

RÉSUMÉ

Mots-clés: squalene, *Amaranthus sp.*, extraction supercritique, distillation moléculaire

Les recherches réalisés pour la thème « *L'obtention des principes biologiquement actives des ressources végétales* » a eu comme but final le développement d'un concentré de squalene des graines de l'espèce *Amaranthus esp.*

La thèse a été structure en deux grands partis : L'étude critique des données caractéristiques de la littérature spécifique (3 chapitre, 63 pages), et La Partie expérimentale (5 chapitres, 167 pages) et à la fin en conséquent une synthèse des contributions personnelles. De plus, la thèse contient aussi 4 annexes et une liste avec les références bibliographiques totalisant 341 titres.

L'**Introduction** traite en bref l'importance de la thème choisi, le but, et les objectifs principaux de la thèse. **Le premier chapitre** expose une histoire des recherches les plus significatives pour la découverte de la squalene.

Chapitre 2 (29 pages, 14 tableaux) synthétise les données de la littérature concernant les ressources naturelles de la squalene. La source traditionnelle, ayant la plus grande concentration de squalene (>80%) est représenté par l'huile de foie de requin. Les préoccupations qui concernant la conservation de la vie marine constituent un premier raison pour la recherche des autres sources pour obtenir la squalene. L'identification, dans la foi de requin, des polluants organiques persistants (POP, des composés des métaux lourds, a constitué une autre motivation pour la recherche des sources alternatives de squalene, d'origine végétale et/ou microbienne.

Bien que la squalene a été identifié dans plusieurs plantes, les concentrations (de l'ordre mg/100 g), sont trop petites pour isoler la squalene. Pour des raisons industrielles ont été identifié jusqu'à ce moment, 3 sources d'origine végétale: l'huile des grains de l'espèce *Amaranthus*, le désodorisation distillat dérivé de l'huile d'olive et le désodorisation distillat dérivé de l'huile de palme.

Il est bien attendu que la squalene microbienne obtenue par voie de la biosynthèse ou semi synthèse représente une puissante variante commerciale dans les prochaines années.

Dans le Chapitre 3 (30 pages, 7 tableaux) elles sont montrés les principales méthodes d'analyse de la squalene aussi que les méthodes pour séparer, concentrer et purifier le composé des sources significantes du point de vue industriel. Ce chapitre finit par une synthèse des principales utilisations de la squalene dans l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Les propriétés émollientes et de hydrations de la squalene, même que sa biocompatibilité avec la peau ont transformé la squalene dans une composante majeure des formulations cosmétiques (des crèmes hydratantes, et produits anti-âge). La squalene est vue comme l'un des meilleurs

émollientes naturels, étant absorbé rapidement et efficace dans la peau, ayant une action de rétablir sa souplesse et sa flexibilité naturelle, sans laisser des résidus huileux sur la peau.

Naziri et colab. (2011) ont apprécié que la squalène a la capacité de régler la colonisation pathogène. Cette propriété-ci établit le fondement de l'utilisation de la squalène dans le traitement des infections bactérienne ou fongique de la peau.

Dans l'industrie pharmaceutique, la squalène est utilisé principalement pour préparer des émulsions stables, utiles pour les adjuvants dans l'administration de vaccin pour stimuler la réponse immune du patient à la vaccination. Bien qu'il y ait des craintes concernant le rôle de la squalène dans l'induction ou l'augmentation des réactions adverses, il est prouvé que l'administration de la squalène ne produise pas des anticorps anti-squalène. Les données publiées de l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, Global Advisory Committee Report on Vaccine Safety, 2008) ont divulgué que la squalène a été présente en plus de 22 millions vaccins antigrippaux distribués aux patients en Europe depuis 1997, et qu'ils n'y ont pas observé des effets adverses.

La partie expérimentale commence avec la présentation des méthodes employées dans les recherches en laboratoire (**chapitre 4**, 20 pages). Ici sont révélées les méthodes standardisées (ISO, AOAS, AOCS) appliquées pour obtenir les données expérimentales.

