



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE LES FRERES MENTOURI DE CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE APPLIQUEE

*MEMOIRE DE FIN D'ETUDE*

*Présenté par*

- DIDI AICHA OUMEIMA
- YAKOUBI SOFIA INES

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE

*Master*

**SPÉCIALITÉ :** *Bio-industrie Analyse et contrôle*

**Extraction analyse et encapsulation d'huile essentielle de déchets de citron (*Citrus limon*) et déchets d'orange (*Citrus sinensis*), en vue de leurs valorisation**

**Soutenu le : 14 juillet 2021**

**Devant le jury composé de :**

**Président Pr. KACEM CHAOUCH NOUREDDINE U.CONSTANTINE**

**Encadreur Dr. BOUCHEDJA DORIA NAILA MCA/INATAA/UFMC**

**Examinatrice Dr. BENCHIHEUB MERIEM MCB/ UFMC**

**Examinatrice Dr. HIMED LOUIZA MCA/INATAA/UFMC**

## Remerciement

*Ce mémoire n'aurait pas pu être ce qu'elle est, sans l'aide de dieu source de toute connaissance qui m'a donné la force afin de l'accomplir.*

*Le présent travail a été effectué au niveau des laboratoires **ISOPHARM ALGERIE** et Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (**INATAA**) à Constantine.*

*Nous tenons à remercier aussi tous ceux qui ont participé à l'accomplissement de cette œuvre, et leur témoigner ma grande reconnaissance en ces mots.*

*A l'intention de :*

- *Mme BOUCHEDJA. N., d'avoir accepté de nous encadrer, définir le thème de notre mémoire, son suivi, ses orientations et sa confiance.*
- *Nous Tenons à remercier très vivement monsieur le professeur KACEM CHAOUCH NOUREDDINE qui a accepté d'évaluer ce travail et de présider notre jury de soutenance.*
- *Nous Tenons à, remercier également Mme BENCHIHEUB MERIEM et Mme HIMED LOUIZA qui ont accepté d'examiner notre travail.*

*Nos remerciements vont également à :*

- *Monsieur MESSASI. D., et les frères CHERAIT pour leurs bonnes réceptions, leurs gentilleses et leurs confiances.*
- *Mme RIACHI. H., de sa disponibilité et son aide au service physico-chimie et microbiologie.*
- *Mme RAMOUL. Z., pour son aide tout au long de la durée de notre stage pratique, sa gentillesse, et pour ces conseils scientifique et ces travaux qui constituent une de nos sources d'inspiration.*
- *Monsieur FAHIM et Mademoiselle AMINA pour leurs disponibilités, leurs aides, et pour leurs conseils dans le protocole de microbiologie utilisées dans ce travail.*

*En fin nous remercions chaleureusement tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

# **Dédicace**

Je dédie ce travail en signe de respect, de reconnaissance et de remerciements :

A Dieu tout puissant

✚ A mes Parents : Pour tous les sacrifices que vous avez consentis à mon égard afin que je puisse mener à bien mes études. Vous avez su m'inculquer le sens du devoir, de la responsabilité, de la dignité, de l'honneur et de l'humilité. Je ne pourrais jamais vous rendre ce que vous avez fait pour moi, mais j'espère seulement que vous trouverez dans ce modeste travail, un réel motif de satisfaction.

✚ A mon frère SEIF EDDINE et ma petite sœur MARIEM ELBATOUL pour le courage et l'attachement.

✚ A Mon adorable binôme SOFIA INES.

✚ A mes amies AYA et Marwa.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'étude supérieurs.

**AICHA OUMEIMA**

# **Dédicace**

*Je dédie ce travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciements :*

*A Dieu tout puissant*

*✚ A mes Parents : Pour tous les sacrifices que vous avez consentis à mon égard afin que je puisse mener à bien mes études. Vous avez su m'inculquer le sens du devoir, de la responsabilité, de la dignité, de l'honneur et de l'humilité. Je ne pourrais jamais vous rendre ce que vous avez fait pour moi et surtout à ma chère mère RABI YARHAMHA , mais j'espère seulement que vous trouverez dans ce modeste travail, un réel motif de satisfaction.*

*✚ A Ma grande sœur DJIHENE et ma petite sœur ROA pour le courage et l'attachement.*

*✚ A Mon adorable binôme AICHA OUMEIMA.*

*Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnée durant mon chemin d'étude supérieurs.*

**SOFIA INES**

# SOMMAIRE

|                          |          |
|--------------------------|----------|
| <b>Introduction.....</b> | <b>1</b> |
|--------------------------|----------|

## **SYNTHESE Bibliographique**

### **Chapitre I : Les agrumes**

|  |   |
|--|---|
| 1. Généralités sur les agrumes.....          | 4 |
| 2. Taux de consommation.....                 | 5 |
| 2.1.Culture des agrumes en Algérie.....      | 5 |
| 3. Intérêt du recyclage et valorisation..... | 6 |

### **Chapitre II : Les huiles essentielles**

|  |    |
|--|----|
| 1. Définition et localisation histologique.....                | 9  |
| 2. Généralités sur les huiles essentielles.....                | 9  |
| 3. Propriétés des huiles essentielles.....                     | 10 |
| 3.1. Propriétés physicochimiques.....                          | 10 |
| 3.2. Propriété biologique.....                                 | 11 |
| 3.3. Propriété Médicinales.....                                | 11 |
| 4. Rôles physiologiques.....                                   | 12 |
| 5. Composition chimique des huiles essentielles d'agrumes..... | 12 |
| 5.1.Terpènes.....  | 12 |
| 5.2.Composés aromatiques.....                                  | 12 |
| 5.3.Composés phénoliques.....                                  | 13 |
| 6. Conservation des huiles essentielles.....                   | 13 |
| 7. Facteurs influençant la composition chimique des HEs.....   | 13 |
| 8. Principaux domaines d'application.....                      | 13 |
| 8.1.Aromathérapie.....   | 14 |
| 8.2.Agro-alimentaire.....                                      | 14 |
| 8.3.Cosmétologie et parfumerie.....                            | 14 |
| 8.4.Pharmacie.....   | 14 |
| 9. Molécule principale du l'orange et citron.....              | 15 |
| 9.1.Propriétés physico-chimiques et organoleptiques.....       | 15 |
| 10. Procédés d'extraction des huiles essentielles.....         | 16 |
| 10.1. Extraction d'huile essentielles.....                     | 16 |
| 10.2. Choix de la méthode d'extraction.....                    | 17 |
| 10.2.1. Paramètre influençant d'extraction.....                | 17 |

|  |    |
|--|----|
| 11. Technique conventionnelles d'extraction.....   | 18 |
| 11.1. Distillation.....  | 18 |
| 11.2. Décantation.....   | 18 |
| 12. Caractéristiques des huiles essentielles.....  | 19 |
| 12.1. Analyse chromatographique.....   | 19 |
| 12.1.1. Chromatographie sur couche mince.....  | 19 |
| 12.2. Analyse microbiologique.....   | 20 |
| 12.2.1. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé..... | 20 |
| 12.3. Caractérisation physique .....   | 21 |
| 12.3.1. Densité relative .....   | 21 |
| 12.4. Caractérisation chimique .....   | 21 |
| 12.4.1. Indice d'acide .....   | 21 |
| 12.5. Dosage des poly phénols totaux et flavonoïdes .....  | 21 |

### **Chapitre III : ENCAPSULATION**

|   |    |
|---|----|
| 1. Concept d'encapsulation.....                 | 23 |
| 2. Définition.....                              | 23 |
| 3. Technique et efficacité d'encapsulation..... | 24 |

### **MATERIELS ET METHODES**

|   |    |
|---|----|
| 1. Matériels de travail.....  | 26 |
| 1.1. Matière première.....  | 26 |
| 1.1.1. Citron.....  | 26 |
| 1.1.2. Orange.....  | 27 |
| 1.2. Hydro-distillateur.....  | 28 |
| 1.3. Conservation de l'huile essentielle obtenue.....                           | 29 |
| 2. Méthode de travail.....  | 29 |
| 2.1. Collecte des fruits.....   | 29 |
| 2.2. Préparation des fruits .....   | 29 |
| 2.3. Conservation des zestes.....   | 30 |
| 2.4. Préparation des zestes .....   | 30 |
| 2.5. Détermination du rendement d'extraction.....                               | 32 |
| 2.6. Méthode d'analyse et contrôle de la qualité d'une l'huile essentielle..... | 32 |
| 2.6.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....                              | 33 |
| 2.6.2. Mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....        | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 2.6.2.1. Microorganismes testés.....                       | 34 |
| 2.6.2.2. Préparation des suspensions microbiennes.....     | 34 |
| 2.6.2.3. Contamination des milieux.....                    | 35 |
| 2.6.2.4. Préparation des dilutions .....                   | 35 |
| 2.6.2.5. Préparation des puits.....                        | 35 |
| 2.6.3. Mesure de la densité relative .....                 | 36 |
| 2.6.4. Mesure d'indice d'acide.....                        | 37 |
| 2.6.5. Dosage des poly phénols totaux et flavonoïdes ..... | 37 |
| 2.6.5.1. Dosage des poly phénols totaux.....               | 37 |
| 2.6.5.2. Dosage des flavonoïdes .....                      | 37 |
| 3. Encapsulation des huiles essentielles.....              | 38 |
| 3.1. Préparation d'alginate de sodium.....                 | 39 |
| 3.2. Préparation de la solution chlorure de calcium.....   | 39 |
| 3.3. Dosage .....  | 39 |
| 3.4. Conservation.....                                     | 40 |

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

|   |           |
|---|-----------|
| 1. Rendement de l'huile essentielle.....  | 42        |
| 1.1.1. Etude comparative entre différents rendements des huiles essentielles<br>obtenus.....            | 42        |
| 1.1.2. Orange.....  | 42        |
| 1.1.3. Citron.....  | 43        |
| 2. Analyses chromatographiques et physico-chimiques et microbiologique.....                             | 43        |
| 2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....  | 43        |
| 2.1.1. Etude comparative entre différents résultats de CCM.....   | 44        |
| 2.1.1.1. Orange.....  | 44        |
| 2.1.1.2. Citron .....   | 45        |
| 2.2. Effet microbien.....   | 45        |
| 2.2.1. Etude comparative entre différents résultats de l'activité antibiotique .....                    | 48        |
| 2.3. Densité relative.....  | 48        |
| 2.4. Indice d'acide.....  | 48        |
| 2.4.1. Etude comparative entre différents résultats de la densité relative et l'indice<br>d'acide ..... | 49        |
| 2.5. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes.....  | 49        |
| 3. Encapsulation.....   | 51        |
| <b>CONCLUSION.....</b>  | <b>54</b> |

## Liste des Abréviations

**A** : Absorbance.

**AFNOR** : Association Française de Normalisation.

**Al**: Aluminium.

**AlCl<sub>3</sub>**: Chlorure d'aluminium.

**Ca<sup>2+</sup>** : Calcium.

**CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium.

**CCM**: Chromatographie sur couche mince.

**CIRC** : Le Centre international de recherche sur le cancer.

**CLHP** : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

**C.Limon** : Citrus Limon.

**CO** : Monoxyde de carbone.

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse.

**CPG-SM** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

**DMAPP** : diphosphate de diméthylallyle.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde.

**DO** : Densité optique.

**ds**: distance parcourue par le solvant à partir de la ligne de dépôt.

**dx**: distance parcourue par le composé à partir de la ligne de dépôt.

**GPP** : diphosphates de géranyle.

**HE** : Huile essentielle.

**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphomolybdique.

**H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phospho-tungstique.

**IA**: Indice d'acide.

**INRA**: Institut National de la recherche agronomique.

**ITAFV**: Institut technique de l'arboriculture fruitière et de la vigne.



**ISO**: l'Organisation Internationale de Normalisation.

**KMnO<sub>4</sub>** : permanganate de potassium.

**KOH** : hydroxyde de potassium.

**IPP** : diphosphate d'isopentenyle.

**LCD** : liquide crystal display.

**LDL** : Lipoprotéine de base densité.

**MH** : Muller Hinton.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium.

**Na OH** : Hydroxyde de sodium.

**OH** : hydroxyde.

**R%** : le rendement des huiles essentielles en pourcentage.

**R<sub>f</sub>** : rapport frontale.

## Liste des figures

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 1</b> : Origine des formes cultivées d'agrumes.....   | 5  |
| <b>Figure 2</b> : Structure de limonène.....  | 15 |
| <b>Figure 3</b> : Modes d'extraction des huiles essentielles.....   | 17 |
| <b>Figure 4</b> : Photo de dispositif de l'hydro-distillation.....  | 18 |
| <b>Figure 5</b> : Procédé de décantation.....   | 19 |
| <b>Figure 6</b> : Fruits d'agrumes (citron).....  | 27 |
| <b>Figure 7</b> : Fruits d'agrumes (l'orange).....  | 27 |
| <b>Figure 8</b> : Montage d'un hydro-distillateur.....  | 28 |
| <b>Figure 9</b> : Photo des zestes de citron.....   | 29 |
| <b>Figure 10</b> : Photo des zestes d'orange.....   | 29 |
| <b>Figure 11</b> : Préparation des zestes d'agrumes.....  | 31 |
| <b>Figure 12</b> : Photo de l'huile essentielle brute d'orange et de citron obtenus.....  | 32 |
| <b>Figure 13</b> : Préparation de la plaque CCM.....  | 33 |
| <b>Figure 14</b> : Solution de permanganate de potassium « la révélation ».....   | 34 |
| <b>Figure 15</b> : Pré-diffusion des boites.....  | 36 |
| <b>Figure 16</b> : Préparation des solutions de dosage.....   | 38 |
| <b>Figure 17</b> : Préparation d'alginate de sodium.....  | 39 |
| <b>Figure 18</b> : Photo de la réalisation de dosage.....   | 40 |
| <b>Figure 19</b> : Chromatogramme des huiles essentielles extraits (orange/citron) et des huiles essentielles commerciales..... | 44 |
| <b>Figure 20</b> : Chromatogramme de l'huile essentielle d'orange.....  | 44 |
| <b>Figure 21</b> : Plaque CCM de citron mûr.....  | 45 |
| <b>Figure 22</b> : L'antibiogramme des différentes souches microbiennes employées sur l'huile essentielle de citron.....        | 45 |
| <b>Figure 23</b> : L'antibiogramme des différentes souches microbiennes employées sur l'huile essentielle d'orange.....         | 47 |

**Figure 24:** Photo des capsules des huiles essentielles.....52

## Liste des tableaux

|   |    |
|---|----|
| <b>Tableau 1 :</b> Taux de consommation des agrumes.....  | 6  |
| <b>Tableau 2 :</b> Propriété physico-chimiques et organoleptiques du limonène.....                        | 15 |
| <b>Tableau 3 :</b> Rendements de l'huile essentielle d'agrumes.....                                       | 42 |
| <b>Tableau 4 :</b> Effet antimicrobien de l'huile essentielle de citron sur les souches bactériennes..... | 46 |
| <b>Tableau 5 :</b> Effet antimicrobien de l'huile essentielle d'orange sur les souches bactériennes.....  | 46 |
| <b>Tableau 6 :</b> La densité des huiles essentielles.....  | 48 |
| <b>Tableau 7 :</b> L'indice d'acide des huiles essentielles.....  | 48 |
| <b>Tableau 8 :</b> la densité optique des poly phénols totaux et flavonoïdes des huiles essentielles..... | 49 |
| <b>Tableau 9 :</b> La DO des phénols totaux et flavonoïdes d'orange de maltaise.....                      | 51 |

Les huiles essentielles sont des produits odorants, de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiées au cours de la préparation. Elles sont très efficaces sur les germes résistants aux antibiotiques. Leurs domaines d'applications sont diversifiés malgré l'arrivée sur le marché des composés de synthèse; c'est ainsi qu'elles trouvent de nombreuses applications dans l'industrie chimique, dans le domaine agroalimentaire (condiments, épices) dans l'aromathérapie (parfumerie, cosmétique et savonnerie) et aussi dans l'industrie médicinale.

C'est dans cette optique que ce travail a été réalisé sur les huiles essentielles de l'orange douce, *Citrus sinensis* et *Citrus limon* afin de valoriser les zestes fraîches riches en composés volatiles susceptibles d'avoir des différentes activités et que l'on va entamer dans cette mémoire en fin de cycle, La problématique générale de cette référence concerne la qualité, la caractérisation et la valorisation des substances naturelles végétales et plus particulièrement celles qui sont spécifiques aux milieux insulaires. (SYLVAIN., 2010).

