REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE Dr. YAHIA FARES MEDEA



Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

MEMOIRE DE FIN D'ÉTUDE

Pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés Pharmaceutiques

Option : Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème:

ETUDE DES PROPRIETES EMULSIFIANTES DES TENSIOACTIFS NON IONIQUES. APPLICATION PHARMACEUTIQUE

Présenté par :

- KERROUCHE Siham
- BRIK Ibtissem Yousra

Proposé et dirigé par :

Dr. SEFHA Farida

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

C'est l'occasion pour nous de remercier toutes les personnes qui ont contribué physiquement et moralement à l'élaboration de ce mémoire.

Avant toute chose, nous remercions ‹‹*Allah* ››**,** pour nous avoir donné la force, la patience et le courage pour mener ce travail à son terme surtout dans ce pandémique (**COVID-19**) et le confinement.

Nos sentiments de profonde s'adresse à la personne qui nous a proposé ce sujet et qui nous a encadré tout au long de ce travail, Mme **SEFHA Farida.** Au travers de nos discussions elle nous apporté une compréhension plus approfondie des divers aspects du sujet, ne nous saurions trop la remercier pour l'intérêt qu'elle a accordé à ce travail

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail.

Nous remercions très chaleureusement aussi Mr **LATREUCH Hichem**, Maître de conférences B à l'Université de Dr. Yahia Fares de Médéa pour nous aider à trouver l'un des principaux réactifs de ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble du personnel des laboratoires du Hall Technologique de l'Université Dr. Yahia Faress de Médéa et plus particulièrement M^{elle} **BENHAOUA Meriem,** ingénieure de laboratoire d'analyses physico-chimique qui nous aide dans le coté pratique, sans oublier **LOUNIS Selma, FERGANI Radia** ingénieures de laboratoire de biologie.

Un énorme merci à tous nos proches amies **Yamina**, **Iman**, **Habiba , Kholoud, Chahinez Amel, Samira, Rym, Ramla, Souad, Razika, Cilina, Khaoula et Amel** pour leurs encouragements et leur amour.

Ce mémoire n'aurait jamais vu le jour sans le soutien de nos extraordinaires ***PARENTS*** et nos familles. Il est impossible d'exprimer en quelques mots combien nous leurs sommes reconnaissants, aussi nous ne le tentons même pas, nous leurs disons : **MERCI!**

Enfin, que tous ceux qui ont contribués, de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de nous profonde gratitude. Et merci à tous ceux qui nous avons oubliés.

Merci à tous.

Dédicaces

A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que Je dédie :

À mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encourage et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse.

A ma chère sœur Manel, ma grand-mère (que DIEU la protège) et mes chers amies surtout à mes deux sœurs Rim et Ramla ; vous étiez la meilleure chose qui m'est arrivée dans ma vie universitaire, je te souhaite un avenir plein de joie, de réussite et de bonheur.

A ma famille surtout mes tantes Aicha et Farida

A ma chère binôme SIHAM

A tous mes collègues de promotion

A tous ceux que j'aime sans exception

Yousra

*A l'aide d'**Allah**, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie:*

*A ma chère maman en témoignage de ma profonde reconnaissance pour sa patience, sa sacrifice et sa soutient tout au long de mes études. Qu'**Allah** sa prête santé*

A ma chère et seule sœur Mimi et a ses enfants : Lodjaine, Loay, Akram et Joud

A mes deux frères Omar, Abd Samad

A mes chères amies Yamina , Iman pour leurs encouragements et amour.

A ma chère binôme Yousra

A tous mes amis sans exception

A tous ceux que j'aime, sans lesquels tout ceci n'aurait aucun sens

Siham

الملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم قوة الاستحلاب لخافض التوتر السطحي غير الأيوني (إستر السكر) الذي تم الحصول عليه إنزيميًا مع تطبيقات في المستحضرات الصيدلانية. ركزت التجارب أولاً على استخلاص إنزيم الليباز من بذور الخروع (*Ricinus communis* L) لتثبيته في ألجينات الصوديوم. يعطي تركيب إستر الجلوكوز بواسطة مانح أسيل مختلف في ثلاثي البوتانول عائدًا أفضل مع حمض البالمتيك في ظل ظروف مضبوطة جيدًا: درجة الحرارة (40 درجة مئوية) ، سرعة التحريك (600 دورة في الدقيقة) ، وقت التفاعل (8 ساعات) مع الأخذ في الاعتبار محتوى الماء والنسبة المولية بين المواد المتفاعلة. تم تقدير قيمة HLB البالغة 7.15، توضح أن بالميتات الجلوكوز المركب يمكن أن يثبت مستحلب الزيت في الماء. كان مؤشر استحلاب مستحلب زيت الزيتون في محلول بالميتات الجلوكوز (2:10 ، v / v) لمدة 24 ساعة 95.83٪.

الكلمات المفتاحية: الفاعل بالسطح غير الأيوني ، الخروع ، الليباز ، مانع الحركة ، بالميتات الجلوكوز ، HLB ، مؤشر الاستحلاب ,الليباز المجمد

Résumé

L'objectif de ce travail est l'évaluation du pouvoir émulsifiant d’un tensioactif non ionique (ester de sucre) obtenu par voie enzymatique présentant des applications en pharmaceutique. Les expériences ont porté d'abord sur l'extraction de l'enzyme lipase à partir des graines de Ricin (*Ricinus communis* L) afin de l'immobiliser dans l'alginate de sodium. La synthèse d'ester de glucose par différents donneur d'acyle dans le tert-butanol donne un meilleur rendement avec l'acide palmitique sous des conditions bien contrôlées: température (40°C), vitesse d'agitation (600 tr/min), temps de réaction (8 h) en tenant compte la teneur en eau et le rapport molaire entre réactifs. Une valeur de HLB de 7.15 a été estimée, montre que le palmitate de glucose synthétisé peut stabiliser une émulsion huile dans eau. L'indice d'émulsification d'une émulsion huile d'olive dans la solution palmitate de glucose (2:10,v/v) pendant 24 heures était de 95.83%.

Mots clés: Tensioactif non ionique, Ricin, *Ricinus communis* L, lipase, immobiliser, palmitate de glucose, HLB, indice d'émulsification

Abstract

The objective of this work is to evaluate the emulsifying power of a nonionic surfactant (sugar ester) obtained by the enzymatic way with applications in pharmaceuticals. The experiments focused first on extracting the enzyme lipase from the seeds of Ricin (*Ricinus communis* L) in order to immobilize it in sodium alginate. The synthesis of glucose ester by different acyl donor in tert-butanol gives a better yield with palmitic acid under well controlled conditions: temperature (40 ° C), stirring speed (600 rpm), time reaction (8 h) taking into account the water content and the molar ratio between reactants. An HLB value of 7.15 was estimated shows that the synthesized glucose palmitate can stabilize an oil-in-water emulsion. The emulsification index of an olive oil emulsion in glucose palmitate solution (2:10, v / v) for 24 hours was 95.83%.

Keywords: Nonionic surfactant, Ricin, *Ricinus communis L,* lipase, immobilizer, glucose palmitate, HLB, emulsification index

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

Partie théorique

I. TENSIOACTIFS 3

I.1.Historique 3

I.2. Définition 3

I.3. Origines des agents de surface 4

I.3.1. Agents de surface d'origine naturelle 4

I.3.2. Agent de surface d'origine synthétique 4

I.4. Classification des agents de surface 4

I.4.1. Tensioactifs anioniques 5

I.4.2. Tensioactifs cationiques 5

I.4.3. Tensioactifs amphotères 6

I.4.4. Tensioactifs non ionique 7

1.4.5. Agents tensioactifs polymérique 7

I.5. Les Propriétés des tensioactifs 7

I.5.1. Structure amphiphile 7

I.5.2. Adsorption 9

I.5.3. Association 10

I.6. les différentes fonctions des tensioactifs 11

I.6.1. Fonctions émulsifiantes (HLB 4-6) 11

I.6.2. Fonction humidifiantes (HLB 7-9) 12

I.6.3. Fonction dispersantes (HLB 10-12) 12

I.6.4. Fonctions solubilisantes (HLB 13-18) 12

I.7.Structures des tensioactifs 13

I.8. Les applications des agents de surface 13
I.8.1. Le secteur de détergence 14
I.8.2. Le secteur de la cosmétique 14
I.8.3. Le secteur pharmaceutique 14
I.8.4. Le secteur industriel et agricole 14
II. ÉMULSIONS 16
II.1. Définition 16
II.2. Composition des émulsions 16
II.2.1. Phase lipophile 17
II.2.2. Phase hydrophile 17
II.2.3. Émulsifiants 18
II.3. Divers Types d'émulsions 19
II.3.1. Émulsions simples 19
II.3.2. Émulsions multiples 20
II.3.3. Bi- émulsions 21
II .4.Description des émulsions 22
II .4.1. Aspect 22
II .4.2. Concentration 22
II .4.3. Granulométrie 23
II .4.4. Aire interfaciale 24
II .4.5. Rhéologie 24
II.5.Instabilité des émulsions 25
II.5.1. Déstabilisation chimique 26
II.5.2. Déstabilisation biologique 26
II.5.3. Déstabilisation physique 26
II.5.3.1. Mûrissement d'Ostwald 26
II.5.3.2. Floculation 27

II.5.3.3. Sédimentation et Crémage 27
II.5.3.4. Coalescence 28
II.5.3.5. Inversion des phases : 28
II.6. Molécules stabilisant les émulsions 29
II.7. Formulation des émulsions 29
II.7.1. Diagramme ternaire 29
II.7.2. Méthode HLB 30
II.7.3. Méthode HLD 30
II.7.4. Inversion de phase 30
II.8. Stabilité d'une formulation 31
II.8.1. Stabilité physique 31
II.8.2. Stabilité chimique 31
II.8.3. Stabilité microbiologique 31
III. PROCÉDÉS DE SYNTHÈSE DES TENSIOACTIFS NON IONIQUES 32
III.1. Généralité 32
III.2.Sucroester 33
III.3. Voies de synthèse des sucroesters 33
III.3.1. Synthèse par voie chimique 33
III.3.2. Synthèse par voie enzymatique 34
III.4.Lipases 35
III.4.1.Définition 35
III.4.2. Lipase de *Ricinus communis* L 36
III.5. Immobilisation des lipases 37
III.5.1. Immobilisation par inclusion 37
III.5.2. Immobilisation par adsorption 39
III.5.3. Immobilisation par liaison covalente 39

Partie Expérimentale

INTRODUCTION.....41

IV. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....42

IV.1. Matériels 42

IV. 1.1. Appareillages 42

IV.1.2. Produits utilisés..... 42

IV.2. Méthodes 43

VI.2.1. Préparation de la lipase 43

IV.2.2. Préparation de la lipase immobilisée 46

IV.2.3. Synthèse d'ester de glucose..... 48

IV.2.4..Prédiction de type d'émulsion 50

V. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....52

V.1. Préparation de la lipase 52

V.3. Préparation de la lipase immobilisée 52

V.4. Synthèse d'ester de sucre..... 54

V.4.Détermination de la valeur de HLB et de l'indice d'émulsification E_{24} 55

CONCLUSION GÉNÉRALE.....58

RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE.....60

ANNEXES.....69

Liste des figures

Figure I.1: Schéma représentatif d'un tensioactif 3

Figure I.2: Tensioactif anionique : dodécylsulfonate de sodium.....5

Figure I.3: Tensioactif cationique : sel d'amine grasse à 16 atomes de carbon.....6

Figure I.4: Tensioactif amphotère : N-dodécyl N,N-diméthyl ammoniopropane sulfonate.....6

Figure I.5: Tensioactif non ionique : dodécanol hexaéthoxylé.....7

Figure I.6: Modèle d'une molécule de tensioactifs son placement à l'interface.....8

Figure I.7: Adsorption d'une molécule de tensioactif sur une surface solide.....10

Figure I.8: Solubilisation d'huile dans une solution de tensioactif.....11

Figure I.9: Les différentes structures des tensioactifs.....13

Figure II.1: Phase dispersée et phase dispersante d'une émulsion.....16

Figure II.2: Schéma représentant les deux types d'émulsion simple.....20

Figure II.3: Schéma représentant les deux types d'émulsions doubles.....21

Figure II.4: Schéma représentatif d'une bi-émulsion.....21

Figure II.5: Différentes phases d'instabilités d'une émulsion.....25

Figure II.6: Mûrissement d'Ostwald.....27

Figure II.7: Floculation.....27

Figure II.8: Crémage de sédimentation.....28

Figure III.1: Estérification chimique du (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranose.....33

Figure III.2: Transésterification chimique du saccharose.....34

Figure III.3: Transésterification enzymatique du lactose.....35

Figure III.4: Estérification enzymatique de l'acide D-glucoronique.....35

Figure III.5: La plante (A) et le fruit (B) de ricin (*R*icinus *Communis* L).....36

Figure III.6: Structure de l'alginate. G: acide guluronique M: acide mannuronique.....38

Figure III.7: Formule chimique du chitosan.....38

Figure IV.1: Protocol d'extraction et de purification de la lipase.....45

Figure IV.2: Dosage de l'activité enzymatique.....46

Figure IV.3: Protocol d'immobilisation de la lipase dans l'alginate de sodium.....48

Figure IV.4: Synthèse de sucroester.....49

Figure IV.5: Etapes de séparation du sucroester.....50

Figure V.1: Structure d'alginate de sodium.....53

Figure V.2: Structure du polymère alginate de calcium.....53

Figure V.3: Schéma illustrant la sphérification des billes d'alginate dans la solution chlorure de calcium.....54

Figure V.4: Estérification de D-glucose.....54

Figure V.5: Synthèse d'ester de glucose avec l'acide palmitique **(I)** et l'acide oléique **(II)**.....55

Figure V.6: Émulsion H/E d'une solution de palmitate de glucose et d'huile d'olive avant et après l'agitation.....57

Liste des tableaux

Tableau I.1 : Application des tensioactifs dans l'industrie…….....15

Tableau II.1 : Types d'émulsions selon la taille de la phase dispersée…….……16

Tableau II.2 : Exemples d'ingrédients de la phase huileuse.....17

Tableau II .3 : Types d'émulsion simple……....20

Tableau II .4 : Taille des gouttes et aspect des émulsions.....22

Tableau II.5 : Types d'émulsions selon la concentration de la phase interne.....23

Tableau IV.1 : Appareillages utilisés…….….42

Tableau IV.2 : Substances chimiques utilisées au cours de la synthèse de sucroester.....43

Tableau IV.3: Différents solvants utilisés lors de cette étude……43

Tableau V.1 : Activité lipasique pour LPP et LB....……...52

Tableau V.2 : Valeurs de HLB d'esters de glucoses.....56

Abréviations

γ : Tension interfaciale (N/m)

ϕ : Taux de rétention

Π : Pression de Laplace

ρ : Densité de la gouttelette

ρ_o : Densité de la phase continue

η : Viscosité de la phase continue (Pa.s = Pl)

v **:** Taux de crémage

a: Représente l'indice d'acide

A : Aire interfaciale

CMC: Concentration micellaire critique

CAL B : Lipase de *Candida antartica* B

C_{HCl}: Concentration d'HCl,

d_{32} : Diamètre de Sauter

E_{24}: Indice d'émulsification après 24 heures

E/H : Eau dans Huile

E/H/E : émulsion E/H dans l'Eau

Eq : Equation

EC: Enzyme commision

fi : Nombre de gouttes en fréquence

g : accélération locale due à la gravité (9,81 m.s-2)

H/E : Huile dans l'Eau

H/L : Hydrophile dans Lipophile

HLB : Hydrophile-Lipophile-Balance

HLD : La différence hydrophile-lipophile

H/L/H : Emulsion H/L dans hydrophile

IA: l'indice de l'acide d'acide gras

IS: représente l'indice de saponification de l'acide gras

LB : Lipase brute

LPP : Lipase partiellement purifiée

L/H : Lipophile dans Hydrophile

L/H/L : Emulsion L/H dans lipophile

M_{AG}: Masse molaire de l'acide gras.

M_{KOH}: Masse molaire de KOH,

ni : Nombre de gouttes par classe

O/W : Oil in water

R : rayon de la gouttelette (m)

S: solvant

S_{tot} : surface total

tr/min : tour par minute

U : unité d'activité enzymatique

V': Volume d'HCl nécessaire à la neutralisation du blanc,

V: Volume d'HCl nécessaire à la neutralisation de l'échantillon,

VC : Volume de phase continue

VD : le volume de la phase dispersée

V_{tot} : le volume total

W/O: Water in Oil

W/O/W: Emulsion W/O in Water

T: Température

t: temp

U: unité d'activité enzymatique

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

L'emploi de ressources naturelles comme matières premières propose une alternative pour la synthèse de nouveaux composés respectueux de l'environnement comme les tensioactifs [1]. Aussi connus sous le nom d'agent de surface ou "surfactant" en anglais, qui sont très utilisés dans le domaine de la formulation, présents dans de nombreux produits de notre vie quotidienne [2].

Ces molécules au squelette amphiphile ont des propriétés physico-chimiques, qui permettent la formulation de produits de consommation courante pour la détergence ou la cosmétique et dans de nombreux autres domaines d'application en industrie [1]. Ces propriétés expliquent les nombreuses fonctions d'un tensioactif, en effet, ces molécules permettent la diminution de la tension superficielle entre deux surfaces. Leur faculté à s'organiser sous forme de micelles dans l'eau explique également l'importance de leur utilisation dans le domaine de la formulation (des savons, par exemples) [2].

Nous somme plus particulièrement intéressés aux tensioactifs non ioniquesde type sucroester constituent la classe la plus récente de tensioactifs. Ces tensioactifs présentent de nombreux avantages dont notamment la diversité des structures disponibles et le caractère inoffensif, tant pour la santé que pour l'environnement, leurs applications potentielles touchent des domaines aussi variés que l'alimentation humaine (par exemple la mousse au chocolat), la formulation de médicaments et de produits phytosanitaires ou encore l'étude des protéines membranes [4]. Ce sont très polyvalents, leur polyvalence, propriétés et structures permettent la production de certains produits et types chimiques comme les émulsions.

Les émulsions sont des systèmes dispersés métastables constitués d'au moins deux liquides non miscibles et d'un agent amphiphile, l'un des liquides est dispersé dans le second sous forme de petites gouttes sphériques dont la taille varie selon les conditions de 0.1 à quelques dizaines de micromètres. Les émulsions sont largement produites et utilisées dans l'industrie. Ce sont aussi bien des produits alimentaires comme le lait, le beurre, les mayonnaises, les vinaigrettes, que des produits cosmétiques ou pharmaceutiques à appliquer sur la peau tels que les crèmes, ou les pommades [3].

Il existe des multiples modes de synthèse envisageables pour la production de ces molécules à l'échelle du laboratoire. Une méthode de synthèse a été la plus étudiée au cours

de cette dernière décennie : la voie biotechnologique exploitant les capacités de synthèse d'enzymes [4].

L'objectif principal de ce projet a été de comprendre et d'étudier les propriétés émulsifiantes des tensioactifs non ioniques. Pour cela, nous avons tenté de synthétiser un tensioactif non ionique de type sucroester par voie enzymatique puis nous avons défini ses propriétés en vue d'une application pharmaceutique.

Ce mémoire est structuré en quatre chapitres :

Le **chapitre 1** présente quelques généralités sur les tensioactifs et leurs morphologies ainsi leurs domaines d'applications en industrie.

Des généralités sur les émulsions est consacrée dans le **chapitre 2**.

Un aperçu des procédés de synthèse des tensioactifs non ioniques est résumé dans le **chapitre 3**

Enfin, dans le **chapitre 4** nous présentons la liste des produits et appareillages utilisés, ainsi que les différents modes opératoires suivis par l'objet de ce travail qui est la synthèse de la lipase à partir des graines de ″*Ricinus communis* L″ puis l'immobilisation de la lipase pour utilisée dans la production de sucroester afin de préciser les différents propriétés émulsifiantes pour un usage pharmaceutique.

Une conclusion générale est donnée à la fin de ce manuscrit.

Chapitre I

Etude bibliographique sur les tensioactifs

I. TENSIOACTIFS

I.1.Historique

Parmi tous les tensioactifs que nous connaissons aujourd'hui, le plus ancien est le savon. Les premiers utilisateurs de savon auraient été les Sumériens en 2500 av. J.C. Ils fabriquaient les pains de savon à partir d'huiles végétales ou animales, de cendre d'os ou de bois et d'extraits de plantes parfumées. L'apparition du savon, tel que nous le connaissons aujourd'hui, aurait eu pour cadre la ville de Savone en Italie, d'où il tire son nom. Pendant des siècles, le savon servait d'onguent, de cosmétique de remède. Il faut attendre le Moyen-âge pour que le savon soit utilisé pour laver le linge. Il restera pendant longtemps un produit de luxe et deviendra accessible à toutes les bourses qu'au tournant du **XX**ème siècle [5].