Chapitre 5: L'obtention et la caractérisation des graines de l'espèce *Amaranthus*. (18 pages, 18 figures) contient la description du matériel biologique, les données concernant la production obtenue pendant l'année 2012 pour 12 variétés des espèces d'*Amaranthus*, la production des graines, de l'huile et protéine. La production moyenne des 11 variétés a été pendant l'année 2012 de 1861 kg/ha. La meilleure production de graines a été obtenue avec la variété V1 (*Amaranthus cruentus* "MT3) pour laquelle la production enregistrée a été de 2236 kg/ha. Les graines ont été broyées pour les analyses de composition chimique. A été étudié l'influence de la durée de broyage sur la distribution granulométrique des particules résultée. (Déterminée par tamisage avec des sites analytiques) En supposant une distribution log-normale des diamètres des particules (valable par l'analyse des données expérimentales), le diamètre moyen des particules a varié depuis 660 μm ($S_g=269 \mu\text{m}$) à 396 μm ($S_g= 187 \mu\text{m}$).

L'humidité des variétés testées a varié depuis 10,9% et 13%, le contenu de protéine déterminé par la méthode Kjeldahl (facteur de transformation 5.85) entre 9.01 et 16,3%, le contenu de l'huile entre 3,69 et 5,88%. La production de protéine a varié entre 166,44 et 333,91 kg/ha (la moyenne 257,6 kg/ha), et la production de l'huile entre 74,8 et 107,23 kg/ha (la moyenne 93,69 kg/ha). Compte tenu des résultats, les graines de la variété *Amaranthus cruentus*-Alegría (V1) ayant des bonnes concentrations de l'huile (5,78%) et protéine (14,91%) et en assurant une bonne production des graines (1822 kg/ha dans les conditions de l'année 2012), ont été utilisées dans les suivantes expériences.

Au **chapitre 6** (75 pages, 32 tableaux, 48 figures) sont présentés les résultats expérimentales obtenus pour l'extraction et la caractérisation de l'huile des graines de *Amaranthus cruentus*. Prendre en compte les données de littérature et les résultats des tests préliminaires, ont été choisis deux méthodes: une méthode HPLC et une méthode GC.

Pour déterminer la squalène une méthode HPLC à phase inverse a été choisie, avec la détection à 214 nm. On a utilisé une colonne en acier inoxydable 250x 4,6mm, de phase stationnaire Kromasil- C18 (octadécylsilane), 5µm. La phase mobile a été méthanol: i-l'alcool propénoïque : acide acétique 920:80:0,5. Les déterminations ont été réalisées avec un chromatographe (HPLC) Merck- Lachrom. On a obtenu un temps de rétention de 14,36 minutes pour la squalène. Le domaine de linéarité a été inclus entre 0,063325 – 0,37995 mg/mL, le coefficient de corrélation a eu la valeur de 0,9934.

Pour déterminer en même temps le contenu de squalène et les acides gras (sous forme d'esters méthyliques) on a utilisé un chromatographe des gaz 6890N- AGILENT doté avec une colonne capillaire avec une phase stationnaire type HP88 (88% cyanopropyl- arile-polysiloxane) L=60m, φ=0,25mm, équipé avec un détecteur FID (ionisation en flamme) et auto sampler 7683B. Les conditions de travail ont été optimisées pour assurer une bonne séparation des acides gras présents dans l'huile de l'*Amaranthus* et de la squalène.

La durée totale de l'analyse a été de 45,5 min, en utilisant un régime de température en deux étapes : étape I 150-175°C, étape II 175-220°C. Le temps de rétention pour la squalène a été de 39.63 min, le domaine de linéarité 0,2344 – 4,6872 mg/mL, le coefficient de corrélation 0,99888, la limite de quantification pour la squalène 0,015mg/mL.

Pour l'extraction de l'huile des graines d'*Amaranthus* a été employé l'éther de pétrole (SIGMA 24553) ayant le point d'ébullition compris entre 60–80°C et la densité 0,660-0,680 (20°C). L'extraction a été réalisée dans un extracteur Soxhlet de laboratoire. La quantité d'éprouve prise en charge a été 20-25g. L'humidité du matériau soumis à l'extraction a été <10%.