La valorisation des déchets permet non seulement d'alléger l'impact écologique en minimisant la pollution mais aussi de proposer de nouvelles opportunités permettant un développement économique. (MHIRI., 2015).

L'objectif général de ces travaux de mémoire est de proposer un moyen de valorisation des zestes d'orange et de citron, qui appartiennent de la famille des Rutacées qui sont les plus répandus dans le monde, Ils offrent ainsi une grande étendue d'utilisation allant, de l'extraction de leurs essences à partir des écorces, qui sont composés essentiellement du limonène, leurs différentes analyses, associées à la technique d'encapsulation.

Les travaux qui font l'objet de ce mémoire de master s'inscrivent dans la thématique de l'extraction des huiles essentielles à partir des déchets d'agrumes, Ils ont été réalisés au sein de l'équipe « ISOPHARM Algérie », dans le laboratoire de contrôle de qualité des produits pharmaceutique physico-chimique et microbiologique et au sein de laboratoire de l'institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires (INATAA), ensuite déposé au niveau du département de la biologie appliquée sous la spécialité de la bio-industrie analyses et contrôle, université du les frères MENTOURI Constantine.

Ce mémoire est réparti en trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique sur les agrumes, leurs classifications et composition chimique, Taux de consommation, ces sous-produits et leur intérêt.
- Le deuxième chapitre décrit en détail la caractérisation des huiles essentielles obtenues par l'hydro-distillation celles-ci ont subi des différentes analyses physico-chimiques et microbiologique et l'encapsulation.
- Le troisième chapitre décrit les dispositifs expérimentaux ainsi que les techniques de caractérisation utilisées et nous discuterons les résultats obtenus lors de cette étude.
- Une synthèse sur les résultats obtenus ainsi que les perspectives sont finalement discutés dans la conclusion.

# **Synthèse Bibliographique**

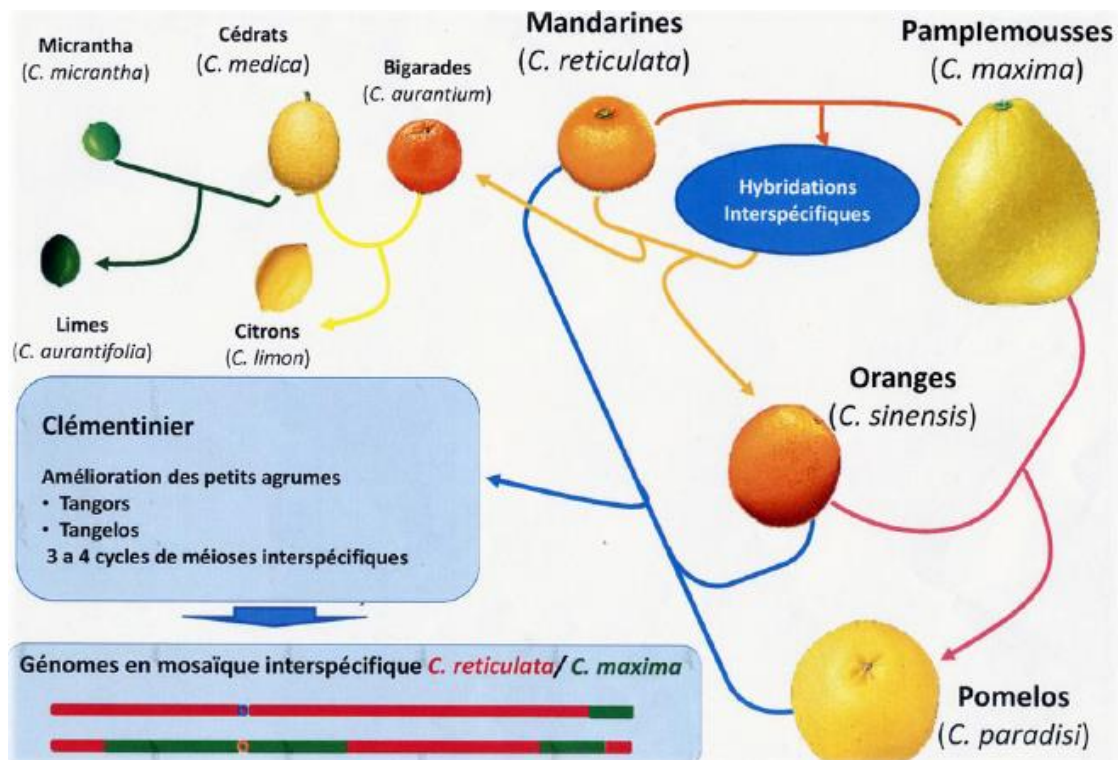
## 1. Généralités sur les agrumes

Le mot agrume provient du latin *acrumen* qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (**BEEDISTE et BACHES, 2002**). Les agrumes sont des baies modifiées ou ont une forme spécialisée de baie (*Hasperdium*) résultant d'un ovaire simple. En plus du genre *Citrus*, nous observons cinq genres supplémentaires de ce type de fruit : *Poncirus* (orange trifoliée), *Fortunella* (le kumquat qui est mangé tel quel avec sa peau), *Microcitrus*, *Eremocitrus*, et *Clymenta* dans la sous famille des *Aurentiordae* et appartenant tous à la famille des *Rutaceae*. La taille des agrumes s'étend d'environ 2,25 cm pour le kumquats (espèce de *Fortunella*) à plus de 20 cm de diamètre pour le *pomelo* (*C. grandis*). La forme est également variable : aplatie (pour le pamplemousse, les mandarines et les tangerines), globuleuse à ovale (sphérique ou presque pour les oranges douces), oblong (pour les citrons (*C. limon*) et cédrats (*C. medica*)) et sphérique pour les limes (*C. aurantifolia*) (**BOUSBIA, 2011**).

D'après **PRALORAN (1971)** les agrumes sont de petits arbres, ou des arbustes, atteignant de 5 à 15 m de hauteur, assez souvent épineux. Et à feuillage dense, persistant à l'exception de quelques variétés hybrides dont les feuilles sont caduques ou semi-persistantes. D'un vert généralement très foncé, les jeunes plants et pousses étant d'un vert nettement plus clair. Le fruit est formé de segments contenant les graines. Les segments sont entourés d'un endocarpe blanc à l'extérieur d'une écorce à très nombreuses glandes à essence, devenant jaune ou orange à maturité.

Selon **EL OTMANI (2005)** les agrumes sont généralement classés parmi les espèces végétales pérennes moyennement sensibles au froid, ceci est dû à leur incapacité à survivre sous des températures froides que supportent les espèces ligneuses, des zones de latitudes élevées qui peuvent atteindre des valeurs voisines de 40 °C.





**Figure 1** : Origine des formes cultivées d'agrumes (adaptée de OLLITRAULT *et al*, 2012)

## 2. Taux de consommation

Les agrumes occupent une place de plus en plus importante en Algérie, du fait que le marché algérien a considérablement montré leurs grandes consommations et essentiellement l'orange et citron en période hivernale.

Des études scientifiques ont conçu la richesse de leurs déchets en huiles essentielles, suites à cela cette présentation réaliser pour valoriser leurs utilisations.

### 2.1. Culture des agrumes en Algérie

Les agrumes sont parmi les fruits les plus cultivées en Algérie. Ils sont d'excellente qualité et sont très appréciés pour leur valeur nutritionnelle et rafraîchissante (INRAA, 2006). En plus la production d'agrumes présente une importance économique considérable pour de nombreux pays, cette importance est justifiée par leur :

- ✓ Consommation comme des produit frais ou après leur transformation (jus ; sirop.).
- ✓ Grande qualité nutritive riche, en vitamine C, B6, et constituent une source de fibres d'acide ascorbique et folique, du potassium et du calcium.

- ✓ Effet bénéfique sur la santé en contribuant dans la diminution des risques de maladies cardio-vasculaires et d'autres maladies (ITAFV, 2014).

(BOUNAB, et CHABBI, 2018)

Aussi bien dans le secteur agricole que dans diverses branches auxiliaires (conditionnement, emballage, transformation transport, etc.) (FERHAT *et al*, 2010). Cette culture revêt une importance stratégique pour l'Algérie comme source d'approvisionnement en fruits et des débouchés sur le marché international des produits agrumicoles. Sur le plan social, la culture des agrumes emploi en moyenne 140 jours/ha/an, sans compter ceux générés par l'environnement de ce secteur (transformation, commercialisation) (I.T.A.F, 2002). Le verger agrumicole algérien est particulièrement concentré dans les plaines Littorales et Sublittorales, où les conditions de sol et de climat sont favorables (BOUNAB, et CHABBI, 2018).

La consommation des fruits a rapidement augmenté en Algérie, résultat de la croissance de la population. Cependant, même après l'implantation d'arbres dans les plantations existantes, il n'y a pas eu d'augmentation effective de la productivité. Il faudrait créer de nouvelles plantations en utilisant des pépinières d'arbres sans virus pour pallier à ce problème, et augmenter par conséquent la production. (LAKHDARA, 2014).

**Tableau 1** : Taux de consommation des agrumes.

| <b>Agrumes - Bassin méditerranéen - Extrapolation aux autres pays de la région de la consommation sur les marchés locaux</b> |                              |         |  |
|--|------------------------------|---------|--|
|  | Population (millions d'hab.) |         | Accroissement potentiel de la consommation d'agrumes (000 t) |
|  | Actuelle                     | En 2020 |  |
| <b>Algérie</b>   | 35.4                         | 40.6    | 115.5  |

### 3. Intérêt du recyclage et valorisation

Les écorces d'agrumes constituent un gisement riche en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques). Toutefois, la voie de la valorisation industrielle la plus répandue demeure l'extraction des essences et des huiles essentielles qui peuvent être utilisées comme une alternative aux fongicides synthétiques (MHIRI, 2015). D'autres valorisations ont été également rapportées telles que l'extraction des fibres comme la cellulose et la pectine (FERNANDEZ-LOPEZ *et al*, 2004 ; MARIN *et al*, 2007 ; BICU *et al*, 2011 ; WANG *et al*, 2014) pour les utiliser dans la formulation des aliments diététiques mais aussi l'incorporation directe des écorces dans la filière de production des confiseries (bonbons, confitures) (BOCCO *et al*, 1998).

Les coproduits d'agrumes peuvent être aussi utilisés en tant qu'aliment pour bétails (BAMPIDIS & ROBINSON, 2006 ; LEDESMA-ESCOBAR & LUQUE DE CASTRO, 2014). L'utilisation des écorces pour la production des biocarburants (éthanol) et des biogaz (WILKINS *et al*, 2007 ; POURBAFRANI *et al*, 2010 ; LOHRASBI *et al*, 2010), pour la production du plastique biodégradable (BYRNE *et al*, 2004) et comme inhibiteur de la corrosion des métaux et des alliages (SALEH *et al*, 1982 ; DA ROCHA *et al*, 2010) est relativement récente. Les travaux de la littérature portant sur les effets d'anticorrosion des extraits de plantes, de feuilles et des coproduits de fruits suggèrent des effets inhibiteurs liés à plusieurs molécules. Les phénols, particulièrement les flavonoïdes, caractérisés par des structures polycycliques, jouent le rôle d'antioxydants en plus d'autres molécules comme la vitamine C et les caroténoïdes qui peuvent contribuer à cet effet. Les polysaccharides comme les pectines contribuent à la formation de film protecteur sur les surfaces métalliques (RAJA & SETHURAMAN, 2008 ; DA ROCHA *et al*, 2010).

Les écorces d'agrumes sont riches en composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les flavonoïdes des écorces d'agrumes sont caractérisés par leur activité anti-oxydante, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne (BOCCO *et al*, 1998 ; MA *et al*, 2009 ; HUANG *et al*, 2010). Grâce à cette richesse, l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces d'agrumes a considérablement attiré l'intérêt scientifique pour les utiliser comme des antioxydants naturels, conservateurs principalement dans les aliments mais aussi dans l'industrie

pharmaceutique et cosmétique ces quelques applications potentielles des substances bioactives des écorces d'agrumes en alimentation fonctionnelle, en pharmacie et en cosmétique ou en d'autres applications telles que la chimie et la conception de nouveaux matériaux ne sont possibles que si les molécules sont extraites tout en gardant leurs fonctionnalités. (MHIRI, 2015).

## 1. Définition et localisation histologique

Les huiles essentielles de la famille des rutacées, notamment les huiles d'agrumes sont largement utilisées comme arômes et parfums en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction et des espèces ainsi que, de la méthode employée pour leur extraction. **(BOUSBIA, 2011)**.

Les huiles essentielles ou essences végétales sont des produits huileux, volatils, odorants et incolores ou légèrement teintés, obtenus par distillation à la vapeur d'eau, par expression, par incision ou par enfleurage du matériel végétal. **(BUDAVARI, 1996)**.

Ces essences végétales sont largement distribuées dans le règne végétal et n'existent que chez les végétaux supérieurs. En effet, elles se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles botaniques. **(RICHTER, 1993)**.

Les huiles essentielles se trouvent dans tous les organes de la plante : racines, fruits, graines, fleurs, feuilles, écorces, bois, etc... Elles se forment dans des cellules spécialisées, le plus souvent, regroupées en canaux ou en poches sécréteurs et elles sont ensuite transportées dans les différentes parties de la plante, lors de la croissance de cette dernière. **(BERNARD *et al*, 1988)**.

Les huiles essentielles des agrumes s'accumulent tout au long de la vie du fruit, de la feuille ou du pétale dans des poches appelées glandes à essence. Ces poches sont entourées par les cellules sécrétrices qui isolent les tissus voisins du contenu de la poche. On peut s'interroger sur la finalité de cette sécrétion puisque les constituants des huiles essentielles ne semblent pas exercer un rôle quelconque dans un métabolisme de la plante.

## 2. Généralités sur les huiles essentielles

Les essences se différencient des huiles grasses, par leurs propriétés physiques et leur composition, du fait qu'elles se volatilisent à la chaleur et que leurs taches sur le papier sont passagères. Elles se caractérisent par leurs propriétés organoleptiques (odeur, couleur et goût). A la température ambiante, elles sont généralement liquides de densité souvent inférieure à celle de l'eau. Elles sont incolores ou jaune pâle, sauf quelques exceptions comme les HES de la cannelle (orange), de l'absinthe (vert) ou de la camomille (bleu). **(SALLE, 1991)**.

Les huiles essentielles trouvent une utilisation extensive dans plusieurs secteurs clés de l'industrie chimique comme l'agroalimentaire, la parfumerie, la cosmétique, la médecine et l'aromathérapie. (MNAYER, 2014).

### 3. Propriétés des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont employées depuis les temps les plus reculés pour leurs effets thérapeutiques les plus diversifiés. La diversité moléculaire des composants qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés. (VALNET, J.1984)

En effet, les hydrocarbures mono terpéniques présentent des propriétés antalgiques en usage percutané, vermifuge, emménagogue, antiseptique atmosphérique, anti parasitaire, Les hydrocarbures sesquiterpéniques présentent des effets anti-inflammatoires, calmants, hypotenseurs. (AMOR, 2006)

Les pouvoirs offerts par les HEs sont innombrables et variés. Il serait impossible de les mentionner tous. La mise en évidence de leur activité biologique a fait l'objet de nombreuses études. (BAKKALI, *et al*, 2008).

#### 3.1. Propriétés physicochimiques

D'une façon générale, les caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles sont variables selon beaucoup de facteurs (lieu de provenance, climat et ses diverses modifications, période de grandes pluies ou de sécheresses prolongées, époque et moyens de récolte, procédés d'extraction, etc.). Ceci explique la marge, souvent assez grande, laissée dans les constantes et pourcentage des composantes (VALNET, 1984).

- Ce sont généralement des liquides à la température ordinaire.
- Elles sont volatiles contrairement aux huiles fixes.
- Elles sont généralement incolores.
- Leur densité est inférieure à 1, sauf pour trois huiles : la cannelle, le girofle et le sassafras.
- Elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et un pouvoir rotatoire.
- Elles sont peu solubles dans l'eau, sont solubles dans les alcools, les huiles fixes et dans la plupart des solvants organiques (PARIS et HURABIELLE, 1981).

### 3.2. Propriété biologique

Le spectre d'action des HEs est très étendu, car elles agissent vis-à-vis d'un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. En outre, certaines essences douées d'une activité antifongique s'opposent au développement des champignons, des moisissures en les détruisant. Ces activités sont par ailleurs variables d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche à l'autre.

