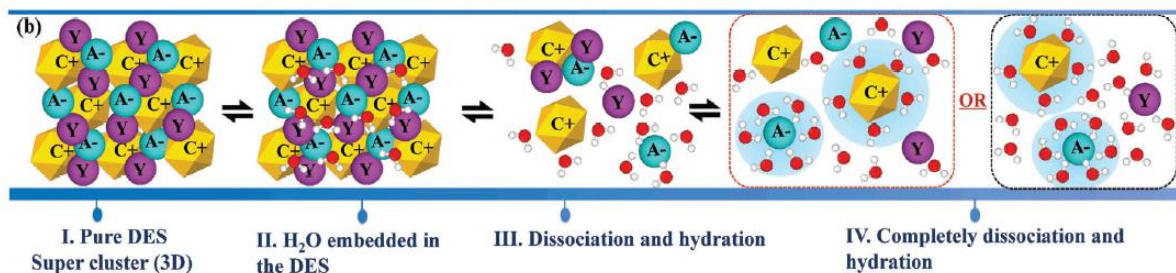
Figure I.13 Spectre RMN 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY montrant les interactions intermoléculaires entre l'acide malique et le sucrose (\*) [25]

Les auteurs rapportent l'existence de tâches de corrélation entre tous les protons des deux molécules et en particulier entre les protons du sucrose et les protons H<sub>2</sub>' et H<sub>3</sub>' de l'acide malique (indiqué par les astérisques sur la figure I.13). Ces tâches de corrélation hors diagonale reflètent une proximité spatiale entre tous les protons du mélange attribuée à l'existence de liaisons hydrogène entre les protons labiles. C'est pourquoi des interactions dipolaires entre les hydrogènes des groupements méthine ou méthylène (non labiles) sont également observées. La mise en évidence de liaisons hydrogène dans un mélange ternaire composé de ChCl / propanediol / eau (1:1:1 mol) a été étudiée par RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY par Dai *et al* [36]. Les auteurs mettent en évidence des tâches de corrélation entre les différents protons des fonctions hydroxyle et indiquent que la faible quantité d'eau contenue dans ce mélange ternaire participe à l'élaboration du réseau de liaisons hydrogène. Une conclusion similaire a été obtenue pour des mélanges à base de bétaïne monohydratée et de polyols (propylène glycol, glycérol) par Zahrina *et al.*[94]. Ces observations sur des mélanges comprenant de très faibles concentrations en eau font écho aux premières études démontrant l'effet de la teneur en eau sur la structure supramoléculaire des mélanges *LTTM*.

---

### I.2.6 Effet de l'eau sur la structure supramoléculaire

L'impact de la dilution sur le mélange ChCl:urée (2:1 mol) a été décrite pour la première fois en 2009 par Gutiérrez *et al* [64]. Les auteurs ont mis en évidence que l'ajout de D<sub>2</sub>O nécessaire à l'analyse RMN du mélange provoquait la disparition des interactions entre le ChCl et l'urée. Cette constatation a été confirmée depuis par l'analyse de différents mélanges ternaires composés de ChCl, d'urée et d'eau par diffraction des neutrons [95]. Les auteurs indiquent que la nanostructure du *DES* est conservée jusqu'à un niveau d'eau remarquablement élevé : 42 % (m/m). Cela s'expliquerait par les molécules d'eau piégées dans des domaines structurés autour des cations cholinium. Une différenciation entre deux domaines correspondant soit à l'hydratation soit à la dissociation progressive de la structure de liquides ioniques et de *DES* a ensuite été proposée par Ma *et al.* [96]. En modélisant les données physico-chimiques collectées dans la littérature, les auteurs ont démontré qu'une faible quantité d'eau pouvait entrer dans la structure des mélanges *LTTM*. Cette quantité est variable et dépendante de la nature des composés de départ. Afin de généraliser leur conclusion, les auteurs ont proposé un schéma récapitulatif qui est repris en partie en figure I.14. Sur cette figure les auteurs ont représenté tout d'abord l'assemblage moléculaire d'un mélange eutectique qui ne contient pas d'eau (I. Pure *DES* super cluster).



**Figure I.14** Schéma illustrant l'intégration de l'eau dans la structuration de mélanges à base de chlorure de cholinium (II) et le phénomène de dissociation progressive de la structure après plus forte dilution <sup>[96]</sup>

Lorsque le mélange contient très peu d'eau, les auteurs ont indiqué que cette dernière est emprisonnée au sein de la structure (II = H<sub>2</sub>O embedded in the *DES*). Enfin, plus la quantité d'eau augmente et plus la cohésion du mélange est affaiblie (III. Dissociation and hydration), conduisant ainsi à l'obtention d'une solution aqueuse (IV. Completely dissociation and hydration).

Finalement, la dilution progressive d'un *LTTM* par de l'eau fait apparaître trois domaines. Un premier domaine correspondant à l'intégration d'une faible quantité d'eau dans une structure très compacte. Cette structuration repose sur l'établissement de liaisons hydrogène (identifiables par RMN et spectroscopie IR dans certains cas) entre tous les composés du mélange dont l'eau. Ce réseau confère au mélange une forte viscosité, une densité importante et une température de transition de phase unique ( $T_f$  pour les *DES* et  $T_g$  pour les *LTTM*). A plus forte dilution, un autre domaine correspond à l'affaiblissement progressif des liaisons entre les composés au profit d'interactions avec l'eau. Après une concentration seuil en eau, le mélange se comporte comme une solution aqueuse des constituants de départ. Suite à ce constat, les auteurs indiquent qu'il convient de considérer que tous les *LTTM* contiennent une certaine quantité d'eau qui peut être déterminée par titration Karl-Fischer <sup>[57]</sup>. Une fois de plus, il apparaît que les efforts de certains chercheurs pour éliminer l'eau des systèmes qu'ils étudient soient parfois contre-productifs car une très petite quantité d'eau peut parfois être nécessaire à l'obtention d'un *LTTM* et à l'amélioration de ses caractéristiques. C'est la conclusion d'une étude récente qui étudie l'impact de très faibles quantités d'eau sur la dynamique moléculaire et les propriétés du système ChCl:éthylène glycol (1:2 mol) <sup>[97]</sup>. Toutefois, une dilution trop importante conduit à un affaiblissement de la structure et à l'obtention d'une solution aqueuse. La quantité d'eau intégrée dans un *LTTM* doit donc rester inférieure à une certaine concentration seuil propre à chaque mélange et qu'il convient de déterminer. Cette concentration limite en eau conduisant à la dissociation complète de la structuration d'un *LTTM* peut être déterminée à l'aide de différentes techniques d'analyses.

Nous l'avons vu, une concentration estimée à 42% (m/m) d'eau a été mise en évidence par diffraction des neutrons pour le mélange ChCl:urée (2:1 mol) [95]. L'affaiblissement progressif des liaisons hydrogène entre les composés d'un LTTM composé de tétrabutylammonium et de glycérol au profit d'interactions hydrogène avec l'eau a été démontré par spectroscopie IR par Chromà *et al.* (p.25) [90]. L'existence de différents domaines dépendant de la quantité d'eau est également rapportée pour des mélanges ternaires ChCl:urée:eau et ChCl:acide malique:eau dans les travaux de Posada *et al.* [98] et de Roldan-Ruiz *et al.* [99]. Les auteurs ont couplé des mesures de spectroscopies Brillouin (vitesse de propagation du son) et RMN (déplacement chimique du signal HDO) pour différentes concentrations en eau et ont obtenu les courbes regroupées dans la figure I.15.

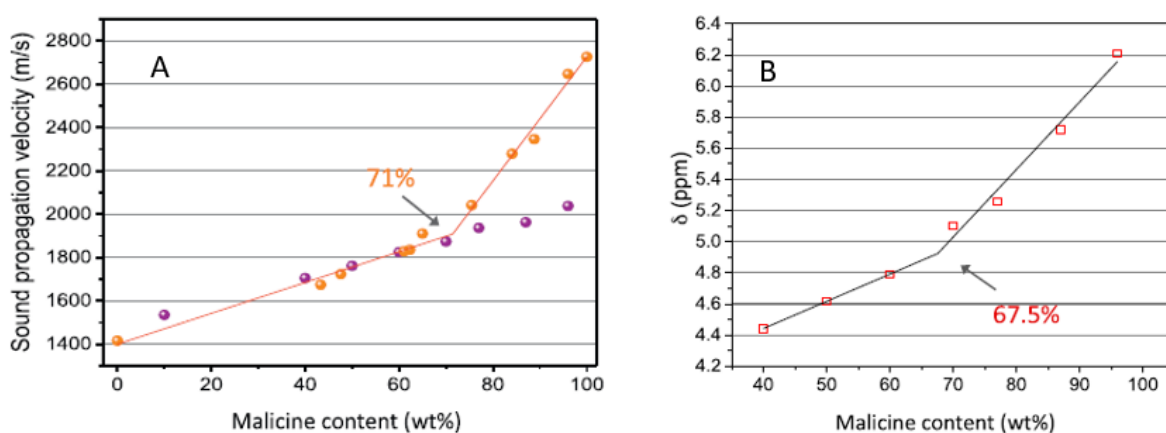
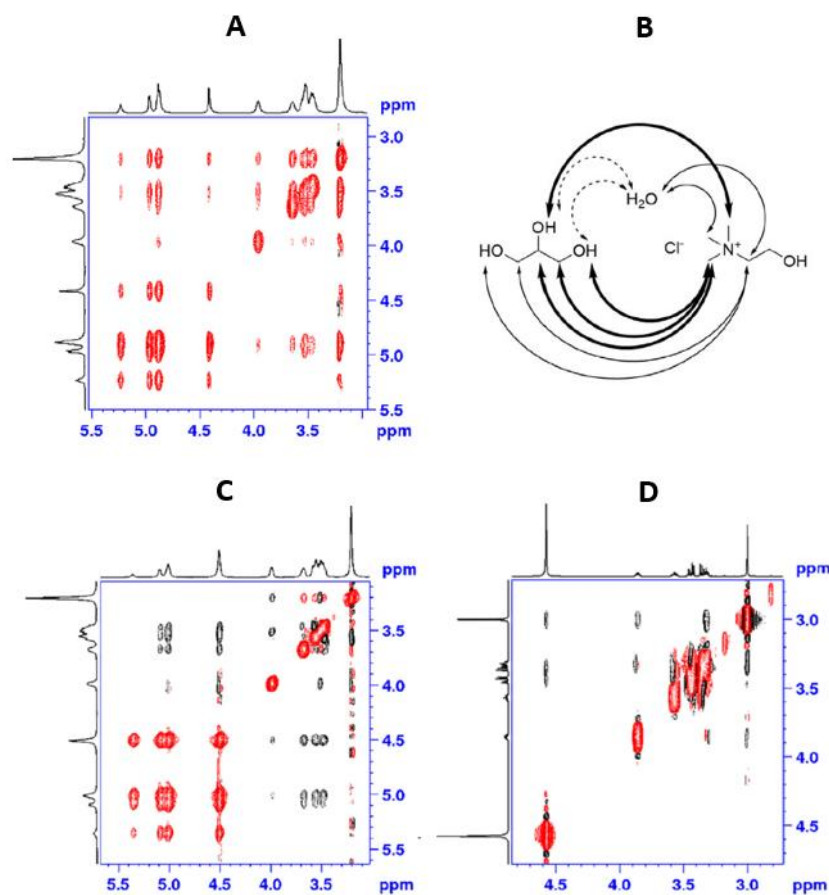


Figure I.15 Effet de la teneur en eau d'un mélange ChCl:acide malique sur la vitesse de propagation du son (A) et sur le déplacement chimique du pic HDO observé en RMN  $^1\text{H}$  (adaptée de Roldan-Ruiz *et al.* [99])

Sur le graphique A de la figure I.15 qui représente le suivi de la vitesse de propagation du son en fonction de la concentration en mélange ChCl:acide malique, on remarque une rupture de pente qui se produit aux alentours de 29% (m/m) d'eau. Sur le graphique B qui représente l'évolution du déplacement chimique du pic HDO observé en RMN  $^1\text{H}$ , une rupture de pente est également observée pour une concentration en eau de 32,5 % (m/m). Ces deux résultats similaires obtenus par des techniques différentes permettent aux auteurs de conclure que ce mélange ternaire ChCl:acide malique:eau conserve une structuration supramoléculaire (à laquelle participent les molécules d'eau) en deçà d'une concentration en eau d'environ 30% (m/m). L'étude de l'effet de la quantité d'eau sur les interactions hydrogène de trois mélanges à base de ChCl en association avec de l'urée, du glycérol ou de l'éthylène glycol par RMN est également rapportée par Delso *et al.* [100]. Les auteurs ont tout d'abord démontré la présence d'une structure supramoléculaire pour les trois mélanges avec des teneurs en eau inférieures à 10,5% (m/m). Dans le cas du mélange ChCl : urée, les interactions les plus fortes apparaissent entre les protons hydroxyle du ChCl et ceux de l'eau alors qu'aucune corrélation n'est observée entre l'urée et l'eau.

Ces résultats sont cohérents avec les travaux déjà mentionnés et confirment que l'eau serait principalement intégrée dans des domaines structurés autour des cations cholinium dans les *DES* de type III. Les auteurs signalent aussi que les interactions entre l'eau et l'*HBD* dépendent fortement de celui-ci. En effet, les interactions les plus fortes identifiées dans le *DES* à base d'éthylène glycol sont celles établies entre le glycol et l'eau. L'absence d'interactions entre le glycol et le ChCl dans ce mélange fait que, parmi les trois solvants étudiés, ce dernier présente la structure la plus faible. Les auteurs ont ensuite étudié l'effet de la dilution par D<sub>2</sub>O comme l'illustre la figure I.16 pour le cas du mélange ChCl:Glycérol:Eau (1:2:1 mol).



**Figure I.16 A.** Carte <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY du mélange ChCl:Glycérol:Eau (1:2:1 mol) obtenus à 25°C, **B.** Illustration des interactions identifiées et cartes NOESY après différentes dilutions par D<sub>2</sub>O (C) 10% (m/m) et (D) 90% (m/m), adaptée des travaux de Delso *et al.* [100]

Des tâches de corrélation impliquant tous les protons sont détectables sur la carte NOESY du mélange ChCl:Glycérol:Eau (1:2:1 mol) (A) ce qui indique que tous les protons sont spatialement proches ou en échange. De plus, les corrélations sont en phase avec la diagonale (même couleur). La phase de ces corrélations indique que les effets NOE entre les protons sont négatifs, ce qui est caractéristique de structures dont les temps de corrélation sont dans le domaine des mouvements lents ( $\omega\tau_c \gg 1,12$ ).

Après ajout de 10% (m/m) de D<sub>2</sub>O (C), on remarque une modification de la réponse obtenue par RMN NOESY. Hormis les corrélations dues aux échanges entre protons hydroxyle qui restent en phase avec la diagonale, toutes les autres corrélations changent de phase traduisant des effets NOE positifs (corrélations en phase inverse avec la diagonale), caractéristiques de structures dont les temps de corrélation sont dans le domaine des mouvements rapides ( $\omega\tau_c \ll 1,12$ ). Cela suggère que la dilution avec 10% de D<sub>2</sub>O permet de conserver une structure supramoléculaire entre le glycérol et le ChCl mais dans laquelle les molécules sont beaucoup plus mobiles. Cela se traduit macroscopiquement par une diminution importante de la viscosité. Enfin, les interactions entre le glycérol et le ChCl ont disparu après dilution par 90% (m/m) de D<sub>2</sub>O (D). Dans ce cas, la carte RMN NOESY obtenue est caractéristique d'une solution aqueuse. Ces travaux confirment qu'une faible quantité d'eau peut entrer dans la structuration d'un mélange *LTTM*. A faible dilution, ici 10% (m/m), la structure supramoléculaire est affaiblie et les molécules sont plus mobiles. Après dilution importante, ici 90% (m/m), seules des interactions intramoléculaires et celles impliquant l'eau sont détectées.

Les travaux de Delso peuvent être directement reliés aux travaux de caractérisation des propriétés physico-chimiques des mélanges nommés « *glyceline* » (ChCl:glycérol) et « *ethaline* » (ChCl:éthylène glycol) avec ou sans eau, qui ont été publiés par Lapeña *et al* [87]; [101]. La réalisation d'une caractérisation exhaustive des propriétés de ces mélanges (viscosité, indice de réfraction, tension de surface, propriétés thermiques et conductivité) a permis aux auteurs de discuter du caractère plus ou moins compact des structurations de ces systèmes. L'observation qui découle des travaux cités précédemment est que l'incorporation d'eau dans les *LTTM glyceline* et *ethaline* conduit à une structure moins compacte. Les mélanges ternaires obtenus sont donc plus fluides et la mobilité des molécules au sein du mélange est accrue. L'ensemble des données collectées dans ces deux publications a permis aux auteurs de comparer la force des interactions présentes dans les deux systèmes. Leur conclusion fait état d'une coopération importante des liaisons hydrogène dans le cas du système *glyceline* comparativement au système *ethaline*. Cette conclusion est également en accord avec les valeurs de viscosité à 30°C rapportées dans les travaux de Zhao *et al.* (Tableau I.5), à savoir 0,025 Pa.s pour le mélange ChCl:éthylène glycol (1:1 mol) et 0,177 Pa.s pour le système ChCl:glycérol (1:1 mol) [79]. L'ensemble de ces données confirme que les interactions entre le glycérol et le ChCl sont nettement plus fortes que lorsque l'éthylène glycol est utilisé comme *HBD*.

Une comparaison entre deux autres mélanges ternaires, respectivement ChCl:xylitol:eau (2:1:3 mol) et ChCl:acide citrique:eau (1:1:6 mol), a été proposée par Lopez *et al.* [102]. En couplant des analyses RMN <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY et une caractérisation exhaustive des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction, propriétés thermiques, viscosité, conductivité), les auteurs ont pu établir un lien de causalité entre la structure supramoléculaire et les propriétés macroscopiques.

Pour exemplifier les différences entre ces deux systèmes, nous avons choisi de retenir uniquement les résultats d'analyses RMN en lien avec les structures supramoléculaires (Figure I.17).

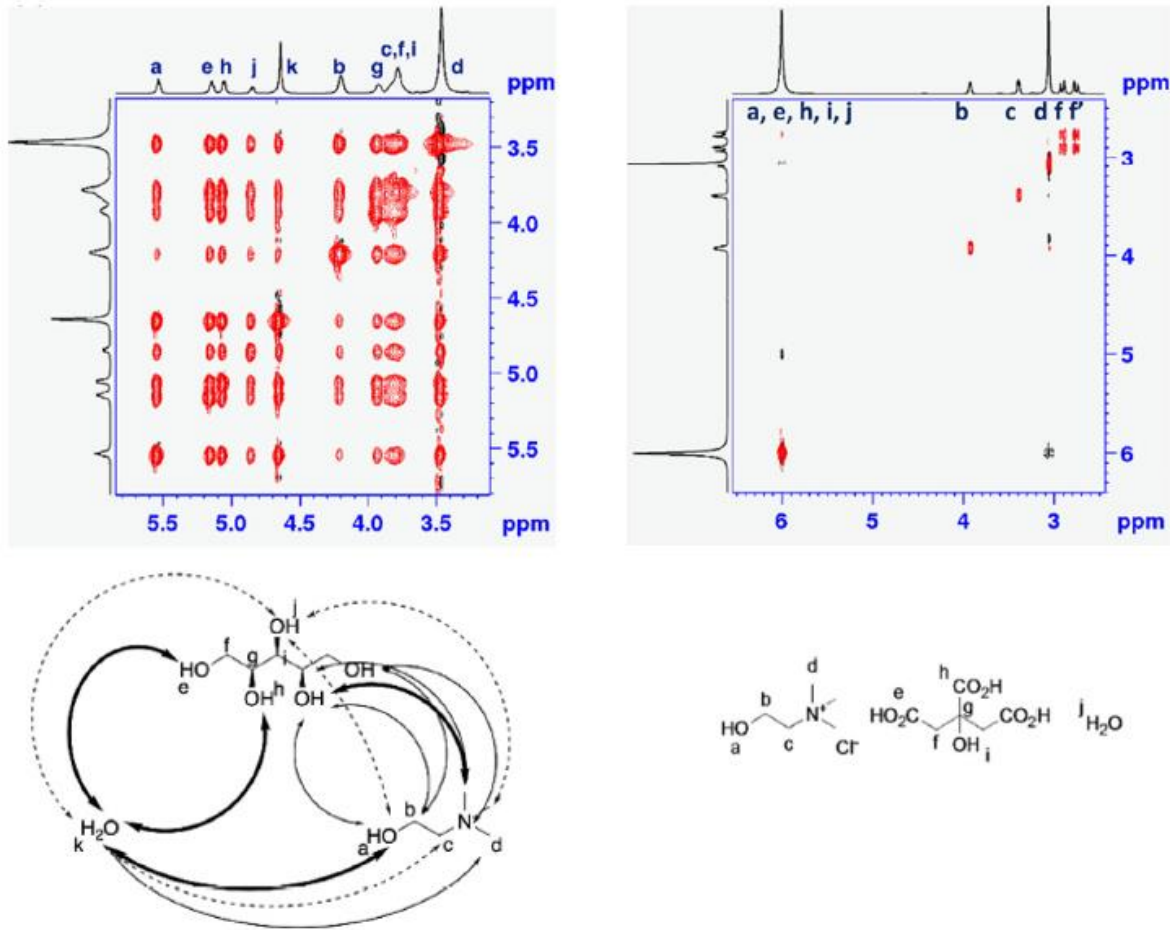


Figure I.17 Cartes  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY des mélanges ChCl:xylitol:Eau (2:1:3 mol) à gauche et ChCl:acide citrique:eau (1:1:6 mol) à droite obtenus à 25°C, adapté des travaux de Lopez *et al.* [102]

La carte RMN NOESY sur la gauche de la figure I.17 montre que le mélange ChCl:xylitol:eau (2:1:3 mol) présente des tâches de corrélation entre tous les protons du mélange. Malgré une proportion massique en eau de 11%, ces corrélations sont en phase avec la diagonale (même couleur) et sont donc caractéristiques de structures dont les temps de corrélation sont dans le domaine des mouvements lents ( $\omega\tau_c \gg 1, 12$ ). L'eau participe à la structuration supramoléculaire de cet assemblage ChCl:xylitol:eau (2:1:3 mol) qui se comporte comme une macromolécule d'un point de vue mobilité des molécules dans l'espace. A l'inverse, la carte de droite ne permet pas de détecter des corrélations entre les protons de l'acide citrique et du ChCl. Cela est dû à une proportion en eau importante dans ce mélange (6 moles = 25% m/m) dont la composition ne correspond pas à la composition eutectique (cf p.16) [73]. L'ensemble des travaux identifiés jusqu'ici indique donc la possibilité de relier les propriétés macroscopiques (viscosité, conductivité, densité, etc.) aux mécanismes d'association observés à l'échelle moléculaire.



Afin de caractériser un système *LTTM*, il est nécessaire de corrélérer les propriétés rhéologiques, thermiques et physico-chimiques aux analyses de structures et de mobilité à l'échelle moléculaire (RMN et IR). La détermination du rôle de l'eau dans l'établissement des interactions de type liaisons hydrogène gagne en popularité dans la littérature scientifique appliquée aux *NaLTTM*. Cependant, la plupart de ces travaux concernent des systèmes à base de ChCl. Nous avons vu que l'ion chlorure possède un rôle prépondérant dans ces interactions et que des domaines structurés contenant de l'eau se localisent autour des cations cholinium. Ce n'est que très récemment que des mélanges sans ChCl ont été étudiés. Il s'agit de l'association d'acide citrique avec du sucrose [63] ou de l'arginine [103]. Savi *et al.* ont étudié les propriétés physiques et rhéologiques (cf. Figure I.10) des systèmes ternaires acide citrique, sucrose et eau en fonction de la température, de la quantité d'eau et du rapport molaire des constituants. Les auteurs supposent une structuration supramoléculaire pour tous ces systèmes qui présentent une unique  $T_g$  et des viscosités élevées. Toutefois, la preuve de l'existence de cette structure n'est pas discutée à l'échelle moléculaire. Les travaux de Roda *et al.* décrivent quant à eux la structure supramoléculaire d'un système acide citrique:arginine:eau (1:1:7 mol) suite à la réalisation d'analyses RMN NOESY (figure I.18) [103]. Une étude comparative de différents systèmes (binaires, ternaires) a permis aux auteurs de démontrer que l'eau possède un rôle primordial dans l'établissement d'interactions au sein de ce mélange en protonant l'arginine (comme discuté précédemment §1.2.3.1) et l'acide citrique. Dans ce cas particulier, la présence d'eau est un élément fondamental à l'obtention d'une phase liquide, limpide et homogène. A dilution plus importante, et comme pour les autres mélanges, l'eau participe à l'établissement du réseau de liaison hydrogène entre les constituants.

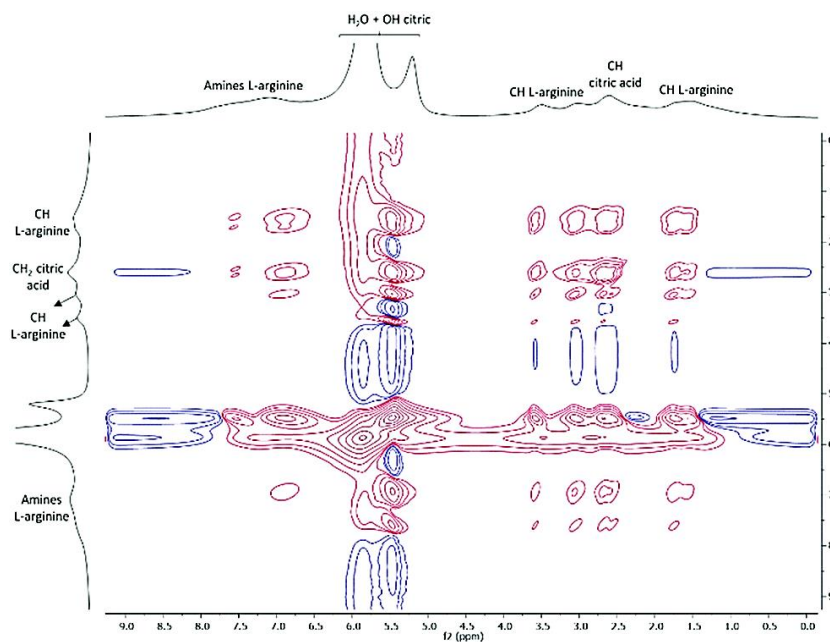


Figure I.18 Carte NOESY du mélange acide citrique : arginine : eau (1:1:7 mol) [103]

### I.2.7 Conclusion

Les mélanges à transition de phase basse température, ou *Low Transition Temperature Mixtures (LTTM)*, sont des mélanges à température de fusion ( $T_f$ ) et/ou à température de transition vitreuse ( $T_g$ ) plus basses que celles des constituants de départ. Les solvants *LTTM* sont retrouvés dans des domaines de recherche et d'application variés et offrent des perspectives d'utilisation industrielle très larges puisque leurs propriétés sont modulables en fonction de la nature des composés, des proportions utilisées, de la température et de la quantité d'eau. Du fait de la nature ionique de la majorité des *LTTM*, l'électrochimie reste le domaine le plus documenté [20]. Généralement peu volatils, non toxiques et solubles dans l'eau, les *LTTM* trouvent également des applications en synthèse organique [17], en catalyse [20], en chimie des matériaux [104] ou encore en pharmacie [47] et dans la valorisation de la biomasse [42]. Les *NaLTTM* sont plutôt plébiscités dans tous les domaines pouvant mettre en œuvre des produits naturels, des enzymes et des protéines comme l'agroalimentaire, la cosmétique ou la pharmacie [35]. Répondant parfaitement aux principes de la chimie verte, les *NaLTTM* ont suscité un intérêt exponentiel dans la littérature ces 10 dernières années. Certains auteurs vont jusqu'à qualifier les *NaLTTM* de solvants du XXI<sup>ème</sup> siècle [105] et prédisent un déploiement industriel massif d'ici quelques années. Les *LTTM* peuvent être préparés selon une méthode simple couplant chauffage et agitation. La DSC et l'ATG sont des techniques de choix pour caractériser les propriétés thermiques de ces mélanges. Elles permettent de déterminer la plage de température pour laquelle les mélanges obtenus sont liquides. La température et la quantité d'eau influencent grandement les propriétés physico-chimiques (densité, viscosité, polarité, etc.) de ces mélanges. De plus, il existe un lien de causalité entre les propriétés macroscopiques et l'établissement d'un réseau intermoléculaire de liaisons hydrogène pouvant être mis en évidence par spectroscopie IR et par RMN. La grande majorité des *LTTM* contiennent de l'eau et la description de la modification de la structure supramoléculaire en fonction de la quantité d'eau gagne en popularité dans la littérature scientifique. Les exemples cités dans ce manuscrit montrent la possibilité de relier l'existence d'une structuration moléculaire, à laquelle l'eau participe, aux propriétés physico-chimiques d'un mélange. Ainsi, la description de l'organisation à l'échelle moléculaire apparaît comme la clé de l'interprétation des propriétés physico-chimiques des *LTTM*. Malheureusement, ce lien est encore trop rarement effectué dans la littérature. La connaissance de la concentration seuil en eau que peut intégrer un mélange *LTTM* au sein de sa structure est primordiale pour une application industrielle. En effet, cela permet de conserver les propriétés intrinsèques du mélange (unique  $T_g$ ) tout en diminuant la densité et la viscosité des mélanges.

## I.3 Les matériaux gélifiés à base de LTTM

Les gels accompagnent notre quotidien : alimentation, produits d'entretien, produits cosmétiques, colles, lubrifiants, etc. Cependant, une utilisation sans discernement du terme « gel » est généralement effectuée dans la vie courante. La pandémie mondiale de Coronavirus a remis sur le devant de la scène l'utilisation de gel hydroalcoolique pour se désinfecter les mains. Nous avons tous fait l'expérience sensorielle qu'il existe des formes plus ou moins gélifiées (et/ou plus ou moins visqueuses) en fonction du produit utilisé et donc, de sa composition. L'ambiguïté qui peut exister autour du terme gel est également présente dans la littérature scientifique et technique. En fonction du domaine d'application (physique de la matière molle, chimie, biologie, etc.) et des constituants du gel, ce terme est utilisé de manière plus ou moins appropriée [106]. Les visions propres aux différentes disciplines – comme par exemple la cosmétique ou les matériaux - ne facilitent pas l'établissement d'une définition claire et précise. Pour tenter de répondre à la question « *qu'est-ce qu'un gel ?* », Almdal *et al.* ont recensé et comparé les différentes définitions proposées dans la littérature avant 1993. Les auteurs concluent que l'utilisation du terme gel doit reposer sur des critères phénoménologiques (propriétés rhéologiques, propriétés mécaniques, microstructure, etc.) appropriés aux conditions d'observations et aux limites de perception de l'expérimentateur (temps, température, etc.). La description de ces critères phénoménologiques et techniques de caractérisation de gels sera introduite dans un premier temps. Nous réaliserons ensuite une revue la plus exhaustive possible des exemples de gélification de *NaLTTM* décrits dans la littérature.

---

### I.3.1 Introduction à la gélification et classification des gels

Selon la définition d'un gel proposée par l'IUPAC, il s'agit d'un : « *Réseau colloïdal non fluide ou réseau polymère qui est dilaté dans tout son volume par un fluide* » [107]. Toujours selon l'IUPAC, un gel peut contenir un réseau de polymère formé par réticulations des chaînes polymère, par polymérisation ou par l'agrégation physique de chaînes polymère (liaisons hydrogène, agrégation d'hélices, complexation, interactions de Van der Waals, interactions hydrophobes, etc.) qui aboutit à des régions associées agissant comme des points ou des zones de jonction à l'origine de la formation du réseau. Ces jonctions confèrent une structuration tridimensionnelle au gel qui le rend capable de retenir un fluide en son sein. Certains hydrogels, terme employé lorsque la phase continue est aqueuse, peuvent absorber et retenir jusqu'à 99% (m/m) d'eau.

Selon Marr P. et Marr A., un gel est un matériau hétérogène dans le sens où il contient un minimum de deux phases : une phase liquide majoritaire et une phase solide organisée en un réseau en trois dimensions <sup>[108]</sup>. D’après les auteurs, un gel présente des propriétés semblables à celles d’un solide c’est-à-dire qu’il est capable de résister à un cisaillement ou à une contrainte mécanique. C’est le réseau tridimensionnel formé par la phase solide qui confère ce caractère élastique au gel. A l’inverse, la phase liquide va conférer un caractère visqueux au matériau constitué après gélification. Les gels sont donc des solides viscoélastiques qui vont se situer entre un matériau purement élastique (solide) et un matériau purement visqueux (liquide). La structure et les propriétés d’un gel dépendent donc directement de la nature des phases en présence et de la nature des interactions qui existent entre elles. La phase solide est généralement appelée « gélifiant ». Les différents types de gélifiants sont eux-mêmes répartis en trois catégories : les colloïdes <sup>[109]</sup>, les gélifiants de faibles masses molaires <sup>[110]</sup> et les polymères <sup>[111]</sup>. La nature de la phase liquide, ou phase continue, permettra également de classer les gels. Les différentes appellations retrouvées dans la littérature ont été reportées sur la figure I.19.

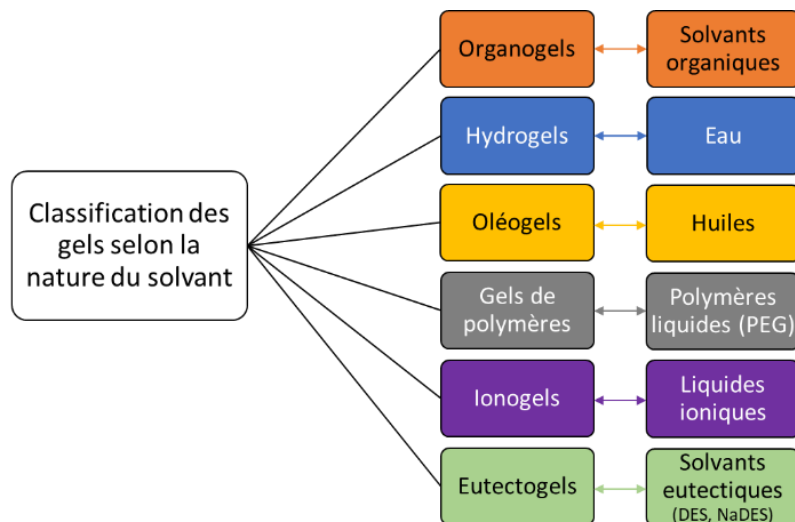


Figure I.19 Classification des gels selon la nature de la phase continue, inspiré de Marr *et al.* <sup>[108]</sup>

Lorsque la phase continue est un solvant organique, on parle d’organogel alors que le terme oléogel décrit les gels pour lesquels la phase liquide est une huile. La figure I.19 fait également apparaître des termes plus récents utilisant les liquides présentés dans la première partie : liquides ioniques, *DES* et *NaDES*. Pour ces cas particuliers, les termes ionogels et eutectogels sont utilisés. Les hydrogels sont les plus documentés dans la littérature scientifique. Ce sont également, et de très loin, les gels les plus rencontrés dans la vie quotidienne (alimentation, matériaux, cosmétique, pharmacie, etc.). A l’inverse, les ionogels et eutectogels sont moins présents dans la littérature.

Cela s'explique principalement par l'introduction très récente de ces nouveaux solvants. En effet, les premières occurrences des termes gels et hydrogels remontent à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle alors que les termes ionogels et eutectogels ont été introduits respectivement en 2001 et 2018. Ces nouveaux matériaux constituent donc à l'heure actuelle une « goutte d'eau » dans l'océan des travaux de recherches appliqués à l'obtention et à la caractérisation de gels.

La description des interactions responsables de la structuration d'un gel permet également de définir ce type de matériaux <sup>[112]</sup>. Un gel chimique sera issu de la formation de liaisons covalentes qui vont constituer les points de réticulation. Les gels chimiques possèdent généralement des propriétés mécaniques élevées et sont considérés comme irréversibles dans le sens où le temps de vie des liaisons covalentes est infini. A l'inverse, un gel physique résultera de la formation de liaisons non covalentes (interactions hydrogène, liaisons  $\pi$ - $\pi$ , interactions de Van der Waals, reconnaissance moléculaire, interactions hydrophobes, électrostatiques, etc.) conduisant à un assemblage supramoléculaire. Les interactions constituant les points de réticulation d'un gel physique sont dynamiques et sont caractérisées par un temps de vie fini, ils peuvent donc être réversibles. C'est le cas par exemple des gels de gélatine ou de pectine en alimentaire ou des gels d'*Aloe vera* en cosmétique. Enfin, une classification des gels au regard de leurs propriétés (thermoréversible, élastique, conducteur, self-healing, absorbant, dépolluant, filtrant, etc.) est également retrouvée dans la littérature. Cette classification est souvent liée au domaine d'utilisation du gel et n'est pas majoritaire. Il s'agit plutôt d'un complément de classification.

Deux exemples ont été choisis afin d'illustrer la classification des gels. Premièrement, Davidovich-Pinhas *et al.* ont décrit des gels d'huile de colza après ajout d'éthylcellulose. La structure de ce gel est fonction de la température et repose sur des interactions hydrogène entre les chaînes d'éthylcellulose <sup>[113]</sup>. Ainsi, ces matériaux mous sont des oléogels physiques thermoréversibles exploités pour des applications alimentaires. Plus récemment, Sun *et al.* ont décrit l'élaboration d'un gel aqueux (86% m/m d'eau) présentant une élasticité remarquable due à la présence d'interactions faibles ( $\text{Ca}^{2+}$  / alginate) complémentaires avec le réseau formé par la réticulation chimique photoamorcée de polyacrylamide <sup>[114]</sup>. Il s'agit donc dans ce cas d'un hydrogel hybride (double réseau : physique et chimique) hautement étirable.

Cette introduction aux gels et à leur classification démontre que le terme générique de « gel » peut englober divers solides viscoélastiques dont les propriétés vont dépendre des phases en présence et des interactions et/ou liaisons responsables de la structuration. Afin de fixer les choses pour la suite de ce manuscrit, nous avons choisi de détailler la définition d'un gel au regard de ses propriétés rhéologiques.

### I.3.2 Caractérisation d'un gel par ses propriétés rhéologiques

Précédemment, nous avons considéré les gels comme des solides viscoélastiques. Ce caractère viscoélastique peut être évalué par des mesures de rhéologie dynamique à faibles déformations, dans le domaine linéaire. Lorsque l'échantillon est soumis à une déformation  $\gamma$  (en %) variant de façon sinusoïdale à une fréquence imposée  $f$  (en Hz), la réponse en contrainte  $\tau$  (en Pa) est enregistrée et varie également de façon sinusoïdale à la même fréquence mais avec un déphasage par rapport à la déformation. La réponse d'un matériau purement élastique est en phase avec la sollicitation tandis que celle d'un matériau purement visqueux est déphasée de  $90^\circ$ . Les matériaux viscoélastiques se situent donc entre ces deux extrêmes. Les équations correspondantes sont :

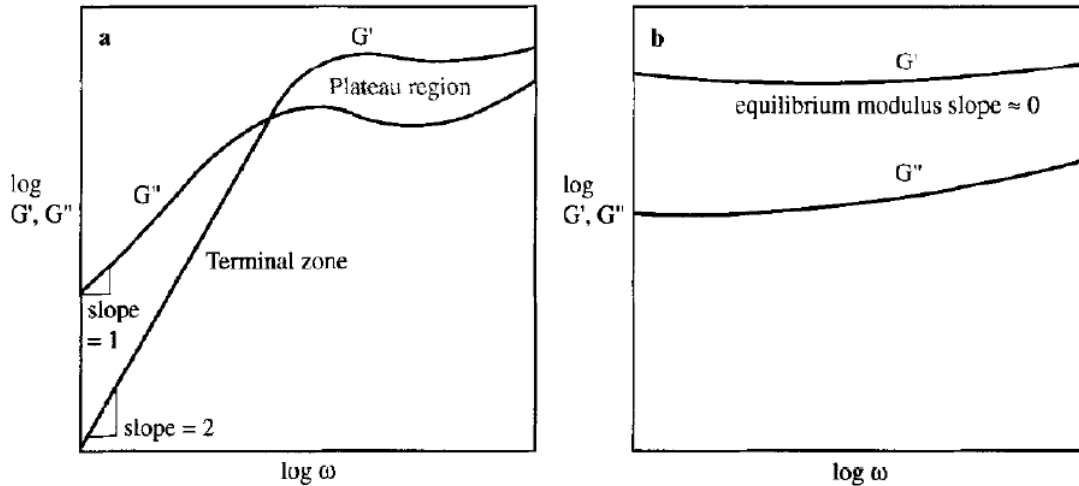
$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \sin(\omega t) \text{ et } \gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin(\omega t + \delta)$$

Avec  $\tau_0$  et  $\gamma_0$  les amplitudes de contrainte et de déformation,  $\omega$  la pulsation ( $= 2\pi f$ , en  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et  $\delta$  le déphasage de la contrainte par rapport à la déformation (en rad).

Il est alors possible d'obtenir les modules dynamiques  $G'$  et  $G''$  (en Pa) à partir de ce déphasage et le module de rigidité complexe  $G^*$  ( $= \tau_0/\gamma_0$ , en Pa). Ces grandeurs sont liées par les relations suivantes :

$$(G^*)^2 = (G')^2 + (G'')^2 \text{ soit } \tan \delta = G''/G'$$

La réponse du matériau en phase avec la déformation appliquée, c'est-à-dire la part d'énergie emmagasinée sous forme élastique est représentée par le module de conservation  $G'$ . Le module de perte (ou module de dissipation),  $G''$ , représente quant à lui la réponse du matériau déphasée avec la déformation appliquée. Il reflète le caractère visqueux, c'est-à-dire la part d'énergie dissipée par frottement interne. Un matériau à dominante élastique ( $G' > G''$ ) s'apparente plus à un solide alors qu'un matériau à dominante visqueuse ( $G'' > G'$ ) se comporte plutôt comme un fluide. Ainsi, en suivant l'évolution des modules avec un balayage en fréquence, il est possible de différencier un gel (solide élastique), d'une solution viscoélastique dont les modules  $G'$  et  $G''$  dépendent de la fréquence. Une illustration théorique issue des travaux de Kavanagh et Ross-Murphy est reprise en figure I.20 afin d'exemplifier les différents cas de figures et l'allure des courbes attendues <sup>[115]</sup>. Sur la figure I.20b, on remarque qu'un gel chimique ou physique permet d'obtenir une réponse élastique prépondérante puisque  $G'$  présente un plateau (pente  $\approx 0$ ) sur des périodes de temps allant jusqu'à plusieurs secondes (donc pour de faibles fréquences), et que  $G''$  est bien inférieur à  $G'$  dans cette région.



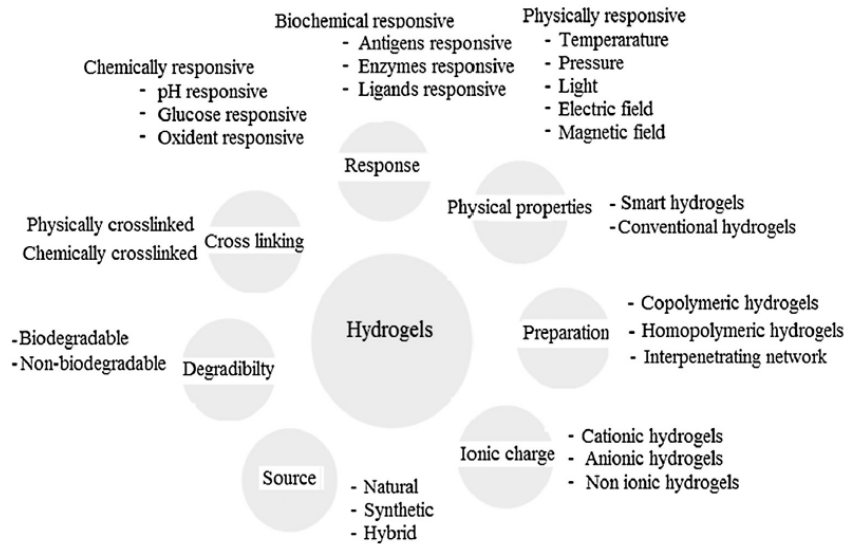
**Figure I.20** Profils théoriques d'évolution des modules  $G'$  (stockage) et  $G''$  (perte) attendus lors d'un balayage en fréquence pour (a) un réseau polymère enchevêtré en solution dans un solvant et (b) un réseau réticulé par des liaisons covalentes (gel chimique) <sup>[115]</sup>

A l'inverse, une solution suffisamment concentrée en polymères pour conduire à des enchevêtrements (figure I.20a) peut présenter un comportement de type gel mais seulement pour des échelles de temps assez faibles par rapport à la durée de vie des enchevêtrements (fréquences élevées). L'analyse des propriétés rhéologiques permet par conséquent de vérifier qu'un matériau est effectivement un gel mais également de comparer deux systèmes entre eux (valeurs de  $G'$ , gamme de fréquence sur laquelle  $G' \gg G''$  etc.). L'évolution des modules en fonction du temps et de la température peut également apporter des éléments d'information sur le mécanisme de gélification, comme nous le verrons dans la partie expérimentale avec l'élaboration de gels thermosensibles (Chapitre III).

### I.3.3 Champs d'applications et classification des hydrogels

Comme mentionné précédemment, les hydrogels sont les matériaux de type gel les plus documentés dans la littérature scientifique. La complexité de ces matériaux est en constante progression et en adéquation avec les nombreuses applications dans lesquelles ils peuvent intervenir (pharmacie et biomédical, biotechnologies, traitement de l'eau et adsorption de polluants, agriculture, emballage alimentaire, cosmétique) <sup>[116]; [117]</sup>.

Une classification basée sur les propriétés des hydrogels a été proposée dans une revue regroupant les moyens d'obtention et les applications de ces matériaux <sup>[118]</sup>. Elle est reprise en figure I.21.



**Figure I.21 Classification des hydrogels basée sur leurs propriétés et leurs applications, proposée par Ullah et al. [118]**

On remarque que de nombreux hydrogels présentent des propriétés modulables en fonction d'un stimulus (pH, température, lumière, champ magnétique, protéine, etc.). Par exemple, les hydrogels sensibles aux antigènes sont conçus en greffant des antigènes sur des squelettes de polymères hydrophiles (acrylate de N-succinimidyle) afin de délivrer des biomolécules à un site spécifique et ciblé [119]. Les progrès réalisés dans la conception des hydrogels ont donné naissance à une nouvelle catégorie de matériaux multi-stimulables et multi-fonctionnels avec des propriétés fascinantes : les « smart hydrogels » [120]. Au-delà de leurs propriétés, on remarque également sur la figure I.21 que les hydrogels peuvent être regroupés selon leur source (naturelle, synthétique ou hybride) et leur dégradabilité. Depuis l'émergence des principes de la chimie verte dans le domaine des matériaux, le développement d'hydrogels physiques biosourcés présentant des propriétés semblables ou supérieures à celles d'hydrogels de synthèse est en plein essor [121]. Parmi les nombreux polymères d'origine naturelle proposés pour la préparation d'hydrogels, les polysaccharides présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux polymères synthétiques [122]. Tout d'abord, cette classe de polymères naturels regroupe une grande variété de structures. Deuxièmement, la plupart des polysaccharides sont relativement faciles à isoler, ce qui les rend moins chers que certains polymères synthétiques. De plus, il est possible de fonctionnaliser un polysaccharide par voie chimique et/ou enzymatique [123]. La fonctionnalisation des polysaccharides est une discipline à part entière qui vise à modifier leurs caractéristiques physico-chimiques en solution (solubilité, propriétés rhéologiques, activités antioxydantes, propriétés biologiques etc.) afin d'élargir leurs domaines d'utilisation. On peut citer par exemple la modification chimique de la cellulose en carboxyméthylcellulose afin de la rendre amorphe, et soluble en milieu aqueux.



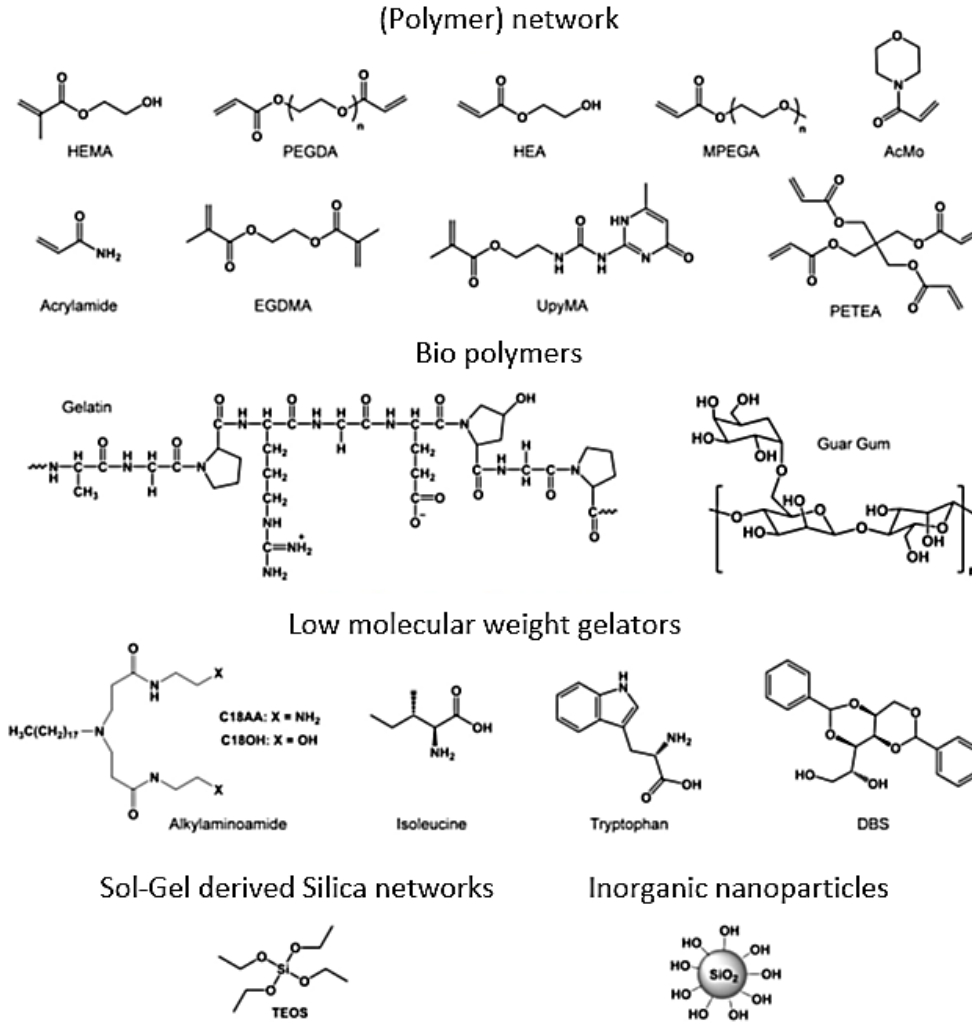
L'origine naturelle des polysaccharides, la diversité de leurs structures, leur polarité, leur caractère semi-rigide, leur aptitude à s'auto-associer notamment par liaisons hydrogène et la possibilité de les modifier chimiquement font que l'on retrouve des hydrogels à base de polysaccharides dans de nombreux domaines d'application : pharmacie, cosmétique, industrie papetière, agroalimentaire, extraction pétrolière... Cet engouement repose en partie sur le fait que la plupart des polysaccharides sont biocompatibles, biodégradables et non toxiques. Les avantages des polysaccharides par rapport aux gélifiants synthétiques sont en accord avec les orientations choisies pour ces travaux de thèse. De plus, la diversité structurale des polysaccharides permet d'envisager divers mécanismes de gélification comme nous le verrons dans le chapitre III. Ces polymères naturels suscitent d'ailleurs un intérêt croissant pour le développement de gels à partir de liquides ioniques et de *LTTM* comme nous le verrons dans le prochain paragraphe. Avant cela, retenons que les méthodes de préparation et de caractérisation des hydrogels à partir de polymères d'origine naturelle sont bien décrites dans la littérature. Ainsi, et indépendamment des polysaccharides qui seront étudiés dans nos travaux, les hydrogels (préparés et caractérisés dans les mêmes conditions) serviront de matériaux comparatifs.

---

### I.3.4 La gélification d'un *LTTM* liquide

Depuis leur introduction en 2001, les ionogels (gels de liquides ioniques) ont ouvert de nouvelles voies pour la conception de matériaux notamment pour les membranes conductrices, les capteurs, la catalyse et les systèmes de libération de médicaments <sup>[124]; [125]</sup>. L'intérêt croissant pour les ionogels repose principalement sur les propriétés des liquides ioniques : conductivité ionique élevée, pression de vapeur négligeable, non-inflammabilité et stabilité thermique et chimique. A l'instar des hydrogels, une évolution vers des ionogels plus respectueux de l'environnement en utilisant des polymères naturels comme gélifiant est en cours. Pour l'illustrer, une étude récente rapporte l'utilisation de  $\iota$ -carraghénane et de liquides ioniques à base de sels d'ammonium ou d'imidazolium. Ces matériaux sont capables d'adapter leurs propriétés électromécaniques en réponse à des stimuli électriques <sup>[126]</sup>. Cependant, l'inconvénient majeur de certains liquides ioniques reste leur faible biodégradabilité, leur difficulté d'obtention (synthèse multi-étapes) et leur toxicité potentielle <sup>[6]</sup>. Il est dorénavant établi que les solvants *LTTM*, répondent d'avantage aux critères de la chimie verte que les liquides ioniques. Ainsi, les eutectogels résultant de l'association d'un solvant eutectique (*DES*, *NaDES*) et d'un gélifiant (matrice polymère organique ou inorganique) constituent une classe émergente de gels. Ce terme d'eutectogel a été introduit par Joos *et al.* en 2018, dans un article traitant de la préparation de membranes solides et conductrices à base de silicium <sup>[127]</sup>.

Dans ces travaux, le mélange revendiqué comme un *DES* est composé d'un sel de lithium (LiTFSI) et de méthylacétamide. La gélification a été réalisée à l'aide d'un précurseur consistant en un mélange d'acide formique et de tétraéthylortosilicate qui est introduit dans le *DES*. La solution, contenant le *DES* et le précurseur, est ensuite coulée dans un moule puis laissée une nuit à température ambiante pour que la gélification in-situ se produise. Un traitement thermique (72h à 45°C) permet d'éliminer l'excès d'acide formique. Le matériau composite obtenu est stable jusqu'à 130°C et possède une conductivité ionique élevée (1,4 mS.cm<sup>-1</sup>). Les auteurs ont indiqué que cette alternative, moins coûteuse que les ionogels, ouvre la voie à une nouvelle génération de batteries au lithium peu chères et plus performantes [127]. Une revue proposée par Tomé et Mecerreyes en 2020 permet d'identifier d'autres champs d'application pour ces nouveaux matériaux qui combinent la conductivité ionique fournie par le *DES* et le comportement « solid-like » du gel [128]. D'après les auteurs, cette combinaison *DES* + gélifiant facilite la préparation de tous les dispositifs électrochimiques solides, en contournant les principaux inconvénients liés à la lixiviation ou à l'oxydation. Au travers des exemples cités, les auteurs ont identifié d'autres applications prometteuses pour ces matériaux. Les domaines de la pharmacie (libération contrôlée de médicaments), de l'analyse (techniques séparatives) et du traitement des eaux usées sont identifiés même si les eutectogels ont été principalement utilisés dans les domaines de l'énergie (batteries et supercondensateurs) et de la bioélectronique (capteurs, membranes). Dans leur revue, Tomé et Mecerreyes différencient les travaux sur ce sujet en classant les matériaux obtenus selon le type de gélifiant utilisé (Figure I.22) [128]. On remarque sur cette figure I.22 que de nombreux polymères comme ceux à base d'acrylates : le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA), l'acrylate de 2-hydroxyéthyle (HEA), l'acrylate de poly(éthylène glycol) méthyl éther (MPEGA), le diacrylate de poly(éthylène glycol) (PEGDA), le diméthacrylate d'éthylène glycol (EGDMA) et l'acrylamide sont utilisés pour gélifier des solvants eutectiques. Les dérivés de silicium et gélifiants inorganiques déjà discutés précédemment pour décrire les travaux de Joos *et al* sont également mentionnés dans la figure I.22. Les autres systèmes gélifiants cités dans la revue de Tomé et Mecerreyes sont des polymères d'origine naturelle (gélatine et gomme de guar) et les gélifiants de faibles masses molaires (acides aminés, amino amides alkylés, et 1,3:2,4-Dibenzylidène-d-sorbitol (DBS)). Afin de compléter la revue de Tomé et Mecerreyes [128], une interrogation Scifinder<sup>n</sup> basée sur le terme « eutectogel » a été réalisée et mise à jour le 19 août 2022. Les résultats de cette interrogation sont rassemblés dans un tableau placé en annexe II. Le potentiel de ces nouveaux matériaux et l'intérêt croissant de la communauté scientifique sont confirmés par les résultats obtenus puisque sur les 37 publications rapportées, près de la moitié a été publiée au premier semestre 2022. On peut par conséquent s'attendre à une évolution exponentielle des publications sur ce sujet dans les prochaines années.



**Figure I.22 Structures chimiques des différents gélifiants décrits pour l'obtention de matériaux ioniques à base de solvants eutectiques d'après la revue de Tomé et Mecerreyes <sup>[128]</sup>**

A partir de l'annexe II, on observe que plus de 60% des eutectogels sont obtenus avec des *LTTM* ioniques principalement à base de  $\text{ChCl}$  (*DES* de type III). La classe de solvant *LTTM* contenant un sel de Lithium ou de Zinc est bien documentée dans des travaux directement reliés à ceux de Joos *et al.* <sup>[127]</sup>. En complément des systèmes gélifiants identifiés dans la revue de Tomé et Mecerreyes (Figure I.22), l'annexe II recense également des matrices polymère (fluorure de poly(vinylidène-co-hexafluoropropylène) (PVDF-HFP), poly(acide acrylique), poly(1-vinylimidazole), poly(alcool vinylique), polyuréthane), des matrices inorganiques (silice), des polymères naturels (cellulose, alginate de sodium, gomme xanthane), des gélifiants de faibles masses molaires (acides aminés et DBS) et des systèmes double réseaux. Compte-tenu du contexte du projet de thèse, les travaux décrivant des mélanges à base de sels métalliques ou de polymères de synthèse non biosourcés ne seront pas discutés en détail dans ce manuscrit.

On retiendra que la plupart de ces matériaux sont obtenus par photo polymérisation comme l'illustre la figure I.23 issue des travaux de Wan *et al.* concernant un gel de poly(acide acrylique) obtenu dans un mélange ChCl:urée (1:2 mol) <sup>[129]</sup>.



Figure I.23 Polymérisation photo-induite de l'acide acrylique dans un mélange ChCl:urée (1:2 mol)<sup>[129]</sup>

En complément, une revue publiée en 2021 par Mota-Morales *et al.* fait un état précis des différents procédés d'obtention de ce type d'eutectogels et des perspectives d'utilisation de ces matériaux <sup>[130]</sup>. Les auteurs distinguent trois stratégies majoritaires de préparation (Figure I.24) :

- (i) polymérisation des monomères de *DES* (en haut à gauche) ou polymérisation classique en milieu *DES* (en haut à droite),
- (ii) dissolution et assemblage de (macro)molécules dans des *DES* pour l'obtention de gels physiques
- (iii) obtention de réseaux polymère interpénétrés en milieu *DES* basés sur la dissolution et l'assemblage de (macro)molécules ou nanocristaux dans un *DES*, suivie de la polymérisation de monomères (classiques ou du *DES*) *in-situ* dans ce milieu.

Finalement, seules deux catégories de systèmes gélifiants identifiés lors de ces recherches bibliographiques sont en accord avec les orientations choisies pour nos recherches : les gélifiants biosourcés de faibles masses molaires (acides aminés et amino-amides alkylés), et les polymères d'origine naturelle (gélatine, gomme de guar, gomme xanthane, alginate de sodium). En effet, les gels obtenus avec ces systèmes gélifiants sont préparés par simple mélange et mettent en œuvre des (macro)molécules biosourcées ce qui répond favorablement aux principes de la chimie verte. Les travaux utilisant ce type de gélifiants biosourcés sont discutés dans les deux sous-parties suivantes.

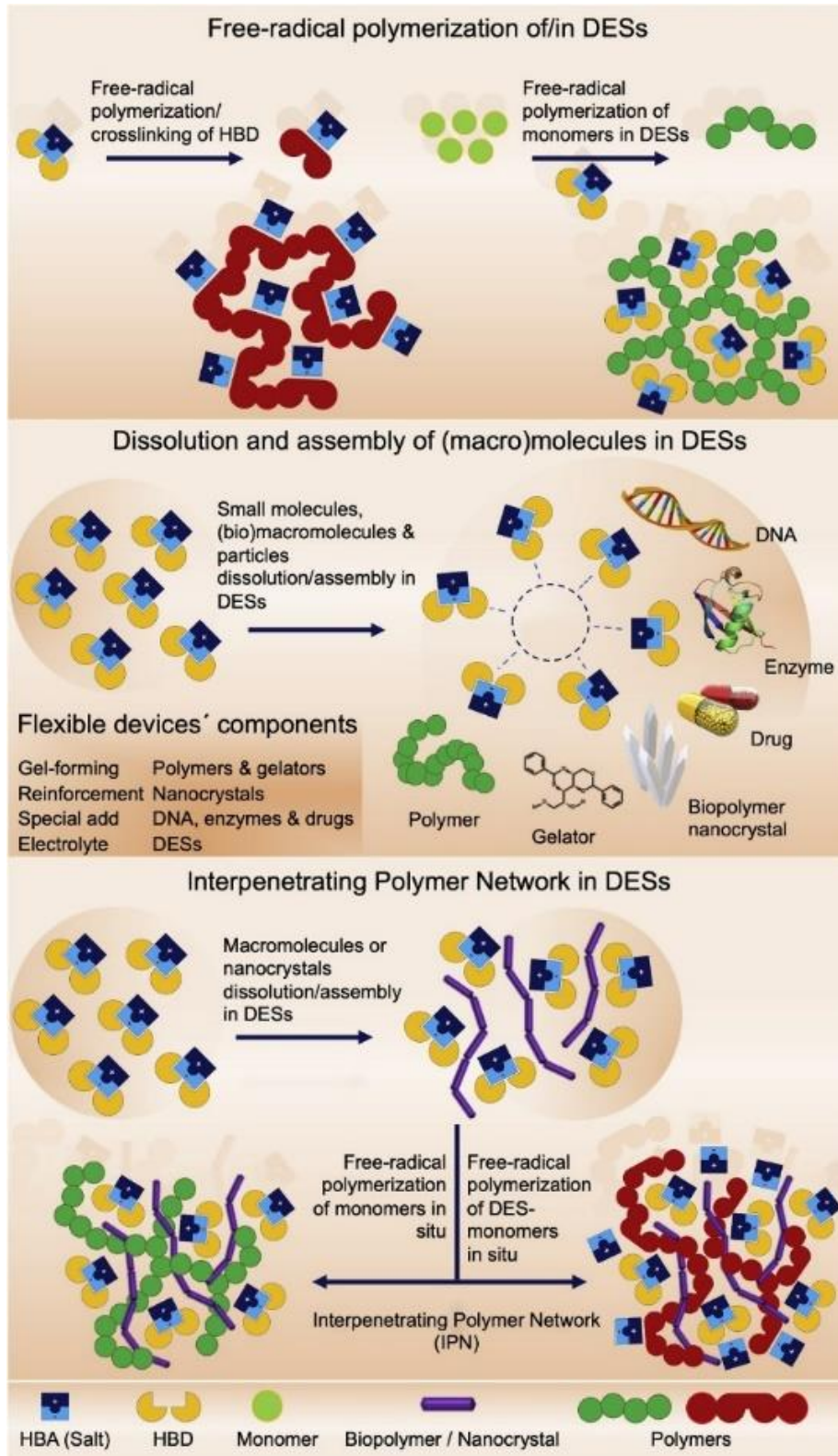


Figure I.24 Stratégies de synthèse pour la préparation de matériaux flexibles biosourcés à base de polymères et contenant des solvants eutectiques <sup>[130]</sup>

## I.3.4.1 Gélification de LTTM par des gélifiants biosourcés de faibles masses molaires

L'utilisation d'acides aminés (isoleucine et tryptophane) pour gélifier un *DES* ChCl:acide phénylacétique (1:2 mol) est décrite par Marullo *et al* [131]. La méthode de préparation décrite consiste en un simple mélange pendant 1 heure à 80°C suivi d'un refroidissement à 4°C. La gélification est obtenue à partir de la capacité des acides L-aminés à former, en milieu solvant, des assemblages nanostructurés via des liaisons hydrogène et des interactions  $\pi$ - $\pi$  spécifiques. Ce mécanisme étant dépendant de la température, les auteurs ont déterminé les températures de transition gel/sol par mesure du point de goutte. Les températures obtenues sont de 34°C et 38°C, respectivement pour des gels à 3% (m/m) d'isoleucine et de tryptophane. Ces dernières étant plus élevées que la température de fusion du *DES* ( $T_f = 25^\circ\text{C}$ ), ces résultats indiquent que la transition gel/sol est due à la dissociation des liaisons hydrogène et non pas à la fusion du solvant. Le comportement rhéologique de ces échantillons est élastique ( $G' > G''$ ) et les modules obtenus sont indépendants de la fréquence, ce qui atteste de la formation d'un gel physique (Figure I.25).

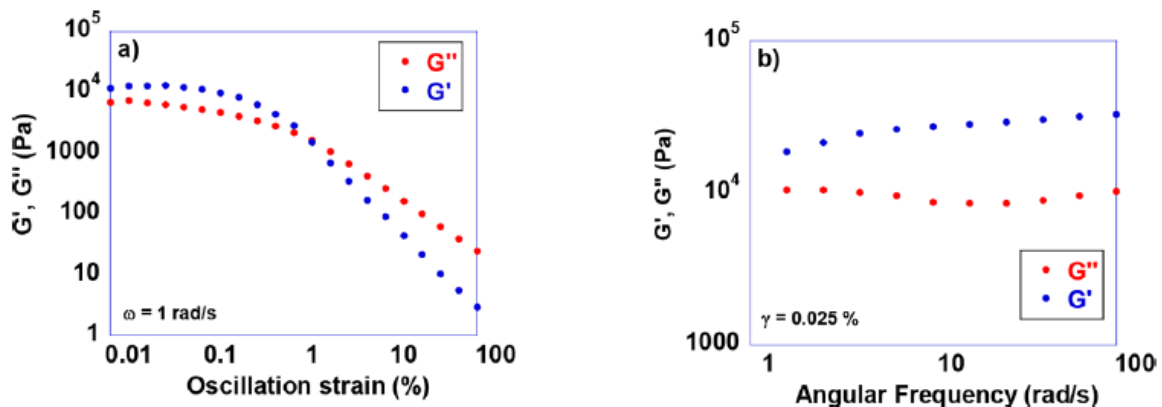
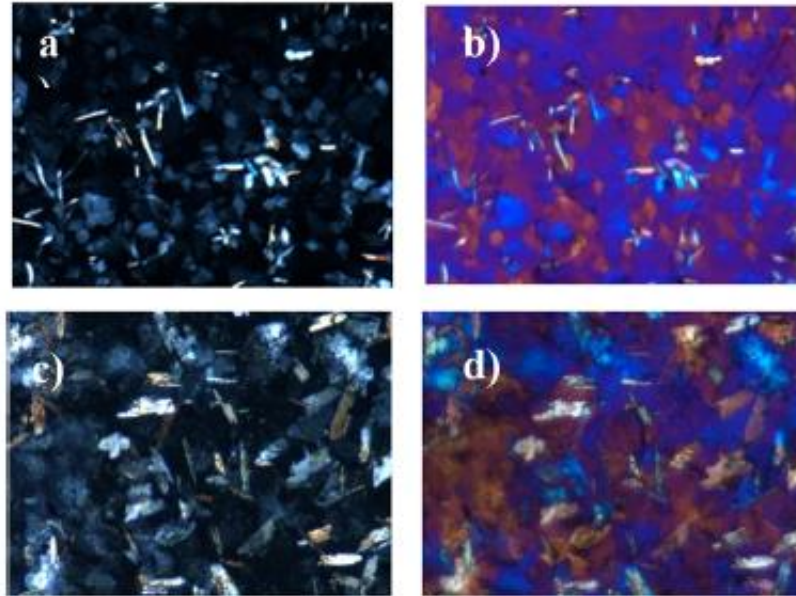


Figure I.25 Mesures de déformation (a) et balayage en fréquence (b) effectuées sur l'eutectogel d'isoleucine à 3% (m/m) dans un mélange ChCl:acide phénylacétique (1:2 mol)<sup>[131]</sup>

Ces travaux montrent également que le module  $G'$  est plus élevé dans le cas de l'isoleucine ( $G' > 10^4$  Pa) comparativement à l'utilisation de tryptophane ( $G' > 10^3$  Pa). Les auteurs ont attribué ces différences aux types d'interactions établies entre le gélifiant et le *DES* (liaisons hydrogène, force de Van der Waals et liaisons  $\pi$ - $\pi$ ). Les auteurs ont observé les gels obtenus au microscope à lumière polarisée (POM) et ont mis en évidence des agrégats de formes différentes en fonction de l'acide aminé employé (Figure I.26). Sur les images a et c, la matrice amorphe apparaît en noir, tandis que les agrégats sont brillants. Lorsqu'une plaque rouge de premier ordre (images b et d) est utilisée, la matrice est magenta et les agrégats sont bleus ou jaunes selon leur orientation.

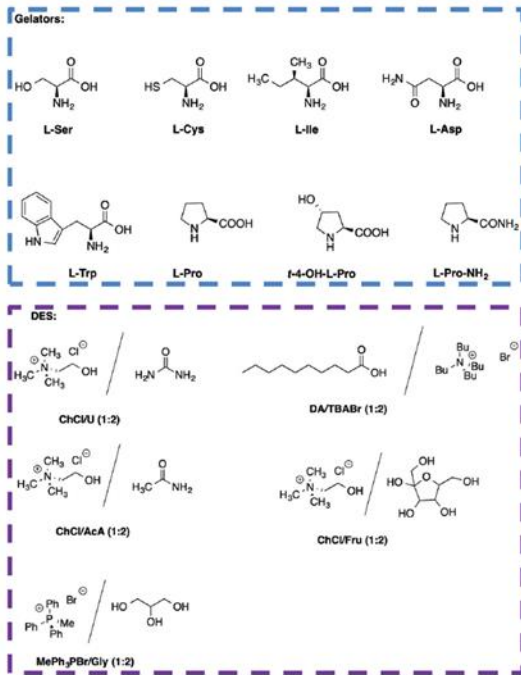


**Figure I.26 Observations POM de gels obtenus dans ChCl:acide phénylacétique (1:2 mol) après ajout de 3% (m/m) de tryptophane (a et b) ou d'isoleucine (c et d) <sup>[131]</sup>**

L'analyse des images obtenues révèle des différences pour les deux gels. Le gel à base de L-Tryptophane (a et b) est caractérisé par de nombreux agrégats polymorphes (dipyramides, octaèdres, dodécaèdres, etc.), ainsi que par des structures allongées éparses. À l'inverse, le gel de L-Isoleucine (c et d) se caractérise par des agrégats plus gros, de tailles et de formes multiples dont la répartition est plus homogène dans l'espace. Ainsi, les auteurs ont conclu que les propriétés de ces gels d'acides aminés dépendent de la structure chimique de ces derniers (cf. Figure I.22).

Les travaux plus récents de Saavedra *et al.* rapportent également l'utilisation d'acides aminés pour gélifier des LTTM <sup>[132]</sup>. Les structures des huit acides aminés ainsi que la nature des solvants sont repris sur la figure I.27. Le protocole de préparation des gels est identique à celui suivi par Marullo *et al.* (solubilisation à 80°C puis refroidissement à 4°C) <sup>[131]</sup>. A travers les résultats de ce screening expérimental, les auteurs ont mis en évidence trois comportements macroscopiquement distincts :

- (i) insolubilité de l'acide aminé dans le LTTM (noté I dans le tableau de la figure I.27),
- (ii) solubilité de l'acide aminé dans le LTTM (noté S dans le tableau de la figure I.27),
- (iii) gélification du solvant par l'acide aminé pour une concentration seuil (noté G dans le tableau de la figure I.27).



Gelator	DES	Conc. (w/w %)	Aspect <sup>a</sup>
L-Pro	ChCl/U (1:2)	3.0-5.0	G (3.0 %)
	DA/TBABr (1:2)	4.0-5.0	I
	ChCl/AcA (1:2)	2.0	S
	ChCl/Frut (1:2)	3.0-4.0	I
	MePh <sub>3</sub> PBr/Gly (1:2)	2.0-3.0	S
L-Pro-NH <sub>2</sub>	ChCl/U (1:2)	1.0-5.0	G (3.0%)
	DA/TBABr (1:2)	2.0-5.0	I
	ChCl/AcA (1:2)	2.0	S
	MePh <sub>3</sub> PBr/Gly (1:2)	2.0-3.0	S
<i>trans</i> -4-OH-L-Pro	ChCl/U (1:2)	1.0-5.0	G (3.0%)
	DA/TBABr (1:2)	2.0-5.0	I
	ChCl/AcA (1:2)	2.0	I
L-Ser	ChCl/U (1:2)	1.0-3.0	G (3.0%)
	DA/TBABr (1:2)	1.0-4.0	I
	ChCl/AcA (1:2)	2.0	I
	MePh <sub>3</sub> PBr/Gly (1:2)	2.0-3.0	S
L-Iso	ChCl/U (1:2)	2.0	S
	DA/TBABr (1:2)	2.0	I
	ChCl/AcA (1:2)	2.0	I
L-Asp	ChCl/U (1:2)	3.0	I
L-Cys	ChCl/U (1:2)	1.0-3.0	I
L-Trp	ChCl/U (1:2)	1.0-2.0	G (2.0%)
	MePh <sub>3</sub> PBr/Gly (1:2)	2.0	S

<sup>a</sup>G = gel; S = soluble; I = insoluble

Figure I.27 Structures des acides aminés et des composants des systèmes LTTM ainsi que les résultats du screening réalisé pour l'obtention d'euctogels. Adaptée de Saavedra *et al.* [132]

A l'exception de l'isoleucine, de l'asparagine et de la cystéine, les acides aminés et dérivés testés (proline, sérine, tryptophane, prolinamide et *trans*-4-hydroxy-proline) permettent d'obtenir des gels mais uniquement dans le mélange ChCl:urée (1:2 mol). Les auteurs ont ensuite caractérisé les températures de transition gel/sol de ces matériaux par mesure du point de goutte et obtenu des valeurs comprises entre 31 et 35°C, soit légèrement inférieures à celles rapportées par Marullo *et al.* [131]. Les propriétés rhéologiques et l'observation de la nanostructure par microscope à lumière polarisée (POM) ont également été étudiées. Comme observé précédemment par Marullo *et al.* [131], le comportement rhéologique de ces échantillons est élastique ( $G' > G''$ ). Les modules obtenus sont indépendants de la fréquence, signature de la formation d'un gel physique, comme dans le cas de la gélification du mélange ChCl:urée (1:2 mol) par 3% (m/m) de L-proline (Figure I.28). Bien que la relation entre les propriétés rhéologiques des gels obtenus et la structure des acides aminés (Figure I.27) ne soit pas discutée par les auteurs, d'après les valeurs de  $\tan \delta$  rapportées pour les gels de proline (0,35), de prolinamide (0,65), et de *trans*-4-hydroxy-proline (0,70), il apparaît là aussi que la nature des groupements fonctionnels influence directement les propriétés des gels d'acides aminés en milieu LTTM.



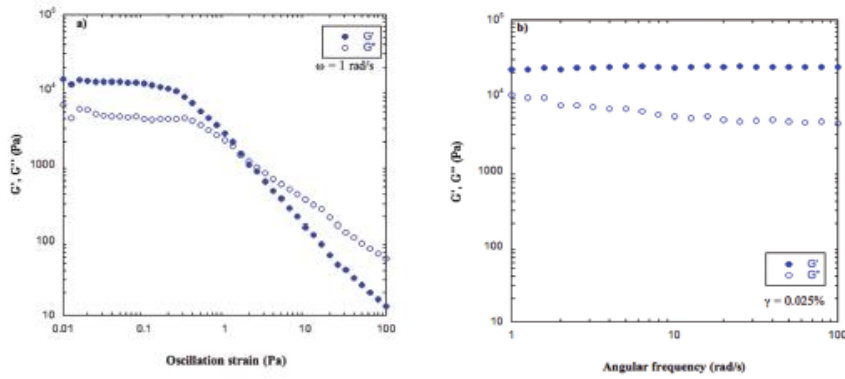


Figure I.28 Mesures en déformation (a) et balayage en fréquence (b) effectuées sur l'eutectogel de L-proline à 3% (m/m) dans un mélange ChCl:urée (1:2 mol)<sup>[132]</sup>

En étudiant le pouvoir gélifiant de deux amino-amides alkylés (les structures sont présentées en figure I.22) sur un mélange de ChCl:urée (1:2 mol), Delbecq *et al.* ont également mis en évidence l'importance des groupements chimiques dans les processus de gélification<sup>[133]</sup>. En effet, les auteurs ont montré que l'ajout de 1% de C18AA dans le *NaLTTM* étudié conduit à la formation d'un gel, ce qui n'est pas le cas lorsque le C18OH est utilisé à des concentrations supérieures à 4%. Les auteurs ont proposé que la gélification repose sur l'insertion du C18AA dans le réseau tridimensionnel formé par le *NaLTTM* par le biais de liaisons hydrogène avec l'urée et l'ion chlorure. Ce mécanisme de création de liaisons hydrogène, illustré en figure I.29, serait facilité par la présence des fonctions amine et amide et conduirait à la formation d'une structure lamellaire stabilisée par des interactions hydrophobes entre les chaînes alkyle du C18AA. L'absence de fonction amine terminale sur la structure du C18OH expliquerait la différence observée dans ce cas.

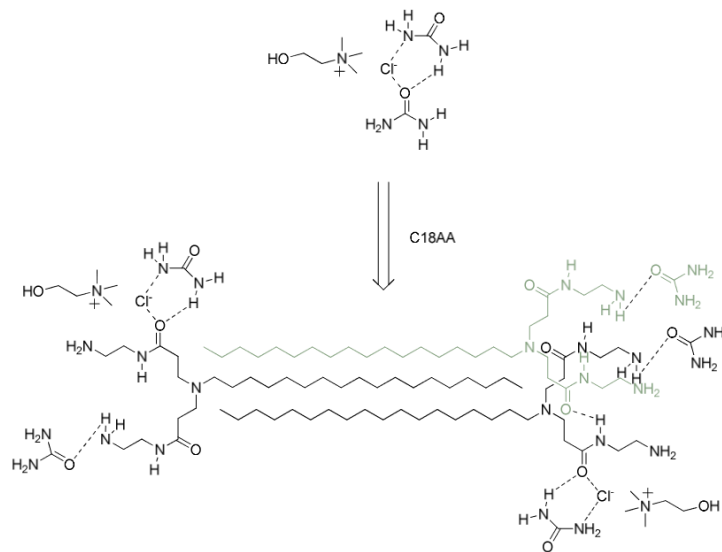


Figure I.29 Illustration du possible mécanisme de gélification d'un mélange CHCl :urée par un amino-amide alkylé : le C18AA<sup>[133]</sup>

Ces trois exemples traitant de l'incorporation de gélifiants biosourcés de faible masse molaire (acides aminés et amino-amides alkylés) dans des *LTTM* démontrent que l'obtention d'un gel dépend du solvant et de la structure chimique du gélifiant utilisé. Plus particulièrement, la nature des groupements chimiques impacte directement les interactions développées au sein du matériau. La formation et l'organisation du gel résulte de l'équilibre qui existe entre les interactions gélifiant/gélifiant, gélifiant/*LTTM* et *LTTM/LTTM*.

#### I.3.4.2 Gélification de *LTTM* par des polymères d'origine naturelle

L'utilisation de polymères d'origine naturelle pour gélifier des solvants de type *LTTM* est également décrite dans la littérature. L'état de l'art a permis d'identifier différents polysaccharides (gomme de guar, gomme xanthane, alginate de sodium) pouvant être utilisés à cet effet, ainsi que la gélatine. La gélatine, mélange de protéines issues de l'hydrolyse partielle du collagène, a été proposée pour gélifier un mélange ChCl:éthylène glycol (1:2 mol) <sup>[134]</sup>. Les mélanges ont été préparés à 70°C pour permettre la dissolution de la gélatine et induire son état de désordre. La gélification se produit lors du refroidissement à 4°C pendant une nuit, temps nécessaire pour que la gélatine retrouve un état ordonné sous forme de triples hélices. Les auteurs ont préparé différents mélanges, tous à base de gélatine (22% m/m) mais dans différents solvants, notamment dans le but de mieux comprendre le rôle joué par chacun des constituants du DES. Le premier mélange est un organogel formé à partir de l'éthylène glycol seul (noté EGgel), le deuxième mélange (noté ChCl hydrogel) correspond à un hydrogel à force ionique élevée préparé à partir d'une solution aqueuse de même concentration en ChCl que celle du *DES* (4,2 M) et le troisième est un hydrogel (gélatine + eau). Les propriétés mécaniques, à grandes déformations, de ces matériaux ont été comparées par des essais de traction qui permettent de suivre les courbes de contrainte-déformation et les valeurs de ténacité (figure I.30 a et b).

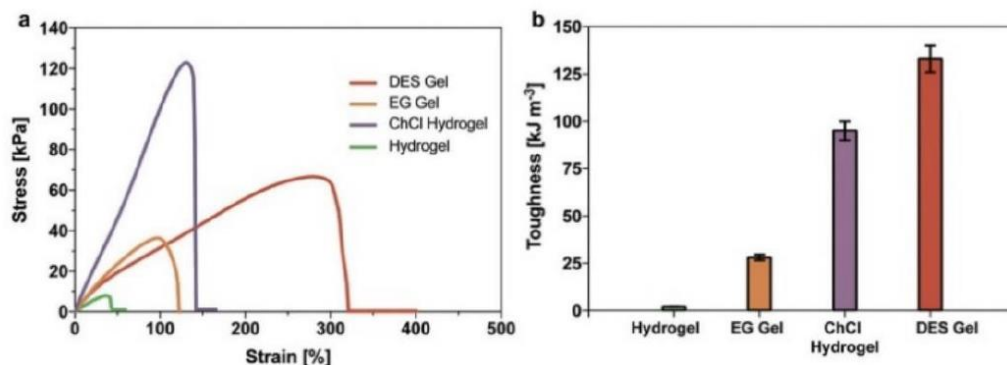


Figure I.30 a) Courbes de contrainte-déformation des différents gels de gélatine (22% m/m) obtenus par des essais de traction. b) Valeurs de la ténacité des gels étudiés <sup>[134]</sup>

La figure I.30a montre les courbes de contrainte de traction-déformation des quatre gels et la figure I.30b montre les ténacités déterminées pour chaque échantillon (correspondant à la valeur de l'aire de la courbe contrainte-déformation). Le gel à base du mélange gélatine/*DES* (en rouge) présente la plus grande déformation à la rupture (320%) et la ténacité la plus élevée (133 kJ.m<sup>-3</sup>). L'hydrogel présente les valeurs de déformation à la rupture et de ténacité les plus faibles (≈ 40 % et 2,1 kJ.m<sup>-3</sup>, respectivement). La présence de ChCl à une concentration de 4,2 M dans le milieu aqueux conduit à un système présentant une plus grande déformation à la rupture (≈ 140%) et une plus forte ténacité (95 kJ.m<sup>3</sup>), par rapport à l'hydrogel sans ajout de ChCl. D'après les auteurs, cela peut s'expliquer par une réduction des interactions électrostatiques entre les chaînes de gélatine dans l'hydrogel contenant le ChCl en raison de la forte densité ionique qui facilite le regroupement des chaînes. L'organogel à base d'éthylène glycol possède une déformation à la rupture proche de celle de l'hydrogel ChCl (≈ 120%), alors que sa ténacité (28 kJ.m<sup>3</sup>) est beaucoup plus faible. Cela indique que l'assemblage des chaînes de gélatine est grandement affecté par cet environnement non aqueux. Par des analyses de diffusion des rayons X aux grands angles (WAXS), les auteurs ont mis en évidence la présence de triples hélices dans l'hydrogel, ainsi que dans le gel à base de *DES*. Cependant, toujours d'après les expériences en WAXS, dans le cas du *DES*, les triples hélices sont moins nombreuses mais leur diamètre moyen est plus important. Ainsi, les auteurs suggèrent que les propriétés mécaniques du gel à base de *DES* résultent d'une contribution synergique de chacun des composés du mélange. L'éthylène glycol favoriserait la formation de triples hélices de diamètre supérieur à celles formées dans l'eau, tandis que le ChCl engendrerait un assemblage sous forme de faisceaux de chaînes. Ces interactions spécifiques entre les chaînes de gélatine et le solvant conduiraient à des agrégats de triples hélices moins nombreux mais de diamètre important.

Quelques polysaccharides ont également été utilisés comme gélifiants de solvants eutectiques. Tout d'abord, les travaux de Depoorter *et al.* ont décrits des mélanges à base de ChCl et de différents *HBD* (urée, acides, alcools et sucres) et de gomme de guar, un polysaccharide appartenant à la famille des galactomannanes. Il s'agit d'une partie des travaux de thèse de Jeremy Depoorter, réalisés au sein du laboratoire IMP, illustrée par la figure I.31 [135]. Le mélange ChCl:urée (1:2mol) s'est avéré le plus efficace pour solubiliser la gomme de guar. Les mélanges obtenus sont transparents et macroscopiquement homogènes. D'après les auteurs, cette compatibilité supérieure s'explique d'une part par la propension de l'anion chlorure à former des liaisons hydrogène et, d'autre part, par la nature chaotrope de l'urée qui favorise la dissociation des liaisons hydrogène développées naturellement entre les chaînes de guar.

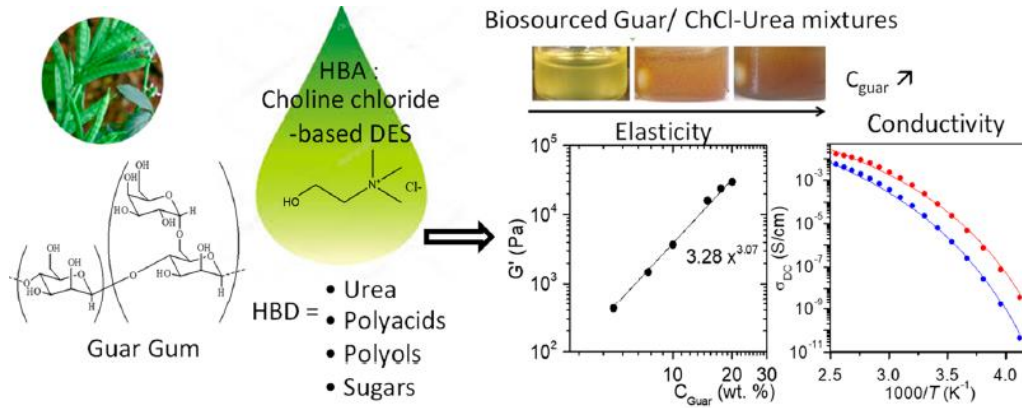


Figure I.31 Graphical abstract résumant l'obtention et la caractérisation de matériaux à partir de gomme de guar et de mélanges LTTM [135]

Cette conclusion s'appuie notamment sur des analyses par spectroscopie infrarouge et par diffraction des rayons X qui ont révélé la dissociation de liaisons entre les chaînes de guar au profit de liaisons hydrogène développées entre les groupements OH de la gomme de guar et les groupements polaires du *DES* ChCl:urée. La caractérisation des propriétés rhéologiques réalisée sur les mélanges guar/ChCl:urée a montré que les modules  $G'$  et  $G''$  augmentent avec la concentration en guar. Pour des concentrations inférieures à 10%, le comportement est dominé par le module visqueux ( $G'' > G'$ ). Entre 10 et 20%, un comportement viscoélastique dépendant de la fréquence est observé alors que la concentration de 20% permet de conserver un comportement élastique ( $G' > G''$ ) sur toute la plage de fréquence étudiée. Cette différence de comportement s'explique par l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène entre les chaînes de guar et le *DES* et par l'augmentation du nombre des enchevêtrements entre les chaînes de guar avec la concentration. Cette structuration résulte donc de l'équilibre qui existe entre les interactions guar/guar, guar/*DES* et *DES/DES*. Enfin, le mélange guar/ChCl/urée ( $C_{guar} = 10\%$  m/m) présente une conductivité ionique élevée qui démontre que ces matériaux biosourcés présentent un potentiel applicatif en tant qu'électrolyte solide, pour des utilisations dans le domaine de l'énergie, à l'instar des eutectogels introduits par Joos *et al.* [127]

L'utilisation de la gomme xanthane, un exopolysaccharide obtenu par la fermentation aérobie du glucose par la bactérie *Xanthomonas campestris* a été décrite dans deux publications. Dans la première, les auteurs ont rapporté l'obtention de gels à partir de mélanges à base de ChCl et de différents *HBD* : xylitol, glycérol, sorbitol et acide citrique [136]. La préparation est simple puisque les auteurs ont indiqué que la gomme xanthane a été introduite dans le *NaLTTM* sous agitation jusqu'à dissolution complète à température ambiante. Un ajout d'eau à 10% (m/m) a ensuite été effectué. Ce mélange a été chauffé à 80°C pendant 5 minutes avant d'être conservé à température ambiante. C'est lors du refroidissement que la gélification se produit.

Plus précisément, il s'agit du réarrangement thermoréversible de type ordre-désordre du xanthane induit par un cycle de chauffage / refroidissement comme pour la formation d'hydrogels de xanthane. Les auteurs ont indiqué que la formation de gels physiques à faibles concentrations de xanthane (3% m/m) n'était possible que lorsqu'un ajout de 10% (m/m) d'eau était réalisé. La figure I.32 issue de cette publication illustre cette constatation pour le mélange ChCl:xylitol.

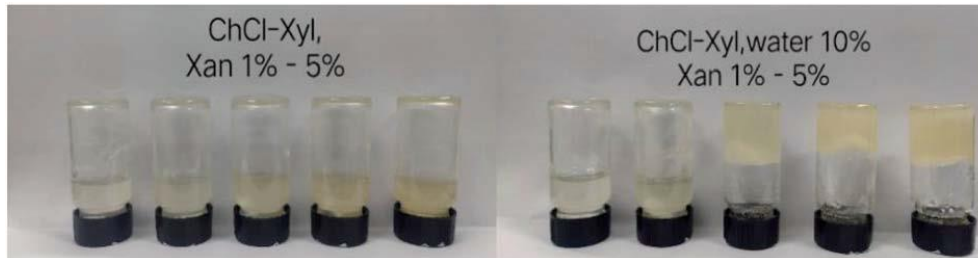


Figure I.32 Effets de l'ajout d'eau et de la concentration en gomme de xanthane sur la formation de gels de ChCl / xylitol (1:1 mol) [136]

Un ajout jusqu'à 5% (m/m) de xanthane dans le mélange binaire ChCl:xylitol a conduit à l'obtention de solutions visqueuses (écoulement après retournement du flacon). A l'inverse, pour des concentrations en xanthane supérieures ou égales à 3% (m/m) dans un mélange ternaire ChCl:xylitol:eau, les échantillons ne s'écoulent pas après retournement du flacon. L'étude des propriétés rhéologiques en écoulement montre un comportement fortement rhéofluidifiant (Figure I.33A). D'autre part, les balayages en fréquence révèlent un comportement élastique avec  $G' > G''$  sur la gamme de fréquences étudiées sauf dans le cas du mélange ChCl:acide citrique (1:1 mol) pour lequel un croisement des modules est observé à 3 Hz (Figure I.33B).

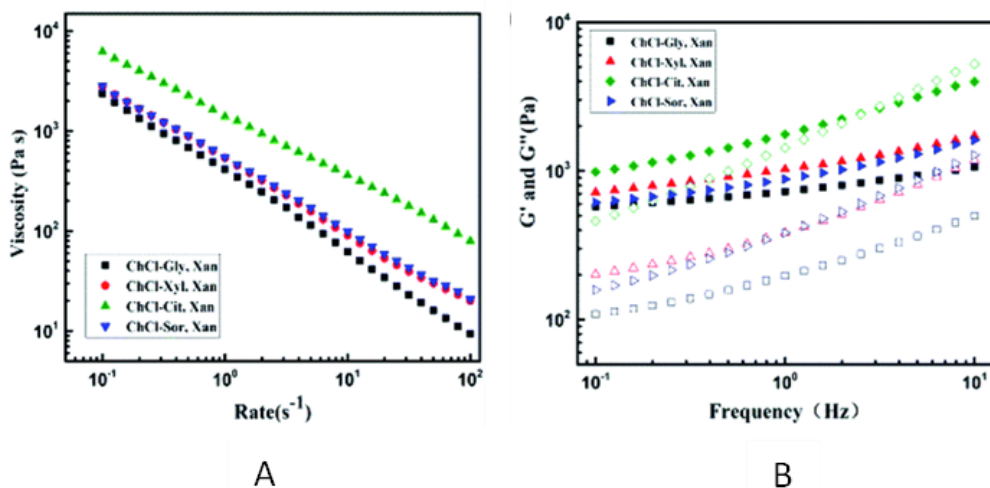
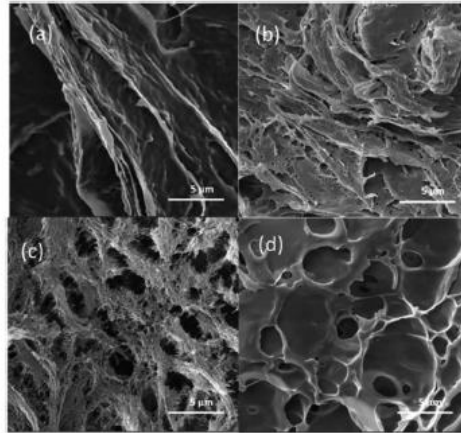


Figure I.33 Propriétés rhéologiques de gels de xanthane obtenus dans différents NaLTTM : ChCl:glycérol, ChCl:acide citrique, ChCl:xylitol, ChCl:sorbitol. (A) courbes d'écoulements et (B) balayages en fréquence. Adaptée de Zeng *et al.* [136]

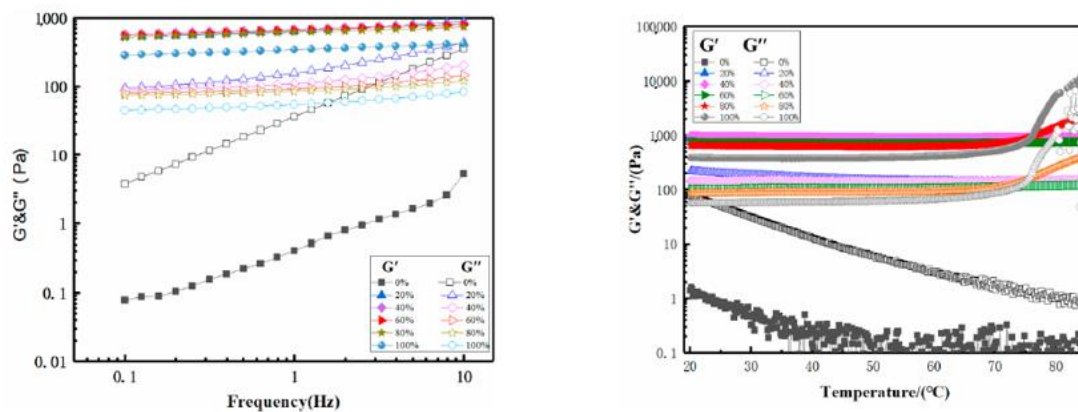
Les auteurs ont indiqué que la valeur des modules augmente avec la concentration en xanthane. Ces matériaux présentent toutefois des modules dépendant de la fréquence de sollicitation, ce qui s'explique par la nature et le caractère non-covalent des interactions engagées dans la formation du réseau physique (liaisons hydrogène entre le polysaccharide et le *NaLTTM*). Ainsi, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'eau intervient dans la structuration du matériau. Afin de préciser la structuration interne, les auteurs ont observé les matériaux obtenus au microscope électronique à balayage (SEM) figure I.34.



**Figure I.34 Clichés MEB de gels de gomme xanthane (10% m/m) obtenus dans différents NaLTTM : (a) ChCl:glycérol, (b) ChCl:acide citrique, (c) ChCl:xylitol, et (d) ChCl:sorbitol [136]**

Une structure filamenteuse est retrouvée pour les quatre eutectogels obtenus dans les *NaLTTM* utilisés. Cependant, la microstructure globale du réseau de xanthane présente des différences significatives en fonction du solvant. Dans le mélange ChCl:glycérol (1:2 mol) (a) de longs filaments sont observés alors que dans le ChCl:acide citrique (1:1 mol) (b) des structures en feuillets apparaissent. Pour les systèmes ChCl:xylitol (1:1 mol) (c) et ChCl:sorbitol (1:1 mol) (d) la structure est plus poreuse et est formée de cavités internes de quelques  $\mu\text{m}$ . D'après les auteurs, ces différences pourraient être attribuées à la perturbation du réseau de liaisons hydrogène du solvant par l'incorporation de xanthane. Les molécules d'eau permettraient de maintenir une conformation ordonnée d'agrégats de xanthane, ce qui explique que seules des solutions visqueuses soient obtenues avec les *NaLTTM* anhydres. D'après les auteurs, le degré d'agencement des chaînes de xanthane varie avec le caractère plus ou moins libre de l'eau dans la structuration supramoléculaire du solvant. Cette interprétation est à considérer avec beaucoup de précautions car les structures des différents solvants utilisés n'ont pas été étudiées dans ces travaux. Les auteurs ont également indiqué que les propriétés thermiques du système obtenu avec le système ChCl:xylitol (1:1 mol) (+ 10% m/m d'eau) sont très proches de celles du solvant puisqu'une unique  $T_g$  est observée sur une plage de température allant de  $-50^\circ\text{C}$  à  $90^\circ\text{C}$ .

L'utilisation de gomme xanthane en combinaison avec le *LTTM* ChCl:xylitol (1:1mol) a également été décrite par Xia *et al* [137]. Dans cette étude, les auteurs se sont intéressés plus précisément à l'impact de la quantité d'eau (entre 20 et 100%) sur les propriétés des mélanges obtenus avec 5% (m/m) de xanthane. Le protocole de préparation est identique à celui suivi par Zeng *et al*. [136]. Là aussi, les auteurs ont montré qu'un ajout d'eau était nécessaire à l'obtention de gels. Les propriétés rhéologiques des gels obtenus ont été étudiées par balayage en fréquence à 25°C et par un balayage en température (rampe de 1°C/min entre 20 et 90°C) à une fréquence de 1 Hz (Figure I.35). Hormis l'échantillon ne contenant pas d'eau pour lequel  $G'' > G'$ , l'indépendance des modules avec la fréquence confirme l'état de gel pour tous les échantillons (figure I.35A).



**Figure I.35** Dépendance des modules en fonction de la fréquence (A) et de la température (B) pour des gels de xanthane obtenus dans l'eau (100%) et dans des mélanges ternaires ChCl:xylitol:eau 1:1mol + différents pourcentages massiques d'eau (de 0 à 80%) [137]

L'hydrogel présente des valeurs de modules inférieures à celles des gels obtenus dans les mélanges ternaires ChCl:xylitol (1:1mol) + eau. On remarque qu'un ajout d'eau (entre 20 et 80% (m/m)) a peu d'impact sur la valeur des modules élastiques à 25°C. L'ordre de grandeur des modules :  $G' < 1000$  Pa et  $G'' \approx 100$  Pa est similaire à ceux des travaux de Zeng *et al*. [136] et confirme qu'il s'agit de gels faibles résultant de liaisons hydrogène entre le polysaccharide et le *LTTM*. Sur la figure I.35B, il apparaît que les modules du mélange sans eau diminuent avec l'augmentation de la température. Pour des concentrations en eau comprises entre 20 et 60% (m/m), les gels présentent des propriétés viscoélastiques invariantes avec la température. Enfin, pour des concentrations en eau comprises entre 80 et 100% (m/m) (hydrogel), une augmentation des modules est observée à hautes températures ce qui est très certainement dû à l'évaporation partielle de l'eau. Les auteurs ont ensuite examiné les propriétés thermiques de ces gels par DSC, entre -60 et 100°C. Lorsque la quantité d'eau ajoutée est inférieure à 40%, aucun événement thermique n'est repéré. Dans cette gamme de concentration, l'eau est retenue dans la structure du *LTTM* et ne cristallise pas, même à des températures négatives. La cristallisation de l'eau apparaît pour des concentrations en eau supérieures à 40%.

Cette observation est cohérente avec la discussion de l'effet de l'eau sur la structure supramoléculaire des mélanges *LTTM* (cf. §I.2.6). Ainsi, l'appellation eutectogels utilisée dans ces travaux pour décrire des mélanges comprenant 60 ou 80% massique d'eau peut être considéré comme un abus de langage car ces mélanges peuvent plutôt être considérés comme étant des hydrogels comprenant du ChCl et du xylitol. Les auteurs ont également indiqué que les gels obtenus sont très bien tolérés par des cellules normales (type HepG2) avec une viabilité cellulaire proche de 100% (Test AMTT). Enfin, l'ajout de 20% d'eau au mélange ChCl:xylitol (1:1mol) permettrait de solubiliser 10 000 fois plus de quercétine (un flavonoïde souvent retrouvé en extraction végétale) que dans l'eau. Toutefois, les auteurs n'ont pas discuté la possibilité d'obtenir des gels en ajoutant de la gomme xanthane dans un mélange *LTTM* + quercétine. Les publications de Zeng *et al.* et Xia *et al.* démontrent cependant la faisabilité de gélifier des solvants *NaLTTM* par de la gomme xanthane en présence d'au moins 10% (m/m) d'eau [136]; [137]. Les propriétés rhéologiques dépendent de la concentration en xanthane et les propriétés thermiques sont étroitement liées à celles du mélange *NaLTTM* utilisé.