Pour une durée de l'extraction plus grande ou égale avec 8 heures, les dimensions des particules n'influencent significativement la quantité de l'huile obtenue par la méthode Soxhlet. Les dimensions des particules agissent sur la vitesse d'extraction, en constituant un paramètre relevant pour des périodes d'extractions petites ou égales à 4 heures. La séparation de la farine résulte à la suite du broyage en fractions granulométriques, (<300 µm; 300-500 µm, > 500 µm) a mis en évidence une concentration plus grande de l'huile et de protéine dans la fraction fine. La fraction de diamètre moyen <300 µm, en représentant environ 34% de la masse totale de la farine a eu une concentration de l'huile de 10,71% et une concentration de protéine de 20,5%, c'est-à-dire plus de 1,8 fois huile et plus de 1,38 fois plus protéine que les valeurs obtenues pour la farine intégrale. (Inséparable en fractions granulométriques).

Les particules ayant des dimensions $<300\ \mu\text{m}$ contiennent environ 63% de l'entière quantité de l'huile, tandis que dans la fraction grossière il ne se retrouve que 9,3% de l'huile présent dans l'entier quantité des graines. Un constat similaire peut être fait même en ce qui concerne la concentration de protéine : la fraction avec un grain plus fin a environ 47% de l'entière quantité de protéine, tandis que la fraction grossière concentre justement 19% de la protéine. La division en fonction des fractions granulométriques n'apporte aucun changement ni sur la concentration de la squalene dans l'huile ni dans la distribution en acides gras, les différences constatées ayant statistiquement non significative.

Une variante moderne d'extraction des huiles végétales est constitué par l'extraction avec du CO_2 supercritique. Ce solvant a peu d'impact sur l'environnement, est non toxique et ininflammable. De plus il permet d'obtenir un extrait « pur » (sans des traces de solvants). L'extraction de la farine intégrale d'*Amaranthus* avec CO_2 supercritique a une pression de 517 bar, température de 100°C , débit de $15\ \text{g/min CO}_2$, durée de 60 min et absorption spécifique de $45\ \text{g CO}_2/\text{g graine}$ a conduit a l'obtention d'une concentration de $5,76\pm 0,16\ \text{g huile/g graine}$ (comparatif a $5,86\ \text{g huile/g graine}$ par extraction avec l'éther de pétrole). L'huile obtenu a eu un contenu de squalene de $5,03\pm 0,083\ \text{g/100 g huile}$ (comparatif a $4,98\ \text{g huile/g graine}$ par l'extraction avec l'éther de pétrole), un indice d'acidité $1,05\pm 0,12\ (\%)$ et une teneur en phosphore de $31\pm 13\ \text{ppm}$. Des données obtenues on conclut que l'extraction avec du CO_2 supercritique déterminé a l'obtention d'une valeur comparable avec l'extraction avec l'éther de pétrole pour la teneur de l'huile, teneur de squalene et l'indice de peroxyde. L'indice d'acidité et la teneur en phosphore sont plus réduits pour l'huile extrait par la méthode Soxhlet. Ces caractéristiques montrent que l'huile obtenu par l'extraction supercritique est supérieur du point de vue qualitative a l'huile obtenu par l'extraction classique.

Comme l'un des facteurs les plus importantes qui influencent l'efficacité de l'extraction de l'huile avec des fluides supercritiques est représenté par la solubilité de l'huile en solvant, la connaissance des effets de la pression, et de la température sur la solubilité, aussi que la détermination la plus précise des valeurs de la solubilité constitue le premier pas pour la gestion efficace de l'extraction avec CO_2 supercritique.

Dans la littérature il y a des nombreuse données expérimentales de la solubilité de la squalene en CO_2 supercritique, mais parmi les données expérimentales il y a des grandes différences, dues a l'équipement et aux méthodes variées de déterminer la solubilité (des méthodes statique ou dynamique). A plupart des cas, la solubilité des substances organique en CO_2 supercritique est modélisée soit a l'aide de l'équation d'état Peng-Robinson, soit par des équations (semi)empirique fondée sur la densité du solvant.