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries à Gram négatif paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire sauf quelques exceptions, comme par exemple *Aeromonas hydrophila* et *Campylobacter jejuni* qui ont été décrites comme particulièrement sensibles à l'action des huiles essentielles. Néanmoins *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif, reste la moins active vis-à-vis des essences végétales. (OUIS, 2015).

### 3.3. Propriété Médicinales

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. La plupart des constituants des huiles essentielles ont un pouvoir antimicrobien d'où leur usage comme antiseptiques. D'autres possèdent des propriétés digestives ou des propriétés antispasmodiques, sédatives, cicatrisantes, etc.... Ces activités sont dues surtout à leurs constituants terpéniques.

En outre, de nombreuses HEs présentent une activité contre tous les différents types de douleurs et sont très utilisées pour traiter les troubles articulaires inflammatoires. Elles ont la propriété de renforcer et de relancer les défenses immunitaires de l'individu.

C'est dans ce sens que l'on a pu dire que les essences aromatiques étaient cytophylactiques (protectrices des cellules vivantes). Par ailleurs, certaines HEs présentent des activités anti tumorales et sont adoptées dans le traitement préventif de certains types de cancers (Nigelle, Mélisse officinale). (OUIS, 2015).

## 4. Rôles physiologiques

Le rôle des huiles essentielles n'a pas pu être clairement démontré. En effet, on considère qu'il s'agit de produits de déchets du métabolisme. Toutefois, certains auteurs pensent que les huiles essentielles peuvent avoir un rôle aussi bien dans les interactions végétales (agents allélopathiques, notamment inhibiteurs de germination) que dans les

interactions végétal-animal : protection contre les prédateurs (insectes, champignons) et attraction des pollinisateurs (**BRUNETON, 1993 ; BEKHECHI et ABDELOUAHID, 2010**).

D'autres considèrent que les HEs facilitent certaines réactions chimiques et conservent l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques (**BELAÏCHE, 1979**).

## 5. Composition chimique des huiles essentielles d'agrumes

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques. (**ALIOUNE, 2015**).

### 5.1. Terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte, leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone  $C_5H_8$ . Ils sont subdivisés selon le nombre d'entité isoprènes en mono terpènes formé de deux isoprènes ( $C_{10}H_{16}$ ), en sesquiterpènes formés de trois isoprènes ( $C_{15}H_{24}$ ), en di terpènes formés de quatre isoprènes ( $C_{20}H_{32}$ ) et en tétra terpènes formés de huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. (**ALIOUNE, 2015**).

### 5.2. Composés aromatiques

Une autre classe de composés volatiles fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragol et bien d'autres. (**ALIOUNE, 2015**).

### 5.3. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés parmi les produits du métabolisme secondaire des plantes aromatiques. Ils correspondent à un vaste ensemble de molécules caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ces composés, d'intérêt biologique, sont principalement présents dans les végétaux (fruits, légumes, céréales...) et dans les produits qui en dérivent (thé, jus de fruits, vin, bière, ...). (**ALIOUNE, 2015**).



Les composés phénoliques sont actuellement l'objet d'une littérature abondante. En effet, leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine seraient nombreuses : effets protecteurs contre les maladies cardio-vasculaires, effets anti-inflammatoires, ou encore antiviraux (YANG *et al*, 2000). Par ailleurs ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et leurs propriétés anti oxydantes. (ALIOUNE, 2015).

## 6. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances très délicates, elles s'altèrent facilement, ce qui rend leur conservation difficile. Les risques de dégradation sont multiples : photo-isomérisation, photo-cyclisation, coupure oxydative de propénylphénols, peroxydation des carbures et décomposition en cétones et alcools (limonène). Ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons propres et secs en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté, à l'abri de la lumière et de la chaleur. (Alioune F, 2015).

## 7. Facteurs influençant la composition chimique des HES

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant divers Facteurs : la température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le séchage, le lieu et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes la partie utilisée de la plante, méthode d'extraction (BRUNETON, 1999 ; SVOBODA et HAMPSON, 1999).

## 8. Principaux domaines d'application

En raison de leurs diverses propriétés, les H.ES sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leurs pouvoirs antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif, antidiabétique..., en alimentation par leur activité Anti-oxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriété odoriférante. (OUI, 2015).

### **8.1. Aromathérapie**

L'aromathérapie est une forme de médecine alternative dans laquelle les H.Es ont une grande importance car elles induisent de nombreux effets curatifs. Ainsi elles s'utilisent de plus en plus dans diverses spécialités médicales telles que : la podologie, l'acupuncture, la masso-kinésithérapie, l'ostéopathie, la rhumatologie ainsi que dans l'esthétique. (OUIS, 2015).

### **8.2. Agro-alimentaire**

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatisants, les H.Es sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym,...). Elles sont également très prisées en liquoristerie (boissons anisées, kummel) et en confiserie (bonbons, chocolat...). Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures. (OUIS, 2015).

### **8.3. Cosmétologie et parfumerie**

Les H.Es sont recherchées dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes. L'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60%). Les H.Es sont aussi consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétiques : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons.

Ces produits d'hygiène, détergents et lessives par exemple, consomment eux aussi beaucoup d'H.Es pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs. (OUIS, 2015).

### **8.4. Pharmacie**

Les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion et sous la forme de préparations galéniques 2b. Plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes, par exemple gastralgine est un digestif antiacide (OUIS, 2015).

Elles permettent par leurs propriétés aromatisantes de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale. Aussi beaucoup de médicaments vendus en pharmacie sont à base d'H.Es comme par exemple les collyres, les crèmes, les élixirs (OUIS, 2015).

## 9. Molécule principale du l'orange et citron

Le limonène  $C_{10}H_{16}$  est un hydrocarbure liquide appartenant à la famille des terpènes. Il est produit naturellement par divers végétaux, notamment les agrumes et représente le constituant majoritaire de toutes les huiles issues des peaux de ces fruits, environ 95 % (ALIOUNE, 2015). La structure du limonène est donnée par la figure 2.

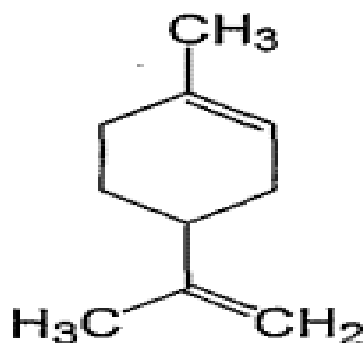


Figure 2. Structure de limonène (ALIOUNE, 2015).

Le limonène est largement répandu dans la nature. Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) rapporte que le limonène a été décelé dans plus de 300 huiles essentielles. Le limonène est un sous-produit de l'industrie des jus d'oranges, de citrons et de pamplemousses. Il est obtenu à partir de l'huile des pelures de ces agrumes dans laquelle sa concentration peut atteindre 95 % en poids. (ALIOUNE, 2015).

### 9.1. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques

Les propriétés physico-chimiques et organoleptiques sont mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Propriété physico-chimiques et organoleptiques du limonène. (ALIOUNE, 2015).

|  |                |
|--|----------------|
| Formule brute                            | $C_{10}H_{16}$ |
| Masse molaire (g/mol)                    | 136.23         |
| Température d'ébullition ( $^{\circ}C$ ) | 176            |
| Température de fusion ( $^{\circ}C$ )    | -75            |
| Masse volumique ( $g/cm^3$ )             | 0.84           |

|            |                                      |                      |
|------------|--------------------------------------|----------------------|
| Solubilité | Eau<br>Hexane                        | Insoluble<br>Soluble |
| Apparence  | Liquide incolore                     |                      |
| Odeur      | Parfumée caractéristique des agrumes |                      |

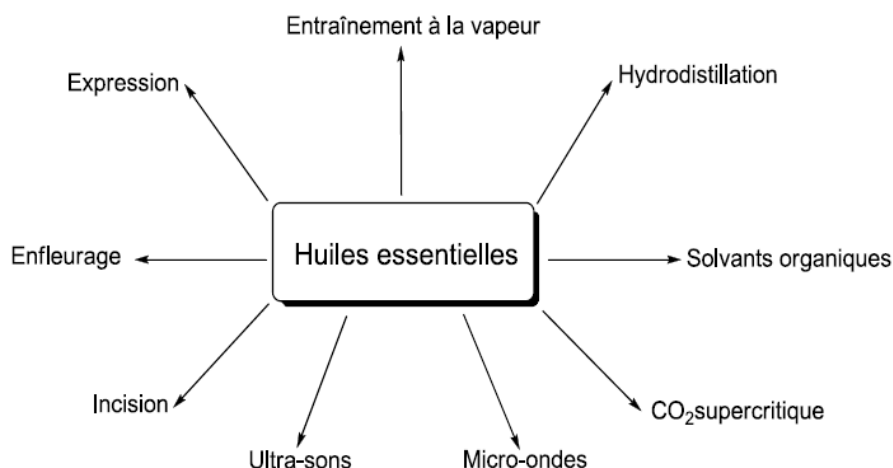
Le limonène est un constituant naturel de certains, plantes, fruits et légumes. On le retrouve dans les huiles essentielles des pelures d'agrumes (orange, citron, lime, etc.), les cornichons et le céleri. L'autre isomère (l-limonène) se retrouve principalement dans les huiles essentielles de pin, la térébenthine et de menthe. (ALIOUNE, 2015).

## 10. Procédés d'extraction des huiles essentielles

### 10.1. Extraction de l'huile essentielle

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles et le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter et des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire. Il est nécessaire dans un premier temps d'extraire de la matière végétale les molécules odorantes constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation.

Les principales méthodes d'extraction des huiles essentielles sont résumées dans le schéma suivant :



**Figure 3.** Modes d'extraction des huiles essentielles (OUIS, 2015)

### 10.2. Choix de la méthode d'extraction

La diversité et la complexité des huiles essentielles rendent le choix des processus d'obtention délicat. La méthode choisie ne doit pas conduire à la discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils. Pour cela, différents paramètres et propriétés sont à prendre en compte. (BOUSBIA, 2011).

Les principaux paramètres à prendre en compte dans les opérations fondamentales d'extraction de matières premières naturelles aromatiques sont :

- La volatilité.
- La solubilité.
- La taille et la forme des molécules constitutives.
- L'adsorption.

(BOUSBIA, 2011).

#### 10.2.1. Paramètres influençant l'extraction

- Matière végétale.
- Nature et état du solide et du soluté.
- Nature, concentration et volume du solvant.
- Méthode, durée, température et pression. (BOUSBIA, 2011).

## 11. Technique conventionnelles d'extraction

### 11.1. Distillation

L'hydro-distillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction dont le rôle est d'entraîner les composés volatiles des produits naturels avec la vapeur d'eau, ainsi que pour le contrôle de qualité. Ce procédé est aussi appelé « entraînement à la vapeur ». Selon l'étymologie du mot, composé d'hydro « eau » et de – distillation qui vient du latin *stilla*, « goutte » et de *distillare* (latin savant), « tomber goutte à goutte », il semble donc que cette technique soit très ancienne. On a en effet retrouvé des traces de son existence dès l'antiquité, car on pense que les perses l'auraient découvert pour fabriquer l'eau de rose (BRUNTON, 1993).

Une hydro-distillation est assurée grâce à un appareil de type *Clevenger*, Son principe consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, ensuite l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique où la chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales (BOUHALI, 2015).



Figure 4 : Photo de dispositif de l'hydro-distillation.

### 11.2. Décantation

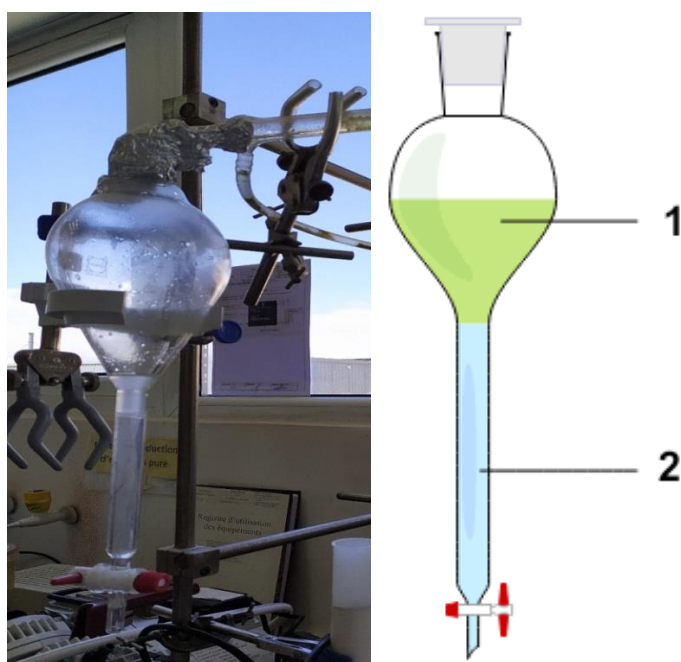
Après condensation, la séparation de la phase aqueuse de l'huileuse (HE) se fait par décantation.

La décantation est une opération de séparation mécanique (Figure 5). Lorsque deux liquides ne sont pas miscibles, comme l'huile et l'eau, il suffit de laisser reposer le

mélange pour que le liquide le plus dense se place en-dessous du liquide le moins dense, et qu'apparaisse une surface de séparation horizontale entre les deux liquides.

(BADJOU DJ et GOUASMIA, 2015).

Cette méthode apporte une amélioration à la qualité de l'HE en minimisant les altérations hydrolytiques (OUIS, 2015).



1. L'huile essentielle
2. Eau

**Figure 5 :** Procédé de décantation.

## 12. Caractéristique des huiles essentielle

### 12.1. Analyse chromatographique

#### 12.1.1. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode qui permet de séparer les constituants d'un mélange et éventuellement de les identifier ; elle permet également de contrôler la pureté d'une substance. Le mélange est fixé sur un support appelé phase stationnaire (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque), est entraîné par un solvant approprié appelé éluant (phase mobile) qui migre par capillarité sur la plaque. Les constituants du mélange se séparent par migration différentielle, chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant qu'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire. Après migration les taches doivent être révélées. La

révélation peut se faire par immersion dans un bain de permanganate de potassium ou de vapeur de diiode ou encore par observation à la lumière UV si la plaque de silice comporte un indicateur de fluorescence. Le rapport frontal  $R_f$  caractérisant la position d'un composé sur une plaque est défini par l'expression suivante :

$$R_f = \frac{dx}{ds}$$

Où

$dx$  : distance parcourue par le composé à partir de la ligne de dépôt.

$ds$  : distance parcourue par le solvant à partir de la ligne de dépôt.

(ALIOUNE, 2015).

## 12.2. Analyse microbiologique

La détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation antimicrobienne, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type de microorganisme ciblés et leur éventuelle adaptation aux huiles essentielles. (TOURE, 2015).

### 12.2.1. Méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé

Cette technique utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet anti microbien, elle est aussi appelée : la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs. Des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller Hinton. (KHEBICHAT, 2013). Elle consiste à déposer à l'intérieur d'un puit creusé dans une gélose inoculée dans la masse par une souche bactérienne cible, une quantité de substance antimicrobienne à évaluer. Après dépôt dans le puits, le composé diffuse dans la gélose et inhibe la formation d'un tapis bactérien selon le gradient de concentration qui se met en place. Cette diffusion est dépendante de la diffusibilité du composé dans la gélose, de la durée de migration, de la distance de migration et de la concentration du composé (COOPER, 1955).



### 12.3. Caractérisation physique

#### 12.3.1. Densité relative

La densité ou densité relative d'une huile essentielle est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique de l'eau distillée, à 20°C. Cette grandeur sans dimension. La densité des huiles essentielles est très souvent inférieure à 1 (densité de l'eau). (DESCHEPPER, 2017).

### 12.4. Caractérisation chimique

#### 12.4.1. Indice d'acide

L'indice d'acide d'une l'huile défini comme étant le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huiles essentielles. La mesure d'indice acide est réalisée par titrage où les acides libres sont neutralisés par une solution d'Ethanol titrée de KOH. (AFNOR, 2000).

### 12.5. Dosage des poly phénols totaux et flavonoïdes

Les polyphénols totaux sont solubles dans les solvants organique polaires et en les caractérise dans les solutions d'hydroxydes de sodium (Na OH) et de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Les Flavonoïdes peuvent être directement extraits par des solvants polaires tels que le dichloro-méthane et l'éther.