À partir des années 50, le savon se voit remplacé par des tensioactifs de synthèse dans les formulations détergentes [6].

Les tensioactifs, tels que nous les connaissons aujourd'hui, sont donc relativement récents **[**5].

I.2. Définition

Les tensioactifs ou surfactants, appelés également agents de surface, d'origine naturelle ou synthétique ont fait l'objet de nombreuses études fondamentales et appliquées.

De telles molécules sont dites "actives" à la surface parce qu'elles conditionnent la tension de surface d'une solution. Ces molécules sont amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent une structure moléculaire spéciale : d'une part une chaîne à caractère lipophile (ou queue hydrophobe) et d'autre part, un groupement hydrophile dit tête polaire comme indiqué sur la **figure I.1** [7].

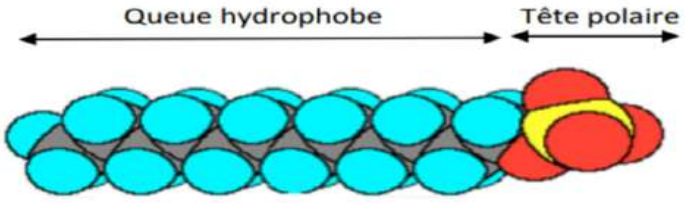


Figure I.1 : Schéma représentatif d'un tensioactif (dodécyl sulfate de sodium)**[**8]

La queue hydrophobe correspond généralement à une longue chaine hydrocarbonée linéaire qui peut contenir des hétéroatomes comme l'oxygène, l'azote, le souffre ou le fluor.

La tête hydrophile est habituellement constituée d'un atome, d'un groupement d'atomes ou d'un ion [9]. Selon la nature de la partie hydrophile, on distingue les composés ioniques et les non-ioniques. Les premiers sont classés selon la charge de la tête hydrophile : anionique, cationique et zwitterionique (possédant deux charges de signes opposés). Les tensioactifs non ioniques peuvent comporter une chaine hydrocarbonée sur laquelle sont fixés des groupements polaires (alcool, éther ou amine) [9].

I.3. Origines des agents de surface

I.3.1. Agents de surface d'origine naturelle

Historiquement, le premier agent de surface: le savon constitué par des chaînes grasses d'origine naturelle était déjà fabriqué par les gaulois par mélange des corps gras avec des cendres alcalines, sa constitution a été définie par les travaux de chevreuil [10].

Les corps gras naturels, d'origine végétale ou animale, représentent toujours une base importante de la chimie des agents de surface. Ces produits naturels ont une longueur de chaîne variant de 8 à 22 atomes de carbone. La chaîne hydrocarbonée est linéaire et comporte un nombre pair d'atomes de carbone. En plus de ces chaînes saturées, il existe des chaînes insaturées, spécialement en C_{18} (oléique, linoléique.....) [9].

I.3.2. Agent de surface d'origine synthétique

Historiquement, le premier dérivé tensioactif totalement synthétique était un alkyl naphtaléne sulfonate de soude préparé en 1917, ceci afin de pallier le manque de savon dû à la pénurie des corps gras dont souffrait l'Allemagne à cette époque. Actuellement, la pétrochimie a pris la relève et les matières premières de synthèse de l'industrie des agents de surface proviennent de la chimie de l'éthylène, du propylène, des paraffines, des α-oléfines et des coupes pétrolières [10].

I.4. Classification des agents de surface

Les tensioactifs sont classés selon la nature de leur partie hydrophile en quatre grandes familles:

I.4.1. Tensioactifs anioniques

Ils comportent un groupement ionique chargé négativement en solution aqueuse (**figure1.2**) en l'occurrence carboxylate, sulfate, sulfonate ou phosphate. Ces agents tensioactifs sont les plus utilisés industriellement. Les tensioactifs anioniques sont généralement utilisés pour augmenter la durée de vie des mousses, ou comme détergent, ce qui explique leur présence dans de nombreux produits cosmétiques tels que les shampoings et les dentifrices ainsi que dans la plupart des détergents à vaisselle [11].

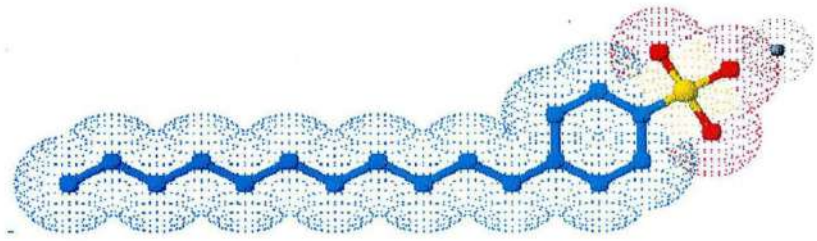


Figure I.2 : Tensioactif anionique: dodécylsulfonate de sodium ($C_{12}H_{25}C_6H_4SO_3^-Na^+$) [12].

Exemples:

- Les alkylsulfates: R-O-SO_3^-- avec R longue chaîne carbonée: on les appelle aussi syndets (détergents synthétiques) le dodécyl sulfate d'ammonium ou lauryl sulfate d'ammonium: $C_{12}H_{25}$-O-SO_3^--, NH_4^+ est présent dans les dentifrices, shampooings, produits pour le bain et la douche,.....

- Les sulfonates : R-SO_3-, Na^+ (R: longue chaîne carbonée).

I.4.2. Tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques possèdent un groupement ionique chargé positivement en solution aqueuse (**figure I.3**), ce sont généralement des sels d'ammonium quartenaire. Ils sont largement utilisés en tant qu'agents de conditionnement dans les produits de soins pour cheveux et textiles. Les tensioactifs cationiques forment des complexes insolubles dans l'eau avec les anioniques [11].

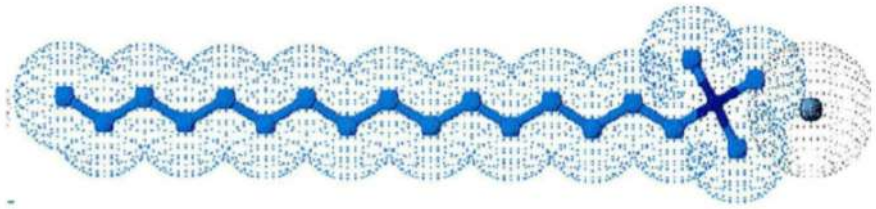


Figure I.3 : Tensioactif cationique: sel d'amine grasse à 16 atomes de carbone ($C_{16}H_{33}NH_3^+Cl^-$) [12]

Exemple:

Les sels d'ammonium quaternaire, RR1R2R3 N^+, allergisants et assez irritants pour les yeux et la peau, ils sont peu employés en cosmétologie où ils sont alors associés à d'autres composés pour atténuer ces effets. Ils ont cependant des propriétés bactéricides intéressantes.

Leurs propriétés démêlantes font qu'ils entrent dans la formulation de nombreux après-shampooings.

I.4.3. Tensioactifs amphotères

Ces surfactants comportent deux groupements ioniques, l'un cationique et l'autre anionique. Le pH détermine le caractère dominant:

- Anionique à pH alcalin

-Cationique à pH acide

-Près du point isoélectrique, ils sont par conséquent parfois classifiés comme non ioniques. Les plus répandus sont les bétaïnes et les sulfobétaïnes.

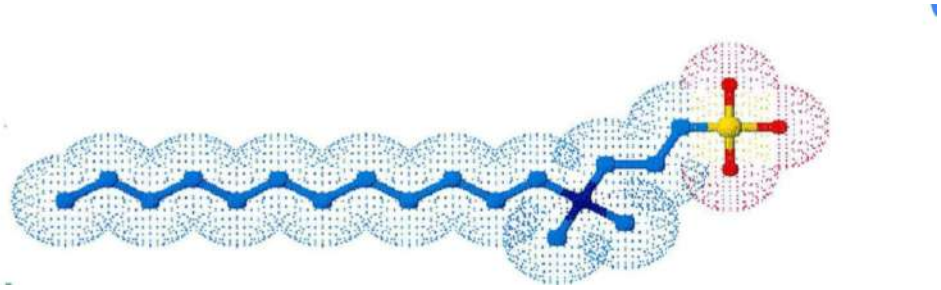


Figure.1.4 : Tensioactif amphotère : N-dodécyl N,N-diméthyl ammoniopropane sulfonate [12]

I.4.4. Tensioactifs non ioniques

La partie hydrophile est neutre mais fortement polaire. Ces produits sont biologiquement sans risques. On les retrouve dans la formulation de nombreux shampoings pour leurs pouvoirs détergents et moussants et dans les émulsions [13].

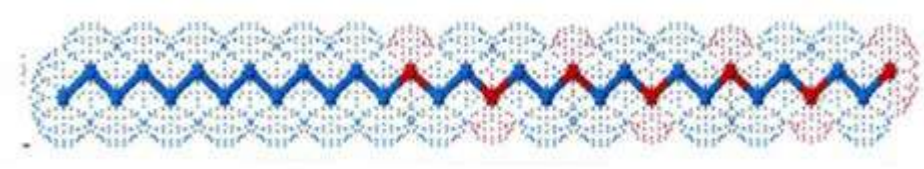


Figure.1.5 : Tensioactif non ionique le dodécanol hexaéthoxylé:
n-$C_{12}H_{25}O(CH_2CH_2O)_6H$ [12]

1.4.5 Agents tensioactifs polymériques

Outre les classes de tensioactifs mentionnées, il existe d'autres types parmi lesquels, on peut citer les composés polymériques, siliconés, fluorés, etc. [14].

Certains de ces agents tensioactifs sont indispensables dans des procédés qui mettent en jeu des macromolécules naturelles, comme lors de la déshydratation du pétrole brut [15]. La polymérisation des agrégats permet d'augmenter leur stabilité, mais aussi d'introduire de nouvelles propriétés telles que l'encapsulation ou la redispersion [16].

I.5. Les Propriétés des tensioactifs

I.5.1. Structure amphiphile

Les tensioactifs sont des substances dont la molécule possède à la fois un groupe polaire et un groupe apolaire, le groupe polaire est un groupe fonctionnel qui comporte des hétéroatomes d'oxygène, de soufre, d'azote ou de phosphore. Ce sont ces hétéroatomes qui produisent une forte interaction avec les solvants polaires, particulièrement l'eau [17].

En ce qui concerne le groupe apolaire, il s'agit en général d'une chaîne hydrocarbonée ancrée directement sur le groupe polaire ou par l'intermédiaire d'un noyau aromatique. Dans des cas très particulières le groupe apolaire peut contenir des groupes silicones ou fluorocarbones [17]. C'est leur dualité polaire-apolaire qui confère aux surfactifs leur caractère amphiphile. Ce terme a été fabriqué par Winsor [18] à partir des racines "amphi"

et 'philos' qui possède une affinité des deux cotés (vis à vis des substances polaires et apolaires).

La plupart des amphiphiles sont surfactifs parce qu'ils se localisent de préférence à la surface ou à l'interface. La **figure 1.6**montre que c'est dans cette position que la molécule amphiphile peut satisfaire sa double affinité[17].

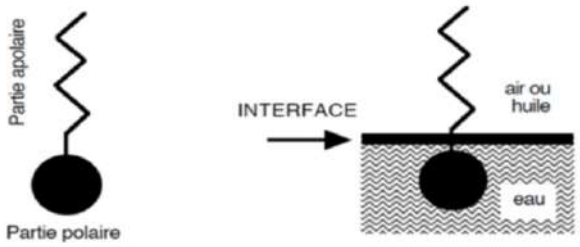


Figure 1.6 : Modèle d'une molécule de tensioactifs son placement à l'interface [19]

Encore faut-il que les interactions soient relativement équilibrées. En effet, si le groupe polaire est trop "petit" par rapport au groupe apolaire, par exemple comme dans le dodécanol, l'affinité pour la phase apolaire domine, et on a affaire à une huile légèrement polaire plutôt qu'à un surfactif. Il en va de même si le groupe polaire est beaucoup pus "gros" que le groupe apolaire, comme par exemple dans le sulfonate de toluène. Dans ce cas, on n'a pas un surfactif mais un hydrotrope essentiellement soluble dans l'eau [17].

On voit donc qu'un "bon" surfactif possède des affinités polaire et apolaire relativement équilibrées. Ceci ne signifie pas qu'elles doivent être égales. Il faut toutefois que les deux affinités ne soient pas trop différentes, sinon une des affinités l'emporte définitivement sur l'autre, et la substance perd son caractère surfactif [17]. On peut se demander alors dans quelles conditions un amphiphile est un surfactif. Il n'ya pas de réponse toute faite, mais on peut dire qu'il faut une affinité suffisante à la fois pour les phases polaire et apolaire (comme pour l'eau de l'huile**)** [17].

Un groupe polaire ionisé de type carboxylate, sulfonate, ammonium, sulfate, ou phosphate, possède des interactions de l'ordre de plusieurs kcal/mole avec l'eau, par contre un groupe non-ionisé comme par exemple un acide carboxylique, un alcool, une amine, un éther ou un ester, possède des interactions beaucoup plus faibles et il faudra soit l'ionisé par ajustage du pH, soit lui donner un ordre de multiplicité suffisant. C'est le cas des

surfactifs non-ionique comme le polyéthoxylés dans lesquels les groupes oxydes d'éthylène forme une chaîne polyéther. On se rappellera tout d'abord que les interactions de type London entre les groupes méthylène sont de l'ordre de quelques dixièmes de kcal/mole, c'est-à-dire beaucoup plus faibles que les interactions du groupe polaire avec l'eau. Il faudra donc un certain ordre de multiplicité pour produire une interaction suffisante entre le groupe apolaire et l'huile.

Dans la pratique les molécules de surfactif comportent au moins une douzaine d'atomes de carbone dans leur groupe apolaire, parfois beaucoup plus [17]**.** En conséquence, la plupart des surfactifs possèdent un groupe polaire compact auquel on se référera parfois comme à la tête hydrophile, et un groupe apolaire de type long chaîne hydrocarbonée que l'on appellera souvent queue hydrophobe ou lipophile. Ce commentaire justifie à posteriori la représentation de la molécule de surfactif (**Figure 1.7)** [17]**.** Cette structure particulière des surfactifs leur confère deux propriétés fondamentales qui sont responsables de pratiquement toutes les propriétés des systèmes qui contiennent ces substances: leur adsorption aux surfaces ou aux interfaces, et leur association polymoléculaire sous forme de micelle ou autres structures [17].

I.5.2 Adsorption

Quand une molécule de surfactif se place de façon orientée à une interface eau-huile on dit qu'elle s'adsorbe. L'adsorption est un phénomène spontané qui produit une diminution d'énergie libre du système. L'adsorption se produit aussi aux surfaces de type air-eau ou solide -eau, et dans ce cas la force motrice est surtout l'effet hydrophobe [17]. Si la surface solide est chargée, l'adsorption peut néanmoins être facilitée ou inhibée suivant la charge du surfactif. Si le solide est hydrophobe on peut imaginer une adsorption par la queue comme l'indique la **figure 1.7** [17].

De ce fait l'adsorption produit souvent une ségrégation des molécules suivant leur plus au moins forte tendance à sortir de la solution, ou leur plus au moins forte attraction pour les conditions interfaciales **[**17].

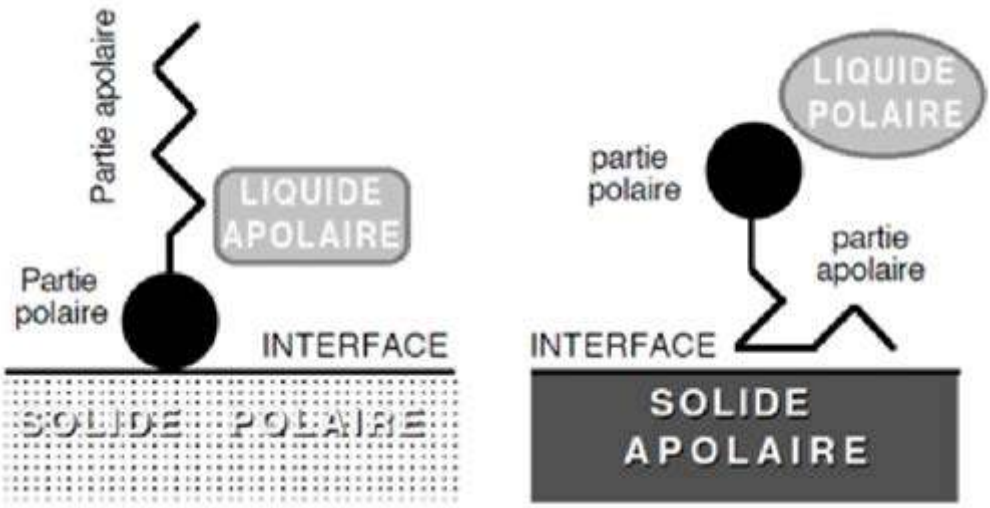


Figure.1.7 : Adsorption d'une molécule de tensioactif sur une surface solide [20]

I.5.3 Association

Cette propriété fondamentale des tensioactifs est leur capacité d'association qui se développe à partir d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique, en abrégé CMC [7-9-21].

La micelle est une structure de type polymère d'association, dans laquelle les molécules de tensioactifs possèdent une énergie libre plus faible qu'en solution. En solution aqueuse la force motrice de la micellisation est l'effet hydrophobe c'est-à-dire la soustraction de la queue lipophile du milieu aqueux. La micellisation est une sorte de micro-précipitation, et c'est le résultat d'un compromis entre les effets qui tendent à favoriser l'extraction du tensioactif de la phase aqueuse, tel l'effet hydrophobe, et les effets qui favorisent la dissolution du tensioactif dans l'eau ou ceux qui s'opposent à la formation de la structure micellaire. Les micelles sont responsables d'une propriété fondamentale des solutions de tensioactifs: leur pouvoir solubilisant. La **figure 1.8** montre la variation de la concentration d'hydrocarbure solubilisé dans une solution de tensioactif en fonction de la concentration de ce dernier. On constate qu'à partir de la CMC la solubilisation augmente considérablement grâce à la migration d'hydrocarbure au centre apolaire des micelles. La solubilisation micellaire peut se produire suivant divers mécanismes. Elle permet de solubiliser de l'huile dans de l'eau et vice-versa, ce qui est d'un grand intérêt pratique dans de nombreuses applications comme la détergence, la vectorisation de médicaments, la séparation ou l'extraction sélective.....[22].

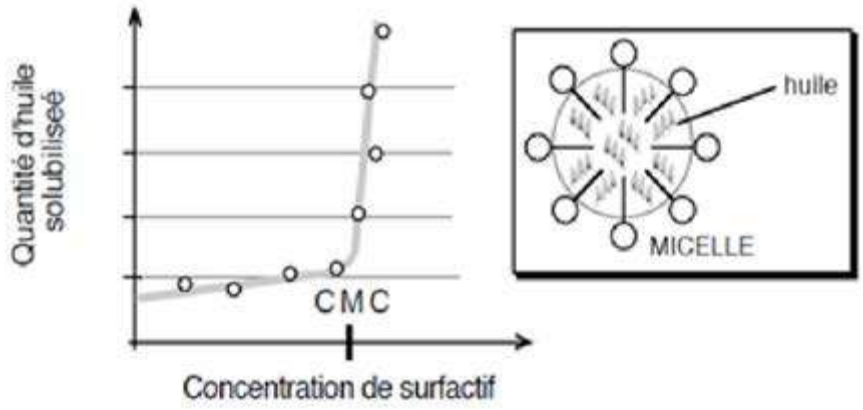


Figure1.8 : Solubilisation d'huile dans une solution de tensioactif [20]

I.6. les différentes fonctions des tensioactifs

La partie hydrophile et la partie hydrophobe influent sensiblement les propriétés tensioactives et la connaissance de la valeur de la balance hydrophile/hydrophobe (HLB) est très importante car les diverses caractéristiques applicatives du surfactant dépendent de cette valeur. La HLB est une méthode proposée en 1949 par Griffin [23]**,** elle permet de chiffrer l'équilibre existant entre la partie hydrophile et la partie lipophile de la molécule de tensioactif. Cet équilibre est lié à la solubilité dans l'eau. L'échelle varie de 0 à 20 (0 étant attribué à un produit totalement hydrophobe et 20 à un produit totalement hydrophile). Plus la valeur est élevée, plus la solubilité dans l'eau est grande .les tensioactifs peuvent avoir plusieurs fonctions [23].