Enfin, la possibilité de gélifier des *LTTM* par de l'alginate de sodium a été très récemment étudiée par Tian *et al.* [138]. Ces travaux se démarquent de ceux discutés précédemment car les *NaLTTM* utilisés ne contiennent pas de ChCl et consistent en des associations proline + *HBD* (glucose ou sorbitol) + eau (20% (m/m)). Le protocole de préparation des eutectogels est assez complexe et comporte plusieurs étapes (Figure I.36).

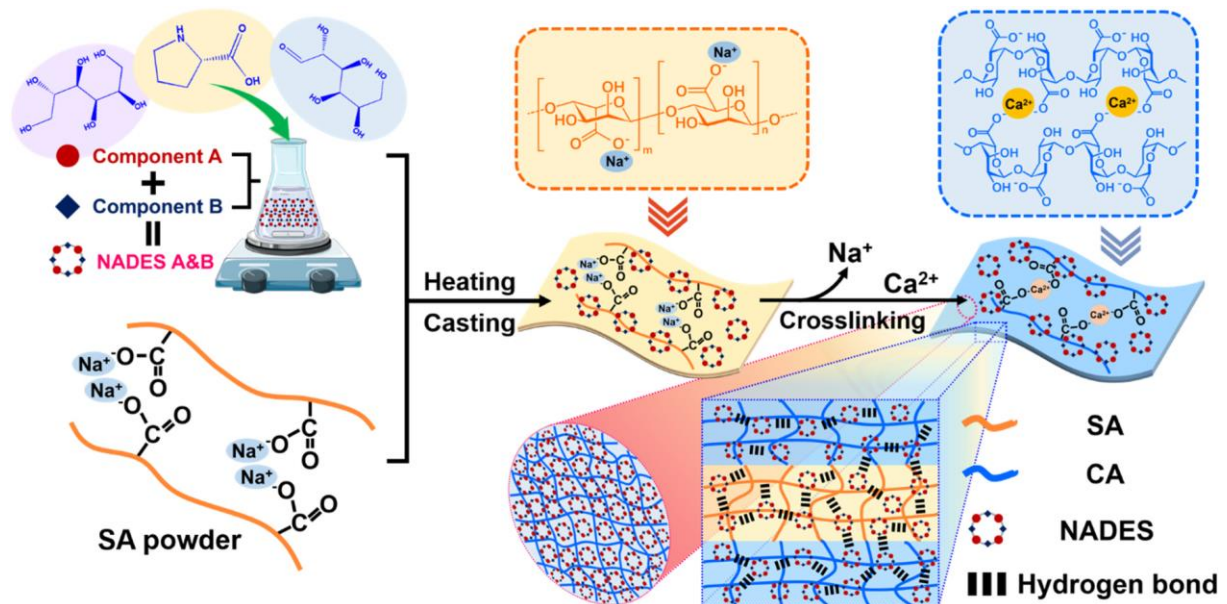


Figure I.36 Protocole de préparation décrit dans les travaux de Tian *et al.* [138] pour l'obtention de films d'eutectogels composés de *NaLTTM* et d'alginate de sodium



Comme le montre la figure I.36, la première étape consiste en la préparation du *NaLTTM* à 50°C sous agitation jusqu'à ce qu'une solution visqueuse et transparente soit obtenue. L'alginat de sodium (environ 1g) a été dissous dans 60mL d'eau distillée et la solution d'alginat a été chauffée à 90°C. Après dissolution complète de l'alginat, 4,0g de *NaLTTM* a été ajouté à la solution aqueuse d'alginat et le mélange a été agité pendant 10 minutes à 90°C. La solution obtenue a été immédiatement passée aux ultrasons pour éliminer le gaz dissous puis refroidie à  $T_{amb}$ . Après refroidissement, la solution a été coulée dans un gabarit en plastique d'un diamètre de 90 mm et d'une hauteur de 2 mm puis séchée à 30°C pendant environ 12 heures. Un film monocouche comprenant les composés du *NaLTTM* et l'alginat de sodium a été obtenu. Pour immobiliser ce film monocouche dans un gel et rendre le matériau insoluble dans l'eau, cette monocouche a été immergée dans la solution de réticulation comprenant 3% (m/v) de  $CaCl_2$  et 90 % (v/v) d'éthanol pendant environ 30 minutes. Au cours du processus de réticulation, la couche externe est gélifiée par diffusion des ions calcium créant ainsi un film possédant une structure « sandwich-like » comme illustré par la figure I.37 issue de ces travaux [138].

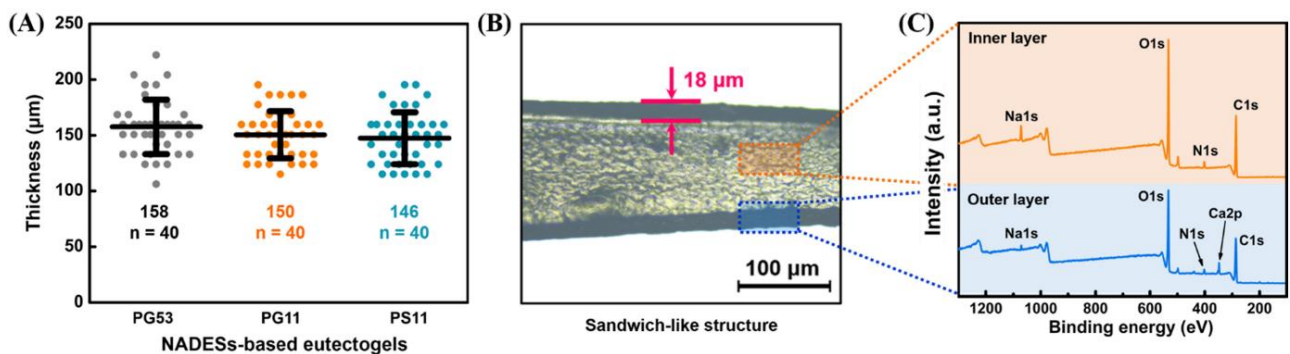


Figure I.37 Epaisseur (A), microstructure (B) et informations élémentaires (C) des eutectogels à base de *NaLTTM* obtenus par Tian *et al.* [138]

L'épaisseur des films obtenus a été mesurée sur 40 échantillons, préparés à partir des 3 solvants *NaLTTM* considérés. Quel que soit le solvant, l'épaisseur des films obtenus est d'environ 150µm (Figure I.37A). La microstructure des films a été observée par microscopie optique afin de confirmer la structure « sandwich-like » (Figure I.37B). Enfin, une analyse par spectroscopie de photoélectrons X (XPS) de chacune des couches a permis de mettre en évidence que seules les couches externes du matériaux contiennent du calcium. Les auteurs ont ensuite caractérisé les propriétés mécaniques et thermiques en conditions extrêmes afin d'illustrer la bonne résistance à la congélation des matériaux obtenus. Les auteurs ont envisagé d'utiliser ces matériaux comme films alimentaires résistant à la congélation [138].

---

### I.3.5 Conclusion

Dans cette deuxième partie bibliographique, nous avons recensé plusieurs travaux traitant de la gélification de solvants *LTTM*. Différents systèmes gélifiants ont été recensés. Il apparait cependant que les polysaccharides non modifiés restent à ce jour minoritaires dans les travaux traitant de la gélification de *LTTM*. De plus, un seul exemple de gélification d'un *NaLTTM* ne contenant pas de  $\text{ChCl}$  a été identifié. La caractérisation de ces matériaux repose principalement sur la description des propriétés rhéologiques, mécaniques et structurales. Les publications traitant d'eutectogels à base de xanthane indiquent que la présence d'eau est nécessaire pour l'obtention d'un gel. D'autre part, les systèmes gélifiés obtenus avec la gélatine <sup>[134]</sup> et la gomme de guar <sup>[135]</sup> nécessitent des concentrations en polysaccharides très élevées ( $\approx 20\%$  m/m), ce qui présente un inconvénient pour des projections industrielles. Parmi les différentes techniques identifiées pour la préparation d'eutectogels, on retiendra que l'utilisation de certains polysaccharides (gomme de guar, gomme xanthane) permet l'obtention de gels par un simple cycle de chauffage et de refroidissement de la solution de polysaccharide dans le *NaLTTM*. Compte-tenu des orientations de ce projet de thèse (potentielle application en cosmétique, chimie verte, procédé peu énergivore et transposable industriellement) cette approche sera privilégiée. D'autres polysaccharides comme les alginates nécessitent la présence d'ions divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  dans les travaux de Tian *et al.* <sup>[138]</sup>) et permettent de créer une coque de gel en surface du matériaux. Cette voie sera également examinée et étudiée (Chapitre III.3). Enfin, il apparait que la gélification de solvants *LTTM* à base de fructose, de glycérol et d'eau, et que la gélification d'extraits végétaux obtenus par ce type de solvants, ne sont pas décrites à ce jour dans la littérature.

## I.4 Références bibliographiques

- [1] Anastas P. T., Warner J. C. Green chemistry Theory and practice. Oxford, England: Oxford University Press, 1998, 135 p. ISBN 0198502346.
- [2] Aparecida de Marco B., Rechelo B. S., Tófoli E. G., et al. Evolution of green chemistry and its multi-dimensional impacts: A review. Saudi pharmaceutical journal, 2019, 27, 1, pp. 1–8.
- [3] Anastas P. T., Eghbali N. Green Chemistry: Principles and Practice. Chemical Society Reviews, 2010, 39, 1, pp. 301–312.
- [4] Capello C., Fischer U., Hungerbühler K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. Green Chemistry, 2007, 9, 9, pp. 927–934.
- [5] Jessop P. G. Searching for green solvents. Green Chemistry, 2011, 13, 6, pp. 1391–1398.
- [6] Kudlak B., Owczarek K., Namiesnik J. Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. Environmental science and pollution research international, 2015, 22, 16, pp. 11975–11992.
- [7] Messadi A., Mohamadou A., Boudesocque S., et al. Task-specific ionic liquid with coordinating anion for heavy metal ion extraction: cation exchange versus ion-pair extraction. Separation and Purification Technology, 2013, 107, pp. 172.
- [8] Klingshirn M. A., Spear S. K., Holbrey J. D., et al. Ionic liquids as solvent and solvent additives for the synthesis of sol-gel materials. Journal of Materials Chemistry, 2005, 15, 48, pp. 5174.
- [9] Kragl U., Eckstein M., Kaftzik N. Enzyme catalysis in ionic liquids. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13, 6, pp. 565–571.
- [10] Hecht S. E., Niehoff R. L., Narasimhan K., et al. Extracting biopolymers from a biomass using ionic liquids, WO2006/116126A2. 20/04/2006.
- [11] Troter D. Z., Todorović Z. B., Đokić-Stojanović D. R., et al. Application of ionic liquids and deep eutectic solvents in biodiesel production A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2016, 61, pp. 473–500.
- [12] Berthod A., Ruiz-Angel M. J., Carda-Broch S. Ionic liquids in separation techniques. Journal of Chromatography A, 2008, 1184, 1-2, pp. 6–18.
- [13] Shamshina J. L., Barber P. S., Rogers R. D. Ionic liquids in drug delivery. Expert Opinion on Drug Delivery, 2013, 10, 10, pp. 1367–1381.
- [14] Duan M. H., Luo M., Zhao C. J., et al. Ionic liquid-based negative pressure cavitation-assisted extraction of three main flavonoids from the pigeonpea roots and its pilot-scale application. Separation and Purification Technology, 2013, 107, 0, pp. 26–36.
- [15] Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M. C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. Angewandte Chemie International Edition, 2013, 52, 11, pp. 3074–3085.
- [16] Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. Chemical Communications, 2003, 1, pp. 70–71.
- [17] Ruß C., König B. Low melting mixtures in organic synthesis – an alternative to ionic liquids? Green Chemistry, 2012, 14, 11, pp. 2969.
- [18] Sun H., Li Y., Wu X., et al. Theoretical study on the structures and properties of mixtures of urea and choline chloride. Journal of Molecular Modeling, 2013, 19, 6, pp. 2433–2441.
- [19] Smith E. L., Abbott A. P., Ryder K. S. Deep eutectic solvents (DESS) and their applications. Chemical reviews, 2014, 114, 21, pp. 11060–11082.
- [20] Zhang Q., Oliveira Vigier K. de, Royer S., et al. Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties and Applications. Chem.Soc.Rev., 2012, 41, 21, pp. 7108–7146.

- [21] Martins M. A. R., Pinho S. P., Coutinho J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. *Journal of Solution Chemistry*, 2019, 48, 7, pp. 962–982.
- [22] El Achkar T. Deep eutectic solvents : characterization, interaction with synthetic and biological membranes, and solubilization of bioactive volatile compounds. *chimie organique. UCEIV - Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant*. 25 janvier 2021.
- [23] Abranches D. O., Martins M. A. R., Silva L. P., et al. Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: the quest for type V DES. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 2019, 55, 69, pp. 10253–10256.
- [24] van den Bruinhorst A., Spyriouni T., Hill J.-R., et al. Experimental and Molecular Modeling Evaluation of the Physicochemical Properties of Proline-Based Deep Eutectic Solvents. *The journal of physical chemistry. B*, 2018, 122, 1, pp. 369–379.
- [25] Choi Y. H., van Spronsen J., Dai Y., et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, 2011, 156, 4, pp. 1701–1705.
- [26] van Osch D. J., Zubeir L. F., van den Bruinhorst A., et al. Hydrophobic deep eutectic solvents as water-immiscible extractants. *Green Chemistry*, 2015, 17, 9, pp. 4518–4521.
- [27] Duarte A. R. C., Ferreira A. S. D., Barreiros S., et al. A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 2017, 114, pp. 296–304.
- [28] Qin H., Hu X., Wang J., et al. Overview of acidic deep eutectic solvents on synthesis, properties and applications. *Green Energy & Environment*, 2020, 5, 1, pp. 8–21.
- [29] El Achkar T., Moufawad T., Ruellan S., et al. Cyclodextrins: from solute to solvent. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 2020, 56, 23, pp. 3385–3388.
- [30] Chemat F., Anjum H., Shariff A. M., et al. Thermal and physical properties of (Choline chloride + urea +l-arginine) deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 2016, 218, pp. 301–308.
- [31] Durand E., Lecomte J., Villeneuve P. From green chemistry to nature: The versatile role of low transition temperature mixtures. *Biochimie*, 2016, 120, pp. 119–123.
- [32] Coutinho J. A., Pinho S. P. Special Issue on Deep Eutectic Solvents: A foreword. *Fluid Phase Equilibria*, 2017, 448, pp. 1.
- [33] Jablonský M., Jozef Šima Is it Correct to Name DESs Deep Eutectic Solvents? *BioResources*, 2022, 17, 3, pp. 3880–3882.
- [34] Liu X., Locasale J. W. *Metabolomics: A Primer*. *Trends in biochemical sciences*, 2017, 42, 4, pp. 274–284.
- [35] Choi Y. H., Verpoorte R. Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products using ionic liquids and deep eutectic solvents. *Current Opinion in Food Science*, 2019, 26, pp. 87–93.
- [36] Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G. J., et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 766, pp. 61–68.
- [37] González C. G., Mustafa N. R., Wilson E. G., et al. Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour and Fragrance Journal*, 2018, 33, 1, pp. 91–96.
- [38] Caprin B., Charton V., Vogelgesang B. Chapter Twelve - The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. *Advances in Botanical Research Eutectic Solvents and Stress in Plants (Volume 97)*. Academic Press. 2021, pp. 309–332. ISBN 978-0-12-821691-0.
- [39] Ling J. K. U., Hadinoto K. Deep Eutectic Solvent as Green Solvent in Extraction of Biological Macromolecules: A Review. *International journal of molecular sciences*, 2022, 23, 6,
- [40] Mamajanov I., Engelhart A. E., Bean H. D., et al. DNA and RNA in anhydrous media: duplex, triplex, and G-quadruplex secondary structures in a deep eutectic solvent. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49, 36, pp. 6310–6314.

- [41] Vanda H., Dai Y., Wilson E. G., et al. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 2018, 21, 6, pp. 628–638.
- [42] Jablonský M., Škulcová A., Malvis A., et al. Extraction of value-added components from food industry based and agro-forest biowastes by deep eutectic solvents. *Journal of Biotechnology*, 2018, 282, pp. 46–66.
- [43] Zdanowicz M., Wilpiszewska K., Spychaj T. Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 200, pp. 361–380.
- [44] Hoppe J., Byzia E., Drozd R., et al. An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 2022, 216, pp. 112518.
- [45] Gallo V., Tomai P., Di Lisio V., et al. Application of a Low Transition Temperature Mixture for the Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Illicit Drugs from Urine Samples. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26, 17,
- [46] Caprin B., Charton V., Rodier J.-D., et al. Scrutiny of the supramolecular structure of bio-sourced fructose/glycerol/water ternary mixtures Towards green low transition temperature mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 337, pp. 116428.
- [47] Roda A., Paiva A., Duarte A. R. C. Therapeutic Liquid Formulations Based on Low Transition Temperature Mixtures for the Incorporation of Anti-Inflammatory Drugs. *Pharmaceutics*, 2021, 13, 10,
- [48] Boyko N., Zhilyakova E., Malyutina A., et al. Studying and Modeling of the Extraction Properties of the Natural Deep Eutectic Solvent and Sorbitol-Based Solvents in Regard to Biologically Active Substances from Glycyrrhizae Roots. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25, 7,
- [49] Alhadid A., Mokrushina L., Minceva M. Formation of glassy phases and polymorphism in deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 314, pp. 113667.
- [50] Mat Hussin S. A., Varanusupakul P., Shahabuddin S., et al. Synthesis and characterization of green menthol-based low transition temperature mixture with tunable thermophysical properties as hydrophobic low viscosity solvent. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 308, pp. 113015.
- [51] Sánchez P. B., González B., Salgado J., et al. Physical properties of seven deep eutectic solvents based on l-proline or betaine. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2019, 131, pp. 517–523.
- [52] Tomai P., Lippiello A., D'Angelo P., et al. A low transition temperature mixture for the dispersive liquid-liquid microextraction of pesticides from surface waters. *Journal of chromatography. A*, 2019, 1605, pp. 360329.
- [53] Zdanowicz M., Staciwa P., Spychaj T. Low Transition Temperature Mixtures (LTTM) Containing Sugars as Potato Starch Plasticizers. *Starch - Stärke*, 2019, 71, 9-10, pp. 1900004.
- [54] Yiin C. L., Quitain A. T., Yusup S., et al. Sustainable green pretreatment approach to biomass-to-energy conversion using natural hydro-low-transition-temperature mixtures. *Bioresource technology*, 2018, 261, pp. 361–369.
- [55] Yiin C. L., Quitain A. T., Yusup S., et al. Characterization of natural low transition temperature mixtures (LTTMs): Green solvents for biomass delignification. *Bioresource technology*, 2016, 199, pp. 258–264.
- [56] Zeng C.-X., Qi S.-J., Xin R.-P., et al. Synergistic behavior of betaine–urea mixture Formation of deep eutectic solvent. *Journal of Molecular Liquids*, 2016, 219, pp. 74–78.
- [57] Craveiro R., Aroso I., Flammia V., et al. Properties and thermal behavior of natural deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 2016, 215, pp. 534–540.
- [58] Zubeir L. F., Lacroix M. H. M., Kroon M. C. Low transition temperature mixtures as innovative and sustainable CO<sub>2</sub> capture solvents. *The journal of physical chemistry. B*, 2014, 118, 49, pp. 14429–14441.
- [59] Naser J., Mjalli F., Jibril B., et al. Potassium Carbonate as a Salt for Deep Eutectic Solvents. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2013, pp. 114–118.

- [60] Gonzalez A. S., Francisco M., Jimeno G., et al. Liquid–liquid equilibrium data for the systems {LTTM+benzene+hexane} and {LTTM+ethyl acetate+hexane} at different temperatures and atmospheric pressure. *Fluid Phase Equilibria*, 2013, 360, pp. 54–62.
- [61] Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M. C. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. *Green Chemistry*, 2012, 14, 8, pp. 2153.
- [62] Francisco M., van den Bruinhorst A., Zubeir L. F., et al. A new low transition temperature mixture (LTTM) formed by choline chloride+lactic acid Characterization as solvent for CO<sub>2</sub> capture. *Fluid Phase Equilibria*, 2013, 340, pp. 77–84.
- [63] Savi L. K., Dias M. C. G. C., Carpine D., et al. Natural deep eutectic solvents (NADES) based on citric acid and sucrose as a potential green technology A comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 1, 08, pp. 70.
- [64] Gutiérrez M. C., Ferrer M. L., Mateo C. R., et al. Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2009, 25, 10, pp. 5509–5515.
- [65] Gomez F. J. V., Espino M., Fernandez M. A., et al. A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect*, 2018, 3, 22, pp. 6122–6125.
- [66] Santana A. P., Mora-Vargas J. A., Guimarães T. G., et al. Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 293, pp. 111452.
- [67] Aroso I. M., Paiva A., Reis R. L., et al. Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine – Physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 2017, 241, pp. 654–661.
- [68] Liu Y., Friesen J. B., McAlpine J. B., et al. Natural Deep Eutectic Solvents Properties, Applications, and Perspectives. *J. Nat. Prod.*, 2018, 81, 3, pp. 679–690.
- [69] El Achkar T., Greige-Gerges H., Fourmentin S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 2021, 19, 4, pp. 3397–3408.
- [70] Hansen B. B., Spittle S., Chen B., et al. Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical reviews*, 2021, 121, 3, pp. 1232–1285.
- [71] Yang Z. Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 2018,
- [72] Cao J., Su E. Hydrophobic deep eutectic solvents: the new generation of green solvents for diversified and colorful applications in green chemistry. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 314, pp. 127965.
- [73] Abbott A. P., Boothby D., Capper G., et al. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 29, pp. 9142–9147.
- [74] Katkov I. I., Levine F. Prediction of the glass transition temperature of water solutions Comparison of different models. *Cryobiology*, 2004, 49, 1, pp. 62–82.
- [75] Matveev Y. I., Grinberg V. Y., Sochava I. V., et al. Glass transition temperature of proteins. Calculation based on the additive contribution method and experimental data. *Food Hydrocolloids*, 1997, 11, 2, pp. 125–133.
- [76] Delgado-Mellado N., Larriba M., Navarro P., et al. Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis. *Journal of Molecular Liquids*, 2018, 260, pp. 37–43.
- [77] Santana A. P. R., Andrade D. F., Mora-Vargas J. A., et al. Natural deep eutectic solvents for sample preparation prior to elemental analysis by plasma-based techniques. *Talanta*, 2019, 199, pp. 361–369.
- [78] Khutoryanskiy V. V., Nurkeeva Z. S., Mun G. A., et al. Effect of temperature on aggregation/dissociation behavior of interpolymer complexes stabilized by hydrogen bonds. *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 93, 4, pp. 1946–1950.

- [79] Zhao B.-Y., Xu P., Yang F.-X., et al. Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2015, 3, 11, pp. 2746–2755.
- [80] van Osch D. J. G. P., Dietz C. H. J. T., van Spronsen J., et al. A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7, 3, pp. 2933–2942.
- [81] Xin R., Qi S., Zeng C., et al. A functional natural deep eutectic solvent based on trehalose Structural and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 2017, 217, pp. 560–567.
- [82] Hayyan A., Mjalli F. S., AlNashef I. M., et al. Glucose-based deep eutectic solvents Physical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 2013, 178, pp. 137–141.
- [83] Dai Y., Witkamp G. J., Verpoorte R., et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, 2015, 187, pp. 14–19.
- [84] Abbott A. P., Harris R. C., Ryder K. S., et al. Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chemistry*, 2011, 13, 1, pp. 82–90.
- [85] Ibrahim R. K., Hayyan M., AlSaadi M. A., et al. Physical properties of ethylene glycol-based deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 276, pp. 794–800.
- [86] Shahbaz K., Mjalli F. S., Hashim M. A., et al. Prediction of the surface tension of deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibria*, 2012, 319, pp. 48–54.
- [87] Lapeña D., Lomba L., Artal M., et al. The NADES glyceline as a potential Green Solvent A comprehensive study of its thermophysical properties and effect of water inclusion. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2019, 128, pp. 164–172.
- [88] Karbowski T., Debeaufort F., Voilley A. Importance of surface tension characterization for food, pharmaceutical and packaging products: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2006, 46, 5, pp. 391–407.
- [89] Reichardt C. Pyridinium N-phenolate betaine dyes as empirical indicators of solvent polarity: Some new findings. *Pure and Applied Chemistry*, 2004, 76, 10, pp. 1903–1919.
- [90] Chromá R., Vilková M., Shepa I., et al. Investigation of tetrabutylammonium bromide-glycerol-based deep eutectic solvents and their mixtures with water by spectroscopic techniques. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 330, pp. 115617.
- [91] Overhauser A. W. Polarization of Nuclei in Metals. *Physical Review*, 1953, 92, 2, pp. 411–415.
- [92] Vögeli B. The nuclear Overhauser effect from a quantitative perspective. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 2014, 78, pp. 1–46.
- [93] Huggins M. T., Billimoria F. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy. An Advanced Undergraduate Experiment. *Journal of Chemical Education*, 2007, 84, 3, pp. 471.
- [94] Zahrina I., Mulia K., Yanuar A., et al. Molecular interactions in the betaine monohydrate-polyol deep eutectic solvents Experimental and computational studies. *Journal of Molecular Structure*, 2018, 1158, pp. 133–138.
- [95] Hammond O. S., Bowron D. T., Edler K. J. The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 2017, 56, 33, pp. 9782–9785.
- [96] Ma C., Laaksonen A., Liu C., et al. The peculiar effect of water on ionic liquids and deep eutectic solvents. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47, 23, pp. 8685–8720.
- [97] Alfurayj I., Fraenza C. C., Zhang Y., et al. Solvation Dynamics of Wet Ethaline: Water is the Magic Component. *The journal of physical chemistry. B*, 2021, 125, 31, pp. 8888–8901.
- [98] Posada E., López-Salas N., Jiménez Riobóo R. J., et al. Reline aqueous solutions behaving as liquid mixtures of H-bonded co-solvents Microphase segregation and formation of co-continuous structures as indicated by Brillouin and <sup>1</sup>H NMR spectroscopies. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2017, 19, 26, pp. 17103–17110.

- [99] Roldán-Ruiz M. J., Jiménez-Riobóo R. J., Gutiérrez M. C., et al. Brillouin and NMR spectroscopic studies of aqueous dilutions of malicine Determining the dilution range for transition from a “water-in-DES” system to a “DES-in-water” one. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 284, pp. 175–181.
- [100] Delso I., Lafuente C., Muñoz-Embid J., et al. NMR study of choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 290, pp. 111236.
- [101] Lapeña D., Lomba L., Artal M., et al. Thermophysical characterization of the deep eutectic solvent choline chloride Ethylene glycol and one of its mixtures with water. *Fluid Phase Equilibria*, 2019, 492, pp. 1–9.
- [102] López N., Delso I., Matute D., et al. Characterization of xylitol or citric acid Choline chloride:water mixtures: Structure, thermophysical properties, and quercetin solubility. *Food Chemistry*, 2020, 306, pp. 125610.
- [103] Roda A., Santos F., Chua Y. Z., et al. Unravelling the nature of citric acid L-arginine:water mixtures: the bifunctional role of water. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2021,
- [104] Tomé L. I., Baião V., Da Silva W., et al. Deep eutectic solvents for the production and application of new materials. *Applied Materials Today*, 2018, 10, pp. 30–50.
- [105] Paiva A., Craveiro R., Aroso I., et al. Natural Deep Eutectic Solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2014, 2, 5, pp. 1063–1071.
- [106] Almdal K., Dyre J., Hvidt S., et al. Towards a phenomenological definition of the term ‘gel’. *Polymer Gels and Networks*, 1993, 1, 1, pp. 5–17.
- [107] Gold V. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2019,
- [108] Marr P. C., Marr A. C. *Ionic liquid gel materials: applications in green and sustainable chemistry*. *Green Chemistry*, 2016, 18, 1, pp. 105–128.
- [109] Zaccarelli E. Colloidal gels: equilibrium and non-equilibrium routes. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2007, 19, 32, pp. 323101.
- [110] Hanabusa K., Tange J., Taguchi Y., et al. Small molecular gelling agents to harden organic liquids: alkylamide of N-benzyloxycarbonyl-L-valyl-L-valine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1993, 4, pp. 390.
- [111] Jagur-Grodzinski J. *Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications*. *Polymers for Advanced Technologies*, 2010, 21, 1, pp. 27–47.
- [112] Richter S. Recent Gelation Studies on Irreversible and Reversible Systems with Dynamic Light Scattering and Rheology - A Concise Summary. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2007, 208, 14, pp. 1495–1502.
- [113] Davidovich-Pinhas M., Gravelle A. J., Barbut S., et al. Temperature effects on the gelation of ethyl-cellulose oleogels. *Food Hydrocolloids*, 2015, 46, pp. 76–83.
- [114] Sun J.-Y., Zhao X., Illeperuma W. R. K., et al. Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature*, 2012, 489, 7414, pp. 133–136.
- [115] Kavanagh G. M., Ross-Murphy S. B. Rheological characterisation of polymer gels. *Progress in polymer science*, 1998, 23, 3, pp. 533–562.
- [116] Chen G., Tang W., Wang X., et al. Applications of Hydrogels with Special Physical Properties in Biomedicine. *Polymers*, 2019, 11, 9,
- [117] Pyarasani R. D., Jayaramudu T., John A. Polyaniline-based conducting hydrogels. *Journal of Materials Science*, 2019, 54, 2, pp. 974–996.
- [118] Ullah F., Othman M. B. H., Javed F., et al. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 2015, 57, pp. 414–433.
- [119] Miyata T., Asami N., Urugami T. A reversibly antigen-responsive hydrogel. *Nature*, 1999, 399, 6738, pp. 766–769.



- [120] Samchenko Y., Ulberg Z., Korotych O. Multipurpose smart hydrogel systems. *Advances in colloid and interface science*, 2011, 168, 1-2, pp. 247–262.
- [121] Qamruzzaman M., Ahmed F., Mondal M. I. H. An Overview on Starch-Based Sustainable Hydrogels: Potential Applications and Aspects. *Journal of Polymers and the Environment*, 2022, 30, 1, pp. 19–50.
- [122] Coviello T., Matricardi P., Marianecchi C., et al. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2007, 119, 1, pp. 5–24.
- [123] Karaki N., Aljawish A., Humeau C., et al. Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review. *Enzyme and microbial technology*, 2016, 90, pp. 1–18.
- [124] Kimizuka N., Nakashima T. Spontaneous Self-Assembly of Glycolipid Bilayer Membranes in Sugarphilic Ionic Liquids and Formation of Ionogels. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2001, 17, 22, pp. 6759–6761.
- [125] Le Bideau J., Viau L., Vioux A. Ionogels, ionic liquid based hybrid materials. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40, 2, pp. 907–925.
- [126] Serra J. P., Fernandes L. C., Correia D. M., et al. Environmentally friendly carrageenan-based ionic-liquid driven soft actuators. *Materials Advances*, 2022, 3, 2, pp. 937–945.
- [127] Joos B., Vranken T., Marchal W., et al. Eutectogels: A New Class of Solid Composite Electrolytes for Li/Li-Ion Batteries. *Chemistry of Materials*, 2018, 30, 3, pp. 655–662.
- [128] Tomé L. C., Mecerreyes D. Emerging Ionic Soft Materials Based on Deep Eutectic Solvents. *The journal of physical chemistry. B*, 2020,
- [129] Wan Y., Huang S., Sun Y., et al. Superstrong yet water-detachable eutectogel adhesives. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 442, pp. 136289.
- [130] Mota-Morales J. D., Morales-Narváez E. Transforming nature into the next generation of bio-based flexible devices: New avenues using deep eutectic systems. *Matter*, 2021, 4, 7, pp. 2141–2162.
- [131] Marullo S., Meli A., Giannici F., et al. Supramolecular Eutecto Gels Fully Natural Soft Materials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6, 10, pp. 12598–12602.
- [132] Saavedra B., Meli A., Rizzo C., et al. Natural eutectogels: sustainable catalytic systems for C–C bond formation reactions. *Green Chemistry*, 2021, 23, 17, pp. 6555–6565.
- [133] Delbecq F., Delfosse P., Laboueix G., et al. Study of a gelated Deep Eutectic solvent metal salt solution as template for the production of size-controlled small noble metal nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2019, 567, pp. 55–62.
- [134] Qin H., Oweyung R. E., Sonkusale S. R., et al. Highly stretchable and nonvolatile gelatin-supported deep eutectic solvent gel electrolyte-based ionic skins for strain and pressure sensing. *Journal of Materials Chemistry C*, 2019, 7, 3, pp. 601–608.
- [135] Depoorter J., Mourlevat A., Sudre G., et al. Fully Biosourced Materials from Combination of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents and Guar Gum. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7, 19, pp. 16747–16756.
- [136] Zeng C., Zhao H., Wan Z., et al. Highly biodegradable, thermostable eutectogels prepared by gelation of natural deep eutectic solvents using xanthan gum Preparation and characterization. *RSC Advances*, 2020, 10, 47, pp. 28376–28382.
- [137] Xia H., Ren M., Zou Y., et al. Novel Biocompatible Polysaccharide-Based Eutectogels with Tunable Rheological, Thermal, and Mechanical Properties: The Role of Water. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25, 15,
- [138] Tian Y., Sun D.-W., Xu L., et al. Bio-inspired eutectogels enabled by binary natural deep eutectic solvents (NADESS): Interfacial anti-frosting, freezing-tolerance, and mechanisms. *Food Hydrocolloids*, 2022, 128, pp. 107568.

## I.5 Liste des figures et des tableaux

FIGURE I.1 ILLUSTRATION DES 12 PRINCIPES DE LA CHIMIE VERTE <sup>[2]</sup> .....	15
FIGURE I.2 COMPARAISON ENTRE LES SOLVANTS VERTS CITES PAR DES SCIENTIFIQUES DANS LE CADRE D'UNE ENQUETE (A) ET LES SOLVANTS VERTS CITES DANS GREEN CHEMISTRY EN 2010 (B) <sup>[5]</sup> .....	16
FIGURE I.3 CLASSIFICATION ET PROPRIETES DES DIFFERENTES GENERATIONS DE LIQUIDES IONIQUES PROPOSEE PAR KUDLACK ET AL. EN 2015 <sup>[6]</sup> .....	18
FIGURE I.4 EVOLUTION DU POINT DE FUSION DE MELANGES CHCl <sub>3</sub> /UREE EN FONCTION DE LA COMPOSITION MOLAIRE ET STRUCTURES DES COMPOSES, ADAPTEE DE ABBOTT ET AL. <sup>[16]</sup> .....	19
TABLEAU I.1 CLASSIFICATION DES DEEP EUTECTIC SOLVENTS SELON LE TYPE DE PRECURSEURS <sup>[19]</sup> .....	20
FIGURE I.5 DIAGRAMME DE PHASE SOLIDE-LIQUIDE REPRESENTANT UN POINT EUTECTIQUE IDEAL (LIGNE ROUGE) ET UN SOLVANT EUTECTIQUE PROFOND (DES) (LIGNE VERTE) <sup>[22]</sup> .....	21
FIGURE I.6 DIAGRAMME DE PHASE DU SYSTEME BINAIRE MENTHOL/THYMOL. LES PREDICTIONS PAR LOI DE MELANGE IDEAL (LIGNE POINTILLEE) ET PAR COSMO-RS (LIGNE PLEINE) SONT INDIQUEES AINSI QUE LES T <sub>F</sub> (◆) ET LES T <sub>G</sub> (●) <sup>[23]</sup> ..	21
FIGURE I.7 ILLUSTRATION DE LTTM OBTENUS A PARTIR DE MOLECULES NATURELLES : SUCROSE (1), FRUCTOSE (2), GLUCOSE (3), ACIDE MALIQUE (4), SUCROSE-FRUCTOSE-GLUCOSE (1:1:1 MOL) (5) ET SUCROSE-ACIDE MALIQUE (1:1 MOL) (6) <sup>[35]</sup> .....	23
TABLEAU I.2 SOLUBILITE DE MOLECULES DANS DES NADES COMPARATIVEMENT A L'EAU <sup>[36]</sup> .....	24
FIGURE I.8 INTERPRETATION GRAPHIQUE DU RECENSEMENT DES NALTTM DONT LA T <sub>G</sub> EST RENSEIGNEE DANS LA LITTERATURE (CF. TABLEAU ANNEXE I) .....	25
FIGURE I.9 VALEURS DE T <sub>G</sub> (ISSUES DE L'ANNEXE I) DES SYSTEMES NALTTM BINAIRES EN PROPORTION MOLAIRE (1:1) EN FONCTION DU COUPLE HBA / HBD .....	29
TABLEAU I.3 VALEURS DE T <sub>G</sub> RAPPORTEES PAR ZDANOWICZ ET AL. POUR DES SYSTEMES SUCRE : GLYCEROL <sup>[53]</sup> .....	31
TABLEAU I.4 EXTRACTION DE DONNEES DE T <sub>G</sub> ISSUES DU TABLEAU RECAPITULATIF PLACE EN ANNEXE I .....	31
TABLEAU I.5 PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DE DES DE TYPE III (CHCl <sub>3</sub> + HBD) A 30°C <sup>[79]</sup> .....	33
FIGURE I.10 EVOLUTION DE LA VISCOSITE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE POUR DES MELANGES COMPOSES D'ACIDE CITRIQUE, DE SUCROSE ET D'EAU <sup>[63]</sup> .....	34
FIGURE I.11 SPECTRES INFRA-ROUGE DE LTTM COMPOSES D'ACIDE MALIQUE ET DE PROLINE (A) 1 : ACIDE MALIQUE, 2 : PROLINE : ACIDE MALIQUE (1:1 MOL), 3 : PROLINE ET (B) EFFET DE LA PROPORTION MOLAIRE <sup>[83]</sup> .....	37
FIGURE I.12 EFFET DE L'ADDITION PROGRESSIVE D'EAU SUR LE SPECTRE IR D'UN LTTM COMPOSE DE BROMURE DE TETRABUTYLAMMONIUM ET DE GLYCEROL (1:3 MOL) (A). (B)=20%, (C)=50%, (D)=80%, (E)=90% ET (F)=100% D'EAU <sup>[90]</sup> .....	38
FIGURE I.13 SPECTRE RMN 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY MONTRANT LES INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES ENTRE L'ACIDE MALIQUE ET LE SUCROSE (*) <sup>[25]</sup> .....	39
FIGURE I.14 SCHEMA ILLUSTRANT L'INTEGRATION DE L'EAU DANS LA STRUCTURATION DE MELANGES A BASE DE CHLORURE DE CHOLINIUM (II) ET LE PHENOMENE DE DISSOCIATION PROGRESSIVE DE LA STRUCTURE APRES PLUS FORTE DILUTION <sup>[96]</sup> .....	41
FIGURE I.15 EFFET DE LA TENEUR EN EAU D'UN MELANGE CHCl <sub>3</sub> :ACIDE MALIQUE SUR LA VITESSE DE PROPAGATION DU SON (A) ET SUR LE DEPLACEMENT CHIMIQUE DU PIC HDO OBSERVE EN RMN <sup>1</sup> H (ADAPTEE DE ROLDAN-RUIZ ET AL. <sup>[99]</sup> )	42
FIGURE I.16 A. CARTE <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY DU MELANGE CHCl <sub>3</sub> :GLYCEROL:EAU (1:2:1 MOL) OBTENUS A 25°C, B. ILLUSTRATION DES INTERACTIONS IDENTIFIEES ET CARTES NOESY APRES DIFFERENTES DILUTIONS PAR D <sub>2</sub> O (C) 10% (M/M) ET (D) 90% (M/M), ADAPTEE DES TRAVAUX DE DELSO ET AL. <sup>[100]</sup> .....	43
FIGURE I.17 CARTES <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY DES MELANGES CHCl <sub>3</sub> :XYLITOL:EAU (2:1:3 MOL) A GAUCHE ET CHCl <sub>3</sub> :ACIDE CITRIQUE:EAU (1:1:6 MOL) A DROITE OBTENUS A 25°C, ADAPTE DES TRAVAUX DE LOPEZ ET AL. <sup>[102]</sup> .....	45

FIGURE I.18 CARTE NOESY DU MELANGE ACIDE CITRIQUE : ARGININE : EAU (1:1:7 MOL) <sup>[103]</sup> .....	46
FIGURE I.19 CLASSIFICATION DES GELS SELON LA NATURE DE LA PHASE CONTINUE, INSPIRE DE MARR <i>ET AL.</i> <sup>[108]</sup> .....	49
FIGURE I.20 PROFILS THEORIQUES D'EVOLUTION DES MODULES $G'$ (STOCKAGE) ET $G''$ (PERTE) ATTENDUS LORS D'UN BALAYAGE EN FREQUENCE POUR (A) UN RESEAU POLYMERE ENCHEVETRE EN SOLUTION DANS UN SOLVANT ET (B) UN RESEAU RETICULE PAR DES LIAISONS COVALENTES (GEL CHIMIQUE) <sup>[115]</sup> .....	52
FIGURE I.21 CLASSIFICATION DES HYDROGELS BASEE SUR LEURS PROPRIETES ET LEURS APPLICATIONS, PROPOSEE PAR ULLAH <i>ET AL.</i> <sup>[118]</sup> .....	53
FIGURE I.22 STRUCTURES CHIMIQUES DES DIFFERENTS GELIFIANTS DECRITS POUR L'OBTENTION DE MATERIAUX IONIQUES A BASE DE SOLVANTS EUTECTIQUES D'APRES LA REVUE DE TOME ET MECERREYES <sup>[128]</sup> .....	56
FIGURE I.23 POLYMERISATION PHOTO-INDUITE DE L'ACIDE ACRYLIQUE DANS UN MELANGE CHCL:UREE (1:2 MOL) <sup>[129]</sup> .....	57
FIGURE I.24 STRATEGIES DE SYNTHESE POUR LA PREPARATION DE MATERIAUX FLEXIBLES BIOSOURCES A BASE DE POLYMERES ET CONTENANT DES SOLVANTS EUTECTIQUES <sup>[130]</sup> .....	58
FIGURE I.25 MESURES DE DEFORMATION (A) ET BALAYAGE EN FREQUENCE (B) EFFECTUEES SUR L'EUTECTOGEL D'ISOLEUCINE A 3% (M/M) DANS UN MELANGE CHCL:ACIDE PHENYLACETIQUE (1:2 MOL) <sup>[131]</sup> .....	59
FIGURE I.26 OBSERVATIONS POM DE GELS OBTENUS DANS CHCL:ACIDE PHENYLACETIQUE (1:2 MOL) APRES AJOUT DE 3% (M/M) DE TRYPTOPHANE (A ET B) OU D'ISOLEUCINE (C ET D) <sup>[131]</sup> .....	60
FIGURE I.27 STRUCTURES DES ACIDES AMINES ET DES COMPOSANTS DES SYSTEMES LTTM AINSI QUE LES RESULTATS DU SCREENING REALISE POUR L'OBTENTION D'EUTECTOGELS. ADAPTEE DE SAAVEDRA <i>ET AL.</i> <sup>[132]</sup> .....	61
FIGURE I.28 MESURES EN DEFORMATION (A) ET BALAYAGE EN FREQUENCE (B) EFFECTUEES SUR L'EUTECTOGEL DE L-PROLINE A 3% (M/M) DANS UN MELANGE CHCL:UREE (1:2 MOL) <sup>[132]</sup> .....	62
FIGURE I.29 ILLUSTRATION DU POSSIBLE MECANISME DE GELIFICATION D'UN MELANGE CHCL :UREE PAR UN AMINO-AMIDE ALKYLE : LE C18AA <sup>[133]</sup> .....	62
FIGURE I.30 A) COURBES DE CONTRAINTE-DEFORMATION DES DIFFERENTS GELS DE GELATINE (22% M/M) OBTENUS PAR DES ESSAIS DE TRACTION. B) VALEURS DE LA TENACITE DES GELS ETUDIES <sup>[134]</sup> .....	63
FIGURE I.31 GRAPHICAL ABSTRACT RESUMANT L'OBTENTION ET LA CARACTERISATION DE MATERIAUX A PARTIR DE GOMME DE GUAR ET DE MELANGES LTTM <sup>[135]</sup> .....	65
FIGURE I.32 EFFETS DE L'AJOUT D'EAU ET DE LA CONCENTRATION EN GOMME DE XANTHANE SUR LA FORMATION DE GELS DE CHCL / XYLITOL (1:1 MOL) <sup>[136]</sup> .....	66
FIGURE I.33 PROPRIETES RHEOLOGIQUES DE GELS DE XANTHANE OBTENUS DANS DIFFERENTS NALTTM : CHCL:GLYCEROL, CHCL:ACIDE CITRIQUE, CHCL:XYLITOL, CHCL:SORBITOL. (A) COURBES D'ECOULEMENTS ET (B) BALAYAGES EN FREQUENCE. ADAPTEE DE ZENG <i>ET AL.</i> <sup>[136]</sup> .....	66
FIGURE I.34 CLICHES MEB DE GELS DE GOMME XANTHANE (10% M/M) OBTENUS DANS DIFFERENTS NALTTM : (A) CHCL:GLYCEROL, (B) CHCL:ACIDE CITRIQUE, (C) CHCL:XYLITOL, ET (D) CHCL:SORBITOL <sup>[136]</sup> .....	67
FIGURE I.35 DEPENDANCE DES MODULES EN FONCTION DE LA FREQUENCE (A) ET DE LA TEMPERATURE (B) POUR DES GELS DE XANTHANE OBTENUS DANS L'EAU (100%) ET DANS DES MELANGES TERNAIRES CHCL:XYLITOL:EAU 1:1MOL + DIFFERENTS POURCENTAGES MASSIQUES D'EAU (DE 0 A 80%) <sup>[137]</sup> .....	68
FIGURE I.36 PROTOCOLE DE PREPARATION DECRIT DANS LES TRAVAUX DE TIAN <i>ET AL.</i> <sup>[138]</sup> POUR L'OBTENTION DE FILMS D'EUTECTOGELS COMPOSES DE <i>NALTTM</i> ET D'ALGINATE DE SODIUM .....	69
FIGURE I.37 EPAISSEUR (A), MICROSTRUCTURE (B) ET INFORMATIONS ELEMENTAIRES (C) DES EUTECTOGELS A BASE DE NALTTM OBTENUS PAR TIAN <i>ET AL.</i> <sup>[138]</sup> .....	70

## Annexe I

Tableau récapitulatif des *NaLTTM* dont les  $T_g$  sont reportées dans la littérature (1/3)

	Hydrogen Bond Acceptor (HBA)	Hydrogen Bond Donor (HBD)	Third Compound	molar ratio	$T_g$ (°C)	Reference
1	choline lactate	urea	/	1:2	-51.55	Hoppe <i>et al.</i> 2022 <sup>[44]</sup>
2	choline lactate	glycerol	/	1:2	-52.93	
3	choline lactate	ethylene glycol	/	1:2	nr	
4	choline lactate	urea	glycerol	1:1:1	-66.62	
5	choline lactate	urea	ethylene glycol	1:1:1	-73.04	
6	choline lactate	glycerol	ethylene glycol	1:1:1	nr	
7	choline chloride	sesamol	/	1:3	-71	Gallo <i>et al.</i> 2021 <sup>[45]</sup>
8	fructose	glycerol	water	2:2:1	-43	Caprin <i>et al.</i> 2021 <sup>[46]</sup>
9	fructose	glycerol	water	1:1:1.5	-58	
10	fructose	glycerol	water	1:1:2	-64	
11	fructose	glycerol	water	1:1:3	-71	
12	fructose	glycerol	water	1:1:4	-78	
13	fructose	glycerol	water	1:1:5	-84	
14	fructose	glycerol	water	1:1:6	-89	
15	fructose	glycerol	water	1:1:7	-91	
16	glycerol	sorbitol	/	2:1	-62	Roda <i>et al.</i> 2021 <sup>[47]</sup>
17	sorbitol	malic acid	water	1:1:3	-55.9	Boyko <i>et al.</i> 2020 <sup>[48]</sup>
18	L-menthol	thymol	/	1:1	-56	Alhadid <i>et al.</i> 2020 <sup>[49]</sup>
19	L-menthol	carvacrol	/	1:1	-57	
20	DL-menthol	thymol	/	1:1	-54	Mat Hussin <i>et al.</i> 2020 <sup>[50]</sup>
21	DL-menthol	sesamol	/	1:1	-51	
22	DL-menthol	3-hydroxy benzoic acid	/	7:1	-41	
23	betaine	L-lactic acid	/	1:2	-63.15	Sanchez <i>et al.</i> 2019 <sup>[51]</sup>
24	betaine	L-lactic acid	/	1:5	-73.15	
25	betaine	L-lactic acid	water	1:1:1	-68.15	
26	betaine	levulinic acid	/	1:2	-61.15	
27	betaine	citric acid	water	2:1:6	-65.15	
28	proline	levulinic acid	/	1:2	-63.15	
29	proline	lactic acid	/	1:1	-49.15	
30	choline chloride	acetylsalicylic acid	/	1:2	-37	Tomai <i>et al.</i> 2019 <sup>[52]</sup>
31	fructose	glycerol	/	1:2	-55.7	Zdanowicz <i>et al.</i> 2019 <sup>[53]</sup>
32	fructose	glycerol	/	1:3	-62.9	
33	fructose	glycerol	/	1:4	-68.2	
34	fructose	glycerol	/	1:5	-69.9	
35	fructose	glycerol	/	1:6	-72.5	
36	glucose	glycerol	/	1:3	-64.0	
37	glucose	glycerol	/	1:4	-68.5	
38	glucose	glycerol	/	1:5	-67.0	
39	glucose	glycerol	/	1:6	-68.9	
40	sucrose	glycerol	/	1:6	-67.4	
41	choline chloride	urea	/	1:2	-62	Depoorter <i>et al.</i> 2019 <sup>[134]</sup>
42	choline chloride	citric acid	/	1:1	-30.0	
43	choline chloride	oxalic acid	/	1:1	-45.0	
44	choline chloride	galactose	/	1:1	-39.0	
45	choline chloride	fructose	/	1:2	-42.0	
46	choline chloride	isosorbide	/	1:2	-54.0	
47	choline chloride	sorbitol	/	1:2	-28.0	
48	choline chloride	maltitol	/	1:1	15.0	

Tableau récapitulatif des NaLTTM dont les  $T_g$  sont reportées dans la littérature (2/3)

	Hydrogen Bond Acceptor (HBA)	Hydrogen Bond Donor (HBD)	Third Compound	molar ratio	$T_g$ (°C)	Référence
49	malic acid	proline	/	3:1	-8	van den Bruinhorst <i>et al.</i> 2018 <sup>[24]</sup>
50	malic acid	proline	/	2:1	-10	
51	malic acid	proline	/	1:1	-5	
52	malic acid	proline	/	1:2	-5	
53	malic acid	proline	/	1:3	-8	
54	glycolic acid	proline	/	3:1	-46	
55	glycolic acid	proline	/	2:1	-40	
56	glycolic acid	proline	/	1:1	-31	
57	malic acid	sucrose	water	1:3:2	-55	Yiin <i>et al.</i> 2018 <sup>[54]</sup>
58	malic acid	sucrose	water	2:4:2	-55	
59	malic acid	sucrose	water	2:4:3	-68	
60	citric acid	sucrose	water	1:1 + 16 wt%	-44.88	Savi <i>et al.</i> 2018 <sup>[63]</sup>
61	citric acid	sucrose	water	1:2 + 16 wt%	-42.45	
62	citric acid	sucrose	water	1:3 + 16 wt%	-39.68	
63	citric acid	sucrose	water	1:1 + 20 wt%	-48.25	
64	citric acid	sucrose	water	1:2 + 20 wt%	-45.95	
65	citric acid	sucrose	water	1:3 + 20 wt%	-44.56	
66	citric acid	sucrose	water	1:1 + 30 wt%	-72.17	
67	citric acid	sucrose	water	1:2 + 30 wt%	-70.39	
68	citric acid	sucrose	water	1:3 + 30 wt%	-68.56	
69	malic acid	sucrose	water	1:1:10	-43	Yiin <i>et al.</i> 2016 <sup>[55]</sup>
70	malic acid	sucrose	water	1:3:10	-53	
71	choline chloride	urea	/	1:2	-75.55	Chemat <i>et al.</i> 2016 <sup>[30]</sup>
72	choline chloride	urea	arginine	1:2:0.05	-62.67	
73	choline chloride	urea	arginine	1:2:0.10	-59.22	
74	choline chloride	urea	arginine	1:2:0.15	-59.11	
75	choline chloride	urea	arginine	1:2:0.20	-54.42	
76	betaine	urea	/	1:1	-49	Zeng <i>et al.</i> 2016 <sup>[56]</sup>
77	betaine	urea	/	1:1.5	-51.1	
78	betaine	urea	/	1:2	-48.5	
79	betaine	urea	/	1:2.5	-40.6	
80	choline chloride	glucose	/	1:1	-28.4	Craveiro <i>et al.</i> 2016 <sup>[57]</sup>
81	choline chloride	citric acid	/	1:1	-21.4	
82	choline chloride	sucrose	/	4:1	-42	
83	choline chloride	sucrose	/	1:1	-15.8	
84	choline chloride	tartaric acid	/	2:1	-41.6	
85	choline chloride	xylose	/	3:1	-46.4	
86	choline chloride	xylose	/	2:1	-51.2	
87	citric acid	sucrose	/	1:1	-14	
88	citric acid	glucose	/	1:1	9.8 / 48.7	
89	glucose	tartaric acid	/	1:1	-18.3	
90	choline chloride	xylose	water	2:1 + 2.2 wt%	-58.5	
91	choline chloride	xylose	water	2:1 + 3.8 wt%	-59.1	
92	choline chloride	xylose	water	2:1 + 5.0 wt%	-61.3	

Tableau récapitulatif des NaLTTM dont les  $T_g$  sont reportées dans la littérature (3/3)

	Hydrogen Bond Acceptor (HBA)	Hydrogen Bond Donor (HBD)	Third Compound	molar ratio	$T_g$ (°C)	Référence
93	tetramethylammonium chloride	L-lactic acid	/	1:2	-69	Zubeir <i>et al.</i> 2014 <sup>[58]</sup>
94	tetraethylammonium chloride	L-lactic acid	/	1:2	-71	
95	tetrabutylammonium chloride	L-lactic acid	/	1:2	-66	
96	Potassium carbonate	glycerol	/	1:3.5	-38	Nasser <i>et al.</i> 2013 <sup>[59]</sup>
97	Potassium carbonate	glycerol	/	1:50	-78.54	
98	choline chloride	malic acid	water	1:1:2	-71.32	Dai <i>et al.</i> 2013 <sup>[36]</sup>
99	choline chloride	glycerol	water	1:2:1	-101.59	
100	$\beta$ -alanine	malic acid	water	1:1:3	-70.88	
101	proline	malic acid	water	1:1:3	-61.29	
102	choline chloride	fructose	water	5:2:5	-84.58	
103	choline chloride	xylose	water	2:1:2	-81.8	
104	choline chloride	sucrose	water	4:1:4	-82.96	
105	choline chloride	glucose	water	5:2:5	-83.96	
106	choline chloride	1,2-propanediol	water	1:1:1	-109.55	
107	lactic acid	glucose	water	5:1:3	-77.06	
108	choline chloride	sorbitol	water	5:2:6	-89.62	
109	choline chloride	xylitol	water	2:1:3	-93.33	Gonzales <i>et al.</i> 2013 <sup>[60]</sup>
110	fructose + glucose	sucrose	water	1:1:1:11	-50.77	
111	choline chloride	lactic acid	/	1:2	-77.7	Francisco <i>et al.</i> 2012 <sup>[61]</sup> Francisco <i>et al.</i> 2013a <sup>[15]</sup> Francisco <i>et al.</i> 2013b <sup>[62]</sup>
112	choline chloride	glycerol	/	1:2	-96.5	
113	alanine	lactic acid	/	1:9	-59.31	
114	betaine	lactic acid	/	1:2	-46.86	
115	choline chloride	lactic acid	/	1:1.3	-76.75	
116	choline chloride	lactic acid	/	1:2	-77.73	
117	choline chloride	lactic acid	/	1:5	-69.23	
118	choline chloride	lactic acid	/	1:10	-66.3	
119	choline chloride	lactic acid	/	1:15	-67.15	
120	glycine	lactic acid	/	1:9	-54.51	
121	histidine	lactic acid	/	1:9	-39.22	
122	proline	lactic acid	/	1:2	-36.69	
123	alanine	malic acid	/	1:1	-42.64	
124	betaine	malic acid	/	1:1	-20.01	
125	choline chloride	malic acid	/	1:1	-56.48	
126	glycine	malic acid	/	1:1	-34.08	
127	proline	malic acid	/	1:1	-13.64	
128	proline	malic acid	/	2:1	-15.51	
129	proline	malic acid	/	3:1	-44.38	
130	histidine	malic acid	/	1:2	nr	
131	nicotinic acid	malic acid	/	1:9	nr	
132	betaine	oxalic acid dihydrate	/	1:1	-17.19	
133	proline	oxalic acid dihydrate	/	1:1	-42.91	
134	choline chloride	oxalic acid dihydrate	/	1:1	-40.17	
135	glycine	oxalic acid dihydrate	/	1:3	nr	
136	nicotinic acid	oxalic acid dihydrate	/	1:9	nr	
137	histidine	oxalic acid dihydrate	/	1:9	nr	
138	choline chloride	oxalic acid anhydrous	/	1:1	-46.06	
139	proline	oxalic acid anhydrous	/	1:1	-14.45	

# Annexe II

Résultats de l'interrogation SciFinder<sup>n</sup> réalisée le 19/08/2022 à partir du terme eutectogel

année	auteurs	Journal	DES	gélator	gélation mechanism	applications
2022	Kalqi et al.	Chemical Engineering Journal	ChCl:urea (1:2 mol) ChCl:glycerol (1:2 mol) ChCl:ethylene glycol (1:2 mol) ChCl:1,3-propanediol (1:2 mol)	1-vinylindazole (monomer) N,N'-methylene bisacrylamide (crosslinker) Irgacure 2559 (initiator)	UV induced polymerization	sensors with adhesive properties on human skin, highly stretchable and self-healing
2022	Xiao et al.	Food Hydrocolloids	ChCl:diethylene glycol (1:3 mol)	Review suggesting the use of durian seed gum to obtain eutectogel	heating and cooling	food coating
2022	Marin et al.	Journal of molecular liquids	ChCl based DES with urea, ethylene glycol, glycerol, 1,4 butanediol, glucose, malonic acid	Acrylic acid (monomer) + tetrahydrofuran N-oxide	UV induced polymerization	adhesive removal from apollo solvents
2022	Kalqi et al.	Chemical Engineering Journal	ChCl:urea (1:2 mol) ChCl:glycerol (1:2 mol) ChCl:1,3-propanediol (1:2 mol) ChCl:1,3-propanediol (1:2 mol)	halogenated 1,3,2,4-dibenzylidene-D-sorbitol (X-DBS)	UV induced polymerization mixing at critical gel concentration	self-healing supramolecular eutectogels with multiple potential uses (irreversibility, steel-steel lubrication, dye absorption, etc.)
2022	Tian et al.	Food Hydrocolloids	polyine:glucose (6:3 mol) + 20wt% water polyine:glucose (1:1 mol) + 20wt% water polyine:sorbitol (1:1 mol) + 20wt% water ChCl:urea (1:2 mol)	sodium alginate + CaCl <sub>2</sub> acrylamide persulfate (initiator)	1. heating and mixing of DES + alginate 2. cooling + drying (12h at 30°C) 3. crosslinking with CaCl <sub>2</sub>	anti-freezing materials for food industry
2022	Feng et al.	Nano Energy	ChCl:urea (1:2 mol)	Acrylic acid (monomer) + ammonium persulfate (initiator)	dual catalytic reaction	flexible sensor for monitoring human movements
2022	Hou et al.	Advanced energy materials	UTFSI + acetamide + water	poly acrylamide + carboxymethyl cellulose	1. preparation of GMAC-PAM hydrogels 2. drying 3. immersion in the DES	high safety flexible electronic devices
2022	Chen et al.	ACS applied Polymer materials	ChCl:urea (1:2 mol)	poly(vinyl alcohol) + gelatin	? PUBLI non disponible	wearable electronic devices
2022	Cheng et al.	ACS nano	Zn(OAc) <sub>2</sub> + acrylamide + water	poly(vinyl alcohol)	? PUBLI non disponible	pliable high energy storing devices
2022	Wu et al.	ACS applied energy materials	LiCl + ethylene glycol	poly(vinyl alcohol)	? PUBLI non disponible	flexible sensor devices
2022	Wang et al.	ACS applied Polymer materials	ZnCl <sub>2</sub> + ethylene glycol	lignin sulfonated + gelatin	heating and cooling	3D-Printable Wearable Sensors and Bioelectrodes
2022	Picchio et al.	Advanced materials technologies	ChCl:glycerol (1:2 mol)	poly(vinyl alcohol)	1. preparation of PVA hydrogel 2. drying 3. immersion in the DES	soft electronic devices
2022	Zhang et al.	Advanced functional materials	ChCl:glycerol (1:2 mol)	cyanoethyl cellulose	mixing	electrolyte for batteries
2022	Zhang et al.	Carbon energy	UTFSI + succinonitrile	diastereomeric water-soluble polypyrrolidene	mixing + drop casting	ionic thermoelectric capacitors
2022	Zhao et al.	Journal of Materials Chemistry A	ChCl:ethylene glycol (1:2 mol)	2 benzene 1,3,5-tricarboxamide (6TA) derivative (substituted by three hexanoic acid)	? PUBLI non disponible	high-strength supramolecular adhesives
2022	Zhang et al.	Materials horizons	? PUBLI non disponible	alkyl trimethyl ammonium bromide	? PUBLI non disponible	self-healing conductive material
2022	Liang et al.	Materials horizons	? PUBLI non disponible	D-gluconic acetal bearing silyl amine with different alkyl chain lengths	heating and cooling	wearable electronics and soft robotics
2021	Zhang et al.	Chemical Engineering Journal	ChCl based DES with urea, monoethylene glycol, mono propylene glycol, glycerol, 1,3-propanediol	poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid)	UV induced polymerization	wearable self-adhesive strain sensors
2021	Wang et al.	ACS applied materials and interfaces	ChCl:ethylene glycol (1:2 mol) ChCl:ethylene glycerol (1:2 mol) ChCl:1,3-propanediol (1:2 mol) ChCl:propylene glycol (1:2 mol)	(R)-12-hydroxyoctanoic acid hydrazide (HSAH) + poly(N-vinylcarbazole-male) (PHEAA)	heating and cooling + UV induced polymerization	energy storage applications
2021	Ma et al.	Biomacromolecules	ChCl:urea/glycerol	lignin with poly(ethylene glycol)diglycidyl ether (PEGEDE)	? PUBLI non disponible	solid electrolytes
2021	Li et al.	Materials Chemistry and Physics	UTFSI + N-methylacetamide	Poly (Vinylidene fluoride-hexafluoro-isopropylene) (PVDF-HFP)	mixing in DMF + casting + drying	soft robotics, wearable and implantable devices, artificial skin, edible materials, remote sensing, and substrates for photo- and electrochromic, (mechano)plasmonic, photonic and tribological devices
2021	Mota-Morales et al.	Matter	Review focusing on the use of deep eutectic solvents for the next generation of bio-based flexible devices			
2021	Wang et al.	ACS applied materials and interfaces	ChCl:glycerol (1:2 mol)	waterborne poly(urethane (MPU) and tannic acid (TA)	mixing + casting + drying	strain sensors and biopotential electrodes for precise health monitoring
2021	Wang et al.	Materials horizons	? PUBLI non disponible	? PUBLI non disponible	? PUBLI non disponible	soft electronic devices
2021	Saavedra et al.	Green Chemistry	? PUBLI non disponible	Amino acids	heating and cooling	sustainable reaction media for catalysis
2021	Mathew et al.	Physical Chemistry Chemical Physics	ChCl:glycerol (1:2 mol)	Protonated sodium dodecyl sulfate	heating and cooling	self-assembling fractal dendrites
2021	Mathew et al.	Physical Chemistry Chemical Physics	ChCl:glycerol (1:2 mol)	? PUBLI non disponible	? PUBLI non disponible	lithium-ion sensitive soft materials
2020	Sun et al.	Soft matter	ChCl based DES with urea, glycerol	guanosine + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + KOH	heating and cooling	flexible electrochromic device
2020	Gui et al.	Angewandte Chemie	ChCl:monopropylene glycol (1:2 mol)	bacterial cellulose	1. preparation of organogel 2. immersion in the DES 3. drying	solid electrolytes
2020	Smith et al.	Journal of Physical Chemistry B	ChCl:glycerol (1:2 mol)	? PUBLI non disponible	heating and cooling	water treatment (plankton absorption)
2020	Joos et al.	Chemistry of materials	? PUBLI non disponible	? PUBLI non disponible	heating and cooling	biodegradable and thermostable eutectogel
2020	Marin et al.	ChemPhysChem	ChCl:β/phenylacetic acid 1 - 2	l-arginine acids	addition of water and heating and cooling	biodegradable and thermostable eutectogel
2020	Zeng et al.	RSC Advances	ChCl based DES with glycerol, sorbitol, xylitol, citric acid	xanthan gum	addition of water and heating and cooling	energy and catalysis
2020	Xia et al.	Molecules	ChCl:xylitol (1:1 mol)	xanthan gum	addition of water and heating and cooling	solid electrolytes
2019	Riz-Olives et al.	Angewandte Chemie	ChCl:monopropylene glycol (1:2 mol)	1,3,2,4-dibenzylidene-D-sorbitol (DBS)	mixing	energy and catalysis
2018	Joos et al.	Chemistry of materials	UTFSI + N-methylacetamide (1:4)	tetraethyorthosilicate and formic acid	mixing + casting + drying	solid electrolytes

# Chapitre II : Caractérisation de *NaLTTM* et rôle essentiel de l'eau

---

## Table des matières

CHAPITRE II : CARACTERISATION DE NALTTM ET ROLE ESSENTIEL DE L'EAU .....	85
II.1 CONTEXTE ET ENJEUX.....	86
II.2 SCRUTINY OF THE SUPRAMOLECULAR STRUCTURE OF BIO-SOURCED FRUCTOSE / GLYCEROL / WATER TERNARY MIXTURES: TOWARDS GREEN LOW TRANSITION TEMPERATURE MIXTURES.....	87
II.2.1 Introduction .....	87
II.2.2 Experimental section.....	89
II.2.2.1 Materials .....	89
II.2.2.2 Mixtures preparation .....	89
II.2.2.3 X-Ray diffractometry (XRD) .....	89
II.2.2.4 Thermal characterization.....	90
II.2.2.5 Rheological measurements .....	90
II.2.2.6 NMR spectroscopy .....	90
II.2.3 Results and Discussion .....	91
II.2.4 Conclusion.....	102
II.2.5 Acknowledgements.....	103
II.2.6 Supporting information.....	103
II.2.7 Citations.....	108
II.2.8 Perspectives .....	108
II.3 CARACTERISATION D'UN SECOND SYSTEME : BPE115 .....	109
II.3.1 Contexte et enjeux.....	109
II.3.2 Premiers résultats et discussion.....	109
II.4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	116
II.5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	117
II.6 LISTE DES FIGURES .....	120



## II.1 Contexte et enjeux

Le chapitre I a mis en évidence que les propriétés applicatives des mélanges *NaLTTM* sont étroitement liées aux mécanismes d'association de leurs molécules constitutives. En particulier, lorsqu'ils contiennent de l'eau, celle-ci joue un rôle prépondérant dans les propriétés physico-chimiques du mélange et dans les associations mises en œuvre. Parmi les mélanges développés par Gattefossé pour l'obtention d'extraits végétaux, le mélange Fructose / Glycérol / Eau en proportion molaire 1:1:5 (FGE115) est le plus utilisé industriellement. En effet, ce mélange possède des propriétés physico-chimiques (densité, viscosité, polarité) compatibles avec son utilisation industrielle en tant que solvant d'extraction. De plus, il s'agit d'un mélange composé de molécules agrosourcées et inoffensives pour l'Homme et l'environnement. Ce mélange FGE115 a été retenu afin d'établir une méthodologie de caractérisation qui pourra être appliquée à d'autres mélanges *NaLTTM* par la suite. Les résultats de ces travaux de recherche ont été publiés dans « *Journal of Molecular Liquids* » en 2021 et sont présentés sous ce format dans la première partie de ce chapitre II. Ces travaux dédiés à la caractérisation de mélanges composés de fructose (F), de glycérol (G) et d'eau (E) répondent à trois objectifs principaux :

- i) Identifier les proportions relatives de chaque composant qui permettent d'obtenir une phase liquide homogène et macroscopiquement stable pendant 12 mois,
- ii) Etudier l'impact de la quantité d'eau sur les principales propriétés physico-chimiques de ces mélanges FGE comme la température de transition vitreuse ( $T_g$ ), la viscosité ( $\eta$ ) et l'énergie d'activation ( $E_a$ ) associée,
- iii) Etudier l'impact de la quantité d'eau sur l'organisation des constituants à l'échelle moléculaire (proximité spatiale et mobilité translationnelle).

La réalisation de ces objectifs permettra de proposer un mécanisme d'association basé sur la corrélation entre les paramètres physico-chimiques mesurés à l'échelle macroscopique et les observations réalisées à l'échelle moléculaire.

Dans la seconde partie du chapitre II, la même stratégie sera initiée pour identifier les systèmes composés de bétaïne, de propanediol et d'eau ayant les caractéristiques de *NaLTTM*. Cela permettra de valider partiellement la méthodologie suivie avec un autre mélange et d'identifier des perspectives pour la caractérisation d'autres systèmes *NaLTTM*.

## II.2 Scrutiny of the supramolecular structure of bio-sourced Fructose / Glycerol / Water ternary mixtures: towards green low transition temperature mixtures

### II.2.1 Introduction

Deep Eutectic Solvents (DES) <sup>[1]</sup> and Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) <sup>[2]</sup> belong to the family of Low Transition Temperature Mixtures (LTTM) <sup>[3]</sup>. These neoteric and appealing classes of solvents generally meet several criteria of green chemistry (eco-friendly, simple and cheap preparation, potential bio-sourced origin, innocuousness, possible biodegradability and biocompatibility). Mostly, these solvents are binary mixtures composed of H-bonded molecular species which lead to one liquid phase exhibiting a low melting point or a low glass transition temperature due to the formation of strong and multiple interactions between the molecules <sup>[4]</sup>. As a consequence of their attractive features as well as the huge library of available raw precursors, LTTM, DES and NaDES have been utilized in a wide range of green chemical technologies such as analytical chemistry <sup>[5]</sup>, biodiesel production <sup>[6]</sup>, radical polymerization and polycondensation <sup>[7]</sup>, metal processing <sup>[8]</sup>, extraction of natural resources <sup>[9]</sup> among other. The most used hydrogen bond acceptor (HBA) is undoubtedly choline chloride (ChCl), notably due to its low cost, safe character, biodegradability, and biocompatibility <sup>[10]</sup>. This salt has been associated with various hydrogen bond donors (HBD), such as urea derivatives, carboxylic acids and alcohols <sup>[11]</sup> and the resulting solvents have been well characterized. For instance, the structural organization of choline chloride/urea (ChCl:Urea 1:2mol) DES was elucidated thanks to NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, NOESY, ROESY) and neutron diffraction techniques <sup>[12]</sup>. Although it is a less reported technique, <sup>1</sup>H pulse field gradient (PFG) NMR spectroscopy was employed to examine the self-diffusion in aqueous mixtures of ChCl-based DES <sup>[13]</sup>. While gaining interests in wide applicative fields such as food, materials, pharmaceutical or cosmetic, the high viscosity of some DES or NaDES, is often detrimental for a further industrial implementation. To overcome this drawback, ternary mixtures including additional water were envisaged to decrease viscosity. The presence of water in H-bonds mediated solvents is undeniably impactful on the internal organization, as shown for instance for ChCl:Urea diluted with deuterated water <sup>[14]</sup>. The authors evidenced by NMR spectroscopy that the dilution with D<sub>2</sub>O progressively disrupted the H-bonded supramolecular network until an aqueous solution was obtained. The observation of two domains for sound propagation depending on water was additionally demonstrated by Brillouin spectroscopy <sup>[15]</sup>.

A gradual H-bond dissociation was also highlighted by Dai *et al.* for a ternary mixture of 1,2-propanediol/choline chloride/water (1:1:1 mol) upon dilution with D<sub>2</sub>O by means of spectroscopic techniques (NOESY NMR and FT-IR). Additionally, a significant change of physical properties such as viscosity, polarity and water activity was emphasized indicating a causal relationship between the molecular structure and the macroscopical features [16]. More recently, NOESY and PFG-NMR analysis were concomitantly exploited to reveal the role of water within the supramolecular structure of ChCl-based ternary blends [17]; [18]. The authors suggested that the mixture xylitol/choline chloride/water (1:2:3 mol) behaved as a supramolecular structure with an involvement of water in the H-bonded network. Very recently, Roda *et al.* studied the effect of water in ternary mixtures composed of citric acid, L-arginine and water through phase equilibria studies and spectroscopic analysis, and they stated that water plays a crucial bifunctional role in the liquefaction of the mixture [19]. Among precursors available to generate NaDES or LTTM, glycerol and fructose are particularly relevant, since both are renewable, safe, low cost compounds and suitable non-ionic H-bond interacting building blocks, which paves the way for the development of eco-designed solvents complying with the principles of green chemistry [20]; [21]. Fructose and glycerol have intensively been employed separately as HBD to interact with ammonium chloride salts, amino acids, urea, organic acids, sugars or polyols, as recently reviewed [22]. However, the concurrent use of fructose with glycerol, in the same (binary or ternary) mixture, remains scarcely described. Jeong and co-workers reported one combination of glycerol and fructose (3:1 mol) among 26 different types of DES leading to stable liquids at room temperature. After a dilution with 30 wt% of water, the resulting ternary mixture was employed as an extraction solvent for catechins from green tea, but the extraction efficiency was shown to be limited [23]. Zdanowicz *et al.* evaluated the potential of binary mixtures of glycerol and fructose (from 2:1 to 6:1 mol) to be used as potato starch plasticizers [24]. The authors named those mixtures as LTTM since they exhibit a low *T<sub>g</sub>*. Nevertheless, those glycerol/fructose-based mixtures were mainly considered for applicative uses, and their characterization mostly concerned their thermal features, viscosity and polarity, with no insights on the understanding of organization at the molecular level. In a recent patent, we evidenced that the use of fructose (F), glycerol (G) and water (W) ternary blend with a given molar composition of FGW (1:1:5 mol) acts as an efficient green solvent for plant extraction allowing the access to novel actives for cosmetic field [25]. Additionally, from exploratory analysis reported in a recent article, we proved the potential of NOESY experiments to examine the molecular organization of FGW mixtures. However, this first investigation explored only two compositions of FGW mixtures and needs to be completed [26]. Herein, the objective is thus to gain insights into the internal molecular organization of a large panel of FGW mixtures in order to establish the relationship between their micro and macroscopical features.

For this purpose, we first present the preparation of a library of FGW mixtures differing in their compositions, thus allowing for drawing a ternary diagram based on their long-term stability. Then, thermal behavior and rheological properties are examined. Finally, intermolecular interactions and translational motions from NOESY and pulse field gradient NMR experiments respectively are evaluated through a particular focus on the effect of the water content and temperature. This comprehensive study, not reported so far in literature for such non-ionic, eco-designed and eco-friendly solvents, is expected to constitute the cornerstone for further innovative applications of FGW mixtures in green and sustainable chemical processes.

---

## II.2.2 Experimental section

---

### II.2.2.1 Materials

Fructose (white powder,  $M=180.16$  g/mol, purity > 99%) provided by Danisco and glycerol (viscous and colourless liquid at 25°C,  $M=92.09$  g/mol, purity > 99.5%) acquired from Oleon were used without any further purification. Deionized water (18 M $\Omega$ .cm) obtained from a Veolia Aquadem<sup>TM</sup> system was used as the third component.

---

### II.2.2.2 Mixtures preparation

Fructose, glycerol and water were weighted at different molar ratios and were introduced in a sealed glass bottle. The mixtures were heated at 50°C under magnetic stirring with mixing times ranging from 1 to 4 hours and then cooled down to 25°C. A fraction of each sample (15 mL) was stored for one year at 25°C under dark conditions in a sealed glass bottle of 15 mL for further visual inspections of macroscopic stability. The remaining fraction was used to perform all following characterizations within one month after the preparation. According to the molar content of each component, acronyms were used to identify such as-prepared mixtures. As a typical example, FGW113 refers to a mixture containing an equimolar ratio of fructose (F) and glycerol (G) in combination with 3 moles of water (W).

---

### II.2.2.3 X-Ray diffractometry (XRD)

The X-ray powder diffraction patterns were recorded by using a Bruker D8-Advance diffractometer equipped with a LynxEye XE detector. The X-ray tube was operated at 40 kV and 40 mA with CuK $\alpha$ -radiation ( $k=1.5406$  Å).

---

#### II.2.2.4 Thermal characterization

Differential Scanning Calorimetry (DSC) was carried out in a DSC-Q22 device (TA Instruments). Samples were placed in aluminium hermetic pans under nitrogen flow (50 mL/min) and submitted to three temperature cycles with a scan speed of 10°C/min: 1) from -140 up to 30°C; 2) from 30 down to -140°C; 3) again from -140 up to 30°C. The glass transition temperature ( $T_g$ ) was determined from the second heating ramp and the midpoint of the thermal transition was considered. The melting temperature ( $T_m$ ) value was collected from the first heating run. The reproducibility and repeatability of the analysis were assessed by measuring in triplicate the  $T_g$  of three different FGW115 samples.

---

#### II.2.2.5 Rheological measurements

The shear viscosity measurements of ternary blends were carried out on a DHR2 controlled stress rheometer (TA Instruments Inc., UK) operating in flow mode and using two different geometries according to the viscosity of the mixtures: *i*) an aluminium cone/plate geometry (diameter 60 mm, angle 2°, gap 2 µm) for viscosities higher than 2 Pa.s and *ii*) an aluminium concentric cylinders geometry (bob diameter x length : 28.03 x 42.11 mm, cup diameter 30.36 mm) for viscosities lower than 2 Pa.s. The temperature was precisely controlled by a high-power Peltier system. A particular care was taken in order to prevent evaporation during measurements at high temperature and to avoid the moisture absorption from atmosphere by using a homemade cover. The reproducibility and repeatability of the method were assessed by measuring in triplicate the viscosity of pure glycerol and three different FGW115 samples.

---

#### II.2.2.6 NMR spectroscopy

A Bruker ADVANCE III spectrometer operating at 400.1 MHz for  $^1\text{H}$  and 100.6 MHz for  $^{13}\text{C}$  observation and equipped with a BBFO+ probe was used to perform 1D and 2D-NOESY NMR experiments. The samples were analysed in 5 mm NMR tubes. A solution of 3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- $\text{d}_4$  acid sodium salt ( $\text{TSPd}_4$ ) in  $\text{D}_2\text{O}$  was used in a coaxial tube to lock the magnetic field of the spectrometer and set chemical shifts without diluting the sample.  $^1\text{H}$  NMR spectra were recorded with a 30° flip angle, 6.0 s recycle delay and 64 scans.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were acquired with a 70° flip angle, 4.4 s recycle delay and 512 scans. NOESY experiments were carried out using a phase sensitive gradient selected NOESY sequence (noesygpqh) with 512 increments (F1) and 4 scans for each increment. Mixing time was adjusted on FGW114 and FGW1110 mixtures and finally set to 500 ms as a standard value for all NOESY spectra recorded in this study. When NOESY were acquired

at different temperatures, a temperature equilibration delay of 1800 s was added before each acquisition. All 1D and 2D NMR experiments were processed with Topspin® software, 3.6.

Pulse Field Gradient (PFG) NMR experiments were carried out by using a 5 mm BBI probe equipped with a z-gradient coil delivering up to 258 G.cm<sup>-1</sup>. Experiments were recorded at 298K with a “ledbpgp” Bruker pulse sequence (stimulated echo sequence with bipolar gradient pulses). Gradients (SMSQ10.100) were linearly incremented in 40 steps with 8 scans, 32K data points, and a recycle time of 4.4 s for each spectrum. The gradient pulse length  $\delta$  and the diffusion delay  $\Delta$  were optimized for each sample to reach up to a 95% decay of the whole aliphatic signal intensity. Fourier transform was applied to the free induction decays with 2 Hz Lorentzian line-broadening and an automatic baseline correction routine was achieved using the Bruker Topspin® software. Diffusion coefficients were determined by using the Stejskal-Tanner (ST) equation (Eq.1) [27]; [28].

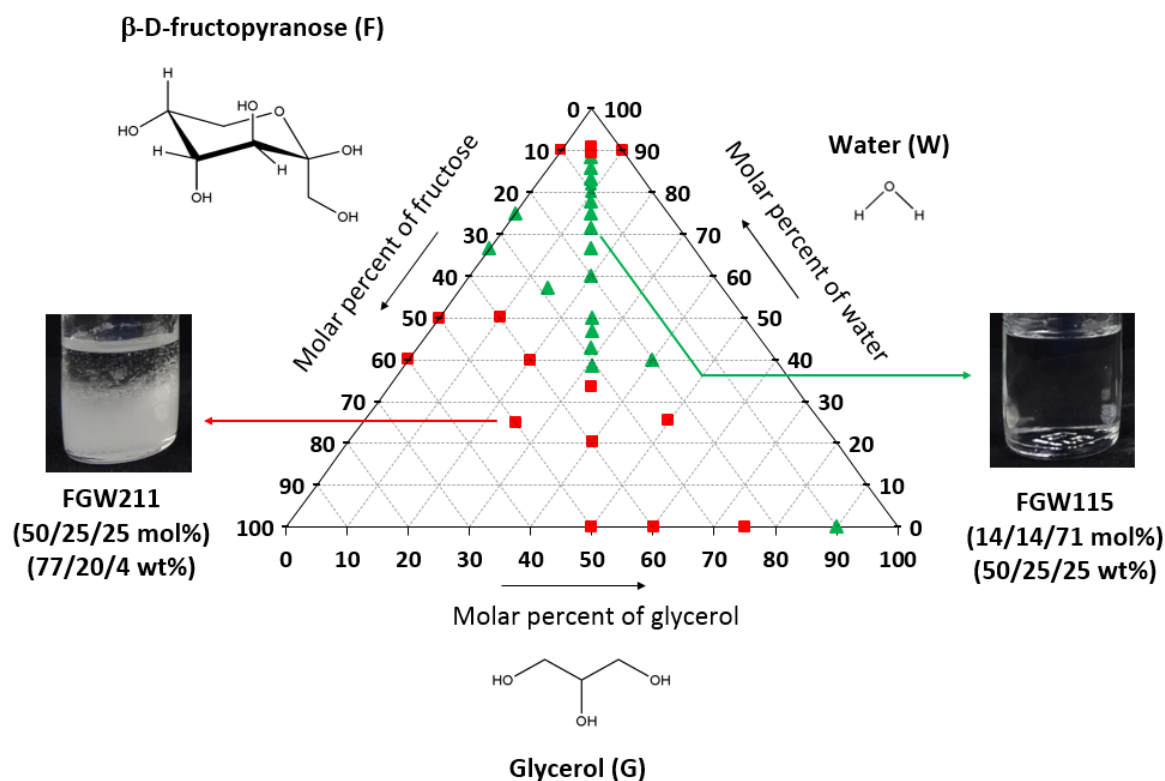
$$I = I_0 \cdot e^{-BD} \text{ with } B = (\gamma g \delta)^2 \left( \Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau}{2} \right) \text{ (Eq.1)}$$

Where  $I$  is the attenuated intensity of the selected signal,  $I_0$  the reference intensity of the same signal with 0% gradient,  $D$  the diffusion coefficient,  $\gamma$  the gyromagnetic ratio of the hydrogen nucleus,  $\delta$  the gradient pulse length,  $g$  the gradient strength,  $\Delta$  the diffusion delay and  $\tau$  the time between bipolar gradients. All the experimental signal area measurements and the fitting of the gathered Stejskal-Tanner curves were processed with Bruker Dynamics Center tool.

### II.2.3 Results and Discussion

A library of binary and ternary mixtures differing in their compositions of fructose (F,  $T_m = 103^\circ\text{C}$ ), glycerol (G,  $T_m = 18^\circ\text{C}$ ) and water (W) was first prepared. We applied the most reported procedure to prepare water-containing NaDES or LTTM systems consisting in heating and mixing the components in a sealed flask [29]. We used a low temperature of 50°C to prevent any degradation of fructose and mixing times ranging from 1 to 4 hours, depending on the mixture. The resulting mixtures were first optically inspected at 50°C, then subjected to a cooling step down to 25°C, and, finally stored for one year at 25°C under dark conditions for further visual inspections. As reported in literature, NaDES or LTTM ternary mixtures are generally directly employed after the preparation step and their long-term physical stability is very scarcely described [30].

However, the long-lasting stability of mixtures is a key and prerequisite criterion for a further industrial utilization. During and at the end of the storage period, the samples were optically examined, and a molar ternary diagram was designed based on these observations (Fig. 1). To the best of our knowledge, such phase diagram of ternary mixtures relied on the macroscopic appearance was not reported so far in literature.

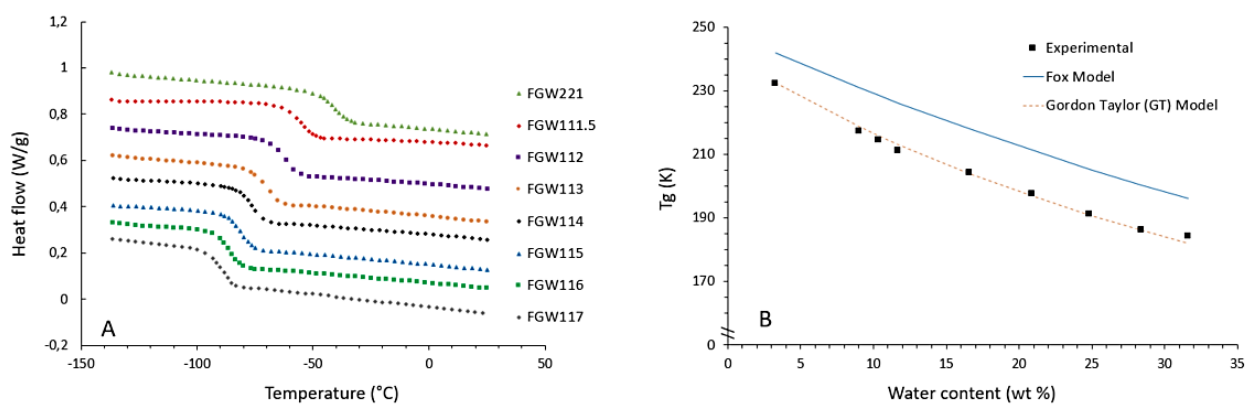


**Fig. 1 Ternary diagram based on molar contents of fructose (F), glycerol (G) and water (W) made from the visual inspection of mixtures after a storage for one year at 25°C. Red squares correspond to heterogeneous or instable systems (e.g. FGW211) while green triangles describe homogeneous single phase liquids (e.g. FGW115)**

From Fig. 1, it appears that as a function of the molar composition, two main categories of macroscopic behaviors emerge after the one-year storage step: *i*) heterogeneous mixtures composed of two macroscopically distinct phases (presence of crystals or bacteria) (red squares, as illustrated for FGW211 in Fig. 1) and *ii*) macroscopically homogeneous and transparent single liquid phase (green triangles, as shown for FGW115 in Fig. 1). Typical additional pictures are given in Fig. S11, showing the distinct macroscopic aspects observed after the storage period (homogeneous liquids, presence of crystals or bacterial growth). Fructose is poorly soluble in glycerol and an equimolar mixture of both (FG11) leads to a heterogeneous mixture at 50°C. The controlled introduction of water in this FG11 mixture favors the miscibility between all the components.

As a matter of fact, an equimolar ternary mixture, FGW111 (62/32/6 wt%), leads to a homogeneous liquid at 50°C. However, its stability does not exceed few weeks at 25°C. This damaging behavior was observed for five mixtures (namely FGW212, FGW111, FGW121, FGW221 and FG13), in which dispersed crystals progressively appeared with time within the liquid phase (Fig. SI1). These crystals collected in FGW111 were shown to be mainly composed of  $\beta$ -D-fructopyranose, as revealed by the X-ray diffraction pattern (Fig. SI2A). Long-term macroscopic stability of FGW ternary mixtures yielding to a homogeneous single liquid phase is obtained by increasing water content. This macroscopic description is supported by the XRD analysis of the FGW115 (50/25/25 wt%) mixture as its resulting pattern after one year of storage is typical of an amorphous liquid without presence of any fructose crystals (Fig. SI2B). However, within the following binary and ternary mixtures: FW19 (53/47 wt%), GW19 (36/64 wt%), FGW1120 (29/15/57 wt%) and FGW1130 (22/11/66 wt%), a macroscopic bacterial growth was detected after 3 months of storage (Fig. SI1). Finally, all the ternary mixtures involving an equimolar proportion of fructose and glycerol with less than 53 wt% of water; from FGW445 (61/31/8 wt%) up to FGW1117 (31/16/53 wt%) exhibit a long-lasting physical stability. These visual observations suggest that water plays a key role in the formation of stable ternary mixtures given its dual role as both H-bond donor and H-bond acceptor. At those given compositions, the interactions are strong enough to prevent any crystallization of fructose with time at 25°C without any visual bacterial growth despite the presence of water.

Thermal features of mixtures from FGW221 (64/33/3 wt%) to FGW1117 (31/16/53 wt%) were determined by differential scanning calorimetry (DSC). The thermograms of FGW mixtures containing a water content  $\leq 32$  wt% (*i.e.* FGW117) display a unique low glass transition temperature ( $T_g$ ) value, without other noticeable phase transitions (Fig. 2A).



**Fig. 2 (A) DSC thermograms of ternary mixtures from FGW221 to FGW117 (B) Evolution of experimental (■) and modelled  $T_g$  values as a function of weight water content. Continuous line corresponds to the Fox model and dashed curve to the Gordon-Taylor model**



The  $T_g$  values are low and decrease from  $-41^\circ\text{C}$  for the FGW221 mixture down to  $-91^\circ\text{C}$  for the FGW117 mixture. Mixtures with higher water content (above 32 wt%) have one  $T_g$  concomitantly with other thermal events such as melting, crystallization and even two different  $T_g$ , as observed for the mixture containing the highest water ratio (FGW117) (see Fig. SI3). We can assume that while exhibiting a macroscopic continuous single phase, such mixtures present some heterogeneities at the molecular scale, characterized by fluctuations of concentrations. Thus, DSC analysis show that the thermal features are closely linked to the water content, since only the mixtures containing seven or less moles of water display a single low  $T_g$ . In these mixtures, the polar interactions developed between the three compounds are strong enough to prevent any fructose crystallization. Such thermal behavior is consistent with the designation of Low Transition Temperature Mixture (LTTM) [3].

The experimental  $T_g$  collected for these LTTMs were compared with  $T_g$  values calculated from the Fox [31] and the Gordon Taylor [32] models (Fig. 2B). The Fox model is commonly used for the prediction of  $T_g$  in classical miscible mixtures made of components of similar structure (close solubility parameters), weakly interacting with each other. This model is described by the equation (Eq.2) where  $w_x$  refers to the mass fraction of the component within the mixture and  $T_{gx}$  being the glass transition temperature of the pure component x.

$$\frac{1}{T_g} = \frac{w_W}{T_{gW}} + \frac{w_F}{T_{gF}} + \frac{w_G}{T_{gG}} \quad (\text{Eq.2})$$

Fig. 2B shows that, whatever the molar composition of the mixture, experimental  $T_g$  values remain lower than the Fox predicted ones. This discrepancy with the Fox model can be ascribed to the existence of specific and strong molecular interactions such as H-bonds between the three components constituting these LTTM mixtures. Besides, we were also interested in the Gordon-Taylor (G-T) model, which has mainly been exploited to predict the  $T_g$  values of binary systems such as polymer/polymer or plasticizer/polymer mixtures. In this model, a Gordon-Coefficient  $k_{G-T}$  was introduced, originally based on the free volume of polymer (characterized by  $T_{g1}$ ) [32]. This coefficient was commonly calculated from the equation (Eq.3) where  $\rho_x$  refers to the volumic mass of the component x and in which the diluent (or plasticizer) was defined as the second component (characterized by  $T_{g2}$ ) [33].

$$k_{12} = \frac{\rho_1 \cdot T_{g1}}{\rho_2 \cdot T_{g2}} \quad (\text{Eq.3})$$

This G-T model was also applied to sugar-water mixtures and in these examples, the  $k_{G-T}$  coefficients were determined by a fit of experimental data by considering a series of mixtures of varied water content [34]. Herein, three components are mixed, and as emphasized by DSC analysis, water plays a crucial role in the mixtures (vide-supra). Consequently, we propose to model the  $T_g$  values from the equation (Eq.4) derived from the one of G-T, but, in which water is defined as the first component, and fructose and glycerol as the second or third ones. The two  $k_{G-T}$  coefficients are then given by equations (Eq.5) and (Eq.6).

$$T_g = \frac{(w_W \cdot T_{gW}) + (k_{WF} \cdot w_F \cdot T_{gF}) + (k_{WG} \cdot w_G \cdot T_{gG})}{w_W + (k_{WF} \cdot w_F) + (k_{WG} \cdot w_G)} \quad (\text{Eq.4})$$

$$k_{WF} = \frac{\rho_W \cdot T_{gW}}{\rho_F \cdot T_{gF}} \quad (\text{Eq.5}) \quad \text{and} \quad k_{WG} = \frac{\rho_W \cdot T_{gW}}{\rho_G \cdot T_{gG}} \quad (\text{Eq.6})$$

As shown in Fig. 2B, the experimental  $T_g$  values are clearly in good agreement with  $T_g$  modelled by the Gordon-Taylor equation when water is considered as the first component, which reflects its major role in the hydrogen-bonded network developed in the FGW mixtures.

The effect of water content on the macroscopical features was additionally examined, and to that extent, the shear rate-dependency of the viscosity at 25°C of several homogeneous FGW mixtures (from 6 wt% up to 66 wt% of water, corresponding to mixtures from FGW111 up to FGW1130) was measured (Fig. SI4). It appears that all ternary mixtures are Newtonian fluids irrespective of the water content. Thus, the evolution of viscosity (at  $\dot{\gamma} = 10 \text{ s}^{-1}$ ) as a function of the water content was monitored (Fig. 3A).

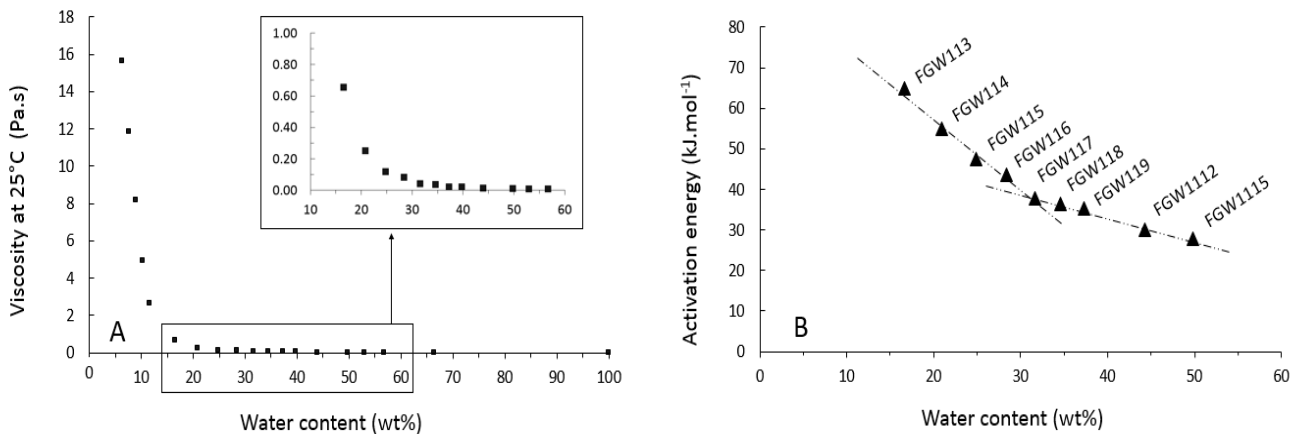


Fig. 3 (A) Shear rate viscosity at 25°C for FGW mixtures (from FGW111 to FGW1130) and (B) Activation energy for FGW mixtures (from FGW113 to FGW1115) as a function of the water content

As expected, the increase of the water content leads to a significant decrease of the viscosity. A brutal drop of the viscosity is observed from FGW111 (15.6 Pa.s) to FGW115 (0.12 Pa.s), followed for further dilutions by a much slower and continuous decrease down to 0.003 Pa.s for the FGW1130 mixture. This significant viscosity decrease arises from the dilution effect of water, which causes a more and more pronounced distancing between the interacting molecular species (F and G), thus leading to a progressive disruption of the H-bonded supramolecular network [35]. Such a viscosity decrease induced by the water addition has already been discussed in literature for other families of DES or LTTMs [16]; [35]–[38]. The thermal dependence of the viscosity of the FGW mixtures was examined by monitoring the evolution of shear rate viscosity at different temperatures. A typical example is given for the FGW113 mixture (Fig. SI5A). The viscosity significantly decreases when temperature increases from 15 to 40°C, as a result of both promotion of molecular mobility, and a progressive weakening of H-bonds.

The viscosity-temperature dependence of all ternary mixtures obeys an Arrhenius Law ( $\eta = \eta_0 \exp(E_a/RT)$ ), as proved by the linear plotting of  $\ln(\eta)$  with inverse temperature (Fig. SI5B), that is consistent with bibliography dealing with other families of DES or LTTMs [35]; [37]. The flow activation energies ( $E_a$ ) of FGW mixtures (from 17 wt% to 50 wt% of water, corresponding to FGW113 to FGW1115) are depicted as a function of the water content (Fig. 3B).

Two key points can be emphasized: *i*)  $E_a$  values are high, particularly for mixtures containing a low water amount, and *ii*)  $E_a$  values substantially decrease when the water content increases (from 65 to 27.7 kJ.mol<sup>-1</sup>). Such high  $E_a$  values, and even higher values, have been reported for ChCl-based DES ternary mixtures [39]. The  $E_a$  values of ternary mixtures composed of an equimolar proportion of citric acid and sucrose with different water amounts (from 16 to 30 wt%) were measured by Savi *et al.*, and, a value of 79 kJ.mol<sup>-1</sup> was found for the mixture diluted with 16 wt% of water [37].  $E_a$  values obtained herein reflect a cohesive character of the solvents stemming from strong and temperature dependent H-bonds developed between fructose, glycerol and water. Interestingly, the evolution of  $E_a$  as a function of water weight content exhibits two linear domains with two different slopes, which are intersected for a water content of 32 wt% (FGW117). This particular massic composition coincides with the change of thermal characteristics underlined by DSC measurements, allowing for identifying the compositions of FGW yielding to LTTMs. The rupture of the slope suggests the existence of two regimes characterized by two different extents of the water effect: *i*) a domain characterized by a strong slope, for which water is actively engaged in the H-bonded network leading to the formation of LTTM (up to FGW117), and *ii*) a second domain for which water mainly behaves as a diluting molecule.

The thermal and rheological behavior is anticipated to result from a peculiar organization/structuration of the interacting species at the molecular level, which was in-depth examined by NMR spectroscopy. Particular efforts were devoted to equimolar mixtures of fructose and glycerol containing an increasing water content (from FGW113 (16 wt%) to FGW1120 (57 wt%)) in order to gain insights into the effective contribution of water into the LTTM formation.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of individual aqueous fructose and glycerol solutions as well as FGW mixtures were firstly recorded (Fig. SI6 & SI7). Although fructose crystallizes exclusively in the  $\beta$ -D-fructopyranose form, it is known that four tautomers appear in aqueous solution [40]. Herein,  $^{13}\text{C}$  NMR analysis [41] confirms that fructose in the FGW mixtures is mainly present as the  $\beta$ -D-fructopyranose form (70 mol%), with  $\beta$ -D-fructofuranose,  $\alpha$ -D-fructofuranose, and  $\alpha$ -D-fructopyranose isomers in lower molar proportions of 21, 6 and 3 mol% respectively (Fig. SI6C). Interestingly, this composition is the same irrespective of the presence of glycerol, and the water content suggesting that the formation of H-bonds between the compounds does not impact the tautomeric equilibrium of fructose. In the  $^1\text{H}$  NMR spectra of FGW mixtures, all aliphatic protons are detected between 3 and 4 ppm (Fig. 4B & SI6). Only protons  $\text{H}_5$  and  $\text{H}_6$  of  $\beta$ -D-fructopyranose (3.7 ppm) and  $\text{H}_3$  and  $\text{H}_4$  of  $\beta$ -D-fructofuranose (3.8 ppm) exhibit isolated and well distinguished resonances. Protons  $\text{H}_1/\text{H}_1'$  and  $\text{H}_3$  of  $\beta$ -D-fructopyranose respectively overlap with signals of methylene and methine protons from glycerol. From 4 to 6 ppm, all labile and exchangeable hydroxyl protons appear as broad signals. Additionally,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY experiments were performed on the FGW mixtures (from FGW113 to FGW1120) in order to elucidate intermolecular dipolar interactions, as reported in literature [2]; [17]; [18]; [30]; [42]; [43]. The corresponding correlation maps are given in Fig. 4 and Fig. SI7. A particular attention was paid to the correlation map of the peculiar FGW115 mixture (Fig. 4A), since it was first introduced and industrially used for plant extraction purposes [44].

As previously evidenced, the NOESY spectrum of FGW115 exhibits cross-peaks between all the aliphatic and labile proton signals [45]. These correlations attest of a spatial proximity ( $\leq 5\text{\AA}$ ) between all the hydrogens of the molecules engaged in this mixture. The correlations between the signals from 4 to 5.5 ppm come from exchanges between all hydroxyl labile protons with a possible contribution of a dipolar NOE effect. Even though a discrimination between intra and inter dipolar molecular interactions is not reachable for fructose and glycerol due to the overlap of their signals (Fig. 4B), all the correlation dots involving aliphatic hydrogens are in phase with the diagonal (similar red colour, as illustrated in Fig. 4C). That means that the correlation times ( $\tau_c$ ) of the corresponding molecules are typical of large structures ( $\omega\tau_c \gg 1$ ) and demonstrates that this FGW115 mixture behaves more as a supramolecular structure than as an aqueous solution of low molecular weight isolated compounds ( $\omega\tau_c \ll 1$ ).