Le contenu des composés phénoliques de notre extrait est estimé par la méthode de Folin-ciocalteu, le réactif de Folin-Cioecalteu est constitué par un mélange d'acide phospho-tunguistique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène (SINGLETON et ROSSI, 1965 ; SINGLETON *et al*, 1999 ; BOIZOT et CHARPENTIER, 2006).

La coloration produite, dont l'absorption est mesurée à 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait végétal (STANKOVIĆ, 2011 ; BONNAILLIE *et al*, 2012), et les flavonoïdes contenus dans les huiles essentielles citron/orange estimés par la méthode d'AlCl<sub>3</sub>, Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, qui est susceptible de donner par son groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium (RIBEREAU *et al*, 1972 ; BOULEKBACHE, 2005).

D'après RIBEREAU (1968), les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que

le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. **(RIBEREAU, 1968)**.

La lecture des composées phénolique totaux et les flavonoïdes se fait par un spectrophotomètre (UV).

## 1. Concept d'encapsulation

C'est dans les années 50 que les premiers produits encapsulés ont vu le jour, avec la fabrication du papier copie sans carbone, sur lequel étaient fixées des microcapsules contenant de l'encre. Ces microcapsules s'ouvraient lorsqu'une pression s'exerçait, libérant ainsi les actifs protégés (**DE KRUIF *et al*, 2004**). Actuellement, les applications de l'encapsulation sont très nombreuses et généralisées à plusieurs secteurs d'activités partant de la chimie à l'agro-alimentaire (**KOLHE *et al*, 2003**). Suivant les domaines et les applications, l'encapsulation a pour but d'assurer la protection, la compatibilité et la stabilisation d'une matière active dans une formulation. Elle permet d'améliorer la présentation d'un produit ou encore de masquer une odeur ou un goût. Enfin, l'encapsulation peut modifier et contrôler le profil de libération d'une substance active pour obtenir, par exemple, un effet prolongé ou déclenché (**AKDIM, 2016**).

## 2. Définition

L'encapsulation est l'une des techniques couramment utilisées. Elle permet d'immobiliser les composés volatils des huiles essentielles, de stabiliser cette dernière et de la protéger contre la lumière, l'oxygène et la température ainsi que de moduler sa libération en prolongeant son profil cinétique (**MICHAEL, 2009**). Par conséquent, ce procédé a tendance à protéger et préserver les activités biologiques de ces huiles. En outre, mettre en action ces vertus dans le produit alimentaire.

L'encapsulation est un procédé qui a pour but de piéger une substance ou un mélange de substances précis à l'aide de matériaux adaptés. Les substances qui feront l'objet d'une encapsulation peuvent être liquides, solides ou gazeuses. Généralement, ce sont des principes actifs sensibles ou instables à certains facteurs environnementaux et qui ont une action bien ciblée. Il peut aussi s'agir de substances dont on souhaite modifier l'état comme par exemple la transformation d'un liquide en solide (**KERDUDO *et al*, 2014**). L'encapsulation permet d'immobiliser les composés volatils des huiles essentielles, de stabiliser ces dernières et de les protéger (contre la lumière, l'oxygène et la température).

Les principaux objectifs de l'encapsulation peuvent être résumés comme suit:

- **Immobiliser ou isoler** : limite le contact entre différentes parties d'un système. Par exemple, deux réactifs sont séparés par encapsulation et mis en contact seulement lors de la rupture des capsules.
- **Protéger** : protège le composé encapsulé du milieu environnant. Par exemple, les cellules biologiques, très sensibles au cisaillement, sont protégées une fois incorporées dans une microcapsule.
- **Contrôler la libération** : isole un composé non indéfini. Par exemple, un parfum encapsulé sera libéré par frottement d'une surface sur laquelle sont déposées des microcapsules, ou un médicament sera libéré selon une cinétique bien définie.
- **Structurer et fonctionnaliser** : modifie les propriétés physiques et le comportement, où permet de créer des fonctions nouvelles.

(VANDAMME *et al*, 2007)

### 3. Technique et efficacité d'encapsulation

Il n'existe pas de système universel d'encapsulation pour une substance active donnée. En effet, lorsque l'actif à protéger est un complexe de molécules, tels que les extraits naturels, les contraintes et les difficultés de développement sont importantes. Les différences entre les composés (hydrophilie/hydrophobicité, différences de masses moléculaires, fonctions chimiques diverses, etc.) vont conduire à des différences d'interaction avec le ou les matériaux de recouvrement, entraînant par exemple des rendements d'encapsulation variables (Kerdudo *et al*, 2015). De nombreuses méthodes d'encapsulation ont été développées afin de s'adapter à divers types de substances actives et matériaux enrobants. Ces différentes méthodes permettent d'obtenir des particules aux caractéristiques variées (taille, épaisseur de la paroi, perméabilité) permettant de moduler la libération de la substance active (Martins *et al*, 2014).

L'efficacité de l'encapsulation dépend de plusieurs variables. La rétention de l'agent actif dans l'enveloppe membranaire est régie par des facteurs liés à la nature chimique du noyau, notamment son poids moléculaire, sa fonctionnalité chimique, sa polarité et sa volatilité, les propriétés de matériau de base et la technique d'encapsulation choisie. Les matériaux de base les plus couramment utilisés dans la coacervation sont les polysaccharides et les sucres (gomme, amidon, cellulose, cyclodextrine); les protéines (gélatine, caséine, protéines de soja); les lipides (cires, paraffine, huiles); et des polymères synthétiques (polymères acryliques, poly vinylpyrrolidone). Dans une moindre mesure, des matériaux inorganiques tels que des silicates, des argiles et des polyphosphates peuvent également être utilisés (Martins *et al*, 2010)

# **Matériel et méthode**

A travers ce travail nous avons visées à objectiver et confirmer la réponse des huiles essentielles extraites aux critères des normes internationaux qui est réalisé par la méthode d'extraction à partir du zeste frais de l'orange (*Citrus sinensis*) et de citron (*Citrus Limon*) à l'aide d'un hydro-distillateur, suivie par des analyses de contrôle de qualité, ainsi qu'une technique de protection appelé l'encapsulation.

## 1. Matériel de travail

Au premier lieu de cette partie expérimentale, nous allons extraire des huiles essentielles à partir des zestes frais d'orange et de citron à l'aide d'un hydro-distillateur nommé « *clevenger* », ce dispositif est utilisé dans plusieurs procédés d'extraction qui fournit un rendement important.

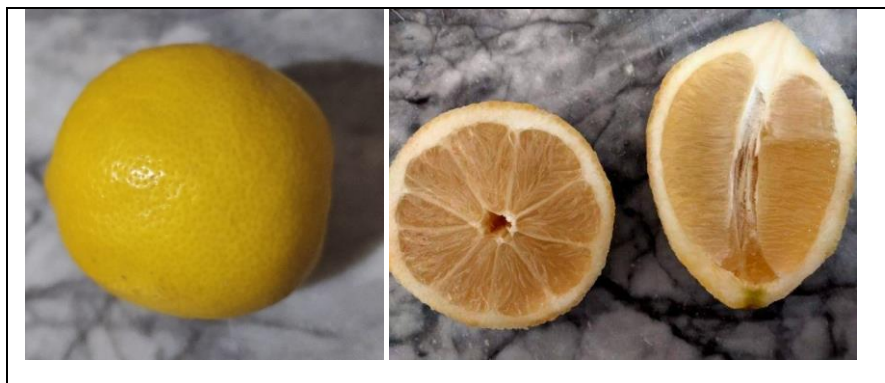
### 1.1. Matière première

Les huiles essentielles étudiées étaient extraites à partir des zestes conservés à température ambiante de citron (*Citrus limon.*) et d'orange (*Citrus sinensis*).

#### 1.1.1. Citron

Le citron utilisé se caractérisait par

- Une forme ovale.
- D'une couleur jaune et une écorce molle.
- Est de taille moyenne.
- Son épaisseur était d'environ 6mm
- Le poids moyen de son zeste net est de  $35g \pm 3g$ , le zeste représentait de 14% du poids de fruit.
- A une pulpe très juteuse et acidulée.

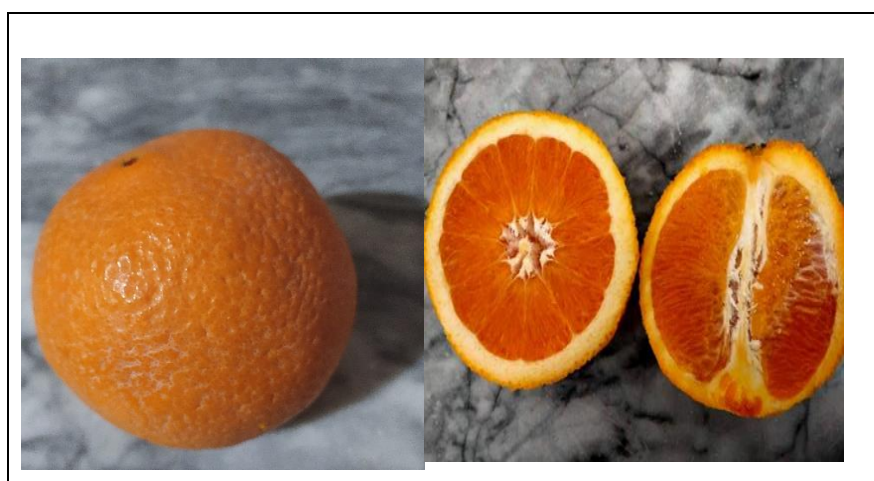


**Figure 6** : fruits d'agrumes (citron).

### 1.1.2. Orange

L'orange utilisée se caractérisait par :

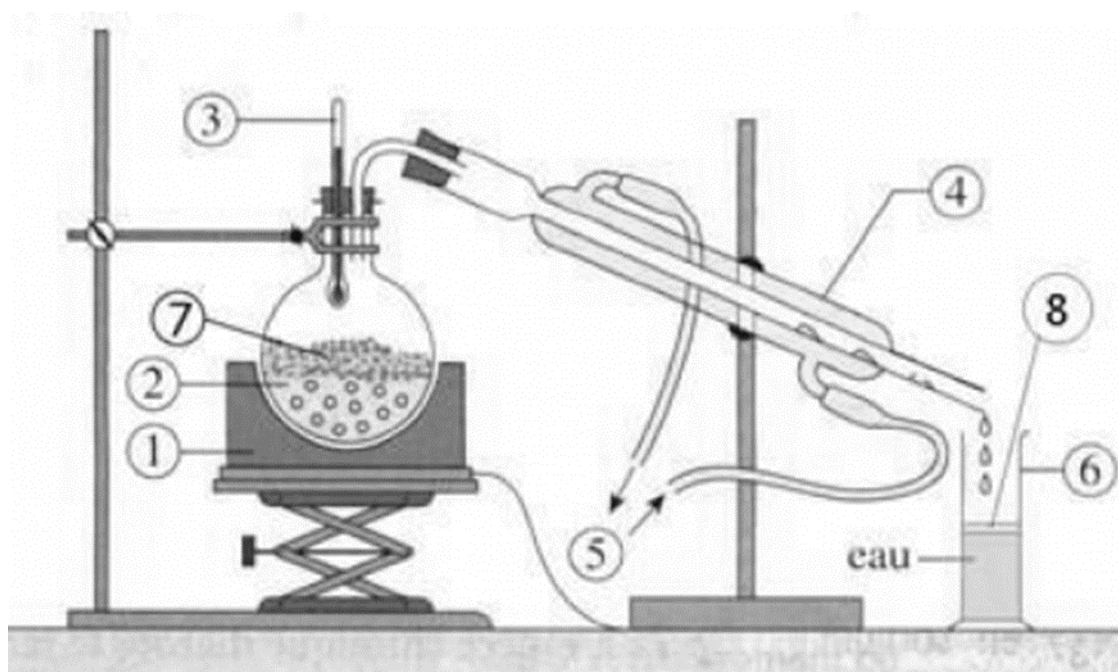
- une forme ronde, un peu ovalisante.
- Est de taille moyenne.
- Son épaisseur était d'environ 1 Cm.
- A une peau fine, une écorce jaune-orangé et peu rugueuse.
- A une pulpe très juteuse et un peu acidulée.
- Le poids moyen de son zeste net est de  $55g \pm 5g$ , le zeste représentait 15% du poids de fruit.



**Figure 7** : fruits d'agrumes (l'orange).

## 1.2. Hydro-distillateur

L'appareil utilisé pour l'hydro-distillation schématisé dans la (**Figure 8**), il est constitué d'un chauffe ballon qui permet la distribution homogène dans le ballon, un ballon en verre où l'on place les zestes de citron ou d'orange et l'eau distillé , une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, une ampoule à décanter en verre également qui reçoit les extraits de la distillation et au même temps pour faire la séparation de la phase aqueuse de la phase huileuse (décantation).



- |                      |                               |
|----------------------|-------------------------------|
| 1. Chauffe-ballon    | 5. Arrivée et sortie de l'eau |
| 2. Eau en ébullition | 6. Eprouvette graduée         |
| 3. Thermomètre       | 7. Les zestes d'agrumes       |
| 4. Réfrigérant à eau | 8. Huile essentielle de zeste |

**Figure 8 :** Montage d'un hydro-distillateur (LUCCHESI, 2005).



### 1.3. Conservation de l'huile essentielle obtenue

Les huiles essentielles sont des substances très délicates, elles s'altèrent facilement, ce qui rend leur conservation difficile et exige certaines précautions indispensables.

Ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des Flacons propres et sec en verre teinté, à l'abri de la lumière et de la chaleur (BRUNETON, 1999).

C'est pour cela nous les avons conservées à une température voisine de 4°C.

## 2. Méthode de travail

### 2.1. Collecte des fruits

Le matériel végétal ayant fait l'objet de notre étude est constitué de zestes nets d'oranges et de citron. Ces derniers proviennent de la plantation d'agrumes située à El-Hadjar commune de la ville d'Annaba. Les oranges de variété « Thompsonnette on dit Thompson tardive », ces agrumes utilisés ont été collectés au mois d'Avril de l'année 2021.

### 2.2. Préparation des fruits

Après la collecte des fruits (citron et orange). Au niveau du laboratoire du contrôle de qualité physico-chimique de l'industrie ISOPHARM-Algérie les fruits fraîchement récoltés ont été d'abord nettoyés, lavés et ensuite séchés avec une serviette en coton avant d'être pesés.

Après pesage les fruits ont été frottés à la rappe à fin d'être réduites en zeste pure (figure 9-10).



**Figure 9** : Photo des zestes de citron. **Figure 10** : Photo des zestes d'orange.

### 2.3. Conservation des zestes

Les zestes purs obtenues (citron/orange) étaient pesés sur une balance électronique (de précision  $\pm 0.001\text{g}$ ), puis repartir dans des sacs en plastique propre et destinées à la conservation. Chaque sac contenait 200g des zestes.

La conservation se fait à température ambiante à fin d'étudier l'effet de ce procédé sur le rendement en HE.

### 2.4. Préparation des zestes

Dans nos investigations, 200 g de matière végétale (zestes purs du citron ou bien d'orange), sont introduits avec 500 ml d'eau dans un ballon de 1000 ml. L'ensemble est porté à ébullition pendant environ 2heures et 30minutes.

Après installation et fermeture du montage, la mise en marche du chauffe ballon est effectuée avec un réglage optimum du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constantes bien maîtrisée (**BOUSBIA, 2011**). Sous l'effet de la chaleur, les cellules libèrent leurs contenus aromatiques qui seront entraînés par la vapeur d'eau en passant par un refroidisseur. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse chargée de composés volatils (**MNAYER, 2014**) et une phase organique : l'huile essentielle. (**BRUNETON, 1987**).

Lorsque les densités de ces deux phases sont proches on peut observer une émulsion (**SCIMECA et TETAU, 2005**). Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche de l'huile mince à la surface qui sera par la suite, après repos du liquide séparé par décantation. (**BADJOU DJ et GOUASMIA, 2015**).

L'huile essentielle obtenu est récupérée et conservée dans des vials de couleur brune, hermétiquement fermés et stockés dans un endroit frais ( $4^{\circ}\text{C}$ ) à l'obscurité (**BOUSBIA, 2011**).