I.6.1. Fonctions émulsifiantes (HLB 4-6)

Les tensioactifs interviennent de deux manières dans la formation des émulsions, d'une part ils réduisent la tension interfaciale (quantité d'énergie requise pour créer une aire interfaciale unité) entre les liquides immiscibles, d'autre part ils forment une pellicule interfaciale entre le liquide dispersé (phase interne) et le milieu continu (phase externe), agissant comme une barrière protectrice qui retarde ou empêche la séparation des liquides, [7,9,21]. La fonction émulsifiante est la fonction la plus importante pour la formulation des cosmétiques, vu que les émulsions présentent des avantages considérables sur les autres types de préparation: elles sont faciles à appliquer, relativement économiques grâce à leur concentration élevée en eau, et rendent possible l'usage simultané de substances

hydrosolubles et liposolubles. Enfin elles présentent généralement un aspect agréable. Les émulsions pharmaceutiques sont utilisées depuis l'Antiquité pour administrer huiles et médicaments. Aujourd'hui, on a restreint leur usage à cause de leur instabilité potentielle [23].

I.6.2. Fonctions humidifiantes (HLB 7-9)

L'humidification ou plus généralement la mouillabilité, est le déplacement d'un fluide en contact avec une surface, par un autre fluide, ce processus implique la participation d'au moins trois phases [7-9]. Généralement, le terme humidification s'applique au déplacement de l'air en contact avec une surface liquide ou solide. Ce déplacement est obtenu par de l'eau ou une solution aqueuse d'un composé -l'agent humidifiant- capable d'augmenter cette capacité de déplacement, en diminuant la tension interfaciale et, par voie de conséquence en augmentant l'affinité du liquide mouillant pour la surface à mouiller. L'action humidifiante est très importante dans les formes galéniques solides, dans lesquelles l'adsorption du tensioactif sur la surface des particules hydrophobes facilitera leur mobilité et augmentera la vitesse de désagrégation de celles-ci et libérera les principes actifs il est rare que cette activité se déroule seule (crèmes à raser, bains d'huile), on l'associe généralement à l'action nettoyante et dispersante [23].

I.6.3. Fonctions dispersantes (HLB 10-12)

Ils permettent la dispersion fine d'une phase dans une autre phase en diminuant la tension interfaciale. Ces propriétés sont utilisées pour réparer des dispersions en milieu liquide de solides finement divisés, L'instabilité d'une suspension peut se manifester par sédimentation et agglomération du solide (difficilement réversibles), par floculation (réversible) et par recristallisation [23].

I.6.4. Fonctions solubilisantes (HLB 13-18)

L'action solubilisante est conditionnée par la formation de micelles, agrégats de molécules tensioactives, qui se forment au sien du solvant, une fois que l'interface est saturée de monomères. La concentration à laquelle apparaissent les micelles est la concentration micellaire critique (CMC). L'importance pratique de cette application réside dans le fait qu'il est possible de solubiliser des composés déterminés dans des solvants dans lesquels ils seraient insolubles. Ainsi, il est possible de solubiliser des huiles dans des

milieux polaires (eaux de toilette, lotions toniques.....) ou des substances hydrosolubles dans des milieux non polaires (maquillage, fards.....) [23].

I.7. Structures des tensioactifs

Quelle que soit la nature des têtes polaires, elles peuvent présenter des structures très diverses (**figure1.7**). Dans le cas des tensioactifs monocaténaires, bicaténaires et tricaténaires, les têtes polaires portent respectivement une, deux et trois chaînes alkyles. Les bolaformes, quant à eux, sont constitués de deux têtes polaires reliées par un ou deux segments hydrophobes. Enfin, les géminés sont constitués de deux tête polaire portant chacune une chaîne alkyle reliées par un segment hydrophobe appelé espaceur mésogène [24].

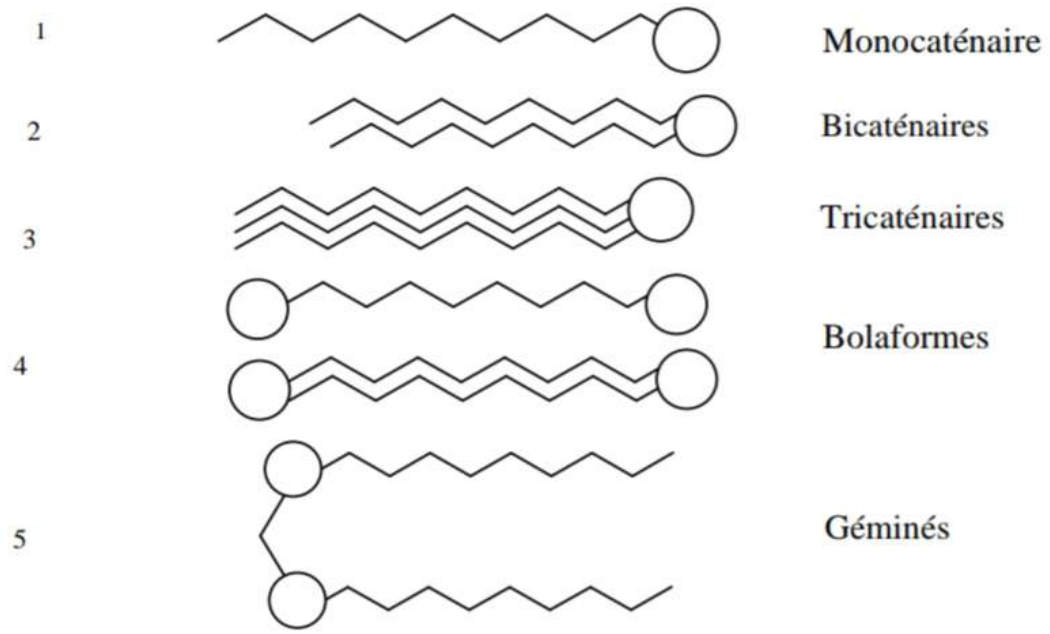


Figure.1.9 : Les différentes structures des tensioactifs [25]

I.8. Les applications des agents de surface

Les domaines d'application des tensioactifs sont multiples. Ils jouent le rôle soit de matière première de base pour la formulation de produits détergents, cosmétiques et autres, soit de produit auxiliaires dans les procédés de fabrication de l'industrie textile, des métaux, du cuire, du pétrole, etc. Principalement trois grands secteurs d'activités, à savoir les secteurs de la détergence, de la cosmétique et des usages industriels sont distingués [26].

I.8.1 Le secteur de détergence

Les tensioactifs entrent dans la formulation de tous les détergents, ils représentent en moyenne 20% de leur composition. Le tensioactif est adapté à l'usage et à l'aspect souhaité pour le détergent, il peut se présenter sous forme de poudre ou de liquide [27].

I.8.2. Le secteur de la cosmétique

Il faut distinguer deux grands domaines d'application: la cosmétique rincée et la cosmétique blanche. La cosmétique rincée englobe les produits d'hygiène lavants tels que les shampooings, gels douches et dentifrices. Dans ce domaine la propriété détergente du tensioactif est recherchée. La cosmétique blanche concerne les produits de beauté en général, c'est-à-dire, les crèmes, les laits, les maquillages et autres produits de soins. Les tensioactifs sont principalement utilisés pour générer des émulsions, leur pouvoir adoucissant est également fortement sollicité [26].

I.8.3. Le secteur pharmaceutique

La pharmacie utilise un grand nombre de tensioactifs, ils entrent dans les formulations de principes actifs dans les pommades, sirops et autres. Les liposomes en tant que vésicules phospholipidiques bi lamellaire, sont ainsi un cas particulier d'émulsion d'eau dans l'huile où la solution aqueuse de principe actif est emprisonnée dans deux parois hydrophobes formant des microgouttelettes dispersées dans l'huile. Ils ont aussi des applications dans le domaine médical [26].

I.8.4. Le secteur industriel et agricole

De nombreux domaines sont concernés: les industries des additifs alimentaires, des céramiques, du cuir, des matières plastiques, métallurgique, minière, du papier, des peintures, du pétrole, routière, textile, etc. Les produits phytosanitaires et les engrais sont également de gros consommateurs de tensioactifs. Le **tableau I.1** rapporte quelques exemples d'utilisation technique dans les industries:

Tableau I.1 : Application des tensioactifs dans l'industrie [28] :

Type d'activité	Mode d'utilisation des tensioactifs
Cuir	Propriété mouillantes et détergentes pour la préparation des peaux au tannage
Matières plastiques	Dispersion de PVC, caractère antistatique
Métallurgie	Nettoyage et dégraissage des métaux, inhibiteurs de corrosion
Peintures	Stabilisations des formulations Mouillage de pigments Ajout d'un caractère hydrophobe aux peintures, antirouille
Textile	Lubrification des fibres Lavage et teinture des fibres traitées
Phytosanitaire et engrais	Maintien du conditionnement sous forme de granulés et empêche l'agglomération des substrats

Chapitre II

Propriétés émulsifiantes des tensioactifs

II. ÉMULSIONS

II.1. Définition

Une émulsion est, selon la définition courante, une dispersion d'un liquide en fines gouttelettes dans un autre liquide (**figure II.1**), les deux liquides étant non miscibles :

-le liquide sous forme de gouttelettes est qualifié de phase dispersée, phase discontinue ou phase interne;

-l'autre liquide est appelé phase dispersante, phase continue ou phase externe [29].

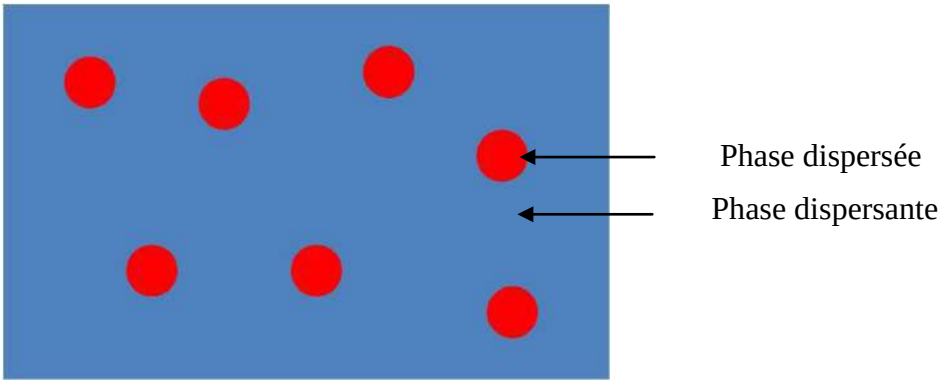


Figure II.1 : Phase dispersée et phase dispersante d'une émulsion [29]

En fonction de la taille moyenne des gouttelettes on distingue des émulsions plutôt grossières, appelées *émulsions* ou *microémulsions* et des émulsions plus fines, submicroniques, appelées *mini* ou *nano émulsions* (**Tableau II .1**).

Tableau II.1 : Types d'émulsions selon la taille de la phase dispersée [29]

Taille (µm)	Désignation
1 à 10	Microémulsions ou émulsions
0.1 à 1	Mini-émulsions ou nano-émulsions

II.2. Composition des émulsions

Elles sont composées d'une phase lipophile, d'une phase hydrophile et d'un émulsifiant :

II.2.1. Phase lipophile

La phase huileuse, appelée également *phase grasse*, *phase lipophile* ou *phase organique*, comporte des huiles, des cires et des graisses (respectivement liquides, solides ou semi-solides a température ambiante) d'origine végétale, animale ou minérale [30]. Des substances synthétiques dérivées ou non, des substances naturelles sont aussi utilisées. La phase huileuse d'une émulsion est généralement composée d'un mélange d'ingrédients. Le **tableau II.2** donne quelques exemples d'ingrédients de la phase huileuse [29].

Tableau II.2 : Exemples d'ingrédients de la phase huileuse [29] :

Origine	Cires	Graisse	Huiles
Animale	Cire d'abeille Blanc de baleine	Lanoline	Huile de baleine, de foie de requin
Végétale	Cire de carnauba	Beurre de cacao Beurre de karité	Huile d'arachide, d'olive, d'amande, de soja….
Minérale	Paraffine	Vaseline	Vaseline Paraffine
Synthétique	Esters gras	Esters gras	Esters et alcools gras Huile de silicone

II.2.2. Phase hydrophile

La phase aqueuse ou *phase hydrophile* contient l'eau et divers composants hydrosolubles. Les solutés de la phase aqueuse sont de nature diverse : ions minéraux, acides, bases, vitamines, glucides, protéines, etc.

En fonction du type d'émulsion (alimentaire, cosmétique, pharmaceutique) des substances peuvent être ajoutées a l'une ou l'autre phase pour conférer au produit diverses propriétés (augmentation de la durée de conservation, modification du gout, de la texture, de l'aspect, maintien de l'humidité, etc.). Les additifs utilisés sont très varies. Ils se distribuent entre phase aqueuse et phase grasse suivant leur solubilité. Leur utilisation est soumise a une réglementation qui dépend du secteur industriel considère.

Les produits pharmaceutiques et les produits cosmétiques de soin comportent d'autre part au moins un principe actif (appelé *actif* ou *ingrédient actif* pour les cosmétiques) dans l'une ou l'autre phase de l'émulsion [29].

II.2.3. Émulsifiants

Les émulsions conventionnelles sont des systèmes thermodynamiquement instables qui se séparent, plus ou moins rapidement, en deux phases. On parle de systèmes *hors équilibre*. En raison de cette instabilité les émulsions industrielles comportent toujours des émulsifiants, ou *émulsionnants*, formant un film interfacial, ou *film mince*, ou *membrane interfaciale*, autour des globules de phase dispersée.

Il existe plusieurs familles d'émulsifiants : les tensioactifs, les polymères, les protéines et les particules.

Tensioactifs

Les tensioactifs sont de petites molécules amphiphiles ayant des propriétés émulsifiantes. De par la présence d'un pôle hydrophile et d'un pôle lipophile, ces molécules se placent à l'interface entre les phases de l'émulsion. Du côté hydrophile de l'interface, le tensioactif établit des liaisons hydrogènes et des liaisons ioniques avec la phase aqueuse. Du côté lipophile, la molécule établit des liaisons de Van der Waals et des interactions hydrophobes avec la phase grasse. Cette disposition permet de diminuer la tension interfaciale du système, ce qui favorise l'émulsification (diminution de l'énergie à apporter) et stabilise l'émulsion. D'autres phénomènes interviennent sur la stabilisation par les tensioactifs, c'est le cas par exemple des tensioactifs non ioniques à longue chaine hydrophile qui stabilisent le système par répulsion stérique. Nous pouvons également citer le cas des tensioactifs ioniques qui s'opposent au rapprochement des gouttelettes par répulsion électrostatique [31].

Polymères

Les polymères sont également des émulsifiantes efficaces. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique, leur structure pouvant être très variée aussi bien chimiquement qu'architecturalement [32]. Nous distinguons les homopolymères, formés à partir d'un seul type de monomère, des copolymères composés d'au moins deux monomères différents. Contrairement aux tensioactifs classiques, les polymères créent une répulsion stérique importante entre les gouttes, ce qui permet de stabiliser des émulsions sur des temps longs avec des concentrations faibles en émulsifiant [33]. De plus, grâce à leur masse molaire élevée, ils sont généralement considérés comme moins toxiques que les tensioactifs [34].

Protéines

Les protéines peuvent aussi être utilisées comme émulsifiants. Les protéines sont des macromolécules biologiques formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques. Ces macromolécules sont donc constituées d'un enchaînement d'acides aminés et présentent une organisation spatiale complexe. Ainsi, elles possèdent souvent des propriétés tensioactives. Les protéines permettent donc de stabiliser efficacement des émulsions mais aussi de leur conférer des propriétés physico-chimiques originales. Les émulsions stabilisées par des protéines sont souvent très stables dans le temps grâce à la bonne répulsion stérique et électrostatique garantie par ces macromolécules [35]. Par exemple, la β-caséine est une protéine que l'on trouve en autre dans le lait et qui est très utilisée pour stabiliser des émulsions dans l'industrie agroalimentaire [36]. Les protéines permettent notamment la stabilisation efficace d'émulsions multiples en deux étapes d'émulsification [37].

Particules

Les émulsions stabilisées par des particules sont appelées émulsions de Pickering. Les particules peuvent être de nature inorganique, à base de silice par exemple ou organique, comme les latex et les micro-gels. Leur structure peut être homogène, cœur – écorce ou bien Janus. Les particules stabilisent les émulsions sur des temps très longs grâce à leur adsorption quasi irréversible à l'interface, dès que leur taille dépasse 0,5 nm17 et permettent l'obtention d'émulsions dont les gouttes sont de taille bien contrôlée et faiblement poly disperses grâce au phénomène de coalescence limitée [34].

II.3. Divers Types d'émulsions

Il existe plusieurs types d'émulsions, selon la dispersion des phases aqueuses et huileuses :

II.3.1. Émulsions simples

Suivant que la phase continue est lipophile ou hydrophile, on définit deux types d'émulsions (**Tableau II .3**) :

Tableau II .3 : Types d'émulsion simple [29] :

Sens de l'émulsion	Phase dispersée	Phase dispersante	Symbole
Emulsion de type aqueux (Huile dans Eau)	Lipophile	Hydrophile	H/E, L/H ou O/W
Emulsion de type huileux (Eau dans Huile)	Hydrophile	Lipophile	E/H, H/Lou W/O

Les symboles utilisés désignent toujours la phase dispersée en premier. Les émulsions de type huileux étant les moins courantes, elles sont parfois appelées *émulsions inverses*. La **figure II.2** donne une représentation schématique des deux types d'émulsions [29].

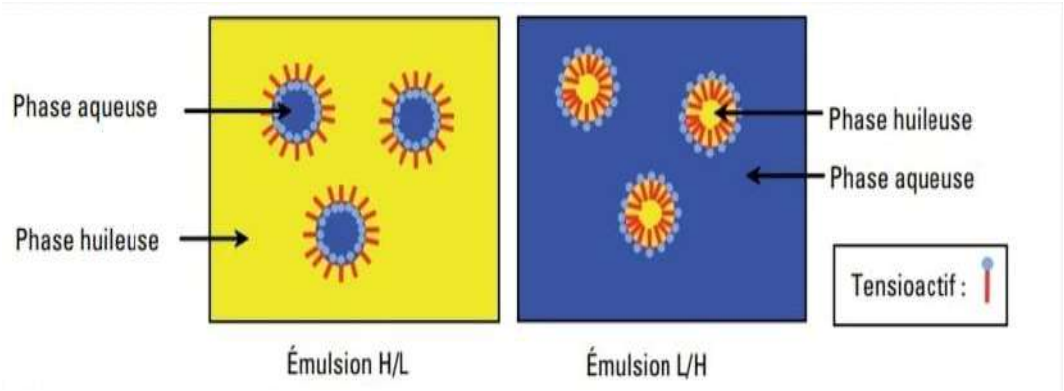


Figure II.2 : Schéma représentant les deux types d'émulsion simple [29]

II.3.2. Émulsions multiples

Il s'agit d'émulsions ou de dispersion d'une émulsion dans une phase dispersante :

- la dispersion d'une émulsion H/L dans une phase aqueuse (H) donne une émulsion H/L/H (ou E/H/E ou W/O/W) ;
- à l'inverse, la dispersion d'une émulsion L/H dans une phase huileuse (L) donne une émulsion L/H/L.

Ces deux exemples correspondent au cas le plus simple d'émulsions multiples : les émulsions doubles (**Figure II.3**). On y distingue trois phases : interne / phase intermédiaire sont généralement qualifiées de globules, disperses dans la phase externe, et les sphères de phase interne sont appelées gouttelettes. Cette distinction n'existe pas pour les émulsions simples pour lesquelles les sphères de phase dispersée sont appelées indifféremment gouttelettes ou globules.

Chaque phase peut contenir des ingrédients actifs différents, ce qui permet la présence d'actifs incompatibles, l'un en phase interne, l'autre en phase externe.

Ce type d'émulsion permet aussi de protéger un principe actif contenu dans l'eau interne ou l'huile interne ou, plus généralement, de séparer des ingrédients solubles mais ne devant pas être en contact dans la même phase.

Les émulsions multiples sont surtout utilisées en pharmacie et en cosmétique. Leur formulation est plus complexe que celle des émulsions simples [29].

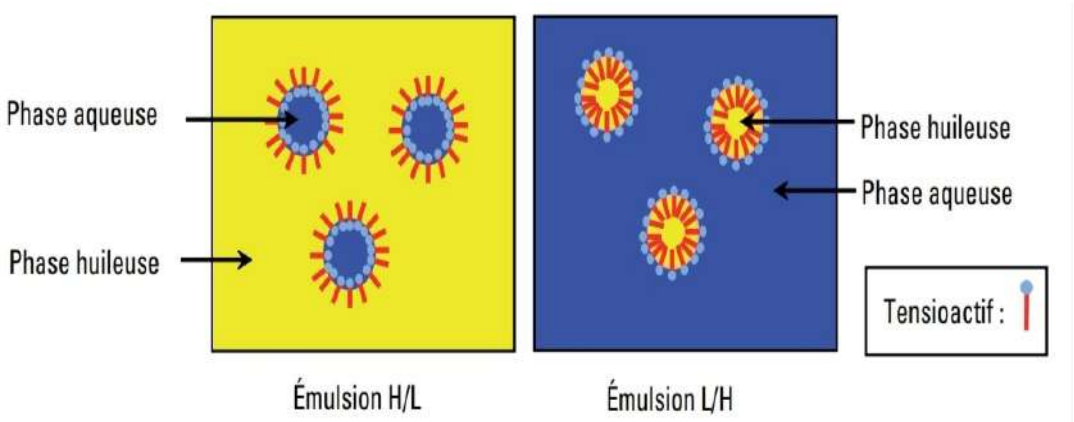


Figure II.3 : Schéma représentant les deux types d'émulsions doubles [29]

II.3.3. Bi- émulsions

Ce sont des émulsions contenant deux différentes phases internes de gouttelettes, soit de même nature (mais de taille différente), soit de nature différente (quel que soit la taille) (**figure II.4**) [38].