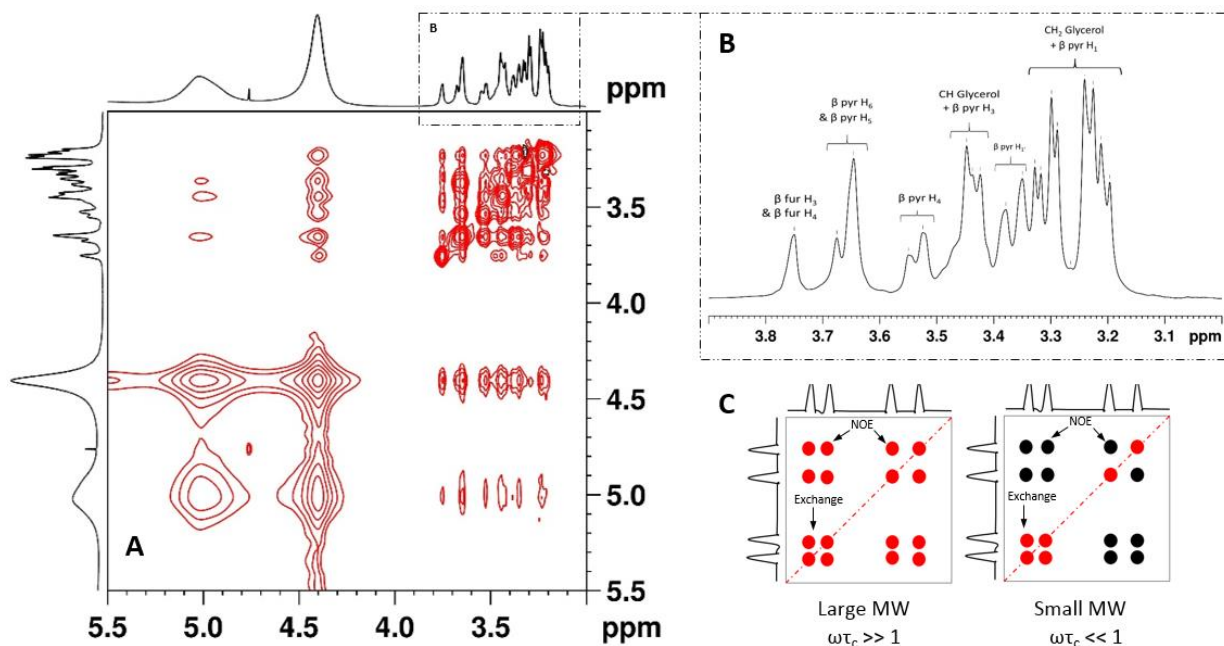
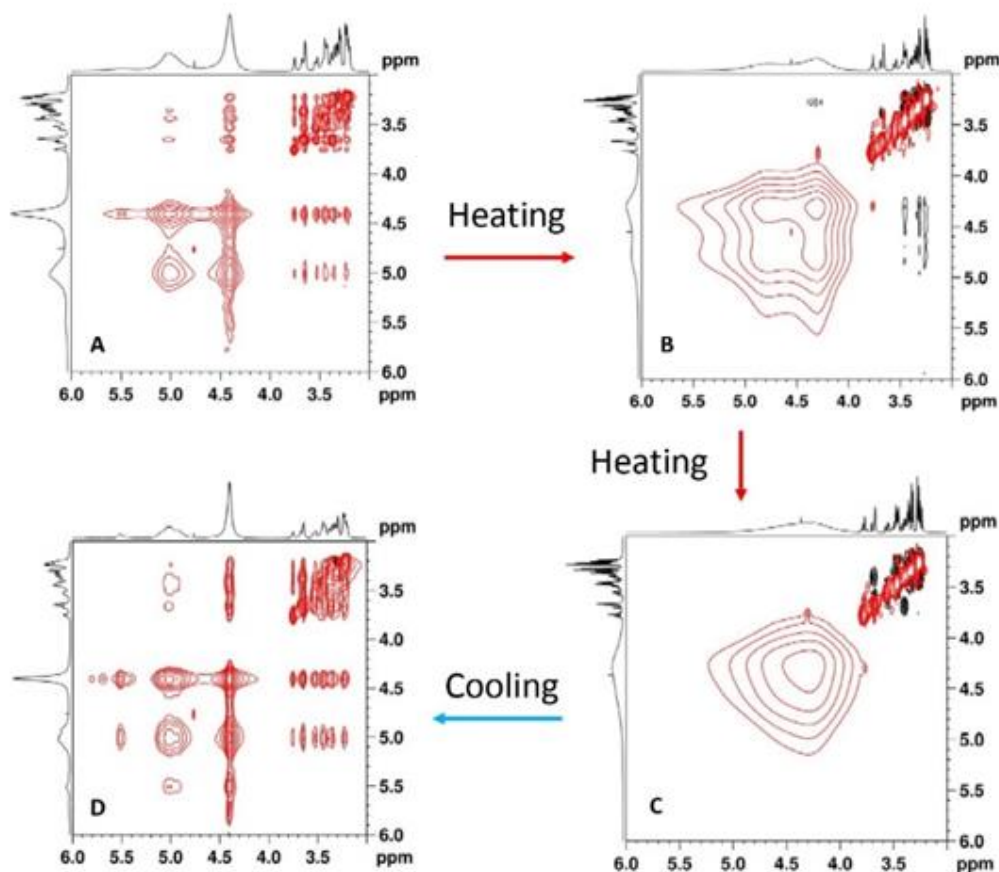


Fig. 4 (A) Phase sensitive <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY correlation map of FGW115; (B) Attribution of main signals of <sup>1</sup>H NMR spectrum of FGW115; (C) Illustration of phase sensitive <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY theory

Thus, the NOESY correlation map of the FGW115 mixture suggests that water effectively participates in the H-bonded network, as first introduced by Dai *et al.* for an equimolar ternary mixture of choline chloride, propanediol and water [30]. A similar conclusion was also reported by Zharina *et al.* for a mixture of betaine monohydrate and glycerol [43]. Given the enthalpic nature of H-bonds and their thermal-dependence, NOESY analysis of FGW115 was collected at several temperatures. Fig. 5 gives NOESY spectra recorded at 298K, 318K and 338K, and then back to 298K after 72h of storage at room temperature. Spectra recorded at 318 and 338K (Fig. 5B and 5C compared to 5A) show that the temperature increase induces a gradual disappearance of the NOE dot correlations from the aliphatic protons (between 3 and 4 ppm) and a huge broadening and coalescence of the signals assigned to the labile hydroxyl protons (between 4 and 5.5 ppm). These prominent thermal-induced changes in NOE spectra arise from *i*) an enhancement of the dynamics of the system linked both to a faster exchange between the hydroxyl labile protons and to a considerable rise in molecular mobility, and *ii*) a progressive dissociation of H-bonds between the components.



**Fig. 5** NOESY spectra of FGW115 recorded successively at 298K (A), 318K (B) and 338K (C) and again at 298K after storage for 72h at room temperature (D)

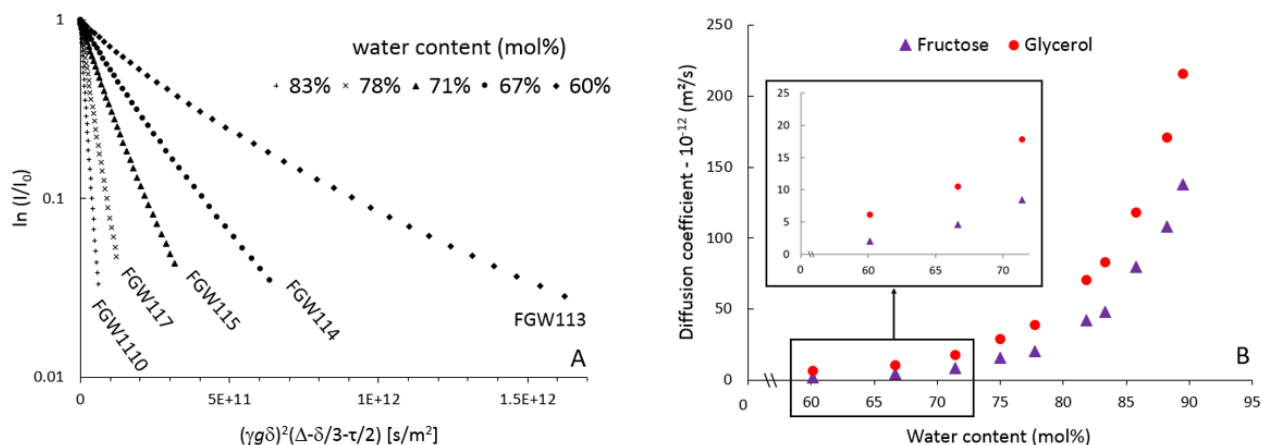
The scarce cross-peaks still observed at 338K for the aliphatic protons are attributed to intramolecular interactions. The corresponding dots are in inverse phase with the diagonal (black colour) indicating that the  $\tau_c$  of the engaged molecules are much lower and that the original supramolecular structure evidenced at 298K is dissociable upon temperature. Interestingly, NOESY spectra acquired at 298K before and after the thermal treatment are very similar (Fig. 5A compared to Fig. 5D), attesting of the reversible character of the H-bonds with temperature changes. As previously demonstrated, the water content plays a major role in the extent and the strength of H-bonds developed within the mixtures. Thus,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spectra were additionally recorded on mixtures from FGW113 to FGW1120. When the water content is  $\leq 28$  wt% (FGW116), the correlation maps (Fig. SI8 A, B, C, D) are similar to the one of FGW115 (Fig. 4A). These mixtures are strongly associated supramolecular structures mediated by H-bonds developed between fructose, glycerol and water. For these molar compositions corresponding to the so-called LTTMs, water is actively engaged into the network.

For higher dilutions, the cross-peaks involving the aliphatic protons (from 3 to 4 ppm) progressively disappear. Only residual black dots with an inverse phase to the diagonal can be observed, corresponding to intramolecular dipolar interactions within highly mobile and distanced molecules (Fig. SI8 E, F, G, H). As previously demonstrated, water is required for the formation of stable equimolar fructose/glycerol-based mixtures, but owing to its dual HBA and HBD character, a too high water amount is detrimental and leads to *i*) a displacement of the equilibrium of the interactions towards H-bonds of both fructose and glycerol with water only and *ii*) a decrease of the spatial proximity between fructose and glycerol, which both contribute to a change of the dynamics of the system by enhancing the molecular motion, and to a weakening of H-bonds between them. A similar behaviour was already described for other families of DES, NaDES or LTTM [14]–[18].

Another approach to discuss the mobility of molecules in FGW mixtures is the determination of their self-diffusion coefficients by Pulsed-Field Gradient NMR. As described by the Stejskal-Tanner equation (see experimental), when plotting the characteristic signal attenuation ( $\ln(I/I_0)$ ) of a single component in a solution versus the gradient strength, a straight line is obtained whose slope is proportional to the diffusion coefficient. In our case, as the signals of aliphatic protons of fructose and glycerol are not clearly distinguishable in the  $^1\text{H}$  NMR spectrum, the raw attenuation curves were plotted (Fig. 6A) by considering the decay of the whole area of signals between 3 and 4 ppm for mixtures with an increasing water content from FGW113 (17 w%) to FGW1120 (57 w%). The best fitting was done for all curves by considering the contributions of two components as expressed in the equation (Eq.7) allowing for the determination of two different self-diffusion coefficients for fructose and glycerol ( $D_F$  and  $D_G$ ) (Fig. 6B).

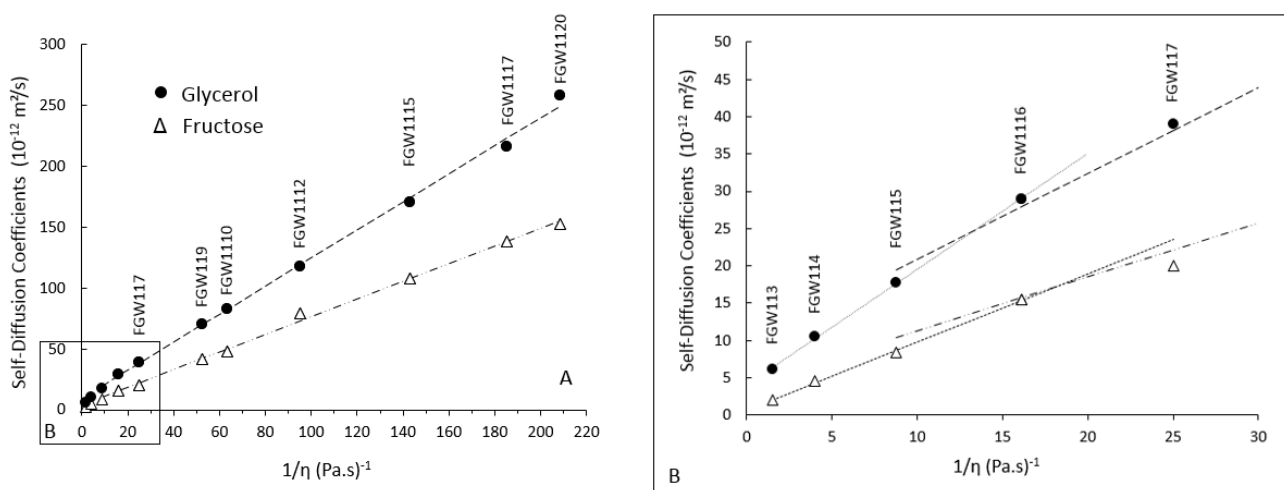
$$I/I_0 = A_F \cdot e^{-BD_F} + A_G \cdot e^{-BD_G} \quad (\text{Eq.7})$$

The highest diffusion coefficient was attributed to glycerol which exhibits a theoretical smaller hydrodynamic radius than fructose [46]; [47]. In our study, no distinction between the diffusion coefficients of fructose tautomers can be emphasized, that is consistent with works reported by Rampp *et al* [48]. Fig.6B shows that the  $D_F$  and  $D_G$  values, while being significantly distinct for high water contents due to their different inherent hydrodynamic radius, progressively decrease to values that get closer and closer for smaller water contents.



**Fig. 6 (A) Logarithm of the normalized signal attenuation as a function of gradient strength for five FGW ternary mixtures and (B) Evolution of the self-diffusion coefficients of fructose ( $\blacktriangle$ ) and glycerol ( $\bullet$ ) as a function of the water content (mol%) at 298K**

In this last case, glycerol, fructose, and water molecules are strongly associated through cooperative H-bonds and are thus sterically hampered, which considerably reduces their degrees of freedom and their self-mobility. These  $D$  profiles are consistent with correlation times ( $\tau_c$ ) underscored by NOESY experiments. A similar continuous enhancement of  $D$  values with the water content was already reported by D’Agostino for ChCl-based DES diluted by water [13]. The effect of the water addition in a malic acid/choline chloride DES was also recently studied by Roldan-Ruiz *et al* [49]. Additionally and according to the Stokes-Einstein equation [13], the self-diffusion coefficients were monitored as a function of the inverse of the shear rate viscosity (25°C, taken at  $\dot{\gamma} = 10 \text{ s}^{-1}$ ) (Fig. 7).



**Fig. 7 (A) Diffusion coefficients of fructose ( $\Delta$ ) and glycerol ( $\bullet$ ) at 25°C as a function of inverse shear rate viscosity; (B) Magnification on the zone of  $1/\eta$  below 30 (Pa.s) $^{-1}$**

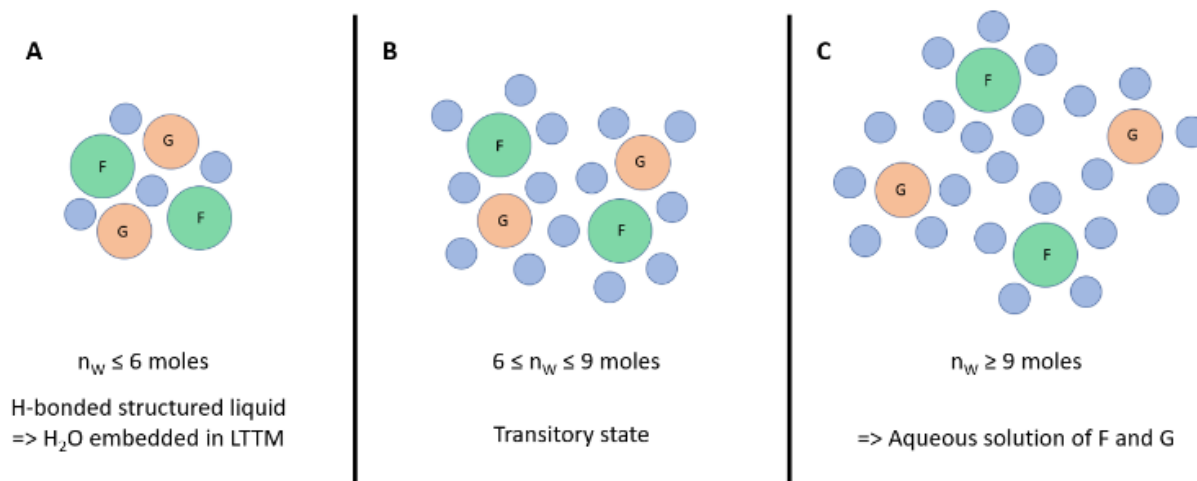


As expected, the  $D$  coefficients are closely linked to the macroscopic viscosity of the FGW mixtures, and the diffusion of both molecular species increase with the inverse of viscosity, meaning that a gain of viscosity substantially reduces their translational mobility. The magnification on the zone below  $30 \text{ (Pa.s)}^{-1}$  (Fig. 7B) shows the existence of two linear evolutions with an intersection close to the FGW116 composition, which corroborates the transition already evidenced by NOESY experiments,  $E_a$  evolution by means of viscosity measurement, as well as DSC analysis. For a water content lower than 32 wt% (FGW117), the corresponding ternary mixtures, designed as LTTMs, are strongly organized liquids stabilized by H-bonds including fructose, glycerol, and water, and are characterized by a high viscosity and a restricted rotational and translational mobility.

---

#### II.2.4 Conclusion

We report herein a detailed comprehensive study of ternary mixtures composed of very attractive interacting molecules, *i.e.* fructose, glycerol and water. In this frame, we established a ternary diagram based on the long-term stability behavior of a large library of FGW mixtures differing in their compositions and prepared through an eco-friendly and simple experimental approach. The thermal and rheological characterizations highlight that water plays a key role in the formation of stable ternary mixtures owing to its dual HBA and HBD character. Water behaves either as a decisive actor in the formation of the supramolecular FGW structuration, or as a solvent which dissolves polar fructose and glycerol molecules. NOESY and PFG NMR proved that the internal structuration existing within the FGW mixtures is deeply modified by the presence of water. To the best of our knowledge, this is the first time that an in-depth characterization is conducted on ternary mixtures involving non-ionic biobased interacting precursors. All the results allowed us for correlating the comprehension of interactions at molecular scale with micro and macroscopical (thermal and rheological) features. From these statements, we propose a schematic illustration (Scheme 1) of the organization of the mixtures, with the existence of two main domains controlled by the water content : *i*) a domain corresponding to the formation of strongly organized supramolecular mediated LTTMs involving fructose, glycerol and water (Scheme 1A), and *ii*) a domain corresponding to the formation of aqueous solution of individualized and dissolved fructose and glycerol molecules (Scheme 1C), these two zones being separated by a transitory domain highlighting a weakened H-bonded network (Scheme 1B). Finally, this methodology should be exploited to examine other families of LTTM. Moreover, this in-depth investigation is expected to be helpful for further applicative utilizations of FGW mixtures in green and sustainable chemical technologies.

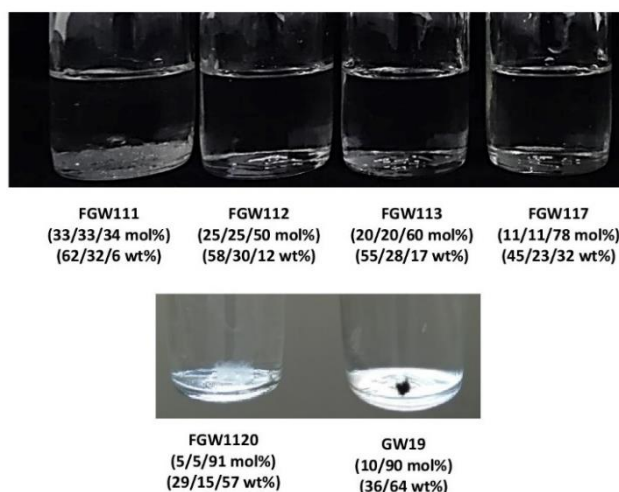


**Scheme 1** Illustration of the molecular organization within FGW mixtures at 25°C as a function of water content (A) H-bonded structured liquid, (B) Transitory state and (C) aqueous solution in which dissolved fructose and glycerol are individualized

## II.2.5 Acknowledgements

This project has received funding from Gattefossé. The authors are also thankful to R. Vera, from the Centre de diffractométrie Longchambon, Université Claude Bernard, Lyon, for its kind help to obtain and process XRD patterns. The authors acknowledge G. Quintard (IMP, INSA Lyon), for its support in rheological characterizations.

## II.2.6 Supporting information



**Fig. SI1** Optical images of selected mixtures showing different behaviors observed during a year of stability at 25°C: crystals appearance within FGW111, 3 stable LTTM compositions and bacterial growth within FGW1120 and GW19

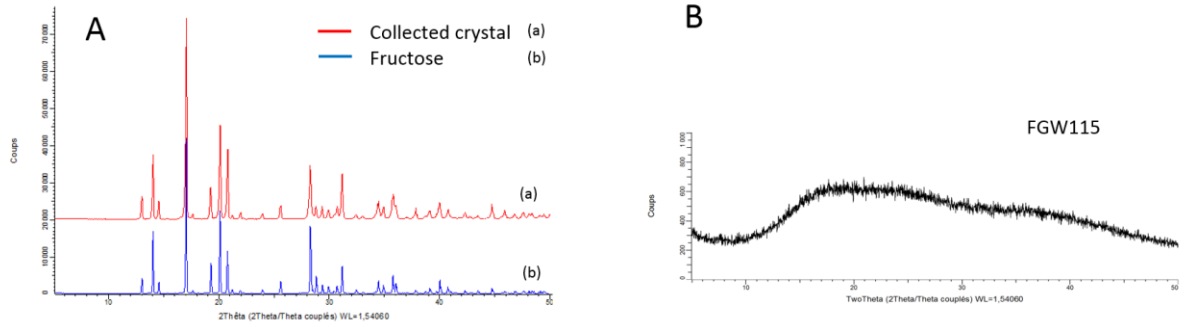


Fig. S12 (A) Diffraction pattern of crystals collected in the unstable mixture FGW111 and (B) Diffraction pattern of FGW115

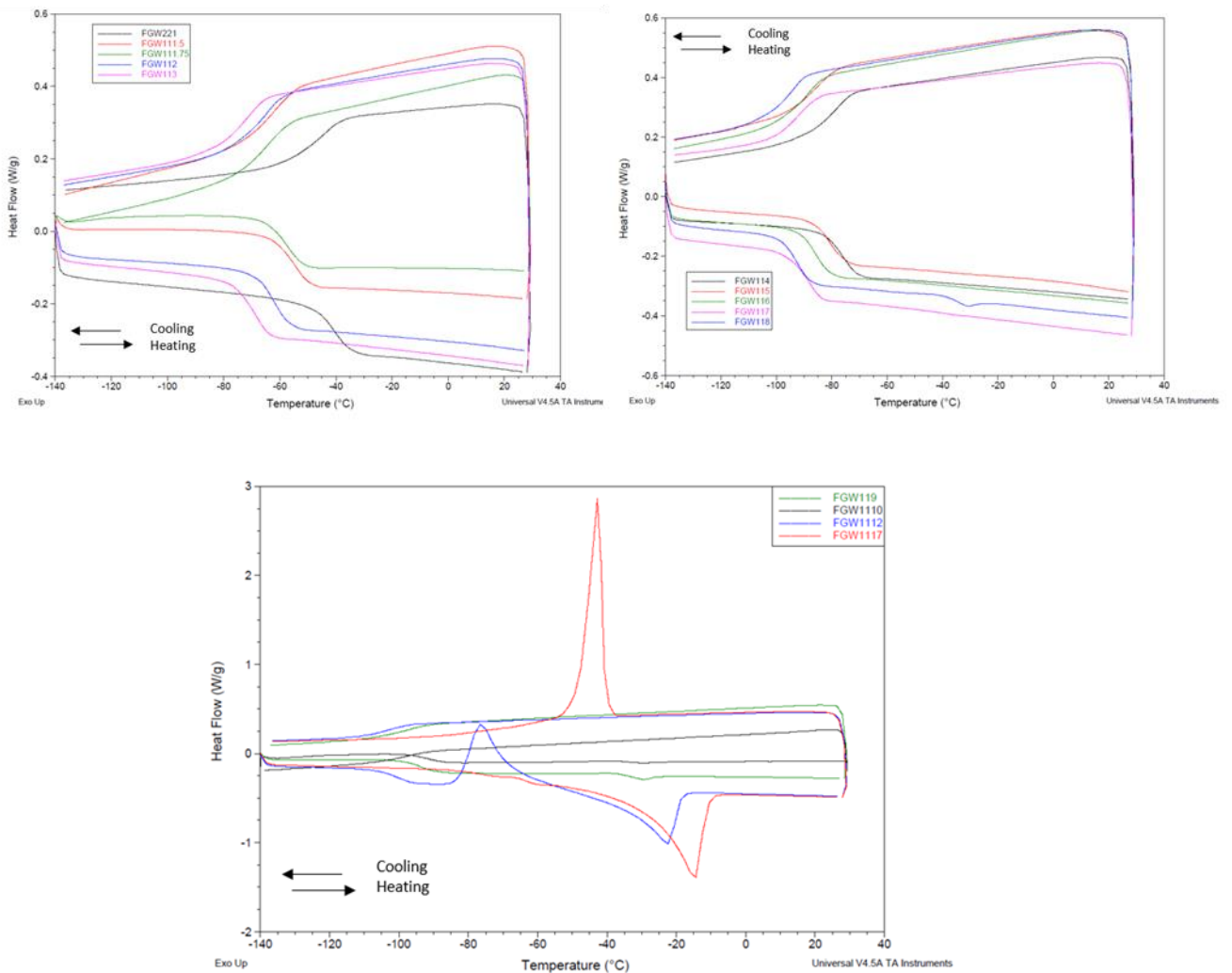


Fig. S13 Thermograms of mixtures containing an increasing water content from FGW221 (64/33/3 wt%) to FGW1117 (31/16/53 wt%)

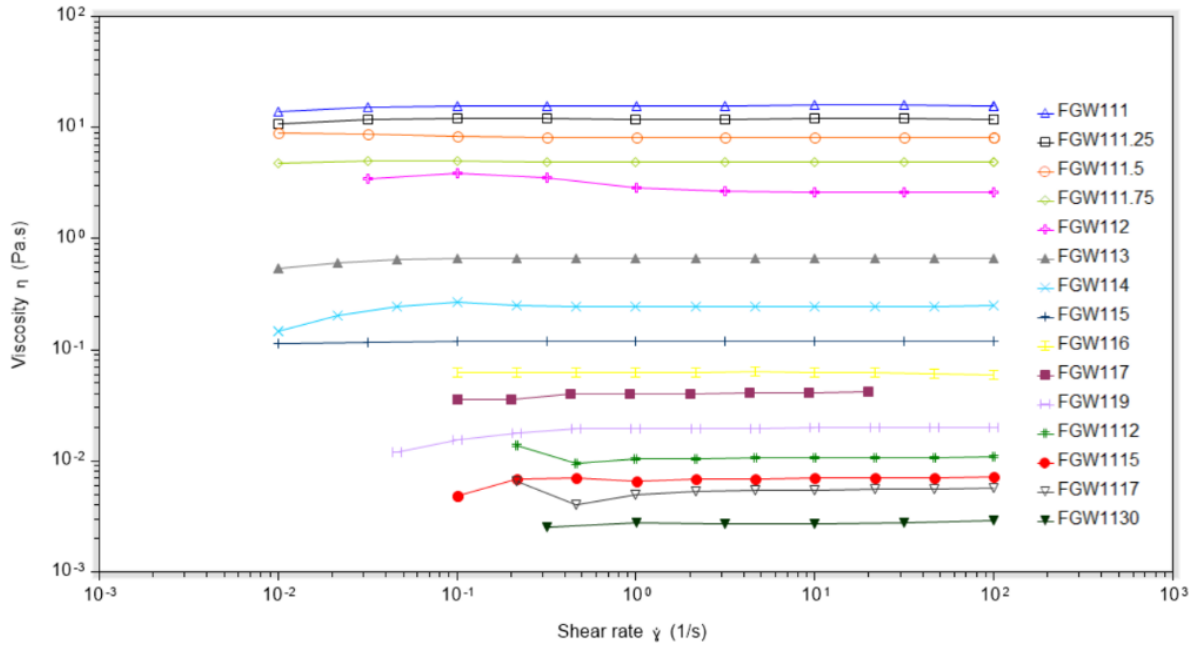


Fig. SI4 Shear rate-dependency of the viscosity at 25°C for several FGW mixtures (from 6% to 66%, corresponding to FGW111 to FGW1130)

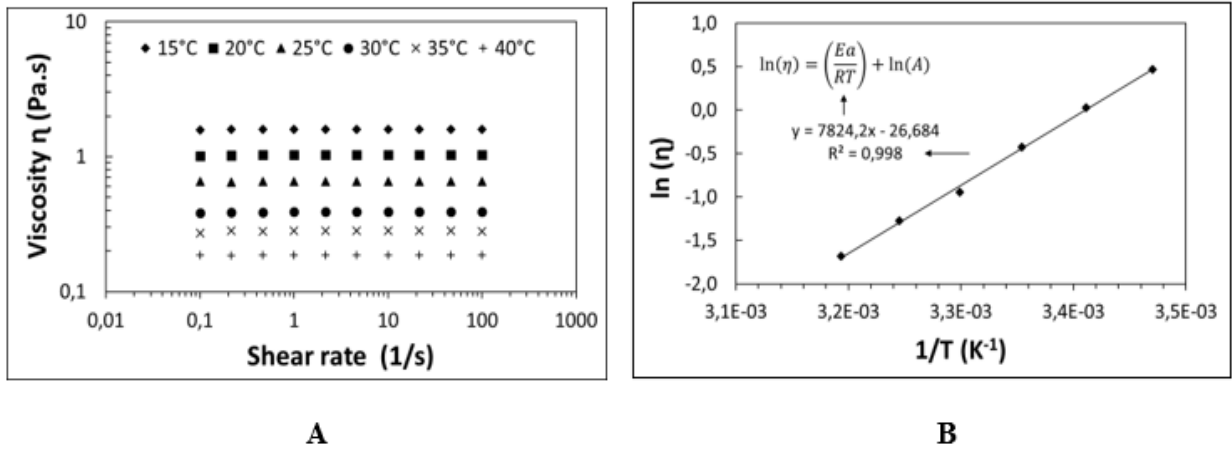
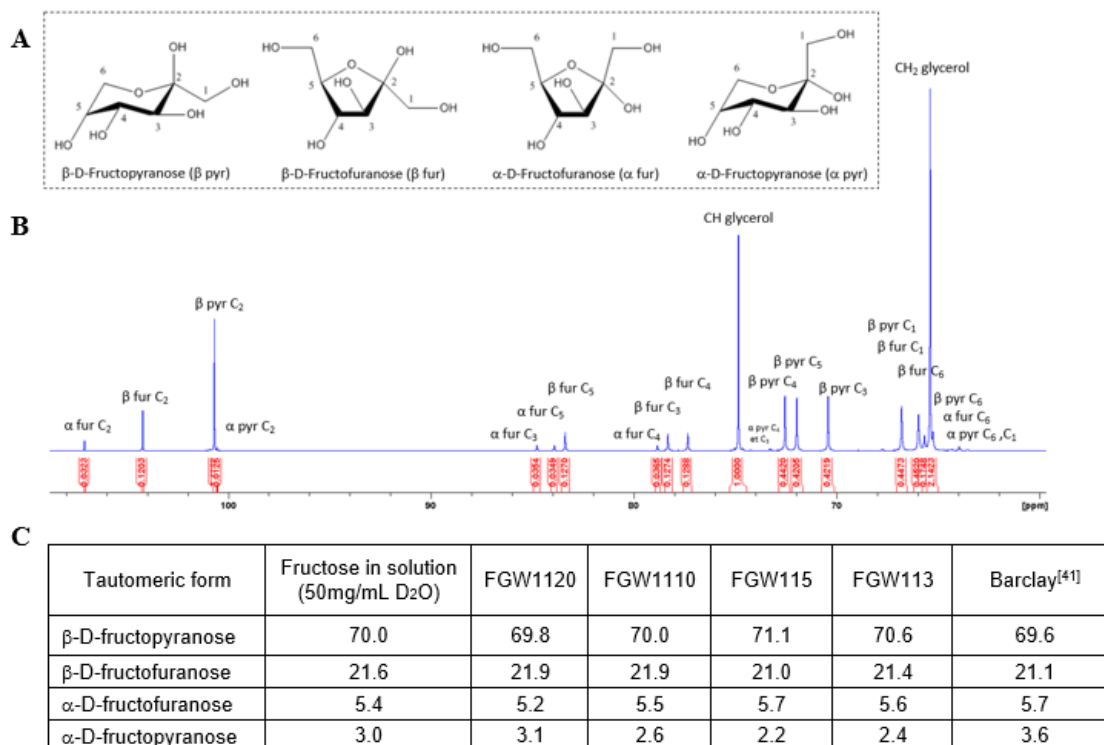
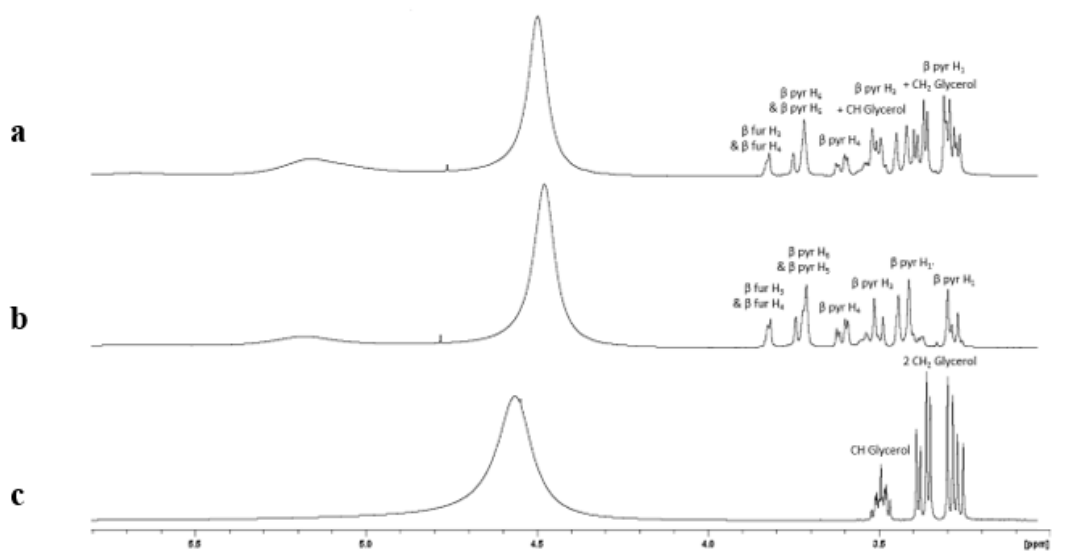


Fig. SI5 Method used for the determination of activation energy. Given example for the FGW113 mixture: (A) viscosity measurements as a function of shear rate for different temperatures; (B) graphical treatment of viscosity-temperature dependence for activation energy determination



**Fig. SI6 (A) Chemical structures of four tautomeric forms of D-fructose identified by <sup>13</sup>C NMR. (B) <sup>13</sup>C NMR spectrum of FGW115. (C) Tautomeric content (mol%) calculated for a diluted solution of fructose in D<sub>2</sub>O (50mg/mL) and different ternary systems in comparison with data obtained by Barclay for a diluted solution of fructose in D<sub>2</sub>O (50mg/mL)**



**Fig. SI7 <sup>1</sup>H NMR spectra of (a) FGW1110 (b) FW19 and (c) GW19 recorded at 25°C**

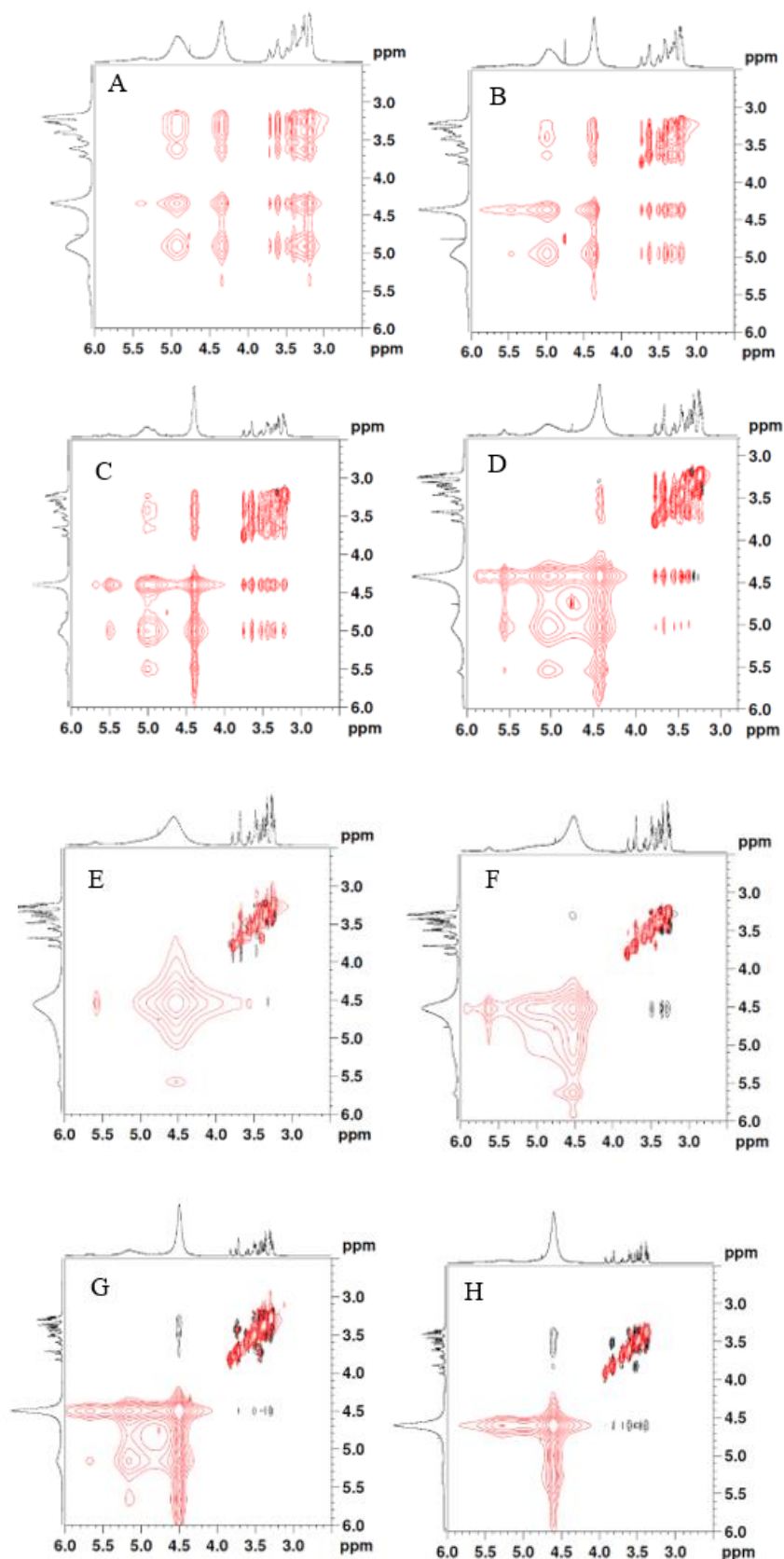


Fig. S18 Phase sensitive  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spectra recorded at 298K for FGW113 (A) FGW114 (B) FGW115 (C) FGW116 (D) FGW117 (E) FGW118 (F) FGW1110 (G) and FGW1120 (H)

---

### II.2.7 Citations

Depuis sa parution dans le journal *Journal of Molecular Liquids* [50], cette publication a fait l'objet de 3 citations [51]–[53]. La revue publiée par Wils *et al.* en 2021 se focalise sur l'utilisation de solvants de types *NaDES* pour la valorisation de biomasse par les laboratoires académiques et industriels français [51]. Les auteurs retiennent de nos travaux que la viscosité d'un *NaDES*, paramètre clé guidant une opération d'extraction, peut être contrôlée par l'ajout d'une faible quantité d'eau. Les travaux de Zhou *et al.* traitent de la stabilisation (chimique et microbiologique) de catéchines dans des *NaDES* à base de  $\text{ChCl}$  et de glycérol [52]. Les auteurs retiennent la stratégie de caractérisation par RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY développée dans notre publication pour mettre en évidence un réseau de liaisons hydrogène au sein d'un *NaDES*. Également par RMN, les auteurs démontrent l'existence d'interactions hydrogène entre la catéchine et le glycérol qui pourraient être à l'origine de l'augmentation de la stabilité observée. La troisième publication citant notre article a été publiée en 2022 par Abdallah *et al.* [53]. Les auteurs développent une méthode d'extraction de la favipiravir (actif antiviral utilisé contre la COVID-19) à partir de plasma humain. Leur méthode s'appuie sur la capacité des sucres à former des liaisons hydrogène en solution aqueuse et c'est dans ce contexte que nos travaux sont cités.

---

### II.2.8 Perspectives

L'étude de systèmes composés de fructose, de glycérol et d'eau nous a permis de corréler les propriétés physico-chimiques mesurées à l'échelle macroscopique et les observations réalisées à l'échelle moléculaire. Ce travail a mis en évidence le rôle prépondérant que joue l'eau sur les interactions et la mobilité des molécules au sein des *NaLTTM*. Cette même stratégie a été initiée pour identifier des systèmes composés de bétaïne, de propanediol et d'eau ayant les caractéristiques de *NaLTTM*.

## II.3 Caractérisation d'un second système : BPE115

### II.3.1 Contexte et enjeux

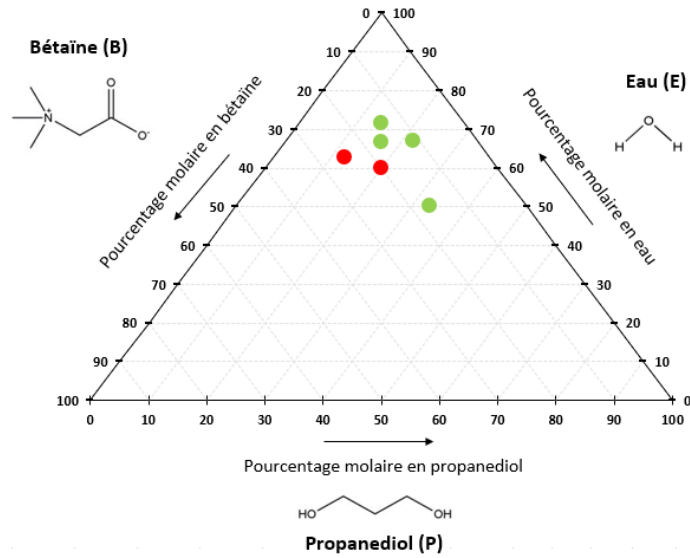
Le second mélange *NaLTTM* le plus utilisé par Gattefossé pour l'obtention d'extraits végétaux est un système composé de bétaïne (B), de propanediol (P) et d'eau (E) en proportions molaires 1:1:5, noté BPE115. Cette combinaison correspond aux proportions massiques suivantes (% m/m) : 41% de bétaïne, 27% de propanediol et 32% d'eau. Comparativement au mélange FGE115, le solvant BPE115 présente l'avantage d'être moins dense ( $d_{\text{BPE115}} = 1,1$  et  $d_{\text{FGE115}} = 1,3$ ) ce qui facilite sa mise en œuvre industrielle en tant que solvant d'extraction. Ce *NaLTTM* est également moins polaire ( $E^{\text{NT}}_{\text{BPE115}} = 0,8$ ) que le FGE115 ( $E^{\text{NT}}_{\text{FGE115}} = 0,9$ ), d'après la méthode de Reichardt [54]. Il permet par conséquent l'accès à des contenus phytochimiques différents et spécifiques. C'est notamment le cas en ce qui concerne l'extraction de feuilles de *Murraya koenigii*. L'extrait obtenu avec le *NaLTTM* BPE115 présente l'avantage d'être riche en acides phénols et en flavonoïdes tout en étant dépourvu d'alcaloïdes [55]. Avec cette composition phytochimique spécifique et différenciante par rapport aux solvants conventionnels, l'extrait végétal ne présente aucun risque de toxicité qui pourrait être induit par la présence d'alcaloïdes. Les auteurs ont également mis en évidence une activité biologique sur les marqueurs de l'élasticité de la peau.

Afin de mieux appréhender les interactions qui régissent ce mélange, différentes combinaisons molaires de bétaïne, de propanediol et d'eau (BPE113, BPE114, BPE115, BPE123, BPE126 et BPE215) ont été préparées et une partie de la méthodologie suivie pour caractériser les systèmes FGE a été appliquée. Ces travaux visent à identifier les proportions relatives permettant d'obtenir une phase liquide homogène et macroscopiquement stable pendant 12 mois. L'étude de l'effet de la composition, notamment de la quantité d'eau, sur les propriétés thermiques ( $T_g$ ) et la proximité spatiale des molécules constitutives (RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) a donc été initiée.

### II.3.2 Premiers résultats et discussion

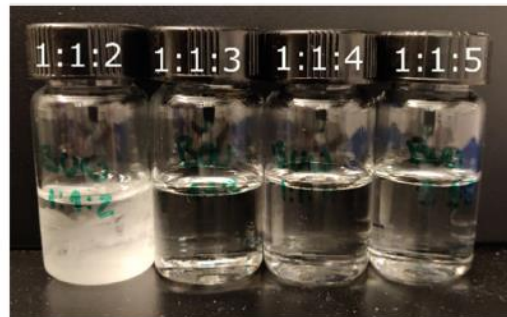
Le protocole expérimental détaillé au paragraphe II.2.2.2 a été utilisé pour la préparation de 6 mélanges (BPE113, BPE114, BPE115, BPE123, BPE126 et BPE215). Ces systèmes ont été suivis en stabilité à 25°C pendant 1 an et les observations macroscopiques sont reportées sur la figure II.1.





**Figure II.1 Diagramme ternaire résultant de l'observation de systèmes à base de bêtaïne (B), de propanediol (P) et d'eau (E) stockés pendant un an à 25°C. Les points rouges correspondent aux mélanges hétérogènes ou instables et les points verts aux liquides homogènes et stables**

Comme nous l'avons observé pour les systèmes FGE, deux comportements macroscopiques sont observés après un an à 25°C pour les systèmes BPE. Les mélanges BPE215 et BPE113 sont instables et une cristallisation progressive de la bêtaïne est observée. Les quatre autres combinaisons testées (BPE114, BPE115, BPE123, BPE126) forment des liquides homogènes et physiquement stables à 25°C pendant un an. La comparaison des systèmes BPE113, BPE114 et BPE115 met une nouvelle fois en avant le rôle fondamental de la quantité d'eau dans l'obtention de liquides homogènes et stables. Une conclusion similaire est reportée dans les travaux récents de Nava-Ocampo *et al.* concernant des mélanges ternaires composés de bêtaïne, d'urée et d'eau [56]. Comme le montre la figure II.2, les auteurs ont observé qu'un ajout minimum de 3 moles d'eau était nécessaire à l'obtention d'une solution homogène et stable pendant 4 mois à partir d'un mélange équimolaire de bêtaïne et d'urée.



**Figure II.2 Photographies de mélanges composés de bêtaïne, d'urée et d'eau obtenus par Nava-Ocampo *et al.* [56]**

Les propriétés thermiques des 4 combinaisons BPE stables ont été déterminées par DSC comme explicité au paragraphe II.2.2.4. Les thermogrammes obtenus entre  $-140^{\circ}\text{C}$  et  $30^{\circ}\text{C}$  sont regroupés dans la figure II.3.

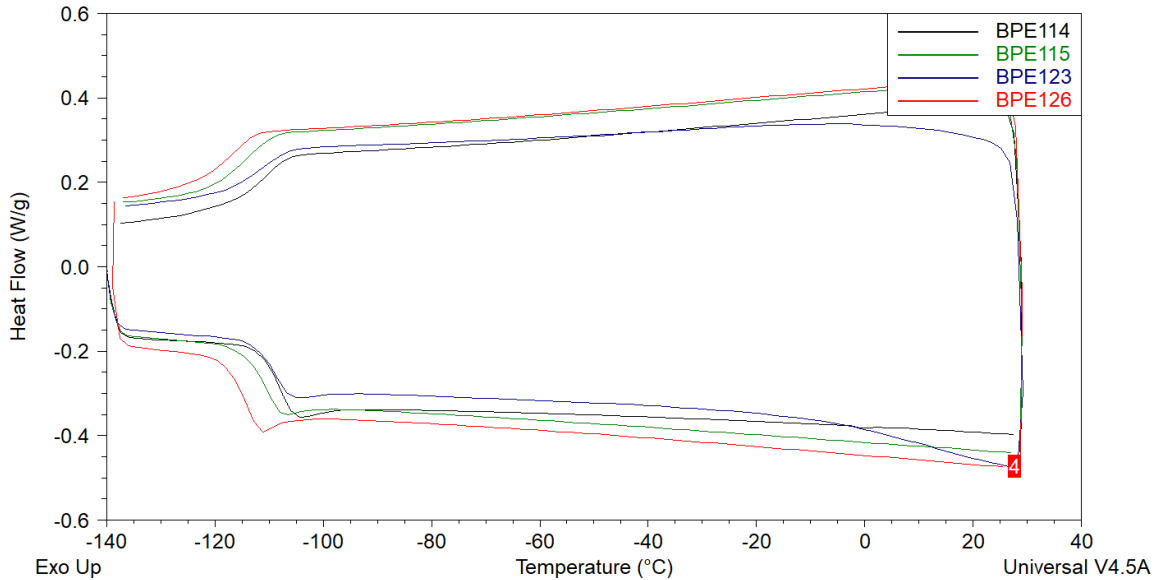
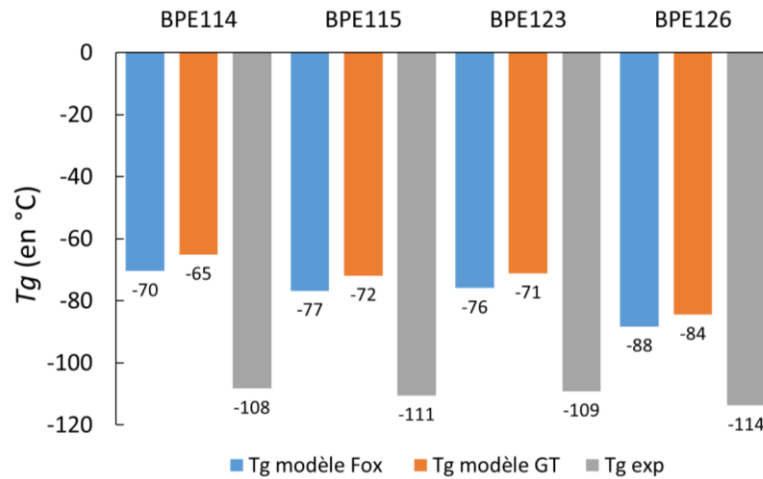


Figure II.3 Thermogrammes de 4 systèmes BPE obtenus par DSC entre  $-140$  et  $30^{\circ}\text{C}$

La figure II.3 montre que les thermogrammes des quatre combinaisons étudiées présentent un seul et unique événement thermique correspondant à une transition vitreuse. L'absence de point de fusion indique que ces systèmes BPE sont des *NaLTTM* caractérisés par une  $T_g$  à basse température (entre  $-100$  et  $-120^{\circ}\text{C}$  selon les proportions). Comme attendu, l'augmentation de la teneur en eau diminue la valeur de la  $T_g$ . Toutefois, cette diminution de  $T_g$  est moins marquée que dans le cas des mélanges à base de fructose, de glycérol et d'eau. En effet, une différence significative de  $7^{\circ}\text{C}$  a été mise en évidence entre FGE114 ( $T_g = -75^{\circ}\text{C}$ ) et FGE115 ( $T_g = -82^{\circ}\text{C}$ ) alors qu'elle n'est que de  $2^{\circ}\text{C}$  entre BPE114 ( $T_g = -108^{\circ}\text{C}$ ) et BPE115 ( $T_g = -110^{\circ}\text{C}$ ). La préparation de combinaisons supplémentaires serait nécessaire afin de discuter plus en détails l'impact des différents composés sur les propriétés thermiques des mélanges à base de bétaine, de propanediol et d'eau.

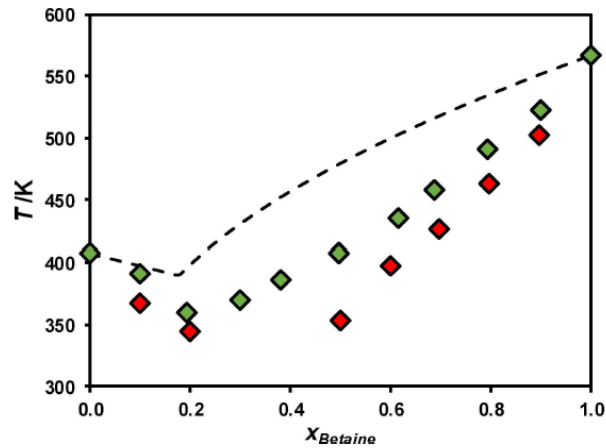
Compte-tenu des composés en présence, les transitions vitreuses à très basses températures peuvent être attribuées à l'établissement de liaisons hydrogène entre les composés mais également à des interactions entre les charges des molécules de bétaine et l'eau. Les valeurs expérimentales de  $T_g$  ont été comparées aux valeurs de  $T_g$  calculées avec les modèles de Fox et de Gordon-Taylor proposés au paragraphe II.2.3 (équations 2 et 4). Les résultats sont regroupés dans le graphique placé en figure II.4.



**Figure II.4 Comparaison des valeurs expérimentales de  $T_g$  obtenues pour 4 systèmes BPE (gris) avec les valeurs calculées par les modèles de Fox (bleu) et de Gordon-Taylor (orange)**

On remarque sur la figure II.4 que les valeurs expérimentales sont nettement inférieures à celles obtenues avec les modèles étudiés. Ainsi, les modèles de Fox et de Gordon-Taylor ne sont pas adaptés pour estimer les valeurs de  $T_g$  de ce type de mélanges.

Bien que la bétaïne soit un composé très attrayant pour l'obtention de *NaLTTM* (non toxique, biodégradable et bon marché), l'étude et la compréhension des interactions intermoléculaires dans les mélanges *LTTM* à base de bétaïne est peu décrite dans la littérature. A partir de ce constat, Abranches *et al.* ont étudiés les mécanismes de formation de *DES* à base de bétaïne [57]. Les auteurs ont indiqué avoir obtenu expérimentalement des points de fusion très en deçà des valeurs théoriques obtenues par la loi de mélange idéal. D'après les auteurs, cela peut en partie s'expliquer par la nature zwitterionique de la bétaïne. En effet, le déséquilibre de charge présent sur cette molécule fait de la bétaïne un excellent accepteur de liaisons hydrogène même avec des molécules présentant un faible potentiel de donneur de liaison hydrogène. La bétaïne possède également un fort caractère hygroscopique, les auteurs ont donc étudié l'impact de l'ajout de 2% (m/m) d'eau dans des mélanges à base de bétaïne et d'urée. Les diagrammes de phases obtenues sont présentés dans la figure II.5. Sans eau, le diagramme de phase représenté par des losanges verts présente un point eutectique à 80°C. Lorsqu'un ajout de 2% (m/m) d'eau est effectué, les compositions comprenant une fraction molaire de bétaïne comprise entre 0,3 et 0,4 ne cristallisent pas jusqu'à -80°C (durée d'observation 72h). Ces observations sont en accord avec les travaux de Zeng *et al.* qui recensent une absence de  $T_f$  et des  $T_g$  comprises entre -40 et -52°C pour quatre mélanges bétaïne / urée (cf. Annexe I, chapitre I) préparés sans séchage au préalable des constituants [58].



**Figure II.5** Diagramme de phase solide-liquide obtenu par Abranches et al. lors de l'étude de systèmes composés de bétaine et d'urée sans eau (losanges verts) et après ajout de 2% (m/m) d'eau (losanges rouges) comparativement au diagramme de phase idéal (---) [57]

D'après Abranches *et al.*, l'effet de l'eau sur les systèmes bétaine / urée pourrait résulter de sa petite taille et de sa capacité à créer des liaisons hydrogène. La présence d'eau améliorerait la stabilité de la bétaine dans la phase liquide en renforçant les répulsions électrostatiques entre deux molécules de bétaine ce qui faciliterait son interaction avec l'urée. Les auteurs restent prudents et indiquent que la nature de ces interactions spécifiques est encore inconnue à ce jour et que des compléments de recherche sur ces solvants sont nécessaires. Pour en revenir à nos travaux, il semble tout à fait plausible que ce genre d'interactions électrostatiques existent au sein des systèmes bétaine / propanediol / eau. Ces dernières participent très certainement à la diminution de la valeur de  $T_g$  dans les mélanges BPE. Ce type d'interactions n'étant pas considéré dans les modèles de Fox et de Gordon-Taylor, ces modèles ne sont pas adaptés pour les mélanges à base de bétaine. Finalement et bien que suggéré par Lavaud *et al.* dans le brevet FR3034625A1, le terme de solvants eutectiques ne peut être utilisé pour ces systèmes bétaine, donneur de liaison hydrogène et eau [59]. Le terme *LTTM* est plus approprié du fait de l'absence de point de fusion.

Dans l'objectif d'approfondir la description des interactions intermoléculaires au sein de ces mélanges, des analyses RMN ont été initiées selon les protocoles expérimentaux détaillés au paragraphe II.2.2.6. Les structures et les notations associées pour l'attribution des signaux sont reprises dans la figure II.6 présentant le spectre RMN  $^1\text{H}$  de BPE115. Comparativement aux systèmes FGE, les spectres proton des systèmes BPE ne présentent pas de superposition de signaux. Ce point est un avantage pour l'interprétation des résultats d'analyses  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY.

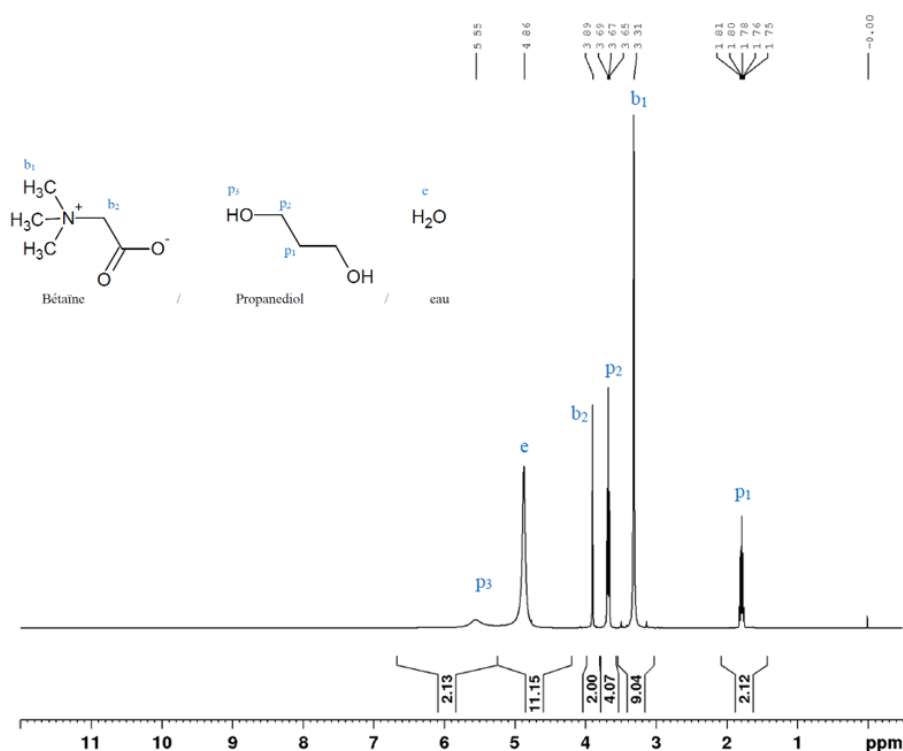


Figure II.6 Spectre RMN <sup>1</sup>H du système BPE115 et annotations utilisées pour l'attribution des signaux

Sur les cartes 2D des échantillons BPE114, BPE115, et BPE126 (Figure II. 7 A, B et D), les taches de corrélation qui apparaissent en noir, soit avec la même phase que la diagonale, traduisent des échanges entre les protons labiles de l'eau et les protons hydroxyle du propanediol. Les taches qui apparaissent en rouge, soit avec une phase opposée à la diagonale, indiquent une proximité spatiale de protons appartenant à des structures dont les temps de corrélation sont dans le domaine des mouvements rapides : NOE positif ( $\omega\tau_c \ll 1,12$ ). Ces corrélations traduisent essentiellement une proximité spatiale intramoléculaire. Aucune corrélation intermoléculaire n'est observée entre les signaux des protons non labiles du propanediol et ceux de la bétaine dans les conditions d'analyse. Les corrélations montrent que l'eau est en interaction hydrogène avec le propanediol et la bétaine. Même si les mouvements moléculaires sont plus rapides que pour les systèmes FGE, la présence de ces interactions conduit à un mélange homogène caractérisé par une unique  $T_g$  comme nous l'avons vu précédemment. En revanche, la carte 2D du mélange BPE123 (Figure II. 7 C) fait apparaître deux taches de corrélation supplémentaires comparativement aux autres systèmes (cadres violets).

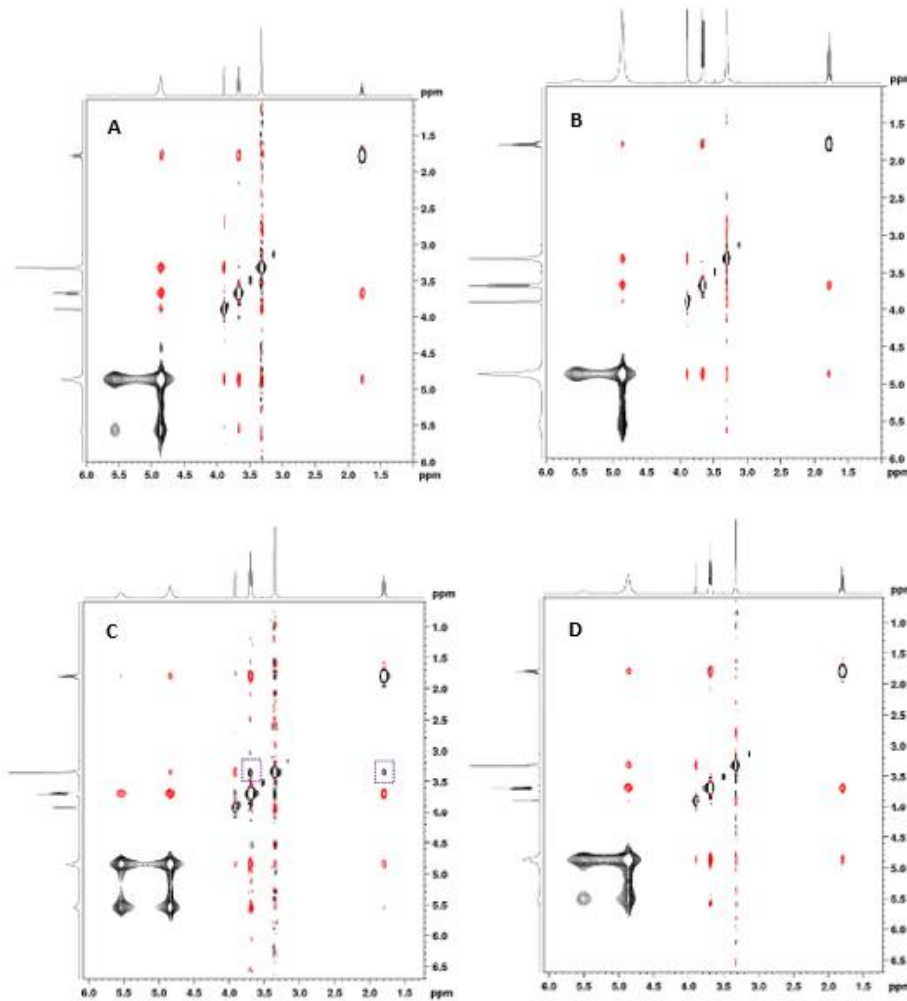


Figure II.7 Cartes RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY de 4 systèmes BPE (A = BPE114, B = BPE115, C = BPE123 et D = BPE126) obtenues à 25°C

Ces corrélations révèlent une proximité spatiale entre les protons des groupements méthyle de la bétaïne et les protons méthylène du propanediol. Ces taches de corrélation sont en phase avec la diagonale et correspondent donc à un NOE négatif caractéristique de structures dont les temps de corrélation sont dans le domaine des mouvements lents ( $\omega\tau_c \gg 1,12$ ). La présence de ces interactions est directement liée à la plus faible teneur en eau puisqu'elles n'ont pas été détectées pour le mélange BPE126 (Figure II.7 D). Ces résultats suggèrent donc qu'il est possible d'obtenir une structure supramoléculaire telle que mise en évidence pour les mélanges à base de fructose, de glycérol et d'eau. L'étude de ces systèmes n'a pas été poursuivie faute de temps. Elle valide néanmoins une partie de la méthodologie de caractérisation établie pour les mélanges FGE. Pour l'application de cette méthodologie à un spectre plus large de *NaLTTM*, les méthodes expérimentales restent identiques mais les modèles prédictifs doivent être adaptés pour tenir compte de la nature des composés impliqués dans les mélanges.

## II.4 Conclusion et perspectives

Les systèmes *NaLTTM* reposent sur l'association d'un (ou plusieurs) donneur(s) de liaisons hydrogène (*HBD*) et d'un (ou plusieurs) accepteur(s) de liaison hydrogène (*HBA*), tous deux d'origine naturelle. L'ajout d'un tiers corps, majoritairement de l'eau, est classiquement réalisé afin d'adapter les propriétés physico-chimiques de ces mélanges. Ainsi, la littérature recense des centaines de combinaisons dénommées *NaLTTM*. Cependant, seule une caractérisation exhaustive permet d'appréhender finement les mécanismes d'association au sein de tels mélanges. Afin de comprendre ces mécanismes dans le cas de mélanges composés de fructose, de glycérol et d'eau (FGE), une méthodologie de caractérisation basée sur la détermination des propriétés thermiques (DSC, ATG), des propriétés rhéologiques ( $\eta$  et  $E_a$ ), sur la description des systèmes à l'échelle moléculaire (RMN-1D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY), et sur l'étude de la mobilité translationnelle des espèces (RMN à gradient de champs pulsé) a été établie. Cette méthodologie a permis d'identifier les mélanges FGE ayant les caractéristiques de *NaLTTM* et présentant une structure supra-moléculaire régie par un réseau de liaisons hydrogène impliquant les 3 composés du mélange. Elle montre que **l'eau participe à la structure des *NaLTTM* et doit être considérée comme un constituant à part entière de ces mélanges**. Les différents travaux publiés dans la littérature pendant la durée de cette thèse (entre 2018 et 2022) sur des systèmes de type *DES*, *NaDES* ou *LTTM* le confirment (cf. §1.2.6 du chapitre I).

Nous avons également montré que la stratégie globale de caractérisation développée sur les mélanges FGE est applicable à d'autres *NaLTTM* comme les systèmes à base de bétaïne, de propandiol et d'eau (BPE). Toutefois, une méthode de caractérisation complémentaire aux mesures effectuées n'a pu être pleinement explorée faute de temps. Il s'agit de l'étude de la dynamique des molécules par RMN et en particulier la relaxométrie par RMN bas champ. Cette méthode est basée sur la mesure des temps de relaxation (relaxation spin-spin et spin-réseau) de l'ensemble des protons du mélange. Ces temps de relaxation étant dépendants du temps de corrélation des molécules engagées dans le mélange, une étude fine des courbes de relaxation pourrait permettre d'identifier les mélanges dans lesquels les molécules forment des associations supramoléculaires et pourrait permettre de discriminer les mélanges qui ont les caractéristiques de *LTTM*. Cette approche, non décrite dans la littérature à ce jour, constitue une piste de collaboration future entre Gattefossé et le service RMN de l'IMP.

## II.5 Références bibliographiques

- [1] Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 2003, 1, pp. 70–71.
- [2] Choi Y. H., van Spronsen J., Dai Y., et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, 2011, 156, 4, pp. 1701–1705.
- [3] Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M. C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52, 11, pp. 3074–3085.
- [4] Durand E., Lecomte J., Villeneuve P. From green chemistry to nature: The versatile role of low transition temperature mixtures. *Biochimie*, 2016, 120, pp. 119–123.
- [5] Shishov A., Bulatov A., Locatelli M., et al. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. *Microchemical Journal*, 2017, 135, pp. 33–38.
- [6] Troter D. Z., Todorović Z. B., Đokić-Stojanović D. R., et al. Application of ionic liquids and deep eutectic solvents in biodiesel production A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2016, 61, pp. 473–500.
- [7] del Monte F., Carriazo D., Serrano M. C., et al. Deep eutectic solvents in polymerizations A greener alternative to conventional syntheses. *ChemSusChem*, 2014, 7, 4, pp. 999–1009.
- [8] Smith E. L., Abbott A. P., Ryder K. S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical reviews*, 2014, 114, 21, pp. 11060–11082.
- [9] Zainal-Abidin M. H., Hayyan M., Hayyan A., et al. New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents A review. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 979, pp. 1–23.
- [10] Radošević K., Bubalo M. C., Srček V. G., et al. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2015, 112, pp. 46–53.
- [11] Ruß C., König B. Low melting mixtures in organic synthesis – an alternative to ionic liquids? *Green Chemistry*, 2012, 14, 11, pp. 2969.
- [12] Hammond O. S., Bowron D. T., Edler K. J. Liquid structure of the choline chloride-urea deep eutectic solvent (reline) from neutron diffraction and atomistic modelling. *Green Chemistry*, 2016, 18, 9, pp. 2736–2744.
- [13] D'Agostino C., Gladden L. F., Mantle M. D., et al. Molecular and ionic diffusion in aqueous - deep eutectic solvent mixtures: probing inter-molecular interactions using PFG NMR. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2015, 17, 23, pp. 15297–15304.
- [14] Gutiérrez M. C., Ferrer M. L., Mateo C. R., et al. Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2009, 25, 10, pp. 5509–5515.
- [15] Posada E., López-Salas N., Jiménez Riobóo R. J., et al. Reline aqueous solutions behaving as liquid mixtures of H-bonded co-solvents Microphase segregation and formation of co-continuous structures as indicated by Brillouin and <sup>1</sup>H NMR spectroscopies. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2017, 19, 26, pp. 17103–17110.
- [16] Dai Y., Witkamp G. J., Verpoorte R., et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, 2015, 187, pp. 14–19.
- [17] Delso I., Lafuente C., Muñoz-Embid J., et al. NMR study of choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 290, pp. 111236.
- [18] López N., Delso I., Matute D., et al. Characterization of xylitol or citric acid Choline chloride:water mixtures: Structure, thermophysical properties, and quercetin solubility. *Food Chemistry*, 2020, 306, pp. 125610.
- [19] Roda A., Santos F., Chua Y. Z., et al. Unravelling the nature of citric acid L-arginine:water mixtures: the bifunctional role of water. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2021,



- [20] Gu Y., Jérôme F. Glycerol as a sustainable solvent for green chemistry. *Green Chemistry*, 2010, 12, 7, pp. 1127.
- [21] Thapa I., Mullen B., Saleem A., et al. Efficient green catalysis for the conversion of fructose to levulinic acid. *Applied Catalysis A: General*, 2017, 539, pp. 70–79.
- [22] Jablonský M., Škulcová A., Malvis A., et al. Extraction of value-added components from food industry based and agro-forest biowastes by deep eutectic solvents. *Journal of Biotechnology*, 2018, 282, pp. 46–66.
- [23] Jeong K. M., Ko J., Zhao J., et al. Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *Journal of Cleaner Production*, 2017, 151, pp. 87–95.
- [24] Zdanowicz M., Staciwa P., Sychaj T. Low Transition Temperature Mixtures (LTTM) Containing Sugars as Potato Starch Plasticizers. *Starch - Stärke*, 2019, 71, 9-10, pp. 1900004.
- [25] Charton V., Caprin B., Bechetoille N. *Extrait d'Aesculus hippocastanum*, FR 3 053 890 B1; EP 3 269 426 B1; US 10 363 212 B2. 13/07/2016.
- [26] Caprin B., Charton V., Vogelgesang B. Chapter Twelve - The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. *Advances in Botanical Research Eutectic Solvents and Stress in Plants (Volume 97)*. Academic Press. 2021, pp. 309–332. ISBN 978-0-12-821691-0.
- [27] Vögeli B. The nuclear Overhauser effect from a quantitative perspective. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 2014, 78, pp. 1–46.
- [28] Brand T., Cabrita E. J., Berger S. Intermolecular interaction as investigated by NOE and diffusion studies. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 2005, 46, 4, pp. 159–196.
- [29] Gomez F. J. V., Espino M., Fernandez M. A., et al. A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect*, 2018, 3, 22, pp. 6122–6125.
- [30] Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G. J., et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 766, pp. 61–68.
- [31] Fox T. G. Influence of Diluent and of Copolymer Composition on the Glass Temperature of a Polymer System. *Bul. Am. Phys. Soc.*, 1956, 1, 123, pp. 123.
- [32] Gordon M., Taylor J. S. Ideal copolymers and the second-order transitions of synthetic rubbers. i. non-crystalline copolymers. *Journal of Applied Chemistry*, 1952, 2, 9, pp. 493–500.
- [33] Katkov I. I., Levine F. Prediction of the glass transition temperature of water solutions Comparison of different models. *Cryobiology*, 2004, 49, 1, pp. 62–82.
- [34] Chen T., Fowler A., Toner M. Literature review Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. *Cryobiology*, 2000, 40, 3, pp. 277–282.
- [35] Xin R., Qi S., Zeng C., et al. A functional natural deep eutectic solvent based on trehalose Structural and physicochemical properties. *Food Chemistry*, 2017, 217, pp. 560–567.
- [36] Lapeña D., Lomba L., Artal M., et al. The NADES glyceline as a potential Green Solvent A comprehensive study of its thermophysical properties and effect of water inclusion. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2019, 128, pp. 164–172.
- [37] Savi L. K., Dias M. C. G. C., Carpine D., et al. Natural deep eutectic solvents (NADES) based on citric acid and sucrose as a potential green technology A comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 1, 08, pp. 70.
- [38] Francisco M., van den Bruinhorst A., Zubeir L. F., et al. A new low transition temperature mixture (LTTM) formed by choline chloride+lactic acid Characterization as solvent for CO<sub>2</sub> capture. *Fluid Phase Equilibria*, 2013, 340, pp. 77–84.
- [39] Aroso I. M., Paiva A., Reis R. L., et al. Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine – Physicochemical properties. *Journal of Molecular Liquids*, 2017, 241, pp. 654–661.
- [40] Barclay T., Ginic-Markovica M., Cooper, P.D., Petrovsky, N. The chemistry and sources of fructose and their effect on its utility and health implications. *J.Excipients and Food Chem*, 2012, 3, 2,

- [41] Barclay T., Ginic-Markovic M., Johnston M. R., et al. Observation of the keto tautomer of D-fructose in D2O using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 2012, 347, 1, pp. 136–141.
- [42] Pisano P. L., Espino M., Fernández M. d. l. Á., et al. Structural analysis of natural deep eutectic solvents. Theoretical and experimental study. *Microchemical Journal*, 2018, 143, pp. 252–258.
- [43] Zahrina I., Mulia K., Yanuar A., et al. Molecular interactions in the betaine monohydrate-polyol deep eutectic solvents Experimental and computational studies. *Journal of Molecular Structure*, 2018, 1158, pp. 133–138.
- [44] Caprin B., Charton V., Demarne F. Extraits végétaux destinés à la cosmétique, solvants et procédés pour les obtenir, FR 3 036 618 B1. 26/05/2015.
- [45] Charton V., Claret A. Using nades extraction to create natural, sustainable, high-performance actives. *Household and Personal Care Today*, 2018, 13, 2, pp. 37–40.
- [46] Ribeiro A. C. F., Ortona O., Simões S. M. N., et al. Binary Mutual Diffusion Coefficients of Aqueous Solutions of Sucrose, Lactose, Glucose, and Fructose in the Temperature Range from (298.15 to 328.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2006, 51, 5, pp. 1836–1840.
- [47] D'Errico G., Ortona O., Capuano F., et al. Diffusion Coefficients for the Binary System Glycerol + Water at 25 °C. A Velocity Correlation Study. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2004, 49, 6, pp. 1665–1670.
- [48] Rampp M., Buttersack C., Lüdemann H.-D. c,T-Dependence of the viscosity and the self-diffusion coefficients in some aqueous carbohydrate solutions. *Carbohydrate research*, 2000, 328, 4, pp. 561–572.
- [49] Roldán-Ruiz M. J., Jiménez-Riobóo R. J., Gutiérrez M. C., et al. Brillouin and NMR spectroscopic studies of aqueous dilutions of malicine Determining the dilution range for transition from a “water-in-DES” system to a “DES-in-water” one. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 284, pp. 175–181.
- [50] Caprin B., Charton V., Rodier J.-D., et al. Scrutiny of the supramolecular structure of bio-sourced fructose/glycerol/water ternary mixtures Towards green low transition temperature mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 337, pp. 116428.
- [51] Wils L., Hilali S., Boudesocque-Delaye L. Biomass Valorization Using Natural Deep Eutectic Solvents: What's New in France? *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021, 26, 21,
- [52] Zhou P., Tang D., Zou J., et al. An alternative strategy for enhancing stability and antimicrobial activity of catechins by natural deep eutectic solvents. *LWT*, 2022, 153, pp. 112558.
- [53] Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., et al. Determination of favipiravir in human plasma using homogeneous liquid-liquid microextraction followed by HPLC/UV. *Bioanalysis*, 2022, 14, 4, pp. 205–216.
- [54] Reichardt C. Pyridinium N-phenolate betaine dyes as empirical indicators of solvent polarity: Some new findings. *Pure and Applied Chemistry*, 2004, 76, 10, pp. 1903–1919.
- [55] Charton V., Bechetoille N., Demarne F. Extrait de *Murraya Koenigii* et son utilisation en Cosmétique, FR 3 106 755 A1. 03/02/2020.
- [56] Nava-Ocampo M. F., Al Fuhaid L., Santana A., et al. Structural properties and stability of the Betaine-Urea natural deep eutectic solvent. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 343, pp. 117655.
- [57] Abranches D. O., Silva L. P., Martins M. A. R., et al. Understanding the Formation of Deep Eutectic Solvents: Betaine as a Universal Hydrogen Bond Acceptor. *ChemSusChem*, 2020, 13, 18, pp. 4916–4921.
- [58] Zeng C.-X., Qi S.-J., Xin R.-P., et al. Synergistic behavior of betaine–urea mixture Formation of deep eutectic solvent. *Journal of Molecular Liquids*, 2016, 219, pp. 74–78.
- [59] Lavaud A., Laguerre M., Birtic S., et al. Solvant eutectique d'extraction, procédé d'extraction par eutigénèse utilisant ledit solvant, et extrait issu dudit procédé d'extraction, (Demande de brevet) FR3034625 A1. 10/04/2015.

## II.6 Liste des figures

FIG. 1 TERNARY DIAGRAM BASED ON MOLAR CONTENTS OF FRUCTOSE (F), GLYCEROL (G) AND WATER (W) MADE FROM THE VISUAL INSPECTION OF MIXTURES AFTER A STORAGE FOR ONE YEAR AT 25°C. RED SQUARES CORRESPOND TO HETEROGENEOUS OR INSTABLE SYSTEMS (E.G. FGW211) WHILE GREEN TRIANGLES DESCRIBE HOMOGENEOUS SINGLE PHASE LIQUIDS (E.G. FGW115) .....	92
FIG. 2 (A) DSC THERMOGRAMS OF TERNARY MIXTURES FROM FGW221 TO FGW117 (B) EVOLUTION OF EXPERIMENTAL (■) AND MODELLED $T_g$ VALUES AS A FUNCTION OF WEIGHT WATER CONTENT. CONTINUOUS LINE CORRESPONDS TO THE FOX MODEL AND DASHED CURVE TO THE GORDON-TAYLOR MODEL .....	93
FIG. 3 (A) SHEAR RATE VISCOSITY AT 25°C FOR FGW MIXTURES (FROM FGW111 TO FGW1130) AND (B) ACTIVATION ENERGY FOR FGW MIXTURES (FROM FGW113 TO FGW1115) AS A FUNCTION OF THE WATER CONTENT .....	95
FIG. 4 (A) PHASE SENSITIVE $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY CORRELATION MAP OF FGW115; (B) ATTRIBUTION OF MAIN SIGNALS OF $^1\text{H}$ NMR SPECTRUM OF FGW115; (C) ILLUSTRATION OF PHASE SENSITIVE $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY THEORY .....	98
FIG. 5 NOESY SPECTRA OF FGW115 RECORDED SUCCESSIVELY AT 298K (A), 318K (B) AND 338K (C) AND AGAIN AT 298K AFTER STORAGE FOR 72H AT ROOM TEMPERATURE (D) .....	99
FIG. 6 (A) LOGARITHM OF THE NORMALIZED SIGNAL ATTENUATION AS A FUNCTION OF GRADIENT STRENGTH FOR FIVE FGW TERNARY MIXTURES AND (B) EVOLUTION OF THE SELF-DIFFUSION COEFFICIENTS OF FRUCTOSE (▲) AND GLYCEROL (●) AS A FUNCTION OF THE WATER CONTENT (MOL%) AT 298K .....	101
FIG. 7 (A) DIFFUSION COEFFICIENTS OF FRUCTOSE (Δ) AND GLYCEROL (●) AT 25°C AS A FUNCTION OF INVERSE SHEAR RATE VISCOSITY; (B) MAGNIFICATION ON THE ZONE OF $1/\dot{\gamma}$ BELOW 30 (PA.S) $^{-1}$ .....	101
SCHEME 1 ILLUSTRATION OF THE MOLECULAR ORGANIZATION WITHIN FGW MIXTURES AT 25°C AS A FUNCTION OF WATER CONTENT (A) H-BONDED STRUCTURED LIQUID, (B) TRANSITORY STATE AND (C) AQUEOUS SOLUTION IN WHICH DISSOLVED FRUCTOSE AND GLYCEROL ARE INDIVIDUALIZED .....	103
FIG. SI1 OPTICAL IMAGES OF SELECTED MIXTURES SHOWING DIFFERENT BEHAVIORS OBSERVED DURING A YEAR OF STABILITY AT 25°C: CRYSTALS APPEARANCE WITHIN FGW111, 3 STABLE LTTM COMPOSITIONS AND BACTERIAL GROWTH WITHIN FGW1120 AND GW19 .....	103
FIG. SI2 (A) DIFFRACTION PATTERN OF CRYSTALS COLLECTED IN THE UNSTABLE MIXTURE FGW111 AND (B) DIFFRACTION PATTERN OF FGW115 .....	104
FIG. SI3 THERMOGRAMS OF MIXTURES CONTAINING AN INCREASING WATER CONTENT FROM FGW221 (64/33/3 WT%) TO FGW1117 (31/16/53 WT%) .....	104
FIG. SI4 SHEAR RATE-DEPENDENCY OF THE VISCOSITY AT 25°C FOR SEVERAL FGW MIXTURES (FROM 6% TO 66%, CORRESPONDING TO FGW111 TO FGW1130) .....	105
FIG. SI5 METHOD USED FOR THE DETERMINATION OF ACTIVATION ENERGY. GIVEN EXAMPLE FOR THE FGW113 MIXTURE: (A) VISCOSITY MEASUREMENTS AS A FUNCTION OF SHEAR RATE FOR DIFFERENT TEMPERATURES; (B) GRAPHICAL TREATMENT OF VISCOSITY-TEMPERATURE DEPENDENCE FOR ACTIVATION ENERGY DETERMINATION .....	105
FIG. SI6 (A) CHEMICAL STRUCTURES OF FOUR TAUTOMERIC FORMS OF D-FRUCTOSE IDENTIFIED BY $^{13}\text{C}$ NMR. (B) $^{13}\text{C}$ NMR SPECTRUM OF FGW115. (C) TAUTOMERIC CONTENT (MOL%) CALCULATED FOR A DILUTED SOLUTION OF FRUCTOSE IN $\text{D}_2\text{O}$ (50MG/ML) AND DIFFERENT TERNARY SYSTEMS IN COMPARISON WITH DATA OBTAINED BY BARCLAY FOR A DILUTED SOLUTION OF FRUCTOSE IN $\text{D}_2\text{O}$ (50MG/ML) .....	106
FIG. SI7 $^1\text{H}$ NMR SPECTRA OF (A) FGW1110 (B) FW19 AND (C) GW19 RECORDED AT 25°C .....	106
FIG. SI8 PHASE SENSITIVE $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY SPECTRA RECORDED AT 298K FOR FGW113 (A) FGW114 (B) FGW115 (C) FGW116 (D) FGW117 (E) FGW118 (F) FGW1110 (G) AND FGW1120 (H) .....	107
FIGURE II.1 DIAGRAMME TERNAIRE RESULTANT DE L'OBSERVATION DE SYSTEMES A BASE DE BETAÏNE (B), DE PROPANEDIOL (P) ET D'EAU (E) STOCKES PENDANT UN AN A 25°C. LES POINTS ROUGES CORRESPONDENT AUX MELANGES HETEROGENES OU INSTABLES ET LES POINTS VERTS AUX LIQUIDES HOMOGENES ET STABLES .....	110

FIGURE II.2 PHOTOGRAPHIES DE MELANGES COMPOSES DE BETAÏNE, D'UREE ET D'EAU OBTENUS PAR NAVA-OCAMPO <i>ET AL.</i> [56] .....	110
FIGURE II.3 THERMOGRAMMES DE 4 SYSTEMES BPE OBTENUS PAR DSC ENTRE -140 ET 30°C .....	111
FIGURE II.4 COMPARAISON DES VALEURS EXPERIMENTALES DE $T_g$ OBTENUES POUR 4 SYSTEMES BPE (GRIS) AVEC LES VALEURS CALCULEES PAR LES MODELES DE FOX (BLEU) ET DE GORDON-TAYLOR (ORANGE).....	112
FIGURE II.5 DIAGRAMME DE PHASE SOLIDE-LIQUIDE OBTENUS PAR ABRANCHES ET AL. LORS DE L'ETUDE DE SYSTEMES COMPOSES DE BETAÏNE ET D'UREE SANS EAU (LOSANGES VERTS) ET APRES AJOUT DE 2% (M/M) D'EAU (LOSANGES ROUGES) COMPARATIVEMENT AU DIAGRAMME DE PHASE IDEAL (---) [57] .....	113
FIGURE II.6 SPECTRE RMN $^1\text{H}$ DU SYSTEME BPE115 ET ANNOTATIONS UTILISEES POUR L'ATTRIBUTION DES SIGNAUX ....	114
FIGURE II.7 CARTES RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ NOESY DE 4 SYSTEMES BPE (A = BPE114, B = BPE115, C = BPE123 ET D = BPE126) OBTENUES A 25°C .....	115

# Chapitre III : Ajout de polysaccharides dans des *NaLTTM* à base de fructose, de glycérol et d'eau

---

## Table des matières

<i>CHAPITRE III : AJOUT DE POLYSACCHARIDES DANS DES NALTTM A BASE DE FRUCTOSE, DE GLYCEROL ET D'EAU</i> .....	122
<b>III.1 SELECTION DES POLYSACCHARIDES ADAPTES AUX OBJECTIFS</b> .....	123
<i>III.1.1 Généralités sur les polysaccharides et orientations</i> .....	123
<i>III.1.2 Sélection des polysaccharides</i> .....	123
<i>III.1.3 Stabilité du solvant FGE115 lors d'un chauffage prolongé</i> .....	130
<i>III.1.4 Conclusion et sélection de quatre polysaccharides</i> .....	135
<i>III.1.5 Références bibliographiques</i> .....	136
<i>III.1.6 Liste des figures et des tableaux</i> .....	137
<b>III.2 INCORPORATION DE XANTHANE DANS FGE115</b> .....	138
<i>III.2.1. Origine, structure et comportement du xanthane en solution</i> .....	138
<i>III.2.2. Matériel et Méthodes</i> .....	145
<i>III.2.3. Résultats et discussion</i> .....	147
<i>III.2.4. Conclusion</i> .....	155
<i>III.2.5. Références bibliographiques</i> .....	156
<i>III.2.6. Liste des figures</i> .....	158
<b>III.3 AJOUT D'ALGINATE DE SODIUM DANS DES LTTM FGE</b> .....	159
<i>III.3.1. Origine, structure et propriétés de solutions aqueuses d'alginate</i> .....	159
<i>III.3.2. Préparation et caractérisation des solutions d'alginate de sodium</i> .....	162
<i>III.3.3. Gélification des solutions d'alginate</i> .....	181
<i>III.3.4 Conclusions</i> .....	195
<i>III.3.5 Références bibliographiques</i> .....	197
<i>III.3.6 Liste des figures et des tableaux</i> .....	199
<b>III.4 κ-CARRAGEENAN ASSOCIATED WITH FRUCTOSE/GLYCEROL/WATER LTTM: TOWARDS NATURAL THERMOSENSITIVE PHYSICAL GELS</b> .....	201
<i>III.4.1. Introduction</i> .....	201
<i>III.4.2. Experimental</i> .....	203
<i>III.4.3. Results and Discussion</i> .....	205
<i>III.4.4. Conclusion</i> .....	216
<i>III.4.5. Acknowledgements</i> .....	216
<i>III.4.6. Supporting information</i> .....	217
<i>III.4.7. References</i> .....	221
<i>III.4.8. List of figures and tables</i> .....	223

## III.1 Sélection des polysaccharides adaptés aux objectifs

### III.1.1 Généralités sur les polysaccharides et orientations

Les polysaccharides sont des polymères composés d'unités sucre. Ces polymères de masses molaires élevées sont abondants et disponibles à partir de ressources renouvelables (algues, plantes, animaux, champignons, micro-organismes) <sup>[1]</sup>. Les polysaccharides peuvent jouer différents rôles physiologiques dans les règnes animal et végétal. Par exemple, certains polysaccharides sont des macromolécules de structure (cellulose, hemicellulose), d'autres servent de réserve énergétique (amidon), certains entrent dans la composition des mucilages impliqués dans la captation d'eau (acide polygalacturonique) etc. Les structures des polysaccharides peuvent être linéaires ou ramifiées et plus ou moins complexes. Ces polymères naturels sont très majoritairement constitués d'hexoses et/ou de pentoses liés les uns aux autres par des liaisons *O*-glycosidiques. On distingue les homopolysaccharides constitués d'un seul type d'unité monosaccharidique et les hétéropolysaccharides constitués de plusieurs unités monosaccharidiques. Les polysaccharides sont relativement faciles à isoler ce qui les rend moins chers que certains polymères synthétiques. Le prix attractif, l'origine naturelle et la diversité de structures des polysaccharides font que l'on retrouve des polysaccharides, et les matériaux associés, dans de nombreux domaines d'applications : pharmacie <sup>[2]</sup>, cosmétique <sup>[3]</sup>, agriculture et traitement des sols <sup>[4]</sup>, industrie papetière et emballage alimentaire <sup>[5]</sup>, agroalimentaire <sup>[6]; [7]</sup>, extraction pétrolière <sup>[8]</sup>. Cet engouement repose majoritairement sur la biocompatibilité, la biodégradabilité et l'innocuité de la plupart des polysaccharides. De plus, certains polysaccharides contiennent des groupements aglycones (phosphate, sulfate, amine, succinate, pyruvate ou encore acétate) dans leur structure. Ces groupements spécifiques et réactifs sont généralement exploités pour fonctionnaliser les polysaccharides par voies chimiques ou enzymatiques <sup>[9]</sup>. Diverses réactions chimiques telles que l'oxydation, la sulfatation, l'estérification, l'amidification peuvent être appliquées aux polysaccharides afin notamment d'élargir leur domaine d'application. Ces modifications peuvent permettre d'atteindre de nouvelles propriétés, de nouvelles fonctionnalités, ou de moduler la solubilité d'un polysaccharide. Les polysaccharides peuvent donc être classés en deux groupes : les polysaccharides naturels et les polysaccharides artificiels (d'origine naturelle mais modifiés chimiquement). Les polysaccharides naturels sont donc des candidats de choix pour obtenir des matériaux 100% biosourcés. Compte tenu du contexte de ces travaux de thèse qui se basent sur des approches de chimie verte pour des applications dans le domaine cosmétique, seuls les polysaccharides naturels et donc non modifiés chimiquement seront étudiés. Autrement dit, les polysaccharides testés ne subiront ni purification, ni modifications chimiques.

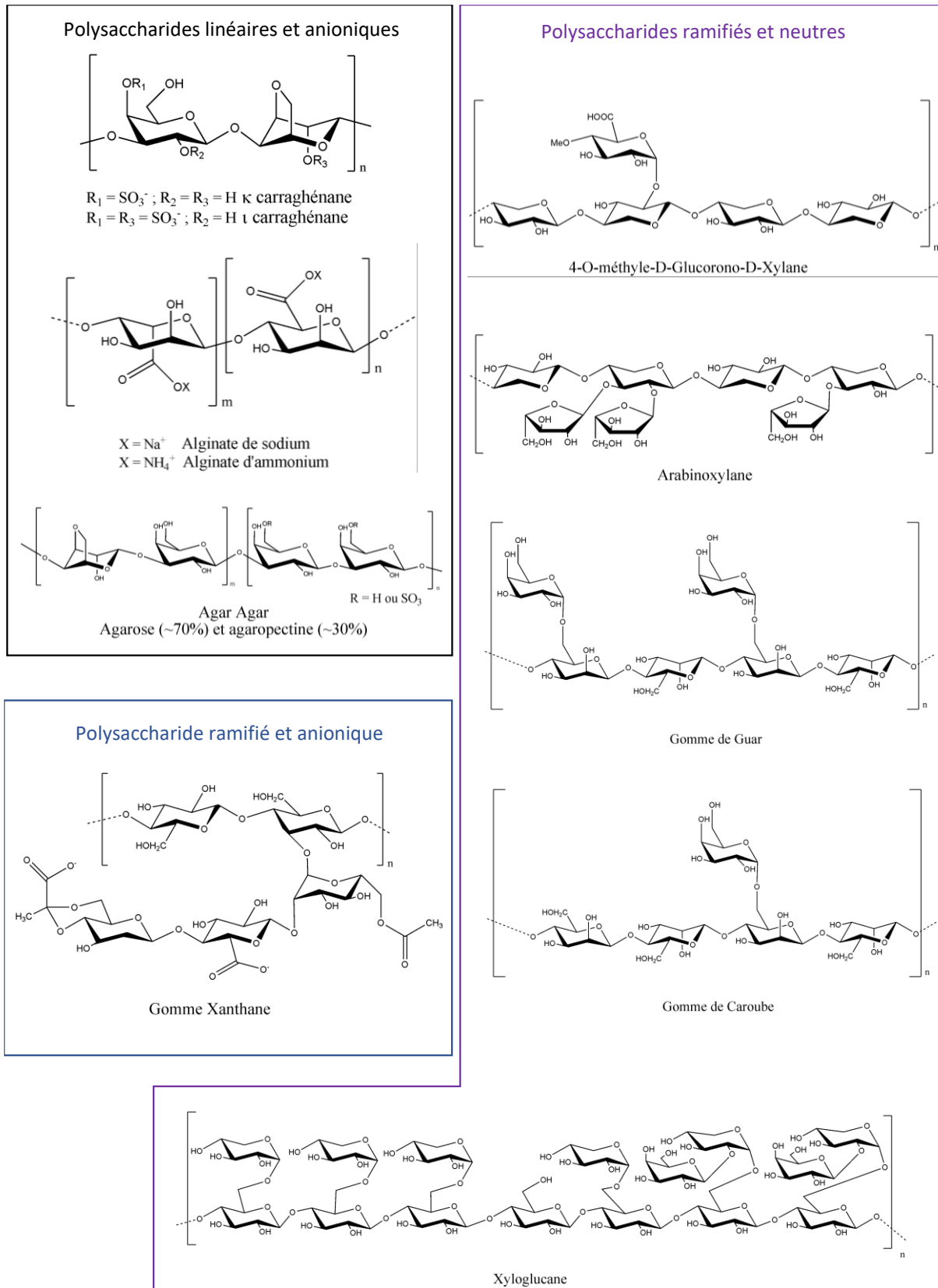
### III.1.2 Sélection des polysaccharides

#### III.1.2.1 Critères de sélection des polysaccharides et structures chimiques

L'incorporation de polysaccharides dans un mélange ternaire composé de fructose, de glycérol et d'eau n'étant pas décrite dans la littérature (cf. Chapitre I), la sélection de polysaccharides pouvant répondre aux objectifs de la thèse a été réalisée en s'appuyant sur les critères suivants :

1. Non modifié chimiquement,
2. Mentionné dans la littérature sur les eutectogels et/ou les hydrogels,
3. Disponible commercialement et produit à l'échelle industrielle,
4. Compatible avec des utilisations dans le domaine cosmétique,
5. De structure chimique bien connue et bien documentée,
6. Avec une faible variabilité structurale en fonction des sources et des lots,
7. Facile à mettre en œuvre à l'échelle laboratoire,
8. Dont la concentration gélifiante est compatible avec des exigences industrielles ( $C_{\text{polysaccharide}} < 5\%$ ).

Pour augmenter les chances d'identifier un ou des polysaccharide(s) répondant à ces critères, nous nous sommes tournés vers des polysaccharides de structures variées (Figure III.1). Ces polymères naturels peuvent être regroupés en plusieurs catégories selon leur structure. La première catégorie de polysaccharides considérés consiste en des **structures linéaires et anioniques**. Dans cette catégorie, nous avons sélectionné deux formes de carraghénanes : la forme iota décrite dans les travaux de Serra *et al.* pour l'obtention de ionogels <sup>[10]</sup>, et la forme kappa qui permettrait d'obtenir des hydrogels présentant de meilleures propriétés mécaniques que ceux préparés avec la forme iota. La différence entre ces deux formes réside dans le nombre de groupements sulfatés et leur localisation sur la chaîne principale linéaire <sup>[11;12]</sup>. Deux sels d'alginate ont été sélectionnés : l'alginate de sodium et l'alginate d'ammonium. Les alginates sont des polymères linéaires composés d'unités mannuronate et d'unités guluronate dont certaines sont acétylées. La structure chimique des alginates peut être très variée comme nous le verrons plus en détail dans la suite de ce manuscrit. L'agar-agar, mélange d'agarose et d'agaropectine dans des proportions relatives de l'ordre de 70% et 30%, a également été retenu pour compléter cette première catégorie. La gomme xanthane, seul représentant de la deuxième catégorie, se caractérise par une **structure ramifiée et anionique**. Bien que sa structure soit complexe, la caractérisation chimique et physico-chimique de la gomme xanthane est bien décrite dans la littérature. Pour rappel, ce polysaccharide a été utilisé pour gélifier des *NaLTTM* à base de  $\text{ChCl}$  contenant au minimum 10% (m/m) d'eau <sup>[13; 14]</sup>.



**Figure III.1 Structures des polysaccharides naturels intégrés dans cette étude**



La troisième catégorie de polysaccharides testés rassemble des **structures ramifiées et neutres**. L'abondance de polysaccharides appartenant à cette catégorie nous a permis de considérer différentes familles de polymères. Parmi les xylanes, nous avons sélectionné le 4-O-méthyle-D-glucorono-D-xylane (MGX) et l'arabinoxylane. Le MGX est un composant principal des hémicelluloses, et le deuxième polysaccharide naturel d'origine végétal le plus abondant dans la nature après le xyloglucane. L'arabinoxylane se caractérise par une chaîne linéaire de poly(xylose) ramifiée avec des motifs arabinose. Pour faire écho aux travaux de Depoorter *et al.* <sup>[15]</sup>, deux galactomannanes ont été testés : les gommages de guar et de caroube. Les structures de ces deux gommages naturelles se différencient par le nombre d'unités galactose présentes sur la chaîne principale de poly(mannose). Parmi les glucanes, le xyloglucane, composé le plus abondant des hémicelluloses et se caractérisant par une chaîne linéaire de poly(glucose) ramifiée avec des xyloses a également été intégré dans ces travaux. Les deux derniers critères de sélection que sont la facilité de préparation du mélange FGE115 + polysaccharide et la détermination de la concentration en polysaccharide permettant d'obtenir un comportement de « type gel », c'est-à-dire ne s'écoulant pas spontanément ont nécessité une approche expérimentale qui est détaillée dans le paragraphe suivant.

### III.1.2.2 Protocole de préparation des mélanges FGE115 + polysaccharides

Pour définir le protocole de préparation des mélanges visés dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes appuyés en première intention sur le protocole de préparation développé au laboratoire IMP dans le cadre des travaux de thèse de Jérémy Depoorter <sup>[16]</sup>. Ce protocole est particulièrement adapté à l'obtention de matériaux anhydres comme dans le cas de l'incorporation de gomme de guar dans des *DES* à base de  $\text{ChCl}$  <sup>[15]</sup>. Ce protocole comprend une première étape de séchage sous vide ( $\approx 15\text{h}$  à  $80^\circ\text{C}$ ) des polysaccharides et des solvants utilisés. Dans notre cas, le séchage du solvant n'est pas nécessaire puisque le solvant FGE115 comporte environ 25% (m/m) d'eau et que l'on souhaite conserver ces proportions. Cette étape préliminaire de séchage des composés n'a donc pas été retenue. Dans une optique industrielle et d'après les exemples recensés dans la partie bibliographique (Chapitre I), deux concentrations massiques en polysaccharide, respectivement 1 et 5% m/m ont été retenues dans un premier temps. A titre de comparaison, des mélanges en milieu aqueux seront également réalisés dans les mêmes conditions. Le protocole est schématisé dans la figure III.2.