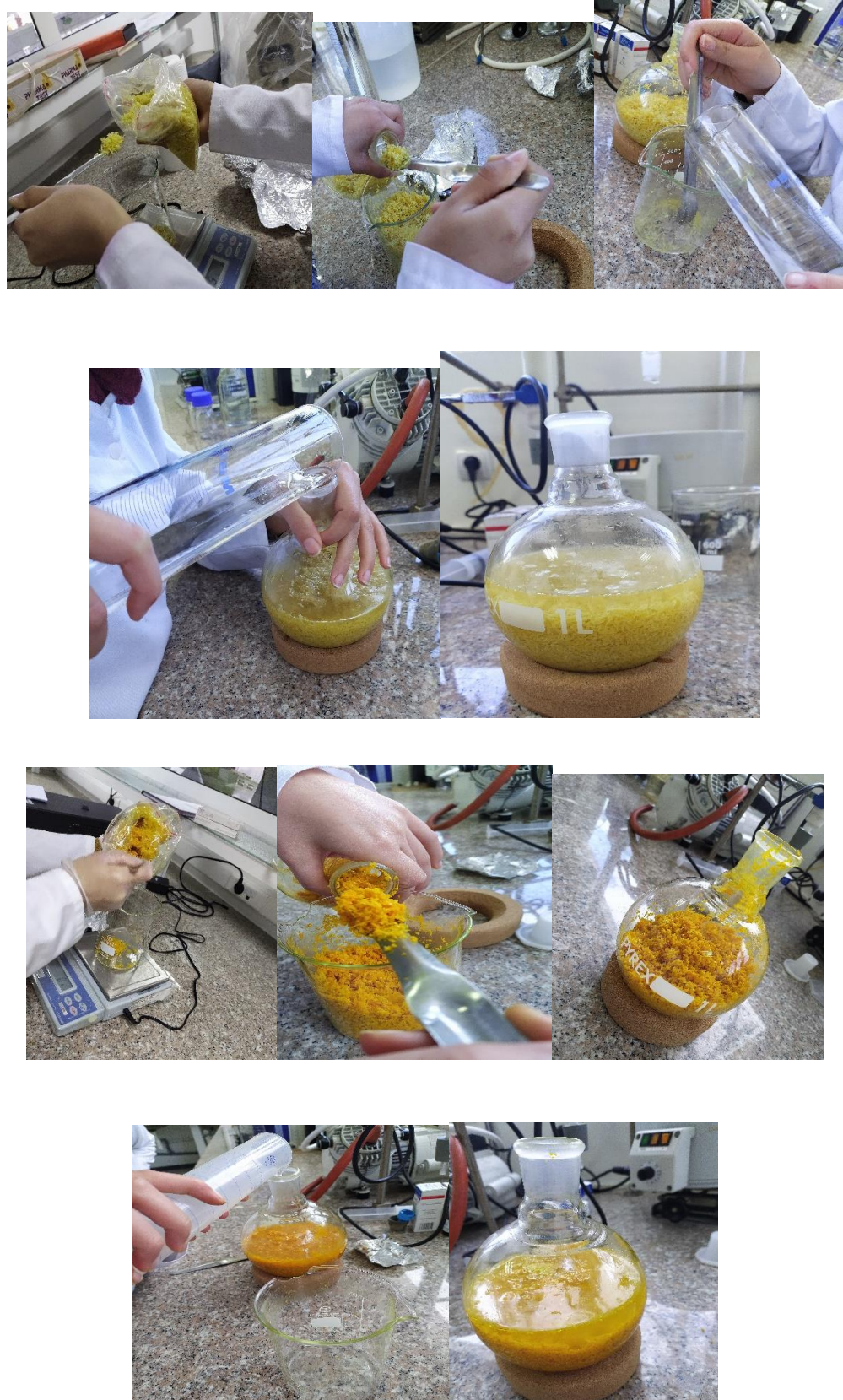
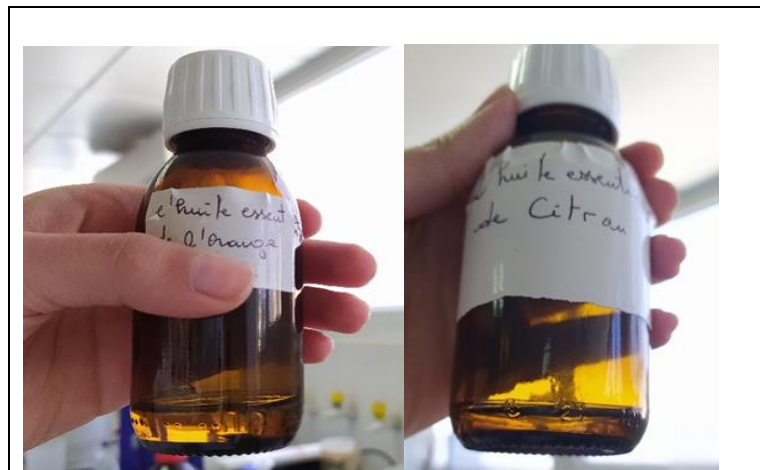


Figure 11 : préparation des zestes d'agrumes.



**Figure 12:** photo de l'huile essentielle brute d'orange et de citron obtenus.

## 2.5. Détermination du rendement d'extraction

Pour étudier la cinétique d'extraction de l'huile essentielle des zestes de *Citrus limon* et *Citrus sinensis* conservées à température ambiante, nous avons récupéré des quantités des huiles essentielles qui vont être exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque extraction.

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huiles essentielles (R%), est défini comme étant le rapport entre la masse des huiles essentielles obtenues après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivante :

$$R\% = (M' / M) \times 100$$

Où

R% : est le rendement des huiles essentielles en pourcentage.

M': est la masse des huiles essentielles obtenues en g.

M : est la masse de zeste du citron en g.

## 2.6. Méthode d'analyse et contrôle de la qualité d'une l'huile essentielle

Selon les référentiels classiques (**Pharmacopée Européenne, ISO, AFNOR**), l'évaluation de la qualité des HEs est réalisée par plusieurs méthodes : Chromatographie



sur couche mince (CCM), mesure de l'activité antimicrobienne, la mesure d'un certain nombre d'indice physique et chimique « densité relative et indice d'acide », et dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes.

### 2.6.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Ce travail est réalisé dans une hotte chimique.

0.5ml de chaque échantillon de l'huile est dissout dans 1 ml de l'hexane. Cette solution est déposée en un point E (Echantillon) à environ 2 cm de la partie inférieure de la plaque qui est recouverte de gel de silice (phase stationnaire). A 2 cm environ du point E, se trouve les échantillons de références (essence commerciales pures « citron et orange ») dissout dans l'hexane.

Les échantillons et les références sont déposés sur la plaque à l'aide d'une micro seringue, puis nous introduisons cette dernière au four à moufle pendant 20 min pour absorber l'humidité. Cette plaque est introduite dans une cuve contenant l'éluant (la phase mobile) qui est constitué d'un mélange binaire de deux solvants qui sont : le cyclohexane et l'éther avec des proportions volumiques de 50 % pour la saturation et à l'absence de la lumière pour éviter les réactions photochimiques. Le niveau de l'éluant ne dépasse pas 1 cm du bord inférieur de la plaque, la phase mobile migre de bas en haut par capillarité le long de la phase stationnaire entraînant les constituants de l'échantillon. Une fois que le solvant atteint la ligne de front (1 cm du bord supérieur de la plaque chromatographique, nous retirons la plaque de la cuve, puis nous la séchant à l'air libre.



**Figure 13** : préparation de la plaque CCM.

Pour la révélation, nous utilisons une solution de permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ ) de concentration 3 g/l. Nous introduisons la plaque dans la solution de  $\text{KMnO}_4$  qui nous séchons ensuite à l'air libre. Après cela, les différents constituants apparaissent sous forme de taches. Nous calculons le rapport frontal Rf.



**Figure 14** : solution de permanganate de potassium « la révélation ».

### 2.6.2. Mesure de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Nous avons appliqué la technique des puits sur la gélose contaminée par des suspensions bactériennes de concentration connue.

Après le séchage des boîtes, la gélose contaminée est perforée au centre à l'aide de la partie supérieure d'une pipette pasteur. (KHEBICHAT, 2013). Les puits ainsi formés sont remplis par des dilutions préparées et des huiles essentielles concentrées (environ 50  $\mu\text{L}$  par puits).

Après incubation, la lecture des résultats se fait par observation des zones d'inhibitions.

#### 2.6.2.1. Microorganismes testés

Le nombre de microorganismes testé, lors de cette étude est de 03 souches bactériennes (02 Gram+ et 01 Gram-), qui appartiennent aux familles : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli*, provenant de la collection du laboratoire de microbiologie du ISOPHARM Algérie.

#### 2.6.2.2. Préparation des suspensions microbiennes

Les souches utilisées sont déjà sous forme pastille, d'abord on a décongelé les souches bactériennes et ces dernières ont été inoculées dans un bouillon nutritif TSP et

incubées à 43°C pendant 30min et à l'aide d'un densicheck on a mesuré la concentration de chaque souche bactérienne :

- *E. coli* :  $12 \cdot 10^8$ .
- *Staphylococcus aureus* :  $9 \cdot 10^8$ .
- *Bacillus subtilis* :  $3.6 \cdot 10^8$ .

### 2.6.2.3. Contamination des milieux

#### Gélose utilisée

Gélose Muller Hinton (MH).

Introduire un inoculum de 0.4-0.5 ml de la suspension bactérienne dans un volume de 40-50ml du milieu MH, mélangé, couler un volume de 20-25 ml du mélange dans 2 boîtes pétri :

- ✓ Volume 40-50 ml MH + 0.4-0.5 ml de *E. coli* → couler dans 2 boîtes.
- ✓ Volume 40-50 ml MH + 0.4-0.5 ml de *Staphylococcus aureus* → couler dans 2 boîtes.
- ✓ Volume 40-50 ml MH + 0.4-0.5 ml de *Bacillus subtilis* → couler dans 2 boîtes.

Laisser les solidifier.

### 2.6.2.4. Préparation des dilutions

- Diluer 1ml d'HE citron dans 1 ml de DMSO (50/50 v/v) + 50µl de Tween.
- Diluer 1ml d'HE citron référence dans 1ml de DMSO (50/50 v/v) + 50µl de Tween.
- Diluer 1ml d'HE orange dans 1ml de DMSO (50/50 v/v) + 50µl de Tween.
- Diluer 1ml d'HE orange référence dans 1ml de DMSO (50/50 v/v) + 50µl de Tween.

### 2.6.2.5. Préparation des puits

Réaliser 5 puits par boîtes de pétri à l'aide d'un emporte- pièce cylindrique de 6 mm de diamètre.

Remplir les puits avec 50 µl des solutions suivantes :

- La première boîte « citron »
- ✓ 50 µl de DMSO pure (Témoin).

- ✓ 50 µl de citron pur.
- ✓ 50 µl de citron de référence.
- ✓ 50 µl d'un mélange de DMSO et citron (citron dilué).
- ✓ 50 µl d'un mélange de DMSO et citron référence (citron dilué).
  - La deuxième boîte « orange » :
- ✓ 50 µl de DMSO pure (Témoin).
- ✓ 50 µl d'orange pur.
- ✓ 50 µl d'orange de référence.
- ✓ 50 µl d'un mélange de DMSO et d'orange (orange dilué).
- ✓ 50 µl d'un mélange de DMSO et d'orange référence (orange dilué).
- Laisser les boîtes en pré-diffusion de 1h à 4h.
- Incubation des boîtes à une température de 30°C -32°C pendant 18h-24h.



**Figure 15:** pré-diffusion des boîtes.

## **N.B**

- Tween (polysorbate) est un réactif utilisé pour la dissolution des huiles.
- DMSO (Solvant polaire) est un réactif qui dissout les composées polaires et non polaires, utilisée généralement pour la diffusion des extraits huileuses dans le milieu MH.

### **2.6.3. Mesure de la densité relative**

On pèse 1ml d'eau distillé, et 1ml de chaque l'huile essentielle (citron/orange), la densité est mesurée par le rapport entre la masse d'eau distillé et la masse de chaque HE.



$$d = \frac{m(\text{HE})}{m(\text{eau})}$$

d : densité.

m (HE) : la prise d'essai de l'huile essentielle.

m (eau) : la prise d'essai de l'eau distillé.

#### **2.6.4. Mesure d'indice d'acide**

- ✓ 0.5 g de chaque HE, 1.25 ml d'éthanol à 96 % sont mis dans un erlenmeyer.
- ✓ Ensuite, on titre par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.1N contenu dans une burette.

Le point d'équivalence a été mis en évidence avec un pH mètre à la place de phénol phtaléine sachant que le point de virage de ce dernier est de 8.3. Lorsque cette valeur est affichée par le pH mètre, la chute de burette est prise.

L'indice d'acide (IA) est calculé par la formule suivante :

$$IA = V \times C \times (56.11/m)$$

V : volume de KOH utilisé en (ml).

C : concentration en moles par litre de la solution de KOH.

m : masse de la prise d'essai.

#### **2.6.5. Dosage des poly phénols totaux et flavonoïdes**

##### **2.6.5.1. Dosage des poly phénols totaux**

On mélange 500 µl de l'extrait dilué de chaque l'huile essentielle (citron/orange « pur et commerciale ») avec 2500 µl de folin ciocalteu dilué 1/10, après l'agitation, le mélange est incubé pendant 3minutes à température ambiante.

Ajouter 2000 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 7.5%.

Les tubes sont ensuite placés dans un bain marie à 60°C pendant 5min, une fois refroidi l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 760nm.

Le témoin est préparé de la même manière on remplace l'extrait par 500 µl d'éthanol.

##### **2.6.5.2. Dosage des flavonoïdes**

On mélange 1000 µl de l'extrait dilué de chaque l'HE (citron/orange « pur et commerciale ») avec 1000 µl de solution de AlCl<sub>3</sub> 2%.

Après 10 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, la lecture de l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 430nm.

Le témoin est préparé de la même manière on remplace l'extrait par 1000  $\mu$ l d'éthanol.



**Figure 16:** préparation des solutions de dosage.

### 3. Encapsulation des huiles essentielles

L'encapsulation est une procédure potentiellement bénéfique pour la protection et la bonne conservation des huiles essentielles contre les processus de dégradations (oxydation et hydrolyse), ainsi pour la stabilisation de la libération des composés à haute valeur extraits à partir des fruits, légumes, et des déchets.

Ce travail est réalisé au sein de laboratoire pédagogique de l'INATAA.

### 1.1. Préparation d'alginate de sodium

A l'aide d'une balance électronique on pèse 0.4g d'alginate de sodium et ajouter 10ml d'eau distillé, ce travail est réalisé dans un bain marie avec une agitation jusqu'à l'obtention d'un gel, puis on ajoute 1ml de l'huile essentielle (citron/orange).



Figure 17 : Préparation d'alginate de sodium.

### 1.2. Préparation de la solution chlorure de calcium

- A l'aide d'une balance électronique on pèse 3.33g de  $\text{CaCl}_2$  et ajouter 100ml d'eau distillé.
- Agitation manuelle.

### 1.3. Dosage

#### 1 → Préparation de la seringue

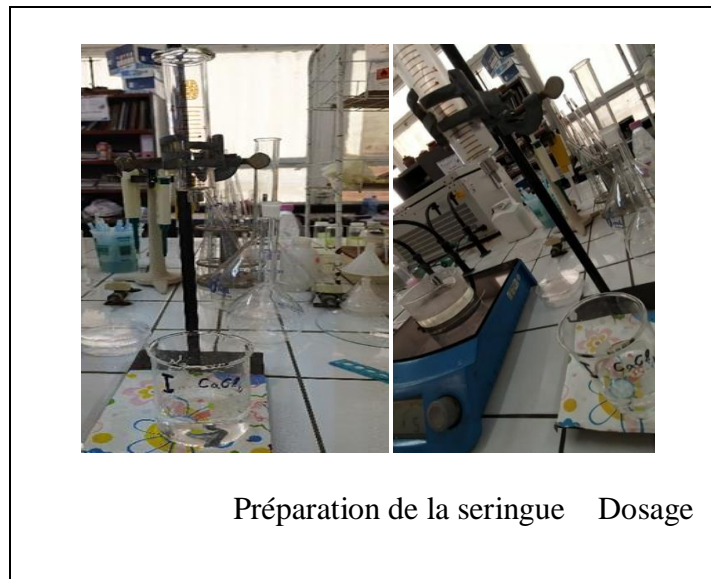
Dans la seringue ajouter le gel d'alginate de sodium préparé.

## 2 → Préparation du bécher contenant la prise d'essai

Introduire la solution de chlorure de calcium préparé dans l'étape précédente.