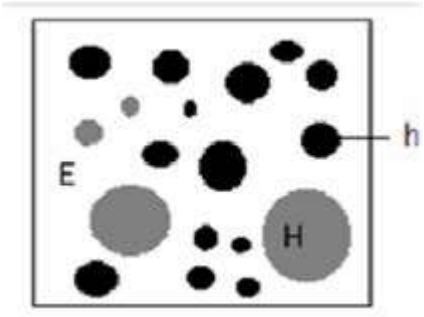


Figure II.4 : Schéma représentatif d'une bi-émulsion [38]

II .4. Description des émulsions

II .4.1 Aspect

L'aspect des émulsions est un caractère organoleptique dépendant de :

- La taille des gouttelettes de la phase dispersée ;
- La concentration de l'émulsion ;
- Le rapport d'indice de réfraction entre les phases.

L'aspect de l'émulsion dépend du rapport entre lumière transmise et lumière diffusée. Plus la taille des gouttelettes est grosse plus la diffusion est importante et plus l'émulsion présentera un aspect opalescent, blanc. Dans le cas des microémulsions, le système est translucide. **Le tableau II.4** montre l'aspect des émulsions en fonction de la taille des globules.

Pour modifier l'aspect de l'émulsion sans changer la granulométrie ni la fraction volumique de la phase dispersée, il faut faire varier l'indice de réfraction de l'une des deux phases en augmentant sa concentration, par exemple en saccharose [31].

Tableau II .4 : Taille des gouttes et aspect des émulsions [31]

Taille des gouttelettes	Aspect de l'émulsion
> 100 µm	Gouttes visibles
10-100 µm	Blanc laiteux
0.1-10 µm	Opalescent
< 0,1 µm	Translucide

II .4.2. Concentration

Le terme de « concentration de l'émulsion » se rapporte en fait à la concentration de la phase dispersée. Cette concentration est mesurée par la fraction volumique de la phase dispersée appelé également taux de rétention :

$$\phi = {}^{VD}/_{VD+VC} \qquad \textbf{(II.1)}$$

Avec :

VD le volume de la phase dispersée

VC le volume de phase continue

Ce paramètre est déterminant pour la stabilité de l'émulsion, sa fabrication et ses propriétés macroscopiques. En effet, il est représentatif des interactions observées entre gouttelettes. Trois types d'émulsions sont définis par ce paramètre (**Tableau II.5**) [39].

Tableau II.5 : Types d'émulsions selon la concentration de la phase interne [39]

ϕ	**Type d'émulsion**
< 0,02	Emulsion diluée
0,3 < ϕ < 0,74	Emulsion concentrée
> 0,74	Emulsion très concentrée

II .4.3. Granulométrie

La granulométrie définit la taille des gouttelettes de la phase dispersée. On définit une distribution des tailles et un diamètre moyen. La distribution peut être monomodale ou bimodale, mono dispersé ou poly dispersé (cas le plus courant).

La distribution des tailles est continue, cependant les données sont généralement exprimées en classes granulométriques. Les résultats peuvent être exprimés en nombre de gouttes par classe (ni) ou en fréquence (fi). Il est possible de modéliser les distributions granulométriques par une loi log-normale.

L'une des notions importantes pour définir la granulométrie de l'émulsion est le diamètre moyen. Nous pouvons définir ce diamètre moyen différemment en fonction de ce que nous voulons faire ressortir.

Le diamètre de Sauter, noté d_{32}, correspond au diamètre moyen de la distribution en surface. Il est proportionnel au rapport entre le volume total (V_{tot}) des particules (considérées sphériques) et leur surface totale (S_{tot}) [31] :

$$d_{32} = \frac{6V_{tot}}{S_{tot}} = \frac{\Sigma_i n_i d_i^3}{\Sigma_i n_i d_i^2} \qquad \textbf{(II.2)}$$

II .4.4. Aire interfaciale

L'aire interfaciale (A) correspond à l'aire des particules, calculée à partir du diamètre de Sauter :

$$A = \pi . d_{32}^{\ 2} \qquad \textbf{(II.3)}$$

Nous définissons également une aire interfaciale spécifique (A), qui correspond à l'aire interfaciale rapportée à une unité de volume :

$$A = \frac{6\phi}{d_{32}} \qquad \textbf{(II.4)}$$

Cette grandeur permet de déterminer la quantité d'émulsifiant et l'énergie à fournir pour l'émulsification. Plus l'aire interfaciale est grande, plus le procédé appliqué est efficace [39].

II .4.5. Rhéologie

La rhéologie est l'étude des écoulements soumis à des contraintes mécaniques. Entre le fluide newtonien (fluide idéal dont la viscosité ne dépend pas du cisaillement) et le solide élastique (solide qui se déforme sous sollicitation, qui reprend sa forme initiale en l'absence de contrainte, mais qui ne s'écoule pas) se situent les fluides viscoélastiques. Les émulsions font partie des fluides au comportement intermédiaire : les fluides viscoélastiques. La viscosité de la préparation détermine son conditionnement, son utilisation et certains caractères organoleptiques. La rhéologie est déterminée par la composition et la structure de l'émulsion.

La viscosité dynamique du système est étudiée en imposant une contrainte de cisaillement. En faisant varier la contrainte, nous obtenons des rhéogrammes permettant de caractériser le fluide. Si la viscosité ne dépend pas de la contrainte, le fluide est Newtonien ; si sa viscosité augmente avec la contrainte, il est rhéo-épaississant et si elle diminue avec la contrainte, il est rhéo-fluidifiant. Il existe d'autres cas plus complexes comme les fluides à seuil (se comportant comme des solides élastiques en dessous d'un seuil de contrainte pouvant induire l'écoulement) ou les fluides thixotropes (dont la viscosité dépend de « l'histoire » du fluide).

La viscosité d'une émulsion dépend à la fois de paramètres propres à sa composition (concentration, granulométrie, viscosités de la phase continue et dispersée et tension inter faciale) et des paramètres extérieurs (température, historique du cisaillement, notamment dans le cas des fluides thixotropes) [31].

II.5.Instabilité des émulsions

Une émulsion est un système métastable : ce sont des systèmes thermodynamiquement instables mais potentiellement cinétiquement stables sur une échelle de temps modérée. Ainsi, afin de tendre vers le minimum d'énergie libre du système, des phénomènes de déstabilisation de phases apparaissent, de nature réversible ou irréversible (**Figure II.5**). Ce minimum d'énergie est atteint lorsque l'aire minimale de contact entre les deux phases (H/E) est observée, ce qui conduit à une séparation de phases [40].

On peut alors dénombrer plusieurs types de déstabilisation:

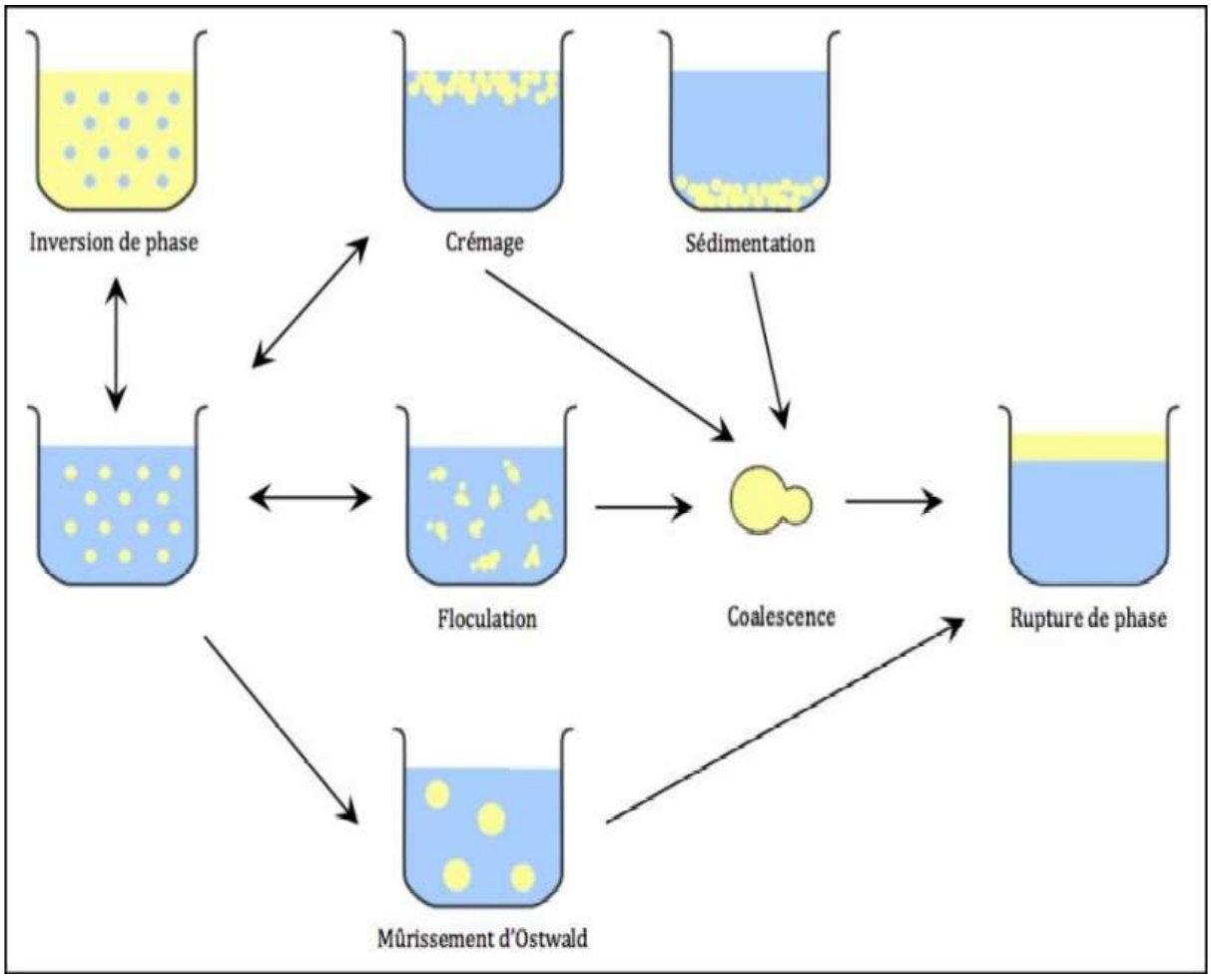


Figure II.5: Différentes phases d'instabilités d'une émulsion [40].

II.5.1. Déstabilisation chimique

Comme pour toute forme pharmaceutique, l'émulsion peut être le siège de réactions entre le principe actif et les autres composants de la phase grasse ou la phase aqueuse ou encore entre le conditionnement primaire et les composants de l'émulsion, une étude détaillée des possibilités d'interférences entre les différents composés est nécessaire pour éviter les incompatibilités éventuelles [41].

II.5.2. Déstabilisation biologique

L'émulsion peut constituer un milieu nutritif idéal pour les microorganismes, la contamination bactérienne et fongique est susceptible d'engendrer la rupture du système [41].

II.5.3. Déstabilisation physique

Au cours du temps, une émulsion évolue fatalement vers la séparation des phases. Les mécanismes de déstabilisation d'une émulsion peuvent être répartis en deux catégories :

- La première regroupe les phénomènes de migration des gouttes et met en jeu des phénomènes réversibles: floculation, sédimentation et crémage.
- La seconde concerne la variation de taille des gouttes, consistant en des processus irréversibles : coalescence, mûrissement d'Ostwald ou inversion de phase [42].

II.5.3.1 Mûrissement d'Ostwald

Le mûrissement d'Ostwald est un phénomène irréversible pendant lequel les plus petites gouttelettes en solution dans la phase continue se dissolvent et se déposent sur des gouttelettes plus grosses afin d'atteindre un état thermodynamiquement plus stable dans lequel le rapport surface / surface est minimisé (**Figure II.6**). La force motrice pour le mûrissement d'Ostwald est la différence de pression de Laplace entre petites et grandes gouttelettes. La pression plus élevée chez les plus petites gouttes les mène à migrer vers les gouttes de diamètre plus important [43].

Dans une gouttelette de rayon R, la pression de Laplace est donnée par la formule suivante :

$$\Pi=\frac{2\gamma}{R} \qquad \textbf{(II.5)}$$

Avec :

γ = la tension inter faciale à la limite de séparation (N/m)

R = rayon de la gouttelette (m)

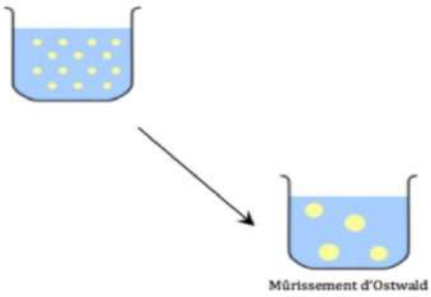


Figure II.6: Mûrissement d'Ostwald [43]

II.5.3.2 Floculation

La floculation résulte de l'agrégation des gouttelettes dispersées dans la phase continue sous l'action d'interactions attractives (comme les forces de Van Der Waals ou la déplétion). Des agrégats ainsi formés sont appelés flocs dans lesquels les gouttelettes conservent leur intégrité et forment des entités séparées. Ce phénomène, tout comme le crémage et la sédimentation est non destructif et donc réversible (**Figure II.7**) [44].

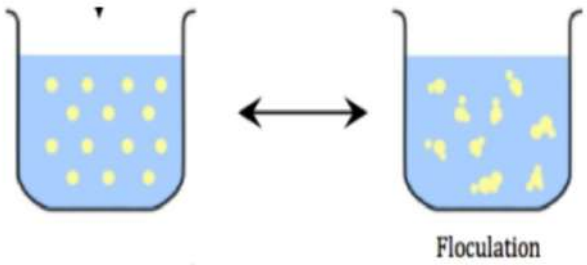


Figure II.7: Floculation [44]

II.5.3.3 Sédimentation et Crémage

Pour des huiles à densité moindre par rapport à celle de l'eau, un phénomène de crémage est observé. On retrouve ainsi la phase dispersée, moins dense, en haut du système. L'inverse se passe pour le phénomène de sédimentation où la phase dispersée est plus dense (phase aqueuse) (**Figure II.8).**

Ce phénomène de crémage est contrecarré par une force, le Mouvement Brownien, qui résulte de l'agitation thermique des molécules [43].

Le taux de crémage peut être estimé à partir de l'équation de Stokes :

$$v = 2gr^2(\rho - \rho_o)^9\eta \qquad \textbf{(II.5)}$$

Avec :

r = rayon de la gouttelette (m)

ρ = densité de la gouttelette

ρ_o = densité de la phase continue

η = viscosité de la phase continue (Pa.s = Pl)

g = accélération locale due à la gravité (9,81 m.s-2)

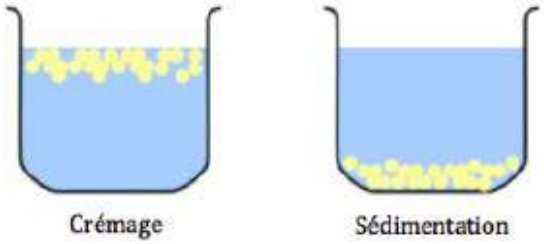


Figure II.8: Crémage et Sédimentation [43]

C'est un phénomène non destructif, donc réversible si soumis à une agitation du système. On peut ainsi jouer sur la viscosité (valeur plus grande de viscosité pour la phase continue), sur le rayon de la gouttelette et sur une petite différence de densité entre l'huile et la phase aqueuse afin de ralentir le phénomène [44].

II.5.3.4. Coalescence

La coalescence est un phénomène irréversible qui résulte de la rupture du film inter facial entre les gouttelettes de la phase dispersée. Elle engendre une réduction de la surface inter faciale, ainsi les forces qui s'exercent sur la gouttelette sont moindres, aboutissant à un état plus stable [43].

Ces interactions entre gouttelettes sont à contrôler : il s'agira de stabiliser l'interface, jouant avec les forces répulsives pour contrecarrer les forces attractives, de nature électrostatiques (tensioactifs ioniques chargés au niveau de la surface des gouttelettes) ou stériques [44].

II.5.3.5. Inversion des phases :

L'inversion des phases est un phénomène qui se traduit par un brusque changement du sens de l'émulsion. L'émulsion E/H se transforme en une émulsion H/E ou inversement, et les propriétés du milieu diphasique s'en trouvent bouleversées [42].

II.6. Molécules stabilisant les émulsions

Les agents stabilisants jouent un rôle essentiel dans la formation et la conservation des émulsions. Nous présentons ici quelques notions des stabilisants qu'il est utile de connaître pour bien aborder l'émulsification :

- Agent absorbant : Substances ajoutées à l'émulsion pour absorber des substances hydrosolubles et/ou liposolubles, qui seraient dissoutes ou finement dispersées (exemple : magnésium aluminium silicate).
- Agent de contrôle de viscosité : Substances ajoutées aux produits afin d'augmenter ou de diminuer la viscosité du produit fini (exemple : carbomer).
- Liants : Substances ajoutées pour conférer une cohésion accrue au produit (exemple : méthylcellulose).
- Opacifiants : Substances ajoutées à l'émulsion transparentes ou translucides afin de la rendre plus résistantes à la pénétration de la lumière visible et du rayonnement proche de celle-ci (exemple : magnésium aluminium silicate, calcium carbonate).
- Agent antistatique : Substances ajoutées à l'émulsion pour réduire l'électricité statique en neutralisant la charge électrique présente sur une surface donnée (exemple : hydroxypropyl guar) [39].

II.7. Formulation des émulsions

Prédire le type d'émulsion que l'on va obtenir pour un système eau–huile–émulsifiant donné est crucial dans la plupart des domaines d'application. Cette partie a pour objectif de décrire les principales méthodes de prédiction existantes :

II.7.1. Diagramme ternaire

Pour la formulation des émulsions on peut faire appel aux diagrammes ternaires. Ce sont des triangles équilatéraux, les sommets correspondant à l'huile, l'eau et au surfactif. On détermine par tâtonnement la zone des émulsions stables pour des valeurs de chaque constituant. D'un point de vu pratique, lorsqu'il s'agit de formuler une émulsion, il n'est pas nécessaire d'étudier tout le diagramme mais de se limiter aux zones spécifiques des émulsions [38].

II.7.2. Méthode HLB

Pour formuler des émulsions stables, la méthode HLB (ou méthode de Griffin) est très utilisée. Elle ne prend en compte que l'importance relative du pôle hydrophile et du pôle hydrophobe. La méthode HLB est basée sur la classification des tensioactifs par hydrophilie croissante et sur l'utilisation de règles simples de calcul des propriétés des mélanges de tensioactifs.

Le principal avantage du HLB est son additivité, très utile lorsque deux tensioactifs doivent être utilisés en mélange pour obtenir une formulation stable. En effet, il existe un HLB requis par la phase hydrophobe pour une stabilité optimale.

Une échelle de valeurs de HLB de 0 à 20 a ainsi été définie. Dans le cas d'émulsions de type eau dans l'huile, on utilise des tensioactifs de faible HLB (HLB < 7). Pour des émulsions de type huile dans l'eau, on choisit des tensioactifs de plus fort HLB (HLB ≥ 8).

La capacité du tensioactif à diminuer la tension inter faciale entre les deux phases à émulsionner constitue un critère de choix du tensioactif [45].

II.7.3. Méthode HLD

La différence hydrophile-lipophile (HLD), est un nombre sans dimension qui traduit l'écart d'une formulation donnée à la formulation optimale. Les termes qui augmentent la valeur du HLD accroissent l'affinité du surfactif pour l'huile, tandis que les termes qui la diminuent, augmentent l'affinité du surfactif pour l'eau.

Le HLD est un concept global qui prend en compte toutes les contributions physico-chimiques de la formulation, comme la nature des phases, la température du système ou le type de surfactif utilisé. De plus, le HLD est une expression numérique qui permet de faire des calculs et de prédire les compensations entre les effets des différentes variables. Les valeurs numériques des paramètres nécessaires dans les équations sont données dans la littérature [46].