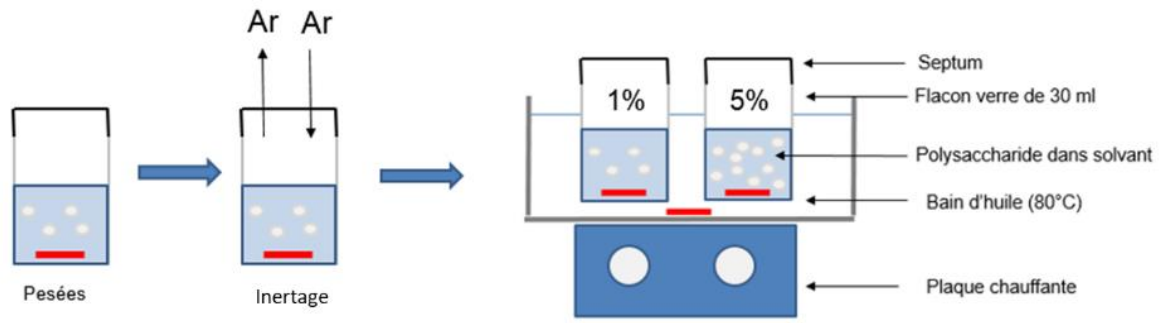









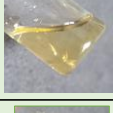









Figure III.2 Protocole expérimental de préparation des mélanges FGE115 + polysaccharides

Les mélanges sont réalisés dans des flacons en verre de 30 mL contenant un simple agitateur magnétique. Le flacon est fermé à l'aide d'un septum permettant de réaliser l'inertage à l'argon des mélanges à l'aide de seringues. Le flacon est ensuite placé à 80°C dans un bain d'huile et agité pendant une nuit ( $\approx 15$ h). Le lendemain, une observation macroscopique de l'échantillon est réalisée à 80°C puis après retour à  $T_{amb}$ . Une attention particulière est portée à : *i*) l'homogénéité macroscopique du mélange, *ii*) la couleur, *iii*) la transparence ou turbidité et *iv*) l'aptitude que possède le mélange à s'écouler plus ou moins facilement et rapidement après avoir retourné le flacon.

### III.1.2.3 Observations macroscopiques des mélanges obtenus

En fonction du polysaccharide et de la concentration utilisée, différents comportements macroscopiques ont été observés après incorporation dans FGE115 (tableau III.1). Certains polysaccharides sont partiellement solubles dans FGE115 à 1% (m/m). C'est le cas des galactomannanes (gommes de guar et de caroube) et du xyloglucane pour lesquels des mélanges liquides visqueux, turbides et non homogènes avec des dépôts gélifiés sur les parois ont été obtenus. Après plusieurs semaines, la proportion de polysaccharide non solubilisée sédimente progressivement. Pour ces trois polysaccharides, la concentration de 5% (m/m) n'a donc pas été testée et ces polysaccharides ont été éliminés. Les carraghénanes, les alginates et les xylanes testés sont macroscopiquement solubles dans FGE115 à 1% m/m. En effet, des solutions monophasiques, transparentes, homogènes et possédant une viscosité plus ou moins élevée ont été obtenues. En ce qui concerne les carraghénanes à 1% m/m, la dispersion des polysaccharides est rapide. Une agitation régulière à 80°C a permis d'obtenir des solutions homogènes et limpides en quelques heures. Après 15h de chauffage, les deux solutions sont légèrement jaunes. Hormis une propension plus importante à l'écoulement pour la solution obtenue avec la forme iota, il est quasiment impossible de distinguer ces échantillons par observations macroscopiques.

Polysaccharide	1% (m/m)	5% (m/m)	Polysaccharide	1% (m/m)	5% (m/m)
Gomme de guar		Non réalisé	Alginat d'ammonium		
Gomme de Caroube		Non réalisé	Alginat de sodium		
xyloglucane		Non réalisé	Xylane (MGX)		
ι-carraghénane		Limite technique	Arabinoxylane		
κ-carraghénane		Limite technique	Agar-agar		Limite technique
Légende			Xanthane		Limite technique

**Tableau III.1 Comportements macroscopiques observés à  $T_{amb}$  après introduction de polysaccharides à 1 et 5% (m/m) dans FGE115 pendant 15h à 80°C. Les polysaccharides sur fond vert répondent aux critères de sélection choisis et ceux sur fond rose sont éliminés.**

La concentration de 5% (m/m) a également été testée pour ces carraghénanes. Mais, dans les deux cas, les mélanges deviennent rapidement très visqueux et il devient impossible de les agiter avec un simple barreau magnétique, même à 80°C. Dans ces conditions, nous ne pouvons pas discuter de la solubilité des carraghénanes à une concentration de 5% (m/m). Malgré cette limitation technique, ces essais ont fait apparaître qu'il est possible d'obtenir un comportement de type gel avec ces deux carraghénanes pour des concentrations en polysaccharide inférieures à 5% (m/m). A ce stade, les deux types de carraghénanes sont donc retenus. La dispersion des sels d'alginate à 1% (m/m) n'est pas problématique et une agitation régulière à 80°C permet d'obtenir des solutions homogènes et limpides. L'observation macroscopique des échantillons obtenus avec les deux alginate à 1% (m/m) fait apparaître une différence de couleur très importante selon le sel d'alginate utilisé. Lorsque l'alginate d'ammonium est utilisé, la solution obtenue est orange foncé ; tandis qu'avec l'alginate de sodium, la solution obtenue est légèrement jaune. Cette observation a été confirmée après incorporation de 5% (m/m) de polysaccharide. Une solution de couleur brune très visqueuse mais coulante est obtenue avec le sel d'ammonium alors qu'une solution très visqueuse ne s'écoulant pas spontanément est obtenue avec le sel de sodium.

La nature du contre ion semble avoir un impact direct sur la coloration du mélange et à ce stade, l'alginate d'ammonium est abandonné au profit de l'alginate de sodium. Le 4-O-méthyle-D-glucorono-D-xylane (MGX) et l'arabinoxylane se dispersent également rapidement dans FGE115. A 1% (m/m), les solutions obtenues sont limpides et on observe une différence de couleur marquée entre les deux solutions. Comme attendu, cette différence est encore plus marquée à 5% m/m. Dans le cas du MGX à cette concentration, un liquide visqueux orange et turbide est obtenu, ce qui indique qu'il est impossible d'obtenir un comportement de type gel avec une concentration inférieure à 5% (m/m). Pour l'arabinoxylane, un mélange homogène de couleur orange ne s'écoulant pas spontanément est obtenu après incorporation de 5% (m/m). Ce polysaccharide semble donc prometteur pour gélifier le solvant FGE115. Enfin, les mélanges obtenus avec l'agar-agar et le xanthane à 1% (m/m) sont légèrement turbides mais ne s'écoulent pas spontanément. Expérimentalement, nous avons remarqué que leur incorporation est plus difficile que pour les autres polysaccharides. Cela est certainement dû à une masse molaire plus élevée. Ce point sera vérifié par la suite. Pour ces deux polysaccharides, le protocole de préparation ne permet pas d'étudier la concentration de 5% (m/m) car les mélanges deviennent rapidement trop visqueux pour être agités dans de bonnes conditions.

#### III.1.2.4 Conclusions sur la sélection des polysaccharides

Comme attendu, la structure chimique et la concentration en polysaccharide sont des paramètres clés pour l'obtention d'échantillons qui ne s'écoulent pas instantanément. Dans une optique de développement industriel, l'étude plus approfondie des polysaccharides permettant l'obtention de comportements macroscopiques de type gel pour une concentration inférieure ou égale à 5% (m/m) seront priorisés. Ainsi, parmi les 6 polysaccharides répondant favorablement aux critères de sélection (fond vert dans le tableau III.1), l'agar-agar et la gomme xanthane sont les seuls permettant l'obtention de mélanges ne s'écoulant pas spontanément dans FGE115 à 1% (m/m). Ces deux polysaccharides sont donc retenus pour la suite. Toutefois, la littérature indique que la caractérisation de la structure de l'agar-agar est complexe et qu'il existe une grande variabilité de structures parmi ces polysaccharides <sup>[17]</sup>. Ce dernier sera par conséquent retenu uniquement pour les essais applicatifs visant à étudier la gélification d'extraits végétaux obtenus avec le solvant FGE115 (Chapitre IV). Afin de favoriser la diversité de structure, nous avons choisi de ne retenir qu'une seule forme de carraghénane, la forme kappa. Ce choix a été guidé par les observations réalisées expérimentalement qui confirment que des gels plus cohésifs sont obtenus avec la forme kappa. L'alginate de sodium est également retenu puisqu'il est en adéquation avec nos projections industrielles et les critères de sélection. Malgré les résultats prometteurs obtenus avec l'arabinoxylane, ce polysaccharide n'a pas été retenu pour la suite. En effet, l'arabinoxylane est

beaucoup plus onéreux que les autres polysaccharides retenus. De plus, nous avons remarqué un développement bactérien rapide dans les mélanges eau + arabinoxylane. Même si le solvant FGE115 présente une bien meilleure stabilité microbologique que l'eau, les critères de coût et de stabilité microbienne éliminent l'arabinoxylane à ce stade. Finalement, suite à la prise en compte de l'ensemble des critères de sélection mentionnés précédemment, une liste réduite de quatre polysaccharides prioritaires a pu être établie :

1. la gomme xanthane,
2. l'alginate de sodium,
3. le  $\kappa$ -carraghénane,
4. l'agar-agar (uniquement pour la partie applicative).

Chacun des trois premiers polysaccharides sera étudié dans une partie spécifique dans la suite de ce chapitre. Pour chacun d'eux, des compléments de recherche bibliographiques seront réalisés afin d'identifier l'origine et le comportement en solution aqueuse de ces polysaccharides. Cela nous permettra de discuter la faisabilité d'obtenir des gels après incorporation de ces polysaccharides dans FGE115 et de les comparer aux mélanges aqueux décrits dans la littérature. Mais avant cela, les observations macroscopiques réalisées jusqu'ici ont fait apparaître une coloration pour l'ensemble des échantillons préparés dans le FGE115 (Tableau III.1). Or, et comme le montre la figure III.3 pour le xyloglucane et les carraghénanes à 1% (m/m), cette coloration n'a pas été observé pour les mélanges préparés dans l'eau avec le même protocole (15h à 80°C). L'hypothèse la plus probable expliquant cette différence réside dans l'éventuelle dégradation du solvant FGE115 lors du traitement thermique. Ce point est discuté dans le paragraphe suivant.

Polysaccharide	1% (m/m) dans FGE115	1% (m/m) dans l'eau
xyloglucane		
$\lambda$ -carraghénane		
$\kappa$ -carraghénane		

**Figure III.3 Comportements macroscopiques observés à température ambiante après solubilisation de polysaccharides à 1% (m/m) dans FGE115 et dans l'eau pendant 15h à 80°C.**

---

### III.1.3 Stabilité du solvant FGE115 lors d'un chauffage prolongé

La littérature indique qu'un des produits de dégradation du fructose est le 5-(hydroxyméthyle)-2-furaldéhyde (HMF). Cette dégradation conduit à l'obtention de solutions jaunes <sup>[18]</sup>. Pour le vérifier, des analyses RMN et des dosages HPLC ont été réalisées après un chauffage prolongé du FGE115.

---

#### III.1.3.1 Méthodes de préparation et de caractérisation

##### III.1.3.1.1 Analyses RMN

Le solvant FGE115 est préparé dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre II (II.2.2.2) soit un chauffage d'une heure à 50°C sous agitation. La quantité nécessaire à l'analyse RMN est prélevée et placée dans un tube de 5mm. L'utilisation d'un insert coaxial permet d'utiliser une référence externe (solution à 2,5% (m/m) de TSPD<sub>4</sub> dans D<sub>2</sub>O) sans diluer l'échantillon. Après introduction du tube, celui-ci est chauffé à 80°C dans la sonde. Une série de spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sont enregistrés toutes les heures afin de faire un suivi en fonction du temps à 80°C.

##### III.1.3.1.2 Analyses par chromatographie liquide à ultra-haute pression (UHPLC)

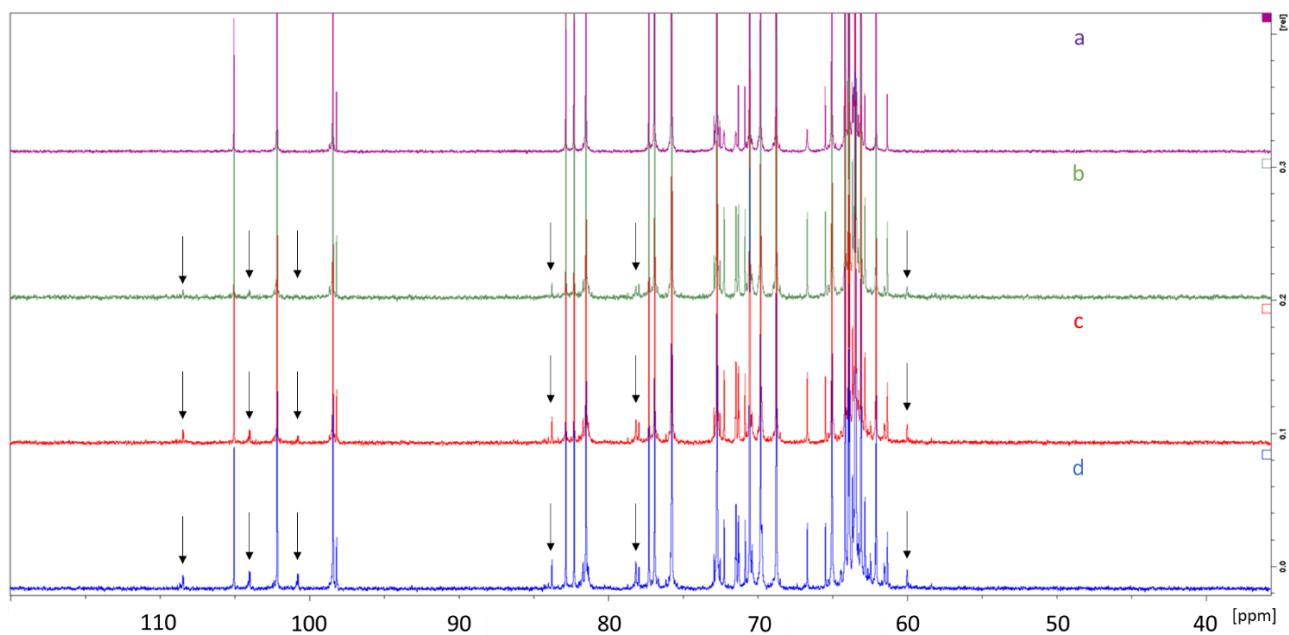
Des préparations spécifiques du solvant FGE115 ont été réalisées à 80°C avec des temps de chauffage variants entre 1h à 24h. La quantification du 5-(hydroxyméthyle)-2-furaldéhyde (HMF) est réalisée par UHPLC avec une détection UV. Une colonne Waters HSS C18 – 1.8μ - 150 mm n°50A est utilisée et la calibration est réalisée à partir d'une solution mère à 8,05mg de HMF dans 50mL d'eau et de solutions filles correspondant à des dilutions successives au demi. Dans ces conditions, le HMF présente un temps de rétention de 2,8min et se caractérise par une absorption à  $\lambda_{\max} = 284$  nm. Grâce à cette courbe de calibration, nous avons pu quantifier la teneur en HMF généré pendant le traitement thermique à 80°C.

---

#### III.1.3.2 Effet de la température sur la dégradation du fructose dans FGE115

Dans la littérature, la déshydratation du fructose en milieu acide a été étudiée afin d'évaluer la faisabilité d'obtention de HMF et de furfural comparativement à d'autres sucres (sucrose, glucose, xylose, etc.) <sup>[18]</sup>. Une cascade de réactions de dégradation est reportée conduisant à l'obtention de HMF. D'après les travaux de Antal *et al.*, le mécanisme de dégradation du fructose comprendrait l'existence d'un cation fructofuranosyl qui permettrait de maintenir le sucre sous forme cyclique. Ces réactions sont généralement étudiées à haute température et en présence d'un acide (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou acide formique) <sup>[18]</sup>.

Nous n'avons pas identifié de publication traitant de la dégradation du fructose en phase aqueuse sans la présence d'acide. Dans notre cas, nous avons fait l'hypothèse que la dégradation du fructose était à l'origine de la coloration des mélanges FGE115 + polysaccharide après un traitement thermique de 15h à 80°C. Dans un premier temps, nous avons suivi l'évolution dans le temps de l'allure des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  d'un mélange FGE115 chauffé à 80°C. Les acquisitions successives effectuées toutes les heures pendant 24h ont permis de détecter la présence de produits de dégradation en quantité significative. Sur la figure III.4, on remarque qu'après 8h à 80°C (spectre b), des pics supplémentaires non présents sur le spectre réalisé juste après l'atteinte de la consigne en température à 80°C (spectre a) apparaissent.



**Figure III.4** Etude de dégradation du solvant FGE115 à 80°C réalisée par RMN  $^{13}\text{C}$ . Les spectres correspondent à différents temps de chauffage à 80°C : a = t<sub>0</sub> ; b = 8h ; c = 15h et d = 24h.

Le (ou les) produit(s) de dégradation qui apparaissent sur la figure III.4 se caractérise par : un pic à 60 ppm, deux signaux vers 78 ppm, puis 4 autres pics respectivement à 84, 101, 104 et 108 ppm. Lorsque le solvant est chauffé à 80°C pendant 15h (spectre c), l'intensité de ces pics augmente mais nous n'avons pas détecté de nouveaux pics comparativement au spectre b. Enfin, le spectre obtenu après 24h (spectre d) est très proche de celui obtenu après 15h de chauffage à 80°C. Ces pics ne peuvent être reliés à ceux décrits dans les travaux de caractérisation du HMF par Dibenedetto *et al.* [19]. Nous n'avons pas approfondi l'identification de la ou des structures caractéristiques de ces signaux par RMN mais nous nous sommes tournés vers des analyses UHPLC-UV pour suivre la teneur en HMF en fonction du temps.

Dans les conditions d'analyse, un pic présentant un temps de rétention équivalent au HMF est retrouvé pendant le traitement thermique à 80°C. La teneur en HMF a ainsi pu être quantifiée via la courbe de calibration et les résultats du dosage sont regroupés dans le tableau III.3.

FGE 115	Temps de préparation à 80°C	Teneur en HMF (en mg/100g)
D18282 E1	Témoin FGE 115	0.1
D18282 E2	2 h	0.2
D18282 E3	3 h	0.2
D18282 E4	4 h	0.2
D18282 E5	15 h	8.3
D18282 E6	24 h	1.7

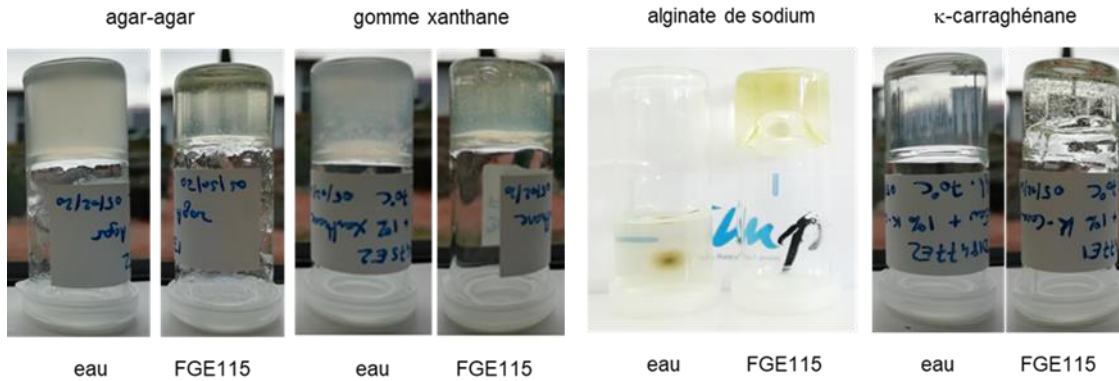
**Tableau III.2 Suivi de la teneur en HMF par HPLC-UV lors du chauffage à 80°C pendant 24h du solvant FGE115**

La teneur en HMF la plus élevée est obtenue après 15 heures de chauffage. On remarque que pendant les quatre premières heures de chauffage à 80°C, la teneur en HMF reste très faible ( $\leq 2$  ppm). L'apparition du HMF en quantité significative se produit donc entre 4 et 15 heures de chauffage à 80°C. Après 24 heures de chauffage à 80°C, on constate une baisse importante de la teneur en HMF et l'apparition d'un autre pic à 2,1 min ( $\lambda_{\max}$  à 296 nm). Ce pic présente une intensité très faible après 15 heures de chauffage mais son intensité est multipliée par 4 entre 15h et 24h de chauffage. Ce composé n'a pu être quantifié faute d'étalon mais il s'agit sans doute d'un produit de dégradation du HMF. Après 24h à 80°C, ce composé est majoritaire. Il apparaît donc que le protocole de préparation des mélanges polysaccharides + FGE115 peut être optimisé afin de limiter au maximum ce phénomène de dégradation du FGE, et notamment du fructose.

### III.1.3.3 Etudes complémentaires et adaptation du protocole de préparation

Un second protocole de préparation de mélanges FGE115 + polysaccharides a été réalisé afin de vérifier qu'un contrôle de la couleur des échantillons était possible en adaptant le temps et la température de préparation. La température de mélange est abaissée à 70°C et le temps de mélange diminué à 4h pour éviter la dégradation du fructose. L'inertage du flacon à l'argon a également été supprimé car cette étape ne sera pas transposable pour Gattefossé. Seule la concentration de 1% (m/m) de polysaccharide a été conservée pour cette seconde phase. La comparaison avec l'eau est quant à elle maintenue afin de mettre en évidence des différences de comportement macroscopique. La figure III.5 présente les résultats obtenus après retour à  $T_{amb}$  et 48h de stockage.





**Figure III.5 Photographies des échantillons obtenus après incorporation dans l'eau et dans FGE115 de polysaccharides (1% m/m), chauffage à 70°C pendant 4h et retour à  $T_{amb}$**

Dans ces conditions ( $C = 1\%$  (m/m),  $T = 70^{\circ}\text{C}$ ,  $t = 4\text{h}$ ), l'ajout d'agar-agar ou de gomme xanthane conduit à des échantillons monophasiques turbides dans l'eau et dans FGE115, avec toutefois une turbidité moins marquée dans FGE115. Indépendamment du solvant, ces échantillons ne s'écoulent pas spontanément après retournement du flacon. Dans le cas de l'alginate de sodium, une solution liquide, incolore et peu visqueuse est obtenue dans l'eau alors qu'une solution légèrement jaune et visqueuse est obtenue dans FGE115. La coloration observée s'explique par la présence d'acide alginique qui doit favoriser la dégradation du fructose. La solution obtenue dans FGE115 s'écoule après quelques minutes d'observation. On note également que seulement 2 jours après la fabrication, la solution aqueuse d'alginate présente un développement bactérien visible à l'œil nu, ce qui n'est pas le cas dans le FGE115. Une attention particulière sera apportée à ce point lors des essais applicatifs (Chapitre IV). En ce qui concerne le  $\kappa$ -carraghénane, le mélange ne s'écoule pas spontanément et cela dans les deux solvants. L'échantillon en FGE115 comprend des bulles car le mélange est très visqueux même à  $70^{\circ}\text{C}$  et une agitation rigoureuse est nécessaire pour garantir l'homogénéité du mélange. Ces essais d'optimisation du protocole de préparation des mélanges polysaccharides + FGE115 montrent qu'il est possible de limiter la dégradation du fructose, et donc la coloration du mélange, en adaptant la température et le temps de chauffage.

### III.1.4 Conclusion et sélection de quatre polysaccharides

Parmi les différents polysaccharides intégrés dans le premier protocole de mélange, une liste réduite de quatre candidats répondant favorablement aux divers critères de sélection a pu être établie (Tableau III.1). Parmi eux, trois polysaccharides sortent du lot et ont été sélectionnés pour la suite de ces travaux :

- **la gomme xanthane**, très utilisée en cosmétique, permet l'obtention de mélanges ne s'écoulant pas spontanément avec une concentration en polysaccharide de 1% (m/m).

- **l'alginate de sodium**, très soluble dans FGE115 permet l'obtention de solutions visqueuses et non de gels. Le mécanisme de gélification en solution aqueuse de l'alginate de sodium nécessite l'ajout de cations divalents. Il semble donc très intéressant d'étudier si ce mécanisme de gélification peut être réalisé dans le solvant FGE115.

- **le  $\kappa$ -carraghénane** utilisé à des concentrations  $\geq$  à 1% (m/m) dans FGE115 conduit à des mélanges transparents, homogènes et qui ne s'écoulent pas spontanément. Ces mélanges semblent présenter des propriétés mécaniques bien supérieures à celles obtenues avec les autres polysaccharides. Il s'agit donc d'une voie prometteuse pour obtenir des gels massifs et résistants.

- **l'agar-agar** permet également d'obtenir des gels à faible concentration dans FGE115. Cependant, la caractérisation précise de la structure de ce polysaccharide est complexe. Ce polysaccharide ne fera pas l'objet d'une étude approfondie comme pour les trois autres polysaccharides mais sera tout de même conservé pour les essais applicatifs visant à gélifier des extraits végétaux obtenus avec le solvant FGE115 (Chapitre IV).

Ainsi et hormis l'agar-agar, chacun des trois polysaccharides sélectionnés sera étudié séparément. Pour chacun d'eux, des compléments de recherche bibliographiques seront réalisés afin d'identifier l'origine et le comportement en solution aqueuse de ces polysaccharides. Cela nous permettra de discuter la faisabilité d'obtenir des gels après incorporation de ces polysaccharides dans FGE115 et de les comparer aux hydrogels décrits dans la littérature. La suite de ce chapitre et donc divisée en trois sous-parties traitant de l'incorporation respectivement de la gomme xanthane, de l'alginate de sodium et du  $\kappa$ -carraghénane dans FGE115.

### III.1.5 Références bibliographiques

- [1] Zong A., Cao H., Wang F. Anticancer polysaccharides from natural resources: a review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90, 4, pp. 1395–1410.
- [2] Prasher P., Sharma M., Mehta M., et al. Current-status and applications of polysaccharides in drug delivery systems. *Colloid and Interface Science Communications*, 2021, 42, pp. 100418.
- [3] Tafuro G., Costantini A., Baratto G., et al. Characterization of Polysaccharidic Associations for Cosmetic Use: Rheology and Texture Analysis. *Cosmetics*, 2021, 8, 3, pp. 62.
- [4] Guilherme M. R., Aouada F. A., Fajardo A. R., et al. Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. *European Polymer Journal*, 2015, 72, pp. 365–385.
- [5] Nechita P., Roman M. Review on Polysaccharides Used in Coatings for Food Packaging Papers. *Coatings*, 2020, 10, 6, pp. 566.
- [6] Wijaya W., Patel A. R., Setiowati A. D., et al. Functional colloids from proteins and polysaccharides for food applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 68, pp. 56–69.
- [7] Jindal N., Singh Khattar J. Microbial Polysaccharides in Food Industry. In: Grumezescu A. M.; Holban A. M. *Biopolymers for food design*. London, United Kingdom. Academic Press an imprint of Elsevier. 2018, pp. 95–123. ISBN 9780128114490.
- [8] Pu W., Shen C., Wei B., et al. A comprehensive review of polysaccharide biopolymers for enhanced oil recovery (EOR) from flask to field. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2018, 61, pp. 1–11.
- [9] Karaki N., Aljawish A., Humeau C., et al. Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review. *Enzyme and microbial technology*, 2016, 90, pp. 1–18.
- [10] Serra J. P., Fernandes L. C., Correia D. M., et al. Environmentally friendly carrageenan-based ionic-liquid driven soft actuators. *Materials Advances*, 2022, 3, 2, pp. 937–945.
- [11] Tran Nu Thanh Viet Bui Structure, Rheological Properties and Connectivity of Gels Formed by Carrageenan Extracted from different Red Algae Species. *Organic Chemistry*. Université du Maine. 2019.
- [12] Guibet Marion Analyse structurale des carraghénanes par hydrolyse enzymatique. 2007.
- [13] Zeng C., Zhao H., Wan Z., et al. Highly biodegradable, thermostable eutectogels prepared by gelation of natural deep eutectic solvents using xanthan gum Preparation and characterization. *RSC Advances*, 2020, 10, 47, pp. 28376–28382.
- [14] Xia H., Ren M., Zou Y., et al. Novel Biocompatible Polysaccharide-Based Eutectogels with Tunable Rheological, Thermal, and Mechanical Properties: The Role of Water. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25, 15,
- [15] Depoorter J., Mourlevat A., Sudre G., et al. Fully Biosourced Materials from Combination of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents and Guar Gum. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7, 19, pp. 16747–16756.
- [16] Depoorter J. Utilisation de solvants eutectiques profonds et de dérivés liquides ioniques pour la conception de nouveaux matériaux. *Matériaux*. IMP. Université de Lyon. 2021.
- [17] Usov A. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids*, 1998, 12, 3, pp. 301–308.
- [18] Antal M. J., Mok W. S., Richards G. N. Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from d-fructose and sucrose. *Carbohydrate research*, 1990, 199, 1, pp. 91–109.
- [19] Dibenedetto A., Aresta M., Di Bitonto L., et al. Organic Carbonates: Efficient Extraction Solvents for the Synthesis of HMF in Aqueous Media with Cerium Phosphates as Catalysts. *ChemSusChem*, 2016, 9, 1, pp. 118–125.

### III.1.6 Liste des figures et des tableaux

FIGURE III.1 STRUCTURES DES POLYSACCHARIDES NATURELS INTEGRES DANS CETTE ETUDE .....	125
FIGURE III.2 PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE PREPARATION DES MELANGES FGE115 + POLYSACCHARIDES .....	127
TABLEAU III.1 COMPORTEMENT MACROSCOPIQUES OBSERVES A TEMPERATURE AMBIANTE APRES SOLUBILISATION DE POLYSACCHARIDES A 1 ET 5% (M/M) DANS FGE115 PENDANT 15H A 80°C. LES POLYSACCHARIDES SUR FOND VERT REPONDENT AUX CRITERES DE SELECTION CHOISIS ET CEUX SUR FOND ROSE SONT ELIMINES. ....	128
FIGURE III.3 COMPORTEMENT MACROSCOPIQUES OBSERVES A TEMPERATURE AMBIANTE APRES SOLUBILISATION DE POLYSACCHARIDES A 1% (M/M) DANS FGE115 ET DANS L'EAU PENDANT 15H A 80°C. ....	130
FIGURE III.4 ETUDE DE DEGRADATION DU SOLVANT FGE115 A 80°C REALISEE PAR RMN <sup>13</sup> C.....	132
TABLEAU III.3 SUIVI DE LA TENEUR EN HMF PAR HPLC-UV LORS DU CHAUFFAGE A 80°C PENDANT 24H DU SOLVANT FGE115.....	133
FIGURE III.5 OBSERVATIONS DES ECHANTILLONS OBTENUS APRES INCORPORATION DANS L'EAU ET DANS FGE115 DE POLYSACCHARIDES (1% M/M), CHAUFFAGE A 70°C PENDANT 4H ET RETOUR A $T_{AMB}$ .....	134

## III.2 Incorporation de xanthane dans le FGE115

### III.2.1. Origine, structure et comportement du xanthane en solution

Découvert dans les années 60, le polysaccharide B-1459 a été obtenu par fermentation aérobique du glucose par la bactérie *Xanthomonas campestris* [1]. D'après les auteurs, cet exo-polysaccharide conduit à des dispersions homogènes dans l'eau présentant des propriétés rhéologiques comparables à celles des gommages végétales. Ces propriétés ont rapidement été reliées à la structure remarquable de ce composé (figure III.2.1) [2].

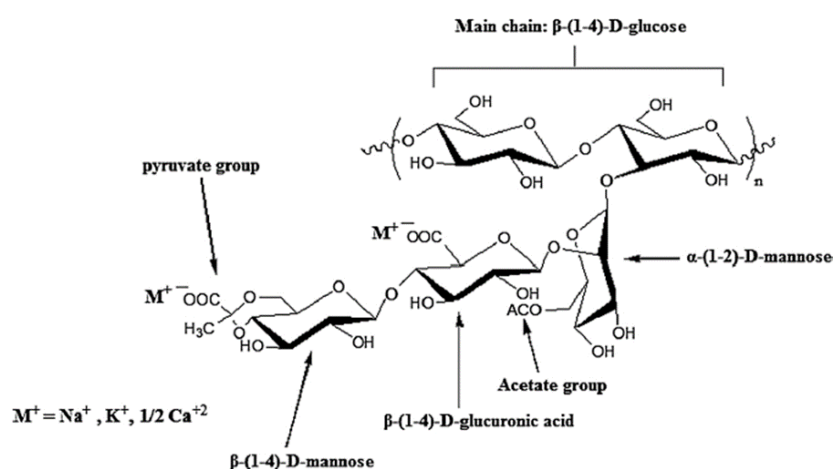


Figure III.2.1 Structure chimique de la gomme xanthane [2]

La figure III.2.1 indique que le xanthane possède une structure primaire pentasaccharidique. La chaîne principale est composée d'un enchaînement d'unités D-glucopyranosyle liées entre elles par des liaisons glycosidiques de type β(1-4). Des ramifications sont retrouvées toutes les deux unités sucre (en O<sub>3</sub> du glucose). Chaque ramification forme une chaîne latérale composée de trois sucres : un acide D-glucuronique relié par une liaison de type α(1-2) au mannose lié à la chaîne principale et par une liaison de type β(1-4) avec le mannose terminal. Certaines des unités mannose reliées au glucose sont substituées par des groupements acétate alors que des groupements pyruvate sont retrouvés sur le mannose terminal. Il s'agit donc d'un polysaccharide anionique dont les contre-ions caractéristiques sont : Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. Comparativement aux polysaccharides extraits de matières premières végétales, l'origine bactérienne du xanthane lui confère une structure présentant peu de variabilité. Pour améliorer les propriétés ou élargir les domaines d'applications du xanthane, différents types de fonctionnalisation (carboxyméthylation, greffage de groupements hydrophobes, copolymérisation, etc.) ont été envisagées dans la littérature [2].

Cependant, il existe tout de même une variabilité structurelle entre les diverses gommexanthane disponibles dans le commerce. D'une part, il a été démontré que d'autres bactéries de type *Xanthomonas* peuvent conduire à l'obtention de xanthane par voie fermentaire [3], et, d'autre part, la structure du xanthane est directement reliée aux conditions de culture des bactéries (milieu de culture, pH, température, nutriments) et au procédé d'obtention (post-fermentation) [4]. La figure III.2.2 issue des travaux de thèse d'Audrey Roy reprend les principales étapes du procédé discontinu d'obtention du xanthane [5].

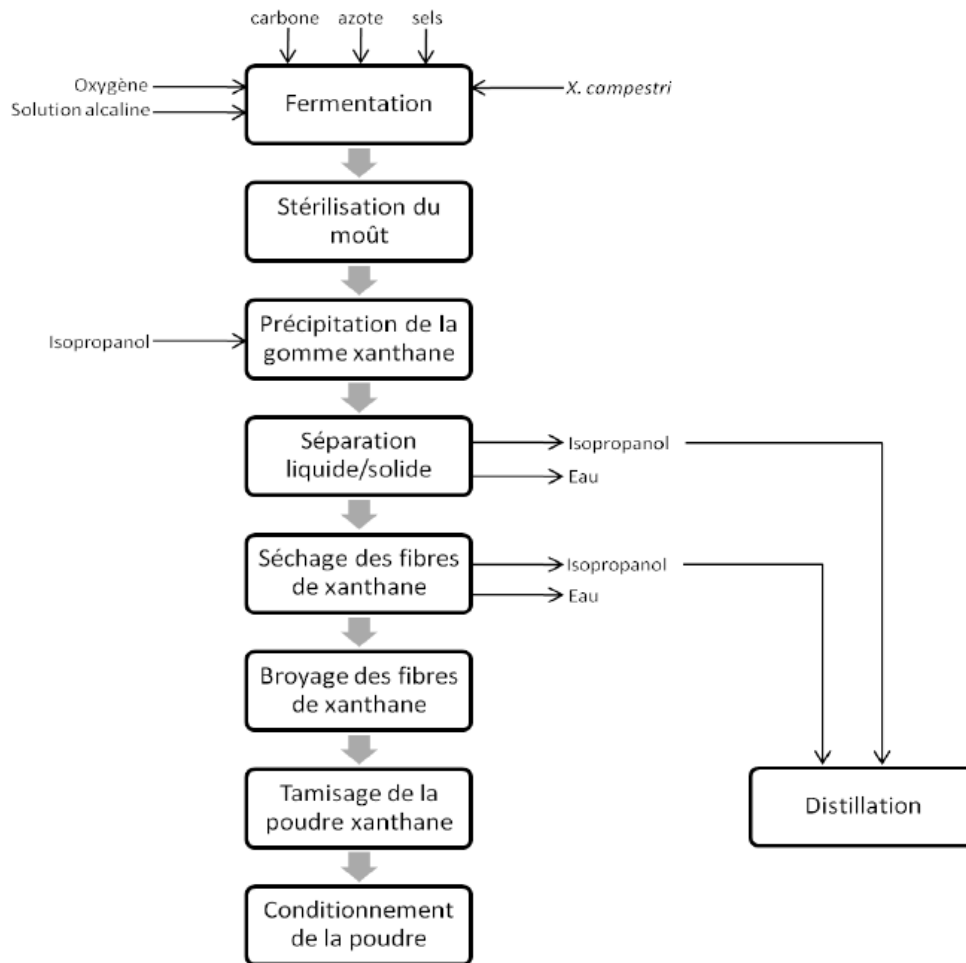


Figure III.2.2 Procédé de production industrielle de xanthane [5]

Depuis le premier lot industriel réalisé en 1964, les industriels ont continuellement optimisé et adapté les procédés d'obtention du xanthane pour répondre à une demande croissante. Une synthèse de ces avancées a été récemment publiée par Bhat *et al.* [6] D'après les auteurs, le xanthane est le polysaccharide d'origine bactérienne le plus produit dans le monde. La production annuelle, estimée à 30 000 tonnes en 2011 [7], est en constante progression.

La diversité des procédés et des souches bactériennes utilisées pour l'obtention de xanthane fait apparaître la nécessité de caractériser la poudre de xanthane préalablement à son utilisation. Les principaux éléments à vérifier sont : la teneur en eau déterminée par analyse thermogravimétrique (ATG), la masse molaire caractérisable par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) [8] et la teneur en groupements acétate et pyruvate qui est quantifiable par RMN [9]. Concernant le comportement du xanthane en solution, la littérature indique que ce polysaccharide permet d'augmenter significativement la viscosité des solutions aqueuses même à des concentrations très faibles. Une étude de Milas *et al.* rapporte les viscosités obtenues pour des solutions aqueuse de NaCl (0,1N) en fonction de la concentration et de la masse molaire du xanthane (figure III.2.3) [10].

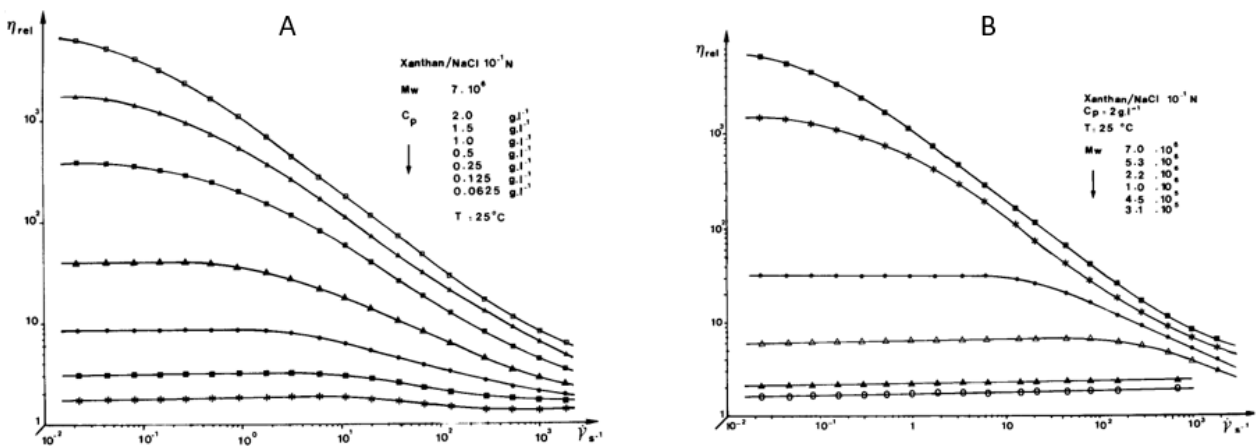


Figure III.2.3 Courbes d'écoulement de solutions aqueuses de NaCl (0,1N) obtenues après ajouts de xanthane ( $M_w = 7.10^6$  g/mol) à différentes concentrations (A) ou de différentes masses molaires à une concentration de 2 g/L(B) [10]

On remarque sur la figure III.2.3A que pour toutes les concentrations, les courbes présentent un plateau newtonien à faible vitesse de cisaillement puis un régime de rhéofluidification. Ce caractère rhéofluidifiant dépend très fortement de la concentration. En régime dilué ( $C < C^*$ ), un second plateau Newtonien est observé à haute vitesse de cisaillement. Ce second plateau disparaît dans le régime semi-dilué non enchevêtré ( $C^* < C < C_e$ ) et le premier plateau Newtonien est de moins en moins visible. Le comportement rhéofluidifiant devient encore plus marqué lorsque le xanthane est en régime semi-dilué enchevêtré ( $C > C_e$ ). Dans les conditions d'analyses de Milas *et al.*, les concentrations séparant les différents régimes dans une solution aqueuse de NaCl (0,1N) sont donc  $C^* \approx 0,13$  g/L et  $C_e \approx 0,78$  g/L pour un xanthane dont la masse molaire est très élevée :  $7.10^6$  g/mol. Sur la figure III.2.3B, on remarque que la viscosité des solutions diminue fortement lorsque la masse molaire du xanthane diminue. En deçà d'une certaine masse molaire, ici  $M_w < 1.10^6$  g/mol, le caractère rhéofluidifiant disparaît et la solution se comporte comme un fluide Newtonien même pour une concentration de 2 g/L.

Le comportement rhéofluidifiant est souvent observé pour les solutions de polymères en régime semi-dilué. Il est dû, le plus souvent, au désenchevêtrement des chaînes sous l'effet du cisaillement. Or, dans le cas du xanthane, le caractère rhéofluidifiant est présent dès le régime dilué. Cela indique que le comportement de ce polysaccharide en solution n'est pas régi par de simples enchevêtrements topologiques. La rigidité importante du xanthane peut être à l'origine de cette forte tendance à la rhéofluidification : sous l'effet du cisaillement, les chaînes semi-rigides s'alignent dans le sens de l'écoulement. Plus récemment, les travaux de Zhong *et al.* ont étudié l'impact de la force ionique en augmentant progressivement la concentration en sel (NaCl ou CaCl<sub>2</sub>)<sup>[11]</sup>. Pour des solutions faiblement concentrées en xanthane ( $C < 0.6$  g/L) et indépendamment du sel ajouté, les auteurs ont mis en évidence une diminution de la viscosité de la solution avec l'augmentation de la concentration en sel. Pour une solution concentrée en xanthane ( $C = 5$  g/L), l'augmentation de la force ionique engendre une augmentation de la viscosité de la solution. Les effets de la concentration en sel sur la viscosité peuvent être expliqués par les différentes conformations que le xanthane adopte en solution. Dans les années 80, les scientifiques pensaient que le xanthane pouvait adopter soit une forme ordonnée, soit une forme désordonnée en solution<sup>[12]</sup>. Dans la conformation ordonnée, les chaînes latérales sont repliées et associées au squelette, formant ainsi une conformation en hélice. A l'inverse, une conformation désordonnée (ou étendue) est obtenue lorsque les chaînes latérales s'éloignent du squelette. Dans ce cas, le polysaccharide occupe un plus grand volume hydrodynamique. À faible concentration de xanthane ( $C < C^*$ ), l'ajout de sel neutralise les charges ioniques des chaînes de xanthane qui adoptent une conformation hélicoïdale. L'ajout de sel réduit le volume hydrodynamique des chaînes et donc la viscosité de la solution. Au contraire, lorsque la concentration en xanthane est importante, les chaînes interagissent entre elles et peuvent s'enchevêtrer ( $C > C_e$  ou  $C_e$  délimite le régime semi-dilué enchevêtré). Dans ce cas, l'ajout de sel serait à l'origine de pontages ioniques créant ainsi une "réticulation" ionique inter ou intramoléculaire et donc un réseau encore plus rigide. L'augmentation de la force ionique augmente par conséquent la viscosité de la solution. Plus récemment et avec l'essor des techniques de caractérisation, différents travaux suggèrent que la variation de conformation du xanthane est un phénomène bien plus complexe qui dépend de la masse molaire, de la température, de la force ionique, de la nature des électrolytes, du pH et de la distribution des groupements acétate et pyruvate<sup>[11]; [13]–[15]</sup>. Ces constatations ont donné lieu à l'émergence d'un modèle plus global présenté en figure III.2.4. Ce modèle considère que la forme native du xanthane est une double hélice constituée de deux brins appariés dont la longueur dépend de la masse molaire. En fonction des conditions opératoires, différentes dissociations peuvent se produire.



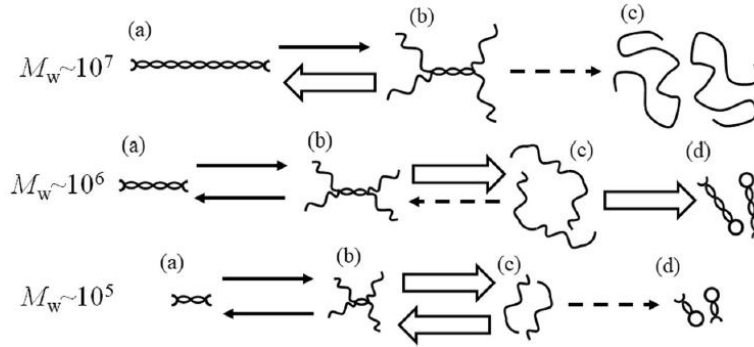


Figure III.2.4 Modèle généralisé des conformations que peut prendre le xanthane en solution aqueuse en présence de sels <sup>[15]</sup>

Une dissociation totale de la double hélice en deux brins isolés peut se produire si le xanthane subit un traitement thermique prolongé en milieu dilué avec de très faibles concentrations en sel ( $[\text{NaCl}] < 10^{-4} \text{ M}$ ). Lorsque les conditions de dénaturation ne sont pas suffisantes pour assurer une dissociation totale de la double hélice, des conformations dénaturées et renaturées intermédiaires entre la double hélice native et le simple brin dénaturé sont alors observées. La forme désordonnée consiste alors en une succession de zones désordonnées de type pelote maintenues ensemble par des « nœuds » de doubles hélices qui forment des têtes d'épingle. On retiendra ici que la température de transition conformationnelle ( $T_m$ ), est influencée par la force ionique du milieu, le pH ou encore par la teneur en acétate et pyruvate au sein du polysaccharide. Cela complique la comparaison entre les données de la littérature lorsque que la description du xanthane n'est pas discutée par les auteurs. Le comportement du xanthane en l'absence de sel, c'est-à-dire quand ce polymère est sous forme désordonnée, est très différent de celui discuté jusqu'ici dans des solutions contenant un sel. Il existe d'ailleurs très peu d'exemples dans la littérature concernant les domaines de concentration du xanthane en l'absence de sel. A notre connaissance, seules deux publications traitant des propriétés rhéologiques des solutions de xanthane sans sel ajouté ont été publiées <sup>[11]; [16]</sup>. Dans la première, Zhong *et al.* rapportent que la viscosité des solutions augmente linéairement en fonction de la concentration en xanthane entre 0,3 et 2 g/L.

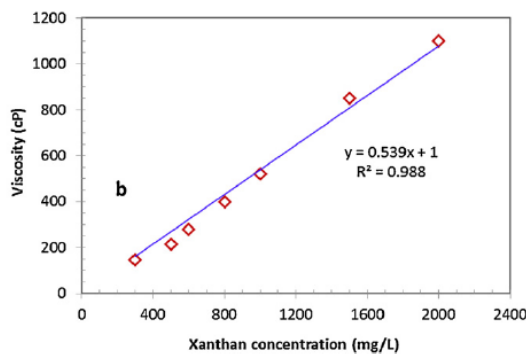
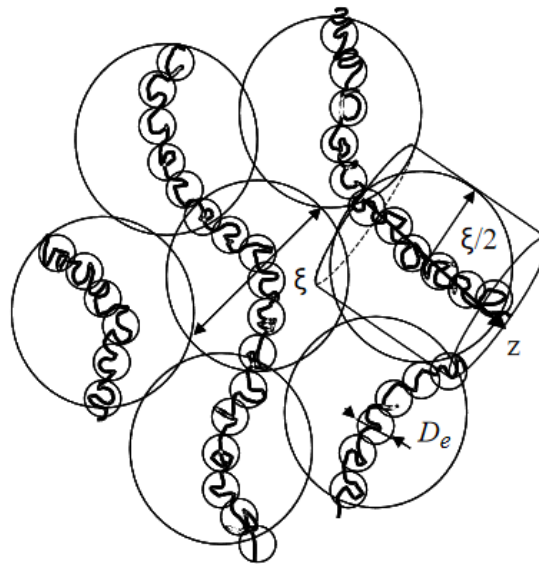


Figure III.2.5 Viscosité à faible taux de cisaillement ( $0,3 \text{ s}^{-1}$ ) pour plusieurs concentrations de xanthane dans de l'eau désionisée, issue de Zhong *et al.* <sup>[11]</sup>

D'après les travaux de Wyatt *et al.*, l'évolution de la viscosité en fonction de la concentration en xanthane ( $M_w = 2.10^6$  g/mol) dans l'eau sans sel ajouté se caractérise par quatre régimes distincts <sup>[16]</sup> : le régime dilué (pour  $C < C^*$  avec  $C^* \approx 0,007$  g/L), le régime semi-dilué non enchevêtré ( $C^* < C < C_e$  avec  $C_e \approx 0,4$  g/L), le régime semi-dilué enchevêtré ( $C_e < C < C_D$  avec  $C_D \approx 2$  g/L) et le régime concentré ( $C > C_D$ ) dans lequel les blobs électrostatiques du xanthane se chevauchent. L'existence de ces blobs électrostatiques fait référence à la théorie de Dobrynin et Rubinstein sur les polyélectrolytes flexibles <sup>[17]</sup>. Selon ce modèle, les polyélectrolytes peuvent être décrits comme une succession de blobs électrostatiques, de longueur  $D_e$ , qui se repoussent les uns les autres. Pour une longueur inférieure à la longueur de corrélation  $\xi$ , les chaînes peuvent être visualisées comme des bâtonnets rigides de blobs électrostatiques. Au-dessus de  $\xi$  en revanche, les chaînes deviennent flexibles et sont modélisées par une marche aléatoire de blobs de corrélation (chaque blob de corrélation contient plusieurs blobs électrostatiques). L'illustration de cette théorie est reprise sur la figure III.2.6.



**Figure III.2.6** Représentation schématique d'un polyélectrolyte en régime semi-dilué <sup>[17]</sup>

Selon cette théorie, les polyélectrolytes présentent quatre domaines de concentration, délimités par trois concentrations critiques : la concentration de recouvrement des blobs de corrélation  $C^*$ , la concentration d'enchevêtrement  $C^{**}$  (ou  $C_e$ ) et la concentration de recouvrement des blobs électrostatiques ( $C_D$ ). D'après les travaux de Wyatt *et al.*, le comportement du xanthane dans l'eau sans sel obéit à cette théorie. Il semblerait donc que dans l'eau, le xanthane ne présente pas d'interactions spécifiques attractives entre les chaînes contrairement à ce qui a pu être observé en solution aqueuse en présence de sel.

La loi de puissance pour le régime semi-dilué enchevêtré dans ce modèle est :  $\eta \sim C^{1.5}$ . Cela explique pourquoi Zhong *et al.* ont établi une relation linéaire entre la viscosité des solutions de xanthane dans l'eau et la concentration entre 0,3 et 2 g/L (Figure III.2.5). Cette relation linéaire ne semble donc pas correcte et il s'agit plutôt d'une relation obéissant à une loi puissance comme décrit par Wyatt *et al.* (Figure III.2.7).

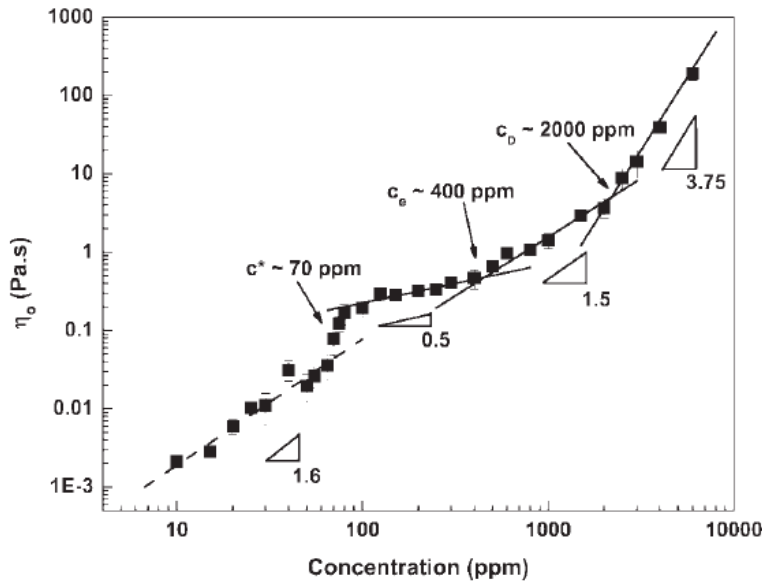


Figure III.2.7 Evolution de la viscosité en fonction de la concentration en xanthane dans l'eau et sans sel ajouté <sup>[16]</sup>

En conclusion, et bien que le comportement de la gomme xanthane en solution soit relativement complexe, tous les auteurs s'accordent sur un point : ce polysaccharide possède un fort pouvoir viscosifiant même à très faibles concentrations. Cette capacité couplée à un prix abordable ont fait que la gomme xanthane est devenue incontournable parmi les biopolymères industriels. De plus, son innocuité et son caractère non-sensibilisant font que ce polysaccharide est utilisable sans restriction par l'industrie agroalimentaire en tant qu'additif (stabilisateur, émulsifiant) sous le code E415. Le xanthane est également très utilisé en tant que stabilisant de formulations cosmétiques et pharmaceutiques <sup>[2]</sup>. Par ailleurs, l'utilisation de gomme xanthane, seule ou en mélange, pour la conception de matériaux d'ingénierie tissulaire connaît un intérêt grandissant <sup>[18]</sup>. De plus, ce polysaccharide a été décrit pour l'obtention d'eutectogel à la condition que de l'eau soit ajoutée <sup>[19]; [20]</sup> (cf. Chapitre I). Ces compléments de recherche bibliographique confirment que le xanthane présente tous les prérequis souhaités dans le cadre de cette thèse et, on se propose d'étudier son incorporation dans le solvant FGE115.

---

### III.2.2. Matériel et Méthodes

---

#### III.2.2.1 Caractérisation de la gomme xanthane

La poudre de xanthane utilisée dans le cadre de ce travail de thèse correspond au lot SLCD3849 approvisionnée auprès de Sigma-Aldrich. Cette poudre est intégrée dans le mélange FGE115 ou dans l'eau déionisée sans traitement préliminaire ni purification. En se basant sur les données collectées dans la littérature, cette poudre a été caractérisée comme suit :

- Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique de la poudre de xanthane est effectuée sur l'appareil TGA Q500 (TA instruments) en réalisant une rampe de chauffage entre 35 et 400°C à 10°C/min sous un flux d'azote (90 ml/min). Cette analyse permet de quantifier l'eau physisorbée à la poudre de xanthane.

- Analyses élémentaires par ICP-AES

L'analyse élémentaire de la poudre a été sous-traitée au laboratoire Filab et déterminée par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry) selon une méthode interne.

- Diffraction des rayons X (DRX)

Le diffractogramme de la poudre de xanthane a été enregistré au centre de diffractométrie Longchambon, Université Claude Bernard avec l'aide de Ruben Vera. Un diffractomètre Bruker D8-Advance équipé d'un détecteur LynxEye XE a été utilisé. Le tube à rayons X a fonctionné à 40 kV et 40 mA avec un rayonnement  $\text{CuK}\alpha$  ( $k = 1,5406\text{\AA}$ ).

- Chromatographie d'exclusion stérique (CES)

La masse molaire du xanthane a été déterminée par chromatographie d'exclusion stérique. L'appareillage utilisé comprend une chaîne Wyatt Technologies avec une triple détection. Une colonne PL aquagel OH mixed M 8 micro est utilisée. Le solvant de dissolution du polysaccharide est de l'eau déionisée filtrée à 0,1  $\mu\text{m}$ . Avant injection, l'échantillon (0,340 mg/mL d'eau) est filtré à 0,45  $\mu\text{m}$ . La phase mobile est une solution de  $\text{NaNO}_3$  à 0.1M ajustée à pH = 7. La température d'analyse est de 25°C, le débit est de 0,5 mL/min et le volume d'injection est de 20  $\mu\text{L}$ .

### III.2.2.2 Caractérisation des mélanges après incorporation de gomme xanthane

- Protocole de préparation des mélanges FGE115 + xanthane

La préparation des mélanges comprend deux étapes principales. La première étape correspond à la dispersion du xanthane dans le solvant à  $T_{amb}$ , sous agitation mécanique lente. L'ajout du xanthane est réalisé de manière très progressive pour éviter la formation d'amas de poudre très difficiles à disperser par la suite. Pour des concentrations en polysaccharide supérieures à 5 g/L, des essais d'ajustement du volume de liquide et de la hauteur du rotor ont été réalisés mais sans pouvoir éviter la formation de bulles dans ces solutions très visqueuses. La teneur en eau du xanthane a été prise en compte pour le calcul des quantités de polysaccharide à charger. La deuxième étape consiste en un chauffage à 70°C pendant 3 h du mélange dans un flacon fermé et sous agitation magnétique. Après refroidissement à  $T_{amb}$ , le barreau magnétique est retiré et le mélange stocké à l'abri de la lumière à  $T_{amb}$ .

- Spectroscopie Infra-rouge (IR)

Les spectres IR de la poudre de xanthane et des solutions de xanthane dans FGE115 ont été réalisés avec l'appareil Nicolet en mode ATR sur une plage de 4000 à 650  $\text{cm}^{-1}$ . Une analyse de l'air ambiant (background) est réalisée avant les séries de mesures afin d'être soustrait lors du retraitement des acquisitions.

- Calorimétrie Différentielle à balayage (DSC)

La caractérisation des propriétés thermiques des solutions de xanthane dans FGE115 est réalisée par DSC (DSC Q22 équipée d'un système de refroidissement à l'azote, TA instruments) sous atmosphère d'azote dans des capsules hermétiques en aluminium. Les échantillons sont analysés comme suit : (i) -140°C à 70°C – rampe de 10°C/min ; (ii) 70°C à -140°C – rampe de 10°C/min et (iii) -140°C à 70°C – rampe de 10°C/min.

- Propriétés rhéologiques

Un rhéomètre DHR-2 de TA instruments a été utilisé pour réaliser des mesures en écoulement et en oscillation. Les mesures ont été réalisées à 25°C avec une géométrie plan/plan de 40 mm de diamètre. Après un temps de stabilisation de 10 min avec maintien à 25°C, le suivi de la viscosité pour des taux de cisaillement entre 0,01  $\text{s}^{-1}$  et 100  $\text{s}^{-1}$  a été effectué. Des suivis de modules viscoélastiques en fonction de la fréquence ont également été réalisés dans les deux solvants (eau et FGE115). En ce qui concerne les mesures en oscillation, une vérification du domaine linéaire a tout d'abord été effectuée à une fréquence de 10Hz et pour des déformations entre 0,01% et 5%, puis un temps de stabilisation de 10 min a été appliqué, avant de réaliser un balayage en fréquence entre 0,01Hz et 10Hz avec un taux de déformation fixe de 1%.

### III.2.3. Résultats et discussion

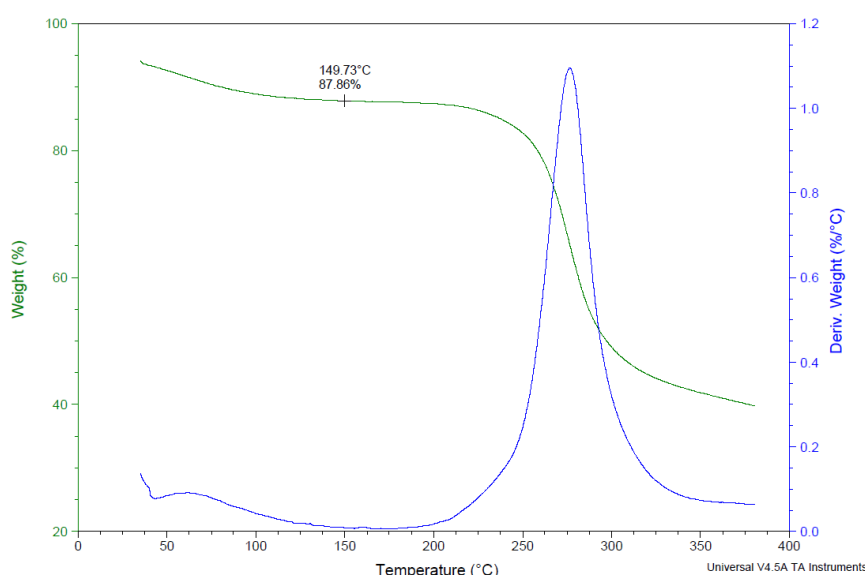
#### III.2.3.1 Caractérisation de la gomme xanthane

Comme indiqué précédemment, le xanthane est principalement commercialisé sous forme de poudre. Les travaux de García-Ochoa *et al.* regroupent les principales caractéristiques physico-chimiques des poudres de xanthane disponibles dans le commerce (Tableau III.2.1) [4].

Typical physical properties of commercial xanthan gum	
Property	Value
Physical state	Dry, cream-colored powder
Moisture (%)	8–15
Ash (%)	7–12
Nitrogen (%)	0.3–1
Acetate content (%)	1.9–6.0
Pyruvate content (%)	1.0–5.7
Monovalent salts (g L <sup>-1</sup> )	3.6–14.3
Divalent salts (g L <sup>-1</sup> )	0.085–0.17
Viscosity (cP)	13–35
(15.8 s <sup>-1</sup> , C <sub>p</sub> =1 g L <sup>-1</sup> , T <sub>D</sub> =25°C, T <sub>M</sub> =25°C)	

**Tableau III.2.1 Propriétés physiques des gommes de xanthane commercialisées** [4]

Le tableau III.2.1 fait apparaître que les gommes xanthane contiennent entre 8 et 15% (m/m) d'eau. Une analyse thermogravimétrique a été réalisée afin de quantifier l'eau physisorbée dans la poudre utilisée dans le cadre de cette thèse (Figure III.2.8).



**Figure III.2.8 Thermogramme obtenu lors de l'analyse ATG de la gomme xanthane**

Une première perte de masse entre 50 et 150°C est attribuable à la perte de l'eau physisorbée et une seconde perte de masse correspondant à la dégradation thermique du polysaccharide apparaît au-delà de 210°C. Ce résultat indique que la teneur en eau du xanthane est de 12% (m/m) ce qui est en accord avec la littérature. Le xanthane contient des matières minérales qui peuvent être les contre-ions des groupements pyruvate et acétate ou des sels résiduels issus du procédé de fabrication. Les résultats de l'analyse élémentaire sont synthétisés dans le tableau III.2.2.

Élément	Teneur
Potassium (K)	3,5%
Sodium (Na)	2,3%
Soufre (S)	1,1%
Phosphore (P)	1729 ppm
Magnésium (Mg)	660 ppm
Calcium (Ca)	146 ppm
Fer (Fe)	4,9 ppm
Aluminium (Al)	2,5 ppm
Autres	traces

Tableau III.2.2 Synthèse des résultats d'analyse élémentaire effectuée sur la poudre xanthane

Ces résultats sont cohérents avec la littérature puisque la proportion massique d'ions monovalents ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) est de 5,8% (m/m). Les autres éléments minoritaires sont caractéristiques de matières minérales résultantes du procédé d'obtention de la gomme xanthane. Toutefois, la teneur en soufre relativement élevée (1,1%) interroge puisque la présence de soufre dans le xanthane n'est pas décrite dans la littérature. Le fournisseur ne souhaitant pas faire de déclaration concernant cette teneur en soufre, une investigation a été menée par diffraction des rayons X sur la poudre. Le résultat de cette mesure est présenté en figure III.2.9 comparativement au diffractogramme présenté dans les travaux de Abu Elella *et al.* [2].

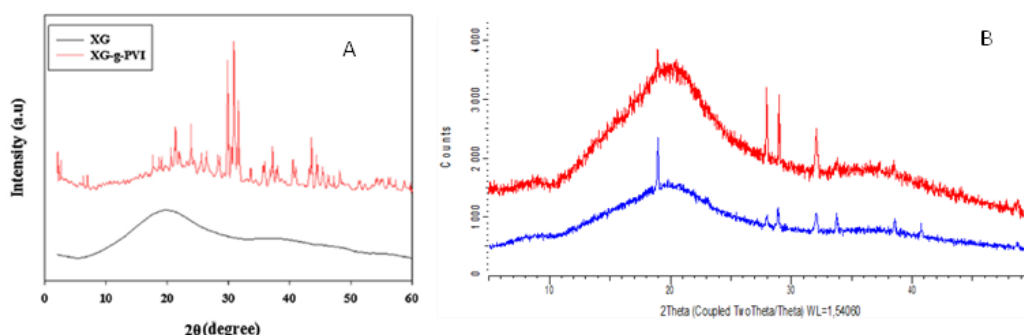


Figure III.2.9 Diffractogrammes de la poudre de xanthane (A) issus de la littérature [2] (noir) et (B) obtenus sur le produit utilisé avant (bleu) et après un chauffage à 80°C (rouge)

La figure III.2.9A issue des travaux de Abu Elella *et al.* indique que la gomme xanthane présente un diffractogramme typique d'une poudre amorphe avec un premier halo centré autour de  $2\theta = 20$  degré et un second moins intense autour de  $2\theta = 40$  degré (courbe noire) [2]. Aucun pic de cristallinité n'est visible sur ce diffractogramme. Inversement, le diffractogramme de la poudre de xanthane utilisée dans notre cas présente des pics fins de cristallinité (courbe bleue, figure III.2.9B). Nous avons tout d'abord fait l'hypothèse que cette cristallinité pouvait être caractéristique de la forme native du xanthane. Afin de dénaturer le xanthane, un chauffage à  $80^\circ\text{C}$  pendant une heure de la poudre a été réalisé. Le résultat obtenu, représenté par la courbe rouge figure III.2.9B, indique que cette cristallinité est conservée après chauffage et invalide notre première hypothèse. L'interrogation de la base de données de l'Institut des Sciences Analytiques nous a permis d'attribuer ces pics de cristallinité à la présence de thénardite ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Il s'agit d'un additif classiquement ajouté dans les produits industriels sous forme poudre soit en tant que charge pour des formules complexes (détergents) soit en tant qu'agent desséchant améliorant la stabilité de la poudre. La caractérisation du xanthane a été complétée par la réalisation d'analyses en chromatographie d'exclusion stérique en phase aqueuse et en RMN. La masse molaire du xanthane est d'environ  $M_w \approx 5 \cdot 10^6$  g/mol, avec une dispersité ( $M_w / M_n$ ) de 1,7. Le dénombrement des groupements acétate et pyruvate a été réalisé par RMN  $^1\text{H}$  d'après le protocole décrit dans la thèse de Catherine Esqueten publiée en 2003 [21]. Cette analyse nous a permis de déterminer un rapport de 0,8 entre les groupements acétate et pyruvate, ce qui est également en accord avec les résultats décrits dans la littérature [21]; [4]. Une fois caractérisée, cette poudre a été utilisée sans traitement supplémentaire pour la préparation de mélanges dans l'eau et dans FGE115.

### III.2.3.2 Caractérisation des mélanges après incorporation de gomme xanthane

Le protocole de préparation détaillé dans la partie matériel et méthodes a permis d'étudier les effets de concentration de la gomme xanthane en solution dans FGE115, comparativement à des solutions en milieu aqueux. La gomme xanthane a été incorporée à des concentrations comprises entre 0,5 et 20 g/L. L'ajout de xanthane est relativement difficile à mettre en œuvre surtout lorsque des concentrations supérieures 5 g/L sont considérées. Cette étape doit être très progressive et réalisée à  $T_{amb}$  sous agitation mécanique. Au fur et à mesure de l'ajout, la viscosité de l'échantillon augmente très rapidement nécessitant une adaptation de la vitesse d'agitation. Le flacon contenant le mélange est ensuite fermé et placé dans un bain-marie à  $70^\circ\text{C}$  pendant 3h sous agitation. La préparation d'échantillon est complexe dans l'eau mais encore plus problématique dans FGE115 même à faible concentration en xanthane compte tenu de la viscosité de ce solvant. Pour les concentrations maximales testées (15 et 20g/L), la préparation des mélanges conduit à l'obtention



d'échantillons contenant un nombre important de bulles. Des essais de dégazage sous vide ont été menés sans véritable succès. Nous avons vu en première partie de ce chapitre III que les solutions de xanthane dans les 2 solvants (FGE115 et eau) ne s'écoulent pas instantanément. Dans un premier temps, nous avons suivi macroscopiquement l'écoulement des échantillons à 20g/L après retournement des flacons en fonction du temps (figure III.2.10).

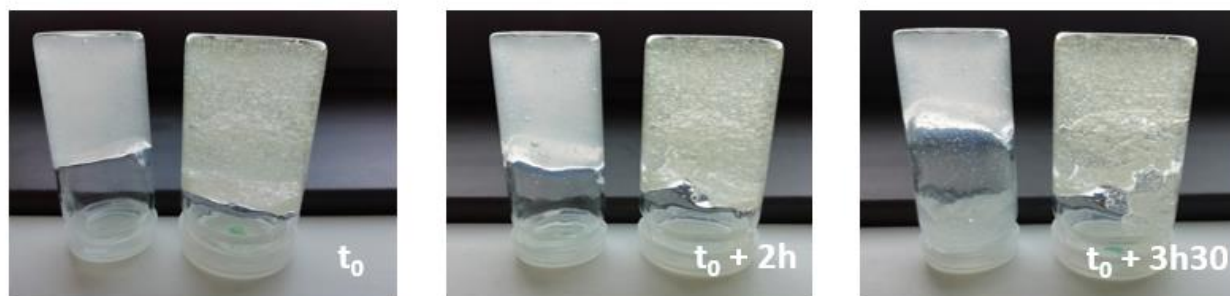


Figure III.2.10 Suivi visuel de l'écoulement en fonction du temps de solutions de xanthane à 20g/L dans l'eau (gauche) et dans FGE115 (droite)

On remarque tout d'abord que les échantillons en milieu aqueux sont turbides. Les échantillons en milieu FGE présentent également une certaine turbidité qui est accentuée par la présence de nombreuses bulles. Deux heures après le retournement des flacons, les deux échantillons se sont écoulés un peu le long des parois. Après 3h30, on observe que des amas se sont désolidarisés du reste de l'échantillon. Ces observations (turbidité et écoulement) semblent indiquer une certaine hétérogénéité à l'échelle du visible. Le mélange à 20g/L de xanthane dans FGE115 a été caractérisé par spectroscopie infra-rouge comparativement à la gomme xanthane seule et au solvant seul. La figure III.2.11 montre le spectre obtenu pour la gomme xanthane seule.

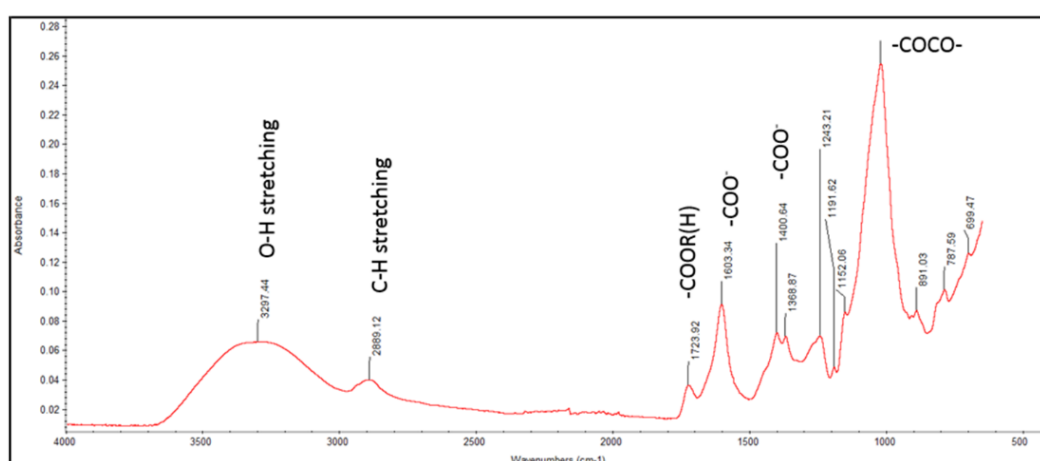
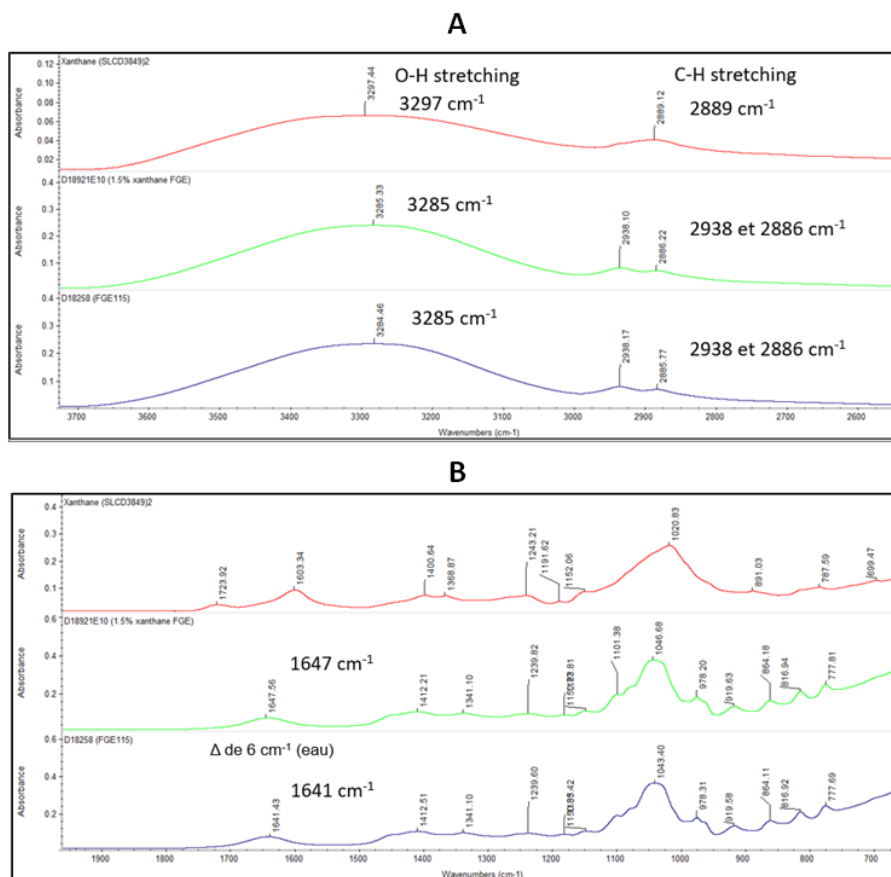


Figure III.2.11 Spectre IR de la gomme xanthane obtenu en mode ATR et attribution des bandes de vibrations selon Pawlicka et al. [22]

Le spectre obtenu est en accord avec la structure de la gomme xanthane (figure III.2.1) [22]. Afin de mettre en évidence d'éventuelles interactions entre le polymère et le solvant, le spectre IR d'une solution à 1,5% ( $\approx 20\text{g/L}$ ) de xanthane dans FGE115 (courbe verte) a été comparée à ceux de la poudre de xanthane (courbe rouge) et du solvant (courbe bleue) (figure III.2.12).



**Figure III.2.12** Caractérisation d'un système à 20g/L de xanthane dans FGE115 (vert) par spectroscopie IR (A) entre 3700 et 2500 cm<sup>-1</sup> et (B) entre 700 et 2000 cm<sup>-1</sup> comparativement au xanthane (rouge) et au solvant FGE115 seul (bleu)

La figure III.2.12A se focalise sur la région entre 2500 et 3700 cm<sup>-1</sup> et la figure III.2.12B sur la région entre 700 et 2000 cm<sup>-1</sup>. Cette figure montre que dans la zone des bandes de vibrations des OH et des CH, aucun shift significatif des bandes n'est observé après incorporation de xanthane. Dans la région comprise entre 700 et 2000 cm<sup>-1</sup>, seul un faible déplacement de la bande de vibration des OH de l'eau est observé ( $\Delta = 6 \text{ cm}^{-1}$ ). Toutes les autres bandes de vibrations ne sont pas affectées par la présence de gomme xanthane en solution. Ces résultats ne permettent pas d'identifier des interactions caractéristiques entre le xanthane et le solvant. Les propriétés thermiques des mélanges FGE115 + xanthane ont également été étudiées par DSC. Pour rappel le solvant FGE115 présente une unique  $T_g$  à  $-80 \pm 2^\circ\text{C}$ . Les deux concentrations extrêmes préparées (0,5 et 20g/L) ont été analysées et la figure III.2.13 reprend les thermogrammes obtenus.

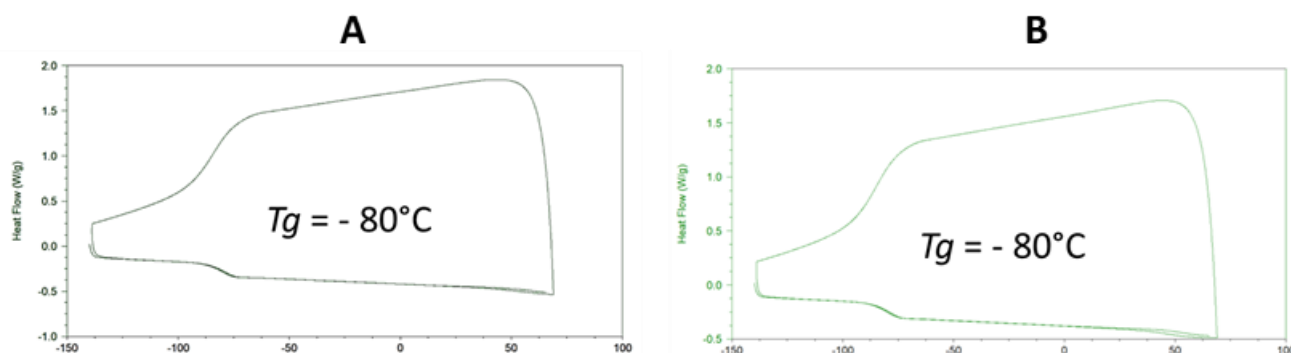


Figure III.2.13 Thermogrammes de solutions de xanthane dans FGE115 (A) 0,5 g/L et (B) 20 g/L

Pour ces deux concentrations extrêmes testées, les thermogrammes sont similaires et ne présentent aucun autre évènement thermique qu'une  $T_g$  à  $-80^\circ\text{C}$ . Ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'impact significatif de l'ajout de xanthane sur les propriétés thermiques du solvant FGE115, même à 20g/L.

Les propriétés rhéologiques des échantillons préparés dans l'eau et dans FGE115 ont également été caractérisées. Dans un premier temps, les viscosités en écoulement ont été analysées. L'impact de la concentration en xanthane a été étudié. L'influence de la concentration en polysaccharide est représentée sur les figures III.2.14, pour les échantillons dans l'eau (A), et dans FGE (B).

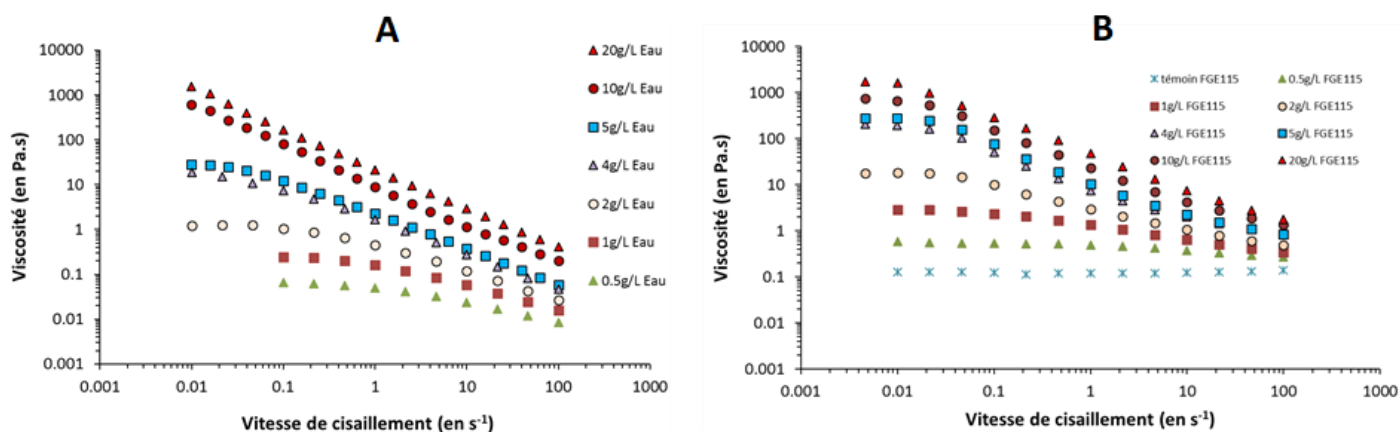


Figure III.2.14 Courbes d'écoulement et effet de la concentration en xanthane dans l'eau (A) et dans FGE(B)

Concernant les solutions en milieu aqueux, on remarque que l'addition de xanthane, et ce même à faible concentration conduit à un gain de viscosité très significatif ( $\eta_{\text{eau}} = 0,001 \text{ Pa.s}$ ). En effet, une viscosité 100 plus élevée est mesurée pour une solution de xanthane à 0,5g/L, ce qui reflète bien le pouvoir viscosifiant très connu du xanthane. Cette augmentation est moins marquée dans le solvant FGE115 puisque à concentration équivalente ( $C = 0,5 \text{ g/L}$ ), la viscosité de la solution est environ 10 fois plus élevée que celle du FGE (0,12 Pa.s).

Comme attendu, la viscosité des solutions augmente avec la concentration en xanthane dans les deux solvants. Nous n'identifions pas de plateau Newtonien à haute vitesse de cisaillement. Cette observation indique que toutes les concentrations testées sont au-delà de  $C^*$ . D'après les travaux de Wyatt *et al.*, les concentrations critiques  $C_e$  et  $C_D$  sont respectivement de 0,4 et 2 g/L dans l'eau [16]. Il semblerait donc que parmi les concentrations testées, les plus faibles (0,5 à 2 g/L) correspondent au régime semi-dilué enchevêtré ( $C_e < C < C_D$ ) et les plus élevées correspondent au régime concentré ( $C > C_D$ ). Cela expliquerait que malgré un doublement de la concentration entre 10 et 20 g/L peu de différences sont observées dans les courbes d'écoulement. L'allure des courbes indique un caractère rhéofluidifiant très marqué dans les deux solvants. Cette forte tendance à la rhéofluidification peut s'expliquer par la rigidité des chaînes du xanthane qui, sous l'effet du cisaillement, vont s'aligner dans le sens de l'écoulement et progressivement se désenchevêtrer. De façon surprenante, les viscosités obtenues dans les deux solvants sont similaires à fortes concentrations en xanthane (15 et 20 g/L). Ainsi, l'évolution de la viscosité spécifique ( $\eta_{sp} = (\eta - \eta_0) / \eta_0$ ) a été suivie en fonction de la concentration en chaîne, dans l'eau et dans le FGE (Figure III.2.15).

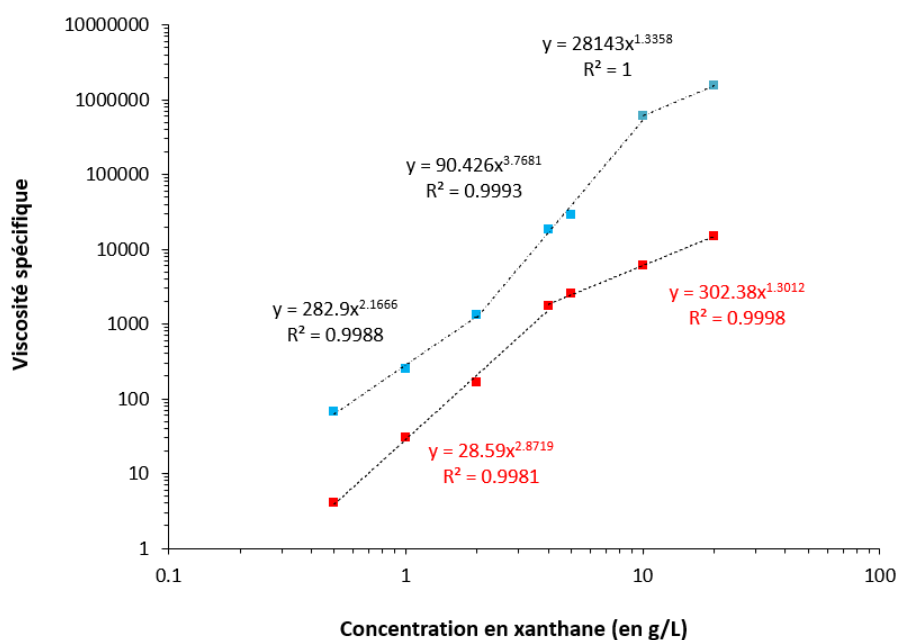


Figure III.2.15 Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en xanthane dans l'eau (carrés bleus) et dans FGE115 (carrés rouges)

L'évolution de la viscosité spécifique en solution aqueuse (points bleus) en fonction de la concentration en xanthane est en accord avec les travaux de Wyatt *et al.* Entre 0,5 et 2 g/L, le régime semi-dilué enchevêtré ( $C_e < C < C_D$  avec  $\eta \sim C^{2.1}$ ) est identifié. Entre 2 et 10 g/L, la loi de puissance obtenue ( $\eta \sim C^{3.8}$ ) confirme qu'il s'agit du régime concentré ( $C > C_D$  avec  $C_D \approx 2$  g/L).

Au-delà de 10g/L, un autre régime semble apparaître puisqu'un point d'inflexion est visible. Mais l'impossibilité de préparer des solutions plus concentrées nous oblige à prendre des précautions. De plus, le mélange dans l'eau à 20 g/L est très trouble (Figure III.2.10) ce qui est le signe d'hétérogénéités existantes dans le milieu. L'évolution de la viscosité spécifique en solution dans FGE115 (points rouges) est nettement différente puisque dès la concentration de 0,5 g/L ; la loi de puissance obtenue ( $\eta \sim C^{2,9}$ ) indique qu'il s'agit du régime concentré ( $C > C_D$ ). Les concentrations testées ne permettent pas de déterminer cette concentration critique qui est inférieure à 0,5 g/L dans ce solvant. Des préparations de mélanges à plus faibles concentrations permettraient de confirmer ce point et de définir les concentrations critiques dans ce solvant qui apparaît comme un moins bon solvant que l'eau pour le xanthane. Sachant que ce solvant est neutre, l'hypothèse la plus probable est que le xanthane soit sous forme désordonnée comme dans l'eau. Cependant, la viscosité de ce solvant due à l'établissement d'un réseau de liaison hydrogène entrave la mobilité et complique l'enchevêtrement des chaînes de xanthane. De plus, nous n'avons pas mis en évidence d'interaction spécifique entre les chaînes de xanthane et le solvant, ni par spectroscopie IR, ni par analyse DSC. L'incorporation des chaînes de xanthane est donc plus difficile que dans l'eau. Cette hypothèse est également cohérente avec le profil des courbes d'écoulement obtenues en FGE qui présentent des pentes de rhéofluidification moins marquées que dans le cas de l'eau. Là aussi, il convient de rester prudent car il y a très certainement des problèmes de solubilité partielle à partir de 5 g/L dans les deux solvants. Ces résultats confirment que la gomme xanthane est un excellent viscosifiant qu'il convient d'utiliser à des concentrations modérées.

Des analyses en oscillation ont tout de même été réalisées sur les échantillons contenant les concentrations les plus importantes en xanthane : 5, 10 et 20 g/L. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure III.2.16. Concernant les échantillons en milieu aqueux une augmentation notable des modules est observée avec l'augmentation de la concentration en xanthane.

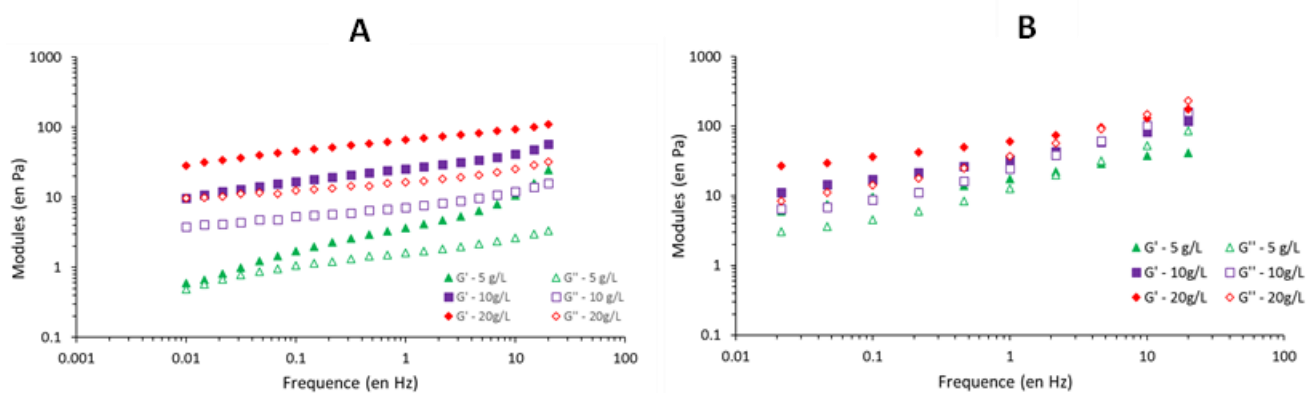


Figure III.2.16 Balayages en fréquence et effet de la concentration en xanthane dans l'eau (A) et dans FGE115 (B)

Pour les solutions aqueuses à 10 et 20 g/L,  $G'$  est bien supérieur à  $G''$  sur toute la gamme de fréquence. Cela reflète un comportement de type « gel » mais avec toutefois des valeurs de modules élastiques relativement faibles ( $< 100$  Pa). A 5 g/L, un phénomène de relaxation est visible à basses fréquences avec un point de croisement des modules autour de 0,01 Hz. La réponse viscoélastique des échantillons dans le FGE diffère de celle des échantillons en milieu aqueux. De façon assez surprenante, la concentration affecte très peu le comportement viscoélastique, et les valeurs des modules  $G'$  et  $G''$  sont du même ordre de grandeur pour les trois concentrations. Jusqu'à environ 5 Hz, le module  $G'$  est supérieur à  $G''$  et à plus hautes fréquences le modules  $G''$  augmente très significativement pour se superposer à  $G'$ . A basse fréquence, on observe un pseudo plateau pour  $G'$ . Ce plateau peut s'expliquer par la présence d'un réseau plus faible constitué principalement de molécules de fructose, glycérol et d'eau qui n'interagissent pas (ou très peu) avec les chaînes de xanthane. Il semble donc que les interactions entre le solvant ternaire FGE et les chaînes de xanthane ne soient pas favorables et que le système est hétérogène. A ce stade, il aurait été nécessaire d'effectuer des analyses plus poussées de la structure et de l'organisation interne, par exemple par des expériences de SAXS, mais nous nous sommes tournés vers des systèmes plus favorables à base d'alginate et de  $\kappa$ -carraghénane.

#### III.2.4. Conclusion

La gomme xanthane utilisée se caractérise notamment par une masse molaire importante ( $M_w \approx 5.10^6$  g/mol). Aucune interaction n'a pu être mise en évidence par spectroscopie IR entre le xanthane et le FGE115. Les propriétés thermiques des mélanges sont identiques à celle du solvant seul, à savoir une unique  $T_g$  à  $-80^\circ\text{C}$ . Les mesures en écoulement ont confirmé un fort pouvoir viscosifiant du xanthane dans l'eau, et il semblerait qu'à partir de 5g/L dans le FGE, la viscosité n'augmente plus de façon significative. Contrairement aux échantillons en milieu aqueux qui ont un comportement majoritairement élastique et renforcé par l'augmentation de la concentration, les propriétés viscoélastiques dans le solvant FGE ne sont pas classiques et difficilement interprétables à ce stade. Une augmentation de la viscosité est observée mais il semble qu'à partir d'une certaine concentration en xanthane (5 g/L), la solubilisation ne soit pas de bonne qualité et que les interactions entre le solvant et les chaînes de xanthane ne soient pas favorables. Cela pourrait s'expliquer par la viscosité de ce solvant qui entrave la mobilité et complique l'enchevêtrement des chaînes de xanthane dont la masse molaire est particulièrement élevée. Des analyses plus approfondies de l'organisation interne auraient mérité d'être entreprises pour mieux comprendre la structure interne. Toutefois, nous avons privilégié l'utilisation d'autres polysaccharides comme les alginates, et le  $\kappa$ -carraghénane qui ont conduit à des résultats plus prometteurs pour la gélification recherchée du mélange FGE, comme il sera décrit dans les deux prochaines parties .

### III.2.5. Références bibliographiques

- [1] Jeanes A., Pittsley J. E., Senti F. R. Polysaccharide B-1459: A new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. *Journal of Applied Polymer Science*, 1961, 5, 17, pp. 519–526.
- [2] Abu Elella M. H., Goda E. S., Gab-Allah M. A., et al. Xanthan gum-derived materials for applications in environment and eco-friendly materials A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2020, pp. 104702.
- [3] Wang Z., Wu J., Zhu L., et al. Characterization of xanthan gum produced from glycerol by a mutant strain *Xanthomonas campestris* CCTCC M2015714. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 157, pp. 521–526.
- [4] García-Ochoa F., Santos V., Casas J., et al. Xanthan gum Production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 2000, 18, 7, pp. 549–579.
- [5] Roy A. Synthèse et caractérisation de dérivés amphiphiles du xanthane. Autre. Université du Havre. 2015.
- [6] Bhat I. M., Wani S. M., Mir S. A., et al. Advances in xanthan gum production, modifications and its applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2022, 42, pp. 102328.
- [7] Palaniraj A., Jayaraman V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*, 2011, 106, 1, pp. 1–12.
- [8] Capron I., Brigand G., Muller G. Thermal denaturation and renaturation of a fermentation broth of xanthan Rheological consequences. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1998, 23, 3, pp. 215–225.
- [9] Rinaudo M., Milas M., Lambert F., et al. Proton and carbon-13 NMR investigation of xanthan gum. *Macromolecules*, 1983, 16, 5, pp. 816–819.
- [10] Milas M., Rinaudo M., Tinland B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. *Polymer Bulletin*, 1985, 14, 2, pp. 157–164.
- [11] Zhong L., Oostrom M., Truex M. J., et al. Rheological behavior of xanthan gum solution related to shear thinning fluid delivery for subsurface remediation. *Journal of hazardous materials*, 2013, 244-245, pp. 160–170.
- [12] Milas M., Rinaudo M. Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. *Carbohydrate research*, 1979, 76, 1, pp. 189–196.
- [13] Kimizuka N., Nakashima T. Spontaneous Self-Assembly of Glycolipid Bilayer Membranes in Sugarphilic Ionic Liquids and Formation of Ionogels. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2001, 17, 22, pp. 6759–6761.
- [14] Le Bideau J., Viau L., Vioux A. Ionogels, ionic liquid based hybrid materials. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40, 2, pp. 907–925.
- [15] Matsuda Y., Okumura K., Tasaka S. Molar mass dependence of structure of xanthan thermally denatured and renatured in dilute solution. *Polymer Journal*, 2018, 50, 11, pp. 1043–1049.
- [16] Wyatt N. B., Liberatore M. W. Rheology and viscosity scaling of the polyelectrolyte xanthan gum. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009, 114, 6, pp. 4076–4084.
- [17] Dobrynin A. V., Rubinstein M. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Progress in polymer science*, 2005, 30, 11, pp. 1049–1118.
- [18] Kumar A., Rao K. M., Han S. S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering A review. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 180, pp. 128–144.
- [19] Xia H., Ren M., Zou Y., et al. Novel Biocompatible Polysaccharide-Based Eutectogels with Tunable Rheological, Thermal, and Mechanical Properties: The Role of Water. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25, 15,

- [20] Zeng C., Zhao H., Wan Z., et al. Highly biodegradable, thermostable eutectogels prepared by gelation of natural deep eutectic solvents using xanthan gum Preparation and characterization. RSC Advances, 2020, 10, 47, pp. 28376–28382.
- [21] Esquenet C. Propriétés structurales et dynamiques des solutions de polyelectrolytes rigides et semi-rigides et de polysaccharides associatifs. 2003.
- [22] Pawlicka A., Tavares F. C., Dörr D. S., et al. Dielectric behavior and FTIR studies of xanthan gum-based solid polymer electrolytes. Electrochimica Acta, 2019, 305, pp. 232–239.

### III.2.6. Liste des figures

Figure III.2.1 Structure chimique de la gomme xanthane [2]	138
Figure III.2.2 Procédé de production industrielle de xanthane [5]	139
Figure III.2.3 Courbes d'écoulement de solutions aqueuses de NaCl (0,1N) obtenues après ajouts de xanthane ( $M_w = 7.10^6$ g/mol) à différentes concentrations (A) ou de différentes masses molaires à une concentration de 2 g/L(B) [10]	140
Figure III.2.4 Modèle généralisé des conformations que peut prendre le xanthane en solution [15]	142
Figure III.2.5 Viscosité à faible taux de cisaillement ( $0,3$ s <sup>-1</sup> ) pour plusieurs concentrations de xanthane dans de l'eau désionisée, issue de Zhong et al. [11]	142
Figure III.2.6 Représentation schématique d'un polyélectrolyte en régime semi-dilué [17]	143
Figure III.2.7 Evolution de la viscosité en fonction de la concentration en xanthane dans l'eau et sans sel ajouté [16]	144
Tableau III.2.1 Propriétés physiques des gommes de xanthane commercialisées [4]	147
Figure III.2.8 Thermogramme obtenu lors de l'analyse ATG de la gomme xanthane	147
Tableau III.2.2 Synthèse des résultats d'analyse élémentaire effectuée sur la poudre xanthane	148
Figure III.2.9 Diffractogrammes de la poudre de xanthane (A) issus de la littérature [2] (noir) et (B) obtenus sur le produit utilisé avant (bleu) et après un chauffage à 80°C (rouge)	148
Figure III.2.10 Suivi de l'écoulement en fonction du temps de solutions de xanthane à 20g/L dans l'eau (gauche) et dans FGE115 (droite)	150
Figure III.2.11 Spectre IR de la gomme xanthane obtenu en mode ATR et attribution des bandes de vibrations selon Pawlicka et al. [22]	150
Figure III.2.12 Caractérisation d'un système à 20g/L de xanthane dans FGE115 par spectroscopie IR (A) entre 3700 et 2500 cm <sup>-1</sup> et (B) entre 700 et 2000 cm <sup>-1</sup> comparativement au xanthane et au solvant FGE	151
Figure III.2.13 Thermogrammes de solutions de xanthane dans FGE115 (A) 0,5 g/L et (B) 20 g/L	152
Figure III.2.14 Courbes d'écoulement et effet de la concentration en xanthane dans l'eau (A) et dans FGE(B)	152
Figure III.2.15 Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en xanthane dans l'eau (carrés bleus) et dans FGE115 (carrés rouges)	153
Figure III.2.16 Balayages en fréquence et effet de la concentration en xanthane dans l'eau (A) et dans FGE115 (B)	154



### III.3 Ajout d'alginate de sodium dans des LTTM FGE

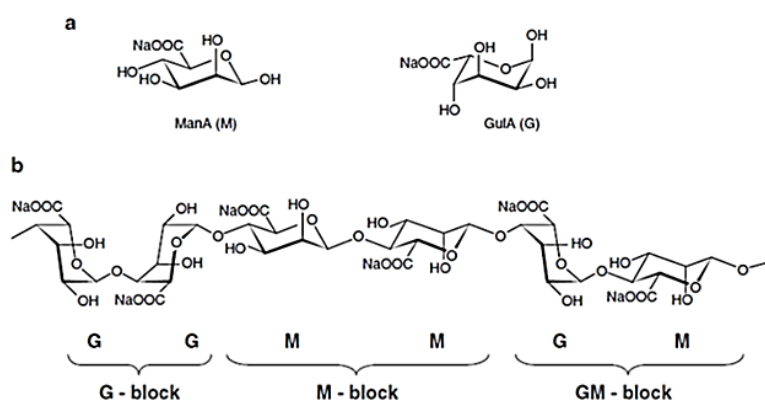
#### III.3.1. Origine, structure et propriétés de solutions aqueuses d'alginate

Les alginates, sels de l'acide alginique, constituent une famille de polysaccharides anioniques linéaires que l'on retrouve dans les mucilages et les cellules des parois des algues brunes (*Phaeophyceae*). La majorité des alginates disponibles dans le commerce sont issus de trois espèces d'algues brunes : *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria* et *Ascophyllum* (goémon noir) [1]. En France, les 2 variétés les plus exploitées sont : *Laminaria hyperborea* et *Laminaria digitata* [2]. Naturellement présents sous forme de sels (sodium, calcium, magnésium, potassium), les alginates peuvent représenter jusqu'à 45% de la matière sèche des algues mentionnées. Les alginates peuvent également être obtenus par voie de biosynthèse (bactéries *azotobacter* et *pseudomonas*) mais cette filière reste très limitée comparativement aux quantités industrielles produites par extraction d'algues brunes ( $\approx 40\,000$  tonnes par an). L'extraction des alginates peut se faire à partir d'algues brunes fraîches ou séchées. Les algues sont lavées, broyées finement, puis trempées dans une solution d'acide minérale afin de libérer l'acide alginique se trouvant sous forme de sels insolubles dans les parois cellulaires des algues (pré-extraction). La seconde étape consiste en une neutralisation par des sels alcalins (carbonate de sodium ou hydroxyde de sodium). Les alginates peuvent ainsi être extraits à l'eau en conditions basiques. Afin d'éliminer les particules d'algues, différents procédés de séparation solide/liquide peuvent être réalisés : tamisage, flottation, centrifugation ou filtration. Une étape de précipitation des alginates est ensuite réalisée en milieu alcoolique, en présence de chlorure de calcium ou d'un acide minéral. L'acide alginique est ensuite reconverti en forme de sel de sodium si nécessaire, et enfin séché et broyé [3]. Si l'on considère ce procédé dans sa globalité, il apparaît que d'importantes quantités d'eau, d'acides et de bases sont nécessaires à l'obtention d'alginate sous forme de poudre purifiée.