## 3 → Le dosage

Le gel d'alginate de sodium est versé très progressivement pour former la bille d'huile essentielle, et chaque bille reste dans la solution de chlorure de calcium d'environ 30min.



**Figure 18** : Photo de la réalisation du dosage.

### 1.4.Conservation

Après la récupération des capsules des HE, sécher ces dernières par un papier absorbant, conserver les capsules à froid (4°C) dans des boites de pétri stérile.

## **Résultat et Discussion**

## 1. Rendement de l'huile essentielle

Deux essais d'extraction ont été réalisés pour chaque zeste d'agrumes (citron/orange) ; afin de s'assurer de la répétabilité des résultats.

Au préalable deux tests d'extraction ont été réalisés afin de déterminer l'extraction serait plus rentable.

Les résultats des rendements sont exprimés en pourcentage et sont transcrits dans le suivant :

**Tableau 3** : Rendements de l'huile essentielle d'agrumes.

| Agrume<br>Essai | Citron | Orange |
|-----------------|--------|--------|
| Rendement       | 2.5 %  | 4%     |

La comparaison des résultats révèle une différence significative de rendement en HE entre l'orange et citron.

Le rendement d'huile essentiel d'orange obtenu, est d'une quantité importante de l'huile essentiel de citron cela est dû à la texture des zestes de chaque type d'agrumes utiliser.

### 1.1. Etude comparative entre différents rendements des huiles essentielles obtenus

#### 1.1.1. Orange

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle obtenu par hydro-distillation à partir des zestes purs d'orange est de (4 et 3.9%). Ce rendement est obtenu au bout d'une durée de 2 h 30 min. L'huile essentielle récupéré est incolore et présente une odeur caractéristique de l'orange. Cette valeur du rendement est très supérieure à celle obtenue par **BOUSBIA Nabil. (2011)** dans le cas de l'extraction par hydro-distillation des huiles essentielles d'orange. Cet auteur a obtenu un rendement de 1.1 % pour une durée de 3h. Cette différence avec nos résultats peut être expliquée par la nature de l'espèce d'agrumes utilisée et par le choix de la période de récolte. D'après (**VERKIARI et al, 2002**), le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la

plante utilisée, le degré de fraîcheur, le séchage et la méthode d'extraction employée, sont des facteurs qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement.

### 1.1.2. Citron

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle obtenu par hydro-distillation à partir des zestes purs de citron est de (2.5 et 2.4%). Ce rendement est obtenu au bout d'une durée de 2 h 30 min. L'huile essentielle récupéré est incolore et présente une odeur caractéristique de l'orange. Cette valeur du rendement est très supérieure à celle obtenue par **BADJOU DJamel et GOUASMIA Abdrrezak, (2015)** dans le cas de l'extraction par hydro-distillation des huiles essentielles de citron. Ces auteurs ont obtenu un rendement de (0.72-0.75 %) pour une durée de 2h30min. Cette différence avec nos résultats peut être expliquée par la nature de l'espèce d'agrumes utilisée et par le choix de la période de récolte. D'après **VERKIARI et al, (2002)**, le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisée, le degré de fraîcheur, le séchage et la méthode d'extraction employée, sont des facteurs qui peuvent avoir un impact direct sur le rendement.

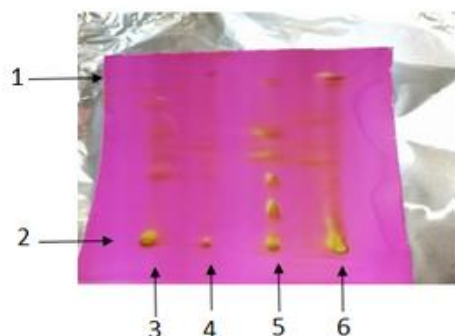
## 2. Analyses chromatographiques et physico-chimiques et microbiologique

Les analyses utilisées pour caractériser les huiles essentielles obtenues :

### 2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse par CCM (**Figure 19**) montre que les huiles essentielles extraites à partir des zestes d'orange et de citron sont constituées de plusieurs tâches  $R_f = 0.56$  (orange) et  $R_f = 0.55$  (citron) et  $R_f$  des huiles essentielles commerciales sont respectivement égales 0.69 et 0.6 pour la méthode d'hydro-distillation sachant que la molécule principale de notre huile essentielle est limonène et d'autres composés non identifiés. La tache intense correspondante au limonène sur le chromatogramme laisse supposer que celui-ci constitue le composé majoritaire.

Les chromatogrammes correspondants aux différents extraits sont illustrés par la figure suivante :



1. Ligne de front.
2. Ligne de dépôt.
3. L'huile essentielle extraite de *Citrus limon*.
4. L'huile essentielle extraite de *Citrus sinensis*.
5. L'huile essentielle commerciale de citron.
6. L'huile essentielle commerciale d'orange.

**Figure 19** : Chromatogramme des huiles essentielles extraits (orange/citron) et des huiles essentielles commerciales.

### 2.1.1. Etude comparative entre différents résultats de CCM

#### 2.1.1.1. Orange

Selon l'analyse CCM d'ALIOUNE Fatiha, (2015) de l'huile essentielle d'orange extraite par hydro-distillation montre la présence d'une seule tache ayant un rapport frontal identique à celui du limonène pur ( $R_f = 0.79$ ). L'absence d'autres taches que celle du limonène montre que cette huile extraite est composée seulement du limonène. Cette différence avec nos résultats peut être expliquée par la présence des différents constituants dans notre huile essentielle contrairement à celle qui montre la présence d'une seule tâche de cette HE et celle-ci est due à l'utilisation de la référence limonène pure (**figure 20**).

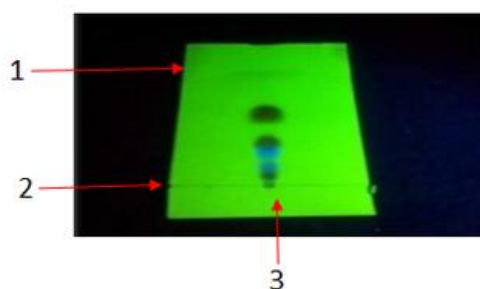


**Figure 20** : Chromatogramme de l'huile essentielle d'orange (ALIOUNE, 2015).



### 2.1.1.2.Citron

L'analyse CCM de HE de citron à montrer la présence de plusieurs tâches selon **BOUKABACHE Meriem et BOUDJEFDJOUF Fatima Zohra**, la comparaison de cette huile avec notre résultat révèle qu'il n'y a pas une différence importante et cela est dû à la grande similitude entre ces huiles.

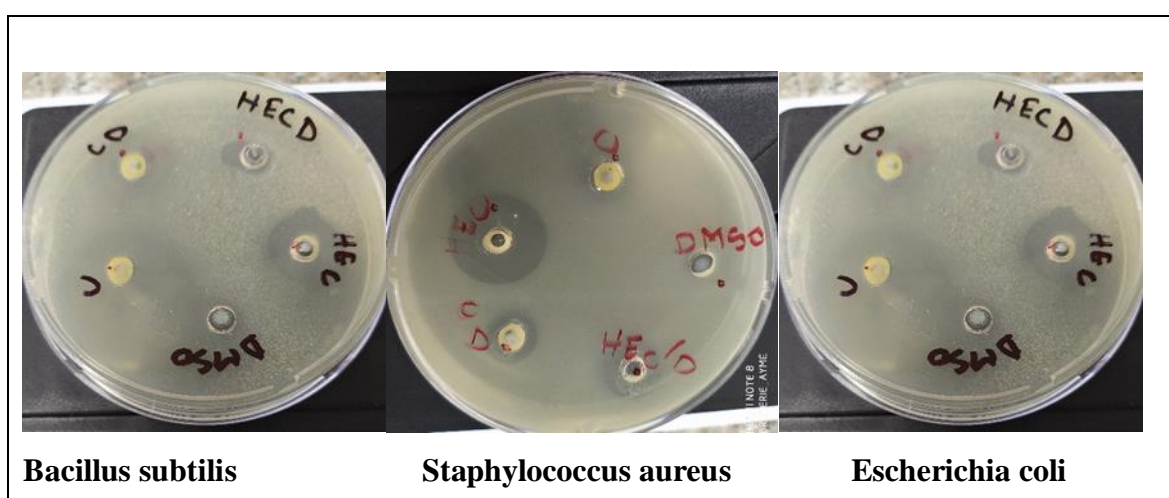


1. Ligne de front.
2. Ligne de dépôt.
3. L'huile essentielle de citron.

**Figure 21** : Plaque CCM de citron mûr (**BOUKABACHE et BOUDJEFDJOUF., 2016**).

### 2.2.Effet antimicrobien

L'activité antibactérienne, lorsqu'elle est observée, apparaît sous la forme d'un halo d'inhibition autour du puits.



**Figure 22** : L'antibiogramme des différentes souches microbiennes employées sur l'huile essentielle de citron.

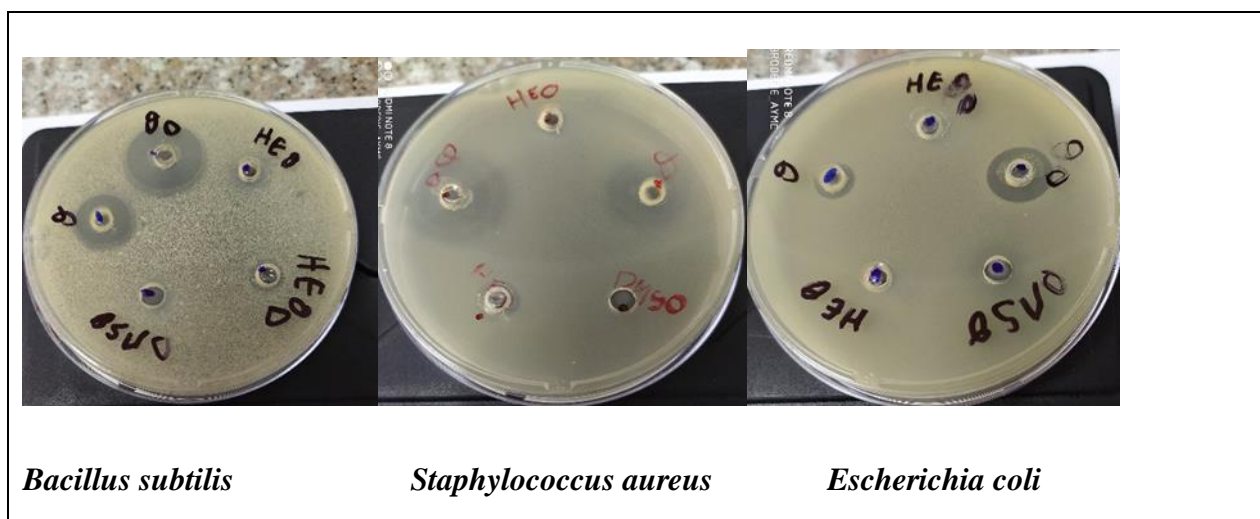
Les tableaux suivants résumant les résultats de l'activité antibiotiques :

**Tableau 4 :** Effet antimicrobien de l'huile essentielle de citron sur les souches bactériennes.

|                                | Bacillus subtilis | Staphylococcus aureus | Escherichia coli |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------|------------------|
| HE de citron extrait pure      | ++                | +++                   | -                |
| HE de citron extrait Dilué     | +                 | +                     | -                |
| HE de citron commerciale pure  | +++               | +                     | -                |
| HE de citron commerciale dilué | +                 | +                     | -                |
| DMSO                           | -                 | -                     | -                |

**Tableau 5 :** Effet antimicrobien de l'huile essentielle d'orange sur les souches bactériennes.

|                               | Bacillus subtilis | Staphylococcus aureus | Escherichia coli |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------|------------------|
| HE d'orange extrait pure      | -                 | -                     | -                |
| HE d'orange extrait dilué     | -                 | +                     | -                |
| HE d'orange commerciale pure  | ++                | ++                    | -                |
| HE d'orange commerciale dilué | +++               | +++                   | -                |
| DMSO                          | -                 | -                     | -                |



**Figure 23 :** L'antibiogramme des différentes souches microbiennes employées sur l'huile essentielle d'orange.

L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la zone d'inhibition, la souche sera qualifiée de résistante (-) ce qui signifie l'absence d'une zone d'inhibition, sensible (+) pour une petite zone d'inhibition, très sensible (++) pour une zone d'inhibition moyenne, extrêmement sensible (+++) pour une zone d'inhibition très importante.

L'évaluation du pouvoir de l'huile essentielle du genre Citrus, extrait par hydro-distillation du zeste frais de citron et d'orange récolté dans la région de la wilaya d'Annaba, sur des souches bactériennes (bactéries à Gram positif (+) : *Staphylococcus Aureus* et *Bacillus subtilis*, bactéries à Gram négatif (-) : *Escherichia Coli*) a montré que les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle étudiée, ils ont constaté aussi que les souches Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) sont des souches sensibles, par contre aux souches à Gram négatif (*Escherichia coli*) sont des souches résistantes, de plus, l'HE a montré une meilleure activité contre les bactéries à Gram positif (+) que les bactéries à Gram négatif (-). Cela pourrait être attribué à la structure de la membrane bactérienne pour les bactéries à Gram négatif (-) qui possèdent une membrane riche en liposaccharides qui fournissent une surface hydrophile (SHAKERI *et al*, 2014), et donc ce dernier agit comme une barrière de pénétration qui bloque les macromolécules de pénétrer dans la cellule (KONG *et al*, 2008). En conséquence les bactéries à Gram négatif (-) sont relativement résistantes aux antibiotiques hydrophobes.

### 2.2.1. Etude comparative entre différents résultats de l'activité antibiotique

Une étude Algérienne menée par BOUGHENDJIOUA, (2013) a conclu que l'HE de citron (extraction à froid de la partie supérieure du péricarpe ou zeste frais de citron de la région de Collo wilaya de Skikda) ne montre aucune zone d'inhibition vis-à-vis de la souche étudiée (*Bacillus subtilis*). Ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevé contre l'action antibactérienne de H.E de Citrus, mais les mécanismes d'action des HE et leur sélectivité envers certaines bactéries restent jusqu'à présent mal élucidée. Il est à noter aussi, qu'aucune corrélation significative n'a été observée entre la teneur des composants chimiques et l'activité antibactérienne de l'HE de *Citrus* testées pour les souches. En effet, le limonène composant majoritaire de l'HE (61.65%) a démontré une efficacité antimicrobienne inférieure. D'après ces observations, il est évident que le limonène n'a exercé aucune influence sur le potentiel antibactérien de H.E testée.

Les résultats de la majorité de ces études sont montrés que l'huile essentielle de citron avait une certaine activité antibactérienne sur tous les agents pathogènes testés. Cette activité est associée aux composants phytochimiques des huiles essentielles ou à l'hydrocarbure mono terpénique ou sesquiterpénique et leurs dérivés oxygénés qui sont les principaux composants des huiles essentielles présentant des activités antimicrobiennes (CAKIR *et al*, 2004).

### 2.3.Densité relative

**Tableau 6 :** La densité des huiles essentielles.

|   |                                    |                                    |
|---|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>d = m<sub>HE</sub>/m<sub>eau</sub></b> | <b>d<sub>HEorange</sub> = 0.82</b> | <b>d<sub>HEcitron</sub> = 0.84</b> |
| m <sub>eau</sub> = 1.0155                 | m <sub>HE orange</sub> = 0.8375    | m <sub>HE citron</sub> = 0.8528    |

La densité relative d'HE d'orange est égale à 0.82.

La densité relative d'HE de citron est égale à 0.84.

### 2.4.Indice d'acide

**Tableau 7 :** L'indice d'acide des huiles essentielles.

|  |                                    |                                    |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| <b>I<sub>A</sub> = V × C (56.11/m)</b> | <b>I<sub>A Orange</sub> = 1.68</b> | <b>I<sub>A Citron</sub> = 1.68</b> |
| V <sub>C</sub> = V <sub>O</sub> = 0.15 | C = 0.1 N                          | m = 0.5 g                          |

L'indice d'acide de l'HE d'orange et de citron est égal à 1.68.

L'examen de ces tableaux, montre que les propriétés physicochimiques des huiles étudiées varient suivant la nature d'agrumes utilisée. La densité relative du citron se situe entre 0.82 et 0.84, L'indice d'acide est pratiquement identique pour les deux types d'agrumes utilisés.