II.7.4. Inversion de phase

Une inversion de phase a lieu quand la phase continue d'une émulsion devient la phase dispersée, et inversement. Une inversion d'émulsion peut se faire lors d'un changement de formulation ou de composition qui provoque un changement du type de l'émulsion. Ce type d'inversion est appelé inversion dynamique car elle a lieu à cause de ce changement continu.

Une inversion peut être favorable ou défavorable, et sera exploitée ou évitée. L'intérêt principal du procédé d'émulsification par inversion de phase est la taille des gouttes, généralement plus faible qu'avec un procédé d'émulsification direct, en apportant moins d'énergie mécanique. Il existe deux méthodes : inversion par température (PIT) et inversion par agitation.

La détection de l'inversion de phase se fait soit par changement de la conductivité, soit par changement de la rhéologie (Il a été noté un maximum de viscosité au moment de l'inversion de phases) [45].

II.8. Stabilité d'une formulation

La stabilité d'une formulation revêt plusieurs aspects :

II.8.1 Stabilité physique

L'émulsion ne doit pas montrer de démixtion. Une démixtion peut être provoquée par la coalescence (on recueille de la phase dispersée) ou par un phénomène de crémage/sédimentation (la phase continue apparait). La stabilité physique stricto sensu inclut aussi une invariance du comportement rhéologique et de la granulométrie [31].

II.8.2. Stabilité chimique

Aucun des composants de l'émulsion ne doit participer à une réaction chimique pouvant, soit modifier de manière grave la stabilité physique, soit perturber les propriétés applicatives (aspect, couleur, odeur, efficacité) [31].

II.8.3. Stabilité microbiologique

La formulation ne doit pas être un milieu de culture pour levures, moisissures et germes bactériens, au risque de se dégrader (modification de viscosité, couleur, odeur, démixtion), mais surtout pour éviter tout problème applicatif chaque fois que la santé publique est concernée (domaine cosmétique, pharmaceutique). La stabilité microbiologique est obtenue par une sélection rigoureuse de conservateurs [47].

Chapitre III

Procédés de synthèse des tensioactifs nonioniques

III. PROCEDES DE SYNTHESE DES TENSIOACTIFS NON IONIQUES

III.1. Généralité

Les tensioactifs non ioniques ont commencé à acquérir une importance industrielle depuis la découverte, au début des années 1930, des dérivés éthoxylés produits par l'addition de l'oxyde d'éthylène sur des molécules possédant des hydrogènes actifs. Aujourd'hui ils sont utilisés dans tous les domaines industriels, de la détergence domestique au textile, dans les préparations pharmaceutiques et dans l'agriculture, pour n'en citer que quelques-uns. Leurs "bonnes propriétés" toxicologiques, leur position avantageuse par rapport aux réglementations en vigueur, leur facilité d'approvisionnement, leur bon rapport coût/efficacité, la large variété des produits disponibles, leur compatibilité avec les autres tensioactifs et l'étendue de leurs propriétés physico-chimiques sont à l'origine de leur emploi toujours croissant [48].

Les tensioactifs non ioniques sont compatibles avec toutes les autres classes de tensioactifs. Cette compatibilité doit être interprétée comme une stabilité dans les formulations, mais pas forcément comme une absence d'interaction. En effet les tensioactifs non ioniques peuvent modifier les propriétés d'autres tensioactifs et vice-versa, notamment en termes d'adsorption, de solubilisation, de pouvoir moussant et de détergence. Les tensioactifs non ioniques sont beaucoup moins sensibles aux ions multivalents que les tensioactifs anionique, mais les ions monovalents réduisent la solubilité dans l'eau des dérivés d'oxyde d'éthylène. Les tensioactifs non ioniques sont plus solubles dans les solvants polaires et non polaires que les tensioactifs ioniques, ce qui permet une mise en œuvre plus simple dans plusieurs applications industrielles [49].

Compte tenu de quasi innocuité des composés non ioniques et de la demande croissante en produits respectueux de l'environnement, les surfactants glucidiques constituent une voie émergente dans l'industrie des tensioactifs.

Les esters de sucre ou sucroester, sont dans ce contexte les molécules appropries. Les esters gras de sucre sont des tensioactifs intéressants en raison de leur grande biodégradabilité, leur faible toxicité et leur grande tolérance vis-à-vis des yeux et de la peau [50].

III.2. Sucroester

Le terme sucroester regroupe l'ensemble des produits obtenus par réaction entre un sucre et un ou plusieurs acides gras [51].

Les sucres constituent sans aucun doute une matière première polaire de choix pour l'élaboration de biotensioactifs. Leur point commun est de posséder un nombre important de fonctions hydroxyles participant à la formation de réseaux de liaisons hydrogène en présence d'eau. Selon leur famille (hexose ou pentose) et/ou leurs poids moléculaires (mono-, di-, tri-,oligo- ou polysaccharides), ils permettront de moduler aisément la HLB de l'agent de surface ainsi que sa géométrie générale [50].

III.3. Voies de synthèse des sucroesters

III.3.1. Synthèse par voie chimique

La synthèse chimique des esters de sucre fut pour la première fois réalisée par Herzfeld dans les années 50 [52]. Ces principaux avantages résident dans que cette méthode est économique, rapide avec un bon rendement (<24h) et réalisable avec de nombreuse molécules [53].

Nous allons citer quelques exemples de synthèses chimiques tirés de la littérature.
Damez C. a réalisé l'estérification du (2, 3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranose (**figure III.1**) avec du chlorure d'un décènoyle en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane pendant 20hpour donner un mélange α/β (30/70) d'un déc-10'-ènoyl (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranosideavec un rendement de 88% [54].

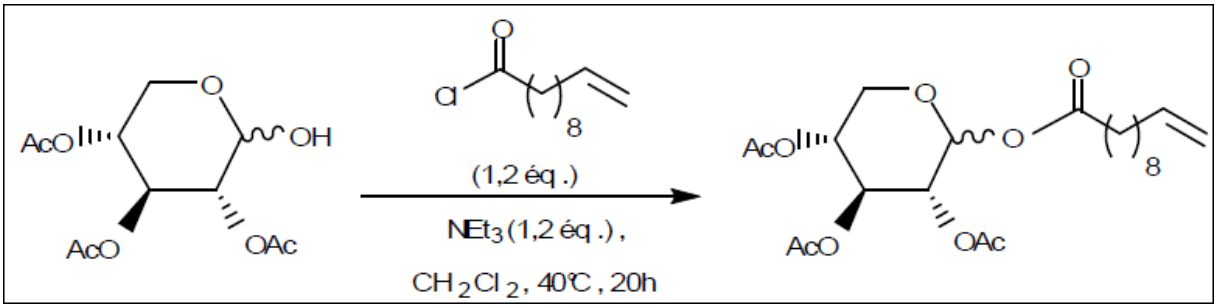


Figure III.1 : Estérification chimique du (2,3,4-tri-O-acétyl)-D-xylopyranose [55].

Un autre exemple donné par la **figure III.2**, est celui de la transestérification chimique du Saccharose [55].

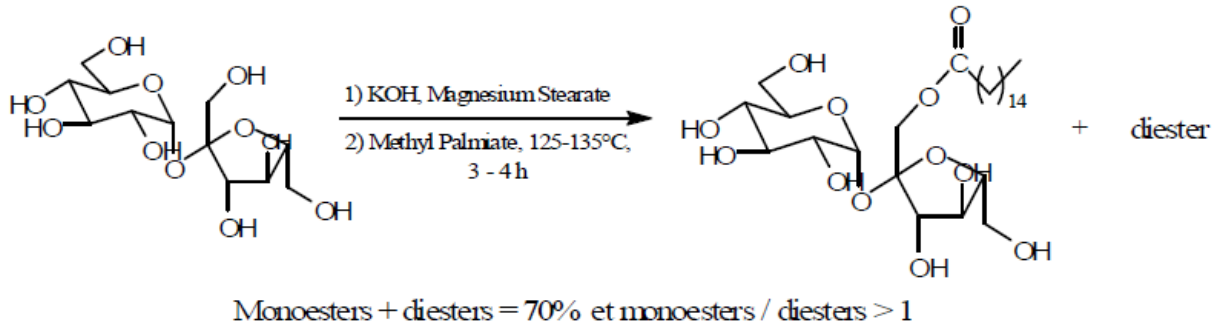


Figure III.2 : Transésterification chimique du saccharose [55].

Mais cette voie rencontre plusieurs problèmes :

- Obtention de sous-produits (provoquant une coloration)
- La toxicité des solvants utilisés
- La caramélisation qui est due à l'élévation de la température
- La faible sélectivité : Ce type de synthèse ne permet de contrôler ni le site de réaction, ni le nombre de groupements hydroxyles qui seront estérifiés [53].

III.3.2. Synthèse par voie enzymatique

Ces dernières années, une alternative a été évoquée par de nombreux groupes de recherche l'utilisation d'enzymes afin d'orienter les réactions de synthèse [56]. L'utilisation d'enzymes pour catalyser les réactions de synthèse permet de cibler le site de réaction et aussi d'opérer dans des conditions plus douces, limitant ainsi les réactions secondaires comme la caramélisation. Les seuls contaminants présents suite à la synthèse enzymatique sont le sucre et l'acide gras résiduels [57].

Le principe de la synthèse enzymatique est d'utiliser une enzyme hydrolytique (le plus souvent une lipase) dans un milieu non aqueux. Dans ces conditions, l'activité de la lipase est inversée, passant de l'hydrolyse à l'estérification [56]. La biocatalyse permet d'envisager la production sélective de structures complexes et originales [53].

De nombreux essais de synthèse d'esters de sucres par voie enzymatique ont été réalisés à l'échelle du laboratoire, citons quelques exemples :

La **figure III.3** illustre l'acylation enzymatique du D-glucose avec le vinyle caprylate catalysée par la lipase du *Candida antartica* B (CAL B) dans l'acétone, avec un rendement de 67% [58].

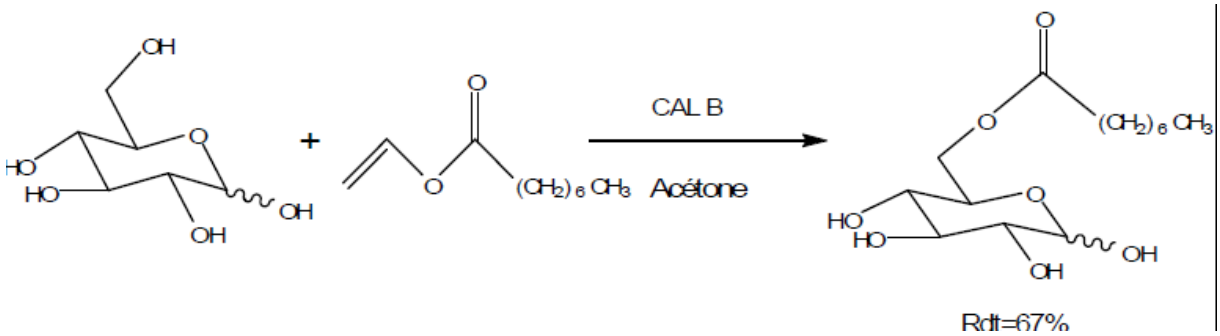


Figure III.3 :Transésterification enzymatique du lactose [58].

Razafindralambo et coll. ont réalisé l'estérification enzymatique de l'acide D-glucoronique en présence de la CAL B [59] comme nous le montre la **Figure III.4** suivante :

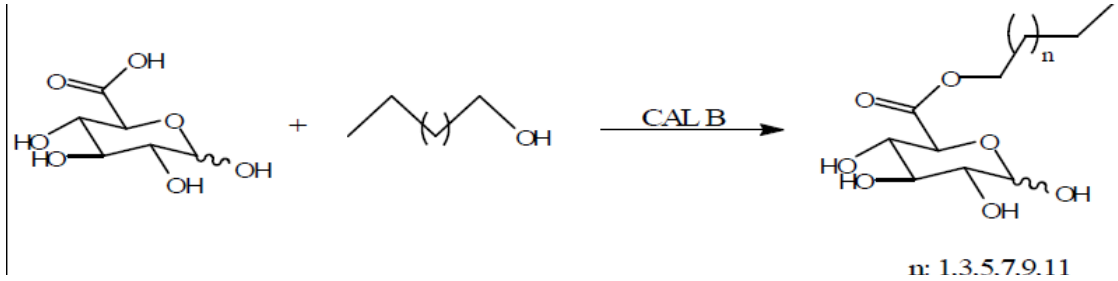


Figure III.4 : Estérification enzymatique de l'acide D-glucoronique [59].

La voie enzymatique se distingue par plusieurs avantages qui sont la sélectivité, les conditions de réaction douces, la purification aisée, la composition du produit définie..... etc [53].

III.4. Lipases

III.4.1. Définition

Les lipases sont des hydrolases d'esters carboxyliques et appartiennent à la classe des Triacylglycérols acyle-hydrolases (EC3.1.1.3). Ce sont des enzymes largement répandues dans la nature. Elles ont des origines diverses (bactérienne, fongique, végétale, pancréatique, hépatique) et présentent un panel de spécificités de substrat très large par rapport à d'autres classes [60]. Par exemple, la lipase B de *Candida antarctica* est employée pour catalyser l'acylation d'une grande diversité de substrats tels que les alcools, les amines, les acides aminés, les sucres ou encore des flavonoïdes [61]. Un autre avantage

intéressant est que ces biocatalyseurs ne nécessitent pas la présence d'un coenzyme contrairement à beaucoup d'autres [62].

III.4.2. Lipase de *Ricinus communis* L

Le ricin (*Ricinus Communis Linn*) est une plante du sous règne des Phanérogames, de l'embranchement des Angiospermes, de la classe des *Magnoliopsidae*, de la sous classe des *Rosidae*, de l'ordre des *Euphorbiales* et de la famille des *Euphorbiaceae* qui compte entre 5000 et 8000 espèces réparties dans environ 300 genres. Le genre *Ricinus* est représenté par une seule espèce : *Ricinus communis* L.

Le ricin est un arbuste vivace robuste de 3 à 12 m de haut, Les feuilles sont longuement pétiolées, palmées, lobées (5 à 9 lobes), caduques et de couleur vert foncé parfois tracées de rouge pourpré, Le fruit est une capsule tricoque qui s'ouvre par déhiscence septicide, puis loculicide, en abandonnant la columelle sur laquelle s'insèrent les graines (**Figure III.5**) [63].



(A) **(B)**

Figure III.5: la plante (A) et le fruit (B) de ricin (*Ricinus Communis* L) [64.65]

L'activité de la lipase des graines de ricin est reconnue depuis plus d'un siècle. Elle présente une sélectivité particulière, souvent pour un substrat, et peut être utilisés de façon rentable pour l'enrichissement ou l'isolement spécifique d'un type ou d'une classe particulière de lipide [66]. Les lipases sont associées aux membranes lipidiques (petites organites intracellulaires qui stockent l'huile) et sont probablement ancrées par leur région hydrophobe proche de l'extrémité N-terminale (4,5) [67].

En vue d'une mise en œuvre rationnelle et rentable des enzymes à l'échelle industrielle ou a des fins analytiques, il est nécessaire de les conditionner sous différentes formes permettant leurs réutilisation vu la complexité et le coût d'obtention des enzymes

pures. De plus, l'isolement des produits du mélange réactionnel par pH ou par traitement thermique peut provoquer une inactivation de l'enzyme. Pour éliminer certains de ces effets délétères, l'immobilisation d'enzymes par attachement ou piégeage dans des matrices solides insolubles permet l'obtention d'une enzyme stable, régénérable et réutilisable [68].

III.5. Immobilisation des lipases

L'application de la catalyse enzymatique aux processus chimiques diminue l'utilisation des produits nocifs dans l'environnement et réduit ainsi le coût de traitement. Les enzymes offrent un avantage distinct dû à leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Quelques critères doivent être réunis pour qu'une enzyme soit un catalyseur industriel viable. L'enzyme doit être compatible et stable. Au niveau fonctionnel la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicinaux et biotechnologiques. Une approche possible pour stabiliser des enzymes est leur immobilisation sur une matrice appropriée. Du point de vue industriel, les biocatalyseurs immobilisés présentent une stabilité augmentée, des changements dans l'activité enzymatique, le pH optimum, et l'affinité pour le substrat ont été observés. Ces changements dépendent de la source de l'enzyme, du type de support et de la méthode d'immobilisation. Le paragraphe suivant passe en revue les différentes techniques d'immobilisation [69].

III.5.1. Immobilisation par inclusion

Le principe de l'inclusion est de retenir l'enzyme prisonnière dans la matrice d'un polymère ou dans une microcapsule. Plusieurs polymères, entre autre l'alginate, le chitosan, le gel depolyacrylamide et le gel d'amidon, sont utilisés dans l'immobilisation par inclusion.

L'alginate est un polysaccharide présent chez les algues brunes ou Phaeophyceae, sous forme d'un mélange de sel (sodium, potassium, calcium, magnésium) et d'acide alginique. L'acide alginique est un polymère constitué de résidus d'acides uroniques: acides α-L-guluronique et β-D-mannuronique [66] (**Figure III.6**).

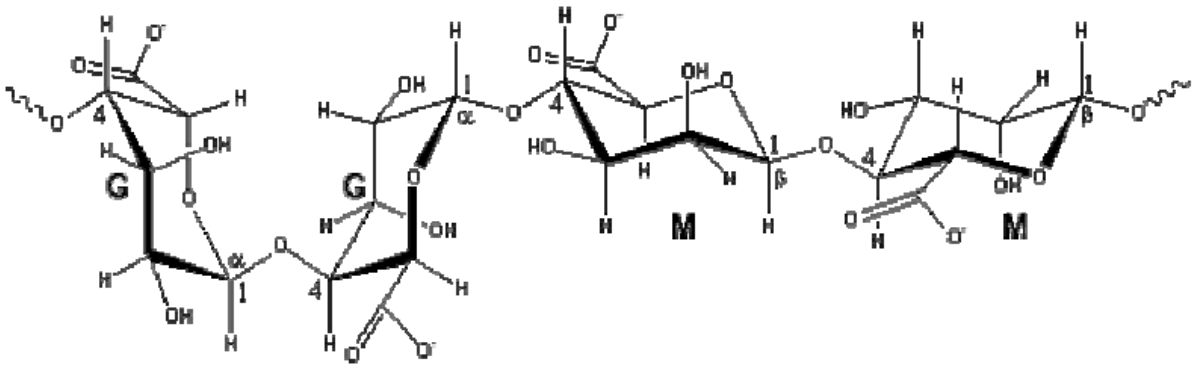


Figure III.6 : Structure de l'alginate. G : acide guluronique M : acide mannuronique [70].

Les acides uroniques sont dérivés de monosaccharides simples dans lesquels le groupe hydroxyle primaire en C6 a été oxydé en acide carboxylique correspondant. Par exemple, l'acide D-mannuronique est dérivé du D-mannose. L'alginate est principalement extrait à partir de *Macrocystis pyrifera*. L'alginate est l'un des polymères le plus fréquemment utilisés pour l'immobilisation par inclusion non seulement grâce à ses propriétés de gélification mais aussi grâce à sa non-toxicité. La gélification qui est l'une des principales propriétés des alginates est due au fait qu'ils réagissent avec les cations divalents (sauf le magnésium) et précipitent lorsque ces cations sont en excès. Les lipases de *Candida rugosa* a été immobilisée par inclusion dans l'alginate [69].

Le chitosan est un polysaccharide composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine liée par ß-(1-4) (unité désacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine (unité acétylée). Le chitosan est obtenu par désacétylation de la chitine, un composé particulièrement abondant dans les carapaces de crustacés (**Figure.III.7**) [69].

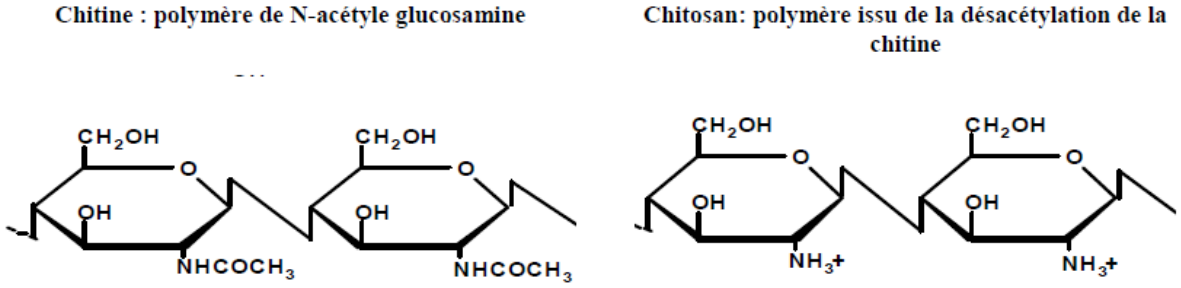


Figure III.7 : Formule chimique du chitosan [69]

Pour permettre à la molécule d'être soluble dans la plupart des acides, la désacétylation libère les groupes amines (NH2) et confère au chitosan une nature "cationique" en milieu acide, ce qui est particulièrement intéressant du fait que la plupart des polysaccharides du même type sont le plus souvent neutres ou négativement chargés [71].