Dans l'optique de développer un procédé d'extraction des alginates moins consommateur en eau et en sels, Saravana *et al.* ont étudié la possibilité d'extraire des alginates et des fucoïdanes à partir de l'algue *Laminaria japonica* préalablement déshuilée par extraction au CO<sub>2</sub> supercritique [4]. Différents mélanges eutectiques à base de ChCl comprenant des quantités variables d'eau ont été utilisés comme solvants d'extraction. L'influence de la pression et de la température sur l'extraction des alginates a été étudiée par les auteurs. Le mélange ternaire ChCl : glycérol (1:2 mol) + 60% (m/m) d'eau présentant le meilleur potentiel, le procédé d'extraction a été optimisé par un plan d'expérience pour aboutir aux conditions suivantes :  $T = 120^\circ\text{C}$  et  $P = 30$  bar.

Les auteurs ont relié cette efficacité d'extraction, supérieure à celle du procédé conventionnel, au fait que les conditions opératoires ( $T$ ,  $P$ ) entraînent l'expansion et la rupture des cellules des algues et facilitent ainsi l'accès du solvant aux polysaccharides. L'avènement des solvants eutectiques en tant que solvants d'extraction et leur utilisation en conditions subcritiques ( $T$ ,  $P$ ) semble être une voie prometteuse pour l'extraction de polysaccharides à partir d'algues.

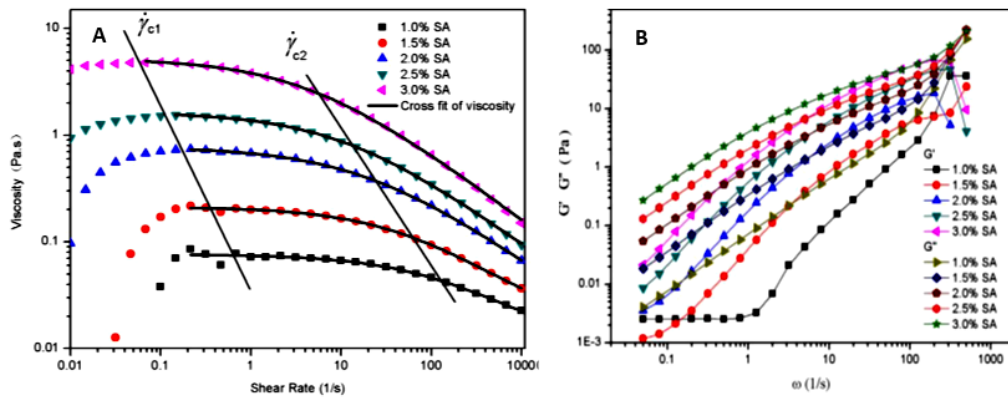
Les alginates sont composés de deux acides uroniques épimères, liés par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$  ou  $\alpha$  1,4 (Figure III.3.1) [5]. L'acide  $\beta$ -D-mannuronique, ou mannuronate (M) sous forme de sel de sodium, présente une conformation sous forme de chaise  ${}^4C_1$  alors que la conformation de l'acide  $\alpha$ -L-gulonique, ou guluronate (G) sous forme de sel, est en chaise  ${}^1C_4$ .



**Figure III.3.1 (a) Structure des unités monomère mannuronate et guluronate et (b) exemples de compositions des blocs caractéristiques des alginates [5]**

Étant donné leur conformation, les liaisons 1,4 entre les unités mannuronate sont équatoriales au plan du cycle tandis que les liaisons entre les guluronates sont axiales. Au sein des chaînes d'alginate, ces monomères peuvent donc s'arranger selon trois configurations détaillées sur la figure III.3.1b : des blocs M (ruban plat étendu), des blocs G (ruban plissé) et des blocs alternés MG (conformation sinusoïdale si alternance régulière). La répartition et la longueur des blocs sont grandement dépendants de l'espèce d'algue utilisée ainsi que des conditions de récolte : saison, localisation, partie, maturité [6]. L'existence de ces blocs va engendrer différentes conformations le long de la chaîne du polysaccharide et affecter sa rigidité. Il est donc primordial de caractériser le rapport entre le nombre de blocs M et le nombre de blocs G (rapport M/G). D'après la littérature, la détermination du rapport M/G s'effectue majoritairement par RMN  ${}^1H$  [7] et la chromatographie d'exclusion stérique (CES) [8] apparaît comme la méthode privilégiée pour la détermination de la masse molaire des alginates. Enfin, les alginates ont une propension naturelle à viscosifier les milieux aqueux. L'augmentation de la viscosité est fonction de la concentration en alginate [9], du rapport M/G et de la masse molaire de l'alginate utilisé [10].

De nombreuses études décrivant les propriétés rhéologiques de solution d'alginate sont disponibles dans la littérature. On retiendra que les solutions aqueuses d'alginate de sodium présentent un comportement rhéofluidifiant (Figure III.3.2A) et se comportent comme des fluides viscoélastiques rhéofluidifiants (figure III.3.2B).



**Figure III.3.2 (A) Courbes d'écoulement à 25°C (B) balayage en fréquence de solutions aqueuses d'alginate de sodium ( $M_w = 1,8 \cdot 10^6$  g/mol et  $M/G = 0,38$ )** [9]

Ce caractère viscosifiant s'ajoute au fait que les alginates sont peu onéreux, présentent une excellente biocompatibilité et une faible toxicité. Les alginates sont donc particulièrement employés industriellement en tant qu'épaississants, stabilisants ou encore émulsifiants dans l'agroalimentaire (E401 = alginate de sodium) et dans la cosmétique (shampoings, dentifrices, gels, crèmes). Les alginates sont également très utilisés pour des applications biomédicales [1]. A titre d'exemple, des hydrogels d'alginate, de structure de plus en plus complexe, permettent la libération progressive ou localisée de principes actifs ou de protéines [11]. Les alginates sont également utilisés pour la fabrication de pansements et suscitent un intérêt croissant dans le domaine de l'ingénierie tissulaire (régénération de tissus, cartilages, os, etc.) [12]. Enfin, les hydrogels composites à base d'alginates sont également étudiés dans les domaines de l'énergie et du traitement de l'eau [13]. Ces applications s'appuient en majorité sur la gélification ionotropique avec l'ajout d'ions calcium, comme nous le verrons plus tard dans la partie relative à la gélification de solutions d'alginate. Ces compléments de recherche bibliographique confirment que l'alginate de sodium répond favorablement à tous les prérequis souhaités dans le cadre de cette thèse. Lors de la mise au point de LTTM répondant aux critères industriels, plusieurs solvants FGE de compositions molaires variées ont été développés (chapitre II). Le FGE115 a été étudié en première intention car c'est le mélange le plus utilisé industriellement par Gattefossé mais nous sommes également intéressés au solvant FGE113, un autre LTTM avec une viscosité plus élevée ( $\eta_{113} = 1,04$  Pa.s contre  $\eta_{115} = 0,11$  Pa.s). L'étude de l'incorporation dans des solvants FGE est développée dans la suite de cette troisième partie du chapitre III.

### III.3.2. Préparation et caractérisation des solutions d'alginate de sodium

#### III.3.2.1 Matériels et méthodes

La poudre d'alginate de sodium utilisée dans le cadre de cette thèse correspond au lot 9005383 approvisionné auprès de Carl Roth. En se basant sur les données collectées dans la littérature, l'alginate de sodium utilisé dans le cadre de cette thèse a été caractérisé comme suit :

- **Analyse thermogravimétrique (ATG)**

L'analyse thermogravimétrique de la poudre d'alginate est effectuée sur l'appareil TGA Q500 (TA instruments) en réalisant une rampe de chauffage entre 35 et 400°C à 10°C/min sous un flux d'azote (90 ml/min). Cette analyse permet de quantifier l'eau physisorbée dans la poudre.

- **Analyses élémentaires par ICP-AES**

L'analyse élémentaire de la poudre a été sous-traitée au laboratoire Filab et déterminée par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry) selon une méthode interne.

- **Chromatographie d'exclusion stérique (CES)**

La masse molaire de l'alginate a été déterminée par chromatographie d'exclusion stérique. L'appareillage utilisé comprend une chaîne Wyatt Technologies avec une triple détection. Une colonne PL aquagel OH mixed M 8 micro est utilisée. Le solvant utilisé pour dissoudre le polysaccharide est de l'eau déionisée filtrée à 0,1 µm. Avant injection, l'échantillon (1,5 mg/mL d'eau) est filtré à 0,45 µm. La phase mobile est une solution de NaNO<sub>3</sub> à 0.1M ajustée à pH = 7. La température d'analyse est de 30°C, le débit est de 0,5 mL/min et le volume d'injection est de 20 µL.

- **Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

L'acquisition du spectre <sup>1</sup>H est réalisée à partir d'une solution à 3,5 mg/mL dans D<sub>2</sub>O. La solubilisation, effectuée à 100°C pendant 30 minutes, est suivie d'un passage aux ultrasons à  $T_{amb}$  pendant 30 minutes. Un ajout de TSPd<sub>4</sub> est réalisé pour la calibration des déplacements chimiques. L'acquisition est réalisée dans un tube de 5mm à 353K avec un nombre de 512 scans.

La poudre d'alginate de sodium caractérisée précédemment a été utilisée, sans traitement ou purification supplémentaire, pour préparer des solutions d'alginate dans l'eau et dans les solvants FGE113 et FGE115. Les LTTM à base de fructose, de glycérol et d'eau ont été préparés selon le protocole détaillé dans le chapitre II <sup>[14]</sup>. Dans le solvant FGE115, une large gamme de concentrations (de 0,001% à 3% m/m) a été étudiée afin de discuter du comportement des chaînes d'alginate dans ce solvant comparativement à des solutions aqueuses à concentrations équivalentes.

La préparation des solutions de concentration variant de 0,3% à 3% massique d'alginate a été réalisée en incorporant progressivement une masse prédéfinie d'alginate dans 5g de solvant sous agitation magnétique à  $T_{amb}$ . La teneur en eau de l'alginate déterminée par ATG a été prise en compte. Les échantillons ont ensuite été chauffés pendant 3h à 70°C sous agitation magnétique afin d'homogénéiser la solution. Des bulles d'air formées lors de l'incorporation de la poudre peuvent être piégées dans l'échantillon. Si la quantité de bulles est jugée trop importante, une étape de dégazage sous vide et à  $T_{amb}$  a été réalisée. Pour les solutions dont la concentration varie de 0,001% à 0,1% (m/m), une solution mère à 0,1% a tout d'abord été préparée selon le protocole précédent. Des solutions filles de 50 mL et de concentrations 0,075%, 0,025%, 0,01%, 0,005% et 0,001% massique d'alginate ont été préparées par des dilutions successives à partir de la solution mère. En ce qui concerne les solutions préparées dans le FGE113, seules 3 concentrations (1%, 2% et 3% (m/m)) ont été considérées. Les solutions d'alginate de sodium obtenues ont été caractérisées comme suit :

- **Spectroscopie Infra-rouge**

Les spectres infrarouges de la poudre d'alginate de sodium et des solutions obtenues ont été réalisés avec un appareil Nicolet en mode ATR sur une plage de 4000 à 650  $\text{cm}^{-1}$ . Une analyse de l'air ambiant (background) est réalisée avant les séries de mesures afin d'être soustrait lors du traitement des acquisitions.

- **Calorimétrie Différentielle à balayage (DSC)**

La caractérisation des propriétés thermiques des solutions d'alginate de sodium est réalisée par DSC (DSC Q22 équipée d'un système de refroidissement à l'azote, TA instruments), sous atmosphère d'azote dans des capsules hermétiques en aluminium. Les échantillons sont analysés comme suit : (i) -140°C à 70°C – rampe de 10°C/min ; (ii) 70°C à -140°C – rampe de 10°C/min et (iii) -140°C à 70°C – rampe de 10°C/min.

- **Propriétés rhéologiques**

Un rhéomètre DHR-2 de TA instruments a été utilisé pour réaliser des mesures en écoulement et en oscillation. Ces mesures ont nécessité l'utilisation de 2 géométries différentes : une géométrie Couette (cylindres concentriques) pour les viscosités < 20 Pa.s et une géométrie plan-plan pour les viscosités supérieures. Les mesures ont été réalisées à 25°C après un temps de stabilisation de 10 min à cette température. Le suivi de la viscosité pour des taux de cisaillement entre 0,01  $\text{s}^{-1}$  et 100  $\text{s}^{-1}$  a été effectué. L'influence de la température sur les viscosités en écoulement de solutions à 2% (m/m) d'alginate de sodium a été mesurée dans l'eau et dans le FGE115 selon la même méthodologie.

Des suivis de modules viscoélastiques en fonction de la fréquence ont également été réalisés dans les trois solvants à 25°C. En ce qui concerne les mesures en oscillation, une vérification du domaine linéaire a tout d'abord été effectuée à une fréquence de 10Hz et pour des déformations entre 0,01% et 5%, puis un temps de stabilisation de 10 min a été appliqué, avant de réaliser un balayage en fréquence entre 0,01Hz et 10Hz avec un taux de déformation fixe de 1%. L'influence de la température sur les modules viscoélastiques des solutions d'alginate de sodium a été mesurée dans les trois solvants selon la même méthodologie.

### III.3.2.2 Caractérisation de l'alginate de sodium

La fiche technique de l'alginate de sodium utilisé indique que les caractéristiques du produit à 1% en solution à 20°C sont les suivantes : pH entre 5,5 et 8 et viscosité entre 250 et 550 mPa.s. Afin de compléter ces informations, cette poudre a été caractérisée par différentes techniques d'analyse. Une analyse thermogravimétrique a été réalisée afin de quantifier l'eau physisorbée dans la poudre (Figure III.3.3).

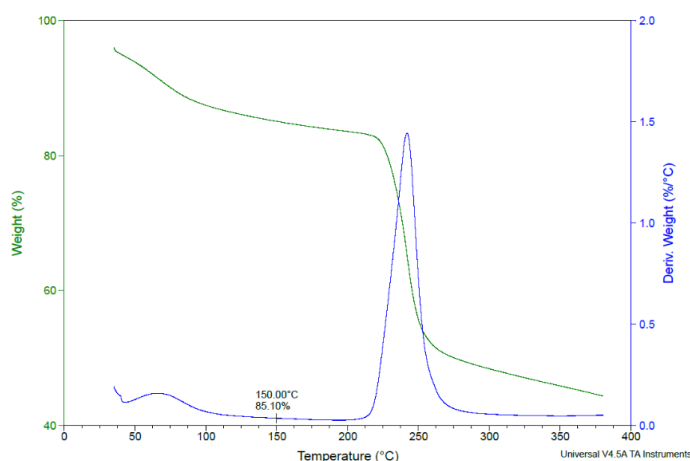


Figure III.3.3 Thermogramme obtenu lors de l'analyse ATG de l'alginate de sodium

Une première perte de masse entre 40 et 120°C est attribuable à la perte de l'eau physisorbée et une seconde perte de masse correspondant à la dégradation thermique du polysaccharide apparaît au-delà de 210°C. Ce résultat indique que la teneur en eau de l'alginate utilisé est de 15% (m/m). L'analyse élémentaire de la poudre d'alginate a été déterminée par ICP-AES. Les résultats sont présentés dans le tableau III.3.1.

Élément	Sodium	Soufre	Potassium	Phosphore	Silicium	Calcium
Teneur	10%	2692 mg/kg	1045 mg/kg	122 mg/kg	59 mg/kg	55 mg/kg

Tableau III.3.1 Résultat de l'analyse élémentaire réalisée sur la poudre d'alginate de sodium

Le sodium est l'élément dosé en plus grande quantité (10% m/m) ce qui confirme qu'il s'agit bien d'alginate de sodium. Les autres éléments détectés correspondent à des résidus non éliminés au cours du procédé d'extraction ou à des additifs favorisant la stabilité de la poudre. La masse molaire de l'alginate de sodium a été déterminée par chromatographie d'exclusion stérique en phase aqueuse. La masse molaire obtenue par triple détection (masse vraie) est  $M_w \approx 300\,000$  g/mol, avec un indice de dispersité de 1,3 (Figure III.3.4).

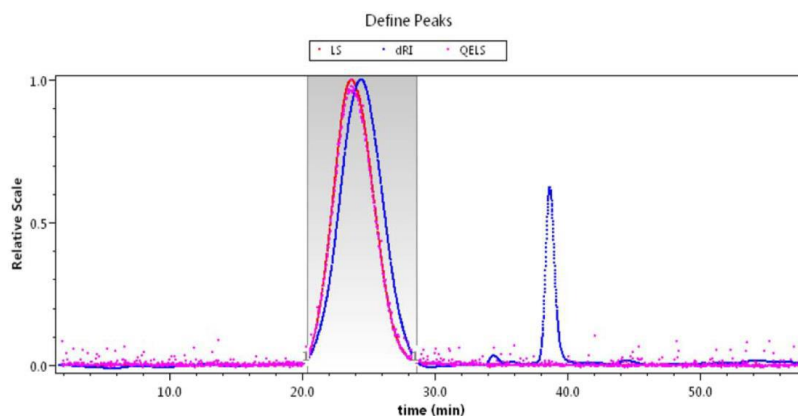


Figure III.3.4 Chromatogramme de l'alginate de sodium à 25°C

La détermination du rapport M/G a été effectuée par RMN  $^1\text{H}$  à 80°C selon la méthodologie détaillée par Grasdalen *et al* [15]. Le spectre obtenu (figure III.3.5) est en accord avec ceux décrits dans la littérature pour l'alginate de sodium et présente trois pics caractéristiques situés entre 4,4 et 5,2 ppm, notés S1, S2 et S3.

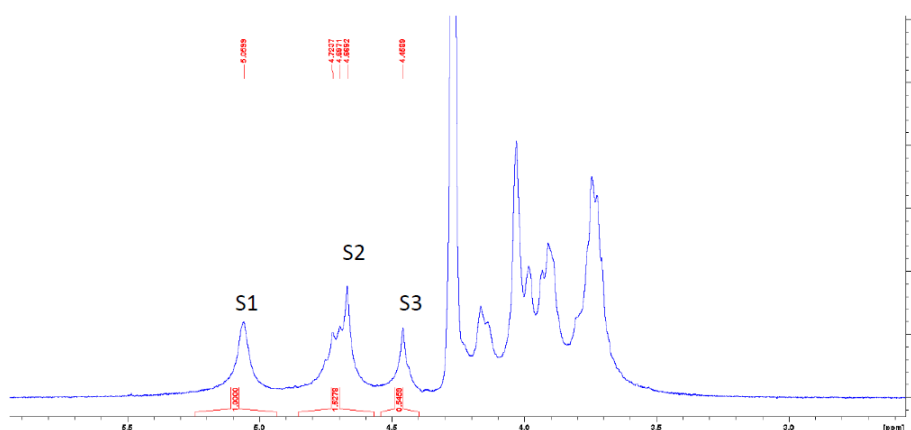


Figure III.3.5 Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 80°C) de l'alginate de sodium

D'après les travaux de Grasdalen *et al.*, les pics notés S1 et S3 correspondent respectivement aux protons  $\text{H}_1$  et  $\text{H}_5$  des unités guluronate, et le signal S2 correspond aux protons  $\text{H}_5$  des unités guluronate adjacentes à un mannuronate et au proton  $\text{H}_1$  des mannuronates [15]. Ainsi, en utilisant la formule ci-après, on obtient directement le rapport M/G qui est ici de 1,1.

$$\frac{M}{G} = \frac{I_{S2} + I_{S3} - I_{S1}}{I_{S1}} = 1,1$$

Ce résultat est cohérent avec les valeurs retrouvées dans la littérature qui se situent généralement entre 0,5 et 2,1 [7]. Une fois caractérisée, cette poudre a été utilisée sans traitement supplémentaire pour la préparation de mélanges dans l'eau et dans les mélanges FGE115 et FGE113.

### III.3.2.3 Caractérisation des solutions d'alginate de sodium

- **Observation macroscopique des solutions d'alginate de sodium**

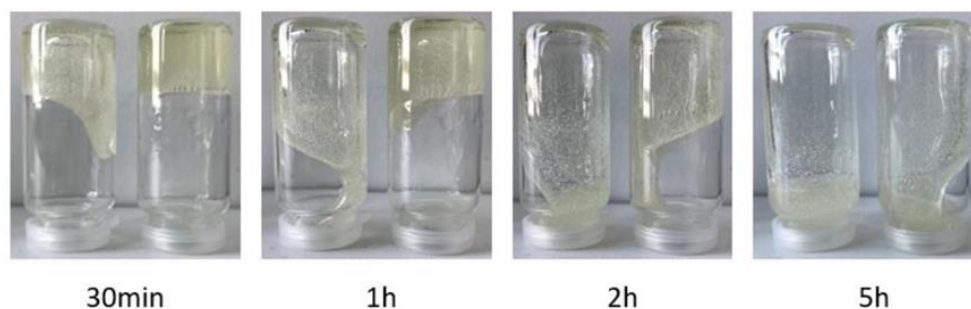
La préparation des solutions d'alginate a été réalisée en incorporant progressivement une masse prédéfinie d'alginate dans 5g de solvant sous agitation magnétique à  $T_{amb}$ . Les échantillons ont ensuite été chauffés pendant 3h à 70°C sous agitation magnétique afin d'homogénéiser la solution. Des mélanges à différentes concentrations en alginate ont ainsi été préparés dans l'eau et dans les mélanges FGE115 et FGE113. L'aspect macroscopique des échantillons a tout d'abord été observé après retournement des piluliers. La figure III.3.6 reprend les principales observations effectuées 1 minute après retournement du pilulier en fonction de la concentration en alginate et de la nature du solvant.

Concentration en alginate de sodium (% m/m)	0.5	1	1.5	2	2.5	3
H <sub>2</sub> O						
FGE115						
FGE113						

**Figure III.3.6 Photographies des échantillons d'alginate de sodium à différentes concentrations en chaînes dans l'eau, FGE115 et FGE113 environ 1 minute après retournement du pilulier**

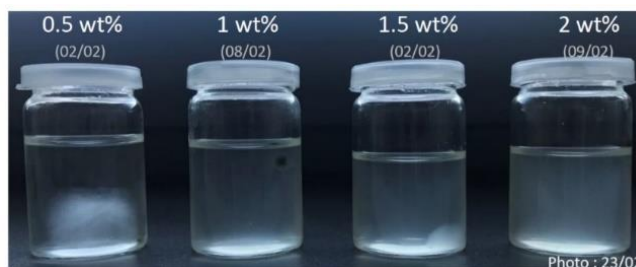


La figure III.3.6 montre que quel que soit le solvant les solutions préparées sont transparentes et homogènes. Une légère coloration jaune est observée pour les concentrations les plus importantes. Des différences de comportement notables apparaissent après retournement des flacons en fonction du solvant. Tout d'abord et indépendamment de la concentration testée, les échantillons dans l'eau s'écoulent presque instantanément malgré une viscosité qui augmente avec la concentration en polysaccharide. Les solutions dans le FGE115 semblent plus visqueuses et lorsque la concentration en alginate est supérieure à 1% (m/m) les mélanges ne s'écoulent pas durant la première minute suivant le retournement du flacon. Macroscopiquement, nous pouvons constater qu'après retournement des piluliers contenant les solutions dans le FGE113, les solutions s'écoulent très lentement. La viscosité des échantillons d'alginate dans le FGE113 semble donc plus élevée que dans le FGE115. On observe également que ces solutions contiennent plus de bulles. L'impact du temps sur l'écoulement des échantillons les plus concentrés dans FGE115, respectivement 2,5% et 3% (m/m), a été observé comme le montre la figure III.3.7.



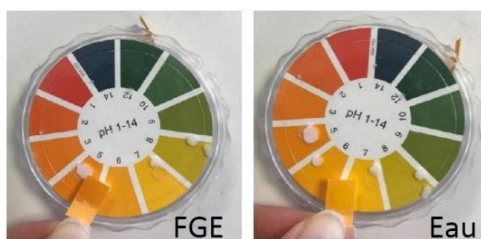
**Figure III.3.7 Impact du temps sur l'écoulement des solutions d'alginate de sodium à 2,5% (pilulier de gauche) et à 3% (pilulier de droite) dans le FGE115**

On remarque que le temps nécessaire à l'écoulement augmente avec la concentration en alginate. Après 5h, les solutions n'ont pas résisté à l'écoulement, ce qui reflète macroscopiquement un comportement de fluide qui flue avec le temps, et non un comportement de type « gel ». Une attention particulière a également été apportée à la stabilité microbologique des échantillons. Pour ce faire, des mélanges ont été conservés à  $T_{amb}$  et à l'abri de la lumière. Alors que macroscopiquement rien n'est observé dans les mélanges FGE113 et FGE115, les solutions aqueuses d'alginate présentent un développement bactérien bien visible à l'œil nu après quelques semaines de stockage (Figure III.3.8). Ce caractère bactériostatique des solvants FGE113 et FGE115 s'explique par l'existence d'un réseau de liaisons hydrogène entre tous les composés. Cette structure supramoléculaire impliquant les molécules d'eau fait que ces LTTM se caractérisent par une activité de l'eau faible ( $A_w$  FGE115 = 0,642 et  $A_w$  FGE113 = 0,537) comme nous l'avons vu dans le chapitre II.



**Figure III.3.8** Illustration de l'instabilité microbologique observée à l'œil nu dans les solutions aqueuses d'alginate de sodium après stockage à  $T_{amb}$

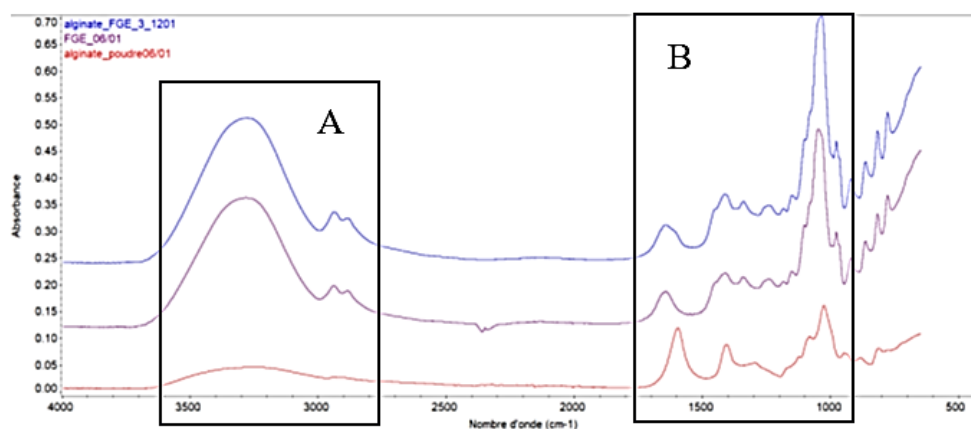
Enfin, les pH des solutions à 1% (m/m) d'alginate de sodium dans l'eau et dans le FGE115 ont été déterminés à l'aide de papier pH (Figure III.3.9). A concentration massique équivalente (ici 1% m/m), la solution dans le FGE115 est légèrement plus acide que celle dans l'eau. Cela peut s'expliquer par le pH du solvant FGE115 (pH = 5,9 au  $\frac{1}{2}$  dans l'eau) et par la différence de densité entre les 2 solvants ( $d_{FGE115} = 1,30$ ). Compte-tenu du protocole de préparation suivi, la concentration volumique en alginate est donc supérieure dans le FGE115 ce qui conduit à un pH légèrement inférieur.



**Figure III.3.9** Mesures de pH pour des mélanges à 1% (m/m) d'alginate dans le FGE115 et dans l'eau

- Mise en évidence d'interactions entre les chaînes d'alginate et le FGE115

Des analyses FTIR ont été réalisées sur la poudre d'alginate de sodium, le solvant FGE115 seul et sur une solution d'alginate de sodium dans le FGE115 à 3% (m/m) (Figure III.3.10).



**Figure III.3.10** Spectres IR de l'alginate de sodium (rouge) du solvant FGE115 (violet) et d'une solution d'alginate à 3% (m/m) dans le FGE115 (bleu)

Le spectre de la solution à 3% (m/m) dans le FGE115 (en bleu sur la figure III.3.10) présente très peu de différences avec celui du solvant pur (en violet sur la figure III.3.10). Cela est certainement dû à la faible sensibilité de l'IR par rapport à la concentration d'alginate utilisée. Nous pouvons néanmoins nous intéresser aux zones A et B qui présentent les signaux les plus susceptibles de montrer des shifts de nombre d'ondes. La figure III.3.11 ci-dessous correspond à la zone A du spectre IR autour du pic large des -OH. Le maximum du signal de la solution à 3% (m/m) ( $3278\text{ cm}^{-1}$ ) se situe à une valeur intermédiaire entre le signal de l'alginate ( $3262\text{ cm}^{-1}$ ) et celui du FGE115 ( $3285\text{ cm}^{-1}$ ). Cette variation du signal d'absorption des fonctions alcool peut raisonnablement être attribué à la formation de liaisons hydrogène entre le solvant et l'alginate.

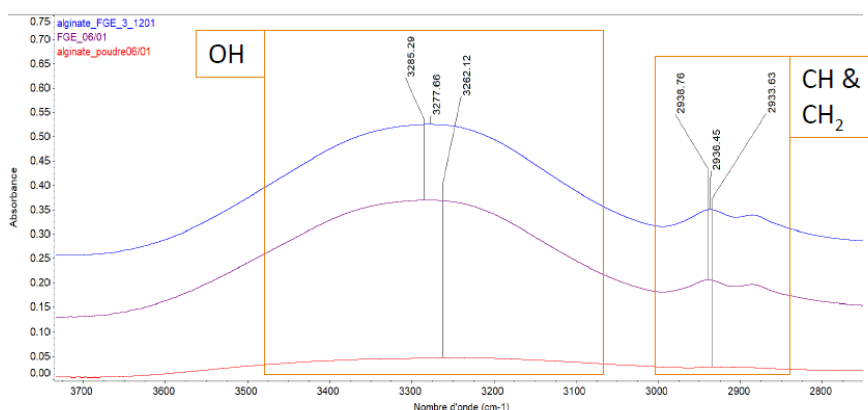


Figure III.3.11 Zoom sur la partie A des spectres IR de l'alginate de sodium (rouge) du solvant FGE115 (violet) et d'une solution d'alginate à 3% (m/m) dans le FGE115 (bleu)

La zone B, représentée sur la figure III.3.10 présente deux zones d'intérêt. D'une part, le signal entre  $1150$  et  $1100\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique des liaisons glycosidiques C-O-C. Ces liaisons sont présentes dans l'alginate de sodium mais également dans le FGE, notamment dans le fructose, ce qui complexifie l'exploitation des résultats. Cependant, il est possible de constater sur la figure III.3.12 que le maximum du signal pour la solution à 3% (m/m) se trouve à une valeur intermédiaire entre celle de l'alginate seul et celle du FGE115.

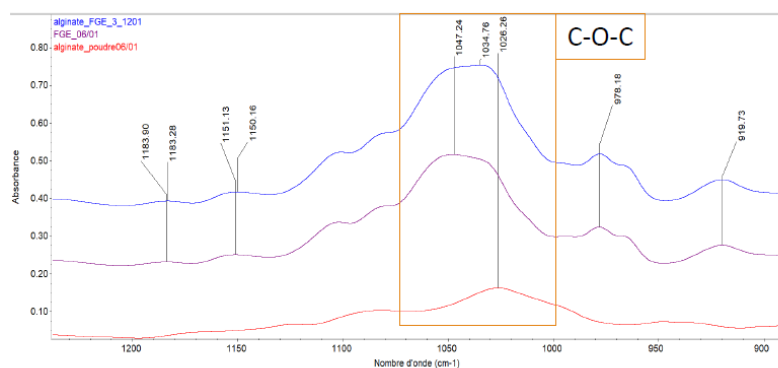
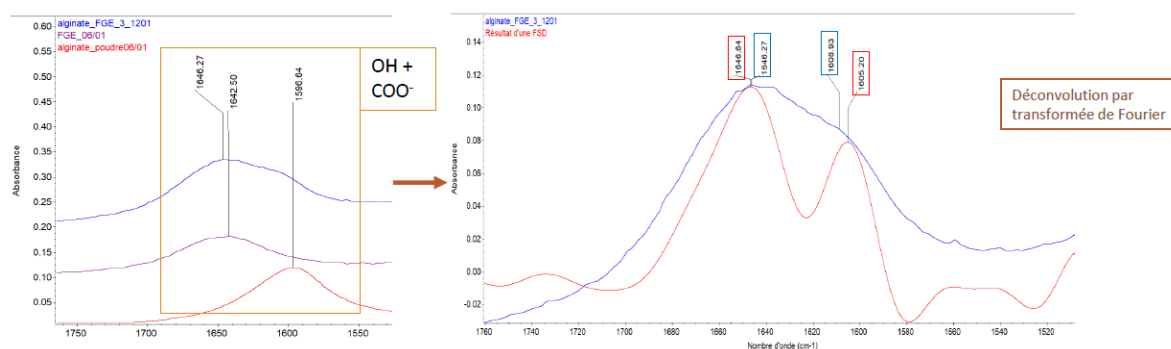


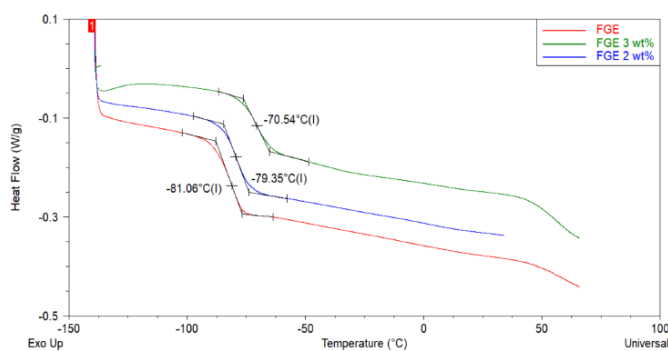
Figure III.3.12 Zoom sur la partie B des spectres IR de l'alginate de sodium (rouge) du solvant FGE115 (violet) et d'une solution d'alginate à 3% (m/m) dans le FGE115 (bleu)

Ceci peut également être attribuée au développement d'interactions entre les composés de la solution. D'autre part, la région autour de  $1600\text{ cm}^{-1}$  est caractéristique du groupement carboxylate ( $-\text{COO}-$ ) de l'alginate de sodium [16]. Dans le cas du FGE115, le pic à  $1643\text{ cm}^{-1}$  correspond au second pic des  $-\text{OH}$  caractéristique de l'eau du mélange. Le spectre de la solution à 3% possède également dans cette zone un signal dont le maximum ( $1646\text{ cm}^{-1}$ ) est proche de celui du FGE115. Toutefois, nous observons un épaulement dont la valeur est proche du signal des  $-\text{COO}-$  de l'alginate seul. En traçant la déconvolution par transformée de Fourier de ce signal avec épaulement (Figure III.3.13), on obtient les contributions des deux signaux. Le signal attribuable au  $\text{COO}-$  de l'alginate de sodium à  $1605\text{ cm}^{-1}$  indique un shift de  $8\text{ cm}^{-1}$  comparativement au spectre de l'alginate seul ( $1597\text{ cm}^{-1}$ ). Cet épaulement et cette transition de nombre d'onde de  $8\text{ cm}^{-1}$  reflètent la formation de liaisons hydrogène entre la fonction  $-\text{COO}-$  de l'alginate et les différentes fonctions  $-\text{OH}$  du glycérol et du fructose du solvant FGE115.



**Figure III.3.13** Déconvolution par transformée de Fourier de la partie des spectres IR correspondant aux groupements carboxylate de l'alginate de sodium et à l'eau du solvant FGE115

Les propriétés thermiques des mélanges FGE115 + alginate de sodium ont été étudiées par DSC (Figure III.3.14). Une tendance à l'augmentation de la  $T_g$  apparaît avec l'augmentation de la concentration en alginate, mais l'introduction d'alginate ne semble pas déstabiliser de façon très significative le réseau de liaisons hydrogène à l'origine de la formation du solvant ternaire FGE115.



**Figure III.3.14** Thermogrammes de solutions d'alginate de sodium dans FGE115 à 2% (m/m) (bleu) et 3% (m/m) (vert) comparativement au solvant seul (rouge)

## III.3.2.4 Propriétés rhéologiques des solutions d'alginate

## III.3.2.4.1 Mesures des viscosités en écoulement des solutions d'alginate

- Influence de la concentration en alginate et évaluation de la qualité des solvants

Tout d'abord, l'évolution de la viscosité en écoulement avec le taux de cisaillement des solutions d'alginate de concentrations variant de 0,001 % à 3% massique, en milieu aqueux et dans le FGE115, a été mesurée. Les courbes d'écoulement obtenues sont représentées en figure III.3.15 et révèlent des différences significatives en fonction de la nature du solvant utilisé.

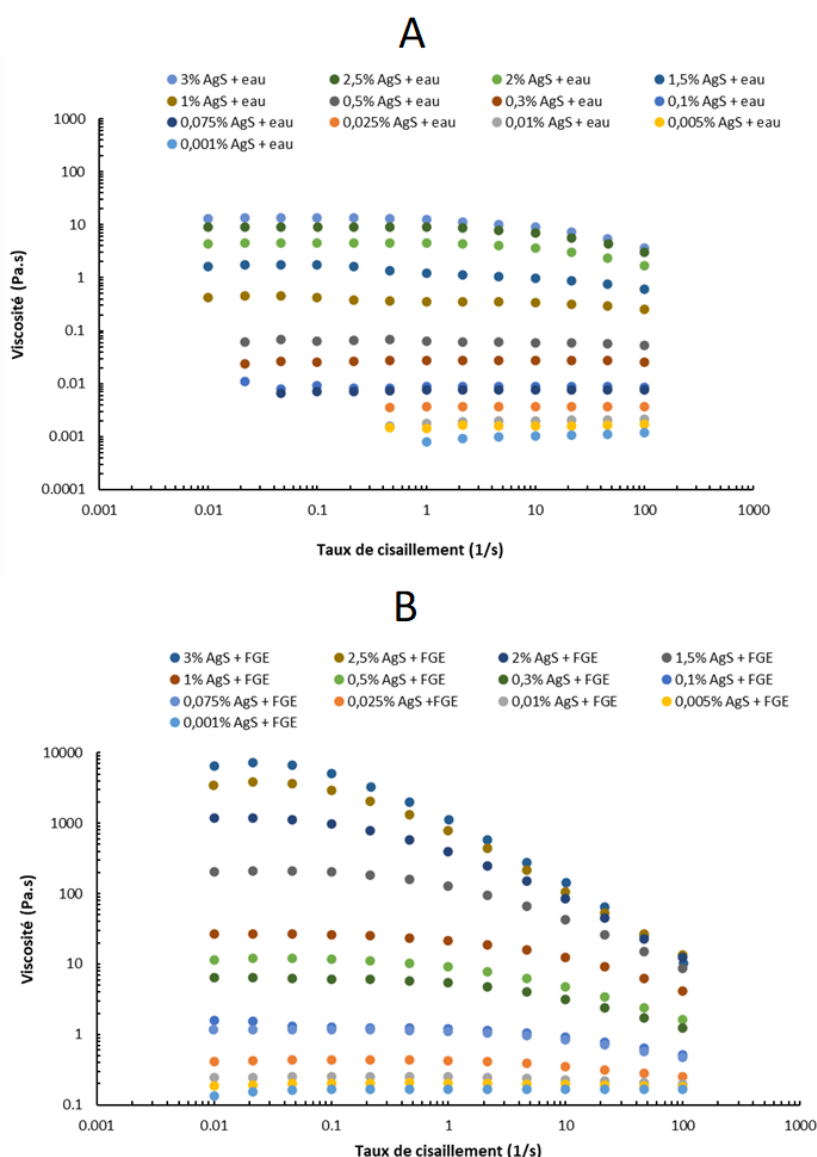


Figure III.3.15 Courbes d'écoulement à 25°C des solutions aqueuses d'alginate de sodium (A) et des mélanges FGE115 + alginate de sodium (B)

Le comportement des solutions aqueuses est Newtonien jusqu'à environ 1% (soit 10 g/L) et une légère rhéofluidification est observée pour les concentrations supérieures. Au contraire, les échantillons dans le FGE115 sont rhéofluidifiants dès les faibles concentrations. Le gradient de cisaillement critique pour lequel la rhéofluidification est observée diminue avec la concentration en alginate. Il apparaît donc que la viscosité des solutions dans le FGE115 est plus sensible au cisaillement que celle des solutions aqueuses d'alginate. Ceci peut s'expliquer par les interactions entre les chaînes d'alginate et le solvant FGE115 qui sont plus sensibles au cisaillement, mais aussi et surtout par des enchevêtrements entre les chaînes d'alginate plus marqués et plus nombreux en milieu FGE115 que dans l'eau. La masse molaire de l'alginate étant identique dans les deux solvants, il est raisonnable d'attribuer ces différences de comportement à des conformations de chaînes d'alginate qui diffèrent selon la nature de solvant. On remarque également que la viscosité des solutions dans le FGE115 est bien plus élevée que celle dans l'eau à concentrations massiques égales. Pour exemple, une solution à 3% (m/m) en alginate dans le FGE115 a une viscosité d'environ 8000 Pa.s, contre seulement 10 Pa.s dans l'eau. Ce gain en viscosité s'explique à la fois par la viscosité du solvant FGE115 ( $\eta = 0,1$  Pa.s) qui est supérieure à celle de l'eau, mais aussi par les interactions attractives développées entre les chaînes d'alginate et le solvant FGE115 basées sur la formation de liaisons hydrogène entre les fonctions polaires de l'alginate (OH, et COOH) et les groupements alcool des molécules constituant le solvant LTTM. Ces interactions favorables induisent très probablement une conformation plus étendue des chaînes d'alginate en milieu FGE115.

Ainsi, afin de mieux qualifier les interactions entre les solvants (eau et FGE115) et les chaînes d'alginate et d'évaluer indirectement la conformation des chaînes, nous nous sommes penchés sur la détermination de : *i*) la concentration critique de recouvrement des chaînes ( $C^*$ ) qui marque le passage du domaine dilué au régime semi-dilué (non enchevêtré), et *ii*) la viscosité intrinsèque. A partir de la viscosité au plateau Newtonien ( $\eta_{New}$ ) à faible gradient de cisaillement, nous avons représenté l'évolution de la viscosité spécifique ( $\eta_{spe} = (\eta_{New} - \eta_0) / \eta_0$ ) (avec  $\eta_0$  la viscosité du solvant) en fonction de la concentration en alginate, dans l'eau (sans addition de sel), et dans le solvant FGE115 (Figure III.3.16 et III.3.17). Des modèles théoriques développés dans la littérature et relatives au comportement et à la dynamique des polymères en solutions prédisent la variation de la viscosité de solutions avec la concentration <sup>[17]-[19]</sup>. Toutefois, les lois de puissance issus de ces modèles dépendent de la rigidité/flexibilité du polymère en solution, et de son caractère de polyélectrolyte ou de polymère neutre <sup>[20]; [21]</sup>. Ainsi, pour un polysaccharide qui est un polymère semi-flexible, les lois de puissance peuvent différer des lois classiques, et dans le cas d'un polyélectrolyte les lois de puissance dépendent également de la concentration en sel. Comme le montre la figure III.3.16 dans l'eau, trois régimes de concentration sont observés et caractérisés par des lois de puissance différentes.

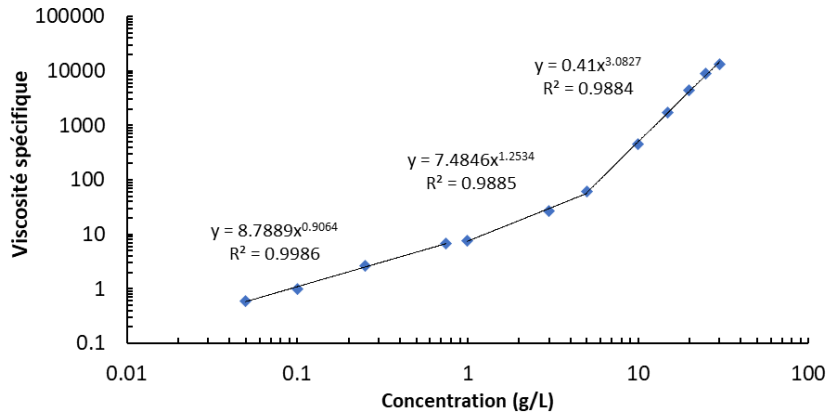


Figure III.3.16 Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en alginate de sodium dans l'eau

Le premier domaine est caractérisé par une dépendance faible de la viscosité spécifique avec la concentration (loi de puissance autour de 1), le deuxième domaine varie de façon plus notable avec une loi de puissance autour de 1,3, et le troisième domaine indique une variation bien plus significative de la viscosité spécifique avec la concentration (loi de puissance autour de 3). Ces valeurs sont en accord avec les valeurs relatées dans la littérature dans le cas de solutions aqueuses de polysaccharides (alginates, carboxyméthyl cellulose, ...) [22]–[26]. La concentration marquant la transition entre les deux premiers domaines correspond à la concentration de recouvrement des chaînes  $C^*$  qui marque le passage du régime dilué, au régime dilué non-enchevêtré. Cette valeur se situe autour de 0,8-0,9 g/L. La deuxième inflexion au niveau des lois de puissances est observée autour de 5 g/L et correspond à la concentration critique  $C_e$ , qui marque le passage du régime semi-dilué non enchevêtré au régime semi-dilué enchevêtré. Notons que cette détermination est cohérente avec les profils de viscosité en fonction du gradient de cisaillement de la Figure III.3.15A, qui montre un phénomène de rhéofluidification à partir de 1% (soit 10 g/L). La même analyse a été réalisée en milieu FGE115 (Figure III.3.17).

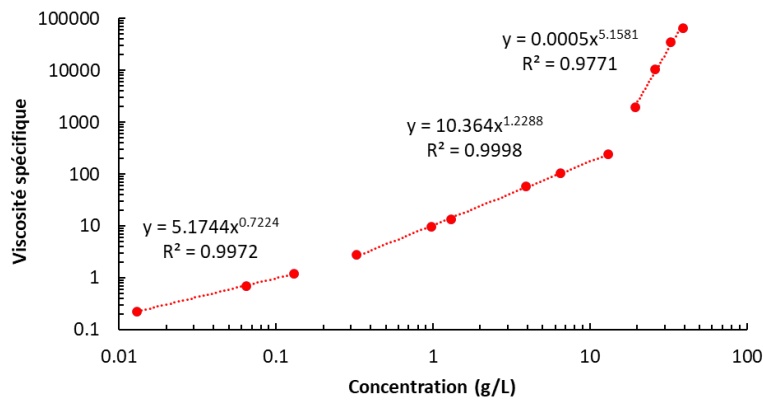


Figure III.3.17 Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en alginate de sodium dans FGE115

Dans ce cas, la première rupture de pente (entre la loi de puissance de 0,7 à 1,2) nous donne accès à  $C^*$  de l'alginate dans le FGE115, soit environ 0,2 g/L, et il semble raisonnable d'attribuer la seconde rupture de pente loi de puissance de 1,2 à 5,2 à  $C_e$ , définissant la transition entre le domaine semi-dilué non enchevêtré et le domaine semi-dilué enchevêtré. Notons que la valeur de 5 en loi de puissance est particulièrement élevée, mais il apparaît compliqué d'exploiter les modèles de concentration existants dans la littérature pour les solutions en milieu FGE115, car ce solvant très visqueux s'apparente plus à un assemblage supramoléculaire qu'à un solvant classique. Il en résulte donc que les valeurs de  $C^*$  des chaînes d'alginate dans l'eau et dans le FGE115 sont différentes (0,9 g/L dans l'eau contre 0,2 g/L dans FGE115), ce qui montre que la conformation adoptée par les chaînes d'alginate dans le FGE115 diffère de celle des chaînes en milieu aqueux. Dès les faibles concentrations, les chaînes d'alginate semblent être plus étendues en milieu FGE115 que dans l'eau, ce qui peut être attribué à des interactions favorisées entre les chaînes polymère et le solvant LTTM.

Nous nous sommes attachés dans un deuxième temps à déterminer la viscosité intrinsèque des chaînes d'alginate dans ces deux solvants. Etant donné que cette grandeur reflète indirectement le volume occupé par une chaîne isolée, à concentration nulle, elle est une bonne indication de la conformation des chaînes adoptée dans le solvant considéré (et dans les conditions d'analyses employées). Dans un premier temps nous avons essayé de représenter l'évolution de la viscosité réduite ( $\eta_{red} = (\eta_{New} - \eta_0) / (\eta_0 * C)$ ) en fonction de la concentration. Dans le régime dilué,  $\eta_{red}$  évolue de façon linéaire avec la concentration selon la relation de Huggins :  $\eta_{red} = [\eta] + k' C [\eta]^2$  ; où  $k'$  est la constante de Huggins. Ainsi, l'ordonnée à l'origine de la droite (limite à concentration nulle) donne accès à la viscosité intrinsèque. Cependant, l'évolution de la viscosité réduite en fonction de la concentration n'a pas conduit à une variation linéaire, probablement en raison de la viscosité trop élevée du FGE115 ou/et aux gammes de concentrations choisies non adaptées pour l'application de la loi de Huggins. En pratique, la concentration critique de recouvrement est définie par la relation :  $C^*[\eta] \approx 1$  suivant un modèle utilisé pour définir le recouvrement géométrique des chaînes assimilées à des sphères <sup>[27]</sup>. Nous avons alors appliqué cette équation aux valeurs de  $C^*$  que nous avons déterminées expérimentalement pour l'alginate dans l'eau et dans le FGE115 et le tableau III.3.2 regroupe les valeurs obtenues.

Solvant	Eau	FGE115
$C^*$ (g/L)	0,9	0,2
$[\eta]$ (mL/g)	1111	5000

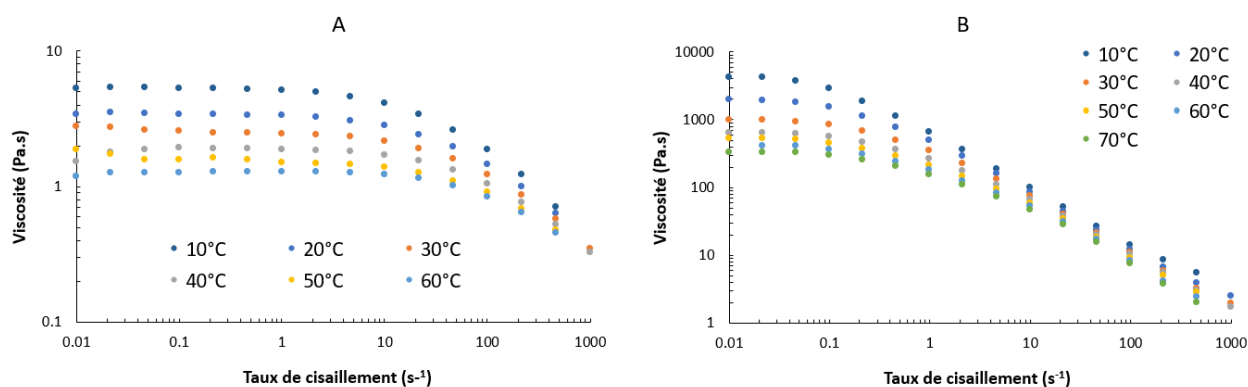
**Tableau III.3.2 Valeurs de  $C^*$  et de viscosité intrinsèque obtenues dans l'eau et dans FGE**



La viscosité intrinsèque dans le FGE115 ( $\approx 5000$  mL/g) est plus élevée que celle déterminée dans l'eau, ce qui signifie que le volume occupé par une chaîne isolée dans ce solvant est supérieur à celui occupé par une chaîne dans l'eau. Ceci corrobore les observations précédemment évoquées, et reflète une conformation plus étendue/expansée des chaînes d'alginate en milieu FGE115, et montre indirectement le caractère de bon solvant du FGE115.

- **Influence de la température sur les viscosités en écoulement**

L'influence de la température sur les viscosités en écoulement de solutions à 2% (m/m) d'alginate de sodium a été mesurée dans l'eau et dans le FGE115 (Figure III.3.18). La viscosité des solutions diminue de façon significative avec l'augmentation de la température. En effet, la température agit directement sur les interactions en dissociant progressivement les liaisons hydrogène établies entre les composés, et induit également une augmentation de la mobilité (macro)moléculaire.

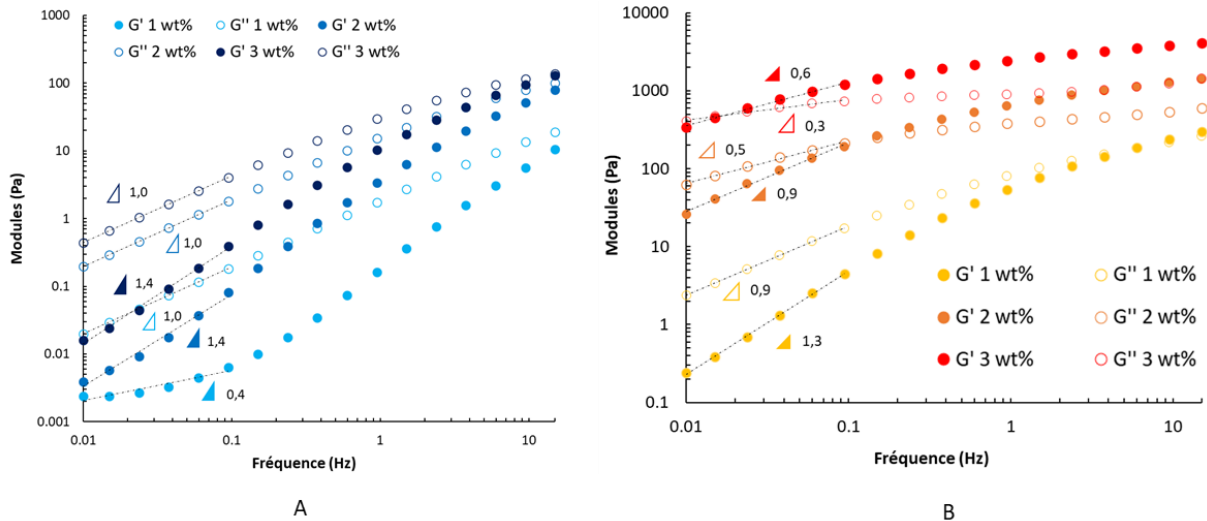


**Figure III.3.18** Evolution de la viscosité en écoulement en fonction de la température pour des solutions d'alginate à 2% (m/m) dans l'eau (A) et dans FGE115 (B)

#### III.3.2.4.2 Analyse des propriétés viscoélastiques des solutions d'alginate

- **Influence de la concentration en alginate**

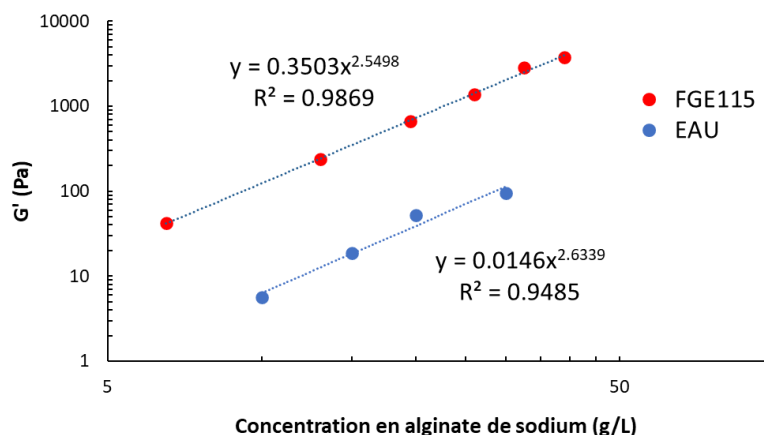
L'influence de la concentration en alginate sur les propriétés viscoélastiques des solutions d'alginate a été étudiée dans l'eau et dans le FGE115. La figure III.3.19 présente l'évolution des modules  $G'$  et  $G''$  des échantillons dans l'eau et dans FGE115 en fonction de la fréquence pour différentes concentrations en alginate de sodium. Nous pouvons tout d'abord constater que les solutions d'alginate dans l'eau (Figure III.3.19A) se comportent comme des fluides visqueux, avec un module de dissipation  $G''$  qui est supérieur au module de conservation  $G'$ , sur toute la gamme de fréquence étudiée. Les modules augmentent classiquement avec la concentration en polymère.



**Figure III.3.19 Evolution des modules viscoélastiques en fonction de la fréquence pour des solutions d'alginate de sodium dans l'eau (A) et dans FGE115 (B). La zone de relaxation terminale des modules viscoélastiques a été exploitée afin de déterminer les pentes à basses fréquences**

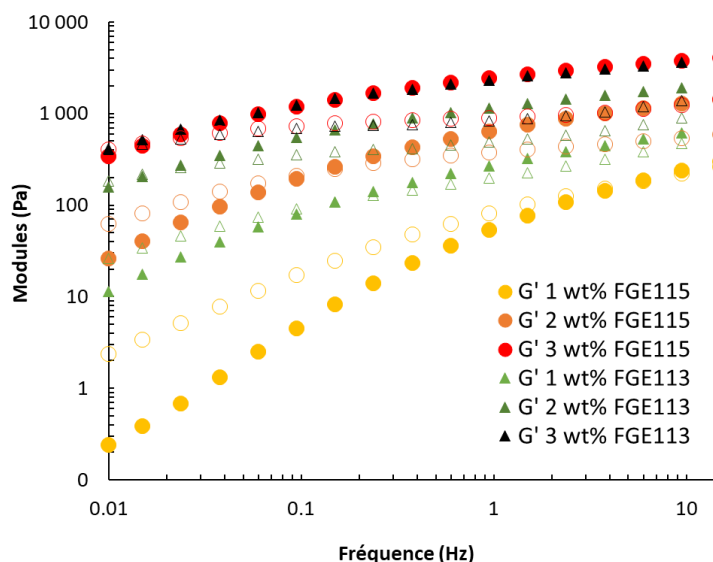
Pour les solutions d'alginate dans le FGE115 (Figure III.3.19B), le comportement est différent. A basses fréquences le module  $G''$  est supérieur à  $G'$ , et ensuite nous observons un croisement des modules, suivi d'une réponse à dominante élastique avec le module  $G'$  qui devient supérieur à  $G''$ . Toutefois, les modules  $G'$  et  $G''$  restent dépendants de la fréquence de sollicitation, et nous observons clairement un phénomène de relaxation des chaînes à basses fréquences. Ceci est caractéristique d'un fluide viscoélastique, et nous ne pouvons pas considérer que ces mélanges se comportent comme des gels physiques (ceci confirme le comportement des échantillons qui coulent après les avoir retournés pendant un certain temps). Nous pouvons également constater que le croisement des modules  $G'$  et  $G''$  est déplacé de façon significative vers les basses fréquences avec l'augmentation de la concentration. Cela signifie que le temps de relaxation du mélange augmente quand la concentration augmente. Ce phénomène peut raisonnablement être expliqué par les enchevêtrements entre les chaînes d'alginate et par les liaisons hydrogène entre les chaînes d'alginate et le FGE115 et entre les chaînes d'alginate, qui sont renforcées et qui augmentent quand la concentration en alginate augmente. Sur la figure III.3.19, nous avons également indiqué les valeurs de pente pour l'évolution de  $G'$  et de  $G''$  à basses fréquences, c'est-à-dire dans la zone de relaxation terminale. Pour des solutions classiques de polymère, les pentes des modules à basses fréquences de sollicitation sont  $\Delta 2$  pour  $G'$  et  $\Delta 1$  pour  $G''$  [28]. Comme nous pouvons le voir, il y a une déviation du comportement des mélanges étudiés par rapport à ce comportement. Cette déviation est d'autant plus importante pour les mélanges dans le FGE115. Ceci peut s'expliquer à la fois par la présence d'interactions fortes spécifiques au sein du milieu, et par la viscosité inhérente du solvant FGE115 qui est élevée. Plus la concentration en alginate augmente, plus les valeurs des pentes dévient des valeurs de 2 et de 1, ce qui est lié aux interactions qui sont renforcées par la concentration en polymère.

La Figure III.3.20 représente l'évolution du module  $G'$  à 9,5 Hz dans l'eau et dans le FGE115 en fonction de la concentration, exprimée en g/L.



**Figure III.3.20 Evolution du module  $G'$  (à 9,5 Hz) en fonction de la concentration en alginate de sodium dans l'eau et dans le FGE115**

Les lois de puissances attribuées aux deux mélanges sont supérieures à 1,5, ce qui laisse penser que pour ces concentrations en alginate, les enchevêtrements sont suffisamment présents pour contribuer à l'élasticité des mélanges [29]; [18]. Les propriétés viscoélastiques de trois mélanges d'alginate (1, 2 et 3% m/m) dans le FGE113 ont été également mesurées. Les courbes obtenues ont été superposées à celles des échantillons dans le FGE115, pour des concentrations identiques (Figure III.3.21).

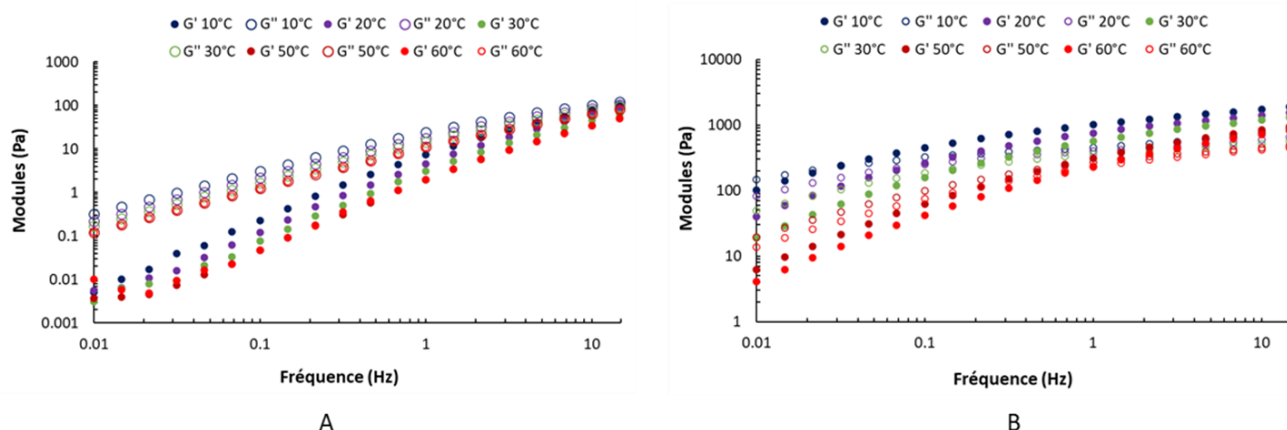


**Figure III.3.21 Evolution des modules viscoélastiques en fonction de la fréquence pour des solutions d'alginate de sodium à différentes concentrations dans FGE115 (•) et dans FGE113 (Δ)**

Comme nous pouvons le voir sur la Figure III.3.21, les propriétés viscoélastiques sont supérieures (modules plus élevés) dans le FGE113. Nous pouvons également constater que le croisement de  $G'$  et  $G''$  se fait à des fréquences plus basses que dans FGE115, ce qui signifie que le temps de relaxation est plus long dans ce solvant. Ces résultats sont très positifs et intéressants, car cela montre que les propriétés rhéologiques des mélanges peuvent aussi être modulées à façon, en fonction des besoins applicatifs, par la composition molaire du solvant ternaire FGE.

### • Influence de la température sur les propriétés viscoélastiques

L'influence de la température sur les modules viscoélastiques a été étudiée pour une concentration en alginate de sodium de 2% (m/m) dans l'eau et dans le FGE115 (Figure III.3.22). Ces mesures ont également été réalisées pour la solution à 2% (m/m) dans FGE113 mais les résultats ne sont pas présentés ici. La Figure III.3.22 montre que les valeurs de  $G'$  et de  $G''$  diminuent avec l'augmentation de la température dans les deux solvants. Nous pouvons constater que dans le FGE115, le point de croisement entre les modules  $G'$  et  $G''$  apparaît à des fréquences plus élevées avec l'augmentation de la température. Il y a donc une diminution du temps de relaxation ( $\tau_{rel}$ ) lorsque la température augmente.



**Figure III.3.22 Modules viscoélastiques  $G'$  (symboles pleins) et  $G''$  (symboles vides) d'une solution d'alginate à 2% (m/m) dans l'eau (A) et dans le FGE115 (B) à différentes températures**

La dynamique du système est significativement impactée par la température, qui dissocie les interactions et augmente les mouvements (macro)moléculaires. À partir de l'évolution des modules  $G'$ ,  $G''$  en fonction de la fréquence pour différentes températures, il est possible de tracer des courbes maitresses de superposition temps-température, en considérant comme référence le comportement viscoélastique à 25°C. Comme en atteste la Figure III.3.23, des courbes maitresses de  $G'$  et de  $G''$  ont été obtenues avec succès, par application d'un facteur de translation horizontal ( $a_T$ ).

L'évolution de ce facteur  $a_T$  en fonction de  $1/T$  suit une loi linéaire de type Arrhenius, à la fois dans l'eau, dans le FGE115 et dans le FGE113. Nous pouvons donc accéder aux valeurs d'énergie d'activation ( $E_a$ ) de ces deux mélanges à travers l'exploitation de l'équation suivante :

$$\ln(a_T) = \frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)$$

Avec  $a_T$  = facteur de translation,  $R$  = constante universelle des gaz parfaits ( $R = 8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ ), et  $T_0$  = température de référence (ici  $25^\circ\text{C}$ )

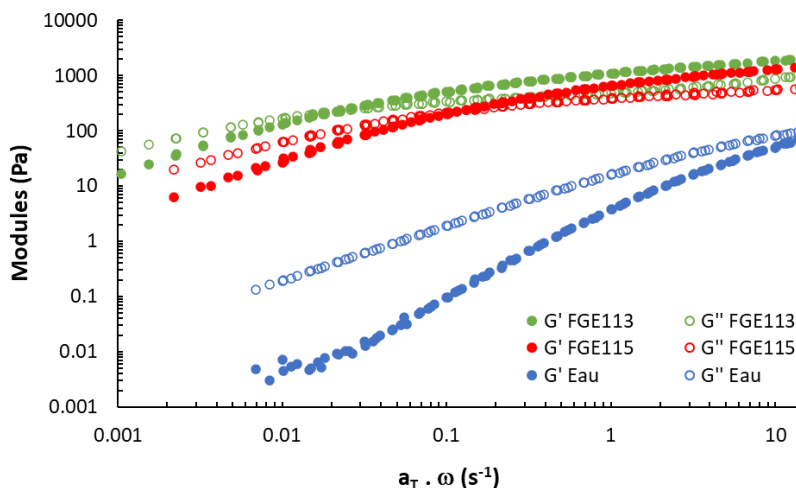


Figure III.3.23 Courbes maitresse temps-température des modules pour des solutions à 2% (m/m) d'alginate dans l'eau (bleu), dans FGE115 (rouge) et dans FGE113 (vert) à  $25^\circ\text{C}$

La pente des droites  $\ln(a_T) = f\left(\frac{1}{T}\right)$  (Figure III.3.24) nous donne accès aux valeurs d'énergie d'activation ( $E_a$ ).

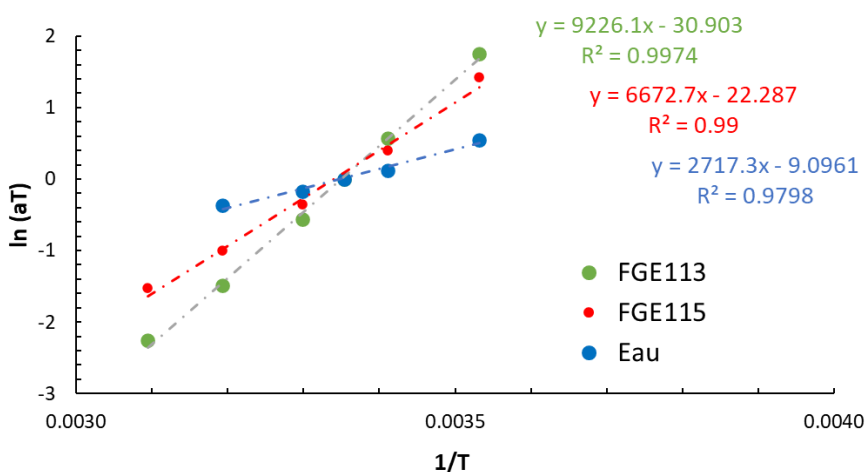


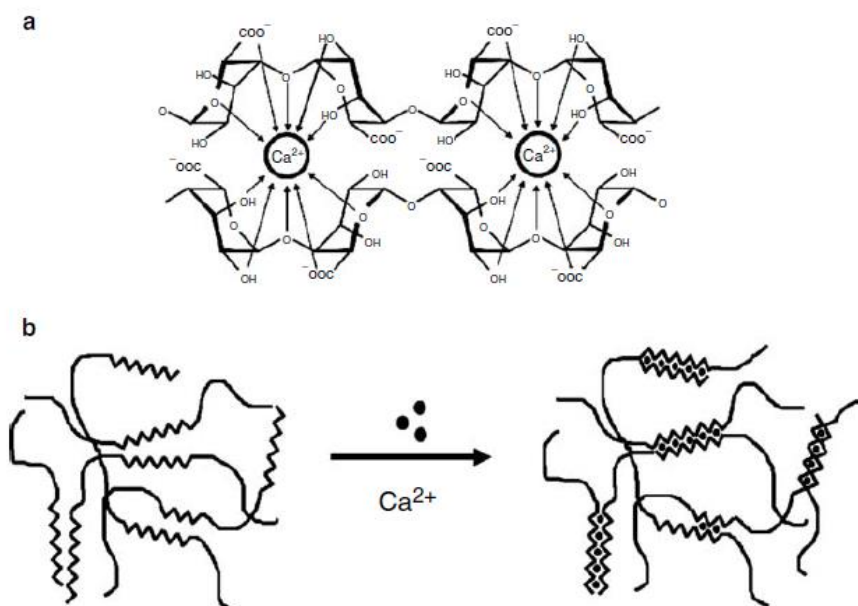
Figure III.3.24 Evolution des facteurs de translation en fonction de  $1/T$  dans l'eau (bleu), dans FGE115 (rouge) et dans FGE113 (vert)

Les résultats obtenus pour ces solutions à 2% (m/m) d'alginate sont de  $22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ;  $55 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  et  $76 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  respectivement dans l'eau, le FGE115 et le FGE113. Pour rappel, les énergies d'activation des solvants FGE115 et FGE113 seuls sont respectivement de 47 et  $65 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  [14]. L'énergie d'activation est donc bien plus importante dans les solutions d'alginate dans le FGE115 que dans l'eau, ce qui reflète une plus forte cohésion au sein du système alginate/FGE115, par rapport au système alginate/eau. Ces différences sont en grande partie dues à la viscosité du FGE115 qui est intrinsèquement élevée puisque ce mélange ternaire est un solvant supramoléculaire organisé. Ces valeurs élevées d'énergie d'activation soulignent également que les interactions développées au sein des échantillons sont sensibles à la température, ce qui est attendu et cohérent puisqu'il s'agit de liaisons hydrogène. L'énergie d'activation obtenue pour le mélange FGE113 est encore plus élevée que celle déterminée dans FGE115. Ceci s'explique par la plus forte cohésion au sein de ce mélange *LTTM* qui se caractérise par une quantité d'eau inférieure à celle présente dans le mélange FGE115.

Comme démontré à travers ces résultats, les solutions d'alginate dans l'eau ou dans les solvants FGE testés (FGE115 et FGE113) conduisent à des solutions viscoélastiques, même pour des concentrations en polymères élevées, mais non à des gels physiques. Comme discuté dans la partie suivante, la littérature indique que l'ajout d'ions divalents, tels que le calcium, permet l'obtention de gels physiques aux propriétés intéressantes à partir de solutions d'alginate de sodium. Ainsi, nous nous sommes proposés d'introduire du calcium (sous différentes formes), dans les solutions d'alginate/FGE115, afin d'évaluer la possibilité de former des gels, sous une forme divisée en tant que billes, et sous une forme de gels massifs. Ceci fait l'objet de la partie qui suit.

### III.3.3. Gélification des solutions d'alginate

Afin d'obtenir un gel, il est nécessaire d'ajouter un cation divalent ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) pour créer des liaisons ioniques entre les chaînes d'alginate [5]. On parle dans ce cas de gélification ionotrope. Ce mécanisme de gélification est le plus décrit dans la littérature et illustré par la figure III.3.25 [5]. Ce mécanisme repose sur l'interaction concomitante des cations divalents avec les atomes d'oxygène des liaisons glycosidiques et les groupements carboxyle des unités guluronate pour former une géométrie rappelant celle d'une boîte à œufs (Figure III.3.25). Cette organisation particulière des chaînes en présence de cations divalents confère une structuration au mélange permettant l'obtention d'hydrogels. Les unités mannuronate ne permettant pas de créer une structure en créneaux, il apparaît clairement que le caractère gélifiant d'un alginate dépendra de la présence de blocs GG et donc directement de son rapport M/G.



**Figure III.3.25 Schéma de principe du mécanisme de gélification ionotrope d'alginate en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (modèle dit de « la boîte à œufs »). (a) Chélation des cations divalents et (b) Formation des jonctions inter-chaînes [5]**

La quantité de calcium est un paramètre déterminant dans le mécanisme de gélification ionotrope des alginate. L'influence de la concentration en ions divalents peut être suivie par le paramètre  $R$ , défini comme le rapport entre le nombre d'ions calcium et le nombre d'unités guluronate. Les travaux de Fang *et al.* rapportent qu'il est possible d'observer trois étapes en fonction du rapport  $R$  dans le mécanisme de gélification ionotrope de longue chaînes d'alginate [30].

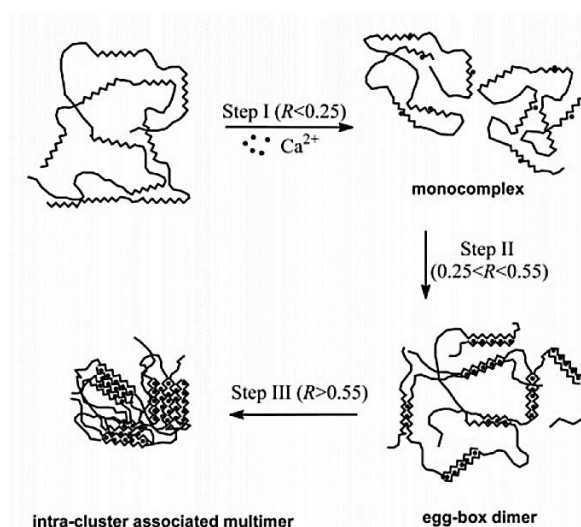


Figure III.3.26 Evolution des interactions entre les chaînes d'alginate lorsque le rapport  $R$  augmente [30]

Pour un rapport  $R$  inférieur à 0,25, un monocomplexe est formé mais aucune association entre les chaînes n'est observée. Lorsque  $R$  est compris entre 0,25 et 0,55, les chaînes d'alginate s'associent sous forme de dimères conduisant à la formation de "boîtes à œufs". Enfin, les dimères complexés par les cations calcium s'associent latéralement pour former un réseau de multimères qui conduit à des zones de jonctions étendues dans l'espace et stables lorsque  $R$  est supérieur à 0,55. Les auteurs décrivent également un mécanisme équivalent pour les alginates à chaîne courtes. Les mêmes valeurs seuil de  $R$  sont retrouvées pour séparer les 3 étapes [30]. Cependant, les chaînes étant plus petites, elles s'associent uniquement latéralement ce qui aboutit à des structures en feuillet. Ce mécanisme de gélification en trois étapes dépendant de  $R$  peut donc être généralisé quelle que soit la masse molaire de l'alginate. Deux voies de gélification des alginates par ajout de calcium sont majoritairement décrites dans la littérature : la gélification externe et la gélification interne. Un autre mécanisme de gélification par voie acide est également décrit dans la littérature [5]. Lorsque le pH de la solution est inférieur aux pKa des acides uroniques : pKa = 3,38 pour l'acide  $\beta$ -D-mannuronique et pKa = 3,65 pour l'acide  $\alpha$ -L-guluronique, les groupes carboxyle sont protonés. Il en découle une diminution des effets de répulsion électrostatique et l'établissement de liaisons hydrogène inter-chaînes conduisant à la gélification du mélange. Les deux acides uroniques ayant un pKa différent, Donati et Paoletti rapportent que le rapport M/G influe sur le pH et par voie de conséquence sur le mécanisme de gélification acide. Comme pour la gélification ionotropique, il a été montré que la force des gels obtenus dépend de la proportion de blocs G. Cependant, ce phénomène reste encore mal compris. L'une des hypothèses proposées par les auteurs repose sur une gélification par un gain entropique lié à l'agrégation des chaînes *via* des interactions hydrophobes [5]. Les deux voies de gélification identifiées dans la littérature (externe et interne) par ajout de calcium dans des solutions d'alginate ont été éprouvées.



Nous avons donc étudié la possibilité de préparer des billes et des gels massifs dans le FGE115 en présence de calcium. Ces expériences de gélification ont également été réalisées en milieu aqueux à des fins de comparaison. Les deux méthodes étant très différentes, nous avons choisi de les dissocier dans la suite de ce chapitre.

### III.3.3.1 Gélification externe de solutions d'alginate

#### III.3.3.1.1 Compléments bibliographiques

La gélification externe d'une solution aqueuse d'alginate est classiquement réalisée par addition goutte à goutte de cette dernière dans un bain de calcium sous agitation. Cette méthode permet d'obtenir un gel hétérogène, le plus souvent sous la forme de billes. Après l'obtention des billes, il est également utile de connaître leur comportement au cours du temps, notamment lorsqu'elles sont empilées. Elles ont en effet tendance à s'affaisser lorsqu'elles sont empilées, surtout à cause de la synérèse <sup>[31]</sup>. Ce procédé ne nécessite ni solvant, ni chauffage et permet d'encapsuler des principes actifs pharmaceutiques, des enzymes, des antigènes ou encore des fragments d'ADN <sup>[2]</sup>.

Il est également possible de réaliser la gélification externe d'une solution d'alginate par dialyse afin d'obtenir un film (Figure III.3.27) <sup>[32]</sup>. La solution d'alginate est versée dans un boudin à dialyse dont l'une des faces est une membrane de dialyse poreuse aux ions calcium. L'immersion du récipient dans une solution de CaCl<sub>2</sub> permet aux ions calcium de diffuser dans la solution d'alginate.

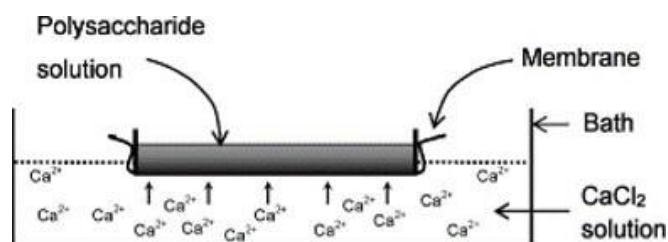


Figure III.3.27 Illustration du procédé d'obtention de gels d'alginate par dialyse <sup>[32]</sup>

Un gradient de concentration en calcium se forme progressivement avec une concentration plus forte sur la surface en contact avec la membrane. Le film obtenu est donc non homogène. Ce procédé permet, entre autres l'enrobage de principes actifs pharmaceutiques par un gel d'alginate. Ces films d'alginate sont séchés et intégrés dans la formulation du médicament sous forme de pastilles ou cachet. Une fois au contact des fluides aqueux de l'estomac, la réhydratation du film d'alginate entraîne son gonflement ce qui va libérer le principe actif contenu dans la pastille médicamenteuse. Pour la suite, nous avons choisi de nous focaliser sur la gélification externe par addition goutte à goutte de la solution d'alginate dans un bain de calcium sous agitation.

## III.3.3.1.2 Matériels et méthodes

La poudre d'alginate de sodium utilisée dans le cadre de cette thèse correspond au lot 9005383 approvisionné auprès de Carl Roth. Cette poudre est intégrée dans le mélange FGE115 ou dans l'eau désionisée sans traitement préliminaire ni purification. L'eau déionisée (18 M $\Omega$ .cm) provient d'un système de filtration Veolia Aquadem<sup>TM</sup>. Le solvant FGE115 est préparé comme décrit précédemment [14]. Le chlorure de calcium (lot BCCC8207, Sigma-Aldrich) utilisé se présente sous la forme de granulés anhydres (taille  $\leq$  à 7,0 mm).

Le chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) a été utilisé pour la réalisation de gels sous forme de billes. Les granulés de CaCl<sub>2</sub> ont été broyés en poudre fine grâce à un pilon. Une solution de CaCl<sub>2</sub> à 100 mM dans le solvant (eau ou FGE115) a été préparée. Une agitation magnétique pendant 2 minutes dans l'eau et 30 minutes dans le FGE115 à  $T_{amb}$  permet la dissolution complète du sel. Les solutions d'alginate sont préparées selon le protocole décrit précédemment (III.3.3.1). Trois concentrations (5 g/L, 10 g/L et 15 g/L) dans le FGE115 et deux concentrations (10 g/L et 15 g/L) dans l'eau ont été testées. Les solutions plus concentrées en alginate sont trop visqueuses et ne permettent pas d'obtenir des billes rondes. La mise en forme des billes est réalisée grâce au montage expérimental présenté sur la figure III.3.28. La solution contenant l'alginate est placée dans une seringue insérée sur un pousse-seringue. L'aiguille de la seringue est pliée pour être perpendiculaire de telle façon à ce que les gouttes tombent de façon verticale. La solution de calcium est placée sous la seringue en respectant une distance de 7 cm entre l'extrémité de l'aiguille et la surface de la solution de calcium. La solution de calcium est continuellement maintenue sous agitation magnétique. Selon le solvant et la concentration en alginate de la solution utilisés dans la seringue, la vitesse à laquelle la solution est versée, ainsi que la vitesse d'agitation de la solution de calcium doivent être adaptées.

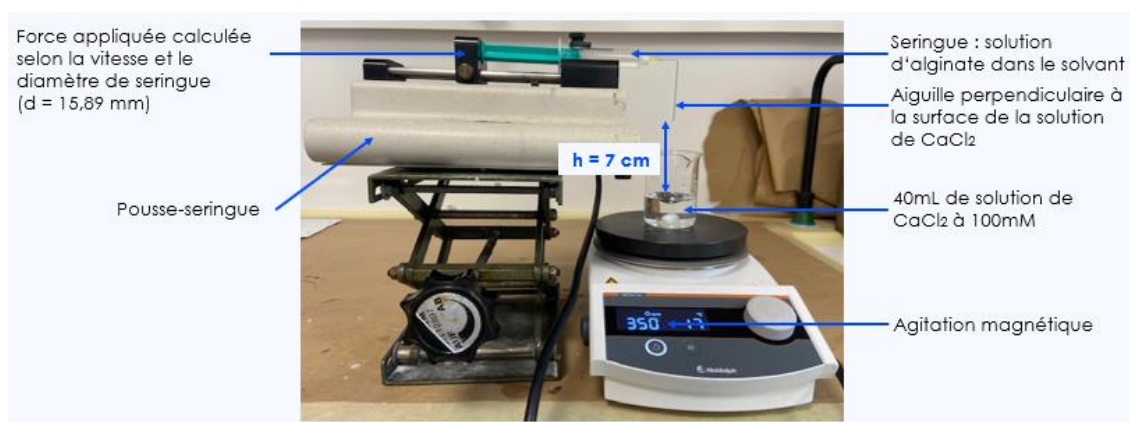


Figure III.3.28 Montage avec pousse-seringue utilisé pour former les billes de gel d'alginate

Les résultats de l'étape d'optimisation du procédé seront discutés dans la partie discussion. Les billes formées sont ensuite laissées dans la solution de  $\text{CaCl}_2$  afin que la diffusion puisse avoir lieu. La stabilité dimensionnelle des billes immergées dans le solvant (eau ou FGE) a été étudiée sur des temps variant de 3h à 112h.

### III.3.3.1.3 Optimisation des paramètres expérimentaux

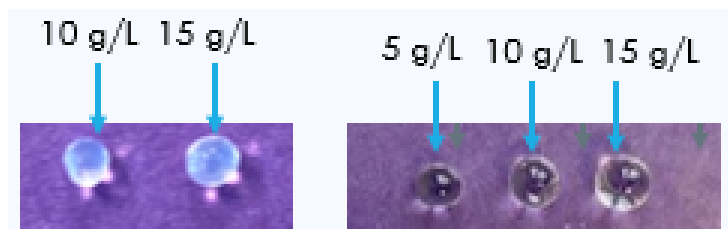
Dans un premier temps, il a été nécessaire d'optimiser les paramètres expérimentaux permettant la préparation de billes de gel rondes et de taille homogène en utilisant le montage expérimental présenté en figure III.3.29. Cette mise au point a été réalisée pour les deux solvants (FGE115 et eau) et pour une gamme de concentration en alginate de sodium la plus étendue possible. Les paramètres variables sont : la hauteur  $h$  entre l'extrémité de l'aiguille et la surface du bain de  $\text{CaCl}_2$ , la vitesse de poussée de la solution d'alginate par le pousse-seringue, le diamètre de la seringue, la concentration et la vitesse d'agitation du bain de  $\text{CaCl}_2$ . Parmi ces paramètres, la hauteur  $h$  a été fixée à 7 cm et le diamètre de la seringue a été fixé à 0,90 mm. Dans un premier temps, la concentration de  $\text{CaCl}_2$  a été fixée à 100 mM afin de s'assurer que la quantité de calcium soit en excès par rapport à la quantité d'alginate (rapport  $R = 4$ , pour une solution à 10 g/L en alginate). Une première série d'essais a permis d'étudier l'influence de la vitesse de poussée de la seringue et de la vitesse d'agitation du bain de  $\text{CaCl}_2$  en fonction de la concentration en alginate. Les paramètres retenus et optimisés sont regroupés dans le tableau III.3.3.

Solvant	Eau		FGE115		
Concentration en alginate (en g/L)	10	15	5	10	15
Agitation du bain de $\text{CaCl}_2$ (en rpm)	350	350	500	350	250
Vitesse de poussée (en mL/h)	15	15	10	5	2

**Tableau III.3.3 Valeurs de vitesse de poussée et d'agitation magnétique selon le solvant et la concentration d'alginate**

Les solutions d'alginate sont très visqueuses puisque les concentrations sélectionnées correspondent au régime de concentration semi-dilué enchevêtré ( $C > C^*$ ). En ce qui concerne les solutions dans le FGE, plus la concentration en alginate augmente et plus la vitesse de poussée a dû être diminuée. En effet, une vitesse de poussée trop importante entraîne la formation d'un écoulement non plus sous forme d'un « goutte à goutte » régulier mais plutôt sous forme d'un filet fin. Pour des solutions de concentrations supérieures à 15 g/L, nous n'avons pas réussi à obtenir des billes rondes. Ce phénomène n'a pas été observé dans l'eau, car les solutions d'alginate dans l'eau sont moins visqueuses que dans le FGE.

De même, la vitesse d'agitation de la solution de calcium a été diminuée lorsque la concentration en alginate augmente dans les solutions dans le FGE. Ceci afin que la bille ait le temps de devenir bien ronde avant d'être entraînée par l'agitation. Après optimisation, des billes gélifiées ont ainsi pu être fabriquées à partir de solutions à 10 et 15 g/L dans l'eau et à 5, 10 et 15 g/L dans le FGE (Figure III.3.29).

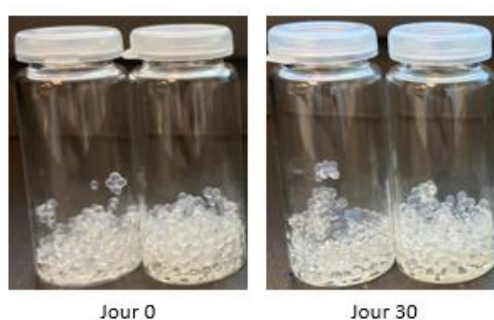


**Figure III.3.29** Billes d'alginate dans l'eau (gauche) et dans FGE (droite) selon leur concentration en alginate

Ce résultat est très novateur, car l'obtention de billes de gels en présence d'ions calcium, dans un solvant tel que le *LTTM* FGE115 n'a jamais été décrite. La conformation étendue des chaînes d'alginate dans le solvant FGE115, mise en évidence indirectement par les analyses de rhéologie présentées précédemment, est un aspect important car cette conformation favorise l'accessibilité des fonctions carboxylate, qui interagissent par des forces électrostatiques avec les ions calcium divalents. On remarque que quel que soit le solvant, le diamètre des billes augmente lorsque la concentration en alginate augmente. Cela s'explique par l'augmentation de la viscosité et par l'augmentation de la masse de la goutte qui est expulsée de l'aiguille. Il est important de préciser que les photos de la Figure III.3.29 n'ont pas été prises avec le même agrandissement, et que les billes dans l'eau sont plus petites que celles dans le FGE115 reflétant un degré de compacité différent en fonction du solvant. Ceci peut être attribué à : *i*) une viscosité plus importante des solutions d'alginate dans FGE115, *ii*) un gonflement des billes qui diffère en fonction du solvant, et *iii*) par la diffusion des ions calcium dans le milieu, différente en fonction du solvant utilisé, et qui régit le « degré » de réticulation ionique à l'origine de la formation du gel ionotrope. Des essais complémentaires ont été effectués en diminuant la concentration en  $\text{CaCl}_2$  à 50 mM. Pour les deux solvants, des billes rondes et homogènes ont été formées. Cependant, les billes obtenues semblent mécaniquement moins résistantes.

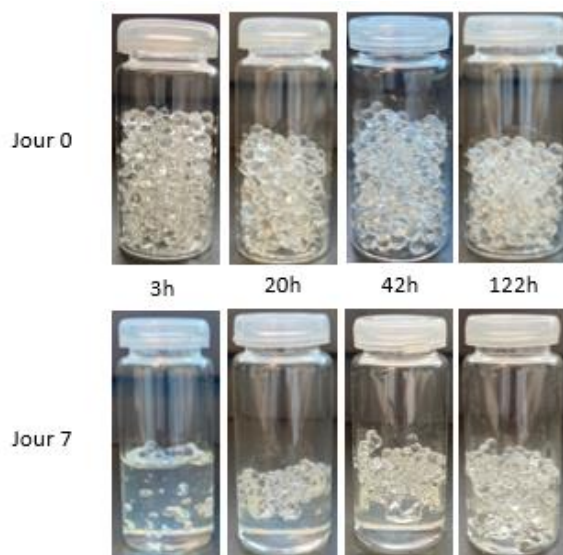
## III.3.3.1.4 Stabilité dimensionnelle des billes

La stabilité dimensionnelle des billes, obtenues dans les deux solvants (eau ou FGE115) selon les paramètres optimisés (cf. Tableau III.3.3), a été étudiée en fonction du temps d'immersion dans la solution de  $\text{CaCl}_2$  (temps variant de 3h à 112h). Après 3 heures dans le bain de calcium, les billes formées à partir de solutions aqueuses sont constituées d'une matrice gélifiée dans son entièreté jusqu'au centre de la bille. Inversement, les billes obtenues avec le solvant FGE115 semblent macroscopiquement constituées d'une coque gélifiée à la périphérie et d'une phase liquide au centre de la bille. La figure III.3.30 représente l'aspect de billes formées à partir d'une solution aqueuse d'alginate à 10 g/L après 3h d'immersion dans la solution de  $\text{CaCl}_2$ , le jour de la préparation et après 30 jours de stockage à  $T_{amb}$ .



**Figure III.3.30 Photographies des billes obtenues à partir d'une solution aqueuse d'alginate de sodium ( $C = 10 \text{ g/L}$ ) après 3h d'immersion dans un bain de  $\text{CaCl}_2$  (100mM) correspondant au jour de la préparation (Jour 0) et après 30 jours de stockage à  $T_{amb}$  (Jour 30)**

Les billes d'hydrogel sont relativement stables sur la période étudiée (30 jours). L'eau reste confinée au sein des billes et celles-ci ne présentent pas de changement macroscopique notable. Nous n'avons donc pas étudié des temps d'immersion plus long dans ce cas. Dans le cas du solvant FGE115, la variation du temps d'immersion est un paramètre déterminant sur la stabilité dimensionnelle des billes. La figure III.3.31 montre des photographies de billes de gel obtenues à partir d'une solution d'alginate à 10 g/L dans le FGE et avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  à 100mM. Différents temps d'immersion ont été étudiés : 3h, 20h, 42h, et 122h. Les billes ont été stockées pendant 7 jours à  $T_{amb}$  avant d'être une nouvelle fois photographiées. La figure III.3.31 montre qu'après 7 jours de conservation à  $T_{amb}$ , une forte exsudation du FGE est observée. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le temps de passage dans le bain de calcium est faible. Pour les billes ayant passé 3h dans le bain, la quantité de FGE « rejeté » est si importante, qu'il n'est optiquement plus possible de bien discerner les billes dans le pilulier. Le degré de compacité initial, contrôlé par le temps passé dans la solution de  $\text{CaCl}_2$ , impacte étroitement la stabilité dimensionnelle des billes formées dans le FGE.



**Figure III.3.31 Photographies des billes obtenues à partir d'une solution d'alginate de sodium ( $C = 10 \text{ g/L}$ ) dans FGE115 après différents temps d'immersion dans un bain de  $\text{CaCl}_2$  (100mM). La ligne du haut correspondant au jour de la préparation (Jour 0) et la ligne du bas à l'aspect des billes après 7 jours de stockage à  $T_{amb}$  (Jour 7)**

L'augmentation du temps d'immersion dans le bain de  $\text{CaCl}_2$  est favorable à l'obtention de billes plus stables. Cela peut s'expliquer par la diffusion progressive des ions  $\text{Ca}^{2+}$  requise pour la formation de réticulations ioniques entre les chaînes polymère. Il apparaît donc que les billes de gel formées dans l'eau sont plus stables, très probablement à cause d'un degré de réticulation ionique plus élevé en milieu aqueux. La diffusion des ions calcium, gouvernée par la viscosité du solvant (et favorisée dans l'eau), est un paramètre clé contrôlant la formation des billes et leur tenue dans le temps. La libération des ions calcium est également liée au degré de dissociation (et à sa cinétique) du chlorure de calcium dans le milieu, qui diffère selon que l'eau ou le FGE est utilisé comme solvant. La diffusion des ions calcium est également gouvernée par la taille des gouttes d'alginate qui tombent dans le bain de  $\text{CaCl}_2$ . Les billes obtenues dans le FGE étant plus grosses, le temps nécessaire pour permettre aux ions calcium de diffuser jusqu'au centre de la bille est plus élevé. Lorsque le solvant FGE115 est utilisé, le temps d'immersion est donc un facteur capital. Finalement, la possibilité de fabriquer des billes de gel dans le FGE115 à partir de différentes concentrations en alginate a été démontrée. Ces essais nécessiteraient d'être poursuivis afin d'optimiser la tenue mécanique des billes obtenues. L'exsudation du solvant au cours du temps reste problématique mais plusieurs voies d'amélioration semblent prometteuses. L'augmentation du temps de diffusion du calcium, la diminution de la taille des billes ou encore le renforcement de la structure gélifiée par un tiers corps sont autant de perspectives qui pourraient être étudiées par la suite. Les protocoles et paramètres expérimentaux définis dans cette partie ont également permis d'obtenir des billes d'extraits végétaux comme nous le verrons dans le chapitre IV.

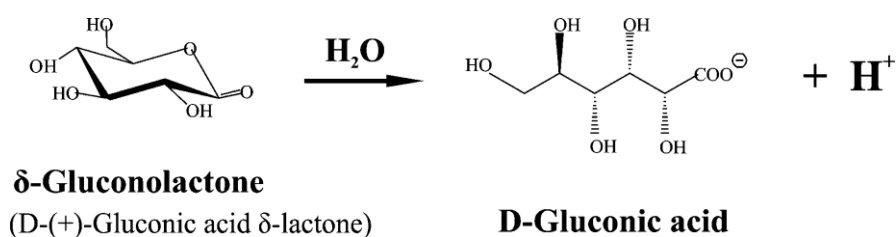
### III.3.3.2 Gélification interne de solutions d'alginate

#### III.3.3.2.1 Compléments bibliographiques

Comparativement à la gélification externe, la gélification interne d'une solution d'alginate permet d'obtenir un gel massif. D'après la littérature, différents sels peuvent être utilisés comme du phosphate de calcium dihydraté et du carbonate de calcium [33]; [34]. Ces sels ont la particularité de se dissocier dans l'eau à pH acide mais pas à pH neutre. Par exemple, la réaction entre le carbonate de calcium et un acide est donnée par l'équation suivante :



Pour initier cette gélification interne, la glucono- $\delta$ -lactone (GDL) est ajoutée au mélange. En solution aqueuse, ce composé va s'hydrolyser lentement en acide gluconique (Figure III.3.32) [35].



**Figure III.3.32 Structures de la glucono- $\delta$ -lactone (GDL) et de l'acide gluconique, produit d'hydrolyse du GDL [35]**

Ainsi, l'hydrolyse du GDL va induire l'acidification progressive du milieu ce qui va entraîner la dissociation du carbonate de calcium et donc la libération continue des ions calcium ainsi qu'un dégagement gazeux de  $\text{CO}_2$ . La gélification ionotrope de l'alginate par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  générés in-situ dans le milieu sera ainsi réalisée de manière progressive.

#### III.3.3.2.2 Matériels et méthodes

Pour étudier la gélification interne, nous avons choisi d'utiliser le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). Ce sel provient d'un lot disponible au laboratoire mais dont la provenance n'est pas connue. Le glucono-delta-lactone (GDL) correspond au lot SLBM7762V approvisionné auprès de Sigma-Aldrich. Des solutions d'alginate à 0,5%, 1% et 1,5% m/m sont préparées dans l'eau et dans le FGE115, selon le protocole décrit précédemment (III.3.3.1). Dans un pilulier, une masse prédéfinie de  $\text{CaCO}_3$  est ajouté à 5g de la solution d'alginate.

La masse de  $\text{CaCO}_3$  à ajouter dépend du rapport  $r$  entre la concentration en calcium et la concentration en fonction acide des chaînes d'alginate. Les rapports qui ont été testés sont  $r = 0,3$ ,  $r = 0,5$  et  $r = 1$ . La masse de  $\text{CaCO}_3$  est calculée grâce à l'équation suivante :

$$m_{\text{CaCO}_3} = r \times \frac{x \times m_{\text{AgS}+s}}{M_{\text{AgS}}} \times M_{\text{CaCO}_3}$$

Avec  $m_{\text{CaCO}_3}$  la masse de  $\text{CaCO}_3$ ,  $r = \text{Ca}/\text{COOH}$ ,  $x$  la concentration effective en alginate,  $m_{(\text{AgS}+s)}$  la masse de solution d'alginate dans le solvant,  $M_{\text{AgS}}=198 \text{ g/mol}$  la masse molaire moyenne du motif de répétition de l'alginate de sodium et  $M_{\text{CaCO}_3}=100 \text{ g/mol}$  la masse molaire du carbonate de calcium.

Le pilulier est placé sous agitation magnétique pour permettre la répartition homogène du  $\text{CaCO}_3$  et sa dissolution partielle. En effet, la solubilité de ce sel dans l'eau est très faible, entre 15 et 20 mg/L à 25°C. Sa solubilité dans le FGE115 est également faible (non quantifiée). Le pilulier est placé dans un bain d'huile à 50°C afin de diminuer la viscosité du solvant et donc favoriser la solubilité du  $\text{CaCO}_3$  dans le milieu. Enfin, une solution de glucono- $\delta$ -lactone (GDL) à 200 g/L dans le solvant correspondant à celui utilisé pour la solution d'alginate a été préparée. La masse de GDL a été ajoutée dans le solvant : sous agitation magnétique pendant 2 minutes avec l'eau et sous agitation magnétique dans le bain d'huile à 50°C pendant 30 min avec le FGE115. Le volume de solution de GDL à ajouter est calculé en considérant un rapport  $\text{GDL}/\text{CaCO}_3 = 2,5$ , c'est-à-dire en ajoutant du GDL en excès. Le calcul permettant d'obtenir la masse de GDL nécessaire est donné par l'équation ci-après :

$$m_{\text{GDL}} = 2,5 \times \frac{m_{\text{CaCO}_3}}{M_{\text{CaCO}_3}} \times M_{\text{GDL}}$$

Avec  $m_{\text{GDL}}$  la masse de GDL, 2,5 le rapport  $\text{GDL}/\text{CaCO}_3$ ,  $m_{\text{CaCO}_3}$  la masse de carbonate de calcium,  $M_{\text{CaCO}_3} = 100 \text{ g/mol}$  la masse molaire du carbonate de calcium et  $M_{\text{GDL}} = 178 \text{ g/mol}$  la masse molaire GDL

Le volume correspondant est ensuite calculé grâce à un produit en croix à partir du volume de solvant et de la masse de GDL qui composent la solution. Le volume est prélevé grâce à une seringue, puis versé rapidement dans la solution d'alginate contenant le  $\text{CaCO}_3$ . Les mélanges en FGE115 sont laissés pendant 1h à 50°C sous agitation pour favoriser à la fois la diffusion du GDL et celle du  $\text{CaCO}_3$ . Les mélanges dans l'eau ne sont laissés à 50°C que 5 minutes car la diffusion, plus rapide dans l'eau, engendre la gélification rapide d'une partie de la solution. Les mélanges sont ensuite laissés 48h à  $T_{\text{amb}}$  pour permettre la diffusion progressive du GDL et du  $\text{CaCO}_3$ .



