

R É S U M É

EXTRACTION ET ISOLATION DE PRINCIPES ACTIFS À PARTIR DE MATIÈRES PREMIÈRES VÉGÉTALES

Doctorant: ARLET Andrei Constantin Ioan

Coordinateur scientifique: Prof. univ. Dr. Florentina ISRAEL_ROMING

MOTS-CLÉ: maïs pigmenté, extraction, polyphénols, propriétés antioxydantes, flavones

Le but du present travail, à travers les recherches entreprises, a été de trouver une valeur économiquement supérieure pour le son de maïs pigmenté de la variété Bloody Butcher (maïs rouge), un sous-produit de ressource céréalière, par l'obtention d'extraits riches en espèces phénoliques et leur essai en tant qu'aditif antioxydant dans des emulsions dermato-cosmetiques, un secteur d'intérêt pour la société moderne. Dans la réalisation des études proposées, les aspects liés à l'amélioration de l'impact sur l'environnement ont été pris en compte, en utilisant des procédés à faible consommation d'énergie et des matériaux à faible toxicité, et surtout, en développant une stratégie de valorisation d'un sous-produit utilisé exclusivement dans l'alimentation animale (son de maïs rouge à structure vitreuse).

Analysant l'état actuel des recherches dans ce domaine, le caractère **originel** de la thèse réside dans les suivants:

- *utilisation d'un sousproduit dérivé des graines de maïs rouge, cultivé sur le territoire de la Roumanie, pour l'obtention d'extraits polyphénoliques.* Il y a un volume réduit de mentions dans la littérature spécialisée concernant le maïs rouge exclusivement, comparées à d'autres types de maïs pigmenté (tel le maïs mauve ou bleu). De même, le nombre d'articles concernant l'utilisation économique de certains types de maïs pigmenté cultivé en Roumanie est réduit.
- *les éléments de nouveauté dérivant de l'investigation du son de maïs rouge à structure vitreuse utilisé exclusivement comme nourriture animale.* Ainsi, l'utilité de cette matière première céréalière est mise en avant dans une stratégie de recherche pouvant déboucher sur des produits à valeur ajoutée – les extraits polyphénoliques – adaptables aux industries d'impacte dans la société (domaine pharmaceutique, cosmétique, biomédical, alimentaire).

- *tests exclusifs des milieux d'extraction respectueux de l'environnement et utilisation de processus à faible impact et à faible consommation d'énergie.* L'engagement en faveur de processus responsables a conduit à un plan de travail en accord avec les stratégies de développement durable. De plus, le choix de la matière première, qui est un sous-produit, est harmonisé avec le concept de durabilité.
- *l'utilisation d'extraits polyphénoliques de son de maïs Bloody Butcher rouge dans une application à la frontière entre les domaines pharmaceutique et cosmétique – ingrédient actif au rôle antioxydant pour les émulsions dermato-cosmétiques.* La littérature spécialisée ne présente pas une approche similaire.

Dans ce contexte, afin d'atteindre l'objectif proposé, la thèse de doctorat comprend trois objectifs principaux, qui constituent trois chapitres de recherche expérimentale:

- **Objectif 1:** *valorisation d'un sous-produit dérivé du maïs coloré (son) pour l'isolement des extraits polyphénoliques; l'établissement du procédé optimale d'extraction et optimisation des paramètres utiles par des procédés responsables par rapport à l'environnement.*

- **Objectif 2:** *Fractionnement de l'extrait polyphénolique par des procédés membranaires, respectueux de l'environnement, afin d'isoler certaines fractions de valeur, au contenu différencié du point de vue phytochimique, et évaluation biochimique des fractions résultantes.*

- **Objectif 3:** *Utilisation d'une sélection de fractions polyphénoliques obtenues à partir du son de maïs rouge en tant qu'ingrédient actif au rôle antioxydant pour les émulsions dermato-cosmétiques.*

L'objectif 1, atteint à travers les activités détaillées dans le 3e Chapitre de la thèse, a visé l'optimisation des paramètres d'extraction pour obtenir une fraction plus riche en composés phénoliques en partant du son de maïs rouge Bloody Butcher. Le choix de cette matière première a été rationnel, compte tenu d'un côté de la stratégie de valorisation d'un sous-produit et, d'un autre côté, dû à sa teneur élevée d'espèces phénoliques associées à la couche aleuronique et au pericarpe des graines de maïs pigmenté.

La recherche a été effectuée en partant du son brut, matière première référentielle comme maïs moulu (not. PM), mais aussi du son passé par le tamis, matière première référentielle comme maïs moulu tamisé (not. PMC). Pour comparaison, on a expérimenté aussi l'extraction des polyphénols à partir du son de maïs jaune, de la variété KWS Kasmir. Les matières premières ont été obtenues le broyage des graines de maïs cultivées durant les années 2021 et 2022, dans la région de Brăila, en Roumanie.