III.5.2. Immobilisation par adsorption

Parmi les diverses techniques d'immobilisation, l'adsorption demeure la méthode la plus simple et la plus rentable. Différents supports, tels que la silice, les billes de verre poreux, l'alumine, la terre diatomée, la célite et le charbon actif ont déjà été exploités pour l'immobilisation d'enzymes. Différents types de liaisons interviennent dans les réactions d'adsorption à savoir l'échange d'ions, les interactions de Van Der Waals et la liaison hydrogène. La concentration en enzyme, le temps de contact, le pH et la quantité du support sont des paramètres qui influencent l'adsorption [69].

La célite est utilisée comme support d'adsorption dans la plupart des applications industrielles des lipases et ce, en raison de son caractère poreux. Les lipases de *Rhizomucor japonicus*[72]*Mucor javanicus, Pseudomonas fluorescens, Candida rugosa, Rhizopusdelemar, Rhizopus oryzae et Chromobacterium viscosum* [73] ont été immobilisées par simple adsorption sur la célite.

Le gel de silice compte parmi les principales substances adsorbantes et se prête à de nombreuses applications. C'est une forme d'acide silicique composée de granulés irréguliers et poreux. Les produits de base pour sa fabrication sont essentiellement le silicate de sodium et l'acide sulfurique. Ces substances sont exposées à une réaction chimique et produisent un gel de silice très riche en SiO_2 [74] ont immobilisé les lipases de pancréas de porc, de *Pseudomonas cepacia,* de *Candida antartica*, sur la silice par simple adsorption. Le gel de silice est compatible avec tous les matériaux à l'exception des substances fortement alcalines et l'acide fluorhydrique [69].

III.5.3. Immobilisation par liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente a été développée dans le souci d'obtenir des liaisons très solides entre enzymes et supports. Pour la réalisation de la liaison covalente il faut une activation préalable soit du support soit de l'enzyme car les groupes fonctionnels de l'enzyme ne sont généralement pas suffisamment réactifs. Mais c'est surtout l'activation des supports d'adsorption qui a fait l'objet de nombreuses études car l'activation des groupes fonctionnels de l'enzyme est délicate et peut conduire à la dénaturation de l'enzyme.

Un carbodiimide est un groupe fonctionnel de type N=C=N. En chimie organique synthétique, les composés contenant la fonctionnalité de carbodiimide sont des agents de

déshydratation et sont souvent employés pour activer les acides carboxyliques vers la formation d'amide ou d'ester et ont l'avantage d'avoir une très faible toxicité pour l'enzyme.

La lipase de *Candida rugosa* a été immobilisée par liaison covalente sur les billes de chitosan dont les groupements hydroxyles ont été préalablement activés par le carbodiimide [75]

La lipase du pancréas de porc a été immobilisée sur polyacrylamide activé par le carbodiimide et a ainsi été appliquée à l'hydrolyse de l'huile d'olive [76].

Le glutaraldéhyde (dialdéhyde comportant cinq atomes de carbone) est également utilisé pour former des liaisons covalentes. C'est un liquide visqueux et incolore qui se présente normalement en une solution aqueuse limpide et incolore. Pour l'immobilisation par liaison covalente, le glutaraldéhyde ayant deux sites réactifs, va servir de pont entre les fonctions -NH2 du support et de l'enzyme. Les films de chitosan activés par le glutaraldéhyde ont été utilisés pour l'immobilisation de la lipase de *Candida cylindracea* et de *Syncephalastrum racemosum* [77].

.

Chapitre IV

MATÉRIELS ET MÉTHODES

INTRODUCTION

Ce travail a pour objectif d'étudier les propriétés émulsifiantes d'un tensioactif non-ionique synthétisé par voie enzymatique en utilisant une enzyme végétale " la lipase de *Ricinus communis*L". Cette enzyme est utilisée pour réaliser la conversion d'un mélange d'un acide gras et un sucre en ester de sucre par une réaction d'estérification.

Pour cela nous avons avoir extrait d'abord et purifier la lipase de *Ricinus communis* L, de la conditionner en l'immobilisant dans un support afin de préserver son activité et faciliter la séparation du produit (ester de sucre).

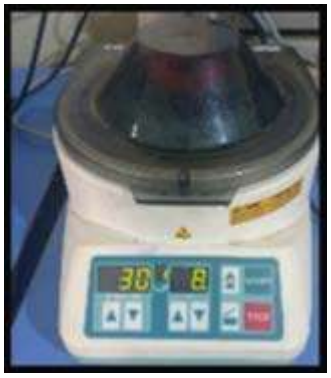
IV. MATÉRIELS ET MÉTHODES

IV.1 Matériels

IV. 1.1 Appareillages

En plus de la verrerie de laboratoire de chimie, les différents matériels utilisés lors de cette étude sont présentés dans le **tableau IV.1 :**

Tableau IV.1 : Appareillages utilisés

Appareil	Centrifugeuse	Balance électronique	Agitateurs
Photo			
Type et emploi	**Type:** Hettich EBA 20 **Emploi:** Centrifugation des préparations (3000 tr/min, le temps de centrifugation est de 10 min dans des tubes à essai	**Type:** KERN **Emploi:** Pesée des produits, des tensioactifs, des phases aqueuse et huileuse.	**Type:** Heidolph Mr Hei-Santard **Emploi:** Agitation des formulations.

IV.1.2. Produits utilisés

Les réactifs utilisés dans ce travail sont:

- ***Enzyme***

La lipase (EC .3.1.1.3) utilisée est de source végétale extraire à partir les graines de ricin (*Ricinus communis* L). La méthode d'extraction et de purification est décrite dans le paragraphe **IV.2.1.** Nous avons choisi les graines de ricin pour la production de lipase à la base des critères suivants:

- La disponibilité de la plante de *Ricinus communis* L (elle peut être cultivée à n'importe quel endroit du monde).
- Sa croissance végétale est très rapide et résiste aux conditions rudes de température et au stress hydrique.

- Possèdent un taux élève 40 à 60% en matière graisse (les lipases sont associées aux membranes lipidiques qui ce sont des petites organites intracellulaires stockent l'huile).
- Le ricin est une plante non alimentaire (pas de concurrence avec la culture alimentaire) [78].

- ***Substrats***

Réaction de synthèse: C'est la réaction de synthèse d'un sucroester:

Tableau IV.2 : Substances chimiques utilisées au cours de la synthèse de sucroester.

Produit	Fournisseur	Masse Molaire
Glucose anhydre	Riedel-de Haën	180.15
Acide palmitique	Fluka	256.43
Acide oléique	Sigma-Aldrich	282.46

- ***Solvants***

Le tableau **IV.3** présente les différents solvants utilisés :

Tableau IV.3: Différents solvants utilisés lors de cette étude.

Réactifs chimique	Fournisseur
Acétone	Sigma-Aldrich
Tert-butanol	Fluka

IV.2 Méthodes

VI.2.1 Préparation de la lipase

Dans notre travail, on utilise la lipase de *Ricinus communis* L, la préparation de cette enzyme passe par les étapes suivantes :

A/ Extraction et purification de la lipase

- **Décorticage**

Les graines sont couvertes d'une couche dure mais fine et facile à décortiquer à la main. Le concassage est réalisé manuellement.

- **Broyage**

Cette opération est réalisée juste avant l'extraction, les graines de ricin ont été broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier avec l'addition de l'eau distillée. On obtient ainsi un mélange pâteux.

- **Filtration**

Le mélange obtenu après le broyage à été filtré sur une gaze. Le filtrat obtenu est l'extrait brut de la lipase.

- **Purification**

La purification partielle de l'extrait brut de lipase à été réalisée par précipitation à l'acétone à 4°C. Trois volumes d'acétone glacial sont versés goute à goute dans un volume de la solution aqueuse de lipase brut disposée sous agitation dans un bain glacé. Une fois l'acétone est totalement versée, le mélange (lipase brut-acétone) est laissé reposer dans le réfrigérateur pendant une heure [79].

- **Séparation**

Après une heure le mélange forme un précipité blanc, sa récupération se fait dans des tubes à essais sont placés dans une centrifugeuse à 3000 tr/min pendant 10min. Le culot récupéré à été séché à température ambiante, la poudre obtenue est la lipase partiellement purifiée (**LPP**), qui doit être conservée sous des conditions la protégeant de la dégradation chimique et biologique, dans un récipient en verre fermé et enveloppé par l'aluminium [79].

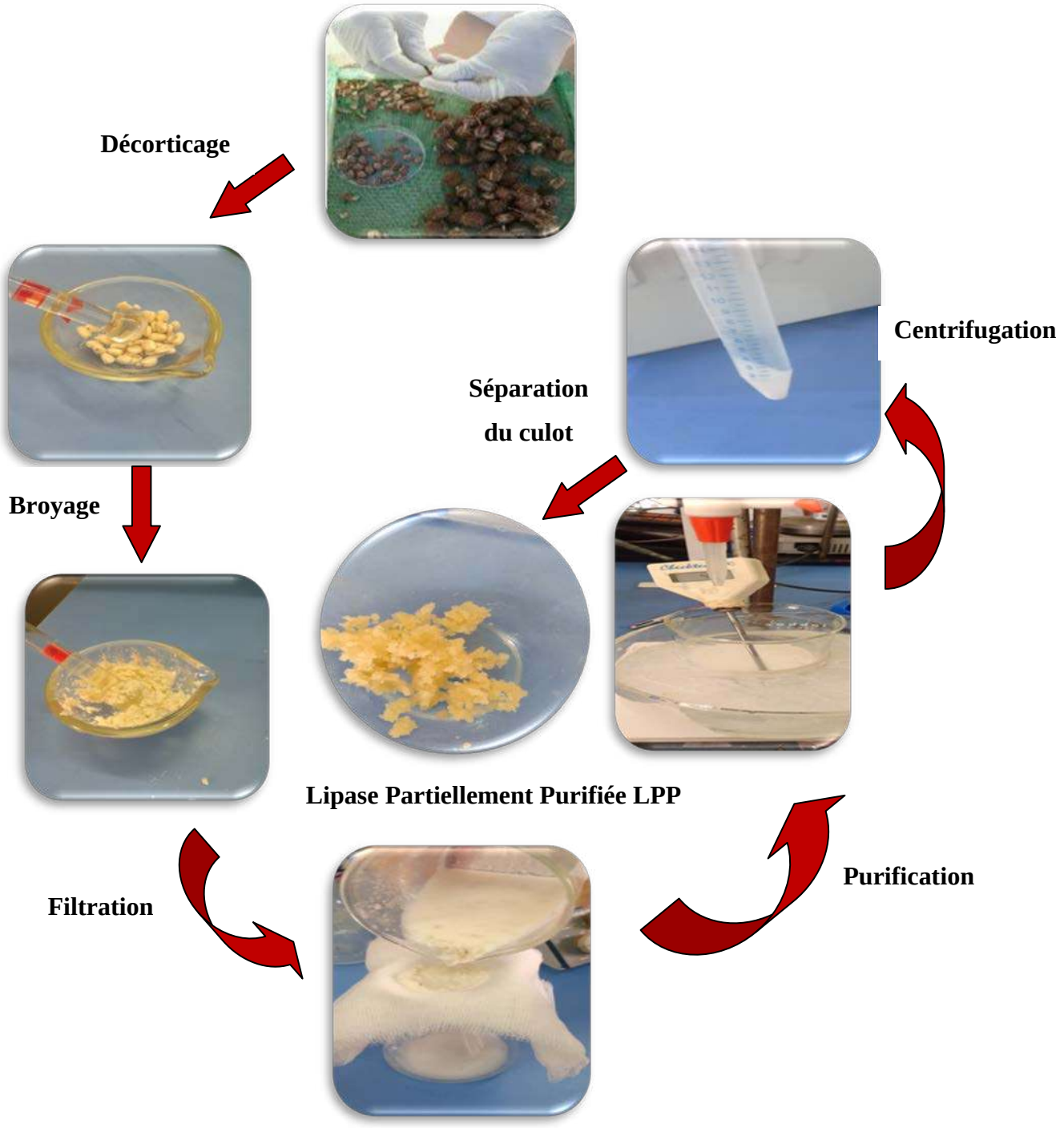


Figure. IV.1 : Protocol d'extraction et de purification de la lipase

B/ Test d'activité lipasique

L'activité enzymatique est une mesure de la quantité d'enzymes active dans une préparation. L'unité d'activité enzymatique (**U**) est définie en terme de quantité de substrat disparaissant par unité de temps ou de quantité de produit apparaissant par unité de temps [80].

La proportionnalité entre vitesse de réaction et concentration enzymatique est la base de tout dosage d'activité enzymatique. Les causes possibles d'un défaut de proportionnalité sont analysées. Des artéfacts dans le processus de dosage, la présence d'inhibiteurs dans le milieu réactionnel ou dans la préparation enzymatique ainsi que des effets de pH et de température [81].

- **Mode opératoire**

  Dans deux erlenmeyers, on introduit 5ml d'émulsion d'huile d'olive (voir annexe **A.1.**), 3ml de solution tampon pH=7 et 0.5ml de $CaCl_2$. On utilise le premier erlenmeyer comme un témoin et on introduit dans le deuxième erlenmeyer 3ml de l'extrait lipasique (**LB** ou **LPP).** Après 30min, la réaction a été stoppée par l'ajout de 5ml de la solution acétone-éthanol (1:1, v/v). Les deux milieux sont titrés par la solution NaOH de 0.05M en présence d'un indicateur coloré (phénolphtaléine). La réaction se fait dans des conditions standards (température ambiante, pH=7) [79].



Figure IV.2 Dosage de l'activité enzymatique

IV.2.2 Préparation de la lipase immobilisée

Pour qu'une réaction enzymatique ait lieu dans les meilleures conditions possibles. Il faut que cette dernière soit stable. Ainsi, au niveau fonctionnel, la stabilité d'une enzyme limite souvent son application pratique dans des processus médicinaux et biotechnologiques. Une des approches permettant d'augmenter la stabilité de ces enzymes est l'immobilisation sur une matrice appropriée en raison de préservation de la structure tridimensionnelle active [82].

L'emprisonnement des enzymes dans un polymère d'alginate est l'un des procédés classiques pour l'immobilisation des enzymes.

Cette technique permet de prouver expérimentalement que les enzymes se retrouvent intactes en fin de réaction et sont donc réutilisables. L'alginate est un matériau non toxique, peu coûteux et polyvalent qui présente des propriétés thermostable et une stabilité enzymatique et des propriétés fonctionnelles améliorées.

Dans ce travail nous avons utilisé l'alginate de sodium pour immobiliser la lipase de ***Ricinus communis*** en présence de cation de calcium.

La réticulation des molécules d'alginate de sodium en présence de l'ion calcium Ca^{2+} (nous avons utilisé le chlorure de calcium) crée la gélification du mélange. L'immobilisation de la lipase dépend des concentrations de ces deux constituants.

L'objectif de cette partie de l'étude est de déterminer la méthode de l'immobilisation et la nature de support utilisé (l'alginate) pour atteindre les objectifs suivants:

- Conserver l'activité de l'enzyme qui a tendance:
  - ✓ à diminuer après immobilisation du fait de possible gênes stériques et de limitations dans l'accessibilité au site actif.
  - ✓ à augmenter sa stabilité dans le temps.
  - ✓ Résistance aux conditions du milieu.
- la fixation solide au support, permettant des lavages répétitifs sans perte de l'enzyme.

- **Mode opératoire**

Dans un bécher, on a dissous 3g de la lipase partiellement purifiée **LPP** dans 10 ml de l'eau distillé, l'opération ce fait sous agitation et à température ambiante. Après la dissolution complète de l'enzyme on ajoute 0.2g de l'alginate de sodium. Le mélange obtenu est maintenu sous agitation magnétique pendant une heure jusqu' à l'homogénéisation est laissé au repos pendant 30 min**.** On verse le mélange obtenu lipase/alginate goute à goute dans 50 ml d'une solution $CaCl_2$ (0.2M) à l'aide d'une seringue 20G maintenue sous agitation magnétique pour l'obtention des billes d'alginate de calcium. Après la récupération et le rinçages des billes on doit les conservées dans une solution tampon pH=7 à 4°C dans un récipient en verre fermé par un bouchon en verre pour éviter la vaporisation du mélange [79].

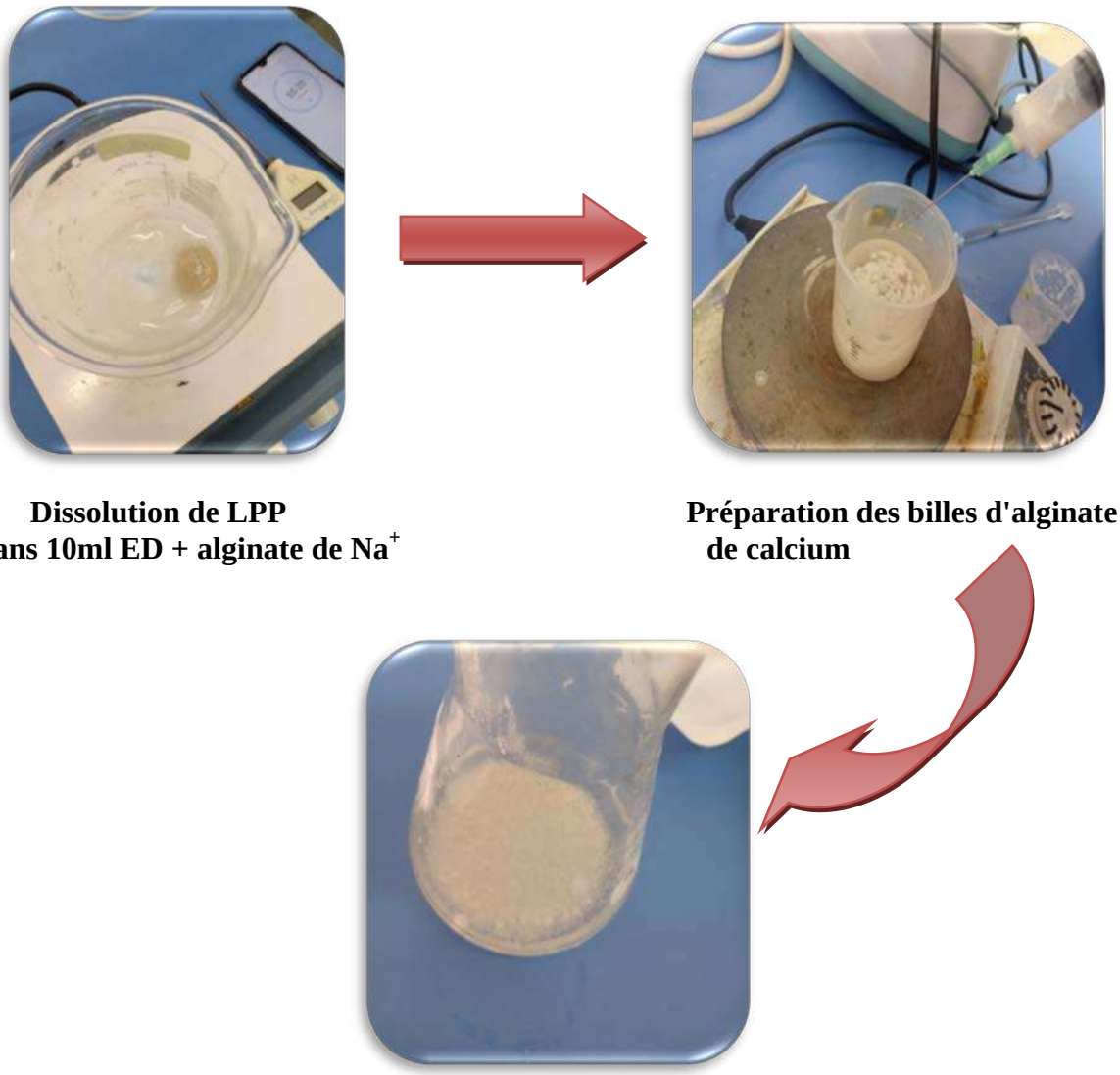


Figure IV.3 : Protocol d'immobilisation de la lipase dans l'alginate de sodium.

IV.2.3 Synthèse d'ester de glucose

Les sucroesters sont utilisés depuis les années soixante dans les industries alimentaires pour leurs propriétés émulsifiante et dans des domaines aussi divers que la cosmétologie, la pharmacie, l'agriculture, la chimie des détergents et bien sûr l'agroalimentaire [83].

Les esters de sucre et d'acide gras peuvent être synthétisés suivant deux voies: chimique et enzymatique. La voie chimique, tout en permettant d'atteindre des rendements de conversion élevés des substrats, présente plusieurs inconvénients notamment une faible sélectivité de synthèse. Par conséquence, la

voie enzymatique a fait l'objet de plusieurs études ces deux dernières afin de pallier les inconvénients rencontrés avec la synthèse par voie chimique [12].