## III.3.3.2.3 Optimisation des paramètres expérimentaux

A l'instar du procédé de gélification externe, le protocole de gélification interne a nécessité une première étape d'optimisation des paramètres opératoires. Le rapport molaire  $r = \text{Ca}^{2+}/\text{COOH}$ , le rapport molaire GDL/  $\text{CaCO}_3$ , ainsi que la température à laquelle la réaction se fait sont des variables dont l'impact a été discuté. Ces essais ont été réalisés à partir d'une solution aqueuse à 10 g/L en alginate. Les différentes expériences effectuées sont décrites dans le tableau III.3.4.

N° essai	$r$	GDL/ $\text{CaCO}_3$	Température (°C)
1	1	2	20
2	0,5	2	20
3	0,3	2	20
4	0,5	2	0
5	0,5	2	50
6	0,5	3	20
7	0,5	3	50
8	0,5	2,5	50

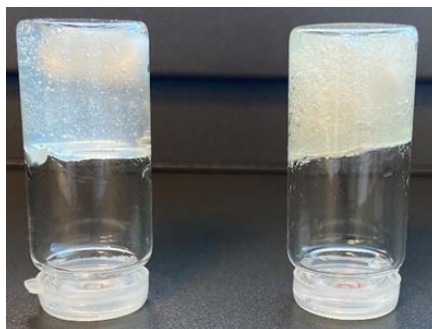
**Tableau III.3.4 Paramètres testés pour l'optimisation du protocole de formation de gels d'alginate par gélification interne**

Ces différentes conditions opératoires ont permis de retenir les paramètres correspondants à l'essai n°8 à savoir : rapport  $r$  de 0,5 (donc un excès de fonctions acide), un rapport GDL/ $\text{CaCO}_3$  de 2,5 (donc un excès de GDL), et une température de 50°C. Ces choix ont été guidés par les constatations suivantes :

- (i) L'utilisation d'un rapport  $r > 0,5$  conduit à un excès de carbonate de calcium n'ayant pas réagi et à une synérèse importante du gel formé, après quelques jours de stockage. Le rapport  $r = 0,3$  donne quant à lui un gel moins résistant mécaniquement.
- (ii) Un excès de GDL par rapport au  $\text{CaCO}_3$ , conduit à un milieu plus acide (induit par l'hydrolyse du GDL), ce qui joue directement sur la cinétique de libération des ions divalents  $\text{Ca}^{2+}$ , et sur la quantité d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  formés. Ceci permet une meilleure homogénéisation des gels. Un rapport GDL/ $\text{CaCO}_3$  de 2,5 s'est révélé suffisant.
- (iii) Enfin, la température a été fixée à 50°C, ce qui permet de diminuer la viscosité de la solution d'alginate, et donc de permettre une diffusion plus homogène des ions calcium, nécessaire pour obtenir un gel homogène.

## III.3.3.2.4 Caractérisation des gels obtenus

Les paramètres opératoires retenus précédemment ( $r = 0,5$ ,  $GDL/CaCO_3 = 2,5$  et  $T = 50^\circ C$ ) ont permis la préparation de gels à partir de solutions à 1,5% (m/m) d'alginate de sodium dans l'eau et dans le FGE115. Une observation macroscopique des gels obtenus a été réalisée après 48h de repos à  $T_{amb}$  dont 24h avec les flacons retournés (Figure III.3.33).



**Figure III.3.33 Photographies des gels obtenus par gélification interne de solution d'alginate à 1,5% (m/m) dans l'eau (gauche) et dans le FGE115 (droite) après 48h de repos à  $T_{amb}$**

Aucun écoulement n'est constaté 24h après le retournement des piluliers et cela pour les deux solvants. Ce test simple semble indiquer que les échantillons obtenus se comportent comme des gels physiques. On observe également que les gels présentent une certaine turbidité, reflet d'une hétérogénéité à petite échelle. Le gel dans FGE115 (photo de droite) présente un degré d'opacité plus élevé et une quantité de bulles bien plus importante que dans l'eau. En effet, le  $CO_2$  dégagé par la réaction entre le GDL et le carbonate de calcium ne parvient pas à être éliminé correctement dans le milieu FGE115 qui est plus visqueux. Suite à ce constat, des essais avec des concentrations plus faibles en alginate ont été réalisés. Pour les trois concentrations étudiées (0,5 ; 1 et 1,5% m/m) le test du retournement a été validé. De façon complémentaire, l'évaluation des propriétés rhéologiques a été entreprise. Des suivis de modules viscoélastiques en fonction de la fréquence ont été réalisés sur les échantillons obtenus dans les deux solvants (eau et FGE115) en suivant la procédure d'analyse développée pour l'étude des solutions d'alginate (cf. III.3.2.1 – Propriétés rhéologiques). Premièrement, le gel obtenu à partir d'une solution aqueuse à 1,5% (m/m) en alginate a été soumis à trois balayages en fréquence successifs avec des temps de repos de 15 min entre chacun d'entre eux. La figure III.3.34 montre une excellente reproductibilité des résultats. Le module élastique  $G'$  est supérieur au module visqueux  $G''$ , et ce, sur toute la gamme de fréquence testée. De plus, le rapport  $G'/G''$  est élevé ce qui permet d'affirmer qu'il s'agit bien d'un gel physique d'élasticité relativement importante ( $G' \approx 5000$  Pa à 10 Hz). Le gel revient à son état initial après un temps de repos de 15 min entre chaque balayage.

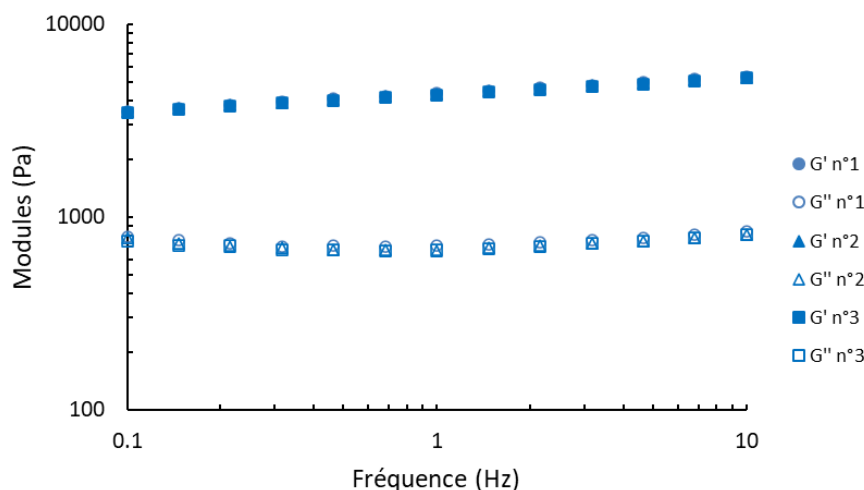


Figure III.3.34 Modules viscoélastiques d'un gel à 1,5% (m/m) d'alginate dans l'eau avec 15min de repos entre chaque balayage

Deuxièmement, trois prélèvements pris dans le même échantillon massif ont été analysés en rhéologie afin d'évaluer l'hétérogénéité du gel obtenu (Figure III.3.35A). Des mesures identiques ont été réalisées sur les gels formés dans le FGE115 à partir d'une concentration en alginate de 1,5% (m/m) (Figure III.3.35B).

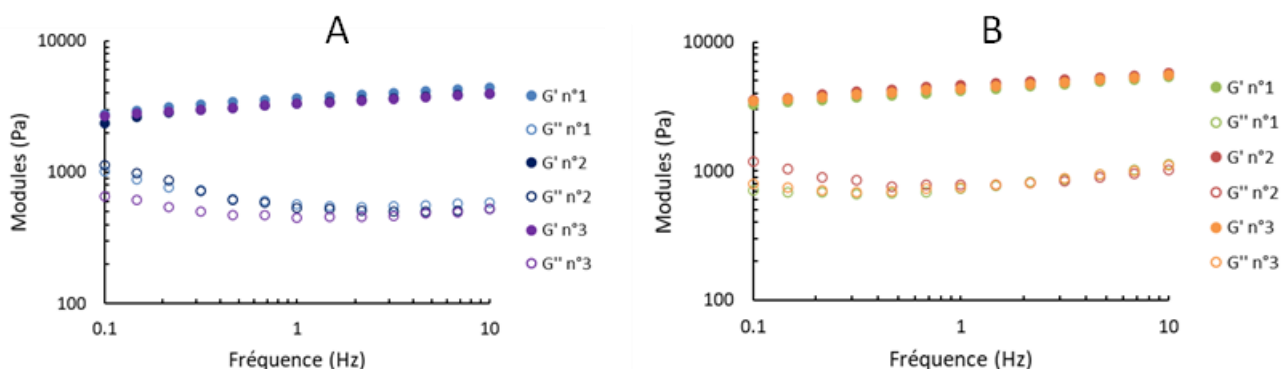
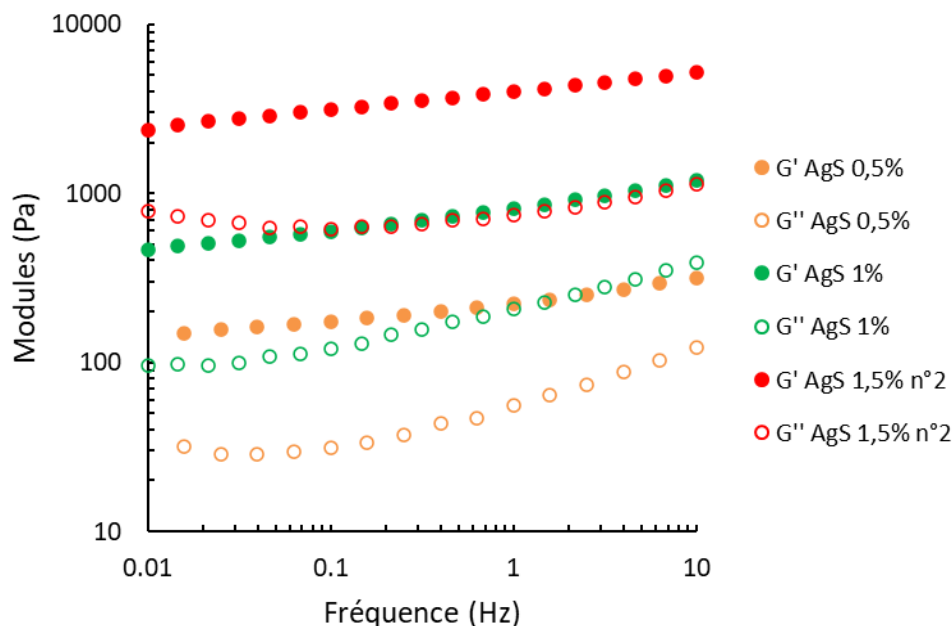


Figure III.3.35 Modules viscoélastiques pour trois parties d'un même gel obtenu par gélification interne à partir d'une solution d'alginate à 1,5% m/m dans l'eau (A) et dans le FGE115 (B)

La figure III.3.35 met en évidence que les modules viscoélastiques des trois parties étudiées se superposent bien sur tout le domaine de fréquences testées, et cela pour les deux solvants. La figure III.3.35B indique également que le matériau obtenu dans FGE115 présente un module élastique  $G'$  supérieur au module visqueux  $G''$  sur toute la gamme de fréquence testée. Le rapport  $G'/G''$  élevé indique qu'il s'agit bien d'un gel physique d'élasticité élevée ( $G' \approx 5000$  Pa à 10 Hz), dont les propriétés rhéologiques sont similaires à celles observées dans l'eau.

Troisièmement, nous nous sommes intéressés à l'évolution des modules viscoélastiques pour différentes concentrations en alginate dans le FGE115 (figure III.3.36).



**Figure III.3.36 Evolution des modules viscoélastiques pour des gels à 0,5%, 1% et 1,5% massique d'alginate de sodium dans le FGE115 obtenus par gélification interne**

A cause de la présence de bulles dans les échantillons, les valeurs des modules obtenues ne peuvent pas être quantitativement comparées avec exactitude. Toutefois, une augmentation significative des modules  $G'$  et  $G''$  est observée lorsque la concentration en alginate augmente. L'augmentation de la concentration en alginate permet donc la formation d'un réseau physique présentant un module élastique plus élevé, lié à : *i*) l'augmentation du nombre et de la taille des jonctions formées entre les ions calcium et les groupements carboxylate des chaînes d'alginate, et *ii*) au nombre d'enchevêtrements formés entre les chaînes qui augmentent avec la concentration (ici  $C > C^*$ ), comme démontré par les analyses en rhéologie discutées précédemment.

Enfin, la stabilité physique des gels obtenus a été éprouvée en les soumettant à un traitement thermique entre 10 et 70°C. Les modules ne varient que très peu sur le domaine de température testé, et ceci pour les deux solvants. Les gels dans l'eau et dans le FGE115 apparaissent donc stables en température, et ne subissent aucune transition thermique. Ces expériences ont donc démontré la possibilité de gélifier une solution d'alginate dans le FGE115 par des ions calciums pour conduire à des gels « massifs », et la réponse viscoélastique peut être modulée à façon par la concentration en alginate.

### III.3.4 Conclusions

Suite à la sélection de l'alginate de sodium dans la première partie de ce chapitre III, nous avons tout d'abord vérifié par des compléments de recherche bibliographique que ce polysaccharide répond favorablement à tous les prérequis souhaités dans le cadre de cette thèse. Toutefois les solutions aqueuses d'alginate de sodium se comporte comme des fluides viscoélastiques rhéofluidifiants et non comme des gels. Plusieurs méthodes basées sur l'ajout de calcium permettent de gélifier une phase aqueuse d'alginate ont été identifiées : la gélification externe qui permet la réalisation de films ou de billes, et la gélification interne qui permet la réalisation de gels massifs. Dans cette troisième partie du chapitre III, nous avons décrit pour la première fois, l'étude de l'incorporation dans des solvants FGE d'alginate de sodium et discuté la faisabilité d'obtention de gels à partir de ces solutions.

Après avoir caractérisé la poudre d'alginate de sodium utilisée, nous avons qualifié l'affinité des solvants (eau et FGE) avec l'alginate. Les résultats obtenus indiquent que des interactions inter chaînes ont lieu pour des concentrations en alginate plus basses dans le FGE115 que dans l'eau, ce qui suggère une conformation différente des chaînes dans les deux solvants. De plus, la viscosité intrinsèque plus élevée pour la solution d'alginate dans le FGE115 que dans l'eau démontre une meilleure affinité de l'alginate avec ce solvant. Des propriétés viscoélastiques supérieures (modules plus élevés) ont également été mises en évidence dans le solvant FGE113. Ces résultats montrent que les propriétés rhéologiques des mélanges alginate/FGE peuvent aussi être modulées à façon, en fonction des besoins applicatifs, par la composition molaire du solvant ternaire FGE. Cependant, les solutions restent viscoélastiques, il n'y a donc pas formation de réseau physique.

L'ajout de calcium dans les solutions d'alginate a ensuite été étudié. D'une part, nous avons démontré que des billes de gel peuvent être formées dans l'eau et dans le FGE115 sur une gamme de concentration en alginate variant de 5 à 15 g/L. Grâce à une optimisation des paramètres expérimentaux, des billes sphériques et de tailles homogènes ont été obtenues dans les 2 solvants. D'autre part, il est possible de préparer des gels massifs à partir de solutions d'alginate dans le FGE115. Les gels formés, caractérisés par un comportement élastique sur le domaine de fréquences testées, ont ainsi montré une bonne homogénéité. Les propriétés viscoélastiques de ces matériaux ont tendance à augmenter avec la concentration en alginate, et ces gels possèdent une bonne tenue en température (entre 10°C et 70°C).

Plusieurs axes de poursuite de ces travaux ont été identifiés. Tout d'abord, des analyses plus approfondies de l'organisation interne des solutions d'alginate dans les solvants FGE permettraient de confirmer que les chaînes adoptent une conformation différente dans les solvants FGE comparativement à l'eau. L'analyse des matériaux obtenus pourrait également être complétée. En ce qui concerne la gélification externe, l'analyse plus approfondie de la tenue des billes dans le temps serait nécessaire dans une perspective d'application industrielle pour gélifier les extraits de Gattefossé. Pour la gélification interne, il serait intéressant de poursuivre l'étude des propriétés rhéologiques des gels en fonction de la concentration et de la température afin de déterminer, entre autres, l'énergie d'activation de ces gels. Enfin, dans ces travaux nous avons sélectionné un type de sel de calcium par méthode de gélification, mais, d'autres sels de calcium voire d'autres cations divalents ( $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) pourraient être utilisés pour préparer des gels à partir des solutions d'alginate de sodium dans des *LTTM* FGE. Cependant, les connaissances acquises dans cette partie ont été jugées suffisantes pour envisager de viscosifier, voire de gélifier des extraits végétaux obtenus avec le solvant FGE115 (cf. Chapitre IV). D'autant plus qu'il nous reste à décrire l'utilisation du troisième polysaccharide sélectionné : le  $\kappa$ -carraghénane. Les résultats de ces travaux de recherche ont été publiés dans « *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* » en 2022 <sup>[36]</sup> et sont présentés sous ce format dans la quatrième partie de ce chapitre III.

### III.3.5 Références bibliographiques

- [1] Lee K. Y., Mooney D. J. Alginate Properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 2012, 37, 1, pp. 106–126.
- [2] Goujon I. Les alginates, excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique: applications à la synthèse d'un gel chimique. *Pharmacie. Faculté de P. Nancy*. 2004.
- [3] Sime W. J. Alginates. In: Harris P. *Food Gels*. Dordrecht. Springer Science+Business Media B.V. 1990, pp. 53–78. ISBN 978-94-010-6825-3.
- [4] Saravana P. S., Cho Y.-N., Woo H.-C., et al. Green and efficient extraction of polysaccharides from brown seaweed by adding deep eutectic solvent in subcritical water hydrolysis. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 198, pp. 1474–1484.
- [5] Donati I., Paoletti S. Material Properties of Alginates. In: Rehm B. H. A. *Alginates: Biology and Applications*. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg. 2009, pp. 1–53. ISBN 978-3-540-92678-8.
- [6] Draget K. I. Alginates. *Handbook of Hydrocolloids*. Elsevier. 2009, pp. 807–828. ISBN 9781845694142.
- [7] Salomonsen T., Jensen H. M., Stenbæk D., et al. Chemometric prediction of alginate monomer composition A comparative spectroscopic study using IR, Raman, NIR and NMR. *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72, 4, pp. 730–739.
- [8] Ci S. X., Huynh T. H., Louie L. W., et al. Molecular mass distribution of sodium alginate by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1999, 864, 2, pp. 199–210.
- [9] Ma J., Lin Y., Chen X., et al. Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions. *Food Hydrocolloids*, 2014, 38, pp. 119–128.
- [10] Comaposada J., Gou P., Marcos B., et al. Physical properties of sodium alginate solutions and edible wet calcium alginate coatings. *LWT - Food and Science Technology*, 2015, 64, 1, pp. 212–219.
- [11] Miyata T., Asami N., Uragami T. A reversibly antigen-responsive hydrogel. *Nature*, 1999, 399, 6738, pp. 766–769.
- [12] Popa E. G., Gomes M. E., Reis R. L. Cell delivery systems using alginate--carrageenan hydrogel beads and fibers for regenerative medicine applications. *Biomacromolecules*, 2011, 12, 11, pp. 3952–3961.
- [13] Wang B., Wan Y., Zheng Y., et al. Alginate-based composites for environmental applications A critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2019, 49, 4, pp. 318–356.
- [14] Caprin B., Charton V., Rodier J.-D., et al. Scrutiny of the supramolecular structure of bio-sourced fructose/glycerol/water ternary mixtures Towards green low transition temperature mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 337, pp. 116428.
- [15] Grasdalen H. High-field, 1H-n.m.r. spectroscopy of alginate Sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate research*, 1983, 118, pp. 255–260.
- [16] Papageorgiou S. K., Kouvelos E. P., Favvas E. P., et al. Metal-carboxylate interactions in metal-alginate complexes studied with FTIR spectroscopy. *Carbohydrate research*, 2010, 345, 4, pp. 469–473.
- [17] Colby R. H. Structure and linear viscoelasticity of flexible polymer solutions: comparison of polyelectrolyte and neutral polymer solutions. *Rheologica Acta*, 2010, 49, 5, pp. 425–442.
- [18] Leibler L., Rubinstein M., Colby R. H. Dynamics of reversible networks. *Macromolecules*, 1991, 24, 16, pp. 4701–4707.
- [19] Rubinstein M., Colby R. H. *Polymer physics*, 2003,
- [20] Dobrynin A. V., Colby R. H., Rubinstein M. Scaling Theory of Polyelectrolyte Solutions. *Macromolecules*, 1995, 28, 6, pp. 1859–1871.

- [21] DeGennes P.-G. Scaling concepts in polymer physics. Ithaca, London: Cornell University Press, 1979, 1324 p. ISBN 9780801412035.
- [22] Roger S., Sang Y. Y. C., Bee A., et al. Structural and multi-scale rheophysical investigation of di-phasic magneto-sensitive materials based on biopolymers. *The European physical journal. E, Soft matter*, 2015, 38, 8, pp. 88.
- [23] Lopez C. G., Colby R. H., Graham P., et al. Viscosity and Scaling of Semiflexible Polyelectrolyte NaCMC in Aqueous Salt Solutions. *Macromolecules*, 2017, 50, 1, pp. 332–338.
- [24] Lopez C. G., Rogers S. E., Colby R. H., et al. Structure of Sodium Carboxymethyl Cellulose Aqueous Solutions: A SANS and Rheology Study. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2015, 53, 7, pp. 492–501.
- [25] Milas M., Rinaudo M., Roure I., et al. Comparative rheological behavior of hyaluronan from bacterial and animal sources with cross-linked hyaluronan (hylan) in aqueous solution. *Biopolymers*, 2001, 59, 4, pp. 191–204.
- [26] Doderò A., Vicini S., Alloisio M., et al. Rheological properties of sodium alginate solutions in the presence of added salt An application of Kulicke equation. *Rheologica Acta*, 2020, 59, 6, pp. 365–374.
- [27] MACOSKO C. W. *Rheology Principles. Measurements and Applications*, 1994,
- [28] Barnes H. A. *A handbook of elementary rheology*. University of Wales, 2000,
- [29] Rubinstein M., Semenov A. N. Dynamics of Entangled Solutions of Associating Polymers. *Macromolecules*, 2001, 34, 4, pp. 1058–1068.
- [30] Fang Y., Al-Assaf S., Phillips G. O., et al. Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. *The journal of physical chemistry. B*, 2007, 111, 10, pp. 2456–2462.
- [31] Louni Si Déformation plastique dans des empilements de capsules. [https://www.academia.edu/39249882/d%C3%A9formation\\_plastique\\_dans\\_des\\_empilement\\_de\\_capsules](https://www.academia.edu/39249882/d%C3%A9formation_plastique_dans_des_empilement_de_capsules), 2018,
- [32] Sriamornsak P., Kennedy R. A. A novel gel formation method, microstructure and mechanical properties of calcium polysaccharide gel films. *International journal of pharmaceutics*, 2006, 323, 1-2, pp. 72–80.
- [33] Fu S., Thacker A., Sperger D. M., et al. Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12, 2, pp. 453–460.
- [34] Xie Z., Wang X., Jia Y., et al. Ceramic forming based on gelation principle and process of sodium alginate. *Materials Letters*, 2003, 57, 9-10, pp. 1635–1641.
- [35] Shchipunov Y., Sarin S., Kim I., et al. Hydrogels formed through regulated self-organization of gradually charging chitosan in solution of xanthan. *Green Chemistry*, 2010, 12, 7, pp. 1187.
- [36] Caprin B., Viñado-Buil G., Sudre G., et al.  $\kappa$ -Carrageenan Associated with Fructose/Glycerol/Water LTTM: Toward Natural Thermosensitive Physical Gels. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022,



### III.3.6 Liste des figures et des tableaux

Figure III.3.1 (a) Structure des unités monomère mannuronate et guluronate et (b) exemples de compositions des blocs caractéristiques des alginates <sup>[5]</sup>	159
Figure III.3.2 (A) Courbes d'écoulement à 25°C (B) balayage en fréquence de solutions aqueuses d'alginate de sodium ( $M_w = 1,8 \cdot 10^6$ g/mol et $M/G = 0,38$ ) <sup>[9]</sup>	160
Figure III.3.3 Thermogramme obtenu lors de l'analyse ATG de l'alginate de sodium	163
Tableau III.3.1 Résultat de l'analyse élémentaire réalisée sur la poudre d'alginate de sodium	163
Figure III.3.4 Chromatogramme de l'alginate de sodium à 25°C	164
Figure III.3.5 Spectre RMN <sup>1</sup> H ( $D_2O$ , 80°C) de l'alginate de sodium	164
Figure III.3.6 Photographies des échantillons d'alginate de sodium à différentes concentrations en chaînes dans l'eau, FGE115 et FGE113 environ 1 minute après retournement du pilulier	165
Figure III.3.7 Impact du temps sur l'écoulement des solutions d'alginate de sodium à 2,5% (pilulier de gauche) et à 3 % (pilulier de droite) dans le FGE115	166
Figure III.3.8 Illustration de l'instabilité microbologique observée à l'œil nu dans les solutions aqueuses d'alginate de sodium après stockage à $T_{amb}$	167
Figure III.3.9 Mesures de pH pour des mélanges à 1% (m/m) d'alginate dans le FGE115 et dans l'eau	167
Figure III.3.10 Spectres IR de l'alginate de sodium (rouge) du solvant FGE115 (violet) et d'une solution d'alginate à 3% (m/m) dans le FGE115 (bleu)	167
Figure III.3.11 Zoom sur la partie A des spectres IR de l'alginate de sodium (rouge) du solvant FGE115 (violet) et d'une solution d'alginate à 3% (m/m) dans le FGE115 (bleu)	168
Figure III.3.12 Zoom sur la partie B des spectres IR de l'alginate de sodium (rouge) du solvant FGE115 (violet) et d'une solution d'alginate à 3% (m/m) dans le FGE115 (bleu)	168
Figure III.3.13 Déconvolution par transformé de Fourier de la partie des spectres IR correspondant aux groupements carboxylate de l'alginate de sodium et à l'eau du solvant FGE115	169
Figure III.3.14 Thermogrammes de solutions d'alginate de sodium dans FGE115 à 2% (m/m) (bleu) et 3% (m/m) (vert) comparativement au solvant seul (rouge)	169
Figure III.3.15 Courbes d'écoulement à 25°C des solutions aqueuses d'alginate de sodium (A) et des mélanges FGE115 + alginate de sodium (B)	170
Figure III.3.16 Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en alginate de sodium dans l'eau	172
Figure III.3.17 Evolution de la viscosité spécifique en fonction de la concentration en alginate de sodium dans FGE115	172
Tableau III.3.2 Valeurs de $C^*$ et de viscosité intrinsèque obtenues dans l'eau et dans FGE	173
Figure III.3.18 Evolution de la viscosité en écoulement en fonction de la température pour des solutions d'alginate à 2% (m/m) dans l'eau (A) et dans FGE115 (B)	174
Figure III.3.19 Evolution des modules viscoélastiques en fonction de la fréquence pour des solutions d'alginate de sodium dans l'eau (A) et dans FGE115 (B). La zone de relaxation terminale des modules viscoélastiques a été exploitée afin de déterminer les pentes à basses fréquences	175
Figure III.3.20 Evolution du module $G'$ (à 9,5 Hz) en fonction de la concentration en alginate de sodium dans l'eau et dans le FGE115	176
Figure III.3.21 Evolution des modules viscoélastiques en fonction de la fréquence pour des solutions d'alginate de sodium à différentes concentrations dans FGE115 (●) et dans FGE113 (Δ)	176

Figure III.3.22 Modules viscoélastiques $G'$ (symboles pleins) et $G''$ (symboles vides) d'une solution d'alginate à 2% (m/m) dans l'eau (A) et dans le FGE115 (B) à différentes températures	177
Figure III.3.23 Courbes maitresse temps-température des modules pour des solutions à 2% (m/m) d'alginate dans l'eau (bleu), dans FGE115 (rouge) et dans FGE113 (vert) à 25°C	178
Figure III.3.24 Evolution des facteurs de translation en fonction de $1/T$ dans l'eau (bleu), dans FGE115 (rouge) et dans FGE113 (vert)	178
Figure III.3.25 Schéma de principe du mécanisme de gélification ionotropique d'alginate en présence de $Ca^{2+}$ (modèle dit de « la boîte à œufs »). (a) Chélation des cations divalents et (b) Formation des jonctions inter-chaînes <sup>[5]</sup>	180
Figure III.3.26 Evolution des interactions entre les chaînes d'alginate lorsque le rapport R augmente <sup>[30]</sup>	181
Figure III.3.27 Illustration du procédé d'obtention de gels d'alginate par dialyse <sup>[32]</sup>	182
Figure III.3.28 Montage avec pousse-seringue utilisé pour former les billes de gel d'alginate	183
Tableau III.3.3 Valeurs de vitesse de poussée et d'agitation magnétique selon le solvant et la concentration d'alginate	184
Figure III.3.29 Billes d'alginate dans l'eau (gauche) et dans FGE (droite) selon leur concentration en alginate	185
Figure III.3.30 Photographies des billes obtenues à partir d'une solution aqueuse d'alginate de sodium (C = 10 g/L) après 3h d'immersion dans un bain de $CaCl_2$ (100mM) correspondant au jour de la préparation (Jour 0) et après 30 jours de stockage à $T_{amb}$ (Jour 30)	186
Figure III.3.31 Photographies des billes obtenues à partir d'une solution d'alginate de sodium (C = 10 g/L) dans FGE115 après différents temps d'immersion dans un bain de $CaCl_2$ (100mM). La ligne du haut correspondant au jour de la préparation (Jour 0) et la ligne du bas à l'aspect des billes après 7 jours de stockage à $T_{amb}$ (Jour 7)	187
Figure III.3.32 Structures de la glucono- $\delta$ -lactone (GDL) et de l'acide gluconique, produit d'hydrolyse du GDL <sup>[35]</sup>	188
Tableau III.3.4 Paramètres testés pour l'optimisation du protocole de formation de gels d'alginate par gélification interne	190
Figure III.3.33 Photographies des gels obtenus par gélification interne de solution d'alginate à 1,5% (m/m) dans l'eau (gauche) et dans le FGE115 (droite) après 48h de repos à $T_{amb}$	191
Figure III.3.34 Modules viscoélastiques d'un gel à 1,5% (m/m) d'alginate dans l'eau avec 15min de repos entre chaque balayage	192
Figure III.3.35 Modules viscoélastiques pour trois parties d'un même gel obtenu par gélification interne à partir d'une solution d'alginate à 1,5% m/m dans l'eau (A) et dans le FGE115 (B)	192
Figure III.3.36 Evolution des modules viscoélastiques pour des gels à 0,5%, 1% et 1,5% massique d'alginate de sodium dans le FGE115 obtenus par gélification interne	193

## III.4 $\kappa$ -carrageenan associated with Fructose/Glycerol/Water LTTM: towards natural thermosensitive physical gels

### III.4.1. Introduction

In the context of sustainable development, polysaccharides remain a powerful and tantalizing resource for biomass valorization since they can be used to generate eco-friendly materials. In this context, such natural polymers have been combined with Deep Eutectic Solvents (DES), just through a simple mixture, usefully exploited to obtain fully biobased and biosafe materials with relevant and tunable properties.<sup>[1]</sup> The interest is to benefit from the unique attributes synergistically provided by the combination of natural polymers (reduced environmental impact, renewable origin, non-toxicity...) with DES solvents, more specifically their biosafe properties, their organized character and the large versatility they provide in terms of final macromolecular structure. The preparation of these novel solvents is simple since DES come from the mixture of two (or more) H-bonded low-cost molecules. When no eutectic point can be clearly identified, such mixtures are classified as low transition temperature mixtures (LTTM). In particular, natural deep eutectic solvents (NaDES) can be conceived from biobased and biosafe precursors. For instance, guar gum, a vegetal galactomannan, was combined to various choline chloride (ChCl)-based DES and physical gels with elastic behavior and relevant ionic transport properties were formed from ChCl-Urea/guar mixtures.<sup>[2]</sup> Xanthan gum was also described as a potential gelator of ChCl-based DES.<sup>[3]</sup> The authors proved that the addition of water was required to obtain physical gels. It is also reported that xanthan gum NaDES-based gels exhibit a larger thermal operating window compared to hydrogels due to the involvement of water in the supramolecular structure of the NaDES.<sup>[4]</sup> Despite of the prominent interest to explore LTTM in the polysaccharide field, the design of materials including carrageenans has not been reported yet. Carrageenans, linear sulfated polysaccharides, are mainly extracted from red algae (*Rhodophyceae*). Carrageenan chains consist of D-galactopyranose units alternately linked by  $\alpha$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 glycosidic bonds. The repeating units are most often disaccharides and are generally distinguished by their degree of sulfation and by the presence or absence of a 3,6-anhydro bridge on the  $\beta$ -1,4-linked galactose unit. The three mostly studied carrageenans are  $\kappa$ ,  $\iota$  and  $\lambda$ -carrageenan.  $\kappa$ -carrageenan is particularly interesting since it not only finds applications in food, cosmetic and pharmaceutical industries but it leads to hard gels in aqueous medium.<sup>[5]</sup> It is accepted that the gelation of  $\kappa$ -carrageenan in water is achieved by a two-step thermo-dependent mechanism. Upon cooling, a coil-to-helix transition occurs, followed by the aggregation of helices, resulting in a gelation.<sup>[6]</sup>

This gelation has been investigated by rheological and micro differential scanning calorimetry, which allowed to determine the thermal transitions : from solution to gel ( $T_{s/g}$ ) and from gel to solution ( $T_{g/s}$ ).<sup>[7]</sup> The influence of the nature of the solvent on the thermal transitions was also examined by Yang *et al.* by additions of sucrose or ethanol in water solutions.<sup>[8]; [9]</sup> Their investigation emphasized that the nanostructure of gels was affected by the solvent.

In this context, we propose herein a new study dealing with the association of  $\kappa$ -carrageenan and a novel green solvent, namely a neutral low transition temperature mixture, composed of bio-sourced and non-toxic molecules: Fructose (F), Glycerol (G), and Water (W). Indeed, we recently reported by means of DSC, rheology, and NMR spectroscopy, that FGW in 1:1:5 molar ratio (subsequently named FGW) behaves as a cooperatively H-bonded supramolecular structure leading to a stable solvent identified as LTTM exhibiting a unique and low  $T_g$ , and an outstanding microbiological stability.<sup>[10]</sup> Moreover, this composition was industrially implemented to efficiently extract bioactives substances from plants for cosmetic applications.<sup>[11]</sup> Due to its appealing advantages in terms of structuration, polarity, and ability to develop synergetic interactions between its compounds, we pursue as statement of hypothesis that FGW constitutes a well-suited solvent to generate, when mixed with  $\kappa$ -carrageenan, soft materials with improved thermo-reversible properties, and reinforced mechanical behavior, compared to water-based systems.

In this work, we evidence for the first time the straightforward formation of physical gels based on the incorporation of  $\kappa$ -carrageenan in FGW. In particular, we successively investigate (*i*) their physico-chemical properties through thermal analysis, (*ii*) use rheological measurements to characterize the formation of gels and to underpin the thermal dependence of the gelation mechanism, (*iii*) use small angle X-ray scattering experiments to elucidate their internal structure, and (*iv*) perform compression tests in order to validate their mechanical response. The properties of the analogous  $\kappa$ -carrageenan hydrogels were systematically analyzed and compared with our novel system, in order to gain insight into the role of FGW solvent in the structuration of the gels, which is shown to dictate the final properties. To the best of our knowledge, this is the first study dealing with soft materials resulting from  $\kappa$ -carrageenan and a fully biobased LTTM.

---

### III.4.2. Experimental

---

#### III.4.2.1 Materials

Fructose (powder,  $M=180.16$  g/mol, purity > 99%) provided by Danisco and glycerol (liquid at 25°C,  $M=92.09$  g/mol, purity > 99.5%) acquired from Oleon were used without any further purification. Deionized water (18 M $\Omega$ .cm) obtained from a Veolia Aquadem<sup>TM</sup> system was used as the third component to obtain FGW LTTM according to the recently described method.<sup>[10]</sup>  $\kappa$ -carrageenan was provided by Roth and was used without any further purification. Its water uptake ( $\approx 7$ wt%) and thermal decomposition temperature ( $\approx 250^\circ\text{C}$ ) were measured by thermogravimetric analysis (Figure S1). Its molar mass determined by Size Exclusion Chromatography is  $M_w \approx 6.0 \times 10^5$  g/mol with a dispersity of 1.3 (Figure S2). Elementary analysis conducted by Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) confirms that the counter ion of the  $\kappa$ -carrageenan used is potassium since equivalent molar quantities of sulfur and potassium were obtained (data not shown). The structure of the  $\kappa$ -carrageenan was confirmed by <sup>1</sup>H NMR analysis (Figure S3).

---

#### III.4.2.2 Preparation of the samples

The preparation is based on two main steps. The first step corresponds to the dispersion of  $\kappa$ -carrageenan into FGW at room temperature (RT), under slow mechanical stirring. RT allows to limit the water evaporation that can disturb the H-bonds of FGW. For concentration of polysaccharide higher than 15 g/L, the volume of liquid and the height of the rotor were adjusted to ensure an efficient stirring while preventing the formation of bubbles in these highly viscous solutions. The water content of  $\kappa$ -carrageenan was considered for the calculation of the total amount of polysaccharide. The resulting turbid  $\kappa$ -carrageenan/FGW mixture was stirred for 30 min. The second step consists in the thermal induced gelation. The mixture was gently poured into a cylindrical recipient to prevent the formation of bubbles. The recipient was then capped and put in a temperature-controlled oven at 80°C for 3 h, in which the sample progressively became transparent. The thermal induced gelation process of  $\kappa$ -carrageenan occurred during the cooling phase down to RT. The as-formed FGW-gels were pushed out of the recipient and transparent cylindrical samples were finally obtained as illustrated in Figure 1. The same procedure was applied to generate hydrogels by replacing FGW solvent by deionized water. By convenience, the carrageenan concentration is usually discussed in mass fractions (wt%) in the literature. However, in this study the concentration is expressed in g/L as FGW is denser than water ( $d = 1.3$ ).

---

### III.4.2.3 Characterizations

- Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC analyses were carried out on a DSC-Q22 device (TA Instruments). Samples were placed in aluminium hermetic pans at room temperature. Thermal analyses were performed under nitrogen flow (50 mL/min) and samples were submitted to 4 temperature cycles with a ramp rate of 10°C/min: 1) from 25°C down to -140°C; 2) from -140°C up to 100°C; 3) from 100°C down to -140°C; 4) from -140°C up to 25°C. The glass transition temperature ( $T_g$ ) was determined from the second heating ramp and the midpoint of the thermal transition was considered. The melting temperature ( $T_m$ ) value of hydrogels was collected from the first heating run and the maximum of the thermal transition was considered.

- Rheology

The shear viscosity ( $\eta$ ) measurements were carried out on a DHR2 controlled stress rheometer (TA Instruments) operating in flow mode and using two different geometries according to the viscosity of the mixtures: *i*) an aluminium cone/plate geometry (diameter 40 mm, angle 2°, gap 52  $\mu$ m) for viscosities higher than 2 Pa.s and *ii*) an aluminium concentric cylinders geometry (bob diameter x length : 28.03 x 42.11 mm, cup diameter 30.36 mm) for viscosities lower than 2 Pa.s. The temperature was precisely controlled by a high-power Peltier system. Dynamic viscoelastic properties were determined with the same rheometer using a plate/plate geometry (diameter 40 mm, gap 460  $\mu$ m). All dynamic rheological data were checked as a function of strain amplitude to ensure that the measurements were performed in the linear domain. Typically, the applied strain during the dynamical measurements was settled at 1%. Temperature sweep on gels was realized in the same conditions (F=1Hz, strain=1%). The samples were carefully loaded on the Peltier plate regulated at 20°C and covered with a home-made cover to prevent evaporation. The temperature was then increased by a controlled temperature ramp to a maximum temperature depending on the analysed sample (see discussion part). Then, the temperature was decreased with the same ramp to examine the reversibility with temperature. For the highest concentrations of  $\kappa$ -carrageenan in FGW, multiples thermal cycles (heating and cooling) were performed. All rheological data were processed with Trios, TA instruments software.

- Small angle X-ray scattering analysis (SAXS)

SAXS measurements were performed at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) on D2AM beamline. Samples were placed between 250  $\mu\text{m}$  Kapton foils stuck on 1.6-mm-thick washers. Measurements were performed on samples equilibrated at either 20°C or 80°C. The incident photon energy  $E$  was set to 17.000 keV ( $\Delta E/E = 10^{-4}$ ). The SAXS intensity was collected using a 2D D5 detector which was placed at a sample-to-detector distance of  $D = 1.57$  m, leading to a  $q$ -range from 0.01 to 0.2  $\text{\AA}^{-1}$ . The two-dimensional data were obtained by considering the detector geometry and its flat field response. The position of the direct beam was determined with attenuators. The  $q$ -calibration was performed thanks to a silver behenate standard. The corrected two-dimensional data were averaged azimuthally to obtain intensity vs scattering vector  $q$  ( $q = (4\pi/\lambda) \cdot \sin(\theta)$ , where  $2\theta$  is the scattering angle and  $\lambda$  is the incident wavelength). Finally, the scattering data were corrected for the scattering from the empty cell (Kapton windows) and normalized by the thickness and attenuation of the samples. The contribution from the solvent (FGW or Water) was subtracted.

- Compression tests

Compression measurements were performed on a double-column Instron universal testing machine at room temperature with a 500 N load cell. The cylindrical gel samples (12 mm height, 20 mm diameter) were set on the lower plate and compressed by the upper plate. The compression was conducted at a constant rate of 1 mm/min to obtain engineering stress – engineering strain curves. The compression experiments were conducted in three replicates for each gel system.

---

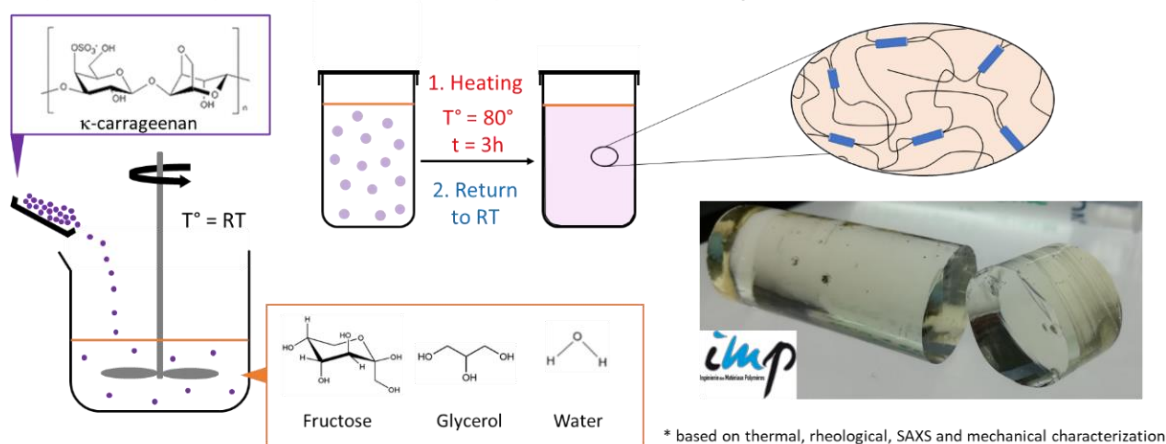
### III.4.3. Results and Discussion

---

#### III.4.3.1 Preparation of the samples

Based on the literature dealing with  $\kappa$ -carrageenan hydrogels<sup>[12]</sup>, the gels formed with the ternary biobased FGW mixture, or deionized water as solvent were prepared according to a straightforward method described in experimental section (§III.4.2.2). At high  $\kappa$ -carrageenan concentration ( $C = 26.5$  g/L = 2 wt% in FGW and 2.65 wt% in water), transparent soft materials with a macroscopically gel-like behavior were obtained without further processing (see picture in Figure 1). The resulting FGW-gels can be easily prepared under various shapes. Comparatively to hydrogels, FGW-gels appear less slippery, less prone to syneresis, and exhibit a better long-lasting physical stability without FGW exudation with time.

1. Polysaccharide dispersion ➔ 2. Thermal gelation ➔ 3. Physico-chemical characterization\*



**Figure 1. Illustration of the two steps procedure of  $\kappa$ -carrageenan/FGW gels: 1) dispersion of  $\kappa$ -carrageenan at room temperature, 2) heating at  $80^\circ\text{C}$  for 3h, and gelation by cooling down to RT. The same procedure was applied to obtain hydrogels. 3) Photograph of the FGW-gel.**

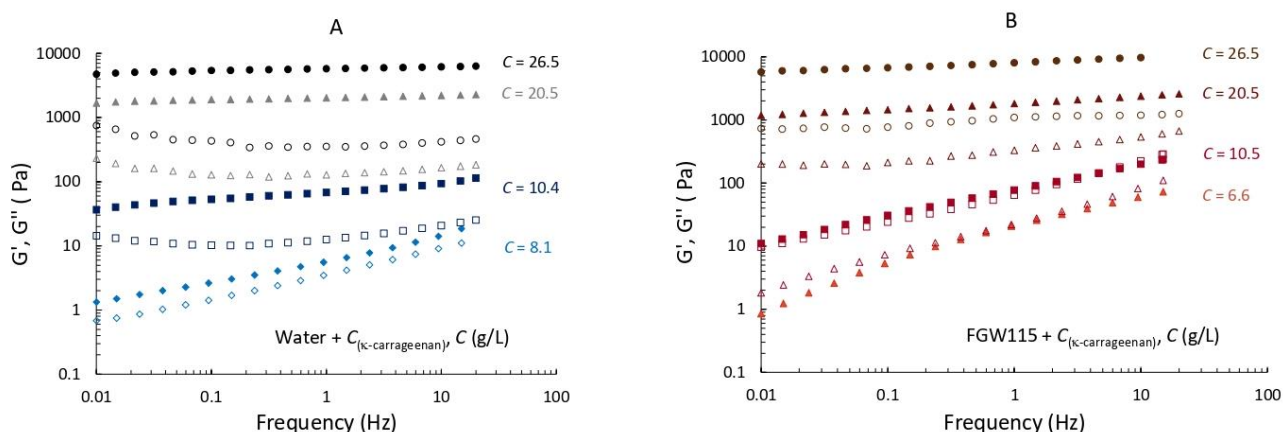
This good dimensional stability can be ascribed to favorable and strong enough interactions (mainly H-bonds) between polysaccharide chains and FGW solvent (see vide-infra). Another crucial point is that FGW-based gels display an excellent microbiological stability compared to its hydrogel analogues. To conclude, an easy-to-implement and robust preparation protocol was used to obtain fully biobased gels based on polysaccharide and this natural LTTM mixture.

As recently described, the solvent FGW, classified as a natural LTTM, is characterized by a single and low glass transition temperature ( $T_g$ ) at  $-80^\circ\text{C}$ .<sup>[10]</sup> DSC analyses were then applied to evaluate the impact of  $\kappa$ -carrageenan addition on FGW thermal properties. Examples of thermogram are given in Figure S4, for a gel prepared in FGW, in comparison with the corresponding hydrogel. It appears that during the heating cycles, the hydrogel presents at  $7^\circ\text{C}$  a thermal event attributed to the melting of iced water when temperature varies from  $-140^\circ\text{C}$  to  $100^\circ\text{C}$ , whereas the FGW-gel only exhibits a  $T_g$  at  $-79^\circ\text{C}$ , related to the  $T_g$  of FGW. The presence of such unique  $T_g$  value reflects the monophasic character of the mixture and shows that polysaccharide chains do not deeply disturb the intrinsic organization of FGW solvent. We can note that no other thermal transition can be clearly identified in these DSC thermograms. Interestingly, the DSC analysis shows that the FGW-based samples are not subjected to any phase transition related to water, which extends their operating temperature range.



## III.4.3.2 Rheological characterization

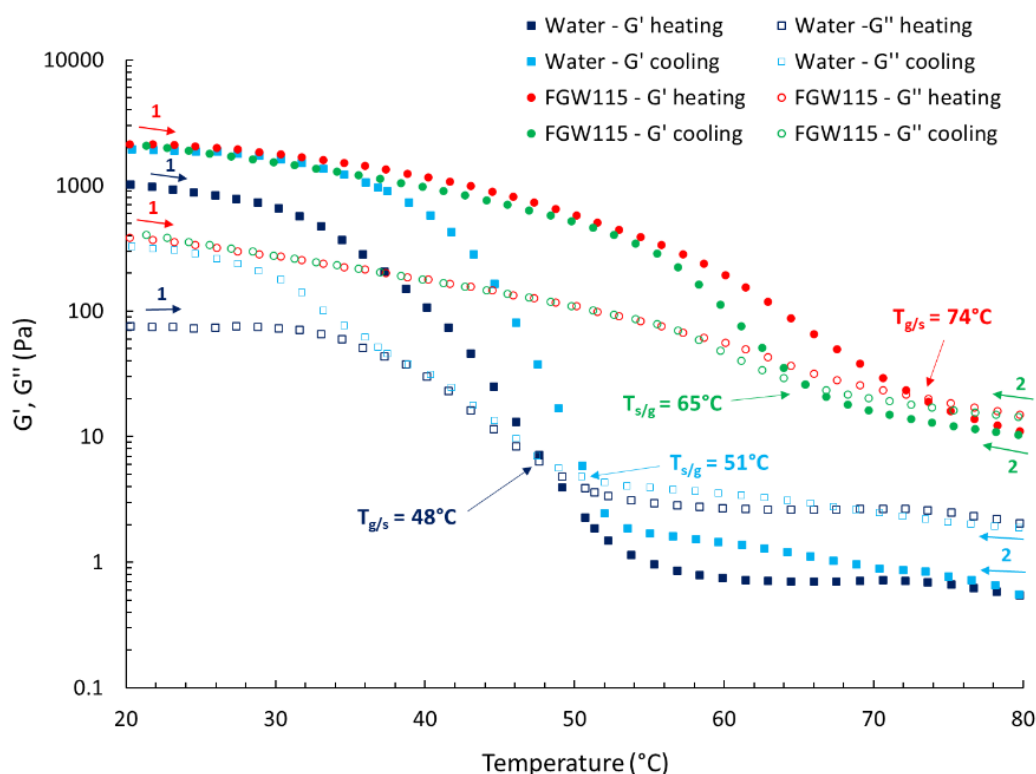
Rheological properties of  $\kappa$ -carrageenan-based systems were investigated. Firstly, the evolution of viscosity with shear rate, in water and in FGW, was examined at low concentrations ( $C < 12$  g/L) (Figure S5). No macroscopical gel-behavior is observed either in water or in FGW. For  $C < 5$  g/L, the aqueous solutions exhibit a Newtonian plateau. A shear-thinning behavior is observed for larger concentrations. Conversely, FGW-based mixtures display a shear-thinning behavior even at low concentrations (0.6 g/L). At this concentration, the viscosity of FGW sample is two decades higher than the water-based one. This can be attributed first to the intrinsically higher viscosity of FGW, but also to the formation of peculiar interactions between the  $\kappa$ -carrageenan chains and/or a different chain conformation in FGW. To gain more insights into the rheological behavior of samples based on higher chains concentrations, the frequency dependence of  $G'$  and  $G''$  was examined in water and in FGW at 20°C for various ranges of concentrations ( $C$  from 8.1 to 26.5 g/L in water, and from 6.6 to 26.5 g/L in FGW) (Figure 2A and B, respectively).



**Figure 2. Frequency-dependence of  $G'$  (filled symbols) and  $G''$  (open symbols) at different concentrations ( $C$  in g/L) of  $\kappa$ -carrageenan in water in blue (A) and in FGW in red (B) at 20°C.**

Regarding the aqueous samples, at  $C = 8.1$  g/L,  $G'$  is higher than  $G''$  within the entire detected frequency range, but the moduli remain sensitive to the frequency, by following a relatively close frequency dependence ( $G'$  and  $G'' \propto f^{0.4}$ ) which is typical of a transition towards a solid-like behavior.<sup>[13]</sup> For higher concentrations, the samples behave as physical gels as  $G'$  is significantly larger (about one order of magnitude) than  $G''$  with no strong variation of both moduli with frequency.  $G'$  reaches  $\sim 5000$  Pa at  $C = 26.5$  g/L (Figure 2A), which is consistent with values reported in the literature (2000 and 7000 Pa for 20 and 30 g/L, respectively).<sup>[7]</sup>

For FGW-based samples, the viscoelastic response is different. The gel point ( $G' \propto G'' \propto f^{0.4}$ ) was observed to occur at higher concentration ( $C = 10.5$  g/L). Above this concentration, physical gels, characterized by a high  $G'/G''$  ratio are obtained and the previous “weak gels”, as classified by Clark & Ross-Murphy, shift to more cohesive gels when the polysaccharide concentration increases.<sup>[14]</sup> It is well accepted in the literature that the gelation of  $\kappa$ -carrageenan in water results from the formation of double-stranded helices laterally arranged in aggregates.<sup>[6]</sup> From this comparison of the viscoelastic properties, it appears that the critical  $\kappa$ -carrageenan concentration required for the aggregation of helices to occur is higher in FGW than in water. For concentrations above 20 g/L, the storage moduli in both solvents are quite similar with a  $G'$  value slightly higher in FGW, compared to water (Figure 2B). These striking similarities regarding the overall viscoelastic response suggest similar gelation mechanism in the two solvents. It is well known that the rheological properties of  $\kappa$ -carrageenan hydrogels are thermally sensitive.<sup>[7]; [15]</sup> Consequently, the evolution of  $G'$  and  $G''$  as a function of temperature upon successive heating-cooling sweep was evaluated. Additionally, the influence of the polysaccharide concentration on these transition regions was also examined. From the rheological data at 20°C, a concentration in  $\kappa$ -carrageenan of 20.5 g/L was selected to study the temperature dependence of  $G'$  and  $G''$  (Figure 3).



**Figure 3.** Evolution of the storage  $G'$  (filled symbols) and loss  $G''$  (open symbols) moduli as a function of temperature during a heating (1) and cooling (2) rate (2°C/min),  $C = 20.5$  g/L of  $\kappa$ -carrageenan in FGW (red and green symbols) and in water (blue and light blue symbols). The thermal transitions directly indicated in the figure correspond to the crossover point of  $G'$  and  $G''$ .

Focusing on the hydrogel case, upon heating from 20 °C up to 80 °C (dark blue squares, Figure 3),  $G'$  is higher than  $G''$  at 20 °C (as previously shown, see Figure 2A) but in the temperature range between 35 °C and 55 °C,  $G'$  and  $G''$  sharply decrease of around 3 decades and 1.5 decade, respectively.  $G''$  becomes greater than  $G'$  for  $T > 48$  °C, indicating a liquid-like behavior. This substantial decrease of both moduli has been ascribed to the thermal-induced dissociation of the helices-based aggregates<sup>[16]</sup> through the progressive disruption of hydrogen bonds by temperature increase, causing the breakage of the network. The temperature corresponding to the  $G'$ ,  $G''$  crossover point, indicator of the gel-solution transition temperature ( $T_{g/s}$ ), was determined to be 48 °C which is consistent with the literature.<sup>[7]</sup> The viscoelastic response of the hydrogel was then monitored upon an immediate cooling after the first heating ramp. Back at low temperatures, pronounced differences in the  $G'$  and  $G''$  values between the heating and cooling ramp emerge, which come from water evaporation during the analysis. Literature reported thermal hysteresis phenomenon ascribed to a different kinetic organization of the polysaccharide helices during heating and cooling, resulting in two different thermal transition temperatures.<sup>[17]</sup> Figure 3 emphasizes a quite small thermal hysteresis of 3 °C, as a value of  $T_{s/g}$  of 51 °C was recorded (light blue squares). This hysteresis is lower than the one described in bibliography, which can reasonably be explained by an overestimation of  $T_{s/g}$  value due to water evaporation. The FGW-gel, at similar concentration, was analyzed following the same thermal procedure. As shown in Figure 3, differences in the thermal behavior are observed. Firstly, the decrease of  $G'$  and  $G''$  of the FGW-gel upon the heating ramp is less acute (two decades against three decades in water for  $G'$ ). Secondly, the decrease of the moduli spreads over a larger range of temperature, with a smooth decrease from 35 °C to 52 °C followed by a more pronounced one from 52 °C up to 80 °C. Thirdly, the FGW-gel exhibits a better solvent retention propensity: after the two temperature cycles,  $G'$  and  $G''$  are perfectly superimposed, and the initial viscoelastic properties are fully recovered (Figure 3 red and green data points at low temperature). The  $T_{g/s}$  of 74 °C of the FGW-gel, determined upon the heating sweep is noticeably higher than in water, and a significant hysteresis (9 °C) appears with a  $T_{s/g}$  identified at 65 °C. The  $T_{s/g}$  values of  $\kappa$ -carrageenan hydrogels are known to decrease while increasing the temperature rate and increase with increasing concentration.<sup>[7]</sup> Thus, we analyzed two FGW-gels ( $C = 20.5$  and  $26.5$  g/L), at various temperature ramps (1, 2 and 10 °C/min) (Table 1). The global expected trend is observed, but some small discrepancies appear for these values measured from the crossover of  $G'$  and  $G''$ . To complete these data, we also conducted another approach to determine the gelation temperature, based on the divergence of the complex viscosity ( $\eta^*$ ) during the cooling ramp, method described in detail by Liu *et al.* for hydrogels (Figure S6).<sup>[7]</sup>

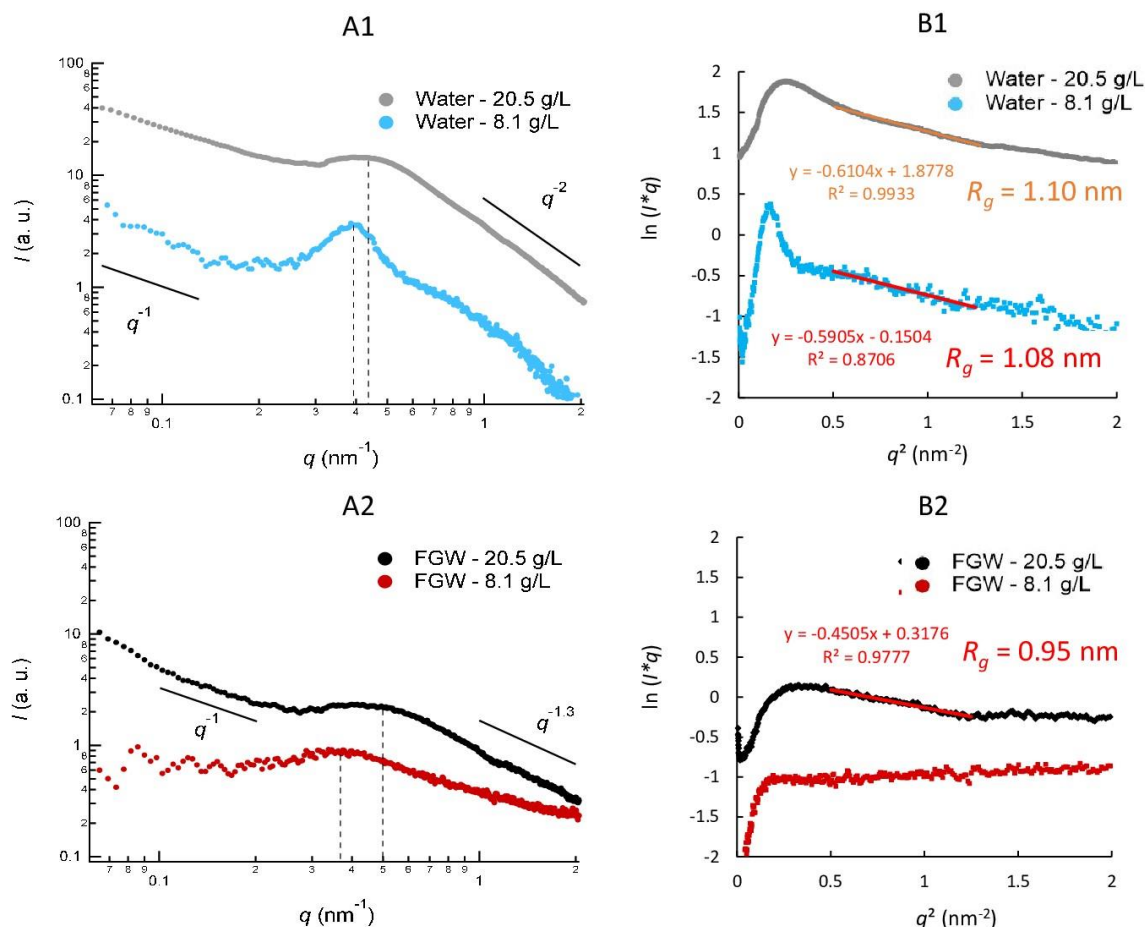
$\kappa$ -carrageenan concentration	Temperature rate (°C/min)	Determination of $T_{s/g}$ (°C)	
		Method 1 G' & G'' crossover	Method 2 $\eta^*$
20.5 g/L ( $\approx$ 1.6 wt%)	1	88	69
	2	65	68
	10	78	64
26.5 g/L ( $\approx$ 2.0 wt%)	1	87	76
	2	70	73
	10	81	71

**Table 1. Comparison between two methods for the determination of  $T_{s/g}$  value for two concentrations of  $\kappa$ -carrageenan in FGW ( $C = 20.5$  and  $26.5$  g/L) at three different temperature ramps (1, 2 and 10 °C/min). All experiments were performed at a fixed frequency of 1 Hz with a constant strain of 1%.**

The resulting  $T_{s/g}$  values are quite lower than the ones collected from the crossover method, probably due to the pronounced dispersive character of the thermal transitions within the FGW gels. Interestingly, this series of data better fits with the expected effect of concentration and temperature rate. Finally, irrespective of the employed method,  $T_{s/g}$  of FGW-gels are higher than the ones measured for the hydrogels. Thus, a higher temperature is required in FGW to allow both the dissociation of helices aggregates and the helix-to-coil transition. Indeed, the high viscosity of FGW solvent, compared to water, requires a more substantial temperature input to impart a sufficient motion of polysaccharide chains. Additionally, a FGW-gel ( $C = 26.5$  g/L) was subjected to several heating/cooling cycles at 10 °C/min between 40 and 100 °C. These cycles were applied either successively (Figure S7A), or after different waiting times between each cycle (Figure S7B). Figure S7 highlights a complete reversibility of the viscoelastic properties, which underpins that the kinetics of the thermal-induced disorganization / reorganization of the cross-linked zones is rapid and confirms the high solvent retention with temperature for FGW gels, compared to hydrogels.

#### III.4.3.3 Nanostructure of the materials

SAXS measurements were performed to obtain further structural information on the different gels. FGW-gels and hydrogels, at two different chain concentrations ( $C = 8.1$  and  $20.5$  g/L) were analyzed at 20°C (Figure 4). These concentrations were selected so that the resulting mixtures exhibit different viscoelastic behaviors. Below a polysaccharide concentration of 10 g/L, viscoelastic liquids were obtained in FGW while "weak" gels started to be formed in water. Conversely, for  $C > 20$  g/L and at 20 °C ( $T < T_{g/s}$ ), physically crosslinked gels characterized by  $G'$  much higher than  $G''$  are generated (see Figure 3). Figure 4A shows the corresponding SAXS patterns ( $I(q)$  vs  $q$ ) of these samples.



**Figure 4. A. SAXS patterns at 20 °C of  $\kappa$ -carrageenan at 8.1 and 20.5 g/L in water (A1) and in FGW (A2). B. Cross-sectional Guinier plots of the SAXS patterns in water (B1) and in FGW (B2) and graphical exploitation to determine the average cross-sectional radius ( $R_g$ ) of rods composed of aggregates of  $\kappa$ -carrageenan helices.**

All four SAXS profiles presented in Figure 4A can be divided in three parts as a function of the wavevector. For  $q < 0.3$  nm<sup>-1</sup>,  $I(q)$  scales with  $q^{-1}$  in water (Figure 4A1). This decrease of the scattering intensity is indicative of the presence of rod-like monodispersed structures [18], which corroborates the well-accepted gelation mechanism of  $\kappa$ -carrageenan in water that results from the formation of laterally arranged double-stranded helices. Thus, the physical 3D network can be described as made of bound cylinders crosslinks.<sup>[6]</sup> In FGW at 8.1 g/L of  $\kappa$ -carrageenan, the intensity is somewhat constant in this  $q$ -region, which seems consistent with the fact that this sample is still a viscous liquid composed of only dissolved polysaccharide chains (*i.e.* no bound cylinder crosslinks present yet). In contrast, at 20.5 g/L in FGW, the intensity decreases with a variation of  $q^{-1}$  in a shorter region ( $0.1$  nm<sup>-1</sup>  $< q < 0.3$  nm<sup>-1</sup>) and the slope is steeper at lower  $q$ -values; this result suggests that cylinders are still implied in the structure of the gel, but another structure at larger length scales is also expected.

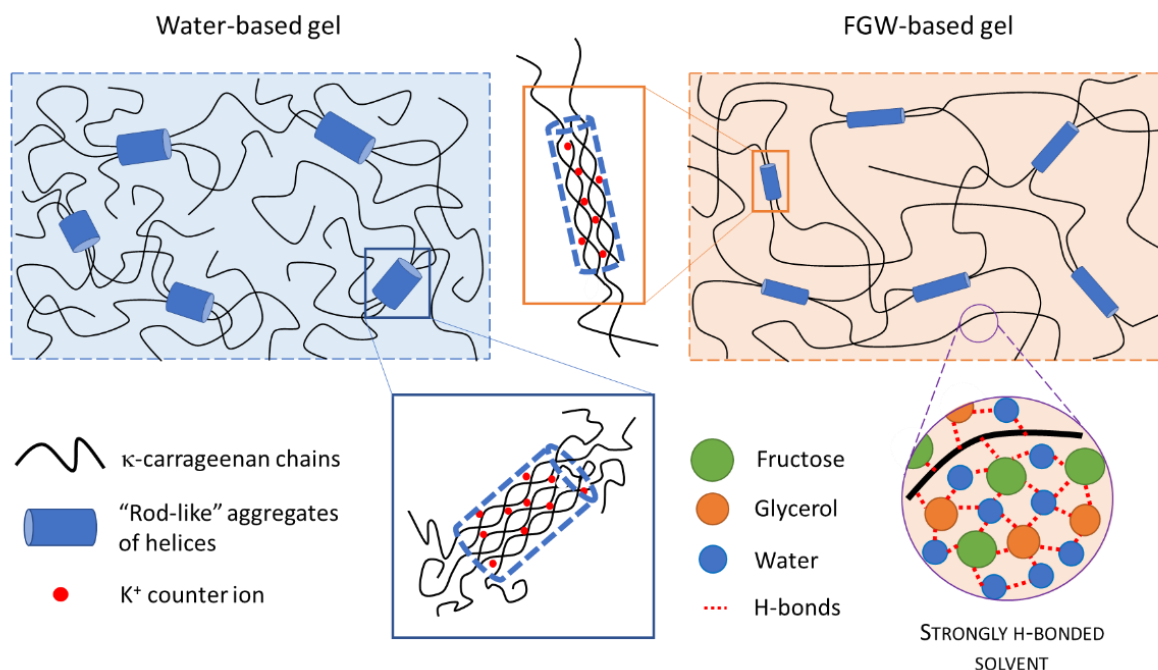
Then, when  $q$  is comprised between  $0.3$  and  $0.7 \text{ nm}^{-1}$ , scattering patterns are characterized by a broad peak. In the case when water is the solvent, it corresponds to the polyelectrolyte peak of  $\kappa$ -carrageenan.<sup>[6]</sup> The peak position  $q_{\text{max}}$  is related to the correlation length between chains. As expected, the position of the polyelectrolyte peak is directly linked to the concentration of  $\kappa$ -carrageenan. It is also observed that the polyelectrolyte peak becomes wider when the concentration increases. Nonetheless, by adding progressive amounts of sucrose in  $2 \text{ wt}\%$   $\kappa$ -carrageenan hydrogels, Yang *et al* reported that the polyelectrolyte peak vanished for  $30 \text{ wt}\%$  of sucrose. The authors argued that H-bonds between the polysaccharide and the sucrose overcame the electrostatic repulsion interactions between  $\kappa$ -carrageenan chains.<sup>[9]</sup> In the present study, the continuous phase (FGW) is composed of  $50 \text{ wt}\%$  of fructose and  $\sim 25 \text{ wt}\%$  of glycerol and water. Despite the important number of available OH groups of the polysaccharide for developing H-bonds, a structure peak is still observed at  $q$ -values close to those of the polyelectrolyte peak observed for water-based systems. As fructose is strongly H-bonded to glycerol and water, it is less accessible to form H-bonds with the polysaccharide, as reported by Yang *et al.* for hydrogels containing sucrose.

Finally, when  $q$  becomes larger than  $0.7 \text{ nm}^{-1}$ , the decrease of the signal can be assigned to the propensity of the solvent to dissolve polysaccharide free chains. In this region,  $I(q)$  scales with  $q^{-2}$  for water while the exponent is higher for FGW ( $\sim q^{-1.3}$ ). This suggests that the LTTM is a better solvent than water for the  $\kappa$ -carrageenan chains.

To gain more insight into the dimensions of junction zones at the origin of the formation of the physically cross-linked gels, cross-sectional Guinier plots ( $\ln(q \cdot I(q))$  vs  $q^2$ ) were performed. Such representation has often been used in studies reporting the nanostructure of carrageenan hydrogels. Scattering from a long rod with a cross-sectional radius of gyration  $R_g$  is given by the Guinier approximation as  $q \cdot I(q) \approx \exp(-q^2 \cdot R_g^2/2)$ .<sup>[19]</sup>  $R_g$  can thus be evaluated from the linear region in cross-sectional Guinier plots ( $qR_g < 1$ ). Figure 4B shows the cross-sectional Guinier plots obtained in water and in FGW for the two different studied  $\kappa$ -carrageenan concentrations ( $8.1$  and  $20.5 \text{ g/L}$ ). On the one hand, in the case of water, a linear region appears after the peak due to the electrostatic interactions at lower  $q$  values. The cross-sectional radius of gyration obtained are equivalent for the two concentrations ( $1.08 \text{ nm}$  and  $1.1 \text{ nm}$ ) (Figure 4B1), which is line with the values reported by Yang *et al.* This result indicates that the number of rods distributed in the aqueous phase increases, but the average diameter of the helices aggregates remains constant. On the other hand, Figure 4B2 shows the cross-sectional Guinier plots obtained in FGW.

As discussed before, only rare aggregates may be present in the solution of lowest concentration. Thus, no  $R_g$  value can be determined in this case. Conversely, the Guinier plot for the FGW gel at  $C = 20.5$  g/L yields a cross-sectional radius of 0.95 nm. SAXS profiles were also investigated at 80°C for all samples, the Guinier plots obtained at this temperature for  $C = 20.5$  g/L (data not shown) present the same profile that for the lower concentration in FGW (Figure 4B2) suggesting the disappearance of aggregates induced by the temperature increase. This is consistent with rheological measurements and the thermo-reversible behavior of  $\kappa$ -carrageenan gels (Figure 3). Eventually, it appears once again that the gelation mechanism resulting from the formation of laterally arranged double-stranded helices is quite similar between FGW and water solvents, leading to rod-like structure with similar size. Since the structure peak of the polysaccharide is broader in FGW, the distribution of interaction lengths is less dispersed in space in the case of water.

We thus propose, in Figure 5, the following schematic representation of the internal organization of the hydrogel and FGW gels, mainly based on SAXS investigation but corroborated by the observed rheological behavior. In both gels, gelation is obtained, at low temperature and for sufficient polysaccharide concentration, when  $\kappa$ -carrageenan chains start forming rod-like aggregates acting like physical crosslinks. These physically bounded cylinders (schematized in blue in Figure 5) are made of an aggregate of double-stranded helices.<sup>[6]</sup> In the case of water-based gels, these aggregates are slightly larger in diameter than for FGW-based gels, with probably one extra double-stranded helix. Another difference between the two systems raises from the interactions between the solvent and the free  $\kappa$ -carrageenan chains, while in the case of hydrogels the chains are more coiled up; in the case of FGW, being a better solvent for  $\kappa$ -carrageenan chains that leads to a more extended network with more H-bonds between the solvent and chains, despite an apparently less homogeneous distribution of interactions lengths. With this overall structural picture, and considering a same concentration  $\kappa$ -carrageenan chains, the FGW-based gel should lead to a better-connected network with more physical junctions (as the physical aggregates in the hydrogel case involved more  $\kappa$ -carrageenan helices) and stronger solvent-chain interactions (*i.e.* strongly H-bonded solvent).

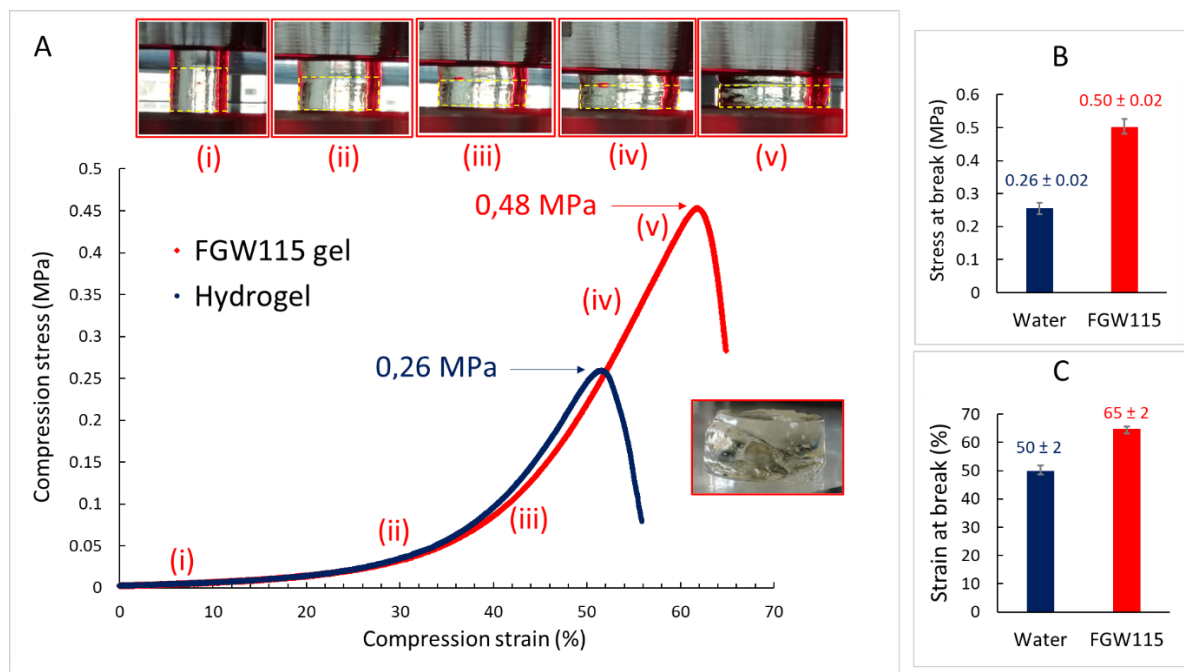


**Figure 5. Illustration of the suggested organizations obtained in water-based gel and in FGW-based gel.**

#### III.4.3.4 Mechanical properties

It was reported that  $\kappa$ -carrageenan forms rigid and brittle hydrogels. When the water phase is modified or another solvent than water is used to obtain  $\kappa$ -carrageenan gels, small deformation tests are used to discuss the viscoelastic behavior of such mixtures. However, the mechanical response to large deformation is scarcely described. Herein, we submitted gels obtained in FGW and in water (26.5 g/L) to compression tests in order to reach the large strain response (see III.4.2.3. Compression tests). Figure 6 regroups the engineering stress – engineering strain curves obtained. As shown in this Figure, samples are progressively deformed until a maximum stress is reached, corresponding to the stress at which the gel ruptures. When samples are subjected to small strain ( $< 20\%$ ), the mechanical response of hydrogel and FGW-gel are similar. This is consistent with the rheological measurements performed at small strains (see Figure 2,  $C = 26.5$  g/L): the storage modulus values obtained in both solvents are comparable. Then, for larger strains, the non-linear elastic regime of gels appears. The slope values for both solvents are relatively equivalent indicating a similar strain-hardening capacity, underlining a relatively analogous physically crosslinked gel structure. However, the range of stress supported by the FGW-gel is significantly higher than that of the hydrogel.





**Figure 6. (A) Engineering stress – strain curves** obtained through compression tests at room temperature with a compression rate of 1 mm/min for 26.5 g/L gels in water (blue line) and in FGW (red line). (i) to (v) Photographs of the FGW-gel during compression test are shown to illustrate its ability to reach large compressive deformation. (B) Average stress at break and (C) average strain at break for both solvents-based gels (measurements were performed in triplicate).

In other words, the stress at fracture obtained in FGW (0.50 MPa) is almost twice bigger than that of the hydrogel (0.26 MPa) (Figure 6B). Concomitantly, a higher strain at break is also reported for the FGW-gel compared to the hydrogel, respectively around 65% and 50%, based on triplicate measurements (Figure 6C). For the hydrogel, the values of stress/strain at break are consistent with a previous study that reported a fracture stress of around 0.2 MPa for a 2%  $\kappa$ -carrageenan hydrogel.<sup>[20]</sup> In the case of FGW, despite the high compression ratio, the gel hardly exudes (compared to water), highlighting again the good solvent retention ability of the system. As the assumption of constant volume being almost respected the true stress-true strain curves are given in Figure S8. Figure S8 shows that the true strain of the FGW-gel presents a slight inflexion at large strains indicating a propensity to shear localization before rupture.

Thus, with a very simple preparation method, the FGW mixture proposed in this study appears as an interesting alternative to develop fully biobased gels with enhanced mechanical properties compared to hydrogels. Better properties may arise in the future for FGW-gels as Cairns *et al.* also studied the addition of carob gum to obtain tougher  $\kappa$ -carrageenan hydrogels which were better able to withstand mechanical stress.

---

#### III.4.4. Conclusion

In conclusion, we were able to develop fully biosourced physical gels through the incorporation of  $\kappa$ -carrageenan chains in FGW solvent, *via* an eco-friendly experimental approach. As hypothesized in the introduction, FGW-based gels present improved properties compared to their aqueous analogous. Indeed, the gels exhibit promising thermal behavior with an extended operating temperature range compared to hydrogels. Even if the study of the nanostructure and the rheological characterizations evidenced a similar gelation mechanism of  $\kappa$ -carrageenan in both solvents, the transition temperatures  $T_{g/s}$  of the FGW-gels are higher than the ones obtained in water, and the initial viscoelastic properties are fully recovered after multiple heating and cooling cycles which is a key advantage compared to hydrogels. The supramolecular FGW structuration offers a better solvent retention and contributes to the formation of additional H-bonds within the gel. This peculiar spatial structuration provides a mechanical response improvement demonstrated by compression tests. Finally, we validate through this study, that the enhanced properties of these FGW-based gels result from the formation of synergetic interactions between this peculiar LTTM solvent and  $\kappa$ -carrageenan polymer chains. These soft materials, never reported in literature so far, are expected to find applicative uses in green and sustainable soft material technologies.

---

#### III.4.5. Acknowledgements

This project has received funding from Gattefossé. The authors are also thankful to Agnès Crepet (IMP, Université Claude Bernard Lyon 1) for her valuable help to obtain and process Size Exclusion Chromatography and to all technical support received at IMP lab to achieve this work. The authors also acknowledge the D2AM beamline staff at ESRF and are in debt of Isabelle Morfin (LIPhy, Grenoble) for the setup of the beamline and the initial data treatment.

### III.4.6. Supporting information

#### III.4.6.1 Polysaccharide characterization

- Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermogravimetric analyses were performed with an ATG Q500 (TA Instruments), from 25°C to 380°C with a ramp of 10°C/min under nitrogen flow. The curves are processed with the TA Universal Analysis software.

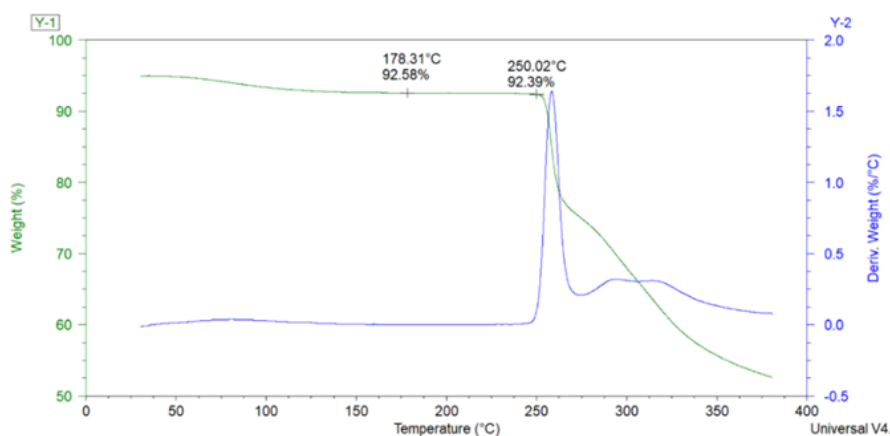


Figure S1. TGA thermogram of  $\kappa$ -carrageenan.

- Size exclusion chromatography (SEC)

An aqueous solution of  $\kappa$ -carrageenan (0.53 mg/mL) filtered at 0.45  $\mu\text{m}$  was injected in a Wyatt Technologies SEC. A buffer solution of NaNO<sub>3</sub> (0.1 M - pH 7) and Aquagel PL columns of OH mixed M8 micro were used. A triple detection was performed.

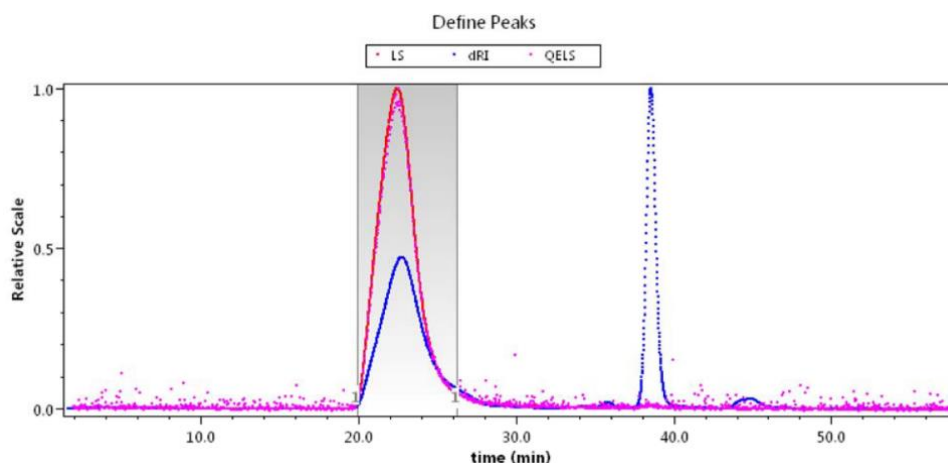


Figure S2. Size exclusion chromatogram of aqueous solution of  $\kappa$ -carrageenan (0.53mg/mL).

- Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

A solution of  $\kappa$ -carrageenan (7 mg/mL) was prepared in  $D_2O$ . 3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- $d_4$  acid sodium salt (TSPd<sub>4</sub>) was added to fix chemical shifts. Solubilization was performed at 100°C for 30 min followed by an ultrasonic run at room temperature for 30 min. NMR analyses were performed on a Bruker AVANCE III spectrometer operating at 400.1 MHz for <sup>1</sup>H with a 5 mm BBFO+ probe. The following acquisition parameters were applied: T=353K, NS=512, d1=4s. Figure S3 presents the <sup>1</sup>H NMR spectrum which is consistent with literature and confirms the absence of other forms of carrageenan.<sup>[21]</sup> Experiments and attributions were based on literature.<sup>[22]</sup>

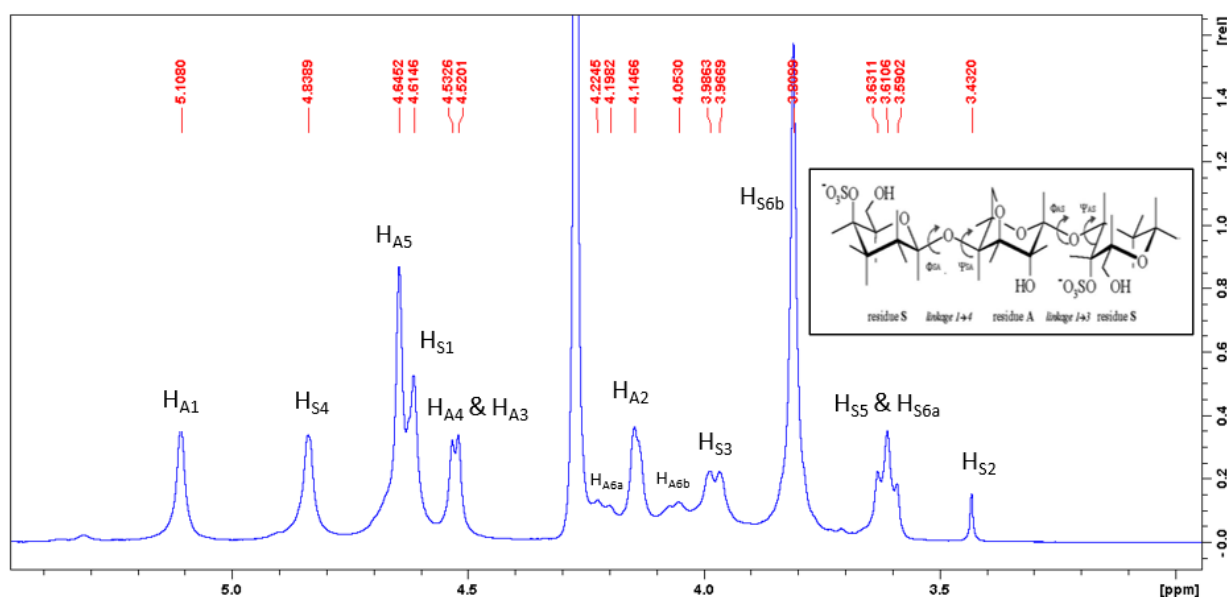


Figure S3. <sup>1</sup>H NMR spectrum of  $\kappa$ -carrageenan in  $D_2O$  (7 mg/mL) at 353K

III.4.6.2  $\kappa$ -carrageenan based gels characterization

- Thermal characterization (DSC)

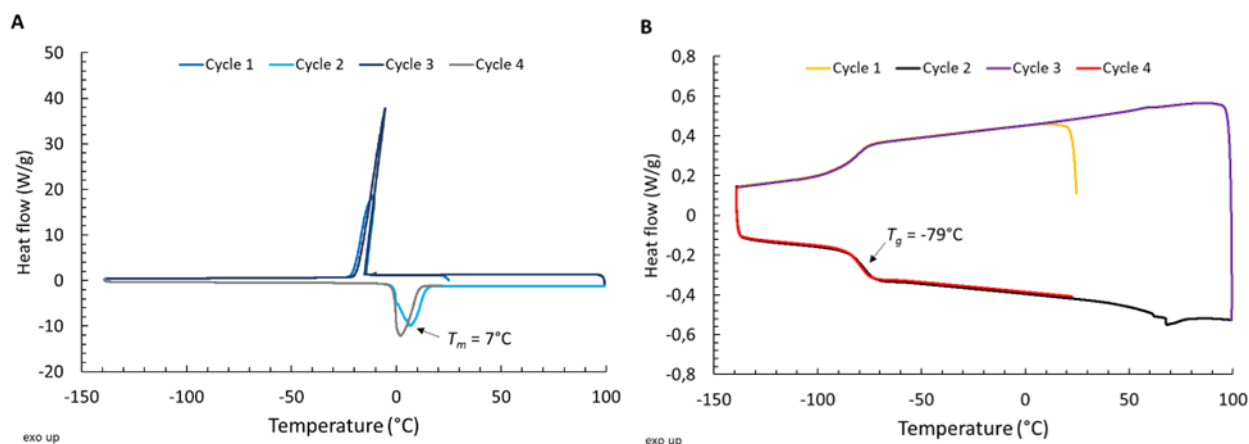


Figure S4. DSC thermograms of  $\kappa$ -carrageenan ( $C = 26.5$  g/L) gels obtained in water (A) and in FGW (B)

One can note that we obtained an unusual shape for icing of water that occurs between  $-10$  and  $-20^\circ\text{C}$  (Fig. S4A). As the ramp temperature used is quite important ( $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ) and the amount of water higher than  $97\text{wt}\%$ , we hypothesized that the prompt and exothermic solidification of water release enough energy to counteract the decrease in temperature.

- Rheological properties

Flow curves for  $C < 12$  g/L

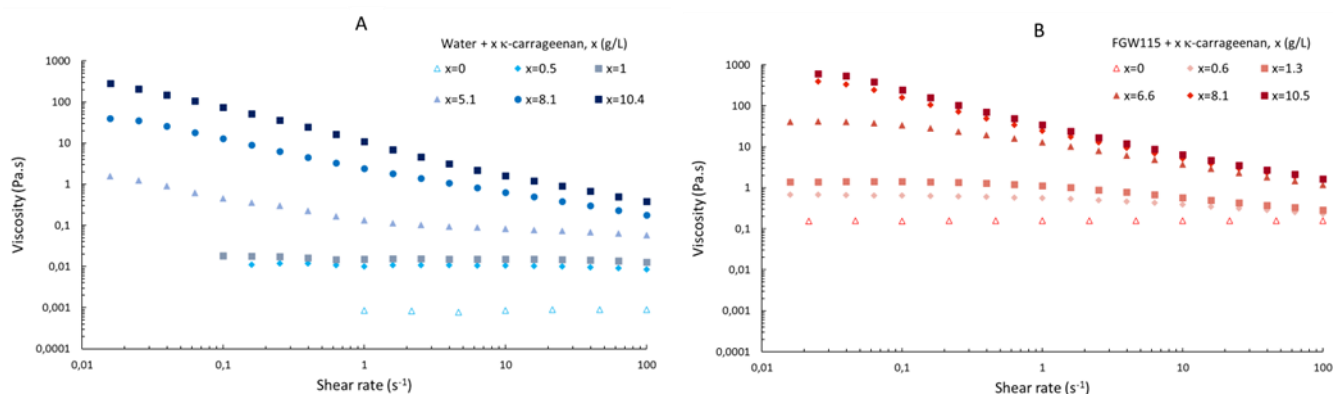


Figure S5. Evolution of the viscosity as a function of the shear rate of solutions of  $\kappa$ -carrageenan in water (A) and in FGW (B), at different polysaccharide concentrations, at  $20^\circ\text{C}$

Determination of  $T_{s/g}$  based on the divergence of the complex viscosity ( $\eta^*$ )

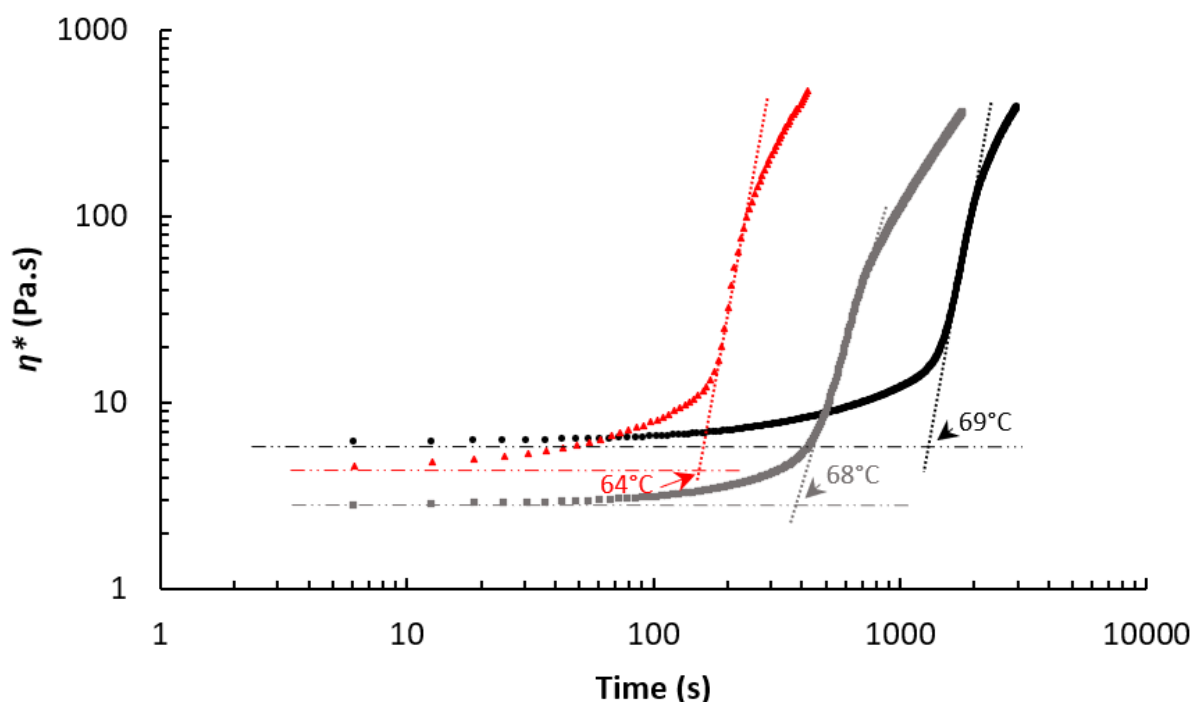


Figure S6. Illustration of the method 2 for determination of  $T_{s/g}$  from the evolution of the complex viscosity ( $\eta^*$ ) with time during cooling for 3 different temperature rates (1, 2 and 10 °C/min) ( $C = 20.5$  g/L).

Successive heating/cooling cycles at 10 °C/min between 40 and 100 °C

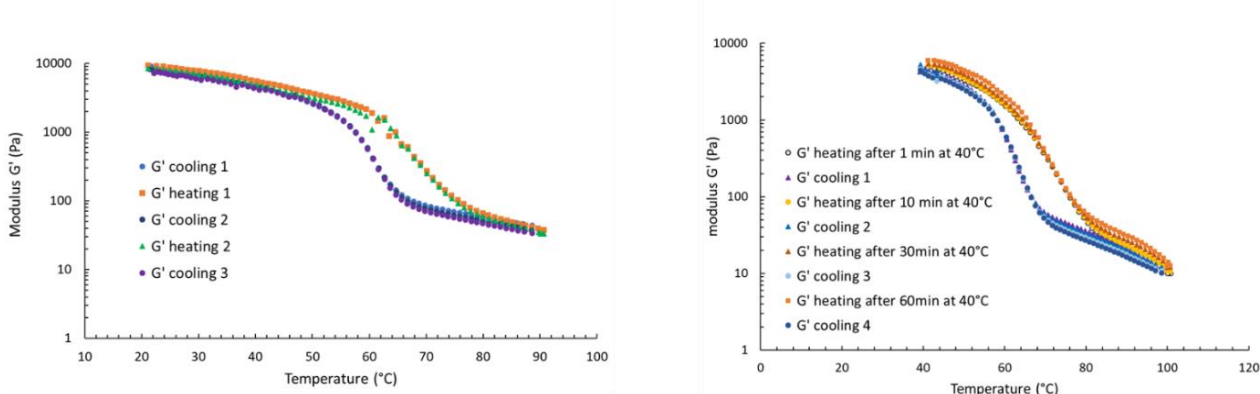
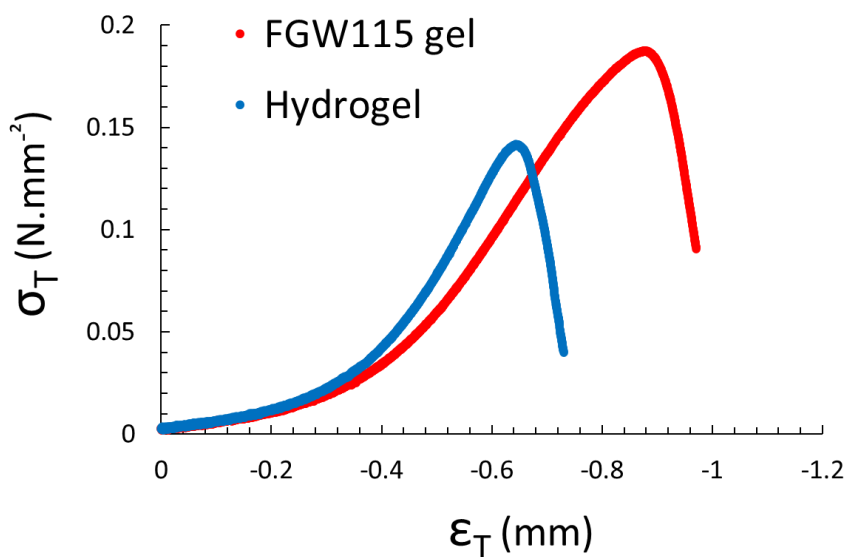


Figure S7. Evolution of  $G'$  and  $G''$  as a function of temperature of  $\kappa$ -carrageenan ( $C = 26.5$  g/L) FGW-gel, subjected to various thermal cycles applied either successively (left), or after various waiting times (right).



**Figure S8.** True stress ( $\varepsilon_T$ ) - ( $\sigma_T$ ) true strain curves obtained through compression tests at room temperature with a compression rate of 1 mm/min for 26.5 g/L gels in water (blue line) and in FGW (red line).

### III.4.7. References

- [1] Tomé L. C., Mecerreyes D. Emerging Ionic Soft Materials Based on Deep Eutectic Solvents. *The journal of physical chemistry. B*, 2020,
- [2] Depoorter J., Mourlevat A., Sudre G., et al. Fully Biosourced Materials from Combination of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents and Guar Gum. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7, 19, pp. 16747–16756.
- [3] Zeng C., Zhao H., Wan Z., et al. Highly biodegradable, thermostable eutectogels prepared by gelation of natural deep eutectic solvents using xanthan gum Preparation and characterization. *RSC Advances*, 2020, 10, 47, pp. 28376–28382.
- [4] Xia H., Ren M., Zou Y., et al. Novel Biocompatible Polysaccharide-Based Eutectogels with Tunable Rheological, Thermal, and Mechanical Properties: The Role of Water. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2020, 25, 15,
- [5] Zia K. M., Tabasum S., Nasif M., et al. A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 96, pp. 282–301.
- [6] Yuguchi Y., Thu Thuy T. T., Urakawa H., et al. Structural characteristics of carrageenan gels: temperature and concentration dependence. *Food Hydrocolloids*, 2002, 16, 6, pp. 515–522.
- [7] Liu S., Huang S., Li L. Thermoreversible gelation and viscoelasticity of  $\kappa$ -carrageenan hydrogels. *Journal of Rheology*, 2016, 60, 2, pp. 203–214.
- [8] Yang Z., Yang H., Yang H. Characterisation of rheology and microstructures of  $\kappa$ -carrageenan in ethanol-water mixtures. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 2018, 107, pp. 738–746.

- [9] Yang Z., Yang H., Yang H. Effects of sucrose addition on the rheology and microstructure of  $\kappa$ -carrageenan gel. *Food Hydrocolloids*, 2018, 75, pp. 164–173.
- [10] Caprin B., Charton V., Rodier J.-D., et al. Scrutiny of the supramolecular structure of bio-sourced fructose/glycerol/water ternary mixtures Towards green low transition temperature mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 337, pp. 116428.
- [11] Caprin B., Charton V., Vogelgesang B. Chapter Twelve - The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. *Advances in Botanical Research Eutectic Solvents and Stress in Plants (Volume 97)*. Academic Press. 2021, pp. 309–332. ISBN 978-0-12-821691-0.
- [12] Mangione M. R., Giacomazza D., Bulone D., et al. Thermoreversible gelation of  $\kappa$ -Carrageenan: relation between conformational transition and aggregation. *Biophysical chemistry*, 2003, 104, pp. 95–105.
- [13] Richter S. Recent Gelation Studies on Irreversible and Reversible Systems with Dynamic Light Scattering and Rheology - A Concise Summary. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2007, 208, 14, pp. 1495–1502.
- [14] Clark A. H., Ross-Murphy S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Biopolymers*. Berlin/Heidelberg. Springer-Verlag. 1987, pp. 57–192. ISBN 3-540-17779-5.
- [15] Mangione M. R., Giacomazza D., Bulone D., et al. K(+) and Na(+) effects on the gelation properties of kappa-Carrageenan. *Biophysical chemistry*, 2005, 113, 2, pp. 129–135.
- [16] Rochas C., Rinaudo M. Mechanism of gel formation in k-carrageenan. *Biopolymers*, 1984, 23, 4, pp. 735–745.
- [17] Ueda K., Itoh M., Matsuzaki Y., et al. Observation of the Molecular Weight Change during the Helix–Coil Transition of  $\kappa$ -Carrageenan Measured by the SEC–LALLS Method. *Macromolecules*, 1998, 31, 3, pp. 675–680.
- [18] Hollamby M. J. Practical applications of small-angle neutron scattering. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2013, 15, 26, pp. 10566–10579.
- [19] Glatter, O. Kratky, O. Small angle X-ray scattering. London: Academic Press, 1982, 1515 p. ISBN 0122862805.
- [20] Cairns P., Morris V. J., Miles M. J., et al. Comparative studies of the mechanical properties of mixed gels formed by kappa carrageenan and tara gum or carob gum. *Food Hydrocolloids*, 1986, 1, 1, pp. 89–93.
- [21] van de Velde F., Rollema H. S. High Resolution NMR of Carrageenans. In: Webb G. A. *Modern Magnetic Resonance*. Dordrecht. Springer Netherlands. 2006, pp. 1605–1610. ISBN 978-1-4020-3894-5.
- [22] Bosco M., Segre A., Miertus S., et al. The disordered conformation of kappa-carrageenan in solution as determined by NMR experiments and molecular modeling. *Carbohydrate research*, 2005, 340, 5, pp. 943–958.