Ces paramètres répondent aux critères de qualité des huiles essentielles fixées par les organismes internationaux (inférieurs à 0.925 pour la densité et inférieurs à 3 pour l'indice d'acide selon les normes d'AFNOR).

Les propriétés physicochimiques des huiles essentielles obtenues par hydro-distillation d'agrumes utilisées suggèrent une huile essentielle de très bonne qualité.

#### 2.4.1. Etude comparative entre différents résultats de la densité relative et l'indice d'acide

L'indice chimique (indice d'acide) de notre huile essentielle du citron et d'orange est considérablement inférieur à ceux trouvés par **MEFLAH Sihem et SEGNI Ladjel** d'une estimation 5.32 pour le citron et 2.74 pour l'orange selon **ELMANNOUBI Ines et SKANJI Thouraya et al. (2010)**, les résultats de la détermination du paramètre physique (densité relative) par rapport à **MEFLAH Sihem et SEGNI Ladjel** est de valeur 0.91 pour le citron et 0.869 pour l'orange selon **MESSAOUR Halima. (2018)** ceci est probablement dû à la composition chimique de celle-ci.

#### 2.5. Dosage des poly phénols totaux et des flavonoïdes

La lecture de l'absorbance des poly phénols totaux et des flavonoïdes est à 760 nm et 430nm successivement se fait grâce à un spectrophotomètre.

**Tableau 8 :** la densité optique des poly phénols totaux et flavonoïdes des huiles essentielles.

|                          | Poly phénols totaux (A) | Flavonoïdes (A) |
|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| HE de citron extrait     | 0.697                   | 0.537           |
| HE de citron commerciale | 0.638                   | 0.882           |
| HE d'orange extrait      | 0.587                   | 0.443           |
| HE d'orange commerciale  | 0.897                   | 0.910           |

D'après les études de dosage de poly phénol et flavonoïdes des huiles essentielles extraites et commerciaux, les résultats montrent que ces HE ont une activité anti-oxydante.

La comparaison des résultats des polyphénols et flavonoïdes révèle une différence significative de la densité optique d'HE d'agrumes extrait et commerciaux, et cela est dû à la texture des zestes de chaque agrumes et ceci probablement est dû à la composition chimique de celle-ci.

*Citrus sinensis* et Citrus limon sont deux agrumes appartenant à la famille des Rutaceae. En raison de leurs nombreuses vertues ; de multiples études phyto-chimiques ont été réalisés, qui ont révélé la présence des polyphénols en particulier les flavonoïdes dans ces deux types d'agrumes, ce qui leurs confèrent de nombreuses propriétés biologiques.

Les propriétés anti-oxydantes des polyphénols, en particulier les flavonoïdes et les acides phénoliques, (**KLIMCZAK et al, 2007 ; ATROUZ, 2009 ; SIMONE et al, 2016**) sont principalement attribuables à leurs propriétés redox. Ce qui leur permet d'agir comme agents réducteurs par don d'électron ou d'hydrogène et inhibiteurs d'oxygène singulet, ou due à la complexation avec des espèces oxydantes, notamment le peroxyde.

En rompant et neutralisant sa chaîne de formation, permettant ainsi d'empêcher l'oxydation des LDL (**AJILA et al, 2010 ; FEJZIC et CAVAR, 2014 ; KAMEL et a., 2015 ; ALAM et al, 2016**). Ceci permet de stimuler le mécanisme de défense de l'homme contre le stress oxydatif (**ATROUZ., 2009 ; ALAM et al, 2016**) **KAMMOUN et al, (2011)** ont rapporté que la teneur en phénols totaux des écorces de l'orange Maltaise est de  $1,130 \pm 0,040$  g/100g bs. Par la comparaison avec nos résultats obtenus lors de ce dosage on observe qu'il y a une variété significative, Cette différence peut être due aux différentes conditions d'extraction utilisées comme la matrice végétale utilisée (*Citrus sinensis*) et l'origine géographique, le pourcentage d'éthanol entamer, mode d'agitation, la durée de l'obscurité et d'extraction.

Ces variations peuvent s'expliquer aussi par le fait que le test de Folin-Ciocalteu surestime les teneurs en phénols totaux à cause des interférences avec d'autres composés comme les sucres (sucrose, fructose, glucose...) et les acides organiques

(acide ascorbique, acide malonique, acide citrique) qui réduisent aussi le réactif de Folin (**LI et al, 2006a; NEVEU et al, 2010**).

En comparant la composition chimique des écorces de l'orange Maltaise (phénol totaux et flavonoïdes) avec celle d'autres variétés d'agrumes (citron, pamplemousse), cette étude montre que les valeurs obtenues sont considérablement différentes sachant qu'il existe une variabilité avec les résultats de notre étude.

Les variations des teneurs en ingrédients nutritifs des écorces des différentes variétés d'agrumes ou au sein de la même variété peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que les facteurs pédoclimatiques (le type de sol, l'exposition au soleil et les précipitations), génétiques (la variété) et agronomiques (la culture biologique, la production de fruits par arbre, l'état de maturation, la région de culture, la fertilisation, l'irrigation) (**DRAGOVIC-UZELAC et al, 2005; CAUSSE et al, 2007**).

Les résultats du **KAMMOUN** sont illustrés dans le (**Tableau 10**) suivant :

**Tableau 9** : La DO des phénols totaux et flavonoïdes d'orange de maltaise. (**KAMMOUN., 2011**)

| Composant          | Orange Maltaise<br>( <b>KAMMOUN et al, 2011</b> ) | Autres variétés d'agrumes |
|--------------------|---|---------------------------|
| Phénols totaux     | 1,130 ± 0,040                                     | 0,67-22,32                |
| Flavonoïdes totaux | -   | 0,03-2,32                 |

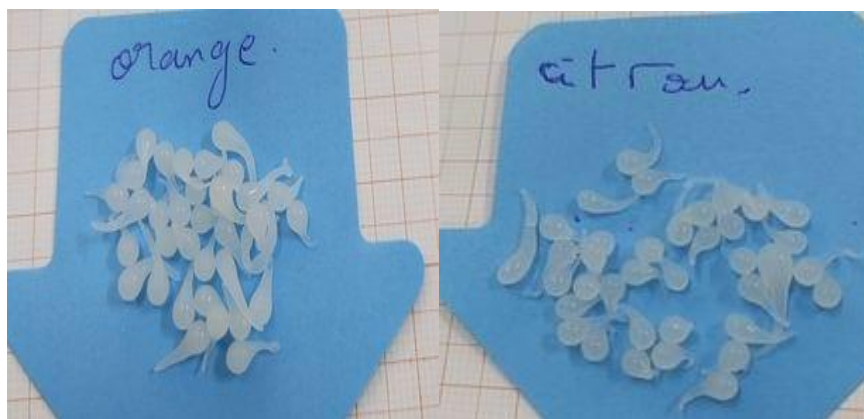
### 3. Encapsulation

D'après les résultats de notre expérience d'obtention des capsules qui montre que celle-ci sont de formes sphériques, et de couleur blanche, membrane inhomogène, caractérisé par un diamètre d'environ 4mm pour le citron et l'orange, ces huiles ont fait l'objet d'encapsulation dans le chlorure de calcium et à la présence de l'alginate de sodium.

La gélification externe est le mécanisme le plus couramment utilisé. Dans ce cas, des gouttes contenant la matière active (huile essentielle) et la solution d'alginate sont plongées dans un bain contenant des ions  $Ca^{2+}$ . Ces ions vont alors réticuler avec les chaînes d'alginate situées en périphérie. Cette première étape va créer une membrane semi-solide enrobant un cœur encore liquide. Les ions  $Ca^{2+}$  vont ensuite diffuser à

travers les interstices pour initier la gélification à l'intérieur de la goutte. Le produit final obtenu se présentera sous la forme d'une bille d'alginate à l'intérieur de laquelle la matière active sera enrobée de façon aléatoire entre les chaînes réticulées d'alginate.

Les résultats d'encapsulation sont montrés dans la (**Figure 24**) :



**Figure 24** : Photo des capsules des huiles essentielles.

La technique d'encapsulation permet d'obtenir un cœur liquide, mais qui contient également la solution de polymère constituant la membrane [PARK et CHANG., 2000 ; BREGUET *et al*, 2005; ZHANG *et al*, 2006; FUNDUEANU *et al*, 1999; NIGAM *et al*, 1988; BLANDINO *et al*, 1999]. De plus, l'épaisseur de la membrane est déterminée par le temps de diffusion de l'agent gélifiant, La gélification est contrôlée par la diffusion de l'agent réticulant de la phase continue vers les gouttes. L'équipe de FUNDUEANU *et al*, (1999) prépare quant à elle des microcapsules de 1,2 mm de diamètre par extrusion en régime goutte-à-goutte d'une solution d'alginate dans un bain de calcium gélifiant. Le temps de diffusion du calcium à travers la goutte d'alginate détermine alors l'épaisseur de gel d'alginate.

Le diamètre de la bille obtenue par gélification durant notre expérience est supérieur à celle obtenue par l'équipe de FUNDUEANU *et al*, (1999), cette différence peut être expliquée par :

1. Le temps de réaction dans la solution.
2. Le Débit appliquant.
3. Le temps de diffusion de calcium à travers la goutte d'alginate qui détermine l'épaisseur de la capsule.



# **Conclusion**

Nous rappelons que les principaux buts visés de cette étude sont d'évaluer, Le paramètre chromatographique (CCM), physico-chimique et microbiologique, et la présence phénolique y compris les flavonoïdes dans nos échantillons.

Les objectifs de ce travail ont consisté en la réalisation, l'optimisation et l'application d'un dispositif d'extraction des huiles essentielles, en appliquant la technique conventionnelle de *Clevenger* (Hydro-distillation). L'extraction de notre échantillon par l'hydro-distillation qui reste une méthode simple et efficace, cette méthode permet d'obtenir des résultats quantitativement (rendement en huile essentielle) et qualitativement (composition des extraits) équivalents.

Dans un premier temps, des différentes analyses sont effectuées sur notre extraits, on entame par l'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des huiles essentielles montrent que, des composés non identifiés sont présents parmi ces composées le limonène en tant qu'il est la molécule principale de ces huiles essentielles. Les valeurs de l'indice d'acide de nos extraits « Citron et orange » sont 1.68, ainsi que ces densités relatives comprises entre 0.82 et 0.84, Ces valeurs répondent aux critères de la bonne qualité des huiles essentielles selon les normes **AFNOR**.

Concernant l'effet microbien, les résultats indiquent que les extraits obtenus ont une sensibilité envers les souches microbiennes de gram+ généralement et spécialement pour *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Par contre ces huiles essentielles déclarent généralement une résistance envers les bactéries à gram (-).

Les résultats de cette étude montrent que les écorces « zestes » de *Citrus sinensis* et *Citrus limon* contiennent des polyphénols y compris les flavonoïdes ce qui révèlent à une activité anti-oxydante de notre HE.

Dans un deuxième temps, l'objectif visés de ce travail aussi est d'évalué l'encapsulation des huiles essentielles dont le but de pallier leur instabilité et pour protéger de l'oxydation.

L'encapsulation peut concerner une grande variété de systèmes, allant de molécules simples à des structures plus complexes comme des cellules. Au sein des microcapsules, les composés peuvent être sous forme d'une solution, d'une suspension ou d'une émulsion. (VANDAMME *et al*, 2007).

Et à partir de ce contexte nous concluons que les huiles essentielles aident à traiter les petites indispositions de la vie de tous les jours par leur action curative dans les différents domaines biologique, chimique, et dans tout le secteur de l'industrie.

# **Référence Bibliographique**

**A**

- 1 **AFNOR.,1986.** Recueil des normes française « huiles essentielles », AFNOR. Paris. P57.
- 2 **AFNOR.,2000.** Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2 ed.
- 3 **AJILA C.M., BRAR S.K., VERMA M., TYAGI R.D., GODBOUT S. et VALERO J.R. (2010).**Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. Critical Reviews in Biotechnology. 1-22.
- 4 **ALAM M.K., RANA Z.H et ISLAM S.N. (2016).**Comparison of the proximate composition, total carotenoids and total polyphenol content of nine orange-fleshed sweet potato varieties grown in Bangladesh. Foods. 5(3): 1-6.
- 5 **ALIOUNE F., 2015.**Etude de l'extraction du limonène à partir des écorces d'orange, Univ, Tizi ouezou , P10-11-12-13-14.
- 6 **ALIOUNE F., 2015.** Etude de l'extraction du limonène à partir des écorces d'orange, UNIV, Tizi Ouezou, P15.
- 7 **ALIOUNE F., 2015.** Etude de l'extraction du limonène à partir des écorces d'orange, Univ, Tizi ouezou , P17-18-19.
- 8 **ALIOUNE F., 2015.** Étude de l'extraction du limonène à partir des écorces d'orange, univ, Tizi Ouezou, P45.
- 9 **AMOR, M.** « Les Huiles essentielles », Phyton Pathos **2006**
- 10 **ARABA O. et BOUCHMEL H., 2016.**Contribution à l'étude de la biodiversité entomologique dans un verger d'agrumes dans la région de Guelma, univ,Guelma P09-10-11-12
- 11 **ATROUZ O.M. (2009).** The Antioxidant activity and polyphenol contents of different plants seeds extracts. Pakistan Journal of Biological Sciences. 12(15): 1063- 1068.

**B**

- 12 **BADAOUI C., CHEROUAT H., DEIF A., 2020.** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux variétés d'agrumes, Univ, Constantine, P30-P32.

- 13 **BADJOU DJ D et GOUAS MIA A.,2015.** Valorisation des déchets d'agrumes (citron et mandarine) par extraction de leurs huiles essentielles, Univ, Constantine, P33.
- 14 **BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M.** Food and Chemical Toxicology 2008, 46, 446-475.
- 15 **BAMPIDIS, V.A., ROBINSON, P.H., 2006.**Citrus by-products as ruminant feeds: a review. Animal Feed Science Technology. 128, 175-217.
- 16 **BAUDOUX, D.**« Aroma News», Lettre information de N.A.R.D.: Natural Aromatherapy Research and Development, Belgique, **1997.**
- 17 **BELAÏCHE P. (1979).** Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Ed. Maloine SA., tome1. 9-128.
- 18 **BENEDISTE A. et BACHES M., 2002 –** Agrumes. Ed. Ugen Ulmer, PARIS, n° 132, 96 p.
- 19 **BEKHECHI C., ABDELOUAHID D. (2010).** Les huiles essentielles. Office des publications universitaires. P 14, 31 et 32.
- 20 **BERNARD, T. ; PERINEAU, F. ; BRAVO P. ; DELMAS, M. et GASET, A.** « Informations chimie », **Oct, 1988**, n° 298, 179.
- 21 **BICU, I., MUSTATA, F., 2011.** Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. Bioresource Technology. 102, 10013-10019.
- 22 **BLANDINO, A., MACIAS, M., and CANTERO, D. (1999).** Formation of calcium alginate gel capsules: Influence of sodium alginate and CaCl<sub>2</sub> concentration on gelation kinetics. Journal of Bioscience and Bioengineering, 88(6) :686–689.
- 23 **BOCCO, A., CUVELIER, M.E., RICHARD, H., BERSSET, C., 1998.** Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46, 6, 2123-2129.
- 24 **BOIZOT N. et CHARPENTIER J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. Le cahier des techniques de l'Inra. 79-82.
- 25 **BOUHALI H.,2015.** Caractérisation des huiles essentielles de Citrus sinensis et étude de leur activité antioxydante : étude comparative entre l'huile essentielle des écorces sèches et fraîches, Univ, Béjaïa, P15-18.

- 26 BOUKABACHE M., et BOUDJEFDJOUF F., 2016.**Extraction, identification de l'huile essentielle par CPG-SM de l'espèce Citrus limon et mise en évidence de son activité antibactérienne. Fabrication du parfum, Univ, Constantine, P62.
- 27 BOUNAB D. et CHABBI Y.,2018.** Etude de la variabilité morphologique au sein d'une collection d'agrumes cultivée à l'Est Algérien, W. Skikda, Univ, Constantine, P05-09.
- 28 BOUSBIA N.,2011.** Extraction des huiles essentielles riche en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduit agroalimentaire, Univ, d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger, P5-7-8-9.
- 29 BOUSBIA N.,2011.** Extraction des huiles essentielles riche en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produit agroalimentaire, Univ, d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger, P31-43-44-63-75-
- 30 BRUNETON J. (1987).** Phytochimie et pharmacognosie. Ed. Lavoisier. France, p83-.86.
- 31 BRUNETON J. (1993).**Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Edition Technique et documentation, 3ème Edition Lavoisier, Paris. P 488.
- 32 BRUNETON J. 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 2ème édition Lavoisier,385-623P.
- 33 BRUNETON J. 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3 ème édition, Paris, Tecet Doc.
- 34 BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E.; KINNEARY, J.F.** The Merk Index-Twelfth edition, Whitehouse Station: Merk and Co, INC, 1996, 2350.
- 35 BYRNE, C.M, ALLEN, S.D., LOBKOVSKY, E.B., COATES, G.W., 2004.**Alternating Copolymerization of Limonene Oxide and Carbon Dioxide. Journal of American. Chemical Society. 126, 11404-11405.