Parmi les réactions les plus étudiées ces dernières années, la synthèse des esters de monosaccharides et d'acides gras par la lipase. L'objectif de cette partie est l'étude d'un procédé de synthèse enzymatique de tensioactifs non ioniques: les sucroesters. Ce procédé met en œuvre la lipase immobilisée de *Ricinus communis* dans un milieu approprie.

- **Mode opératoire**

Dans un erlenmeyer fermé par un bouchon en verre, on a dissous un mélange de 8mmole de glucose et 16mmole d'acide gras (acide palmitique, acide oléique) dans 40 ml de tert-butanol avec l'activité de l'eau du mélange réactionnel est a_w = 0.3, on ajoute après la lipase immobilisée. Le mélange obtenu est maintenu sous agitation magnétique (600 rpm) pendant 8 h à 40°C [79].



Figure. IV.4. Synthèse de sucroester

Après l'agitation du mélange pendant 24h, on fait alors le dosage du mélange par l'hydroxyde de sodium (0.1M) pour éliminer la quantité d'acide gras restante en présence de phénolphtaléine sous agitation manuelle jusqu'à le changement de la couleur. On laisse le mélange reposé afin de séparer la phase solide formé sur un papier filtre [79].

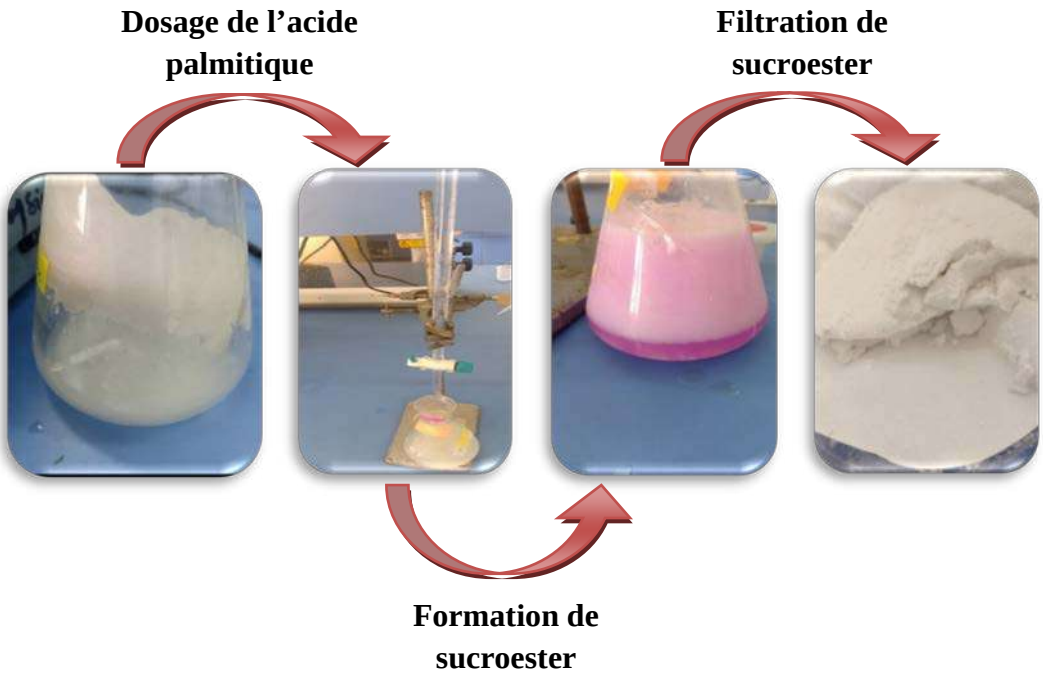


Figure. IV.5. : Etapes de séparation du sucroester.

IV.2.4.Prédiction de type d'émulsion

Le sens d'une émulsion (E/H ou H/E) peut être déterminé par plusieurs méthodes.Dans notre étude, la méthode de Balance Hydrophile / Lipophile (HLB) est utilisée :

A/ Détermination du HLB

Les sucroesters commercialisés sont disponibles avec une large gamme de valeur de Balance Hydrophile/ Lipophile (HLB), qui dépend du degré d'estérification et de nature de l'acide gras. Ainsi, les émulsifiants couramment utilisés sont constitués d'un mélange complexe de mono-, di-, et polyesters avec divers types d'acides gras [84].

Pour les esters d'acides gras, la valeur HLB peut êtres calculée par la méthode suivante (formule de Griffin) (**Eq IV.1) :**

$$\text{HLB} = (1 - \frac{IS}{IA}) * 20 \textbf{(IV.1)}$$

Avec

IS: représente l'indice de saponification de l'acide gras, masse de KOH en mg nécessaire pour neutraliser l'acidité libre et saponifier à chaud les esters de 1 g de sucroester (**Eq IV.2)** (Voir annexe **A.2.**).

$$S= C_{HCl}\,(V'-V) * M_{KOH} * \frac{1}{m} * 10^3 \textbf{(IV.2)}$$

C_{HCl}: Concentration d'HCl,

V': Volume d'HCl nécessaire à la neutralisation du blanc,

V: Volume d'HCl nécessaire à la neutralisation de l'échantillon,

M_{KOH}: Masse molaire de KOH,

m: masse de l'échantillon (sucroester).

IA: représente l'indice d'acide,

Pour un acide gras pur (**Eq IV.3)**

$$a = \frac{M(KOH)}{M(AG)} * 10^3 \qquad \textbf{(IV.3)}$$

$M_{KOH\,:}$ Masse molaire de KOH

M_{AG}: Masse molaire de l'acide gras.

B/ Détermination de l'indice d'émulsification E_{24}

Une émulsion a été préparée par l'agitation au vortex de 20% 0(v/v) d'huile d'olive et de 80% (v/v) de la solution palmitate de glucose de concentration 0.1 g/l pendant 2 min dans un tube à essai en verre et en laissant reposer pendant 24 h à température ambiante. L'indice d'émulsification E_{24} est donné en tant que pourcentage de la hauteur de la couche émulsionnée (mm) divisée par la hauteur totale de la colonne de liquide (mm) après 24 heures [79].

Chapitre V

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

V. RÉSULTAT ET DISCUTION

V.1. Préparation de la lipase

Les lipases (acylglycérol hydrolase, EC 3.1.1.3) font partie du groupe d'enzymes appartenant à la classe des hydrolases qui, d'une part, montrent la capacité de catalyser la réaction d'hydrolyse des liaisons ester et, d'autre part, de catalyser la réaction de synthèse de beaucoup d'esters et monocylglycérols d'acide gras [85,86,87,88], la principale caractéristique des lipases est leur action catalytique strictement dépendante de la présence d'une interface lipide-eau où la phase lipidique est insoluble. Cette activation interfaciale serait due soit à un changement de conformation tridimensionnelle de l'enzyme soit à une activation du substrat [89].

On mesure la quantité de produit apparue ou la quantité de substart disparue au bout du temps. Ce sont les méthodes qui étaient utilisées au tout début de l'enzymologie [90].

Le test d'activité lipasique a été positif comparant avec le temoin (sans enzyme) dans les deux cas (lipase brute : **LB** et lipase partiellement purifiée : **LPP**). La différence de nombre de mole entre les deux milieux pour chaque extrait (sans et avec l'enzyme) détermine l'activité lipasique.Cette méthode de purification s'appelle aussi une méthode de délipidation [91], et commeles lipases sont associées aux membranes lipidiques, ses purification provoque une perte d'activité totale de la lipase de 4.167 à 3.333 µmol / min.

Tableau V.1 : Activité lipasique pour **LPP** et **LB.**

Extrait lipasique	Activité lipasique(µmol / min)
LPP	3.333
LB	4.167

V.3. Préparation de la lipase immobilisée

Le support d'immobilisation de la lipase utilisé dans cette étude est **l'alginate de sodium** (**Figure V.1**).

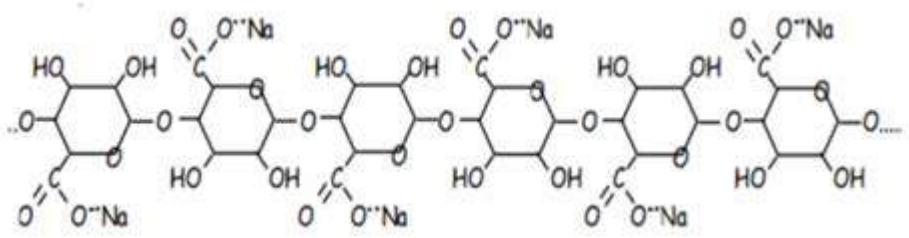


Figure V.1 : Structure d'alginate de sodium [79]**.**

L'alginate de sodium est donc une longue chaîne comportant beaucoup de charges négatives par la présence de groupements carboxyles CO_2^- dont la charge est contrebalancée par la charge positive de l'ion sodium Na^+ afin d'avoir une molécule neutre. L'alginate de sodium, comme tous les sels d'alginate monovalents, est soluble dans l'eau pour des valeurs de force ionique faible.

Un mélange entre l'alginate de sodium et le chlorure de calcium permet d'obtenir des billes d'alginate de calcium.

- **Les billes d'alginate de calcium**:

Lors du mélange entre la solution d'alginate et celle de chlorure de calcium, l'ion Ca^{2+} va repousser l'ion Na^+ car ces deux ions sont des cations(force répulsive). Au contacte de l'ion de calcium Ca^{2+}, qui est un cation doublement chargé positivement (2+), celui-ci se liera à deux groupement carboxyle par l'intermédiaire des ions O_2^-, cette réaction appelée polymérisation a pour but de lier deux brins d'alginate, cela permet la formation d'un gel à la surface de la bille (**Figure V.3)**, c'est ce phénomène qu'on appelle la sphérification, les billes formées ont une forme sphérique.

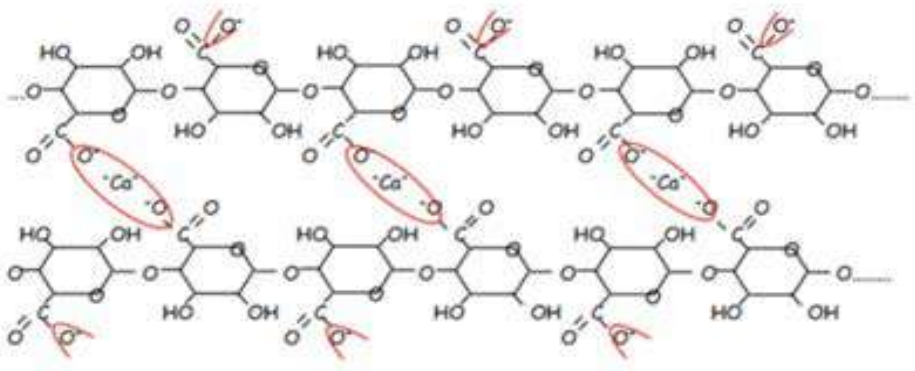


Figure V.2 : Structure du polymère alginate de calcium [79].

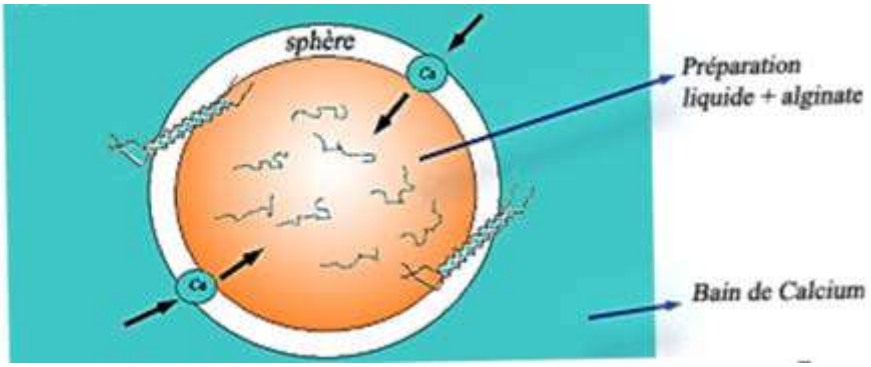


Figure V.3 : Schéma illustrant la sphérification des billes d'alginate dans la solution chlorure de calcium [92]

V.4. Synthèse d'ester de sucre

La synthèse enzymatique des esters de sucre généralement réalisée dans un milieu organique avec une faible teneur en eau pour favoriser la réaction de synthèse. L'utilisation de l'enzyme de la lipase dans un milieu organique présente plusieurs avantages dont les principaux sont le pouvoir catalytique et la sélectivité, ces avantages dépendants de plusieurs paramètres afin d'obtenir une réaction de synthèse avec un rendement important.

Dans le présent travail, on s'intéresse à la synthèse d'un ester de glucose comme produit d'une réaction d'estérification (ou d'acylation) entre le l'D-glucose et un donneur d'acyle (**Figure V.4**) en présence de la lipase du *Ricinus communis* L immobilisée dans l'alginate de sodium en milieu organique.

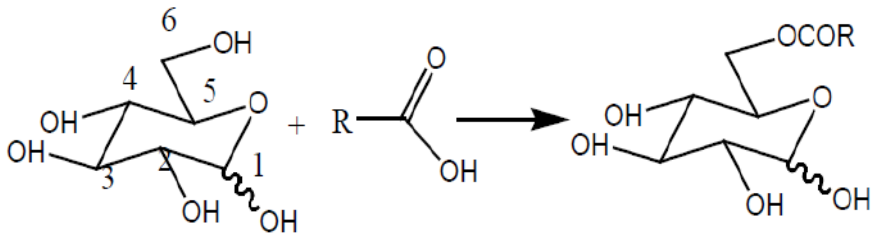


Figure V.4: Estérification de D-glucose.

- **Nature de donneur d'acyle:**

Les résultats obtenus montrent que l'acide palmitique donne une meilleure quantité de sucroester par contre l'acide oléique il nous a donné aucune formation d'ester et c'est ce que montre dans la figure suivante :



(I) **(II)**

Figure V.5 : Synthèse d'ester de glucose avec l'acide palmitique **(I)** et l'acide oléique **(II)**.

Ces résultats peuvent être liés à la stéréo-sélectivité des lipases, définies par la sélectivité observée en fonction de la longueur de la chaîne carbonée, est souvent liée à la topologie du site actif [93]. Ainsi, certaines lipases présentent une sélectivité élevée pour les acides gras à longue et moyenne chaîne, tandis que d'autres sont sélectives vis-à-vis des acides gras courts et ramifiés [94]. La lipase de *Ricinus communis* semble avoir une spécificité vis-à-vis d'acides gras saturés relativement courts tels que l'acide palmitique (16: 0). Contrairement, avec l'acide non saturé avec une chaîne plus longue comme l'acide oléique (18: 1) l'affinité est plus faible.

V.4.Détermination de la valeur de HLB et de l'indice d'émulsification E_{24}

La balance hydrophile/lipophile, plus communément appelée HLB représente l'équilibre entre les groupements hydrophiles et lipophiles au sein d'une structure moléculaire [95], elle peut être déterminée expérimentalement (sur base de données chromatographiques) ou par calcul (sur base de la formule développé de la molécule).

D'après l'équation **IV.1**:

$$\text{HLB} = (1 - \frac{IS}{IA}) * 20 = \mathbf{7.15}$$

La valeur de HLB d'un sucroester dépend du type de sucre ainsi que du type et du nombre de chaînes grasses, une valeur comprise entre 1 et 10 indique une tendance lipophile et une valeur comprise entre 11 et 20 indique une tendance hydrophile. Les esters de saccharose sont avec les esters de sorbitan éthoxylés et les alkylpolyglycosides les seuls tensioactifs non ionique à présenter des HLB supérieures à 8 [4].

Salvator P et al ont publiés que les esters de glucose présentent des valeurs de HLB comprise entre 7.2 et 11.6 (**Tableau V.2)**, et la HLB du palmitate de glucose égale à 7.6 [96].

Tableau V.2 : Valeurs de HLB des esters de glucoses [96].

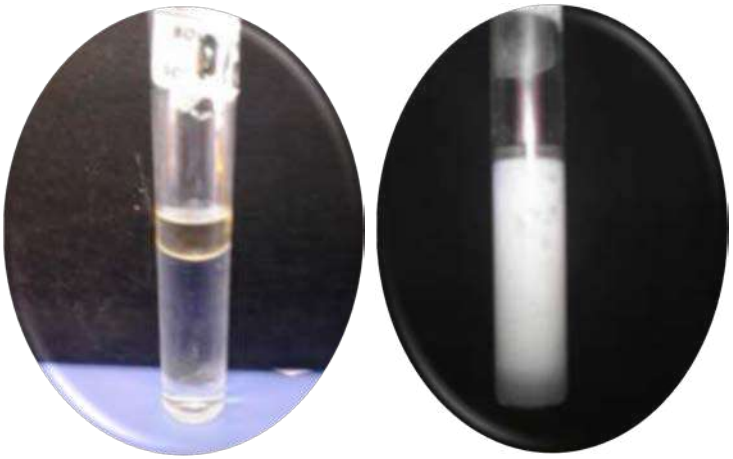
Esters de glucose	Formule	HLB
Caproate de glucose	**C6**	**11.6**
Caprylate de glucose	**C8**	**10.6**
Caprate de glucose	**C10**	**9.8**
Laurate de glucose	**C12**	**8.8**
Myristate de glucose	**C14**	**8.2**
Palmitate de glucose	**C16**	**7.6**
Stéarate de glucose	**C18**	**7.2**

D'après **le Tableau V.2** le palmitate de glucose est un émulsifiant de type huile dans eau. Pour cela on a étudié l'effet de palmitate de glucose sur la stabilité d'émulsion huile dans eau (H/E), par la détermination de l'indice d'émulsification à partir d'une émulsion huile d'olive dans l'eau.

$$\mathbf{E_{24}}=\frac{\boldsymbol{hauteur\ de\ l'émulsion\ après\ agitation\ (24h)}}{\boldsymbol{hauteur\ total\ avant\ agitation}} * 100 = 95.83\%$$

L'absence de tensioactif de palmitate de glucose dans l'émulsion huile d'olive/eau provoque une séparation des phases après quelques minutes, par contre la présence de ce tensioactif provoque une stabilité d'émulsion pendant plusieurs heures. La séparation de phase se maintient à cette valeur pendant d'une semaine.

Soultani S. et al ont obtenus que le monocaprate de fructose est capable de stabiliser plus de 94% de l'émulsion huile decolza dans eau pendant 24 h [79].



(A) (B)

Figure V.6: émulsion H/E d'une solution de palmitate de glucose et d'huile d'olive : avant l'agitation(A), après agitation (B)

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de ce travail était l'étude des propriétés émulsifiantes des tensioactifs non ioniques de type sucroester obtenus par conversion directe d'un sucre simple, le glucose qui sera transformé en ester de glucose par une estérification enzymatique en présence de la lipase du *Ricinus communis*L.

Nous avons travaillé sur un plan et avec des conditions particulières pour obtenir des résultats satisfaisants et cohérents avec le sujet abordé, tous les conditions mise en jeu ont été déjà optimisées pour l'élaboration d'un procédé durable. Tous d'abord nous avons préparé l'enzyme de la lipase à partir des graines de ricin, puis nous avons le séparé et purifié afin d'être immobilisé par l'alginate de sodium pour préserver leur propriété et leur stabilité, conserver leur activité optimal et à la fin faciliter leur séparation.

Le teste d'activité de la lipase nous donne des résultats permet de l'utiliser dans la synthèse de sucroester grâce à leur activité élevée dans un milieu approprié (pH=7 et température 40°C).

La préparation de palmitate de glucose a réussi en présence de solvant organique (tert-butanol) grâce à la solubilité élevée de glucose dans ce solvant ainsi qu'une teneur minimal en eau est importante pour l'activité de l'enzyme aussi pour la solubilité de glucose. L'ajout de la lipase immobilisé favorise cette réaction sous une température de 40°C et agitation de 600 rpm.

Donc la voie enzymatique reste la plus prometteuse étant donnés que la réaction est régiosélective et facile avec la présence d'une teneur minimale en eau ainsi le contrôle de touts les autres paramètres.

Cette étude a montré que le palmitate de glucose synthétisé possède un pouvoir émulsifiant grâce à ses valeurs en HLB et E_{24}.Une valeur de HLB de 7.15 a été estimée pour le palmitate de glucose, ce qui reflète qu'il possède un caractère hydrophile. La valeur de E_{24} montre que le palmitate de glucose est capable de stabiliser ce type d'émulsion avec moins de 5 % de séparation de la phase huile au bout de 24 heures.

Il nous reste quelques paramètres nous ne pouvions pas de les réaliser comme l'effet de la température, de la concentration du tensioactif, du temps.....sur la stabilité de l'émulsion ainsi que l'application de ce tensioactif dans le domaine pharmaceutique ou cosmétique, à

cause de la pandémie Corona « Covid- 19 » qui a frappé le monde et interrompu tous les travaux.