### III.4.8. List of figures and tables

Figure 1. Illustration of the two steps procedure of $\kappa$ -carrageenan/FGW gels: 1) dispersion of $\kappa$ -carrageenan at room temperature, 2) heating at 80°C for 3h, and gelation by cooling down to RT. The same procedure was applied to obtain hydrogels. 3) Photograph of the FGW-gel. _____	205
Figure 2. Frequency-dependence of $G'$ (filled symbols) and $G''$ (open symbols) at different concentrations (C in g/L) of $\kappa$ -carrageenan in water in blue (A) and in FGW in red (B) at 20°C. _____	206
Figure 3. Evolution of the storage $G'$ (filled symbols) and loss $G''$ (open symbols) moduli as a function of temperature during a heating (1) and cooling (2) rate (2°C/min), C = 20.5 g/L of $\kappa$ -carrageenan in FGW (red and green symbols) and in water (blue and light blue symbols). The thermal transitions directly indicated in the figure correspond to the crossover point of $G'$ and $G''$ . _____	207
Table 1. Comparison between two methods for the determination of $T_{s/g}$ value for two concentrations of $\kappa$ -carrageenan in FGW (C = 20.5 and 26.5 g/L) at three different temperature ramps (1, 2 and 10 °C/min). All experiments were performed at a fixed frequency of 1 Hz with a constant strain of 1%. _____	209
Figure 4. A. SAXS patterns at 20 °C of $\kappa$ -carrageenan at 8.1 and 20.5 g/L in water (A1) and in FGW (A2). B. Cross-sectional Guinier plots of the SAXS patterns in water (B1) and in FGW (B2) and graphical exploitation to determine the average cross-sectional radius ( $R_g$ ) of rods composed of aggregates of $\kappa$ -carrageenan helices. _____	210
Figure 5. Illustration of the suggested organizations obtained in water-based gel and in FGW-based gel. _____	213
Figure 6. (A) Engineering stress – strain curves obtained through compression tests at room temperature with a compression rate of 1 mm/min for 26.5 g/L gels in water (blue line) and in FGW (red line). (i) to (v) Photographs of the FGW-gel during compression test are shown to illustrate its ability to reach large compressive deformation. (B) Average stress at break and (C) average strain at break for both solvents-based gels (measurements were performed in triplicate). _____	214
Figure S1. TGA thermogram of $\kappa$ -carrageenan. _____	216
Figure S2. Size exclusion chromatogram of aqueous solution of $\kappa$ -carrageenan (0.53mg/mL). _____	216
Figure S3. $^1\text{H}$ NMR spectrum of $\kappa$ -carrageenan in $\text{D}_2\text{O}$ (7 mg/mL) at 353K _____	217
Figure S4. DSC thermograms of $\kappa$ -carrageenan (C = 26.5 g/L) gels obtained in water (A) and in FGW (B) _____	218
Figure S5. Evolution of the viscosity as a function of the shear rate of solutions of $\kappa$ -carrageenan in water (A) and in FGW (B), at different polysaccharide concentrations, at 20°C _____	218
Figure S6. Illustration of the method 2 for determination of $T_{s/g}$ from the evolution of the complex viscosity ( $\eta^*$ ) with time during cooling for 3 different temperature rates (1, 2 and 10°C/min) (C = 20.5 g/L). _____	219
Figure S7. Evolution of $G'$ and $G''$ as a function of temperature of $\kappa$ -carrageenan (C = 26.5 g/L) FGW-gel, subjected to various thermal cycles applied either successively (left), or after various waiting times (right). _____	219
Figure S8. True stress ( $\epsilon_T$ ) - ( $\sigma_T$ ) true strain curves obtained through compression tests at room temperature with a compression rate of 1 mm/min for 26.5 g/L gels in water (blue line) and in FGW (red line). _____	220

# Chapitre IV : Application aux extraits végétaux

## Table des matières

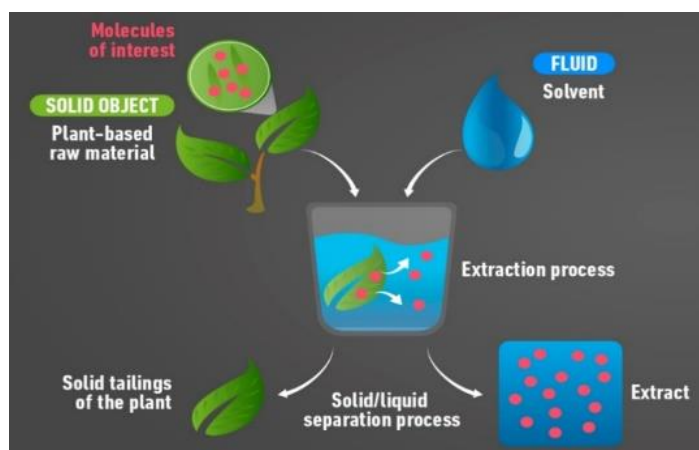
<b>CHAPITRE IV : APPLICATION AUX EXTRAITS VEGETAUX</b>	<b>223</b>
IV.1 CONTEXTE ET ENJEUX	224
IV.2 L'EXTRACTION VEGETALE ET SON APPLICATION INDUSTRIELLE	225
IV.3 THE USE OF NADES TO SUPPORT INNOVATION IN THE COSMETIC INDUSTRY	228
<i>Avant-propos</i>	228
IV.3.1 Introduction	229
IV.3.2 Regulatory framework, market trends and botanical cosmetic bio-actives	229
IV.3.2.1 A few words on the cosmetic regulatory and market environments	229
IV.3.2.2 Plant extracts, green chemistry, and naturalness	231
IV.3.3 NaDES, an opportunity for sustainable plant extraction	232
IV.3.3.1 Low Transition Temperature Mixtures for plant extraction	232
IV.3.3.2 Designing NaDES solvents for cosmetic applications	233
IV.3.4 Benefits of NaDES extracts compared to traditional extracts	241
IV.3.4.1 Evaluation of extraction performance of NaDES in comparison with conventional solvents	242
IV.3.4.2 Value-added of NaDES structures	243
IV.3.4.3 Evaluation of biological activity of NaDES extracts	244
IV.3.5 From the laboratory proof of concept to the market	246
IV.3.6 Conclusion and perspectives	247
IV.4 EVALUATION DE LA PERFORMANCE D'EXTRACTION DE SOLVANTS FGE	248
IV.4.1 Caractérisation des propriétés physico-chimiques d'un extrait FGE115	248
IV.4.2 Influence de la structuration des systèmes FGE sur la performance d'extraction de stilbénoides	251
IV.4.2.1 Matériels et Méthodes	251
IV.4.2.2 Résultats et discussion	255
IV.4.3 Conclusion intermédiaire et orientations	260
IV.5 INCORPORATION DE POLYSACCHARIDES DANS DES EXTRAITS VEGETAUX SUPRAMOLECULAIRES	262
IV.5.1 Introduction	262
IV.5.2 Matériels et méthodes	263
IV.5.2.1 Incorporation de polysaccharides dans des extraits FGE115	263
IV.5.2.2 Suivi de stabilité	263
IV.5.2.3 Caractérisation des teneurs en phytomolécules	264
IV.5.2.4 Caractérisation des propriétés thermiques	265
IV.5.2.5 Caractérisation des propriétés rhéologiques	265
IV.5.2.6 Caractérisation de la couleur par colorimétrie	266
IV.5.2.7 Efficacité de la conservation antimicrobienne ( <i>Challenge-tests</i> )	266
IV.5.3 Résultats et discussion	267
IV.5.3.1 Préparation des mélanges extraits FGE115 + polysaccharides	267
IV.5.3.2 Caractérisation des propriétés rhéologiques et thermiques et mise en forme	267
IV.5.3.3 Impact du procédé sur le contenu phytochimique et étude de stabilité	271
IV.5.4 Compléments de caractérisation d'un extrait gélifié par le $\kappa$ -carraghénane	277
IV.5.4.1 Préparation des échantillons et méthodes d'analyses	277
IV.5.4.2 Résultats	278
IV.5.5 Conclusions et perspectives	281
IV.6 BIBLIOGRAPHIE	283
IV.7 LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	285

## IV.1 Contexte et enjeux

Tout au long de ce travail de thèse, un regard critique a été porté sur les techniques utilisées et les résultats obtenus afin d'en assurer le potentiel applicatif par Gattefossé. Ce chapitre IV est donc consacré à l'application aux extraits végétaux des travaux détaillés dans les chapitres précédents. A l'image de ce qui précède, ce dernier chapitre se décompose en trois sous parties : (i) recherche bibliographique et état de l'art, (ii) caractérisation d'extraits végétaux obtenus avec différents solvants FGE et (iii) incorporation de polysaccharides dans des extraits végétaux industrialisés par Gattefossé. Au travers d'une brève introduction à l'extraction végétale, la première partie permettra de resituer cette discipline dans un contexte industriel cosmétique. Ce sera également l'occasion de revenir sur la stratégie de développement ayant permis aux équipes de Gattefossé de concevoir et d'industrialiser des solvants *NaLTTM* (ou *NaDES*) et les extraits végétaux qui résultent de leur utilisation. Ces travaux ayant été résumés dans un ouvrage en anglais pendant la durée de cette thèse, nous avons fait le choix de l'insérer dans le manuscrit comme pour les publications dans les chapitres précédents. Dans la seconde partie, on se demandera tout d'abord si un extrait végétal (solvant + extractibles) obtenu avec un *NaLTTM* présente les mêmes caractéristiques physico-chimiques que le solvant seul ? On s'attachera ensuite à évaluer les performances extractives de différents mélanges FGE caractérisés dans le chapitre II. Plus particulièrement, on s'intéressera à l'impact de la structure supramoléculaire (et donc de la teneur en eau) sur le potentiel extractif de composés anti-oxydants présents dans une matière végétale modèle. La stabilité physico-chimique et microbiologique de ces extraits liquides sera également étudiée afin de déterminer les points faibles et les points forts de ces systèmes. L'enjeu est d'identifier des voies de progrès pouvant être déployées industriellement. La troisième partie concernera l'ajout de polysaccharides dans des extraits végétaux obtenus avec le solvant FGE115. L'objectif est d'obtenir des systèmes plus visqueux et/ou gélifiés afin de diminuer la mobilité et la diffusion des molécules extraites. Cette voie devrait permettre d'améliorer la stabilité physico-chimique et microbiologique comparativement aux extraits liquides en FGE115 qui présentent, pour certains, quelques instabilités. On se demandera s'il est possible d'obtenir des gels en associant un extrait *NaLTTM* et un polysaccharide ? Et si oui, quel est l'impact des composés phytochimiques sur la structuration du gel ? Inversement, quel est l'impact de la présence du polysaccharide sur la stabilité des composés phytochimiques ? C'est une partie des questions et des défis techniques qui seront à relever dans cette dernière partie. L'enjeu principal étant de détecter de nouveaux potentiels applicatifs tout en s'assurant qu'ils soient industrialisables.

## IV.2 L'extraction végétale et son application industrielle

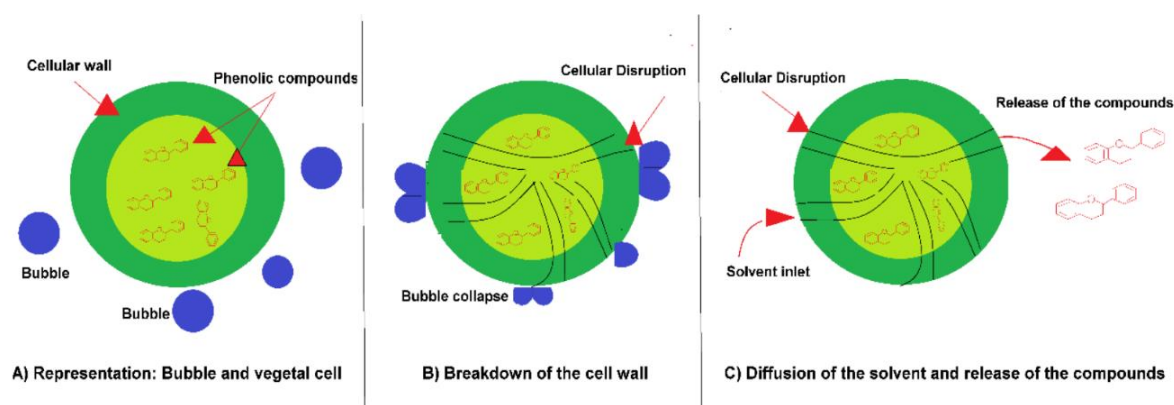
Dans son aspect théorique le plus simple, un procédé d'extraction végétale vise à favoriser le transfert de molécules d'intérêt contenu dans une matière première végétale généralement solide vers une phase généralement liquide appelée solvant. Après séparation solide/liquide, le liquide contenant les composés phytochimiques extraits (ou extractibles) est appelé l'extrait. Ce procédé peut être décrit dans ses grandes lignes par la figure IV.1.



**Figure IV.1** Illustration de principe d'un procédé d'extraction végétale par un solvant liquide

Le solvant d'extraction peut être un gaz ou un solide mais seule l'extraction par voie liquide sera discutée dans ce manuscrit. Au cours de l'extraction par un liquide, deux étapes majeures peuvent être identifiées. La première étape consiste en l'imprégnation de la matière végétale solide par le solvant. Elle peut être optimisée par une agitation adéquate, l'augmentation de la température ou encore la diminution de la taille des particules solides. A l'exception des solvants très visqueux, cette étape d'imprégnation est rapide et non limitative pour le procédé tant sur le plan cinétique qu'économique. La deuxième étape réside en la diffusion des molécules à extraire de la phase solide vers la phase liquide. C'est ce transfert de matière par diffusion qui constitue l'étape d'extraction à proprement parler. Ce phénomène est gouverné par les propriétés physico-chimiques du solvant telles que : la densité, la polarité, la constante diélectrique et son affinité chimique avec les extractibles. De nombreux modèles mathématiques peuvent être appliqués pour prédire les aspects cinétiques de diffusion. Ils reposent pour la plupart sur des adaptations de la loi de Fick <sup>[1]</sup>. L'obtention des coefficients de diffusion des différents extractibles permet ainsi, en théorie, de pouvoir comparer l'efficacité d'extraction de différents solvants. Un exemple de modélisation réussie concerne l'extraction de polyphénols contenus dans les graines d'avocats <sup>[2]</sup>. Les auteurs ont obtenu de bonnes corrélations entre les valeurs expérimentales et un modèle mathématique basé sur la loi de Fick modifiée par la théorie du film, autrement dit l'imprégnation du solide par le solvant.

Ce caractère prédictif de la modélisation résulte des précautions prises par les auteurs pour utiliser ce modèle (broyage fin, tamisage, contrôle de la granulométrie, etc.). L'efficacité d'une extraction dépend donc principalement de la nature du solvant. A titre d'exemple, l'eau qui est un solvant fortement polaire constitue un très bon solvant pour des molécules polaires (sucres, acides aminés, acides organiques, certains polyphénols glycosylés...). A l'inverse, l'hexane qui est un solvant apolaire sera sélectionné pour extraire des composés apolaires comme les terpénoïdes, les vitamines ou les colorants liposolubles. Comme tout phénomène de solubilisation, l'extraction est un phénomène cinétique dépendant du temps et de la température. Une étude cinétique permettra de déterminer les conditions optimales pour enrichir le solvant en extractibles et épuiser le végétal. L'extraction peut être réalisée en réacteur agité de façon discontinue (batch) ou en continu par extrusion par exemple. Depuis plusieurs dizaines d'années, diverses techniques d'intensification ont été développées. Les plus documentées concernent l'utilisation d'ultrasons ou de microondes dont l'action va déstructurer le solide et ainsi faciliter l'accès du solvant aux extractibles [3]. Un schéma de principe en trois étapes proposé par Medina-Torres *et al.* illustre l'effet déstructurant des ultrasons sur une cellule végétale contenant des composés phénoliques (figure IV.2) [4].



**Figure IV.2 Principe de déstructuration d'une cellule végétale par effet de cavitation conduisant à la libération des extractibles [4]**

Une fois le contenu en extractibles validé quantitativement et qualitativement, le liquide et le solide résiduel sont séparés lors de l'étape de séparation solide/liquide au moyen de différentes techniques. Puis, divers traitements peuvent être appliqués à l'extrait liquide en fonction de ses caractéristiques. Un solvant volatil (éthanol, hexane) pourra être évaporé afin d'obtenir un extrait mou ou une résine. L'eau pourra être distillée ou sublimée pour obtenir un extrait sec. Un extrait liquide, après une ou plusieurs étapes de filtration, peut subir des modifications post-extraction (modification de pH, ajout d'un conservateur ou d'un stabilisant) pour être conservé sous forme liquide.

Ainsi, l'extraction végétale ne se limite pas au transfert de matière entre un solide et un liquide qui s'opère pendant l'étape d'extraction solide/liquide mais englobe une succession d'opérations unitaires allant de la préparation de la matière première à la modification de l'extrait pour satisfaire à l'application recherchée. En résumé, le point commun entre tous les procédés d'extraction végétale ayant été développés depuis des millénaires repose sur la capacité d'un solvant à solubiliser les extractibles recherchés. Cela implique une maîtrise de la matière première utilisée et de ce qu'elle contient qualitativement et quantitativement. Or, la composition phytochimique d'une matière végétale dépend de nombreux facteurs (géographique, climatique, saisonnier, agronomique, logistique etc.) qui peuvent être encadrés mais difficilement standardisés. Ainsi, bien que des modèles mathématiques permettent une prédiction satisfaisante dans certains cas, chaque procédé d'extraction végétale reste un cas particulier. Cette discipline « artisanale » nécessite par conséquent un savoir-faire et une adaptation permanente en fonction des observations réalisées lors de chaque lot produit.

Si l'on considère un procédé d'extraction comme une succession d'opérations unitaires, on comprend que son industrialisation englobe des opérations amont et aval à l'étape d'extraction. Les opérations amont concernent toutes les activités d'approvisionnement de la phase solide depuis le champ de culture jusqu'au chargement dans le réacteur d'extraction. Différents aspects doivent être explorés et contrôlés, de la culture (emplacement, type de sol, reproductibilité, projection industrielle, contraintes techniques) jusqu'à l'état physique avant extraction (séchage, broyage, tamisage, conditionnement, stabilité). D'autre part, les opérations aval concernent la récupération de la phase liquide après extraction (séparation solide/liquide, filtration) mais également toutes les étapes supplémentaires (purification, régénération du solvant, etc.) jusqu'au conditionnement de l'extrait. Toutes ces opérations unitaires sont interconnectées. Par exemple, le choix d'une granulométrie pour le solide influencera l'extraction mais également le choix de la technique de séparation solide/liquide à mettre en œuvre. Même si certains outils théoriques de génie chimique aident l'ingénieur à définir et à optimiser un procédé d'extraction, la conception industrielle requiert également un certain savoir-faire qu'il est presque impossible de traduire en équations.

Le facteur coût est une préoccupation majeure pour les industriels. Cependant, la viabilité économique n'est plus une condition suffisante aujourd'hui. Depuis plus de 10 ans, l'extraction végétale a suivi une "révolution verte". Cette évolution des pratiques entraîne un virage technologique vers l'éco-extraction <sup>[3]</sup>. De plus, la responsabilité sociale et environnementale (RSE) des entreprises prend une place de plus en plus importante dans les choix et orientations des industriels. Les acteurs de l'extraction ont récemment créé le label Ingrédient Eco

Responsable (ERI360) dont les lignes directrices du référentiel reposent sur la valorisation de matières premières renouvelables, l'utilisation de procédés non dangereux et économiquement viables et plus particulièrement l'utilisation de solvants verts. C'est dans ce contexte que Gattefossé s'est intéressé aux solvants *NaDES* et *NaLTTM*. Plutôt que de s'adapter aux différentes contraintes détaillées précédemment, l'entreprise a fait le choix stratégique de se tourner vers de nouveaux solvants pouvant répondre plus favorablement à ces exigences que les solvants traditionnels tout en maintenant ou en améliorant la performance extractive.

### IV.3 The use of NaDES to support innovation in the cosmetic industry

---

#### Avant-propos

Le chapitre I (Etat de l'art) de ce manuscrit a fait apparaître que la diversité des constituants pouvant entrer dans la préparation de *NaLTTM* ouvre des opportunités colossales pour la valorisation de la biomasse et de l'extraction végétale. Le chlorure de cholinium (ChCl) est l'accepteur de liaisons hydrogène (*HBA*) le plus utilisé pour constituer de tels solvants. Cependant, bien que peu cher, biodégradable et non toxique, le ChCl et ses dérivés sont interdits en Europe pour des applications cosmétiques (Règlement européen sur les cosmétiques CE n°1223/2009, annexe II). L'utilisation de *NaLTTM* à base d'acides organiques n'est pas non plus souhaitable pour des applications cosmétiques. En effet, le pH très acide de ces solvants est incompatible avec certaines formulations cosmétiques (stabilité, nécessité de neutraliser le pH,...). Finalement, seuls les *NaLTTM* à base de polyols, de sucres et/ou d'acides aminés semblent compatibles avec l'ensemble des applications cosmétiques industrielles. C'est dans la conception de ce type de mélanges que Gattefossé s'est orienté en 2012 sous l'impulsion de Frédéric Demarne alors Directeur R&D. L'entreprise visait à identifier des solvants innovants, efficaces et agrosourcés offrant des perspectives intéressantes pour ses activités d'extraction végétale. Le contexte, la stratégie de développement ainsi que les principaux résultats ont été regroupés en 2021 dans un chapitre de l'ouvrage « *Advances in Botanical Research Eutectic Solvents and Stress in Plants* »<sup>[5]</sup>. Comme pour les publications constitutives des chapitres précédents, ce document rédigé en anglais est repris dans ce manuscrit. L'utilisation du terme *NaDES* est privilégiée dans ce document.

---

### IV.3.1 Introduction

Since their introduction, Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) have emerged as a promising, eco-friendly alternative to petrochemicals to dissolve plant metabolites. As the demand for sustainable, green cosmetics is growing, those solvents represent unexplored opportunities to develop innovative extracts with unique phytochemical footprints and biological activities. However, despite the number of NaDES described in the literature, only a few can actually be used for cosmetic applications because of safety or regulatory issues. This chapter will first introduce the regulatory framework and green chemistry requirements that cosmetic active ingredient have to comply with. To answer the challenging question of how NADES can support innovation in the cosmetic industry, the second part will present the strategy chosen by Gattefossé to develop, characterize and industrialize solvents and extraction processes that overcome cosmetic constraints. Finally, the value-added of NaDES compared to traditional extraction solvents in terms of their phytochemical composition and biological efficacy on human skin and skin models will be discussed through concrete examples.

---

### IV.3.2 Regulatory framework, market trends and botanical cosmetic bio-actives

---

#### IV.3.2.1 A few words on the cosmetic regulatory and market environments

According to the European Regulation (EC) No 1223/2009 a “cosmetic product” is defined as “any substance or mixture intended to be placed in contact with the external parts of the human body (epidermis, hair system, nails, lips and external genital organs) or with the teeth and the mucous membranes of the oral cavity with a view exclusively or mainly to cleaning them, perfuming them, changing their appearance, protecting them, keeping them in good condition or correcting body odours” (Regulation (EC) No 1223/2009) [6]. The European personal care association, namely Cosmetics Europe, describes seven main categories of cosmetics and personal care products: oral care, skin care, sun care, hair care, decorative cosmetics, body care and perfumes [7]. The Federal Food, Drug, And Cosmetic Act codified into Title 21 Chapter 9 of the United States Code (sometimes referred to as 21CFR) offers a slightly different definition, as the term "cosmetic" identifies “articles intended to be rubbed, poured, sprinkled, or sprayed on, introduced into, or otherwise applied to the human body or any part thereof for cleansing, beautifying, promoting attractiveness, or altering the appearance, and articles intended for use as a component of any such articles; except that such term shall not include soap.”



For regulatory purposes, the term “cosmetics” includes products for the eyes, face, nails, hair, skin, and mouth, which may be in the form of products such as makeup, polish, hair dyes and colouring, sunscreens, fragrances, shave gel, oral care and bath products, and products for infants and children [8].

Cosmetic formulation is primarily a matter of chemical substances, even when substances are from natural origin. REACH - which stands for Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals- has entered into force in 2007 and has set the regulatory framework of chemical companies operating in Europe. In short, chemical manufacturers must identify, declare, register, and provide safety data and information for the substances they manufacture (a substance is defined as a chemical element and its compounds in the natural state or the result of a manufacturing process). Requirements increase with increasing production volumes. Over the past decade, with growing environmental awareness and consumer education thanks notably to digital technologies and social networks, the demand for natural cosmetics has been on the rise. As a result, the pressure on the industry for providing more sustainable raw materials of natural origin has increased likewise. For instance, even though preservatives are strictly regulated in most countries (with a restricted list of ingredients and appropriate concentrations of use, based on available safety data), concerns about preservatives of petrochemical origin such as phenoxyethanol have been rising at the same time. Given the wide range of ingredients required for cosmetic formulation (oils, emollients, surfactants, preservatives, texturing agents, actives and auxiliaries, pigments, fragrance...), the challenge for a green transition is immense. The recently released ISO16128 standard is an interesting example of how the industry is moving to help formulators and consumer make more sustainable decisions.

Bio-active ingredients take a very special part in that landscape. If some chemicals such as retinol, hyaluronic acid and collagen have long acquired a cosmetic fame, plants have always been a source of inspiration for the personal care industry. Most traditional medicines are based on herbal remedies and beauty rituals have always been close to folk medicine. Licorice, calendula, mallow, rose, soy, ginseng, aloe vera, amongst others, are widely associated with cosmetic benefits. Since the late 90's and the scandal of Creutzfeld-Jacob disease, the interest of the industry in plant remedies has renewed. But the green challenge is not as easy as it may appear. Indeed, until recently, a natural origin of the feedstock was enough for a botanical extract to claim “natural”. Nowadays, expectations have become much higher and the naturalness of a commercially available plant extract must be considered as a whole: feedstock, farming type, eco-design, bio-based solvents and preservatives. This seems to be a smart direction when considering the current environmental challenges, but it also requires companies to be more creative and innovative. And one way to innovate in plant extraction is undoubtedly working on the extraction process itself.

---

#### IV.3.2.2 *Plant extracts, green chemistry, and naturalness*

Green chemistry is often cited as a master guidance to make a mindful use of biodiversity. This concept is based on twelve principles that aim to reduce manufacturing wastes of existing processes or make use of renewable feedstocks but also to define less polluting processes [9];[10]. Naturally, solvents occupy a strategic place in the development of the concept of green chemistry. To be called “green”, a solvent must meet various criteria such as safety, biodegradability and recyclability. Most of these principles can be applied to plant extraction processes. Indeed, the first step of all plant extraction processes is a solid-liquid mass transfer, meaning the transfer of phytochemicals contained in the solid plant raw material to an extraction solvent, most of the time a liquid. The higher the affinity of the phytochemicals for the solvent, the better the transfer is expected to be. However, polarity and chemical affinity is not the only requirement for efficient plant extraction. Solid processing prior to extraction (drying, grinding, sieving...), kinetics, temperature, physicochemical characteristics of the solvent, stirring method, there are some of the many variables that have to be taken into account to design an extraction process. A huge number of industrial processes use non-renewable solvents. Efficient extraction solvents are often of petrochemical origin and thus, more and more disregarded. For instance, hexane is the reference extraction solvent when it comes to non-polar compounds such as curcumin. Many resources are invested nowadays to find an efficient, eco-friendly alternative to hexane. Supercritical CO<sub>2</sub> is a promising alternative to hexane when searching for lipophilic compounds, but extraction yields are sometimes low. The number of extraction solvents suitable for manufacturing plant-derived bio-active ingredients has shrunk with increasing sustainable requirements. For the extraction of polar or semi-polar compounds, solvents such as water, glycols and ethanol (alone or in mixtures in water) are perfectly appropriate but certain drawbacks remain. Because of volatility and flammability, the transportation and handling of ethanol require specific safety measures and labelling. Besides, due to its drying nature, it can disturb the hydrolipidic film of the skin and cause discomfort sensations for people with sensitive skin. It can be removed by distillation but from an energy saving point of view, this downstream step is not ideal. Glycols such as butylene glycol, propylene glycol (1,2-propanediol) and propanediol (1,3-propanediol) can make up interesting extraction solvents when used alone or in combination with water. However, consumers tend to associate glycols with petrochemicals and often try to avoid glycol-containing cosmetic formulations. However, manufacturers offer nowadays both butylene glycol and 1,3-propanediol of natural origin. When it comes to aqueous extracts, both liquid and powdered, the microbiological safety is a major limitation. Generally speaking, cosmetic products should not contain more than 100-1000 CFU/ml of total viable aerobic mesophilic microorganisms, and

pathogens such as *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli* should be absent. Sterile filtration and sterile packaging can be an alternative but remain relatively expensive and create handling constraints at an industrial scale. Gamma irradiation doesn't obviously comply with natural standards. As a result, aqueous extracts often require the addition of preservatives. And unfortunately, only a few green preservatives can be used without downgrading product naturalness.

---

### IV.3.3 NaDES, an opportunity for sustainable plant extraction

---

#### IV.3.3.1 Low Transition Temperature Mixtures for plant extraction

The discovery of ionic liquids (ILs), sometimes referred to as Deep Eutectic Solvents (DES), Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) or Low Transition Temperature Mixtures (LTTM) has opened new horizons for sustainable, green plant extraction. These names are sometimes used without robust physicochemical characterization and different names can refer to the same solvent. Moreover, in some cases, the identification of the class a mixture belongs to is unclear<sup>[11]</sup>. But leaving the naming controversy aside, thanks to their physical properties, which facilitate the recycling (low vapor pressure and high melting point) ionic liquids were quickly classified as "green solvents". However, this affiliation is debated since some papers have reported a poor biodegradability and potential toxicity of some of these mixtures, especially halogenated ionic liquids<sup>[12]</sup>. And despite a growing interest of the scientific community in ionic liquids for industrial applications, some of the most widely used salts are incompatible with cosmetic applications. Deep eutectic solvents are a more sustainable alternative than ionic liquids. They consist of a mixture of salts and organic compounds, one being a hydrogen bond donor (*HBD*), the other one a hydrogen bond acceptor (*HBA*). Charge delocalization is achieved through hydrogen bonding between compounds. As a result, those mixtures possess a melting point significantly lower than that of individual components, leading to a stable liquid phase at room temperature<sup>[13]</sup>. Based on their NMR-based metabolomics knowledge, Choi and co-workers hypothesized that the metabolites that occur in large amounts in plant cells may form a third type of liquid, different from water and lipids. To support this hypothesis, they assessed the solubility of some common natural products in their new viscous liquids and discovered that those mixtures had an important role to play in cellular metabolism. Thus, they coined the term "Natural Deep Eutectic Solvents" for those mixtures, abbreviated NaDES<sup>[14]</sup>. Dai has reported several stable NaDES, particularly mixtures of primary metabolites, such as organic acids, amino acids, and sugars. The properties of those mixtures can be tailored by the addition of water. Moreover, they can be used as extraction solvents and can thus replace conventional

organic solvents thanks to high extraction potential and good stability <sup>[15]</sup>. Considering the diversity of constituents which can enter the preparation of DES and NaDES, perspectives offered by these mixtures for the development of new industrial extraction processes are impressive. For instance, Jablonsky and co-workers published in 2018 a review on the up-cycling of agroforestry biowastes <sup>[16]</sup>. Hundreds of mixtures used to successfully extract several types of compounds of different polarity such as flavonoids, phenolic acids, stilbenes, tannins, protein, carbohydrates, nucleic acids, flavones, lignans or tocopherols, are listed. Choline chloride here appears as the most widely used compound to make up such solvents. However, choline chloride and its derivatives are prohibited in cosmetics in Europe (European Cosmetic Regulation EC No. 1223/2009, annex II). Thus, all solvent mixtures containing choline chloride cannot be used as an extraction solvent for cosmetic plant extracts. In this context, there is a need to design new NaDES mixtures compatible with cosmetic applications, and to assess their plant extraction performance in comparison with conventional solvents.

---

#### IV.3.3.2 *Designing NaDES solvents for cosmetic applications*

Gattefossé started working on NaDES back in 2012, at a time when the available scientific literature was much more limited than today. We started looking for innovative, effective, bio-based solvents for plant extraction that would widely comply with cosmetic regulations. Those solvents had to meet both the green chemistry principles on one side and comply with industrial constraints on the other side. Keywords were unique phytochemical profile and extraction performance at least equivalent to that of conventional solvents.

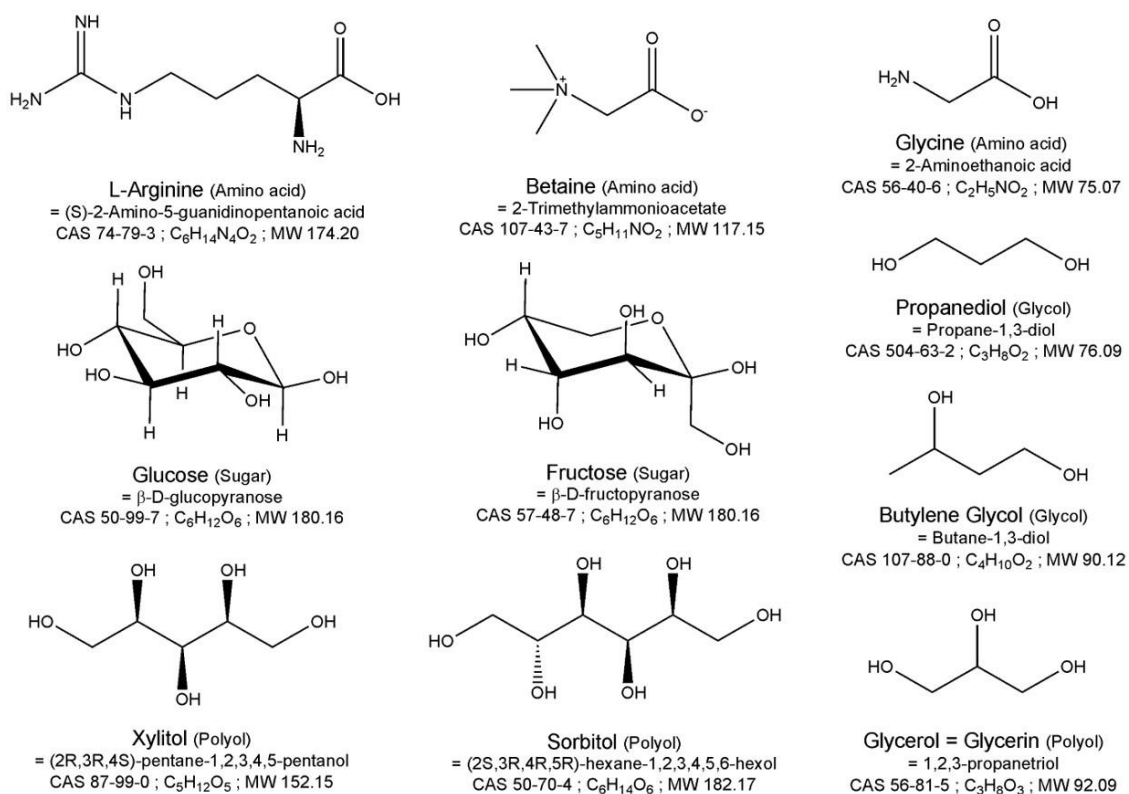
First of all, substances should be allowed for cosmetic use and should thus primarily not appear in Annex II of the European Cosmetic Regulation EC No. 1223/2009. Second, those substances should be bio-based and available at a reasonable cost at industrial scale. Third, the solvents should demonstrate characteristic features of NaDES mixtures, meaning a supramolecular structure as that described by Choi and co-workers. Fourth, mixtures should have a low or tunable viscosity at room temperature to allow homogeneous dispersion of the plant material and easy solid/liquid separation. Fifth, those mixtures should demonstrate long term stability, including microbial stability, alone or in combination with green preservative systems. Sixth, the solvents should be compatible with classical cosmetic formulations such as lotions, creams or gels. Last but not least, they must demonstrate an excellent safety profile.

### 1. Selection of compounds and mixture preparation

Taking into account the above criteria, we selected the following ingredients:

- Trimethyl glycine (an amino acid also called betaine) as alternative quaternary ammonium to choline chloride, which as mentioned earlier is forbidden in cosmetic products in Europe. Betaine is non-toxic, already used in food supplements and cosmetics, available in large quantities at a very affordable price and can be approved by the Cosmos standard for natural cosmetics, when manufactured from sugar beet. Two other amino acids were selected according to the same criteria: glycine and arginine.
- Although organic acids are reported to be suitable for NaDES preparation, we did not select these compounds because of their acidic nature that can create instability in cosmetic formulations.
- Fructose and glucose were selected among monosaccharides and sorbitol and xylitol among sugar alcohols (or polyols).
- Three short-chain alcohols were selected: two dihydroxy alcohols (propanediol and butylene glycol) and one trihydroxy alcohol (propane-1,2,3-triol or glycerol or glycerine). Even if these short-chain alcohols are rarely present in the plant kingdom, their use is well described in the literature for the preparation of NaDES and they offer two strong advantages for cosmetic and industrial applications: they are liquid at room temperature, can be bio-based and are available at large scale for a reasonable price.

The chemical structures of those compounds are presented in figure IV.3.


**Figure IV.3 Chemical structures of compounds selected for designing cosmetic NaDES**

We next studied the feasibility of producing NaDES using these ten organic molecules. Different preparation methods can be used depending on the mixture, water content and intended application [17]. Most of the time, compounds should be heated under stirring. Water can be added before being later evaporated using classical rotary evaporator, desiccator, or freeze-drying. Mixing and heating can be intensified using microwaves. From an energy-saving point of view, water evaporation, freeze-drying and process intensification are to be used with caution. We thus chose to use primarily a low-energy demanding process, which is conventional heating coupled with stirring. Using this method, only a few combinations lead to a clear, stable, homogenous liquid at room temperature, which is an important selection criterion. Water is often added as a third compound for NaDES, DES, LTTM preparation in order to decrease the mixture viscosity and promote liquefaction of solid organic compounds. We thus studied the effect of water addition to the mixture. The most successful trials were obtained with ternary mixtures based on an equimolar association of two organic compounds (1:1) added with water. The six most promising examples are integrated in the following discussion and reported in table IV.1.

Acronyms	Studied mixtures			Mass percentage			Equivalent molar amount		
BFW115	Betaine	Fructose	Water	30.2	46.5	23.3	1	1	5
FGW115	Fructose	Glycerol	Water	25.4	49.7	24.9	1	1	5
FBgW113	Fructose	Butylene glycol	Water	55.5	27.8	16.7	1	1	3
BSW115	Betaine	Sorbitol	Water	30.1	46.8	23.1	1	1	5
BGluW115	Betaine	Glucose	Water	30.2	46.5	23.3	1	1	5
FSW115	Fructose	Sorbitol	Water	39.8	40.3	19.9	1	1	5

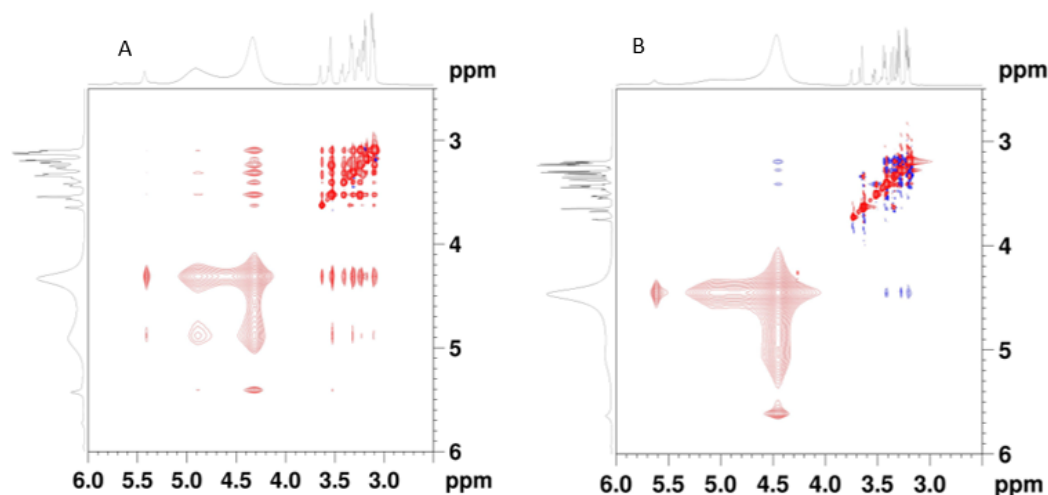
**Table IV.1 Example of homogeneous, limp, and stable liquids obtained by Gattefossé**

To the best of our knowledge, it was the first time that those six ternary mixtures were described for potential use in plant extraction [18]. Once the composition of easy-to-use NaDES mixtures was defined, we next proceeded to their physicochemical characterization.

## 2. NaDES characterization and physicochemical properties

The characterization method of these six systems was inspired by the literature and different techniques have been selected considering our goal, that is to evaluate their potential use as plant extraction solvent. Differential scanning calorimetry was first used in order to evaluate the melting point of each mixture. Samples were analysed at a temperature ranging from -50°C to 30°C. In these experimental conditions, no melting point could be detected. Moreover, we observed the absence of thermal phenomena in the studied range of temperature. This result indicates that the ternary mixtures included in this study present a liquid phase stability over a large range of temperatures. The absence of melting point for NaDES ternary mixtures that contain water has already been reported [15]. Instead of Deep Eutectic Solvents, Francisco and co-workers named those mixtures “Low Transition Temperature Mixtures” because they are characterized by glass transitions instead of melting points [19]. The most documented structural hypothesis indicates that the components of a NaDES mixture interact via strong intermolecular hydrogen bonds when the molar ratio and the water content allow it. The existence of these non-covalent bonds can be demonstrated by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. NMR is a non-destructive spectroscopic technique which gives access to the structure of molecules in a liquid or solid medium. The two-dimensional NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) experiment offers a way to obtain all NOE information from a molecule or a mixture. Applied to NaDES, this single experiment is used to study the spatial proximity between protons present in the mixture. This analysis provides relevant data to discuss the existence of hydrogen bonds and to identify the protons that contribute to these interactions.

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY was thus used to characterize the mixtures from a physicochemical point of view with the help of Leiden University and further analysed with Topspin software. For the sake of this experiment, two mixtures were compared: Fructose-Glycerol-Water mixture, in a 1:1:5 ratio (abbreviated FGW115) and Fructose-Glycerol-Water mixture, in a 1:1:10 ratio (abbreviated FGW1110). The spectrum of the FGW115 mixture shows strong positive correlations between all protons, thus indicating a spatial proximity between molecules (figure IV.4a). Those correlations consist as red signals observed outside the diagonal. The presence of those correlations indicates a low correlation time of molecules in the system. The NOESY spectrum obtained with the FGW1110 mixture is clearly different (figure IV.4b). Apart from the typical exchange of the hydroxyl protons in a water solution, correlations between other protons are negative or have disappeared. This shows that the amount of water and resulting dissolution is too high, and that in the system, interactions with water overcome other interactions. Consequently, water becomes the principal platform of hydrogen bonds and interactions between glycerol and fructose disappear. FGW1110 mixture should thus be considered a water solution of glycerol and fructose, but not a NaDES.



**Figure IV.4** Phase sensitive  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spectra recorded at 298K for (A) FGW115 (B) FGW1110

NMR analysis is crucial to demonstrate the strong network of hydrogen bonds representative of a NaDES mixture and to differentiate it from an aqueous solution. These results confirm that NMR analysis appears as a very effective guide to determine the maximum quantity of water that can be added to reduce the viscosity of mixtures, while preserving the supramolecular structure of a NaDES. This demonstration first made by Dai and co-workers (Leiden University) is nowadays widespread in literature [20;21].



Due to the network of intermolecular hydrogen bonds, liquids obtained display a relatively high viscosity. A simple way to reduce viscosity, besides the addition of water, is heating. Indeed, during heating, hydrogen bonds are broken or weakened. The study of viscosity as a function of temperature is helpful to define the ideal temperature at which plant extraction can be performed. Viscosity measurements were performed at a temperature ranging from 20 to 70°C. The viscosity of NaDES systems was compared to that of viscous conventional solvents: butylene glycol, propanediol and glycerine. Results are presented in figure IV.5. All studied solvents demonstrate a drastic drop in viscosity with increasing temperature. At temperatures above 50°C, their viscosities fall down below 0.2 Pa.s, which is acceptable to perform plant extraction and solid-liquid separation.

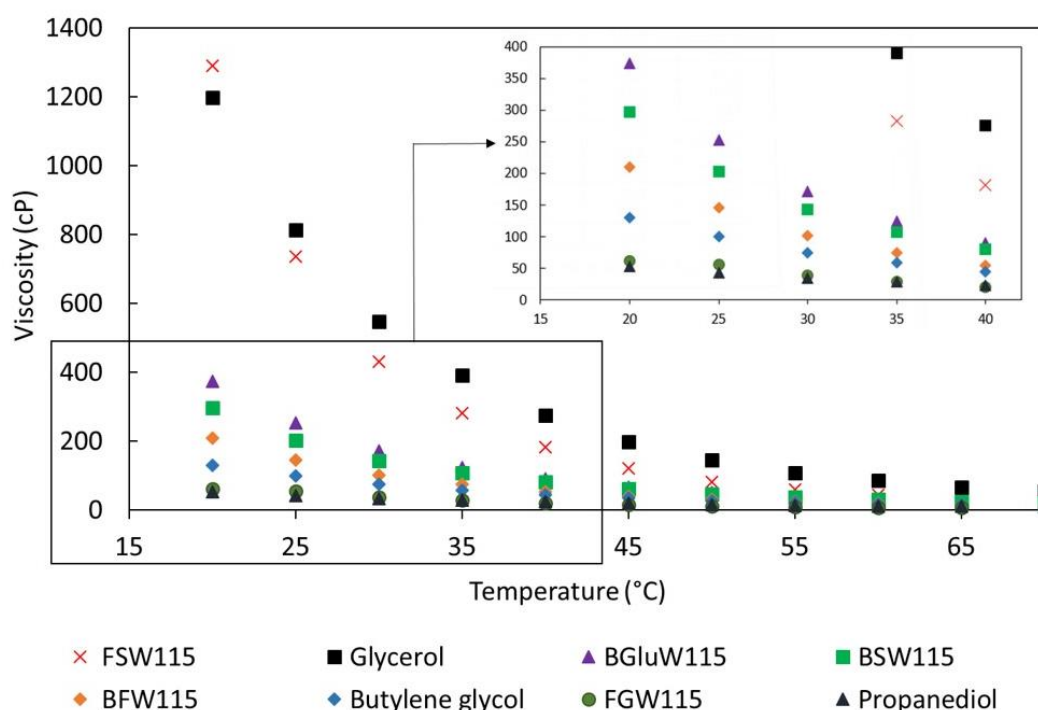


Figure IV.5 Evolution of viscosity as a function of temperature for NaDES and conventional solvents

On the basis of “like dissolves like”, an extraction process, and more particularly the extraction solvent selection is often based on polarity. We used Reichardt’s solvatochromic dye to determine the polarity of each solvent [22]. The term solvatochromism refers to a change in the absorption spectrum of a chromophore in solvents of different polarity. Using such dye, the polarity of each sample solvent can thus be characterized by a maximum absorption wavelength. According to this method, polarity is scaled from 0 to 1. The polarity values of NaDES and conventional solvents are presented in Table IV.2.

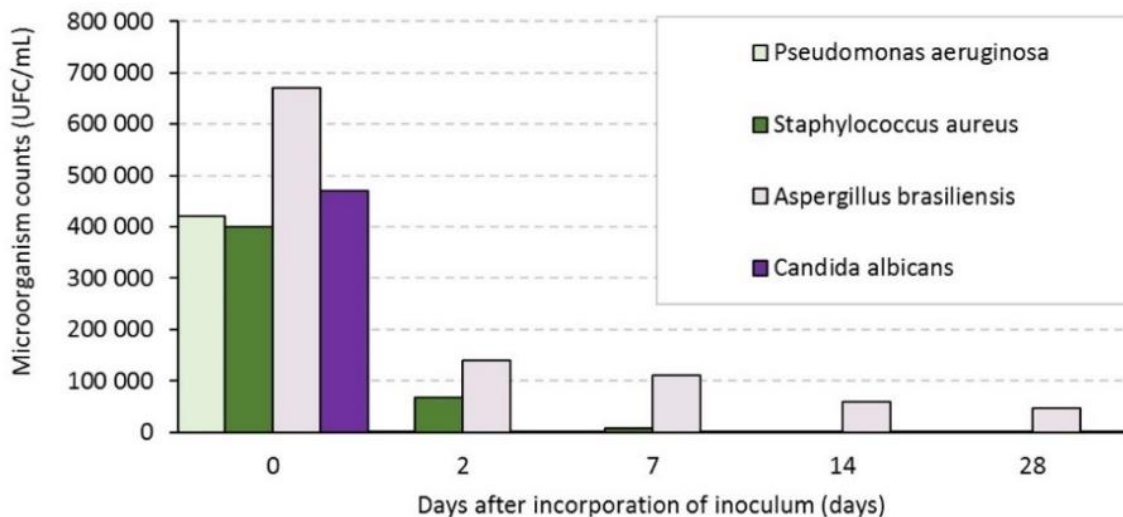
Solvents	$\lambda_{\max}$ (nm)	ET(30)	E <sup>N</sup> T
Ethanol	473,2	51,7	0,648
Propanediol (PDO)	520,3	55	0,75
Butylene Glycol (BG)	497,6	57,5	0,827
PDO/Water (60/40)	496	57,6	0,83
Glycerol	429	57,8	0,836
BFW115	428,2	57,9	0,84
BSW115	424	58,6	0,86
BGluW15	423	58,7	0,865
FGW115	415,6	59,9	0,901
FSW115	414,4	60,1	0,907
FBgW113	No characteristic $\lambda_{\max}$		
BG/Water (60/40)			

**Table IV.2 Solvent polarity of NaDES and conventional solvents obtained with Reichardt's method**

Neither fructose-butylene glycol-water 1:1:3, nor butylene glycol-water, has any characteristic maximum wavelength so their polarity could not be determined using this method. The polarity of the five other NaDES is comprised between those of glycerol and water. According to those results, those solvents should be efficient to extract polar and medium polar phytochemicals from plants.

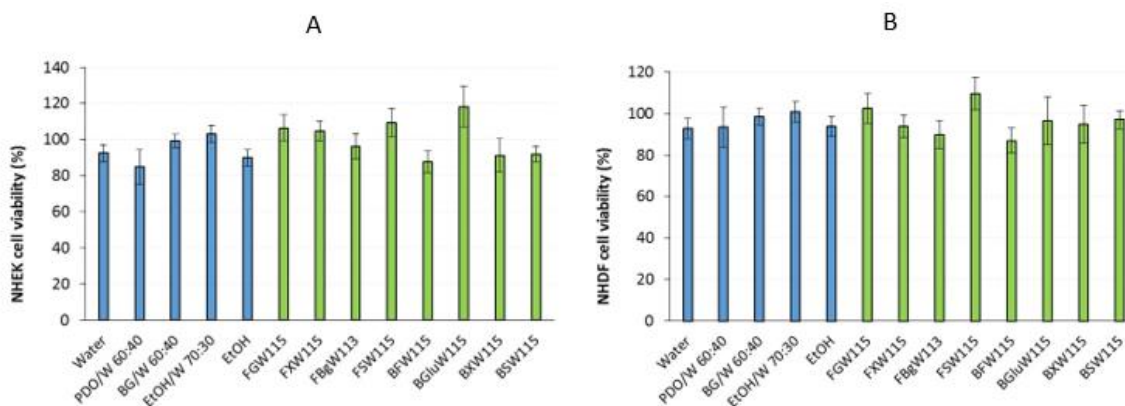
### 3. Study of the microbial safety profile, formulability and skin cell tolerance

Microbiological safety is essential to cosmetic ingredients. Water and nutrients such as sugars favor bacterial growth. Challenge test is commonly used to assess the efficacy of microbial preservation. Challenge-tests were thus carried out following the European Pharmacopeia monograph (9th edition, 2019 –5.1.3: effectiveness of the antimicrobial conservation, preparations for local applications). The test consists of challenging a preparation with a prescribed inoculum of suitable microorganisms (two bacteria, one mould and one yeast: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*, respectively), storing the inoculated preparation at ambient temperature in the dark, withdrawing samples from the container at specified intervals of time and counting the microorganisms in the samples so removed. The preservative properties of the preparation are adequate if, in the conditions of the test, there is a significant fall or no increase, in the number of microorganisms in the inoculated preparation after 2, 7, 14 and 28 days. The acceptance criteria, in terms of decrease in the number of microorganisms with time, vary for different types of preparations according to the degree of protection intended. Figure IV.6 shows that the microorganism count of NaDES FGW115.



**Figure IV.6 Microbial stability study of FGW115 according to European Pharmacopeia challenge test method**

Microorganisms decrease as early as the second day, which is however not quick enough to meet the so-called A criteria. As a result, in order to ensure the microbiological safety of future FGW115 extracts, a final sterile filtration step with a 0,2 $\mu$ m cut-off will be necessary. The compatibility of the selected NaDES in formulation was also checked by adding five percent of solvent in a cream and a gel. Formulations are considered stable when no significant changes in organoleptic properties are observed after one month of storage at different temperatures (4°C, RT, 45°C). In addition, the impact of 5% NaDES on the sensory profiles of emulsions was assessed. Several criteria during and after application on the skin were evaluated by a panel of experts. Very good profiles were obtained for the NaDES. In particular, despite an important amount of sugar in some NaDES, the tacky after-feel was deemed lower than that of glycerin. Finally, the viability of skin cells cultured in the presence of those NaDES was evaluated using MTT assay [23]. Normal human epidermal keratinocytes (NHEK) and normal human dermal fibroblasts (NHDF) were cultured for 48h in the absence (untreated control) or presence of solvents at 1%. Results are presented in figure IV.7a and IV.7b for keratinocyte and fibroblast viability, respectively. No cytotoxicity was observed either with NHEK or NHDF further to NaDES treatment. Consequently, NaDES can be considered harmless for cultured skin cells.



**Figure IV.7 Cell viability (MTT assay) of normal human epidermal keratinocytes (NHEK) (A) and normal human dermal fibroblasts (NHDF) (B) culture containing 1% of NaDES or conventional solvents**

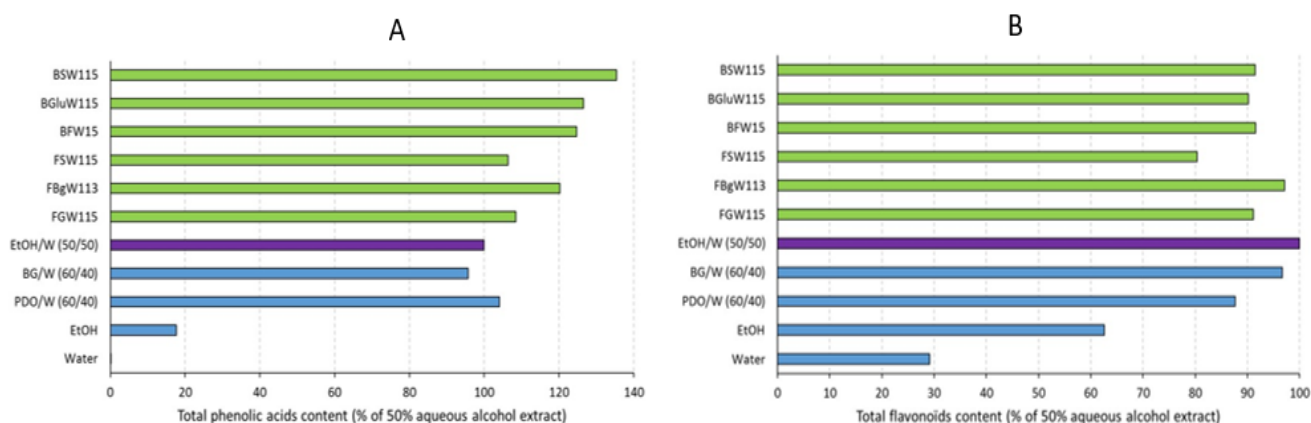
As a conclusion, among the many liquids obtained by combining compounds compatible with cosmetic requirements, six have been selected for further evaluation as plant extraction solvent. A network of hydrogen bonds has been demonstrated by NMR for each of them, which results in a high viscosity that can be reduced by increasing temperature. These new solvents exhibit an intermediate polarity between those of glycerol and water. They show good microbial safety, are perfectly compatible with standard cosmetic formulations and well tolerated by human skin cells in culture. Those new solvents thus meet all the main characteristic features required for plant extraction.

#### IV.3.4 Benefits of NaDES extracts compared to traditional extracts

The extraction efficiency of the six selected NaDES towards different plant metabolites was evaluated. The plant material chosen herein as an example is a flower long used in cosmetics: *Calendula officinalis* L., also referred to as pot marigold. Flowers were used dried and ground to increase the contact surface between solid and liquid and thus promote mass transfer. Extracts have been prepared according to a standardized protocol regardless of the solvent used. The mass ratio of plant to solvent was fixed at five percent and extraction was performed at 70°C during three hours under mechanical stirring. At the end of the extraction step, the solid/liquid separation was carried out after extraction using a coarse filter (100µm). The extract was then centrifuged before sterile filtration (0.2µm). Many polyphenols display biological properties and are thus of particular interest for cosmetic science. Phenolic acids and flavonoids are two classes of polyphenols described in *C. officinalis* flower. The contents of those two phytochemical classes were thus quantified using High Pressure Liquid Chromatography with UV detection (HPLC-UV).

#### IV.3.4.1 Evaluation of extraction performance of NaDES in comparison with conventional solvents

*Calendula officinalis* flower extracts were produced from 11 different solvents: six NaDES mentioned earlier (BSW115, FGW115, BGlW115, BFW115, FSW115 and FBgW113) and five conventional solvents (water, absolute ethanol, ethanol/water 50/50 w/w, propanediol/water 60/40 w/w and butylene glycol/water 60/40 w/w). The extraction efficiency of each solvent was expressed as % vs. Ethanol/water 50/50 was used as reference. Total phenolic acid content was expressed in mg chlorogenic acid equivalent/100g (UV detection at 327nm) and total flavonoid was expressed in mg isorhamnetine-3-O-rutinoside equivalent/100g (UV detection at 355nm). Results obtained are presented in figure IV.8. As expected, considering the targeted phytochemicals and individual solvent polarity, water and ethanol alone delivered poor extraction performance. In contrast, large amounts of both phenolic acids and flavonoids from *Calendula officinalis* flowers were extracted with the studied NaDES. Each of them exhibited an extraction efficiency towards phenolic acids equal or higher than that of best conventional solvents. On the contrary, the extraction performance was similar or lower for flavonoids.



**Figure IV.8** Relative extraction efficiency of both NaDES and conventional solvents for (A) phenolic acids and (B) flavonoids of *Calendula officinalis* compared to ethanol/water standardized at 100%

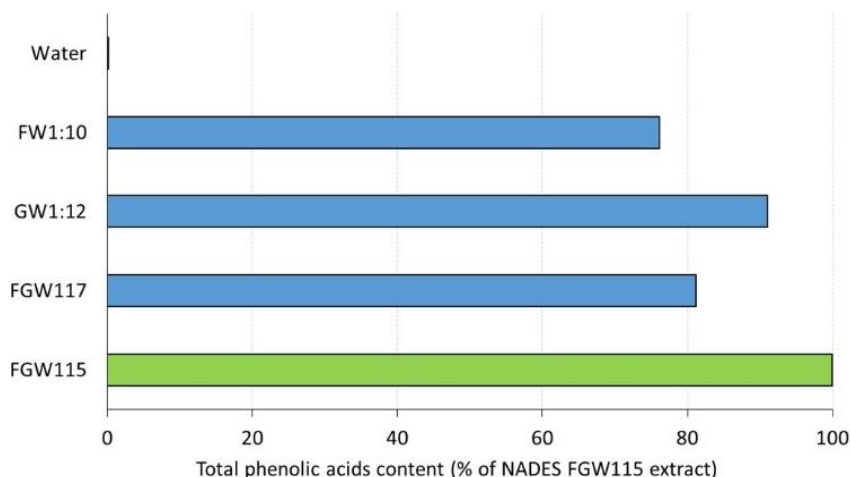
The extraction efficiency of phenolic acids with NaDES BSW115 was 35% higher than that of ethanol-water and that of flavonoids 10% lower. NaDES FGW115 slightly outperformed ethanol-water with a total phenolic acid content close to that obtained with propanediol/water 60:40. The best NaDES for flavonoid extraction was NaDES FBgW113, with a performance close to that of ethanol-water.

As mentioned earlier, the choice of a solvent is often based on the similarity between its polarity and the polarity of the targeted molecules. However, this study also showed that polarity alone is insufficient. Indeed, BFW115 has a similar polarity to propanediol / water 60/40 (respectively 0.84 and 0.83) but the extraction performance was generally better, especially for phenolic acids. Likewise, FGW115 extracts had a phytochemical content similar to that of propanediol / water 60/40 although its polarity is significantly higher (0.90). Others have reported elsewhere that parameters such as dielectric constant, viscosity, density and Hansen parameters should be taken into account. Other internal studies confirmed that the high solubility of a given molecule in a specific solvent does not necessarily predict the extraction performance of the same solvent towards the same molecule contained in a plant raw material. This is true for both NaDES and conventional solvents as reported by Gonzales *et al* [24]. We attempted to better understand the mechanisms underlying extraction performance and asked ourselves whether the supramolecular structure of NaDES could explain, at least in part, the extraction efficiency.

---

#### IV.3.4.2 Value-added of NaDES structures

Additional experiments on *Calendula officinalis* flowers were performed according to the previously described extraction protocol and sample analysis procedure. Here, NaDES FGW115 was taken as reference regarding the extraction efficiency of phenolic acids. The aim was here to compare extraction efficiency of NaDES FGW115 to other ternary or binary mixtures of fructose, glycerine and water or to single compounds whenever possible. Two ternary mixtures were selected: FGW113 (55:28:17 w/w/w), which contains less water than FGW115 and whose specific NaDES supramolecular structure was confirmed based on NMR data; FGW117 (45:23:32 w/w/w), which contains more water than FGW115 and whose typical NaDES supramolecular structure could not be observed. The selected binary mixtures were fructose/water 1:10 (50:50 w/w) and glycerine/water GW1:12 (30:70 w/w). The extraction with pure fructose is of course impossible due to its solid nature and the extraction with glycerine is not feasible at industrial scale due to its high viscosity. Consequently, only water was used for this comparison. Due to the high viscosity, the FGW113 *C.officinalis* extract was very difficult to filtrate at 0.2 $\mu$ m and was thus not relevant from an industrial perspective. Therefore, this sample was not analysed. The phenolic acid content of other extracts is shown in Figure IV.9.



**Figure IV.9 Relative extraction efficiency of solvents composed of fructose, glycerol and water regarding phenolic acids extracted from *Calendula officinalis* flowers**

Concerning the ternary mixtures, the total phenolic acid content of FGW117 was lower than that of FGW115. The addition of water in this NaDES reduced the viscosity but also significantly reduced the extraction efficiency. A similar observation was made with the extraction of phenolic metabolites from *Carthamus tinctorius* [25] and more recently with the extraction of phytochemicals from *Ginkgo biloba* and *Panax ginseng* leaves [26].

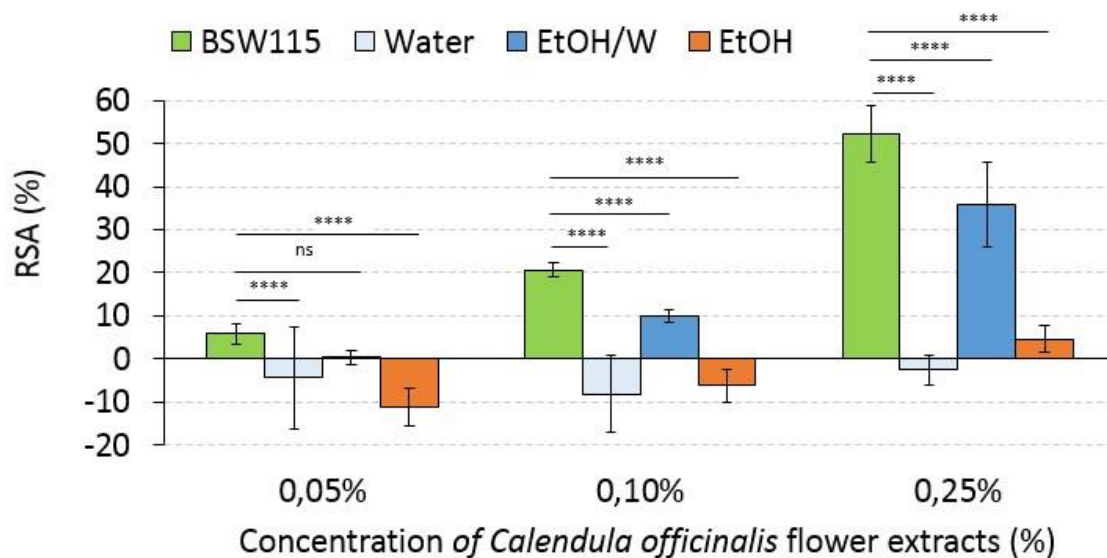
Extracts obtained with binary mixtures had lower phytochemical contents than FGW115. Barely any phenolic acid could be extracted using water. If these results are insufficient to establish a direct correlation between the NaDES supramolecular structure and the extractive performance, this study shows however NaDES mixtures can offer superior extraction ability compared to aqueous solutions made of the same components. This is of particular interest for cosmetic applications. Indeed, NaDES give access to plant extracts with unique phytochemical signatures and potentially unique biological activities. The biological activity of different NaDES extracts was thus further assessed to identify in vitro potential skin benefits.

#### IV.3.4.3 Evaluation of biological activity of NaDES extracts

Most polyphenols such as phenolic acids and flavonoids exhibit antioxidant properties. The previously selected NaDES BSW115 extract from *Calendula officinalis* flowers demonstrated an interesting phytochemical composition with an interesting balance between phenolic acids and flavonoids. Its antioxidant activity was thus assessed using DPPH assay and compared to that of three conventional extracts obtained with water, ethanol/water 50:50 w/w and ethanol. The DPPH in tube assay allows measuring the radical scavenging activity. At room temperature, DPPH reagent (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) is a stable radical with a strong absorption band centered at about 518 nm. It has a deep violet colour in solution and becomes

colourless or pale yellow when neutralized by radical scavengers. It thus offers a quick and easy method to measure the radical scavenging activity. Increasing concentrations of plant extract (0.05%, 0.1% and 0.25%) were tested for their Radical Scavenger Activity (RSA). Three independent experiments were performed in sextuplicate and the statistical analysis was carried out using One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Results are expressed as the percentage of radical scavenger activity vs. untreated control. Results are presented in figure IV.10. The four solvents were tested alone and showed no significant antioxidant activity in this model (data not shown). The NaDES extract showed a dose-related radical scavenging activity with significantly greater activity than that of the conventional ethanol/water solvent used as positive reference.

(ns: non-significant ; \*\*\*\*: statistically significant vs. untreated control  $p < 0.0001$ )



**Figure IV.10** Radical scavenging activity of a BSW115 extract compared to conventional solvents



### IV.3.5 From the laboratory proof of concept to the market

Numerous plants extracts were developed at the laboratory scale based upon the strategy presented above. Amongst these, the better ones were selected and scaled-up to our industrial production plant. For instance, a cosmetic ingredient based on a FGW115 NaDES extract of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) flowers was recently launched on the market. Same as previously, NaDES FGW115 was selected for its unique phytochemical content. More specifically, this extract contains very interesting plant metabolites, such as flavonol glycosides amongst which astragalins attracted great attention. Several biological assays were performed using monolayer cultures of normal human skin cells to identify possible skin benefits of this extract. Amongst the different biological pathways evaluated, the extract exhibited a strong collagen IV boosting effect in normal human dermal fibroblast cultures. Noteworthy is that this extract outperformed the ethanol/water 70:30 (w/w) extract that was used as reference in the test. Indeed, the NaDES extract showed a 4-fold increase in collagen IV synthesis, while the hydroethanolic extract and the positive control vitamin C both delivered a 2-fold increase. FGW115 and ethanol/water tested alone showed no effect. Collagen IV is a major component of the dermal-epidermal junction that is both a structural and biological membrane at the interface between the dermis and epidermis. Collagen IV is known to decrease with skin aging and is thus a target of interest for anti-aging purpose. This result therefore allowed us to initiate and further assess the anti-aging properties of the FGW115 NaDES extract of horse chestnut flowers. Results are reported in figure IV.11.

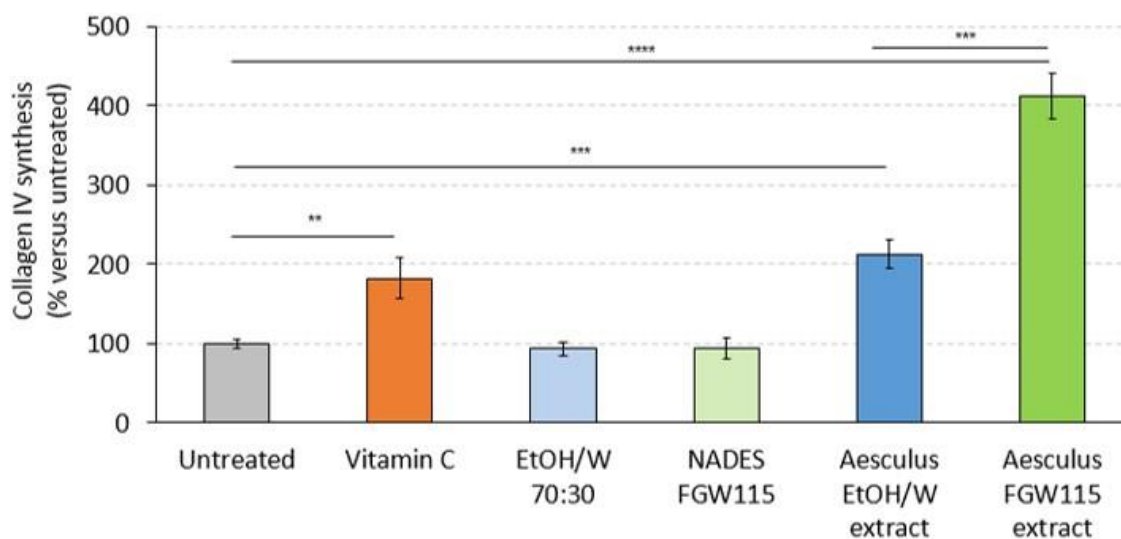


Figure IV.11 Effect of two *Aesculus hippocastanum* extracts on collagen IV synthesis

Interestingly, the flavonol content in both the NaDES and the ethanol/water extracts was similar. Consequently, it is clear that other molecules identified in this NaDES such as procyanidins, amino acids or even minerals contribute to the biological activity. No single class of molecules can probably explain the difference in biological activity. We can also hypothesize that the NaDES solvent itself could not only demonstrate unique extraction properties but also modulate the bioavailability of phytochemicals for skin cells.

---

### IV.3.6 Conclusion and perspectives

Over the past decade, design and development of cosmetic ingredients has dramatically evolved. The industry has operated a shift towards green chemistry to meet market trends but also deliver more sustainable and responsible ingredients. Basic research on NaDES has laid the ground for cosmetic science to develop eco-friendly bio-active ingredients without compromising on biological efficacy. Several years of research were needed before coming up with a commercially bio-active ingredient. The collaboration between Gattefossé and Leiden University has been essential to the successful development of innovative, economically viable, yet efficient bio-active ingredients.

These easy-to-use, stable liquids composed of safe molecules form a unique network of hydrogen bonds and offer terrific opportunities of innovation. Our work has shown that each solvent has its own extraction capacity and that the resulting phytochemical signature is unique. Biological assays have demonstrated that different extracts obtained with solvents of different polarities, including NaDES, could deliver significantly different biological activities in cultured skin cells. It is not always clear exactly how different plant extracts obtained using different solvents can display significantly different biological activities. But one thing is certain: by giving access to unique phytochemicals, NaDES offer a new opportunity to explore biodiversity and identify new plant extracts with new benefits for skin health.

Important questions remain regarding the mechanisms underlying the original extraction performance of NaDES. What is the relation between these particular assemblies and their particular extraction capacities? Can they affect the bioavailability of phytochemicals for skin cells? Do they actually play a role in nature for the transport or preservation of plant metabolites? Further basic and applied research is needed to help answer those questions.

## IV.4 Evaluation de la performance d'extraction de solvants FGE

Cette partie du volet applicatif vise à relier les résultats de caractérisation de solvants à base de fructose (F), glycérol (G) et eau (E) (cf. chapitre II) au domaine de l'extraction végétale. La réalisation d'essais comparatifs intégrant différentes combinaisons FGE permettra d'enrichir la discussion initiée quant à l'apport de la structure supramoléculaire sur les performances d'extraction de solvants FGE (§ IV.3.4.2). Un intérêt particulier sera porté à l'impact de la quantité d'eau, élément capital de l'établissement du réseau de liaisons hydrogène. L'étude de stabilité des extraits obtenus permettra de discuter les différentes sources d'instabilités propre à chaque solvant. Enfin, les résultats seront discutés sous un angle industriel afin d'identifier les combinaisons les plus prometteuses et proposer des voies d'améliorations pouvant être déployées industriellement.

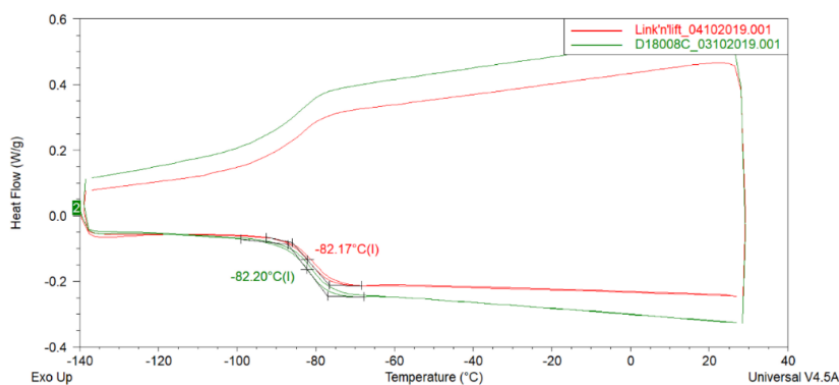
Mais avant de rentrer dans le détail de ces essais, un point n'ayant pas été étudié jusqu'ici a été élucidé : peut-on parler d'extrait végétal supramoléculaire ? Autrement dit, est-ce que la structure supramoléculaire du solvant FGE115 est altérée par le procédé d'extraction et quelle est l'incidence de la présence des composés phytochimiques extraits sur cette organisation ?

---

### IV.4.1 Caractérisation des propriétés physico-chimiques d'un extrait FGE115

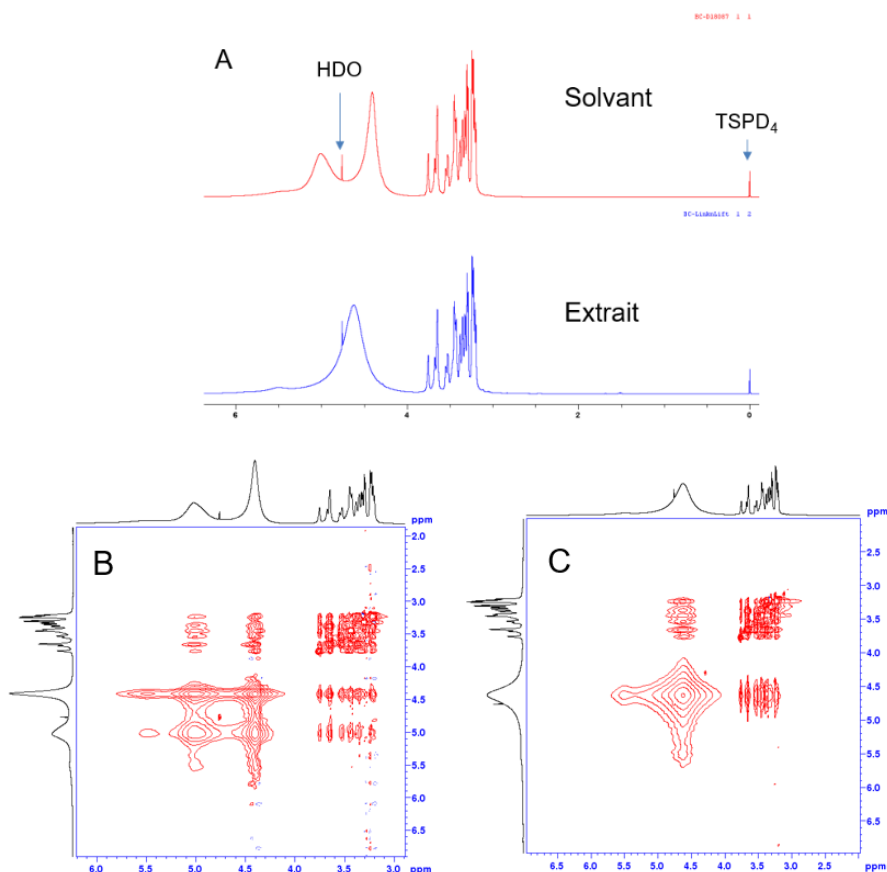
L'existence d'un réseau de liaisons hydrogène a été démontré pour le solvant FGE115. Ce réseau thermosensible est affaibli par la température mais réversible après refroidissement [27]. Cette structuration supramoléculaire démontrée par RMN est responsable des propriétés thermiques et rhéologiques particulières de ce mélange. Industriellement, Gattefossé réalise des extractions solide/liquide avec le *NaLTTM* FGE115 à une température de 70°C pour diminuer suffisamment la viscosité de ce solvant et ainsi améliorer la cinétique de diffusion des composés phytochimiques d'intérêt. L'impact de ces extractibles sur la structuration du mélange a été étudié dans un premier temps. Pour ce faire, un extrait de fleurs de marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) a été choisi comme cas d'étude. Cet extrait, commercialisé sous le nom de Gatuline® Link'N'Lift correspond au premier extrait en FGE115 ayant été industrialisé par Gattefossé. Sa composition phytochimique est caractérisée par la présence de flavonoïdes de type flavonols glycosylés, de proanthocyanidines, de sucres simples, d'acides aminés et d'éléments minéraux. Ainsi, un prélèvement industriel de cet extrait a été caractérisé selon la méthodologie suivie dans le chapitre II de ce manuscrit.

La particularité d'un solvant *NaLTTM* réside dans l'existence d'une température de transition vitreuse ( $T_g$ ) unique et très faible. Les propriétés thermiques de l'extrait d'*Aesculus hippocastanum* ont tout d'abord été étudiées par DSC et comparées à celle du solvant seul. La superposition des thermogrammes obtenus entre -140 et 30°C est représentée en figure IV.12.



**Figure IV.12** Thermogrammes de l'extrait FGE115 d'*A. hippocastanum* (rouge) et du solvant seul (vert)

La figure IV.12 montre que l'extrait présente exactement le même profil thermique que le solvant seul : une unique  $T_g$  à  $-82^\circ\text{C}$ . Les propriétés rhéologiques (viscosité et énergie d'activation) de l'extrait ont ensuite été étudiées à l'aide d'une géométrie Couette comme détaillé dans le chapitre II (§II.2.2.5). Les résultats obtenus indiquent que la viscosité de l'extrait est très proche de celle du solvant, respectivement 0.17 et 0.16 Pa.s. De plus, des mesures à différentes températures ont permis de déterminer l'énergie d'activation de l'extrait qui est similaire à celle du solvant FGE115, respectivement 49 et 47  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Ces similitudes de propriétés rhéologiques et thermiques entre l'extrait et le solvant sont certainement dues à la faible proportion d'extractibles comparativement au solvant. Il est impossible de déterminer précisément l'extrait sec (quantité d'extractibles) pour un extrait *NaLTTM* compte-tenu des caractéristiques du solvant. Nous pouvons néanmoins affirmer que la proportion d'extractibles est inférieure à 2% (m/m). Cette analogie de propriétés entre le solvant seul et l'extrait suggère que la présence des composés extraits ne modifie pas l'organisation supramoléculaire du solvant. Pour le vérifier, des analyses RMN ( $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) ont été réalisées. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure IV.13. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  de l'extrait et du solvant sont superposables entre 3 et 4 ppm ce qui correspond à la partie des protons aliphatiques du fructose et du glycérol (Figure IV.13A). L'unique différence repérée se situe au niveau des protons des groupements hydroxyle (entre 4 et 6 ppm).



**Figure IV.13** Spectres RMN  $^1\text{H}$  de l'extrait FGE115 d'*A. hippocastanum* comparativement à celui du solvant seul (A) et cartes  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY obtenues pour le FGE115 (B) et pour l'extrait (C)

Dans le cas de l'extrait, tous les protons des fonctions hydroxyle sont regroupés sous un seul pic large attestant d'un échange plus rapide entre les protons par rapport au solvant seul pour lequel deux pics distincts sont observés. Deux hypothèses principales peuvent expliquer cette différence. D'une part, l'histoire thermique différente entre le solvant et l'extrait puisque l'extraction est maintenue pendant 3h à 70°C. Cette piste a été écartée suite à l'analyse par RMN  $^1\text{H}$  à 25°C du solvant FGE115 après 3h de chauffage à 70°C et à l'obtention d'un spectre identique à celui de la figure IV.13.A. D'autre part, cette différence peut être attribuée à la présence des composés phytochimiques extraits. En effet, de part leur structures (flavonoïdes, sucres, acides aminés) ces composés apportent de nombreux groupes hydroxyle qui peuvent participer au réseau de liaisons hydrogène. La quantité de ces composés extraits est insuffisante pour pouvoir les détecter dans ces conditions mais nous pouvons faire l'hypothèse que ces extractibles augmentent la mobilité globale des protons hydroxyle. Ce constat se retrouve sur les cartes  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY au niveau des protons des fonctions hydroxyles (Figure IV.13B et IV.13C). La carte 2D obtenue pour l'extrait est très proche de celle du solvant attestant d'une proximité spatiale de tous les protons aliphatiques du mélange.

La tâche de corrélation très étalée des protons hydroxyle appuie l'hypothèse d'une mobilité accrue des protons hydroxyle dans le cas de l'extrait. Il apparaît donc que la présence de composés phytochimiques ne modifie pas considérablement la structure supramoléculaire du solvant FGE115. De plus, la réversibilité de cette structuration de l'extrait sous l'effet d'un chauffage et d'un refroidissement a été confirmée par RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY.

Finalement, la réalisation d'un procédé d'extraction tel que développé par Gattefossé ne modifie pas de façon significative la structure supramoléculaire du mélange FGE115. Ces résultats mettent en évidence un des avantages d'utiliser un solvant de type *NaDES* ou *NaLTTM* pour extraire des molécules : le maintien de la structure après extraction d'une matière végétale sèche. Cette démonstration valide la potentialité de parler d'extraits supramoléculaires obtenus avec le solvant FGE115. Intéressons-nous maintenant au rôle de cette structuration sur les performances d'extraction.

#### **IV.4.2 Influence de la structuration des systèmes FGE sur la performance d'extraction de stilbénoides**

##### **IV.4.2.1 Matériels et Méthodes**

###### **1. Sélection des systèmes FGE et mesures de la viscosité**

Parmi les combinaisons binaires et ternaires obtenues par agitation et chauffage à 50°C, une liste réduite de solvants a été identifiée pour répondre aux différents enjeux : (i) discussion du rôle de la structure supramoléculaire et (ii) impact de la quantité d'eau. Trois systèmes ternaires de type *LTTM* (unique  $T_g$  et corrélations positives en RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY) ont été sélectionnés : FGE122, FGE113 et FGE115. Pour apporter des éléments de discussion sur l'impact de la structure supramoléculaire, des mélanges avec des teneurs en eau plus importante (non *LTTM*) ont été retenus : FGE117 et FGE110. L'eau, le glycérol et deux combinaisons binaires (FE19 et GE19) ont été utilisés comme solvants comparatifs. Cette liste réduite de 9 solvants à base de fructose, glycérol et eau est reportée sur le diagramme ternaire obtenu lors de la caractérisation des mélanges FGE (Figure IV.14). Enfin, la comparaison avec un mélange éthanol/eau (70/30 m/m), solvant conventionnel très utilisé en extraction végétale en raison de son large spectre d'extraction, permettra de situer ces essais dans un cadre plus global.

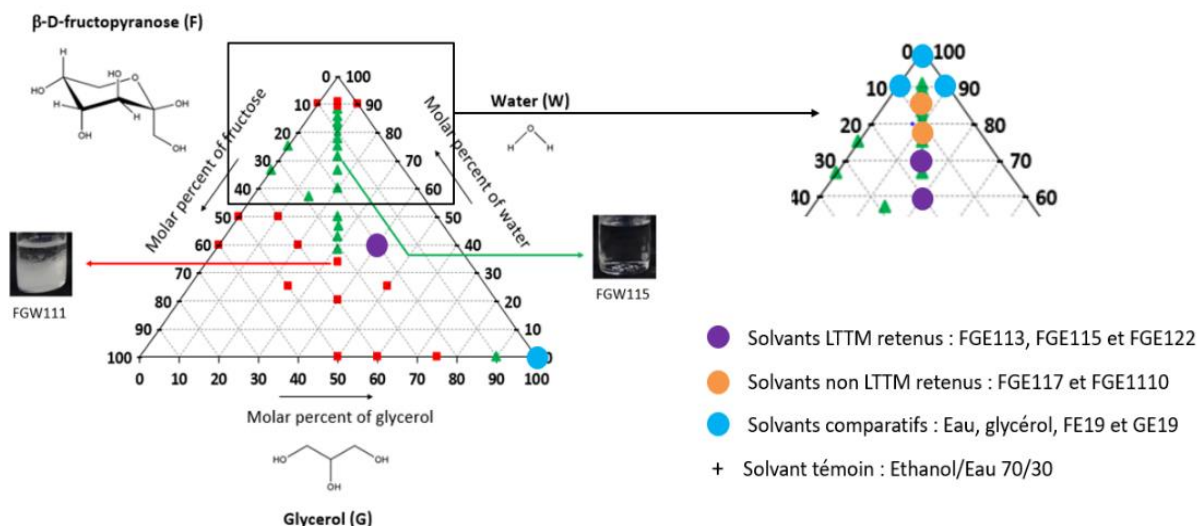


Figure IV.14 Placement des solvants retenus sur le diagramme ternaire des mélanges FGE

Sachant que ces solvants sont stables au moins 3 mois à température ambiante, 1 kg de chaque mélange a été préparé en avance dans un réacteur double enveloppe à 50°C sous agitation mécanique. La préparation est validée lorsqu'une phase homogène liquide et limpide est obtenue. Le tableau IV.3 regroupe les proportions molaires des solvants d'extraction retenus et les pourcentages massiques correspondants par ordre croissant de proportion massique en eau. Ainsi les différents solvants de l'étude présentent une composition massique en eau comprise entre 9 et 64%.

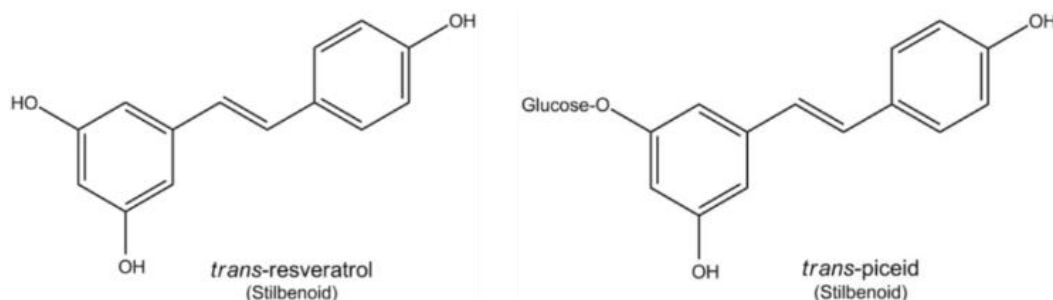
Solvants				Masses pour 100g (en g)		
$n_F$	$n_G$	$n_E$	Acronymes	$m_F$	$m_G$	$m_E$
1	2	2	FGE122	45	46	9
1	1	3	FGE113	55	28	17
1	1	5	FGE115	50	25	25
1	1	7	FGE117	45	23	32
1	1	10	FGE110	40	20	40
1	0	9	FE19	53	0	47
0	1	9	GE19	0	36	64
EtOH/Eau 70/30			EtOH 70%	$m_{EtOH} = 700$		30

Tableau IV.3 Equivalence entre proportions molaires et les pourcentages massiques des solvants

La viscosité de ces systèmes a été déterminée selon le protocole décrit dans le chapitre II (§II.2.2.5) avec une géométrie cône/plan et à 20°C.

## 2. Sélection de la matière première végétale

Dans le cadre de ces essais d'extraction, la racine de *Polygonum cuspidatum* a été choisie comme plante modèle. Il s'agit d'une des espèces les plus invasives à l'échelle mondiale, utilisée dans les médecines traditionnelles Chinoise et Japonaise. Cette racine contient notamment du resvératrol et du picéide - composés appartenant au groupe des polyphénols et à la famille des stilbénoides (ou stilbènes selon les auteurs) - dont les structures sont présentées en figure IV.15.



**Figure IV.15 Structures chimiques du resvératrol et du picéide**

Les stilbénoides constituent une famille de phytoalexines synthétisées par des organismes végétaux pour se défendre en cas d'attaque [28;29]. Plus particulièrement, le resvératrol est très exploité en cosmétique et en pharmacie pour des activités biologiques variées [30-32]. Le caractère anti-oxydant du resvératrol est le plus décrit. Des travaux réalisés précédemment démontrent que parmi les solvants *NaDES* développés par Gattefossé, le solvant FGE115 n'est pas le plus efficace pour l'extraction des stilbénoides contenus dans les racines de *P. cuspidatum* [33]. En effet, il est apparu que les mélanges à base de bétaïne et de butylène glycol présentent de meilleures performances d'extraction que le mélange FGE115. Cela est vraisemblablement relié à une meilleure solubilité des stilbénoides dans les mélanges à base de bétaïne. Cependant, une publication récente signale la possibilité d'extraire des dérivés du resvératrol de racine de *Morus alba* par des *NaDES* à base d'urée et de glycérol (proportions 1:1 ; 1:2 et 1:3 mol) dans un procédé assisté par ultra-sons [34]. L'utilisation de différents mélanges FGE permettra également une discussion de l'impact de la quantité de glycérol sur l'extraction de racine de *P. cuspidatum* séchée et broyée.

## 3. Protocole d'extraction standardisé

Toutes les extractions sont réalisées à partir du même lot de racine de *P. cuspidatum* séchée et broyée, à 70°C en réacteur agité double enveloppe de 250mL. La charge plante/solvant est fixée à 13,2/250,0 g soit un rapport massique plante/solvant de 5/95 %. La plante est introduite dans



le réacteur lorsque le solvant d'extraction est à la température de consigne et l'extraction est maintenue pendant 3h. Après extraction, tous les extraits bruts sont traités selon le même protocole défini lors de la mise en œuvre du solvant le plus visqueux : FGE122. La séparation solide/liquide est effectuée par une filtration sur une toile de nylon (maille  $\approx 100 \mu\text{m}$ ). Le filtrat est ensuite centrifugé afin d'éliminer les particules fines de végétal et de récupérer le surnageant. Le surnageant est alors filtré dans un carter de filtration frontale à une pression de 2 bars et une température de  $60^\circ\text{C}$  sur plaques de cellulose ( $12\text{--}5 \mu\text{m}$  et  $3\text{--}1,5 \mu\text{m}$ ) puis sur une membrane en acétate de cellulose (seuil de coupure =  $0,2 \mu\text{m}$ ). Le diamètre des médias filtrants est fixé à 140 mm afin de n'utiliser qu'une seule plaque par grade. La détermination de la quantité de filtrat finale, notée  $Q_{\text{filtrat}}$ , permet de déterminer le rendement de fabrication noté  $R$ , selon la formule (1) :

$$R (\%) = \frac{Q_{\text{filtrat}}}{Q_{\text{plante}} + Q_{\text{solvant}}} * 100 \quad (1)$$

Après homogénéisation du filtrat, un prélèvement de 10g est effectué pour chaque extrait et transmis pour analyse. La quantité d'extrait restante est répartie dans 3 flacons en verre de 30 mL afin de réaliser l'étude de stabilité à trois températures (4, 25 et  $40^\circ\text{C}$ ) à l'abri de la lumière.

#### 4. Analyse des stilbénoides par HPLC et suivi de stabilité

La recherche et la quantification du picéïde et du resvératrol est réalisée par analyse HPLC sur une colonne Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100mm x 3mm x  $2,7\mu\text{m}$ ). Le solvant d'éluion est composé d'eau et d'acétonitrile. La température est fixée à  $50^\circ\text{C}$  et le flux à 0,6 mL/min. Un détecteur UV-DAD est utilisé et la quantification est réalisée à 306nm au moyen de droites d'étalonnage obtenues avec les molécules étalons (Extrasynthèse). Les teneurs sont exprimées en mg/100mL. Concernant le suivi dans le temps de la teneur en stilbènes, des prélèvements pour dosage sont effectués à intervalles réguliers et après homogénéisation des flacons placés aux trois températures.

#### 5. Détermination de l'efficacité anti-oxydante

L'activité antioxydante, plus particulièrement anti-radicalaire, est déterminée selon la méthode du 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Le DPPH obtenu chez Sigma-Aldrich est incubé à température ambiante en absence (non-traité) ou avec des concentrations croissantes du produit à évaluer (0,025 % ; 0,05 % ; 0,1 %). Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance ou densité optique (DO) est enregistrée à 518 nm au spectrophotomètre UV (Tecan, Infinite M1000). Les contrôles solvants sont effectués dans les mêmes conditions. Une solution sans DPPH est également préparée afin de réaliser le contrôle à blanc de la manipulation. Deux témoins positifs

sont utilisés afin de valider le test (L-cystéine à 5 µg/mL et acide ascorbique à 50 µM). Ces deux témoins sont également approvisionnés via Sigma-Aldrich. L'activité anti-radicalaire ou *Radical Scavenging Activity (RSA)* est calculée selon la formule (2).

$$RSA (\%) = 100 - [ ((DO_{produit} - DO_{blanc}) / (DO_{non\ traité} - DO_{blanc})) * 100 ] \quad (2)$$

## 6. Suivi en stabilité

L'étude de stabilité des 10 extraits a été suivie dans des flacons en verre de 30 mL pendant 1 an à trois températures : 4, 25 et 40°C. Les flacons ont été recouverts de papier aluminium pour les protéger de la lumière lors des manipulations. Les concentrations en picéide et resvératrol ont été quantifiés par HPLC à intervalles réguliers (1, 3, 6, 9 et 12 mois). Les concentrations en traceurs obtenues lors de chacun des points de mesure ( $C_t$ ) ont été exprimés en pourcentage de la valeur obtenue à  $t_0$  ( $C_0$ ). Un examen visuel a été réalisé avant chaque prélèvement pour repérer des changements d'aspects (dépôt, opalescence ou développement microbien). Des photographies ont également été réalisées afin de suivre l'évolution de la couleur des extraits.

### IV.4.2.2 Résultats et discussion

#### 1. Rendements de fabrication et aspects procédés

Le rendement de fabrication d'un extrait est le premier indicateur qui permet de comparer les essais entre eux. Les valeurs obtenues sont représentées sur la figure IV.16. De façon prévisible, on observe sur ce graphique que les rendements de fabrication sont directement liés à la quantité d'eau (bandeau bleu) et donc à la viscosité (étiquettes noires).

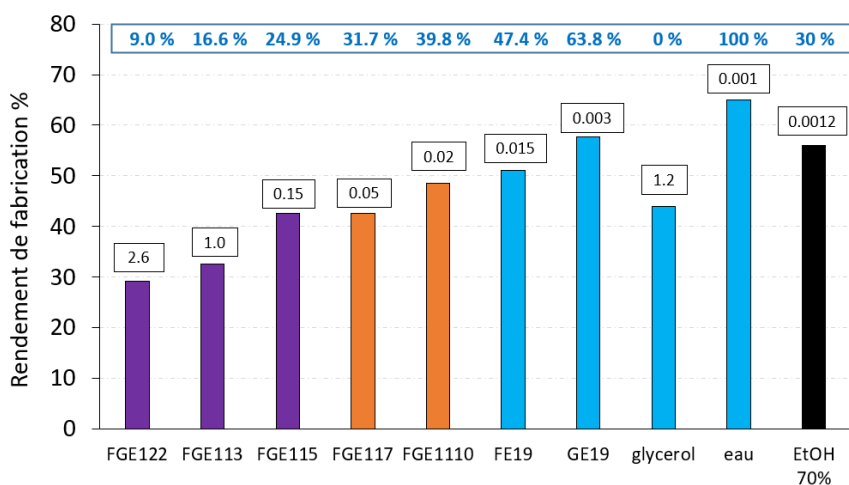


Figure IV.16 Rendements de fabrication en fonction du solvant. Le bandeau bleu indique les teneurs en eau (% m/m). Les valeurs de viscosité (en Pa.s) sont indiquées dans les étiquettes au-dessus des données.

La quantité d'eau impacte significativement les rendements de fabrication qui se situent entre 29% pour FGE122 et 65% pour l'eau. Il est admis dans la littérature que l'augmentation de la teneur en eau permet de diminuer considérablement la viscosité et la densité de mélanges supramoléculaires [35]. Nous l'avons également démontré lors de la caractérisation des solvants FGE (Chapitre II). Ainsi, moins la proportion d'eau est importante, plus le solvant est visqueux et dense. Il en résulte un rendement de fabrication faible comme obtenu ici avec les mélanges FGE122 et FGE113. Hormis pour le glycérol, les rendements obtenus avec les autres solvants témoins sont compris entre 50 et 70%, ce qui est en accord avec leur faible viscosité. Enfin, l'essai d'extraction au glycérol conduit à  $R = 44\%$ , du même ordre de grandeur que celui obtenu pour FGE115. Toutefois, le protocole standardisé suivi pour cette comparaison a été établi à partir du cas le plus limitant : FGE122. Ainsi, les surfaces de filtration et les grades de plaques ne sont pas optimisés pour les autres solvants. Les valeurs obtenues sont par conséquent sous évaluées. A titre d'exemple, le rendement obtenu lors de l'extraction avec le solvant FGE115 est de 43% ici alors qu'il se situe généralement entre 60 et 70% pour un procédé optimisé à l'échelle industrielle.

Néanmoins, ce graphique permet de démontrer que, dans ces conditions, les solvants FGE122 et FGE113 ne sont pas industrialisables ( $R < 35\%$ ). Le mélange FGE115 représente le seul mélange *NaLTTM* compatible avec les exigences d'industrialisation. Parallèlement, le résultat obtenu avec le glycérol semble indiquer que ce solvant pourrait être envisagé industriellement.

## 2. Performance d'extraction des stilbénoides

Les teneurs en picéide et en resvératrol quantifiées par HPLC pour les différents extraits sont reportées sur la figure IV.17.

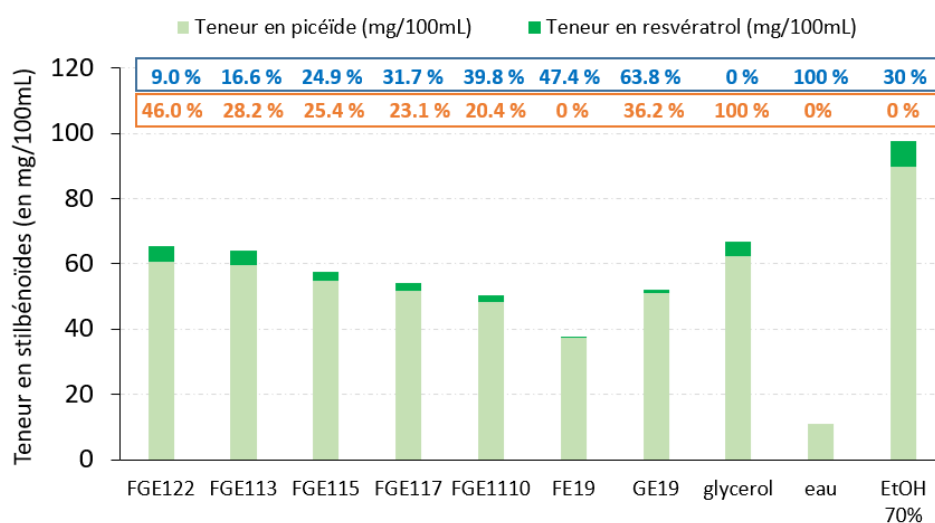


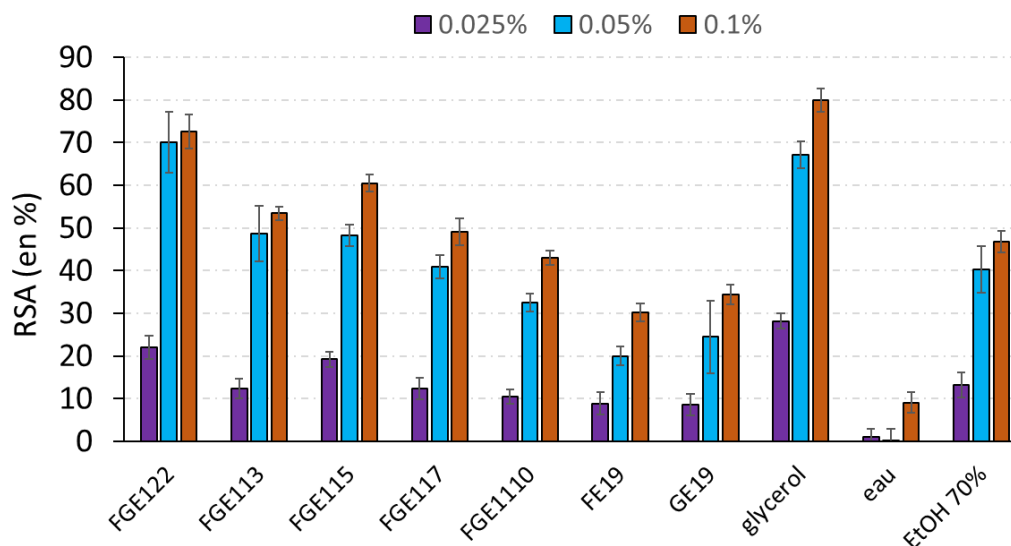
Figure IV.17 Représentation graphique des teneurs en stilbénoides quantifiées par HPLC. Les bandeaux bleu et orange indiquent respectivement les teneurs en eau et en glycérol (% m/m)

Ce graphique montre que les concentrations en picéïde (vert clair) sont nettement supérieures à celles en resvératrol (vert foncé). Cette observation est cohérente avec le rôle de ces composés dans la nature. En effet, le resvératrol est une phytoalexine qui présente une toxicité pour la plante elle-même. Les voies de synthèses biochimiques permettent donc son stockage sous forme de picéïde, équivalent glycosylé et moins toxique. En cas de stress ou d'attaque extérieure, une enzyme va convertir le picéïde en resvératrol et permettre à la plante de le libérer. Sur la figure IV.17, on remarque également que l'eau est un solvant peu efficace pour l'extraction des stilbénoides à l'inverse du mélange EtOH70 qui présente la meilleure efficacité d'extraction. C'est le glycérol qui présente la seconde meilleure performance d'extraction suivi de près par le mélange FGE122. En ce qui concerne les solvants à base de FGE, il apparaît que plus la teneur en eau augmente (bandeau bleu) et plus les teneurs en stilbénoides diminuent. Autrement dit, plus la teneur en glycérol augmente (bandeau orange) et plus les teneurs en stilbénoides augmentent. Ces résultats corrént directement la teneur en glycérol et la performance d'extraction des stilbénoides. Une conclusion similaire est rapportée par Alishlah *et al.* dans le cas de l'extraction d'oxyresvératrol dans les racines de *Morus alba* par des *NaDES* à base d'urée et de glycérol (ratio 1:1 ; 1:2 et 1:3 mol) <sup>[34]</sup>. Les auteurs ont décrit des concentrations en oxyresvératrol croissantes avec la proportion en glycérol, la combinaison 1:3 étant la plus efficace.