## C

- 36 CAKIR A., KORDALI S., ZENGİN H., IZUMI S., HIRATA T. (2004).** Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericumhyssopifolium* and *Hypericumheterophyllum*. FlavFrag J, 19-62–8.

- 37 CAUSSE, M., CHERVIN, C., MAUGET, J.C., RENARD, C., 2007.** Les sources de variabilité des qualités nutritionnelles des fruits et légumes (Chapitre 2). Paris: Institut National de la Recherche Agronomique. 63.
- 38 CHUTIA, M., DEKABHUYAN, P., PATHAK, M.G., SARMA, T.C., BORUAH P., 2009.** Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. Food Science and Technology. 42, 777-780.
- 39 COOPER, K. E., 1955.** "Theory of antibiotic inhibition zones in agar media." Nature 176: 510-511.

***D***

- 40 DA ROCHA, DA CUNHA PONCIANO GOMES, J.C., D'EIIA, E., 2010.** Corrosion inhibition of carbon steel in hydrochloric acid solution by fruit peel aqueous extracts. Corrosion Science. 52, 2341-2348.
- 41 DRAGOVIC-UZELAC, V., DELONGA, K., LEVAJ B., DJAKOVIC, S., Pospisil, J., 2005.** Phenolic profiles of raw apricots, pumpkins, and their purees in the evaluation of apricot nectar and jam authenticity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53 (12), 4836-4842.
- 42 DESCHEPPER R., 2017.** Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie, Marseille , P 13.

***E***

- 43 EL MANNOUBI I., SKANJI T., BARREK S., ZARROUK H., 2010.** Caractérisation de l'huile des graines de l'orange maltaise (CITRUS SINENSIS) poussant en Tunisie, Institut National de Recherche et d'Analyse Physico-chimique, Technopole de Sidi Thabet, P33.
- 44 EL OTMANI M., 2005** - Les Agrumes, le maraichage, et le froid hivernal. Agadir, Maroc, n° 127, 4 p.

***F***

- 45 FEJIE A. et CAVAR S. (2014).** Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Some Citrus. Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina. 42: 1-4.



- 46 FERHAT M.A., MEKLATI B.Y. et CHEMAT F., 2010** – Citrus d’Algérie : les huiles essentielles etLeurs procédés d’extraction. ED. OPU, n°5130. Alger. 157 p.
- 47 FERNANDEZ-LOPEZ, J., FERNANDEZ-GINES, J.M.,ALESON-CARBONELL, L., SENDRA, E., SAYAS-BARBER, E., PEREZ-ALVAREZ, J. A., 2004.**Application of functional citrus by-products to meat products. Trends in Food Science and Techology. 15, 176-185.
- 48 FUNDUENU, G., NASTRUZZI, C., CARPOV, A., DESBRIERES, J., and RINAUDE, M. (1999).** Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. Biomaterials, 20(15) :1427–1435.
- 49 FISHER K., PHILIPS C., 2006.** The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems. Journal of Applied Microbiology. 101, 1232-1240.
- 50 FISHER K., PHILIPS C., 2008.** Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends in Food Science and Technology.19, 156-164.

## H

- 51 HIMED L., 2018** Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (Citrus limon) : encapsulation et application comme agent conservateur à la margarine allégée, Univ, Constantine institut de la nutrition, de l’alimentation et des technologies agro-alimentaires, P01-15-16.

## K

- 52 KAMEL Z., ULLAH F., MUMAMMAD A., SADIQ A., AHMAD S., ANWAR Z., HUSSAIN A. et IMRAN M. (2015).** Anticholinesterase and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of Atriplex laciniata L.: potential effectiveness in Alzheimer’s and other neurological disorders. Biological Research. 48(21): 1-11.
- 53 KAMMOUN BEJAR, A., GHANEM, N., MIHOUBI, D., KECHAOU, N., BOUDHRIOUA MIHOUBI, N., 2011.**Effect of Infrared Drying on Drying

Kinetics, Color, Total Phenols and Water and Oil Holding Capacities of Orange (Citrus Sinensis) Peel and Leaves. Journal of Food Engineering. 7-5- 1-25.

- 54 KHEBICHAT A., 2013.** Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des cendres de bois du chêne vert «Kourriche ou Ballout »(Quercus ilex),Univ, Tlemcen, P17.
- 55 KLIMCZAK I., MALECKA M., SLACHTA M. et GLISZCZYNSKA-SWIGLO A. (2007).**Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis.10: 313-323.
- 56 KONG M., CHEN X G., LIU C S., LIU C G., MENG X H., YU L J. (2008).** Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against E. coli. Colloid Surf. B-Biointerfaces, 65 : 197–202.

### L

- 57 LAKHDARA N.,2014,** les sous-produits de l'agriculture en Algérie, UNIV, Constantine, P50- 51.
- 58 LAURENT J., 2017** CONSEILS ET UTILISATIONS DESHUILES ESSENTIELLES LES PLUSCOURANTES EN OFFICINE, Univ, UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSEIII, P94-95.
- 59 LEDESMA-ESCOBAR, C.A., LUQUE DE CASTRO, M.D., 2014.** Towards a comprehensive exploitation of citrus. Trends Food Science and Technology. 39, 63-75.
- 60 LI B. B., SMITH B., HOSSAIN Md. M., 2006a.** Extraction of phenolics from citrus peels. I.Solvent extraction method. Separation and Purification Technology. 48, 182-188.
- 61 LOHRRASBI, M., POURBAFRANI, M., NIKLASSON, C., TAHERZADEH, M.J., 2010.**Process design and economic analysis of a citrus
- 62** waste biorefinery with biofuels and limonene as products. Bioresource Technology. 101, 7382-7388.
- 63 LOUSSERT R., 1989.** Les agrumes, arboriculture. Ed. Technique agricoles méditerranéennes, Paris, 113p.

## M

- 64 MARIN, F.A., SOLER-RIVAS, C., BENAVENTE-GARCIO., CASTILLO, J., PEREZ-ALVAREZ, J.E., 2007.** By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*. 100, 736-741.
- 65 MEFLAH S., SEGNI L.** caractérisation des huiles essentielles de citron (feuilles et fruits).
- 66 MESSAOUR H., 2018.** L'étude de l'effet de l'incorporation de l'huile essentielle d'orange dans le fromage fondu de la laiterie et fromagerie Boudouaou, univ,Bouira, 46P.
- 67 MHIRI N., 2015** Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité anti-oxydante des extraits des écorces « Maltaise demi sanguine » et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone, univ, Carthage Tunisie P 01-02-03-10-11.
- 68 MNAYER D.,2014.** Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens, P05-09
- 69 MOHAMMEDI-BOUBEKKA N., 2007.** Bio-systématique des Aphidae et leur place dans l'entomofaune de l'oranger dans la plaine de la Mitidja. Institut national agronomique, El Harrach, Alger, 162 p.

## N

- 70 NEVEU V., PEREZ-JIMENEZ J., Vos F., CRESPIY V., DU CHAFFAUT L., MENNEN L., KNOX C., EISNER R., CRUZ J., WISHART D., SCALBERT A., 2010.** Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*. 1-9.doi:10.1093/database/bap024.
- 71 NIGAM, S. C., TSAO, I.-F., SAKODA, A., and WANG, H. Y. (1988).** Techniques for preparing hydrogel membrane capsules. *Biotechnology Techniques*, 2(4) :271–276.

## O

- 72 OUIS N., 2015.** étude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil, UNIV, Oran, P07-18-19-20.

**P**

- 73 PARIS, M. and HURABIELLE, M. (1981).** Abrégé de matière végétale pharmacognosie. Tome 1. Généralités monographiques. Ed. Masson.
- 74 POURBAFARIN, M., FORGACS, G., HORVATH, I.S., NIKLASSON, C., 2010.** Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology*. 101, 4246-4250.
- 75 PRALORAN C., 1971.** Les agrumes. Ed. Éditeur 8348, Paris, n° 5, p. 25.

**R**

- 76 RIBEREAU G. P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris. p 254.
- 77 RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD M., RIBEREAU-GAYON P. et SUDRAUD P. 1972.** Sciences et techniques du vin. Tome1, analyse et contrôle des vins. Edition Dunod, Paris. p671.
- 78 RICHTER G.,**« Métabolisme des végétaux », *Physiologie et Biochimie*. Presses polytechniques et universitaires, Romandes, **1993**, 292.

**S**

- 79 SALLE, J. L.** « Les huiles essentielles ; Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie », Edition Frison – Roche, Paris, **1991**, 21
- 80 SALEH, R.M., ISMAIL, A.A., EI HOSARY, A.A., 1982.** Corrosion inhibition by naturally occurring substances. *British Corrosion Journal*. 17 (3), 130-135.
- 81 SCIMECA D. et TETAU M.,2005.** « votre santé par les huiles essentielles Ed Alpen, 2005. P13.
- 82 SENNAD F., 2016.**essais d'application du bore sur la fécondation et la nouaison de la clémentine, UNIV, MOSTAGANEM, P09.
- 83 SHAKERI A., KHAKDAN F., SOHEILI V., SAHEBKAR A., RASSAM G., ASILI J. (2014).** Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepetaucrainica* L. spp. *kopetdaghensis*. *Ind. Crop. Prod.* 58, 315–321.

- 84 SIMONE S., CONIDI C., URSINO C., CASSANO et FIGOLI A. (2016).** Clarification of orange press liquors by PVDF hollow fiber membranes. *Membranes*. 6(1): 1-15.
- 85 SINGH, P., SHUKLA, R., PRAKASH, B., KUMAR, A., SINGH, S., KUMAR, P., 2010.** Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DLlimonene. *Food Chemical Toxicology*. 48, 1734-1740.
- 86 SINGLTON V.L. et ROSSI J.A. (1965).** Indice de Folin, polyphénols totaux. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.
- 87 SINGLETON V.L., ORTHOFER R. et LAMUELA-RAVENTOS R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- 88 STANKOVIĆ M.S. (2011).** Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregriinum* L. extracts. *Kragujevac. Journal of Science*. 33: 63-72.

**T**

- 89 TIAN, Q., MILLER, E.G., AHMAD, H., TANG, L., PATIL, B.S., 2001.** Differential inhibition of human cancer cell proliferation by citrus limonoids. *Nutrition and Cancer*. P40,180-184.
- 90 TOURE.,2015.** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes médicinales de côte d'ivoire., unive., felixhouphouet-boigny P14.

**V**

- 91 VALNET, J.** « Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes », Ed. Maloine. S.A , n°10, **1984**.
- 92 VANDAMME, T. F., PONCELET, D., and SUBRAT-PATERNAULT,P. (2007).** Microencapsulation - Des sciences aux technologies. TEC & DOC.
- 93 VERVERIS, C., GEORGHIOU, K., DANIELIDIS,D., HATZINIKOLAOU, D. G., SANTAS, P., SANTAS, R., 2007.** Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*. 98, 2, 296-301.

- 94 VEKIARI S.A, PROTOPAPADAKIS E.F, PAPADOPOULOU P, PAPANICOLEAU D, PANOU C et VAMVAKIAS, M. 2002.**Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of the lemon variety. *Journal of Agriculture and food chemistry*, 5, (1), 147-153.
- 95 VIROT, M., TOMAO, V., GINIES, G., VISINONI, F., CHEMAT, F., 2008.**Green procedure with a green solvent for fats and oils" determination Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *Journal of Chromatography A*.1196, 147-152.

### W

- 96 WANG, X., CHEN, Q., & LU, X., 2014.** Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*. 38, 129-137.
- 97 WILKINS, M. R., WIDMER, W., GROHMANN, K., 2007.** Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry*. 42 (12), 1614-1619.

### Y

- 98 Yang C.S, Chung J.Y, Yang G.Y, Chhabra. 2000.** Lee, Tea and Tea Polyphenols in Cancer Prevention, Symposium: Diet, Natural Products and Cancer Prevention: Progress and Promise. American Society for Nutritional Sciences.

## ملخص

تركز هذه الدراسة على استخراج وتحليل وتغليف الزيوت الأساسية المستخرجة من قشر البرتقال (*Citrus sinensis*) وقشر الليمون (*Citrus limon*) باستخدام تقنية التقطير المائي في درجة حرارة 80 درجة مئوية لمدة ساعتين و 30 دقيقة.

مردود الزيوت الأساسية المتحصل عليها قدرت ب 2.5 % بالنسبة للليمون و 4 % بالنسبة للبرتقال. التحاليل النوعية للزيوت الأساسية المجراة عن طريق CCM لهذا قمنا بحساب النسبة الأمامية للجزيء الرئيسي لزيتنا الأساسي وتقدر قيمة هذه الأخيرة بـ 0.56 للبرتقال و 0.55 للليمون.

إضافة إلى المراقبة الفيزيوية - الكيميائية "الكثافة النسبية و مؤشر الحموضة بالإضافة إلى مقدار Les polyphénols totaux et les flavonoïdes.

القيم المتحصل عليها من هذه التحليلات تشير ان الزيوت الأساسية المستخرجة تستوفي إلى معايير مراقبة الجودة. وفيما يتعلق بالتأثير المضاد للميكروبات، طبقنا تقنية les puits على الوسط الملوث بـ "*Staphylococcus aureus*" و "*Bacillus subtilis*" و "*Escherichia coli*" ، وتلاحظ نتيجة التجربة منطقة تثبيط هامة.

استخدام تقنية التغليف لحماية الزيت الأساسي.

### الكلمات الرئيسية:

إستخراج ، زيت أساسي ، ليمونين ، المرود ، تقنية التغليف.

## **ABSTRACT**

This study focuses on the extraction, analysis and encapsulation of essential oils extracted from orange peel (*Citrus sinensis*) and lemon peel (*Citrus limon*) using the hydro-chemical technique. distillation at a temperature = 80°C for 2h and 30min

The essential oil yields are obtained from a significant amount of 2.5% for lemon and 4% for orange.

The qualitative analyses of the essential oils carried out by CCM to this we calculated the frontal ratio of the main molecule of our essential oil, the value of the latter is estimated by 0.56 for orange and 0.55 for lemon.

Plus control of physico-chemical parameters Relative density and acid index and determination of total poly phenols and flavonoids, the values obtained from these analyses suggest an essential oil meets the quality control criteria, concerning the antimicrobial effect, we applied the technique of the agar wells contaminated with *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, the result of the experiment is observed by a significant inhibition zone.

The use of encapsulation technique for the protection of essential oil.

### **Keywords:**

Extraction, essential oil, Limonene, yield, encapsulation.



## Résumé

Cette étude porte sur l'extraction, l'analyse et l'encapsulation des huiles essentielles extraite à partir des zestes d'orange (*Citrus sinensis*) et de citron (*Citrus limon*) en utilisant pour l'extraction la technique d'hydro-distillation dans une température = 80°C pendant 2h et 30min

Les rendements en huile essentielles sont obtenus d'une quantité importante 2.5% pour le citron et 4% pour l'orange.

Les analyses qualitatives des huiles essentielles effectuées par CCM, à cela nous avons calculé le rapport frontal de la molécule principale de notre l'huile essentielle, la valeur de ce dernier est estimé par 0.56 pour l'orange et 0.55 pour le citron.

Plus le contrôle des paramètres physico-chimique « La densité relative et l'indice d'acide ainsi que le dosage des poly phénols totaux et des flavonoïdes. », les valeurs obtenus de ces analyses suggèrent une huile essentielle répond aux critères de contrôle de qualité, concernant l'effet antimicrobien, nous avons appliqué la technique des puits sur gélose contaminée par *Staphylococcus aureus*, *Baccilus subtilis* et *Escherichia coli*, le résultat de l'expérience est observé par une zone d'inhibition importante.

L'utilisation de la technique d'encapsulation pour la protection de l'huile essentielle.

### Mots clés :

Extraction, huile essentielle, Limonène, rendement, encapsulation.