A travers les résultats expérimentaux obtenus, nous présentons les conclusions suivantes :

- l'importance de la méthode de synthèse des produits et le contrôle des facteurs influent sur elle.
- l'utilisation des enzymes pour catalyser les réactions de synthèse permet de cibler le site de réaction et aussi d'opérer dans des conditions plus douces.
- L'immobilisation des enzymes est très importante pour leur stabilité structurale ainsi leur activité.
- l'emploi des esters de sucres en tant qu'agents émulsifiants dans l'industrie pharmaceutique est favorisé par l'innocuité envers la peau et les muqueuses.

D'un point de vue prospectif :

- Les résultats obtenus seraient nécessaire afin de trouver toujours la bonne voie de synthèse de ce type de tensioactif.
- Les propriétés présentées par le tensioactif nécessitent aussi des tests physicochimiques pour garantie leur intégration dans les produits pharmaceutique.

Références bibliographiques

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

[1]: EPOUNE LINGOME C, Nouveaux agrotensioactifs glycolipidiques: Synthèse, propriétés physico-chimiques et application en polymérisation, Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUES DE LYON, **2011**

[2] ANDRIEU A, BLANCFUNEY C, CUNY A, THEFFO A, Synthèse de tensioactifs, identification et caractérisation Projet de physique P6, l'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES, L'UNIVERSITÉ de SAINT- ÉTIENNE-DU-ROUVRAY**, 2019**.

[3]: ARDITTY S., Fabrication, stabilité et propriétés rhéologiques des émulsions stabilisées par des particules colloïdales, Thèse de doctorat, l'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**, 2004.**

[4]: PICCICUTO S, BLECJER C, BROHÉEJ.C, MBAMPARA A, LOGNAY G, DERANNE C, PAQUOT M, MARLIER M, Les esters de sucres: V oies de synthèse et potentialités d'utilisation, Biotechnol. Argon. Soc. Environ., 5 (4), 09-219, **2001**

[5]: RONDEL C, Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles lipopeptidiques tensioactives, Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE TOULOUSE, **2009.**

[6]: NOIRET N., BENVEGNU T. et PLUSQUELLEC D., Tensioactifs à base de substances renouvelables, Actualité Chimique, 12(261) :70-75, **2002.**

[7]: ROSEN M., ROSEN M. et KUNJAPPU J.T, Surfactant and Interfacial Phenomena, Wiley, **2004.**

[8]: GUETTAF N., Synthèse d'un ester à base d'anhydride maléique application à l'extraction du plomb, Mémoire de magister, UNIVERSITÉ M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES**, 2011.**

[9]: BRIAN J., Phénomène d'interface, agent de surface, publication de l'IFP**, 1989.**

[10]: SAMDANI G, SHANLEY A, Surfactants: Super molécules, Chemical Engineering, 38**, 1991.**

[11]: TADORS T.F, *Applied Surfactants*. Weinheim: WILEY- VCH Verla GmbH& Co. KGaA, **2005.**

[12]: SOULTANI S., Synthèse enzymatique d'esters de fructose et d'acide gras: Cinétique, purification et caractérisation des propriétés tensioactives, Thèse de doctorat, INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, **2001.**

[13]: WINSOR P., Solvent Properties of Amphiphilic compounds, Butterworth **2002.**

[14]: ROSEN M.J., Surfactants and Interfacial Phénomena, Wiley Interscience Pub, New york, **1978.**

[15]: SALAGER J.L., Surfactifs: types et usages, Module d'enseignement en phénomènes interfaciaux. Laboratoire de Formulation, Interface, Rhéologie et procédés, Ecole d'ingénierie chimique. Merida (Venezuela): UNIVERSITÉ DE LOS ANDES**,** p 128, **2002**.

[16]: BORDES R., Synthèse physicochimie et polymérisation de tensioactifs paires d'ions dérivés du norbornène, Thèse de Doctorat, UNIVERSITÉ DE TOULOUSE III - Paul**, 2007**

[17]: ANTON-SALAGER R., Contribution a l'étude du comportement de phase des systèmes: Mélange de surfactifs eau-huile, Thèse de doctorat, L'UNIVERSITE DE PAUET DES PAYS DE L'ADOUR,**1992.**

[18]: WINSOR P., Solvent Properties of Amphiphilic compounds, Butterworth **1954.**

[19]: HADJ MOHAMMED A, Etude des propriétés thermodynamique d'un surfactant, Mémoire de master, UNIVERSITÉ ABOU-BAKER BELKAID TLEMCEN, **2013.**

[20]: BABI N.M., Etude des propriétés émulsifiantes de tensioactifs anioniques pour une application en cosmétique, Mémoire de master, UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERI TIZI OUZOU, **2016.**

[21]: MITTAL L. L, Micellization, solubilization and microemulsion, vol. 2, Plenum Press Ed, a **1998.**

[22]: GRIFEN W.C., Classification of surface-Active Agents by HLB, Journal of the Society of Cosmetic Chemists 1, 16**, 1949.**

[23]: PEREZ M., Applications Pharmaceutique et Cosmétique des surfactif, CAHIER FIRPN°F372-A, UNIVERSITÉ de LOS ANDES, **1991.**

[24]: Menger F.M., Littau C.A., Gemini-surfactants: synthesis and properties, J. Am. Chem. Soc., 113(4):1451–1452,**1991**.

[25]: BOUKERCHE T.T., Synthèse de nouvelles molécules tensioactives non ioniques par voie enzymatique, Mémoire de magister, UNIVERSITÉ D'ORON ES-SENIA, **2007.**

[26]: QUACK J.M., et Trautmann M, Tenside Detergents, 6, 284, **1985.**

[27]: DELMAS A., La Recherche 250, 24 -25, **1993.**

[28]: NETO V**,** Nouvelles méthodes d'élaboration de tensioactifs glycosylés par métathèse croisée et cycloaddittion 1,3-dipolaire, Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ LIMOGES, **2007**.

[29]:CNOKAERT J– IA IPR, biologie technique Collection, Biochimie – Génie biologique et Françoise Guillet– IGEN Biotechnologies et secteur médico-social

[30]:DOUMEIX., Opérations unitaires en génie biologique. Tome 1 « émulsions », Ed. Scéren.

[31]: STAUFFER F.**,** Préparation d'émulsions doubles par un système microfluidique, Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE LORRAINE, **2014.**

[32]: OURIQUE A.F., POHLMANN A. R., GUTERRES S. S. & Beck R. C. R. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study, Int. J. Pharm**.,** 352**,** 1–4 **2008.**

[33]: REIS C. P., NEUFELD R. J., RIBEIRO A. J. and VEIGA F. Nanoencapsulation II, Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems, Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med., 2**,** 53–65, **2006.**

[34]: PROTAT M, Formation d'émulsions multiples stimulables en une seule étape d'émulsification : Effet du sel et évolution vers des architectures biocompatibles, Thèse de Doctorat, l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE, **2016**.

[35]: DE JONG W. H., BORM P. J. and others, Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards, Int. J. Nanomedicine, 3**,** 133, **2008**.

[36]: CHO K., WANG X., NIE S., CHEN Z, (Georgia) and Shin, D. M., Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Am. Assoc. Cancer Res.* 14**,** 1310–1316 **2008.**

[37]: OWUSU R. K., ZHU Q. and DICKINSON, E, Controlled release of L-tryptophan and vitamin B2 from model water/oil/water multiple emulsions, Food Hydrocoll., **6,** 443–453 **1992**.

[38]: DENINE R**.,** Cours de pharmacie Galénique, Office des Publications Universitaires, **2008**

[39]: BELHADJ A., BELMILOUDE Z, Les Émulsions Pharmaceutiques, Mémoire de fin d'études de Licence, UNIVERSITÉ SAAD DALEB BLIDA, **2014**

[40]: DUPASQUIER M.L., NAZARI A., FONTAINE-VIVE F., FERNANDEZ X., GOLEBIOWSKI J., CDIEC,DE NICE SOPHIAANTIPOLIS, *Formulation cosmétique, Les émulsion,***2017**

[41]: KARA A., BEDDEK M, Mise au point d'un système dispersé stable à usage cosmétique, Mémoire de Master, UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERI TIZI OUZOU, **2017**

[42]:KASSA D., Etude d'une émulsion a visée anti inflammatoire destinée à la voie orale, Thèse de Doctorat, UNIVERSITÉ d'ALGER, **1991**.

[43]: RONDON. V. C., Étude des mécanismes de libération d'actifs nanodisperses : Application au traitement de puits, Thèse de doctorat, UNIVERSITÉDE BORDEAUX I, **2010**

[44]:CAULLET L., DOS SANTOS A., KNIPPER G., RUSALEN M. et SEIGNEUR M.**,** Projet Professionnel : LES ÉMULSIONS ALIMENTAIRES ET COSMÉTIQUES: Florentin MICHAUX, **2017-2018**,

[45]:PIERAT N., Préparations d'émulsions par inversion de phase induite par agitation, Thèse de Doctorat, UNIVERSITÉ HENRI-POINCARE NANCY I, **2010**

[46]: ALLOUCHE J., Développement de nouvelles méthodes pour l'élaboration d'émulsions multiples eau/huile/eau., Thèse de Doctorat, INSTITUT NATIONALPOLYTHECHNIQUE DE LORRAINE,**2003**.

[47]: ROCHETTE P**.,** Emulsification : Elaboration et étude des émulsions. Techniques de l'Ingénieur J 2 150, **2013.**

[48]:ROUANET J., TERZAIN C., Les agents de surface, Act. Chimi., 2-3, 58-62,**1996**.

[49]: BOGNOLO G., Tensioactifs non ionique- Mise en œuvre industrielle, Techniques de l'Ingénieur Doc. J 2265 V2, **2013.**

[50]: BAKER I. J. A., MATTHEWS B., SUARES H., KRODKIEWSKA I., FURLONG D. N., GRIESER F., DRUMMOND C. J., Sugar fatty acid ester surfactants: Structure and ultimate aerobic biodegradability, Surf J.. Deterg, 3, 1-11,**2000**

[51]: ALAIS C., LINDEN G., Biochimie alimentaire, deuxième édition, Paris : Masson, 245p **,1993**.

[52]: FREGAPANE G., SARNEY D.B., Greenberg SG., Knight DJ., Vulfson E.N., Enzymatic synthesis of monosacharide fatty acid esters and their comparison with conventional products. J. Am. Oil. Chem. Soc., 71, 87-9, **1994**.

[53]:HELLAL D., Optimisation de la réactivité dans la réaction d'estérification enzymatique du D-glucose, Mémoire de Magister, UNIVERSITÉBADJI MOKHTAR ANNABA, **2011**

[54]: DAMEZ C., transformation d'agro-ressource régionale et étude de leurs propriétés amphiphiles, Thèse de Doctorat, UNIVERSITÉ de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE, **2006**.

[55]: JULIETTE F., QUENEAU Y., Jean-Paul Maitre and Alain Bouchu., Tetrahedron letters Co-melting of solid sucrose and multivalent cation soaps for solvent- free synthesis of sucrose esters, 48 (23), 4111-4114, **2007**.

[56]: FERRER M., ANGELES CEUCES M., BERNABÉ M., BALLESTEROS A., plou FJ, Lipase-catalysed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures. Biotechnol. Bioeng., 65 (1), 10–16,**1999.**

[57]: CAO L., BORSCHEUER U T., SCHMID RD. Lipase-catalysed solid-phase synthesis sugar ester: selectivity of lipase towards primary and secondary hydroxyl group carbohydrates. Biocatal. Biotransform., 16, 249–257,**1998**

[58]: GHNAWA A., YASUHIRO K., KEN I., Synthesis of d-allose fatty acid esters via lipase-catalyzed regioselective transesterifiaction Biotechnol. Biochem, 69 (4), 833-835, **2005**.

[59]: RAZAFINDRALAMBO H. and al., Counterion- Induced changes to the micellization, of surfactin C_{16} aqueous solution, Journal of Physical Chemistry, 113, 8872-8877, **2009.**

[60]: CHAMOULEAU .F, COULON D, GIRARDIN M, GHOUL. M, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 949-954, **2001.**

[61]:BOUCHAGRA S., Immobilisation de la lipase de *Candida rugosa* sur la résine Amberjet 4200Cl Optimisation de l'énantioselectivité par la méthode des surfaces, Mémoire de Magister, UNIVERSITÉ BADHJI MOKHTAR ANNABA, **2010**

[62]: MACRAE A. R. H., R. C, Present and future applications of lipases, Biotechnology & Genetic Engineering Reviews,03, 193 - 217, **1985**

[63]: GHNIMI W., Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas.* Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de l'acetylcholin estérase, Thèse de Doctorat, UNIVERSITÉ de LORRAINE**, 2015**.

[64]: Salihu B. Z., Gana A. K. et Apuyor B. O., Castor Oil Plant (*Ricinus communis* L.): Botany, Ecology and Uses, International Journal of Science and Research, 3 (5), 1333-1341, **2014**.

[65]: Padma L., et Rupali B., Ricinus communis (Castor): An overview, Int. J. of Res. in Pharmacology and Pharmacotherapeutics, 3 (2), 136-144, **2014.**

[66]: SOUSA J.S., TORRES A.G. et FREIRE D.M.G., Nutritional enrichment of vegetable oils with long-chain n-3 fatty acids through enzymatic interesterification with a new vegetable lipase, Grasas Aceites, 66 (2), 1-7, **2015**.

[67]: CAVALCANTI ELISA D. C., FABIO M., PIÈRRE V., REGINA C. A., OLGA L. T. et DENISE M. G., Acetone Powder From Dormant Seeds of *Ricinus communis* L, Applied Biochemistry and Biotechnology, 136–140, 57-65, **2007.**

[68]: WEI Q., YAN H., YUWEN D. and YOUYUAN D., Surfactant Distribution in the Clouding of TX114, Chinese Journal of Chemical Engineering, 16(5), 722—725, **2008.**

[69]: ALLOUE W.A.M., Formulation et immobilisation de la lipase de *Yarrowia lipolytica*.).Thèse de Doctorat, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux,Belgique., 165p., 20 tabl., 22fig, **2008.**

[70]: ERTESYAG H., Valla S., Biosynthesis and applications of alginates. Polym. Degrad. Stab., 59, 85–91, **1998**.

[71]: BETEGERI S., NEAU SH. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in theform of hydrogel beads. Biomaterial., 23, 3627-3636,**2002**.

[72]: KHARE SK., NAKAJIMA M, Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. Food. Chem., 68, 153-157**, 2000.**

[73]: KAEWYHONG W., SAROTE S., POONSUK P., ARAN H, Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. Process Biochem., 40, 1525-1530**, 2005.**

[74]: GANAPATI DY., SACHIN RJ., Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: transesterification in nonaqueous medium, Microporous. Mesoporous. Mater., 86, 215-222, **2005**.

[75]: SHAO-HUA C., WEN-TENG W., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, Biomaterial, 25 (2), p.197-204**, 2004**

[76]: BAGI K., SIMON LM., SZAJANI B, Immobilization and characterization of porcine pancreas lipase. Enzyme Microb. Technol., 20, p.531-535, **1997.**

[77]: AMORIM RVS., MELO ES., CARNEIR-DA-CUNHA MG., LEDINGHAM WM., CAMPOS-TAKAKI GM. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. Bioresour. Technol., 89 (1), 35-39, **2003.**

[78]: BENALI B., DJABER A., Production du biodiesel à partir d'une plante spontanée, mémoire de master, UNIVERSITÉ AHMED DRAIA d'ADRAR, **2015.**

[79]: SEFHA F., ABOUSEOUD M., Synthèse enzymatique d'un tensioactif non ionique de type sucroester par la lipase de *Ricinus communis*, Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ YAHIA FARÈS MÉDÉA, **2017**.

[80]: Site internet : introduction aux techniques utilisées en biochimie, Dosage enzymatique, Mise à jour 28 aout 07.

[81]: Acta Clinica Belgica, Dosage d'activités enzymatiques: Apercu des principes méthodologiques du dosage d'activités enzymatique, International Journal of Clinical and Laboratory Medicine, volume 29, - Issue 2, **1974.**

[82]:MATTHIEU B., Acylation enzymatique de lysine par la lipase B de candida antarctica en solvant CO_2 Supercritique et en réacteur a lit fixe : Essais préliminaires, Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE LORRAINE**, 2017**.

[83]: CECCHIN Mireille, Domaines d'application des sucroesters et sucroglycerides, Rapport de recherche bibliographique, UNIVERSITÉ Cl. Bernard Lyon 1, **2000**-**2001**

[84]: SARNEY D.B, KAPELLER H, FREGAPANE G, VULFSON E.N, Chemo enzymatic synthesis of disaccharide fatty acid esters, J.Am.Oil. Chem. Soc., 71(7), 711-714,**1994**

[85]: BORNSCHEUER U.T, Lipase catalyzed synthesis of mono-acylglycerols. Enzyme microbiol. Technol., 17(7), 578-586, **1995**.

[86]: PASTOR E OTERO C, BALLESTEROS A, Synthesis of mono- and dioleylglycerols using an immobilized lipase. App. Biochem. Biotechnol., 50(3), 251-263, **1995**,

[87]: GELO-PUYJIC M, GUIBE-JAMPEL E, LOUPY A, GALEMA S.A , MATHE D, Lipase catalyzed esterification of some alpha-D-glucopyranosides in dry media under focused microwave irradiation, J. Chem. Soc., 23,2777-2780, **1996**,

[88]: SEUNG- hEON Y., MIYAWAKI O., KWAN-HWA P., NAKAMURA K., Transesterification between triolein and ethylbehenate by immobilized lipase in supercritical carbon dioxide, J. Ferment. Bioeng., 82(4), 334-340, 2**1996**.

[89]: BENZONANA G., DESNUELLE P., Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur les triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène, Biochim. Biophys. Acta., 105,121-136, **1965**.

[90]: BAUDIN B, Méthode de mesure des activités enzymatiques, Service de biochimie A, hôpital Saint-Antoine , AP-HP, Paris et UFR de pharmacie, Châtenay-Malabry, UNIVERSITÉ Paris- Sud, P 923,4280**, 2013**

[91]: SONALI S., Debamitra C., Kumar D. and Sanjukta P., An insight into plant lipase research – challenges encountered, Protein Expression and Purification, 95, 13–21, **2014**

[92]: BOURDEY P., Les nouvelles techniques en cuisine moléculaire peuvent-elles s'intégrer dans la vie de tous les jours, Agathe de tricornot, **2012-2013**

[93]: JAEGER K.E., DIJKSTR B.W., REETZ M.T., Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases, Annu. Rev. Microbiol., 53, **1999.**

[94] : THANONGSAK Ch., Synthesis of sugar esters and fatty acid methyl esters from palm oil and palm fatty acid distillates by two bacterial lipases, Thése de Doctorat, UNIVERSITÉ de SONGKLA, **2007**.

[95] : SABEDER S., HABULIN M. and KNEZ Z., Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters, Journal of Food Engineering, 77, 880–886, **2006.**

[96] SHU W.C. and J F.S, Biocatalysis of the production of carbohydrate esters, New Biotechnology, 26 (3/4), 109-115, **2009.**

Annexes

ANNEXES

A.1. Préparation d'émulsion d'huile d'olive dans la gomme arabique

Dans un bécher d'un litre, on porte à l'ébullition 1L d'eau distillé. Sous agitation, 20g de la gomme arabique est versée en pluie. Quand la gomme arabique est dispersée, la solution est laissée sous agitation dans un cristallisoir remplie de glace jusqu'à ce que la solution soit clarifiée. L'émulsion d'huile d'olive est préparée à l'aide d'un homogénéiseur par l'ajout d'huile d'olive (tout dépend la concentration en substrat désirée) dans la solution de la gomme arabique, le mélange est agité 4 fois 1 minute en s'arrêtant 30 secondes entre deux agitations successives pour éviter l'échauffement de l'émulsion.

A.2. Indice de saponification (S)

Matériel

☐Fiole 250 ml;

☐ Réfrigérant à reflux;

☐Billes de verre;

☐ Bain Marie.

Réactifs

☐Hydroxyde de Potassium 0,5M Alcoolique;

☐Phénolphtaléine;

☐Acide Chlorhydrique 0,5M.

Mode opératoire

☐Dans une fiole de 250ml de verre borosilicaté munie d'un réfrigérant à reflux, on introduit la prise d'essai (m=1g) de palmitate de glucose.

☐On ajoute 25,0ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0,5M et quelques billes de verre.

☐On adapte le réfrigérant et on chauffe à reflux pendant 30min.

☐On ajoute 1ml de solution de phénophtaléine et on titre immédiatement par l'acide chlorhydrique 0,5M (V ml d'Acide Chlorhydrique 0,5M).

☐On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions (V' ml d'Acide Chlorhydrique 0,5M).