Les essais d'extraction de racines de *P. cuspidatum* par des systèmes FGE indiquent que les 3 combinaisons *NaLTTM* (FGE122, FGE113 et FGE115) présentent des capacités d'extraction plus importantes que les mélanges non *NaLTTM* (FGE117, FGE1110, FE19 et GE19). Cependant, l'ensemble des résultats démontrent que les teneurs en glycérol et en eau sont nettement plus impactantes sur la capacité d'extraction que la structure supramoléculaire du solvant. De plus, les extractions sont réalisées à 70°C, température pour laquelle nous avons vu que la structuration de FGE115 n'est plus identifiable par RMN. Finalement, ces essais suggèrent que la capacité d'extraction d'un solvant *LTTM* est directement reliée à la nature et à la proportion des molécules qui le composent plutôt qu'à la structure supramoléculaire qui le caractérise.

### 3. Activité anti-oxydante des extraits

L'évaluation du potentiel anti-radicalaire par le test DPPH constitue le second critère choisi pour caractériser les extraits de *P. cuspidatum*. Les résultats obtenus pour les 3 doses testées sont regroupés sur la figure IV.18. Les contrôles solvants ne sont pas reportés sur cette figure mais aucun d'eux ne possède un effet anti-radicalaire quantifiable.



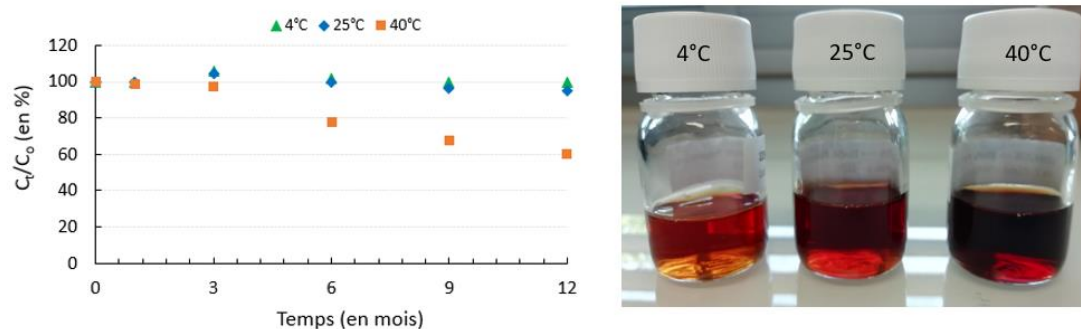
**Figure IV.18** Activité anti-radicalaire (% vs non-traité) des extraits de *P.cuspidatum*

Ce graphique fait apparaître que l'extrait aqueux, le moins riche en stilbénoides, ne présente pas de potentiel anti-oxydant ( $RSA < 10\%$  pour  $C = 0,1\%$ ). Le potentiel anti-oxydant se caractérisant par un effet dose marqué est identifié pour tous les autres extraits. Malgré une teneur en traceurs nettement supérieure à celles des autres extraits, l'extrait hydro éthanolique ne conduit pas à la meilleure activité anti-radicalaire. Au contraire, c'est l'extrait en glycérol qui présente la plus haute valeur de  $RSA$ , l'extrait FGE122 étant relativement proche. Il apparaît également que l'extrait en FGE115 se distingue des autres extraits à base de FGE. Son activité anti-radicalaire est inférieure à celle de FGE122 mais supérieure à tous les autres extraits. De plus, la valeur de  $RSA$  obtenue est nettement supérieure à celle de l'extrait hydro-éthanolique en dépit d'une concentration en stilbénoides 40% plus faible (Figure IV.17). Ainsi, le potentiel d'activité anti-oxydante ne peut être uniquement relié à la teneur en stilbénoides. Un extrait végétal étant composé de plusieurs dizaines de molécules appartenant à des familles phytochimiques différentes, l'hypothèse d'une synergie entre tous les extractibles semble la plus cohérente.

Finalement, la caractérisation des extraits de *P. cuspidatum* fait apparaître que le glycérol apparaît comme le meilleur solvant pour obtenir une concentration en stilbénoides et une activité anti-radicalaire élevées. Cependant, l'industrialisation d'un tel extrait reste à vérifier même si le rendement de fabrication obtenu au laboratoire permet d'être optimiste. En effet la viscosité du glycérol est élevée, et induira notamment des débits de filtration très (trop ?) faibles à l'échelle industrielle. Parmi les extraits à base de fructose, de glycérol et d'eau, le FGE115 constitue le seul solvant *LTTM* testé présentant une concentration en stilbénoides importante, une activité anti-radicalaire remarquable et des caractéristiques physico-chimiques en adéquation avec sa mise en œuvre industrielle.

#### 4. Stabilité physico-chimique et microbiologique des extraits

L'étude de stabilité des 10 extraits a été suivie pendant 1 an à trois températures : 4, 25 et 40°C. La stabilité chimique peut être discutée par le suivi des concentrations en picéide et resvératrol dans le temps. Les observations visuelles et les photographies réalisées au cours du suivi permettent de discuter la stabilité physique et microbiologique des extraits. A titre d'exemple, la figure IV.19 présente les résultats obtenus pour l'extrait obtenu avec le solvant FGE115.



**Figure IV.19 Suivi de la stabilité chimique en stilbénoides pour l'extrait obtenu en FGE115 et photographie des échantillons après 9 mois de stabilité à 4, 25 et 40°C**

Sur le graphique de la figure IV.19, seule la température de 40°C (carrés oranges) permet d'observer une instabilité chimique des stilbénoides. Aux autres températures, une tendance générale à la diminution semble se dessiner mais compte-tenu de la durée d'observation, nous pouvons considérer que l'extrait est stable à 4 et 25°C. Comme observé classiquement avec les extraits en FGE115, l'instabilité chimique peut donc être limitée par un stockage à froid et à l'abri de la lumière. Cependant, la photographie réalisée après 9 mois de stabilité à 25°C met en évidence un changement de couleur vers des teintes plus foncées comparativement à l'échantillon placé en enceinte à 4°C. Cette observation confirme que l'étude de stabilité d'un extrait végétal liquide est complexe. La représentativité des traceurs majoritaires suivis ne suffit pas ici, comme dans la majorité des cas, à expliquer l'instabilité physique identifiée par un changement de couleur à 25°C. En revanche, il est indiscutable que les processus de dégradation chimique et physique sont accélérés à 40°C. Afin d'obtenir une vision globale des résultats obtenus, le tableau IV.4 regroupant les observations effectuées a été progressivement construit au cours des 12 mois de suivi selon 3 critères : la stabilité chimique (HPLC), la stabilité physique (évaluation à l'œil nu de changement de couleur ou sédimentation) et la stabilité microbiologique (évaluation macroscopique de la croissance microbienne). Une coche verte a été attribuée lorsque l'échantillon est considéré comme stable sur un critère alors qu'une croix rouge est mentionnée lorsqu'une instabilité a été observée. Afin de compléter ce tableau, les valeurs de viscosité des mélanges ont été rapportées.

Solvant	Viscosité (en Pa.s, 20°C)	Stab. chimique			Stab. physique			Stab. bactéri.		
		4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C	4°C	25°C	40°C
FGE122	2,6	✓	✓	✗	✓	✓	✗	✓	✓	✓
Glycérol	1,2	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓
FGE113	1	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✓
FGE115	0,15	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✓
FGE117	0,05	✓	✗	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✓
FGE1110	0,02	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓
FE19	0,015	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓
GE19	0,003	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✓
EtOH 70%	0,0012	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✓	✓
Eau	0,001	✓	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗

**Tableau IV.4 Synthèse des observations effectuées lors du suivi de stabilité après 12 mois**

Le tableau IV.4 fait apparaître qu'aucun extrait végétal liquide n'est stable pour tous les critères pendant 12 mois dans toutes les conditions de suivi. C'est tout à fait normal surtout en conditions accélérées à 40°C. Premièrement, on remarque que seul l'extrait aqueux présente une instabilité microbiologique visible à l'œil nu. Deuxièmement, tous les extraits ont changé de teinte à 40°C mais seul l'extrait hydro éthanolique présente un précipité observable à l'œil nu. Enfin, ce tableau fait apparaître que les solvants *LTTM* présentent une meilleure stabilité que les solvants non *LTTM*. Cette observation peut être directement reliée à la structure supramoléculaire de ces mélanges particuliers qui se caractérisent par une viscosité plus élevée et une teneur en eau libre plus ou moins importante.

#### **IV.4.3 Conclusion intermédiaire et orientations**

Ces essais d'extraction de racine de *Polygonum cuspidatum* ont mis en évidence que l'efficacité d'extraction des stilbénoides par les mélanges FGE est directement reliée à la composition du mélange (teneur en glycérol) plutôt qu'à la structure supramoléculaire. Bien que la teneur en stilbénoides soit nettement inférieure à celle obtenue avec un solvant hydro-éthanolique, le potentiel antioxydant de l'extrait FGE115 est supérieur. Cela est certainement dû à son contenu phytochimique particulier et à la synergie qu'il existe entre les composés extraits. Les données de stabilité collectées démontrent que cet extrait liquide est stable chimiquement pendant 1 an à 4°C et à 25°C. Ce caractère stabilisant peut être relié à sa structure supramoléculaire qui limite les mouvements moléculaires et confère une certaine viscosité à cet extrait. Une relation entre augmentation de la viscosité et amélioration de la stabilité est suggérée par les résultats obtenus pour les extraits en FGE113 et FGE122. Toutefois, l'étude de stabilité d'un extrait végétal est

complexe et résulte d'une multitude de phénomènes concomitants qui empêche de valider ce lien. On note également que le glycérol seul constitue un très bon solvant pour l'extraction des stilbénoides. De plus, c'est l'extrait liquide qui présente la meilleure efficacité anti-oxydante.

Finalement, la nature des constituants et les caractéristiques physico-chimiques du système *NaLTTM* FGE115 sont compatibles avec sa mise en œuvre industrielle dans des procédés répondant aux principes de l'éco-conception et de la chimie verte. Néanmoins, ces extraits supramoléculaires présentent quelques inconvénients pour un usage cosmétique optimal. Le premier point résulte d'une efficacité de conservation antimicrobienne non optimale, selon les exigences de la cosmétique. Pour répondre aux critères d'efficacité les plus exigeants, l'ajout de systèmes conservateurs d'origine végétale en aval de l'étape d'extraction solide/liquide est classiquement réalisé industriellement pour des extraits obtenus avec le solvant FGE115. C'est notamment le cas des extraits FGE115 de fleurs d'*Aesculus hippocastanum* (Gatuline® Link'N'Lift) et de racine de *Whitania somnifera* (EnergiNius™). De plus, les extraits liquides présentent plusieurs inconvénients limitant pour une exploitation industrielle optimale : risque de déversements, nécessité de sécuriser le stockage et le transport, etc. Dans ce contexte, et, suite aux résultats obtenus dans le chapitre III, nous nous sommes orienté vers l'ajout de polysaccharides dans des extraits végétaux obtenus avec le solvant FGE115. L'objectif principal de cette orientation est de discuter l'impact de l'augmentation de la viscosité, voire de la gélification, sur la stabilité globale d'un extrait végétal obtenu avec le solvant FGE115.



## IV.5 Incorporation de polysaccharides dans des extraits végétaux supramoléculaires

### IV.5.1 Introduction

Depuis les premiers essais d'extraction réalisés en 2013, le solvant FGE115 a été utilisé pour extraire des dizaines de matières premières végétales avec plus ou moins de succès. Les plus prometteurs ont fait l'objet d'études plus approfondies conduisant à l'obtention d'actifs cosmétiques exploités industriellement par Gattefossé. La majorité d'entre eux ne présentent pas d'instabilité physico-chimique majeure, comme nous l'avons une nouvelle fois démontré dans la précédente partie de ce chapitre en étudiant l'extraction de *Polygonum cuspidatum*. Néanmoins, ces extraits supramoléculaires liquides présentent quelques inconvénients pour un usage cosmétique optimal (ajout de conservateurs, logistique, etc.). Nous avons mis en évidence que tout extrait végétal liquide présente des sources d'instabilités principalement dues à la mobilité des molécules en solution. Ainsi, l'incorporation de polysaccharides, caractérisés dans le chapitre III, dans des extraits végétaux obtenus avec le *NaLTTM* FGE115 est développée dans cette dernière partie. Cette orientation résulte de l'ensemble des résultats obtenus dans ce manuscrit de thèse et semble prometteuse. Cependant, elle implique de nombreux questionnements et défis techniques à appréhender. Tout d'abord, est-il possible d'incorporer des polysaccharides dans un extrait végétal FGE115 qui contient des centaines de composés phytochimiques ? Quelle sera l'incidence de ces phytomolécules sur les propriétés du gel, si tant est qu'il puisse être obtenu ? Comment vérifier que le contenu phytochimique de l'extrait soit conservé après gélification ? Quel sera l'impact de l'augmentation de la viscosité ou de la gélification sur la stabilité physico-chimique et microbiologique de ces extraits végétaux ?

Pour tenter d'apporter des réponses à ces questions, nous avons étudié la faisabilité d'incorporer des polysaccharides dans deux extraits obtenus avec le solvant FGE115 : l'extrait modèle de racine de *Polygonum cuspidatum* et l'extrait de racine de *Whitania somnifera* (EnergiNius™). Les propriétés rhéologiques, thermiques et mécaniques des mélanges obtenus pourront être comparées à celles caractérisées pour les systèmes FGE115 + polysaccharides. Une attention particulière sera ensuite portée à l'évaluation de la stabilité globale (physico-chimique et microbienne) des systèmes extraits FGE115 + polysaccharides.

## IV.5.2 Matériels et méthodes

### IV.5.2.1 Incorporation de polysaccharides dans des extraits FGE115

Les extraits végétaux liquides FGE115 de *Polygonum cuspidatum* et de *Whitania somnifera* sont préparés selon le protocole standardisé détaillé au § IV.4.2.1. Compte-tenu des conclusions obtenues dans le chapitre III, quatre polysaccharides (agar-agar, alginate de sodium,  $\kappa$ -carraghénane et xanthane) ont été retenus pour ces essais et utilisés aux concentrations massiques présentées dans le tableau IV.5. Les choix effectués résultent d'un compromis entre la facilité de mise en œuvre et les propriétés rhéologiques des solutions viscoélastiques ou des gels obtenus après incorporation de ces polysaccharides dans le solvant FGE115.

Polysaccharide	Concentration
Agar-Agar	1,5%
Alginate Na	1%
$\kappa$ -carraghénane	1%
Xanthane	0,8%

**Tableau IV.5 Polysaccharides et concentrations massiques retenus pour les essais applicatifs**

Après pesée de l'extrait et du polysaccharide selon les proportions choisies, le polysaccharide est introduit très progressivement dans l'extrait liquide sous agitation mécanique à faible vitesse et à température ambiante. Le mélange (extrait + polysaccharide) est ensuite introduit délicatement dans un réacteur en verre double-enveloppe avant d'être chauffé à 80°C pendant 3h sous agitation mécanique. Le produit obtenu est coulé à chaud et réparti dans des piluliers en verre à ouverture totale. Les piluliers sont alors fermés et stockés à température ambiante.

### IV.5.2.2 Suivi de stabilité

Le lendemain de la préparation, les piluliers contenant le mélange extrait + polysaccharide sont répartis dans des étuves réglées à 4, 25 et 40°C pour le suivi de stabilité dans le temps. La stabilité chimique des échantillons est évaluée pendant 12 mois. Le critère retenu est l'évolution de la teneur en composés phytochimiques caractérisée par HPLC. Afin d'améliorer la finesse du suivi de stabilité par rapport à celui réalisé sur les extraits liquides, le suivi de la couleur des échantillons est cette fois réalisé par colorimétrie. Le suivi de la stabilité microbiologique est également amélioré en déterminant l'efficacité de conservation antimicrobienne par la réalisation de challenge-tests (cf. §IV.5.2.7)

### IV.5.2.3 Caractérisation des teneurs en phytomolécules

#### 1. Stilbénoides pour les extraits de *P. cuspidatum*

Les conditions des analyses HPLC décrites au paragraphe § IV.4.2.1 ont été modifiées pour s'adapter à ces échantillons plus ou moins gélifiés. On pèse de 300 à 350 mg d'échantillon dans une fiole jaugée de 10mL. Le volume est ajusté avec un mélange eau MilliQ/acétonitrile 60/40 (v/v). Les fioles sont chauffées à 55°C pendant 1 min puis passées aux ultrasons pendant 1 min avant d'être agitées (vortex) jusqu'à dissolution complète de l'échantillon. Certains échantillons nécessitent de répéter ces opérations en complément d'une agitation manuelle énergique. La solution est ensuite filtrée sur un filtre en PTFE (0,45µm) avant injection en HPLC (4µL). Une colonne Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100mm x 3mm x 2,7µm) est utilisée. Le solvant d'éluion est composé d'eau (+ 0,2% TFA) et d'acétonitrile. La température est fixée à 50°C et le flux à 0,6mL/min. Un détecteur UV-DAD est utilisé et la quantification est réalisée à 306 nm. Les teneurs sont exprimées en mg/100mL. Concernant le suivi dans le temps de la teneur en stilbénoides, des prélèvements pour dosage dans les mêmes conditions sont effectués à intervalles réguliers dans les flacons placés en étuve de stabilité à 4, 25 et 40°C.

#### 2. Acides aminés pour les extraits de *W.somnifera*

Ces extraits végétaux contiennent des acides aminés qui sont quantifiés selon une méthode développée par Waters utilisant un agent de dérivation : le réactif AccQ-Fluor (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate - réf. WAT052880) et les solvants d'éluion suivants : AccQ.Tag Ultra Eluent A utilisé en dilution 5/95 dans l'eau (réf. 186003838) et AccQ.Tag Ultra Eluent B (réf. 186003839). On pèse 1g d'échantillon dans une fiole jaugée de 5mL. Le volume est ajusté avec de l'eau MilliQ. Les fioles sont chauffées à 55°C pendant 1 min puis passées aux ultrasons pendant 1 min avant d'être agitées (vortex) jusqu'à dissolution complète de l'échantillon. Certains échantillons nécessitent de répéter ces opérations en complément d'une agitation manuelle énergique. Dans un tube à essais de petit volume, on dépose 70µL de tampon waters puis 10µL d'échantillon. La solution est homogénéisée au vortex. On ajoute ensuite 20µL d'agent dérivant puis le milieu est homogénéisé. La dérivation est effectuée au bain-marie à 55°C pendant 10 min. Pour les échantillons contenant des polysaccharides, un voile translucide se développe et rend l'injection impossible. La solution est transférée dans un tube de centrifugation Eppendorf et une centrifugation à 13500 rpm est réalisée pendant 3min. L'opération est répétée 1h après dans les mêmes conditions. L'injection de 1µL de surnageant est ensuite réalisée. La température de la colonne est fixée à 55°C et le flux à 0,7mL/min. Un détecteur UV-DAD est utilisé et la quantification est réalisée à 260nm.

Les acides aminés sont identifiés à chaque série d'analyse par l'injection de 10 $\mu$ L du mix Waters dilué dans 960 $\mu$ L d'eau. La dérivation de 10 $\mu$ L de cette solution est effectuée selon le même protocole. La quantification des acides aminés s'effectue avec une solution d'asparagine (à environ exactement à 5mg/10mL d'eau en fiole jaugée puis dilution de 40 $\mu$ L de cette solution dans 960 $\mu$ L d'eau). La dérivation de 10 $\mu$ L de cette solution est effectuée selon le même protocole. Concernant le suivi dans le temps de la teneur en acides aminés, des prélèvements pour dosage dans les mêmes conditions sont effectués à intervalles réguliers dans les flacons placés en étuve de stabilité à 4, 25 et 40°C.

---

#### IV.5.2.4 Caractérisation des propriétés thermiques

Les propriétés thermiques des mélanges extrait + polysaccharide ont été étudiées par DSC avec un appareil DSC-Q22 (TA Instruments) équipé d'un système de refroidissement à l'azote liquide. Les échantillons sont placés dans des capsules hermétiques en aluminium sous flux d'azote (50mL/min) et soumis à trois cycles de température : 1) de -140 à 70°C à 10°C/min ; 2) de 70 à -140°C à 40°C/min ; 3) de -140 à 70°C à 10°C/min. Comparativement à la méthode décrite pour la caractérisation des mélanges FGE (Chapitre II), le cycle de refroidissement est accéléré (40 vs 10°C/min) et la plage de température élargie. La concordance des résultats obtenus entre les deux méthodes a été vérifiée au préalable. La température de transition vitreuse ( $T_g$ ) est déterminée à partir de la deuxième rampe de chauffage en considérant le point médian de la transition thermique.

---

#### IV.5.2.5 Caractérisation des propriétés rhéologiques

Les propriétés rhéologiques des mélanges extrait + polysaccharide ont été déterminées avec un rhéomètre DHR2 (TA instruments). Une géométrie cône/plan (diamètre 40 mm, angle 2°, entrefer 52  $\mu$ m) a été utilisée pour les mesures réalisées à une température de 20°C, laquelle est contrôlée par un plan Peltier. Deux types de mesures ont été réalisées : (i) les mesures de viscosité en écoulement ( $\eta$ ) et (ii) les mesures de propriétés viscoélastiques en oscillation ( $G'$  et  $G''$ ). Toutes les données rhéologiques dynamiques ont été vérifiées en fonction de l'amplitude de déformation pour s'assurer que les mesures soient effectuées dans le domaine linéaire. Typiquement, la déformation appliquée pendant les mesures dynamiques est de 1%.

---

#### IV.5.2.6 Caractérisation de la couleur par colorimétrie

Le modèle colorimétrique choisi est le modèle  $L^*a^*b^*$  dans lequel la clarté ( $L^*$ ) varie entre 0 (noir) et 100 (blanc), le paramètre  $a^*$  représente un axe allant du vert au rouge et le paramètre  $b^*$  variant sur un axe bleu jaune. Les mesures sont réalisées avec un angle de  $10^\circ$  et une illumination D65 correspondant à la lumière du jour normalisée. Certains systèmes étant difficilement manipulables, le suivi de stabilité est directement réalisé dans les cuves de mesures. Ainsi, après coulage des systèmes à  $t_0$ , les cellules sont couvertes de parafilm, insérées dans des piluliers fermés et le tout est placé dans les étuves à 4, 25 et  $40^\circ\text{C}$ .

---

#### IV.5.2.7 Efficacité de la conservation antimicrobienne (*Challenge-tests*)

La mesure de l'efficacité de la conservation antimicrobienne est réalisée selon le protocole de la Pharmacopée Européenne, 10<sup>ème</sup> édition, 2021 (Chapitre 5.1.3: Efficacité de la conservation antimicrobienne, Préparations pour applications locales). Le test consiste à réaliser une préparation de l'extrait avec un inoculum de micro-organismes approprié constitué de trois bactéries et deux levures et moisissures (respectivement *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*), en stockant la préparation à température ambiante, en évitant la lumière du soleil, en retirant des échantillons du conteneur à des intervalles de temps spécifiés et à dénombrer les micro-organismes dans les échantillons ainsi prélevés. L'efficacité de conservation microbienne du produit est performante si, dans les conditions de test, il y a une baisse significative ou aucune augmentation, le cas échéant, du nombre de micro-organismes dans la préparation inoculée après 2, 7, 14 et 28 jours. Dans le cas des bactéries, le dénombrement est réalisé à J0 et après 2, 7, 14 et 28 jours ; dans le cas des levures/moisissures, le dénombrement est réalisé à J0 et après 14 et 28 jours. En fonction de la cinétique de décroissance de la population de chaque souche inoculée, différents critères (A, B) d'efficacité de conservation antimicrobienne sont attribués, le critère A étant le plus exigeant. Le critère B, synonyme d'une très bonne efficacité de conservation antimicrobienne, est suffisant pour mettre un extrait végétal sur le marché. Malgré tout, le critère A est prioritairement plébiscité par les industriels du secteur cosmétique. C'est pourquoi l'ajout d'un système conservateur est nécessaire pour permettre à un extrait répondant seulement aux critères B d'atteindre les critères A d'efficacité du challenge-test.

---

### IV.5.3 Résultats et discussion

---

#### IV.5.3.1 Préparation des mélanges extraits FGE115 + polysaccharides

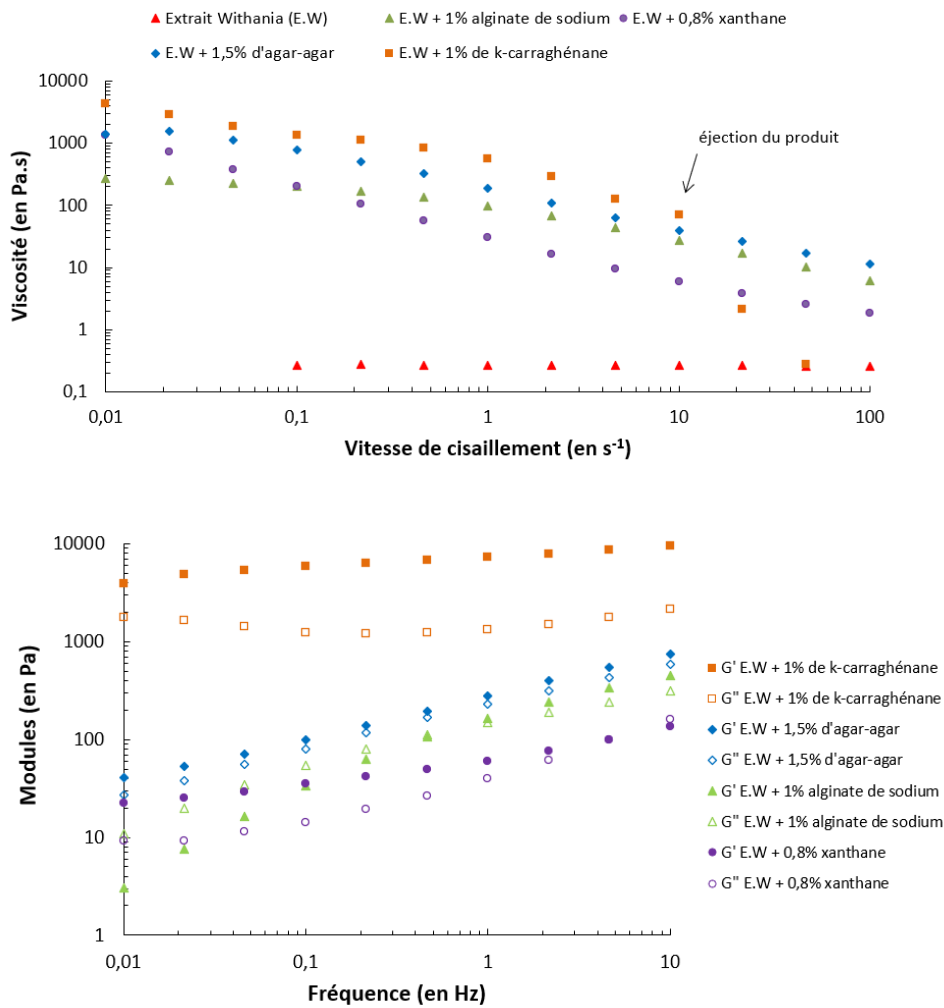
L'incorporation à température ambiante des polysaccharides dans les extraits végétaux obtenus avec le système FGE115 ne pose pas de difficulté particulière. Cela tient principalement au fait que les polysaccharides sélectionnés sont solubles dans le solvant FGE115 seul. De plus, une sélection prudente des concentrations retenues a été réalisée en amont. On observe tout de même des différences de comportement (rapidité de dissolution, gonflement) par rapport à la mise en œuvre dans le solvant FGE115 seul. Ces différences sont directement attribuables à la présence des composés phytochimiques extraits. D'autant plus que les matières premières végétales utilisées sont des racines qui sont connues pour contenir une certaine quantité d'éléments minéraux présents sous forme de sels. Les polysaccharides étant des polyélectrolytes très sensibles à la force ionique du solvant, leur comportement en solution dans un extrait végétal peut varier en fonction de la teneur et du type d'extractibles. Une fois le polysaccharide incorporé, l'étape de mélange réalisée à 80°C pendant 3h nécessite une adaptation de la vitesse d'agitation au cas par cas afin de limiter la création de bulles dans les mélanges. Finalement, des extraits plus ou moins coulants à chaud sont obtenus en fonction du polysaccharide et de la concentration utilisée. Après retour à température ambiante, ces échantillons ont été caractérisés.

---

#### IV.5.3.2 Caractérisation des propriétés rhéologiques et thermiques et mise en forme

L'étude des propriétés rhéologiques des extraits de *W. somnifera* (noté E.W) contenant des polysaccharides a été réalisée avec une géométrie cône/plan à 20°C. Les courbes d'écoulement (entre 0,01 et 100 s<sup>-1</sup>) et les balayages en fréquence (entre 0,01 et 10 Hz) obtenus sont présentés sur la figure IV.20. Sur le premier graphique, on observe tout d'abord que l'extrait liquide de *W. somnifera* présente une viscosité indépendante de la vitesse de cisaillement (triangles rouges). Il s'agit d'un fluide Newtonien dont la viscosité est du même ordre de grandeur que celles obtenues pour le solvant seul ou l'extrait d'*A. hippocastanum* ( $\approx 0,2$  Pa.s). Indépendamment du polysaccharide utilisé, la viscosité des autres systèmes diminue avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement mettant en évidence le caractère rhéofluidifiant de ces échantillons. Les valeurs de viscosité mesurées à faible taux de cisaillement pour les systèmes contenant un polysaccharide sont comprises entre 275 et 4300 Pa.s. Ainsi, l'ajout d'une faible quantité de polysaccharide (ici entre 0,8 et 1,5% m/m) permet d'augmenter de manière significative la viscosité de l'extrait liquide. Enfin, la courbe d'écoulement obtenue sur l'extrait gélifié par 1%

(m/m) de  $\kappa$ -carraghénane présente une cassure brutale à  $10 \text{ s}^{-1}$ . Ce phénomène n'est pas dû à une diminution brutale de la viscosité mais à l'éjection du produit de la géométrie.



**Figure IV.20** Influence de la nature du polysaccharide sur les propriétés rhéologiques des échantillons obtenus après incorporation de polysaccharides dans un extrait FGE115 de *Whitania somnifera*

Le second graphique de la figure IV.20 rapporte la dépendance des modules élastiques  $G'$  (symboles pleins) et des modules visqueux  $G''$  (symboles vides) en fonction de la fréquence. L'extrait liquide étant un fluide Newtonien de faible viscosité, il possède des modules viscoélastique très faibles ne pouvant être déterminés par ces analyses. Le résultat obtenu avec l'alginate de sodium (triangles verts) est caractéristique d'un fluide viscoélastique. Le module  $G'$  est supérieur à  $G''$  à haute fréquence mais  $G''$  devient supérieur à  $G'$  à basse fréquence. Cela explique pourquoi l'extrait obtenu après addition de 1% d'alginate de sodium ne s'écoule pas spontanément ( $G' > G''$ ) mais fini par s'écouler après un certain temps d'observation (relaxation du système).

L'évolution des modules du produit contenant la gomme xanthane (ronds violets) est équivalente à celle obtenue lors de l'ajout de xanthane dans le solvant FGE115. A basse fréquence,  $G'$  est tout d'abord supérieur à  $G''$ . Les valeurs des modules se rapprochent en augmentant la fréquence jusqu'à se croiser à 10 Hz. En ce qui concerne l'extrait contenant de l'agar-agar (losanges bleus),  $G'$  reste légèrement supérieur à  $G''$  sur toute la gamme de fréquence. Les valeurs des modules dépendent de la fréquence et suivent une loi de puissance en 0,4. Il peut donc s'agir d'un gel physique « faible ». Enfin, dans le cas de l'ajout de 1% (m/m) de  $\kappa$ -carraghénane (carrés oranges), les modules sont très peu dépendants de la fréquence et le module élastique  $G'$  est nettement supérieur au module visqueux  $G''$ . Il s'agit donc bien d'un gel physique, comme nous l'avons détaillé dans le chapitre III pour les systèmes FGE115 et  $\kappa$ -carraghénane. Il apparaît par conséquent que les propriétés rhéologiques des systèmes extrait + polysaccharide sont très proches de celles des systèmes solvant + polysaccharide.

Les propriétés thermiques de ces échantillons ont ensuite été déterminées et comparées à celles des extraits liquides par DSC entre -140 et 30°C. Les valeurs de  $T_g$  obtenues sont regroupées dans le tableau IV.6.

		Extrait liquide	Extrait + 1.5% d'agar-agar	Extrait + 1% de $\kappa$ -carraghénane	Extrait + 1% d'alginate Na	Extrait + 0.8% de xanthane
Extraits de <i>W.somnifera</i>	$T_g$ (en °C)	- 80	- 78	- 78	- 79	- 78
Extraits de <i>P.cuspidatum</i>	$T_g$ (en °C)	- 81	- 80	- 80	- 80	- 78

**Tableau IV.6 Températures de transition vitreuses ( $T_g$ ) obtenues par DSC pour 2 extraits liquides en FGE115 et 8 extraits dans lesquels des polysaccharides ont été ajoutés**

On observe tout d'abord que les résultats obtenus sur les extraits liquides confortent le résultat préliminaire indiqué pour l'extrait en FGE115 d'*A. hippocastanum* (figure IV.12). En ce qui concerne les extraits dans lesquels des polysaccharides ont été ajoutés, la signature thermique du solvant est également retrouvée avec des  $T_g$  comprises entre -78 et -80°C. Ainsi, et dans la limite des faibles quantités de polysaccharides mises en œuvre ici, ces mesures mettent en évidence que les mélanges extrait + polysaccharide obtenus possèdent des propriétés thermiques semblables à celles du solvant et des extraits liquides. La présence des extractibles et des polysaccharides ne présente pas d'impact significatif sur les propriétés thermiques des systèmes extrait + polysaccharide.



En conclusion, nous venons de démontrer que l'ajout de faibles quantités de polysaccharide dans un extrait végétal obtenu avec le solvant FGE115 est réalisable. Le procédé de préparation retenu (agitation et chauffage) est industrialisable et complètement en accord avec les principes de la chimie verte puisque ces produits ne nécessitent pas de traitement supplémentaire. L'incorporation de polysaccharides permet en outre d'augmenter de façon significative la viscosité et de modifier les propriétés rhéologiques d'un extrait liquide. Dans certains cas, des solutions viscoélastiques ne s'écoulant pas spontanément sont obtenues comme avec l'alginate de sodium ou le xanthane. Dans d'autres cas, des gels physiques peuvent être obtenus ( $\kappa$ -carraghénane et agar-agar). Ces travaux démontrent par conséquent que l'ajout de polysaccharides non modifiés chimiquement peut permettre de moduler à façon les propriétés rhéologiques des extraits végétaux en FGE115. Enfin, les propriétés thermiques des systèmes extrait + polysaccharide sont semblables à celles du solvant FGE115, à savoir une unique  $T_g$  aux environs de  $-80^\circ\text{C}$ . Suite à ce constat, nous avons exploré la possibilité de mettre en forme des extraits gélifiés en utilisant le  $\kappa$ -carraghénane et l'alginate de sodium en combinaison avec du calcium. La figure IV.21 présente les premiers résultats obtenus.



**Figure IV.21 Illustration de mises en forme des extraits supramoléculaires gélifiés**

La première illustration, noté A, concerne différentes mises en forme réalisées pour un extrait de *W. somnifera* après incorporation de 2% (m/m) de  $\kappa$ -carraghénane. Le deuxième exemple, noté B, démontre la faisabilité de réaliser des billes rondes et de tailles homogènes à partir du même extrait. Ces billes ont été obtenues en reproduisant les travaux détaillés dans le chapitre III lors de l'étude de la gélification de FGE115 par l'alginate de sodium (mécanisme en deux étapes nécessitant la présence de calcium). A travers ces exemples, on s'aperçoit que l'incorporation de polysaccharide permet de modifier à façon la forme physique d'un extrait FGE115. Cette perspective constitue une voie intéressante pour s'affranchir des inconvénients que présente la forme liquide dans des applications industrielles mais également de proposer une certaine originalité dans la mise en forme d'un extrait. Toutefois, il est nécessaire de vérifier l'impact de l'ajout d'un polysaccharide sur l'intégrité du contenu phytochimique de l'extrait.

### IV.5.3.3 Impact du procédé sur le contenu phytochimique et étude de stabilité

Lors de l'évaluation des performances d'extraction des stilbénoides par des systèmes FGE (§IV.2), nous avons vu que les observations réalisées suggère une relation entre l'augmentation de la viscosité et l'amélioration de la stabilité d'un extrait végétal liquide. Afin de compléter la discussion, les systèmes extraits + polysaccharides ont également été suivis en stabilité pendant 1 an. Afin d'améliorer la finesse du suivi de stabilité par rapport à celui réalisé sur les extraits liquides, le suivi de la couleur des échantillons est cette fois réalisé par colorimétrie ( $L^*a^*b^*$ ). Le suivi de la stabilité microbiologique est également amélioré en réalisant des challenge-tests. Finalement, cette seconde étude de stabilité est conduite pour deux extraits liquides en FGE115 de *P. cuspidatum* et de *W. somnifera* et les systèmes avec polysaccharides (agar-agar (1,5% m/m),  $\kappa$ -carraghénane (1% m/m), alginate de sodium (1% m/m) et gomme xanthane (0,8% m/m)). Dans le cas de *W. somnifera*, un extrait avec conservateurs est également suivi en stabilité afin de se comparer au produit fabriqué industriellement par Gattefossé. Des photographies réalisées juste après la préparation des échantillons sont regroupées sur la figure IV.22.

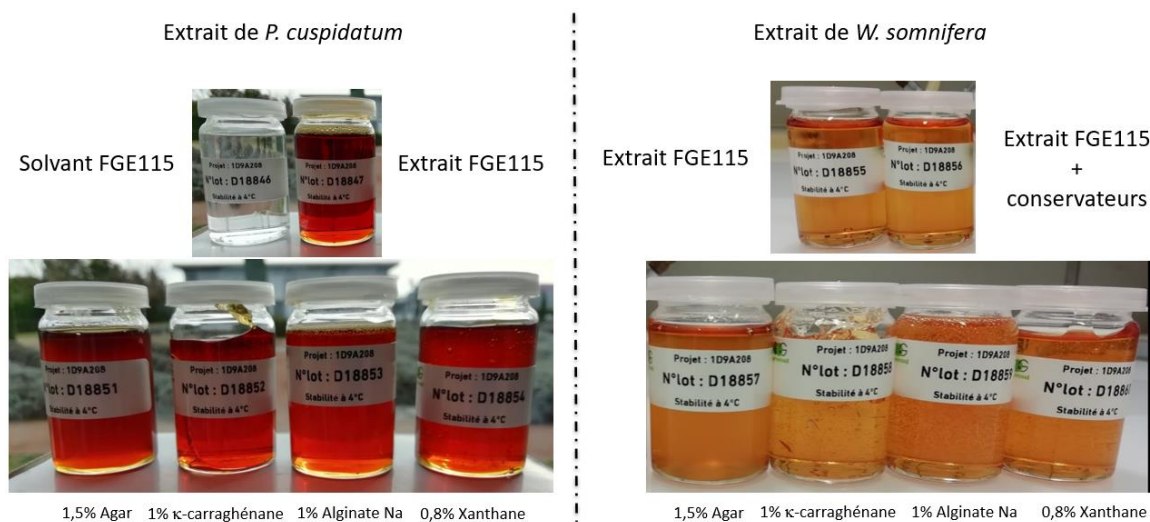


Figure IV.22 Photographies des échantillons intégrés dans ce suivi de stabilité

Concernant la stabilité chimique, la première étape consistait à mettre au point les méthodes d'analyses décrites dans la partie Matériels et Méthodes (§ IV.5.2.3). Pour ce faire, nous avons déterminé les taux de recouvrement en composés phytochimiques après incorporation des polysaccharides. Les résultats sont présentés dans le tableau IV.7.

		Extrait liquide	Extrait + 1.5% d'agar-agar	Extrait + 1% de $\kappa$ -carraghénane	Extrait + 1% d'alginate Na	Extrait + 0.8% de xanthane
Extraits de <i>W.somnifera</i>	Teneur en acides aminés (en ppm)	363	347	352	354	366
	Taux de recouvrement	100%	95%	97%	98%	101%
Extraits de <i>P.cuspidatum</i>	Teneur en stilbénoides (en mg/100mL)	53	52	53	53	54
	Taux de recouvrement	100%	98%	100%	100%	102%

Tableau IV.7 Taux de recouvrement en traceurs après incorporation de polysaccharides

Le tableau IV.7 fait apparaître que les taux de recouvrement en traceurs sont tous supérieurs à 95% quel que soit le polysaccharide ajouté dans les deux extraits étudiés. Ces résultats indiquent que le procédé d'incorporation de polysaccharide permet de conserver le contenu en traceurs phytochimiques initialement présents dans l'extrait liquide. Cette démonstration faite, le suivi de la stabilité chimique a été engagée à 3 températures (4, 25 et 40°C). Seuls les résultats à 40°C seront discutés ici puisque tous les systèmes présentent une bonne stabilité à 4 et 25°C. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus à ces températures sur les extraits liquides. Les résultats obtenus à 40°C sont présentés en figure IV.23.

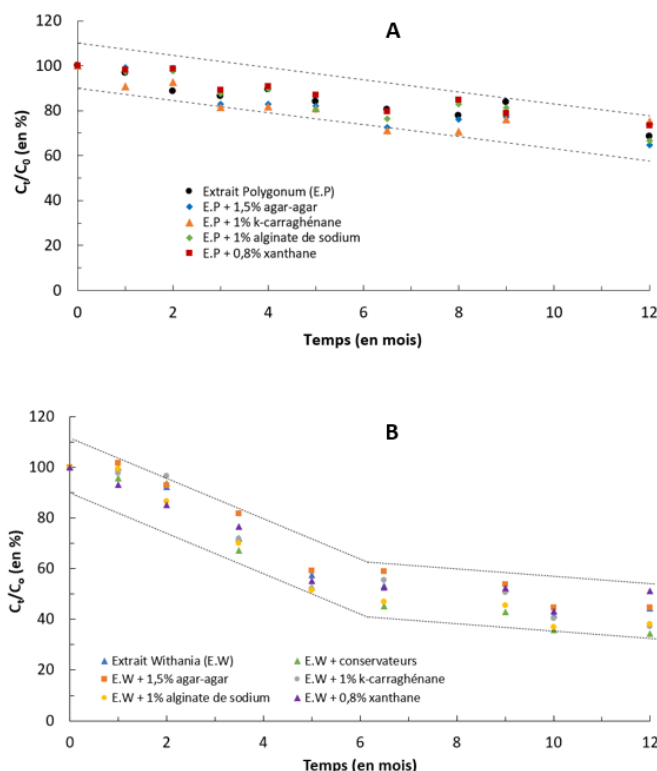


Figure IV.23 Suivi de stabilité chimique par quantification HPLC du picéide dans des extraits de *P.cuspidatum* avec ou sans polysaccharides (A) et des acides aminés dans des extraits de *W.somnifera* avec ou sans polysaccharides (B)

En fonction du type d'extrait, des comportements différents sont observés. Dans le cas des extraits de *P. cuspidatum*, une diminution progressive de la teneur en picéïde est observée jusqu'à atteindre environ 80% de la teneur initiale après un an. La stabilité peut être considérée équivalente pour tous les systèmes étudiés ( $\pm 10\%$ ). Pour les extraits de *W. somnifera*, une première diminution forte de la teneur en acides aminés est observée pendant 6 mois. Cette diminution est moins marquée lors du second semestre de suivi. Cette inflexion a pu être reliée à la dégradation de l'acide aminé majoritaire présent dans l'extrait : l'arginine. En effet, après 6 mois de stabilité à 40°C, la teneur en arginine est quasiment nulle. En conclusion, ce suivi de stabilité démontre que l'incorporation de polysaccharides dans les extraits étudiés présente peu d'impact sur la stabilité chimique des composés phytochimiques suivis. Ces résultats permettent d'affirmer que l'augmentation de la viscosité, voire la gélification, n'améliore pas la stabilité chimique d'un extrait végétal supramoléculaire en conditions accélérées. Ainsi, et indépendamment de la forme physique de l'extrait, un stockage à 4°C reste la voie à privilégier pour garantir une parfaite stabilité chimique supérieure à 1 an.

Comme indiqué précédemment, le suivi de stabilité physique est discuté par des mesures colorimétriques ( $L^*a^*b^*$ ) réalisées à différents intervalles sur la période de suivi de stabilité. Le tableau IV.8 présente les résultats obtenus pour les extraits de *P. cuspidatum*.

N°lot et T°C	SYSTEME	1,5 mois	2 mois	3 mois	5,5 mois	6,5 mois	12 mois
D18847SV4	D18847 Extrait FGE115 Polygonum						
D18847SV25							
D18847SV40							
D18851SV4	D18851 D18847 + 1,5% Agar						
D18851SV25							
D18851SV40							
D18852SV4	D18852 D18847 + 1,0% K-Carraghénane						
D18852SV25							
D18852SV40							
D18853SV4	D18853 D18847 + 1,0% Alginate de sodium						
D18853SV25							
D18853SV40							
D18854SV4	D18854 D18847 + 0,8% Gomme Xanthane						
D18854SV25							
D18854SV40							

Tableau IV.8 Suivi de la variation de couleur des extraits de *P. cuspidatum* avec ou sans polysaccharides

A partir du tableau IV.8, on observe que le brunissement observé à l'œil nu pour l'extrait liquide (figure IV.19) se produit pour l'ensemble des échantillons. Les variations de teinte sont plus marquées en conditions accélérées (40°C) mais les évolutions de couleur sont très proches à toutes les températures. Une conclusion très similaire est obtenue pour les extraits de *W. somnifera* comme le montre le tableau IV.9.

N°lot et T°C	SYSTEME	1,5 mois	2 mois	3 mois	5,5 mois	6,5 mois	12 mois
D18855SV4	D18855 Extrait FGE115 Withania						
D18855SV25							
D18855SV40							
D18856SV4	D18856 Extrait FGE115 Withania + conservateurs						
D18856SV25							
D18856SV40							
D18857SV4	D18857 D18855 + 1,5% Agar						
D18857SV25							
D18857SV40							
D18858SV4	D18858 D18855 + 1,0% K-Carraghénane						
D18858SV25							
D18858SV40							
D18859SV4	D18859 D18855 + 1,0% Alginate de sodium						
D18859SV25							
D18859SV40							
D18860SV4	D18860 D18855 + 0,8% Gomme Xanthane						
D18860SV25							
D18860SV40							

Tableau IV.9 Suivi de la variation de couleur des extraits de *W. somnifera* avec ou sans polysaccharides

Ces résultats permettent d’affirmer que l’augmentation de la viscosité, voire la gélification, n’améliore pas la stabilité physique d’un extrait végétal supramoléculaire en conditions accélérées. Ainsi, un stockage à 4°C reste la voie à privilégier pour ralentir les changements de couleurs, au moins sur une période de 1 an. On note cependant que l’échantillon liquide contenant des conservateurs présente des cristaux après un an de stockage à 4°C. Ce phénomène n’étant pas visible sur l’extrait liquide sans conservateurs, il semble associé au système conservateur lui-même. Ces cristaux disparaissent après un léger chauffage, indiquant qu’il s’agit probablement d’une limite de solubilité de ce système conservateur à basse température.

La troisième partie de cette étude de stabilité concerne l’étude de l’efficacité de la conservation antimicrobienne. Les challenge-tests ont été réalisés par un laboratoire externe et indépendant : Analysis Lab, situé à Brignais. Cette étude s’accompagne d’une mesure préliminaire de la propreté microbiologique des échantillons et des polysaccharides utilisés (à J0). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau IV.10.

	Echantillon	Extrait de <i>W.somnifera</i>	Extrait de <i>W.somnifera</i> + conservateurs	Extrait de <i>W.somnifera</i> + 1,5% d'agar agar	Extrait de <i>W.somnifera</i> + 1% de k-carraghénane	Extrait de <i>W.somnifera</i> + 1% d'alginate de sodium	Extrait de <i>W.somnifera</i> + 0,8% de xanthane	Agar-agar	k-carraghénane	Alginate de sodium	Xanthane
Germes aérobies totaux (UFC/g)	J0	< 10	< 10	< 10	10	< 10	20	270	300	< 10	20
	J2	< 10	< 10	< 10	10	< 10	40	NC	NC	NC	NC
	J7	< 10	< 10	< 10	10	< 10	20	NC	NC	NC	NC
	J14	< 10	< 10	< 10	20	< 10	20	NC	NC	NC	NC
	J28	< 10	< 10	< 10	20	< 10	20	NC	NC	NC	NC
Levures et moisissures (UFC/g)	J0	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	10	10	< 10	10
	J2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	NC	NC	NC	NC
	J7	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	NC	NC	NC	NC
	J14	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	NC	NC	NC	NC
	J28	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	NC	NC	NC	NC

Tableau IV.10 Propreté microbiologique des échantillons suivis en challenge-test et des polysaccharides utilisés

Les résultats présentés dans le tableau IV.10 montrent que même si certains polysaccharides contiennent une charge microbologique détectable à J0 et supérieure à 100 UFC/g, cette dernière ne se retrouve pas dans les extraits gélifiés à t0 qui sont tous conformes aux critères de propreté microbologique des ingrédients cosmétiques (< 100 UFC/g) après incorporation de polysaccharides. De plus, cette propreté microbologique demeure stable et conforme pendant 28 jours à température ambiante pour tous les échantillons d'extraits. Les résultats de l'étude de l'efficacité de la conservation antimicrobienne sont reportés dans les graphiques 1 à 6 de la figure IV.24.

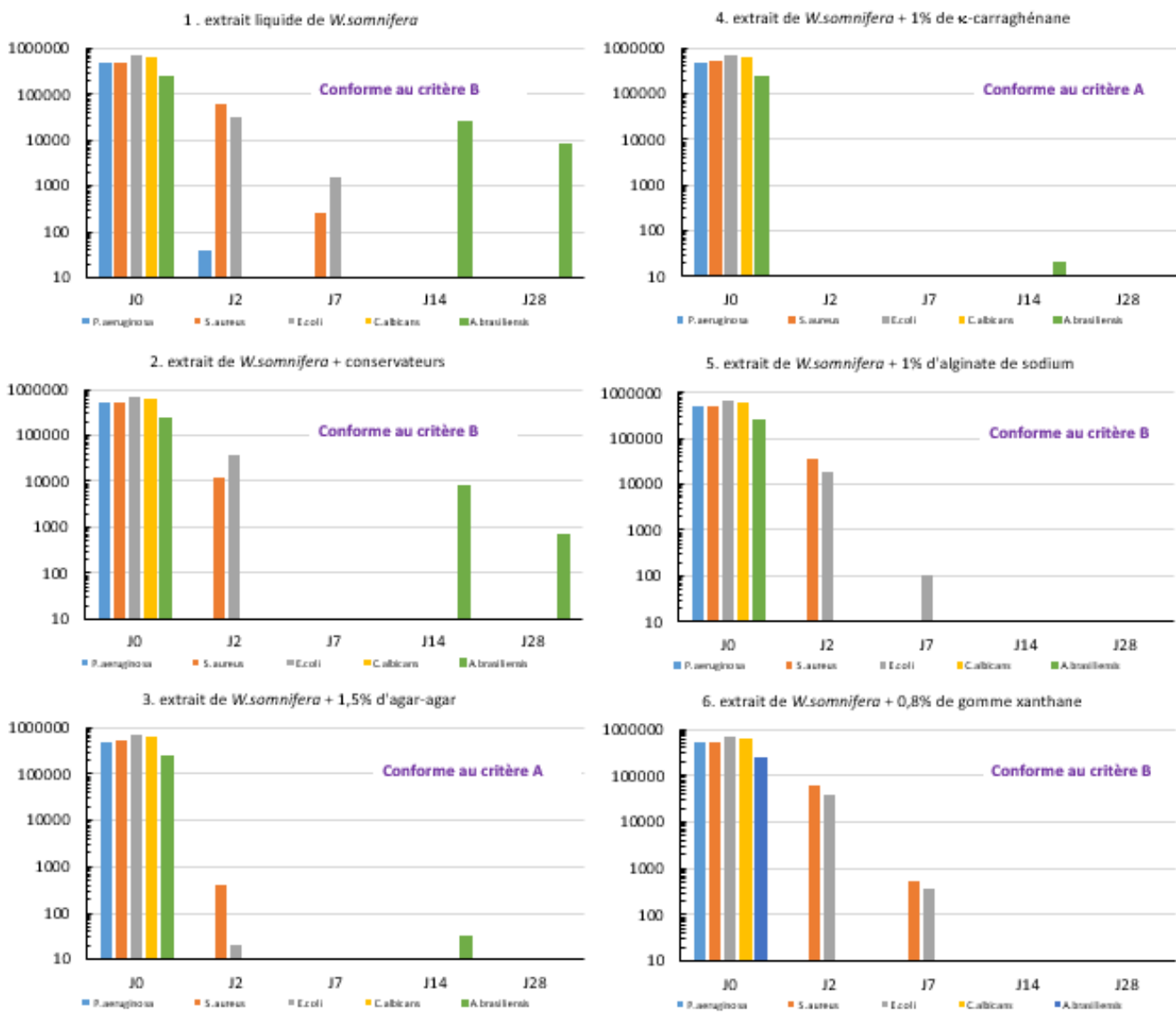


Figure IV.24 Résultats de l'étude de l'efficacité de la conservation antimicrobienne (challenge-test) réalisée sur les extraits gélifiés et non gélifiés de *Withania somnifera*

Ces challenge-tests attestent d'une bonne efficacité de la conservation antimicrobienne. On remarque que l'extrait liquide avec conservateurs (graphique 2) présente une meilleure efficacité que l'extrait seul (graphique 1). Cependant, l'ajout de conservateurs dans cet extrait ne permet pas de répondre favorablement aux critères A de la Pharmacopée Européenne. Une performance équivalente est obtenue pour 2 systèmes gélifiants : l'alginate de sodium (graphique 5) et la gomme xanthane (graphique 6). Ce point est très intéressant dans un contexte cosmétique où l'emploi de conservateurs est de plus en plus limité. De manière encore plus intéressante, les deux autres systèmes gélifiants : agar-agar (graphique 3) et  $\kappa$ -carraghénane (graphique 4) présentent quant à eux une efficacité de conservation antimicrobienne supérieure. Ces extraits gélifiés sont conformes aux critères A de la Pharmacopée Européenne, le plus exigeant et le plus sollicité par les industriels du secteur cosmétique. Ce résultat n'avait jamais pu être atteint pour un extrait liquide de *W. somnifera* en utilisant les systèmes conservateurs d'origine végétale autorisés par les réglementations cosmétiques ainsi que par le référentiel de certification BIO Cosmos. Ces travaux démontrent que l'ajout de polysaccharides peut être une alternative à l'emploi de conservateurs. Dans certain cas, la gélification peut également permettre d'améliorer la propreté et la stabilité microbiologique d'extraits végétaux supramoléculaires sans avoir recours à une étape de stérilisation. Cet effet positif est d'autant plus marqué lorsque le système possède les propriétés rhéologiques d'un gel. Sachant que l'agar-agar et le  $\kappa$ -carraghénane ne sont pas des polysaccharides connus pour leur propriétés anti-microbienne (contrairement au chitosane par exemple), il semblerait que ce soit la structuration sous forme de gel qui apporte ce pouvoir anti-microbien supérieur à celui de l'extrait liquide. La forme gélifiée permet en effet de diminuer la mobilité et la diffusion des molécules au sein du gel. Ainsi, l'eau potentiellement disponible pour le développement microbien est, d'une part en interaction avec les autres composés du mélange FGE et d'autre part, piégée par la structuration du gel. Cela vient s'ajouter au fait que les extraits gélifiés sont obtenus après une étape de chauffage (3h à 80°C) qui contribue certainement à la diminution de la charge microbiologique constatée dans le polysaccharide sous forme de poudre (cf. Tableau IV.10). Ce constat nous a amené à initier la caractérisation des propriétés mécaniques et de la microstructure d'un extrait gélifié par le  $\kappa$ -carraghénane comme nous l'avons réalisé pour les matériaux obtenus en associant ce polysaccharide avec le système FGE115 [36].

## IV.5.4 Compléments de caractérisation d'un extrait gélifié par le $\kappa$ -carraghénane

### IV.5.4.1 Préparation des échantillons et méthodes d'analyses

- Protocole de préparation

L'extrait végétal liquide FGE115 de *Whitania somnifera* est préparé selon le protocole détaillé au § IV.4.2.1. Le protocole de préparation décrit pour préparer des échantillons cylindriques [36] est utilisé pour ajouter le  $\kappa$ -carraghénane dans l'extrait de *W. somnifera*. Le polysaccharide est progressivement incorporé dans l'extrait liquide sous agitation mécanique à faible vitesse et à  $T_{amb}$ . Trois concentrations massiques sont étudiées : 1, 2 et 3% (m/m). Les mélanges (extrait + polysaccharide) sont transférés délicatement dans un récipient cylindrique. Ce dernier est introduit dans une étuve chauffée à 80°C pendant 3h. Après refroidissement, des échantillons cylindriques gélifiés sont obtenus. La même procédure est appliquée avec le solvant FGE115 seul pour préparer un échantillon comparatif à 2% (m/m).

- Analyses élémentaires par ICP-AES

L'analyse élémentaire de l'extrait de *W. somnifera* a été sous-traitée au laboratoire Filab et déterminée par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry) selon une méthode interne.

- Analyse par diffusion des rayons X à petits angles (SAXS)

Cette analyse a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre III (cf. partie III.4.2.3 – SAXS).

- Tests de compression

Cette analyse a été réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre III (cf. partie III.4.2.3 – Compression tests).



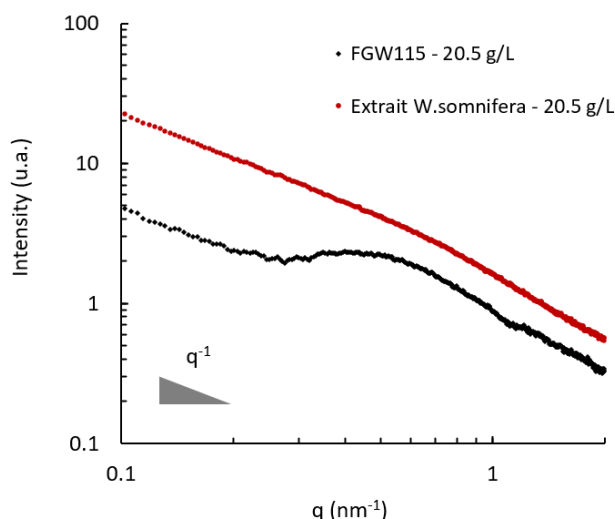
## IV.5.4.2 Résultats

Des préparations d'échantillons sous forme cylindrique d'extrait de *W. somnifera* gélifié par le  $\kappa$ -carraghénane ont été réalisées afin d'initier la caractérisation des propriétés mécaniques et de la microstructure d'un extrait gélifié. La première étape du protocole de préparation consiste en l'incorporation progressive du polysaccharide dans l'extrait sous agitation mécanique. Ces préparations ont confirmé que le polysaccharide semble plus facile à disperser dans l'extrait que dans le solvant FGE115 seul. Ainsi, une concentration de 3% (m/m) de  $\kappa$ -carraghénane a pu être ajoutée dans l'extrait alors que cette concentration n'a pu être atteinte avec le solvant seul. Une analyse élémentaire sous-traitée au laboratoire Filab nous a permis de quantifier les principaux éléments retrouvés dans l'extrait après extraction. Ces données sont comparées aux résultats d'analyse élémentaire obtenus pour le solvant seul dans le tableau IV.11.

Eléments	FGE115	Extrait FGE115 de <i>W. somnifera</i>
Potassium (K)	traces	315 ppm
Soufre (S)	< 2,5 ppm	94 ppm
Sodium (Na)	< 10 ppm	68 ppm
Phosphore (P)	traces	66 ppm
Magnésium (Mg)	traces	40 ppm
Calcium (Ca)	< 10 ppm	26 ppm
Silicium (Si)	traces	2 ppm
Autres	traces	traces

**Tableau IV.11 Résultats d'analyses élémentaires pour le solvant FGE115 et l'extrait de *W. somnifera***

Le tableau IV.11 fait apparaître que le solvant FGE115 ne contient que quelques traces de minéraux certainement issus des procédés de fabrication du fructose et du glycérol. L'extrait de *W. somnifera* se caractérise quant à lui par des teneurs en minéraux certes faibles, mais loin d'être négligeables. Des éléments caractéristiques des extraits issus de racines sont retrouvés : Potassium (315 ppm), Soufre (94 ppm), Sodium (68 ppm), Phosphore (66 ppm) et Magnésium (40 ppm). La teneur en minéraux retrouvée dans l'extrait suggère que la force ionique de l'extrait est légèrement différente de celle du solvant seul. L'échantillon d'extrait gélifié avec une concentration en polysaccharide de 2% (m/m) a été analysé en SAXS dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre III. Le résultat est présenté en figure IV.26 comparativement au matériau obtenu après ajout de 2% (m/m) de  $\kappa$ -carraghénane dans le solvant FGE115.

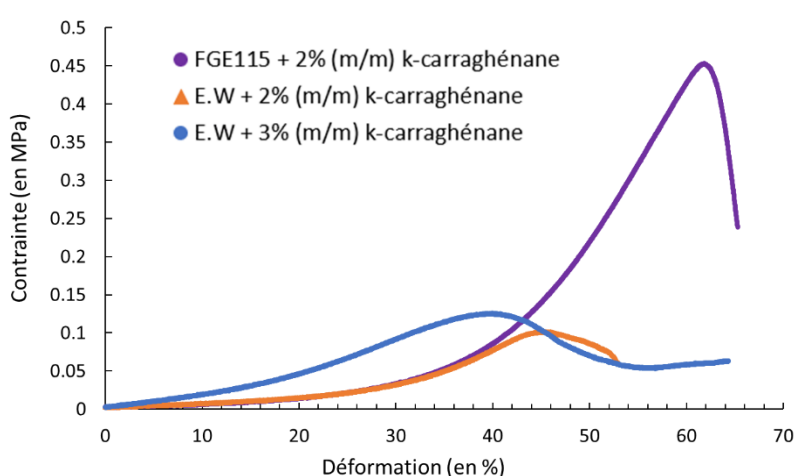


**Figure IV.25** Diffractogrammes SAXS obtenus après ajout de 20.5g/L de  $\kappa$ -carraghénane dans FGE115 (noir) et dans un extrait de *W. somnifera* (rouge)

Le diffractogramme obtenu avec l'extrait présente une allure différente de celui avec le solvant seul. A très petits angle ( $q < 0.3 \text{ nm}^{-1}$ ), la diminution de l'intensité varie en fonction de  $q^{-1}$ . Comme explicité dans le chapitre III ce profil est caractéristique de structures sous forme de cylindres [37]. Cette partie de courbe concorde avec les résultats précédents obtenus dans l'eau et dans FGE115 [36]. Cela suggère que le mécanisme de gélification du  $\kappa$ -carraghénane dans l'extrait peut également être décrit par l'agrégation des chaînes de polymère sous forme des structures assimilables à des cylindres. Lorsque  $q$  est compris entre 0,3 et 0,7  $\text{nm}^{-1}$ , la bosse assimilable à un pic polyélectrolyte dans le cas du solvant FGE115 (courbe noire) n'est pas observée dans l'extrait (courbe rouge). La position de ce pic (ou bosse ici) est directement reliée à la longueur caractéristique entre deux objets. Le fait que cette bosse ne soit pas visible dans le cas de l'extrait indique une diversité de distances caractéristiques entre les agrégats de chaînes dans l'espace. Enfin, lorsque  $q$  devient supérieur à 0,7  $\text{nm}^{-1}$ , une diminution de l'intensité en fonction de  $q^{-2}$  est observée dans les deux cas. Cela atteste que l'extrait est un bon solvant pour ce polysaccharide comme nous l'avons déjà observé pour le solvant seul. Bien que l'allure des diffractogrammes à grands  $q$  soit similaire, nous avons constaté expérimentalement que le polysaccharide est plus facilement dispersible dans l'extrait que dans le solvant seul.

L'analyse SAXS sur l'extrait gélifié atteste donc de la présence d'objets de forme cylindrique. Cela suggère que la formation d'agrégats de chaînes polymère soit à l'origine de la gélification comme pour le solvant seul et l'eau. Toutefois, l'absence de pic polyélectrolyte indique que les distances caractéristiques entre les objets sont variables dans l'espace. Autrement dit, la répartition des agrégats dans l'espace semble plus chaotique dans l'extrait que dans le solvant seul. Ce résultat indique que les microstructures ne sont pas équivalentes dans les deux cas.

Cela peut s'expliquer par la présence des matières minérales extraites des racines de *W. somnifera*. Bien que faiblement présents (teneur totale  $\approx 800$  ppm), les sels métalliques doivent nécessairement interagir avec le polysaccharide qui est un polyélectrolyte chargé. De plus, la variété des matières minérales présentes (K, S, Na, P, Mg, Ca) au sein de l'extrait suggère que des interactions spécifiques peuvent être localement retrouvées. Nous pouvons ainsi faire l'hypothèse que l'organisation des chaînes est moins ordonnée dans l'extrait que dans le solvant seul. Ce constat nous a conduit à étudier les propriétés mécaniques des extraits gélifiés dans les mêmes conditions d'analyse que pour les matériaux obtenus après incorporation de  $\kappa$ -carraghénane dans le solvant seul. Les résultats obtenus sont présentés en figure IV.26.



**Figure IV.26** Courbes de contrainte-déformation obtenues lors d'essais de compression à  $T_{amb}$  avec une vitesse de compression de 1 mm/min

La figure IV.26 regroupe trois courbes de contrainte-déformation obtenues après incorporation de  $\kappa$ -carraghénane dans FGE115 (violette) ou dans l'extrait FGE115 de *W. somnifera* (noté E.W). La courbe violette présentant le résultat obtenu avec le solvant seul est similaire à celle obtenue dans le chapitre III avec un pourcentage de déformation avant rupture d'environ 62% pour une contrainte avant rupture de 0,46 MPa. Les courbes de contrainte déformation dans l'extrait végétal sont nettement différentes. Pour une teneur de 2% (m/m) de polysaccharide et pour des contraintes faibles ( $< 30\%$ ), la réponse mécanique est identique entre les échantillons obtenus dans le solvant seul et dans l'extrait. Par contre, la réponse mécanique est très différente sous des contraintes plus importantes. Le pourcentage de déformation (45%) et la contrainte à la rupture ( $\approx 0,1$  MPa) de l'extrait gélifié sont nettement inférieurs à ceux obtenus avec le solvant seul. Ces différences de propriétés mécaniques peuvent s'expliquer par la présence des matières minérales extraites qui impactent directement l'organisation des agrégats des chaînes polymère comme nous l'avons vu par analyse SAXS.

Cette organisation particulière et hétérogène dans l'espace fait que la capacité de résistance à la compression de l'extrait gélifié est très inférieure à celle obtenue avec le solvant seul. L'effet de la concentration en polysaccharide sur les propriétés mécaniques a également été étudiée. La figure IV.26 montre également que la réponse mécanique est modifiée avec l'augmentation de la concentration en  $\kappa$ -carraghénane (courbe bleue). La contrainte à la rupture de l'échantillon d'extrait gélifié avec 3% (m/m) est d'environ 0,12 MPa et la déformation à la rupture de 40%. Cela indique que l'augmentation de la concentration en polysaccharide rend l'échantillon moins sensible à la compression. L'augmentation du nombre d'agrégats de chaînes répartis de manière hétérogène (du à la présence des matières minérales) modifie la réponse mécanique de l'échantillon. Toutefois, les propriétés mécaniques des extraits gélifiés restent très différentes de celle mises en évidence après ajout du polysaccharide dans le solvant seul. Ce constat permet de conclure que la gélification d'un extrait végétal doit être considéré comme un cas particulier puisque chaque extrait possède sa propre signature phytochimique. En effet, nous venons de démontrer que même si le mécanisme de gélification d'un *NaLTTM* est connu, la présence des composés extraits (ici les matières minérales principalement) peut avoir un impact significatif sur la microstructure d'un gel et par conséquent sur ses propriétés mécaniques.

---

#### IV.5.5 Conclusions et perspectives

Cette dernière partie du volet applicatif a été particulièrement riche en enseignements. Tout d'abord, l'incorporation de polysaccharides dans les extraits végétaux obtenus avec le mélange FGE115 peut être effectuée avec des équipements standards et un procédé de fabrication industrialisable. De plus, ce procédé n'altère pas le contenu en traceurs phytochimiques de l'extrait liquide. Nous avons également observé que les propriétés physico-chimiques (viscosité,  $T_g$ , etc.) des systèmes extrait + polysaccharide sont très proches de celles obtenues après ajout du même polysaccharide dans le solvant seul. Il semblerait également que les mécanismes de gélification soient identiques à ceux rencontrés dans le solvant seul. Pour discuter ce point de manière plus approfondie, nous avons caractériser de façon plus exhaustive la gélification d'un extrait de *W. somnifera* par le  $k$ -carraghénane. La nature et la teneur des extractibles, notamment les sels minéraux, modifie le comportement des chaînes dans les extraits et par conséquent les propriétés mécaniques des matériaux obtenus après gélification d'extraits végétaux. De façon contre intuitive, ces travaux mettent également en lumière que l'augmentation de la viscosité et/ou la gélification par ajout de polysaccharides ne permet pas d'agir positivement sur les sources d'instabilités chimique (dégradation des traceurs) et physique (changement de couleur) d'un extrait végétal.

En revanche, un intérêt notable vis-à-vis de la stabilité microbiologique a pu être détecté. Ainsi, l'ajout de polysaccharide peut offrir une alternative à l'emploi de conservateurs. Dans certains cas, les résultats de challenge-tests obtenus sont conformes aux critères A de la Pharmacopée. Cette perspective permettra certainement à Gattefossé de développer des extraits végétaux supramoléculaires gélifiés sans conservateurs.

D'autre part, l'emploi de polysaccharides permet de contrôler les propriétés rhéologiques des extraits. Ainsi, l'obtention de formes plus ou moins solides mettant en œuvre une faible quantité de polysaccharide est une voie qui peut permettre de s'affranchir des contraintes industrielles liées à la manipulation et au stockage de produits liquides. De plus, ce dernier point ouvre des perspectives de développement en phase avec l'essor récent de la cosmétique solide et la possibilité de s'orienter vers des contenants plus respectueux de l'environnement. Il s'agit également d'un moyen de casser les codes de mise en forme d'un extrait végétal classiquement commercialisé sous formes liquide ou poudre. Cet aspect peut apporter à la fois de l'originalité et une différenciation sur le marché. Pour continuer dans cette voie, il faudrait étudier la stabilité de l'intégrité physique du gel en fonction du temps et des contenants.

Enfin, il serait intéressant d'étudier la synergie qui résulterait de l'incorporation de plusieurs polysaccharides dans un extrait végétal en s'inspirant des travaux effectués en ce sens sur les hydrogels (cf chapitre I). Cela permettrait de gagner encore plus de latitude quant au développement de matériaux contenant des principes actifs issus de plantes avec des propriétés mécaniques spécifiques. Cet axe de recherche ouvre à lui seul de nombreuses perspectives pour des applications de libération prolongée de principes actifs pharmaceutiques par exemple.

## IV.6 Bibliographie

- [1] Petrovic S., Ivanovic J., Milovanovic S., et al. Comparative analyses of diffusion coefficients for different extraction processes from thyme. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2012, 77, 6, pp. 799–813.
- [2] Segovia F. J., Corral-Pérez J. J., Almajano M. P. Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, 2016, 85, pp. 213–220.
- [3] Chemat F. *Éco-extraction du végétal Procédés innovants et solvants alternatifs*. Paris: Dunod; l'Usine nouvelle, 2011, 1322 p. ISBN 9782100565436.
- [4] Medina-Torres N., Ayora-Talavera T., Espinosa-Andrews H., et al. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 2017, 7, 3, pp. 47.
- [5] Caprin B., Charton V., Vogelgesang B. Chapter Twelve - The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. *Advances in Botanical Research Eutectic Solvents and Stress in Plants (Volume 97)*. Academic Press. 2021, pp. 309–332. ISBN 978-0-12-821691-0.
- [6] European Parliament REGULATION (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine\\_disruptors/docs/cosmetic\\_1223\\_2009\\_regulation\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf), 2009. 13/08/2020.
- [7] Cosmetics Europe COSMETICS DIRECTIVE 76/768/EEC EXPLANATORY BROCHURE. [https://cosmeticseurope.eu/files/4114/6400/4203/The\\_European\\_Union\\_Cosmetics\\_Directive\\_Explanatory\\_Brochure\\_2004.pdf](https://cosmeticseurope.eu/files/4114/6400/4203/The_European_Union_Cosmetics_Directive_Explanatory_Brochure_2004.pdf), 2004. 13/08/2020.
- [8] United State Code Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, 21 U.S.C. §§ 301-392 Suppl. <https://tile.loc.gov/storage-services/service/ll/uscode/uscode1934-00602/uscode1934-006021009/uscode1934-006021009.pdf>. 12/08/2020.
- [9] Anastas P. T., Warner J. C. *Green chemistry Theory and practice*. Oxford, England: Oxford University Press, 1998, 135 p. ISBN 0198502346.
- [10] Anastas P. T., Zimmerman J. B. Design through the 12 principles of green engineering. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37, 5, pp. 94A-101A.
- [11] Durand E., Lecomte J., Villeneuve P. From green chemistry to nature: The versatile role of low transition temperature mixtures. *Biochimie*, 2016, 120, pp. 119–123.
- [12] Zhao D., Liao Y., Zhang Z. Toxicity of Ionic Liquids. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 2007, 35, 1, pp. 42–48.
- [13] Abbott A. P., Boothby D., Capper G., et al. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126, 29, pp. 9142–9147.
- [14] Choi Y. H., van Spronsen J., Dai Y., et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, 2011, 156, 4, pp. 1701–1705.
- [15] Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G. J., et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 766, pp. 61–68.
- [16] Jablonský M., Škulcová A., Malvis A., et al. Extraction of value-added components from food industry based and agro-forest biowastes by deep eutectic solvents. *Journal of Biotechnology*, 2018, 282, pp. 46–66.
- [17] Gomez F. J. V., Espino M., Fernandez M. A., et al. A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect*, 2018, 3, 22, pp. 6122–6125.
- [18] Charton V., Clairet A. Using nades extraction to create natural, sustainable, high-performance actives. *Household and Personal Care Today*, 2018, 13, 2, pp. 37–40.
- [19] Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M. C. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. *Green Chemistry*, 2012, 14, 8, pp. 2153.

- [20] Delso I., Lafuente C., Muñoz-Embid J., et al. NMR study of choline chloride-based deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 2019, 290, pp. 111236.
- [21] López N., Delso I., Matute D., et al. Characterization of xylitol or citric acid Choline chloride:water mixtures: Structure, thermophysical properties, and quercetin solubility. *Food Chemistry*, 2020, 306, pp. 125610.
- [22] Reichardt C. Pyridinium N-phenolate betaine dyes as empirical indicators of solvent polarity: Some new findings. *Pure and Applied Chemistry*, 2004, 76, 10, pp. 1903–1919.
- [23] Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Hé, lè, Benink n. A., Worzella T. J., Minor L. Assay Guidance Manual [Internet]: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016,
- [24] González C. G., Mustafa N. R., Wilson E. G., et al. Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour and Fragrance Journal*, 2018, 33, 1, pp. 91–96.
- [25] Dai Y., Verpoorte R., Choi Y. H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chemistry*, 2014, 159, pp. 116–121.
- [26] Liu X., Ahlgren S., Korthout H. A. A. J., et al. Broad range chemical profiling of natural deep eutectic solvent extracts using a high performance thin layer chromatography-based method. *Journal of chromatography. A*, 2018, 1532, pp. 198–207.
- [27] Caprin B., Charton V., Rodier J.-D., et al. Scrutiny of the supramolecular structure of bio-sourced fructose/glycerol/water ternary mixtures Towards green low transition temperature mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 2021, 337, pp. 116428.
- [28] Jeandet P., Delaunois B., Conreux A., et al. Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *BioFactors (Oxford, England)*, 2010, 36, 5, pp. 331–341.
- [29] Chong J., Poutaraud A., Hugueney P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 2009, 177, 3, pp. 143–155.
- [30] Baxter R. Anti-aging properties of resveratrol: review and report of a potent new antioxidant skin care formulation. *Journal of cosmetic dermatology*, 2008, 7, 1, pp. 2–7.
- [31] Filip V., Ploková M., šmidrkal J., et al. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry*, 2003, 83, 4, pp. 585–593.
- [32] Rayne S., Karacabey E., Mazza G. Grape cane waste as a source of trans-resveratrol and trans-viniferin High-value phytochemicals with medicinal and anti-phytopathogenic applications. *Industrial Crops and Products*, 2008, 27, 3, pp. 335–340.
- [33] Caprin B., Charton V., Demarne F. Solvant eutectique pour la dissolution de stilbénoïdes ou leurs dérivés, FR 3 068 352 B1. 30/06/2017.
- [34] Alishlah T., Mun'im A., Jufri M. Optimization of Urea-Glycerin Based NADES-UAE for Ox-yesveratrol Extraction from *Morus alba* Roots for Preparation of Skin Whitening Lotion. *Journal of Young Pharmacists*, 2019, 11, 2, pp. 155–160.
- [35] Dai Y., Witkamp G. J., Verpoorte R., et al. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, 2015, 187, pp. 14–19.
- [36] Caprin B., Viñado-Buil G., Sudre G., et al.  $\kappa$ -Carrageenan Associated with Fructose/Glycerol/Water LTTM: Toward Natural Thermosensitive Physical Gels. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022,
- [37] Hollamby M. J. Practical applications of small-angle neutron scattering. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 2013, 15, 26, pp. 10566–10579.

## IV.7 Liste des figures et tableaux

Figure IV.1 Illustration de principe d'un procédé d'extraction végétale par un solvant liquide .....	225
Figure IV.2 Principe de déstructuration d'une cellule végétale par effet de cavitation conduisant à la libération des extractibles <sup>[4]</sup> .....	226
Figure IV.3 Chemical structures of compounds selected for designing cosmetic NaDES .....	235
Table IV.1 Example of homogeneous, limpid, and stable liquids obtained by Gattefossé .....	236
Figure IV.4 Phase sensitive <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY spectra recorded at 298K for (A) FGW115 (B) FGW1110 .....	237
Figure IV.5 Evolution of viscosity as a function of temperature for NaDES and conventional solvents .....	238
Table IV.2 Solvent polarity of NaDES and conventional solvents obtained with Reichardt's method ...	239
Figure IV.6 Microbial stability study of FGW115 according to European Pharmacopeia challenge test method .....	240
Figure IV.7 Cell viability (MTT assay) of normal human epidermal keratinocytes (NHEK) (A) and normal human dermal fibroblasts (NHDF) (B) culture containing 1% of NaDES or conventional solvents .....	241
Figure IV.8 Relative extraction efficiency of both NaDES and conventional solvents for (A) phenolic acids and (B) flavonoids of <i>Calendula officinalis</i> compared to ethanol/water standardized at 100% ....	242
Figure IV.9 Relative extraction efficiency of solvents composed of fructose, glycerol and water regarding phenolic acids extracted from <i>Calendula officinalis</i> flowers .....	244
Figure IV.10 Radical scavenging activity of a BSW115 extract compared to conventional solvents .....	245
Figure IV.11 Effect of two <i>Aesculus hippocastanum</i> extracts on collagen IV synthesis .....	246
Figure IV.12 Thermogrammes de l'extrait FGE115 d' <i>A. hippocastanum</i> (rouge) et du solvant seul (vert) .....	249
Figure IV.13 Spectres RMN <sup>1</sup> H de l'extrait FGE115 d' <i>A. hippocastanum</i> comparativement à celui du solvant seul (A) et cartes <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H NOESY obtenues pour le FGE115 (B) et pour l'extrait (C) .....	250
Figure IV.14 Placement des solvants retenus sur le diagramme ternaire des mélanges FGE .....	252
Tableau IV.3 Equivalence entre proportions molaires et les pourcentages massiques des solvants .....	252
Figure IV.15 Structures chimiques du resvératrol et du picéide .....	253
Figure IV.16 Rendements de fabrication en fonction du solvant. Le bandeau bleu indique les teneurs en eau (% m/m). Les valeurs de viscosité (en Pa.s) sont indiquées dans les étiquettes au-dessus des données. ....	255
Figure IV.17 Représentation graphique des teneurs en stilbénoides quantifiées par HPLC. Les bandeaux bleu et orange indiquent respectivement les teneurs en eau et en glycérol (% m/m) .....	256
Figure IV.18 Activité anti-radicalaire (% vs non-traité) des extraits de <i>P.cuspidatum</i> .....	258
Figure IV.19 Suivi de la stabilité chimique en stilbénoides pour l'extrait obtenu en FGE115 et photographie des échantillons après 9 mois de stabilité à 4, 25 et 40°C .....	259
Tableau IV.4 Synthèse des observations effectuées lors du suivi de stabilité après 12 mois .....	260
Tableau IV.5 Polysaccharides et concentrations massiques retenus pour les essais applicatifs .....	263
Figure IV.20 Influence de la nature du polysaccharide sur les propriétés rhéologiques des échantillons obtenus après incorporation de polysaccharides dans un extrait FGE115 de <i>Whitania somnifera</i> .....	268
Tableau IV.6 Températures de transition vitreuses ( $T_g$ ) obtenues par DSC pour 2 extraits liquides en..	269
FGE115 et 8 extraits dans lesquels des polysaccharides ont été ajoutés .....	269
Figure IV.21 Illustration de mises en forme des extraits supramoléculaires gélifiés .....	270



Figure IV.22 Photographies des échantillons intégrés dans ce suivi de stabilité .....	271
Tableau IV.7 Taux de recouvrement en traceurs après incorporation de polysaccharides .....	272
Figure IV.23 Suivi de stabilité chimique par quantification HPLC du picéide dans des extraits de <i>P.cuspidatum</i> avec ou sans polysaccharides (A) et des acides aminés dans des extraits de <i>W.somnifera</i> avec ou sans polysaccharides (B) .....	272
Tableau IV.8 Suivi de la variation de couleur des extraits de <i>P. cuspidatum</i> avec ou sans polysaccharides .....	273
Tableau IV.9 Suivi de la variation de couleur des extraits de <i>W. somnifera</i> avec ou sans polysaccharides .....	274
Tableau IV.10 Propreté microbiologique des échantillons suivis en challenge-test et des polysaccharides utilisés .....	274
Figure IV.24 Résultats de l'étude de l'efficacité de la conservation antimicrobienne (challenge-test) réalisée sur les extraits gélifiés et non gélifiés de <i>Withania somnifera</i> .....	275
Tableau IV.11 Résultats d'analyses élémentaires pour le solvant FGE115 et l'extrait de <i>W. somnifera</i> .....	278
Figure IV.25 Diffractogrammes SAXS obtenus après ajout de 20.5g/L de k-carraghénane dans FGE115 (noir) et dans un extrait de <i>W. somnifera</i> (rouge).....	279
Figure IV.26 Courbes de contrainte-déformation obtenues lors d'essais de compression à $T_{amb}$ avec une vitesse de compression de 1 mm/min .....	280

# Conclusion générale

Le solvant *NaDES* le plus utilisé industriellement par Gattefossé correspond à un mélange composé de Fructose, de Glycérol et d'Eau en proportions molaires 1:1:5. Ce mélange ternaire, noté FGE115, ainsi que les extraits qui résultent de son utilisation en tant que solvant d'extraction conduisent à une seule phase liquide à température ambiante. Cet aspect macroscopique est la conséquence de la formation d'interactions coopératives (liaisons hydrogène) entre les molécules constitutives de ce solvant. En se basant sur les travaux issus de la littérature portant sur la caractérisation de ce type de mélanges, nous avons développé une méthodologie de caractérisation qui permet de relier les propriétés rhéologiques et thermiques à la structuration du solvant à l'échelle moléculaire examinée par RMN-1D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY, et par la mesure des coefficients de diffusion. Les résultats obtenus nous ont permis de classer ces solvants comme mélanges naturels à transition de phase basse température (*NaLTTM*). Ces résultats confirment les observations empiriques effectuées lors de sa mise au point par Gattefossé : l'eau participe à la structure des *NaLTTM*. Plus précisément, dans le cas des mélanges FGE, la teneur en eau est l'élément essentiel qui gouverne les interactions moléculaires et par conséquent les propriétés macroscopiques (viscosité, densité) et les propriétés thermiques (unique  $T_g$ ). Pour les combinaisons équimolaires en fructose et en glycérol, une quantité insuffisante en eau ( $n < 3$  moles) conduit à des mélanges instables macroscopiquement. A l'inverse, un excès d'eau ( $n > 7$  moles) affaiblit les interactions entre le glycérol et le fructose au profit d'interactions avec l'eau. Ainsi, seules les combinaisons comprises entre FGE113 et FGE117 peuvent être considérées comme des *NaLTTM*, possédant une unique  $T_g$  variant de  $-71$  à  $-91^\circ\text{C}$ . Ces résultats sont en accord avec les différents travaux de caractérisation de systèmes de type *DES*, *NaDES* ou *LTMM* publiés pendant cette thèse (2018-2022). La méthodologie décrite est applicable à d'autres *NaLTTM* comme nous l'avons mis en évidence avec des mélanges ternaires à base de bétaïne, de propanediol et d'eau. Toutefois, nous n'avons pas eu le temps de finaliser l'étude initiée par relaxométrie (RMN bas champ) mais cela constitue une perspective de collaboration intéressante pour poursuivre ces travaux de thèse. En effet, cette méthode est basée sur la mesure des temps de relaxation (relaxation spin-spin et spin-réseau) de l'ensemble des protons du mélange. Ces temps de relaxation étant dépendants du temps de corrélation des molécules engagées dans le mélange, une étude fine des courbes de relaxation pourrait permettre de discriminer les mélanges dans lesquels les molécules forment des associations supramoléculaires. L'appareillage nécessaire n'engendre pas les mêmes contraintes que l'utilisation de la RMN haut champ et, s'installe aisément dans un laboratoire industriel. Enfin, cette approche n'est pas décrite dans la littérature à ce jour.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la possibilité d'utiliser différents polysaccharides pour générer des matériaux biosourcés à partir du mélange FGE115 et des extraits obtenus avec ce solvant. Ce point n'ayant pas été décrit dans la littérature précédemment, une sélection des polysaccharides adaptés aux objectifs a été réalisée. La mise en œuvre de structures variées nous a permis d'établir une liste réduite de 4 candidats : la gomme xanthane, l'alginate de sodium, le  $\kappa$ -carraghénane et l'agar-agar.

Les résultats de la caractérisation des systèmes obtenus avec la gomme xanthane semblent indiquer que la solubilisation de ce polysaccharide (de masse molaire très élevée), n'est pas de bonne qualité, et de fait ne conduit pas à des matériaux adaptés aux objectifs visés. Bien que des analyses complémentaires auraient pu nous aider à mieux comprendre les interactions, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation d'autres polysaccharides qui apparaissaient plus prometteurs.

L'ajout d'alginate de sodium dans les mélanges FGE113 et FGE115 ne permet pas d'obtenir des gels mais des solutions viscoélastiques dont les propriétés rhéologiques ont été étudiées en détail, et peuvent être modulées avec la concentration en polysaccharide et la nature du solvant FGE. La viscosité intrinsèque dans le FGE115 ( $\approx 5000$  mL/g) est plus élevée que celle déterminée dans l'eau ( $\approx 1111$  mL/g), ce qui reflète une conformation plus étendue/expansée des chaînes d'alginate en milieu FGE115, et montre indirectement le caractère de bon solvant du FGE115. Les énergies d'activation obtenues pour des solutions à 2% (m/m) d'alginate de sodium sont de  $22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  ;  $55 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  et  $76 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  respectivement dans l'eau, le FGE115 et le FGE113. Ces valeurs plus élevées dans les solvants FGE reflètent une plus forte cohésion au sein des systèmes alginate/FGE par rapport au système alginate/eau et soulignent que les interactions développées sont sensibles à la température, ce qui est cohérent avec l'établissement de liaisons hydrogène. Afin de discuter de la possibilité d'obtention de gels physiques à partir de mélanges alginate/FGE, nous nous sommes tournés vers l'ajout de calcium dans les solutions d'alginate. Il est en effet décrit dans la littérature que l'ajout de cations divalents dans des solutions aqueuses d'alginate mène à des hydrogels physiques ionotropes. Après une étape d'optimisation des paramètres expérimentaux, nous avons réussi à obtenir des billes de gels par gélification externe via l'ajout contrôlé de chlorure de calcium dans des solutions alginate/FGE. De plus, en développant un second protocole expérimental que nous avons également optimisé, des gels massifs ont été générés selon un mécanisme de gélification interne basé sur la libération in-situ d'ions calcium par la dissociation progressive de carbonate de calcium en milieu acide à travers l'hydrolyse de la glucono- $\delta$ -lactone (GDL). Les matériaux qui en résultent possèdent des propriétés élastiques de type gel physique, modulables en fonction du protocole de préparation. Là aussi différentes perspectives (utilisation d'un autre cation divalent, étude d'intégrité des billes dans le temps, renforcement de la capsule, ...) ressortent de ces travaux non décrits dans la littérature (cf chapitre III.3).

Le polysaccharide le plus adapté aux enjeux de cette thèse est le  $\kappa$ -carraghénane. En effet, après une optimisation de la procédure expérimentale de préparation, nous avons démontré la faisabilité d'obtenir des matériaux simplement et rapidement ( $< 3h$ ), de façon peu énergivore (simple agitation puis chauffage à température modérée) et surtout reproductible, sous la forme de pièces de gels de géométrie facilement adaptable (cylindre, plaque, etc.). Les propriétés rhéologiques à petites déformations et mécaniques aux grandes déformations des matériaux  $\kappa$ -carraghénane/FGE ont été examinées de façon approfondie, et il s'avère qu'elles sont nettement améliorées par rapport aux analogues en milieu aqueux. Pour des concentrations en  $\kappa$ -carraghénane supérieures à 26 g/L, les modules de stockage dans les deux solvants sont assez similaires ( $G' > 5000$  Pa) et le rapport  $G'/G''$  est élevé, attestant de la formation de gels cohésifs. Ces similitudes au niveau du comportement viscoélastique suggèrent un mécanisme de gélification analogue dans les deux solvants. L'évolution des modules en fonction de la température lors de balayages successifs de montée en température et de refroidissement a également été étudiée puisque les propriétés rhéologiques des hydrogels de carraghénane sont thermosensibles. Quelle que soit la méthode employée pour déterminer les températures de transition sol-gel ( $T_{s/g}$ ), les  $T_{s/g}$  des gels en FGE115 se sont avérées plus élevées que celles mesurées pour les hydrogels. Ainsi, une température plus haute est nécessaire pour permettre à la fois la dissociation des agrégats d'hélices et la transition hélice-pelote dans le FGE115. Cela peut être attribué à la grande viscosité du solvant FGE115 comparativement à celle de l'eau. L'application de cycles successifs de chauffage et de refroidissement a montré une réversibilité complète des propriétés viscoélastiques pour les gels dans le FGE115. Ce résultat indique que la cinétique de désorganisation / réorganisation des zones associées induite par la chaleur est rapide et confirme la forte rétention du solvant FGE115 pour des températures élevées ( $T_{max} = 100^\circ\text{C}$ ), ce qui est impossible à obtenir dans le cas des hydrogels. L'apport du solvant FGE115 est également notable sur les propriétés mécaniques puisque la gamme de contraintes supportées par le gel dans le FGE115 est significativement plus grande que celle de l'hydrogel. En effet, la contrainte à la rupture obtenue (0,50 MPa) est presque deux fois plus importante pour le gel dans le FGE115. La déformation à la rupture est également plus élevée pour le gel dans le FGE115 (65% contre 50% pour l'hydrogel).

Des analyses de la morphologie et de la structure interne par diffusion des rayons X aux petits angles réalisées à l'ESRF à Grenoble, ont permis de relier ces propriétés à une organisation nanométrique spécifique. La présence de structures dispersées en forme de bâtonnets a pu être mise en évidence dans les deux solvants pour des concentrations en  $\kappa$ -carraghénane de 20g/L, ce qui corrobore le mécanisme de gélification bien décrit pour les hydrogels, à savoir la formation d'hélices à double brin arrangées latéralement. Toutefois, l'organisation dans l'espace des agrégats d'hélices est différente. En effet, le solvant FGE115 apparaît comme un meilleur solvant que l'eau pour les chaînes de  $\kappa$ -carraghénane.

Ainsi, et comme l'indique le pic polyélectrolyte plus large dans le FGE115, la distribution des longueurs inter chaînes dans l'espace est moins répétitive que dans l'hydrogel. Cette différence provient des interactions entre le solvant et les chaînes de carraghénane libres qui sont plus étendues dans le FGE115, du fait de l'établissement d'un plus grand nombre de liaisons hydrogène entre le solvant et les chaînes polymère. Les gels à base de FGE115 se caractérisent donc par un réseau comprenant plus de jonctions physiques et des interactions solvant-chaîne plus fortes. Cette structuration spatiale particulière dans le solvant LTTM est très probablement à l'origine des améliorations des propriétés rhéologiques et mécaniques constatées, comparativement aux hydrogels.

Enfin, des pièces de gels massifs ont également été obtenues avec l'agar-agar. Toutefois, la caractérisation de la structure de ce polysaccharide est complexe et nous avons choisi de ne traiter l'utilisation de ce polymère naturel que dans la partie applicative.

Finalement, nous avons rempli le second objectif majeur de cette thèse à savoir : concevoir et caractériser des matériaux biosourcés aux propriétés rhéologiques modulables, à base du solvant supramoléculaire (FGE115) d'intérêt pour Gattefossé, et d'un polysaccharide. De multiples perspectives s'ouvrent dorénavant car les effets de synergie entre plusieurs polysaccharides décrits pour les hydrogels n'ont pas été étudiés ici. La diversité de structure des polysaccharides considérés ainsi que la variété de comportements macroscopiques observés (de la solution viscoélastique au gel physique avec des propriétés mécaniques élevées) permettent d'envisager le développement de matériaux 100% biosourcés à partir du solvant FGE115.

Le potentiel applicatif de ces recherches par Gattefossé a été discuté tout au long de ce travail de thèse. La méthodologie de caractérisation développée dans le chapitre I a été, pour la première fois, appliquée à un extrait végétal obtenu avec le solvant FGE115. Ces analyses ont confirmé que la structure supramoléculaire du solvant est majoritairement conservée après les étapes d'extraction et de filtration. Cependant, l'efficacité d'extraction des constituants phytochimiques contenus dans les végétaux étudiés semble plutôt attribuable à la composition du mélange FGE (notamment la teneur en glycérol) plus qu'à la structuration supramoléculaire du solvant. En revanche, le caractère stabilisant de cette dernière est suggéré par les études de stabilité réalisées qui montrent une relation entre l'augmentation de la viscosité et l'amélioration de la stabilité des extraits liquides.

Fort de cette constatation, nous nous sommes orientés sur la préparation et l'étude de stabilité d'extraits viscosifiés ou gélifiés en incorporant les quatre polysaccharides répondant à nos critères de sélection : la gomme xanthane, l'alginate de sodium, le  $\kappa$ -carraghénane et l'agar-agar. Cette partie a été particulièrement riche en enseignements.

Tout d'abord, la composition en extractibles n'est pas altérée par l'ajout d'un polysaccharide selon le protocole de préparation retenu. Toutefois, l'ajout de polysaccharide n'a pas permis d'agir favorablement sur la stabilité physico-chimique (traceurs, couleur) des extraits dans les conditions d'étude. En revanche, un bénéfice a été mis en évidence concernant la stabilité microbiologique. Il semblerait que la gélification présente une voie d'avenir pour se substituer à l'emploi de conservateurs. Cela s'ajoute à l'ensemble des bénéfices que constitue l'état de gel des produits (transport, emballage, conditionnement, ...) et la possibilité de casser les codes de mises en forme d'un actif cosmétique. Ces travaux de gélification d'un extrait végétal obtenu avec le solvant FGE115 ont conduit Gattefossé à déposer une demande de brevet qui sera visible prochainement. Cette partie des résultats répond favorablement au troisième objectif que nous nous étions fixés, à savoir étudier l'effet de l'ajout d'un polysaccharide sur la stabilité globale des extraits végétaux obtenus avec le solvant FGE115.

Compte-tenu des matériaux obtenus avec le  $\kappa$ -carraghénane, nous avons réalisé des compléments de caractérisation sur les extraits gélifiés avec ce polysaccharide (SAXS, propriétés mécaniques). Ce dernier point fait également office de perspective pour ces travaux. En effet, la présence des éléments minéraux extraits (< 900 ppm) perturbe la microstructure qui semble moins homogène que celle du solvant seul gélifié. Cette organisation particulière et hétérogène dans l'extrait modifie grandement les propriétés mécaniques des matériaux obtenus. Ces travaux suggèrent que même en connaissant le mécanisme d'organisation des chaînes polymère dans un solvant, il est quasiment impossible de prédire avec précision les caractéristiques d'un matériau obtenu à partir d'un extrait végétal. Chaque extrait sera donc à considérer comme un cas particulier.



## FOLIO ADMINISTRATIF

### THESE DE L'INSA LYON, MEMBRE DE L'UNIVERSITE DE LYON.

NOM : CAPRIN

DATE de SOUTENANCE : 16/03/2023

Prénoms : Benoît

TITRE : Gélification d'un solvant supramoléculaire par des polysaccharides et application aux extraits végétaux

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2023ISAL0016

Ecole doctorale : ED34

Spécialité : Matériaux

#### **RESUME :**

Les mélanges à transition de phase basse température d'origine naturelle (NaLTTM) sont des mélanges supramoléculaires qui répondent aux principes de la chimie verte. Gattefossé a développé un mélange composé de fructose, de glycérol et d'eau (noté FGE115) pour ses activités d'extraction végétale. Toutefois, la compréhension du mécanisme d'association des molécules constitutives de ce solvant restait insuffisante. Face à l'absence de consensus sur les méthodes de caractérisation de ce type de mélanges, une méthodologie de caractérisations physico-chimiques a été développée en s'inspirant des travaux disponibles dans la littérature. Cette stratégie basée sur la détermination des propriétés thermiques (ATG, DSC), des propriétés rhéologiques (viscosité, énergie d'activation) et sur la description des systèmes à l'échelle moléculaire (RMN 1D-1H, 13C, 2D 1H-1H NOESY), a permis d'identifier les mélanges FGE ayant les caractéristiques de NaLTTM. Comme tous les extraits végétaux liquides, les extraits obtenus avec le solvant FGE115 possèdent une durée de conservation limitée. La voie explorée pour répondre à cette problématique industrielle consiste à diminuer la mobilité des molécules en solution par le biais de la gélification. Pour ce faire, différents polysaccharides naturels (xanthane, alginates, carraghénanes) ont été sélectionnés en fonction de leur affinité avec le solvant FGE115. Une caractérisation fine des solutions viscoélastiques ou des matériaux de type gels obtenus est proposée dans ce manuscrit. Ces travaux démontrent la possibilité de concevoir et de caractériser des matériaux biosourcés aux propriétés rhéologiques modulables à base du solvant FGE115. Le potentiel applicatif industriel et les bénéfices apportés par la gélification sur la stabilité des extraits végétaux sont également discutés dans ce manuscrit.

MOTS-CLÉS : Chimie verte, NaLTTM, polysaccharide, gel, extraits végétaux

Laboratoire (s) de recherche : IMP@INSA Lyon

Directeur de thèse: FLEURY Etienne

Président de jury : VERPOORTE, Robert

Composition du jury : VERPOORTE, Robert ; AMIEL, Catherine ; PICTON, Luc ; FLEURY Etienne, CHARLOT Aurélia, Da Cruz Fernande, CHARTON Virginie