Modélisation de l'influence de la pression et de la température sur la solubilité de la squalene en CO₂ supercritique avec le modèle propose par Charstil pour l'entier domaine de pressions ($p=100\text{--}400$ bar) et de la température ($T=308,15\text{--}373,15$ K) pour laquelle ont été trouvés des données expérimentales a dirigé vers l'obtention d'une valeur de l'écart relative en valeur absolue (ARA) de 56,55% ($R^2=0,8347$), beaucoup plus grande pour que les prédictions du modèle soient utilisées dans la simulation. Après l'exclusion des valeurs correspondantes de la pression de 100bar, ont été gardés 91 valeurs de la solubilité. Les paramètres du modèle Charstil ont été optimisés par régression non-linéaire de sorte qu'on remporte une valeur totale $ARA < 25\%$.

Les données de la solubilité de l'huile d'*Amaranthus* en CO₂ supercritique ont été modélisées par 4 modèles de solubilité : Charstil (1982), Adachi-Lu (1983), Del Valle –Aguillera (1998), Del Valle et colab. (2012). Pour la solubilité de l'huile d'*Amaranthus*, la meilleure concordance parmi les valeurs expérimentales et les prédictions théorétiques ont été obtenus avec le modèle Adachi-Lu. En combinant le modèle Charstil pour la solubilité de la squalene avec le modèle Adachi-Lu pour la solubilité de l'huile d'*Amaranthus*, ont été identifiées par le biais de la simulation, les domaines des variations des paramètres qui présentent le plus grand intérêt pour l'extraction de l'huile d'*Amaranthus* et de la squalene. Fondé sur les résultats de la simulation, ont été réalisés des expérimentés d'extraction pour des pressions comprises entre 200 et 400 bar, températures entre 30 et 70°C à un débit de CO₂ de 4.6 g/min en validant les modèles proposés. Pour l'extraction complète de l'huile, les meilleures conditions sont 350 bars, environ 180 min, température 35°C.

La cinétique de l'extraction de l'huile d'*Amaranthus* a été modélisée avec le modèle BIC, proposé par Sovova (1994). Pour identifier les paramètres du modèle on a travaillé sur trois valeurs du débit de CO₂: 3,5; 4,5 et 6,0 g/min, à pression de 300 bars et température de 40°C. Les paramètres du modèle ont été calculés les paramètres du modèle, les coefficients de transfert de masse en phase liquide ($k_f \cdot a_0 = 1,17 \times 10^{-3} \text{--} 2,06 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$) et en phase solide ($k_s \cdot a_0 = 4,16 \times 10^{-5} \text{--} 8,65 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$), en résultant une bonne concordance parmi les valeurs existantes dans la littérature.

Chapitre 7 (47 pages, 39 tableaux, 27 figures) analyse les résultats obtenus à la séparation de la squalene par trois variantes de flux technologique réalisées pratiquement au niveau de laboratoire. La première variante de flux technologique est fondée sur l'extraction intégrale de la farine d'*Amaranthus* avec des solvants organiques, la concentration de la micelle, le dégommeage et la neutralisation de l'huile. L'huile a été fractionnée par distillation moléculaire. L'utilisation des paramètres optimaux pour chacune des phases du processus technologique a permis d'obtenir un concentré ayant un contenu de 80-85% squalene et un rendement fractionnaire de 80%. Dans la seconde variante de flux technologique, l'huile d'*Amaranthus* a été transestérifiée avec méthanol/méthoxide de sodium (rendement 92,24–95,1% réaction + séparation + purification).

Le fractionnement de la phase organique par distillation moléculaire a conduit aux résultats plus faibles que la première variante. La plus grande concentration de squalene (87,3%) a été obtenue dans la troisième variante, par l'extraction de la fraction de farine ayant le diamètre moyen $< 300 \mu\text{m}$ avec CO_2 supercritique et le fractionnement par distillation moléculaire à 240°C , une pression de $(2,2-2,5) \times 10^{-3} \text{mbar}$, vitesse de rotation de 500 rpm. Parce que la fraction fine contient seulement $2/3$ de la quantité de l'huile (et squalene) existant dans les grains, le rendement globale est plus faible comparative avec la première variante.

Chapitre 8 (7 pages) contient les conclusions de thèse. La thèse contient également la présentation des principales contributions propres et les articles publiés au cours du stage de doctorat sur le sujet de thèse.