Les deux types de maïs se différencient par leur structure. Le maïs jaune a une structure farineuse/démi-vitreuse, l'endosperme adhérent au son en petite quantité pendant que le maïs rouge a une structure vitreuse (graines dures), et le son

présente, dans ce cas, une fraction amidonneuse significative attachée au péricarpe; de même, PM et PMC sont beaucoup plus dures comparées au son de maïs jaune.

Pour le PM et le PMC, a été mise en place une succession de phases expérimentales et les extraits obtenus ont été ultérieurement étudiés par des techniques modernes de caractérisation, mettant à point la méthode optimale d'extraction ainsi que les paramètres optimaux de travail (milieu et temps d'extraction).

L'extraction des polyphénols à partir de PM et PMC a été faite en utilisant en tant que milieux d'extraction l'eau distillée (not. DW), un mélange eau-éthanol (1/1, v/v, not. DW-EtOH,) et DW-EtOH acidifié à l'acide chlorhydrique (1%, sol HCl 1N). Le rapport de masse du matériel végétal /solvent utilisé a été de 1/10.

Durant une première séquence de travail, PM et PMC ont été soumises à l'extraction durant 60 minutes par deux méthodes: agitation magnétique et respectivement traitement à ultrasons, à température ambiante, à l'abri de la lumière.

La deuxième phase de l'expérience a eu comme but d'identifier le temps optimal d'extraction pour PM et PMC, entre 1 min et 60 min.

La troisième phase de l'expérience a utilisé une technique nonconventionnelle d'extraction des composés phénoliques à partir de PM et de PMC notamment l'extraction assistée par microondes. Nous avons testé des temps d'extraction entre 5 et 20 secondes, ainsi que deux niveaux de puissance différents, 350 et 700 W.

Tous les extraits résultants des 3 séquences expérimentales ont été étudiés pour déterminer le contenu total de phénols, et suivant les résultats obtenus nous avons établi la version optimale de solvant capable d'isoler une fraction riche d'espèces phénoliques, le temps optimal d'extraction selon la stratégie d'utilisation des processus responsables ainsi que la méthode la plus efficace.

Quantification de la teneur totale en polyphénols (CTP) par la méthode spectrophotométrique Folin-Ciocalteu a montré que le mélange DW-EtOH mène aux extraits les plus riches en polyphénols lorsque on utilise le traitement à ultrasons pour les deux matières testées, PM et PMC. De même, un temps d'extraction plus long (60 minutes) signifie un meilleur rendement, mais, en accord avec les principes de la durabilité concernant une moindre consommation électrique, nous avons établi un temps optimal d'extraction de 20 minutes. L'augmentation de la concentration en composés phénoliques dans les extraits obtenus a été prise en compte, déterminant proportionnellement la valeur CTP aux différents temps d'extraction testés, par comparaison avec la valeur CTP de l'extrait obtenu après 1 minute de traitement (soit par agitation magnétique, soit par traitement à ultrasons).

Pour les extraits de son de maïs jaune (KWS Kasmir) nous avons obtenu des valeurs de CTP inférieures, validant ainsi le choix d'opter pour le son de maïs rouge pour l'extraction des espèces phénoliques.

En ce qui concerne l'extraction assistée par microondes, en tant que technique moderne et écologique, particulièrement utile pour l'isolement des molécules bioactives à partir des sources végétales, le traitement à une puissance supérieure (700 W), ainsi que exposition plus longue (20 secondes), mènent à un taux total de polyphénols plus élevé.

L'évaluation de la capacité antioxydante a été réalisée par la méthode TEAC (capacité antioxydante équivalente Trolox). Les résultats ont montré une meilleure activité avec PMC, pour les deux types d'extraction, par agitation magnétique et pour l'extraction à ultrasons. L'activité antioxydante la plus intense (451,71 mM TE/100 g DM) a été observée pour l'extrait résultant après 60 minutes de traitement par agitation magnétique. Un résultat proche a été obtenu aussi pour l'extrait PMC obtenu après 60 minutes de traitement à ultrasons (430,71 mM TE/100 g DM).

Les fractions obtenues par l'extraction assistée par microondes (20 secondes à 350W) présentent une capacité antioxydante modérée pendant que les extraits PM et PMC obtenus après 20 secondes de radiation à microondes, à une puissance de 700 W ont enregistré une très bonne activité antioxydative, 385,34 mM TE/100 g DM et respectivement 396,67 mM TE/100 g DM.

Ainsi, en base des résultats obtenus; on a conclu que le maïs rouge Bloody Butcher peut être envisagé dans des expériences futures pour l'isolement de fractions riches en composés phénoliques et l'isolement de fractions à contenu différencié. En outre, les extraits obtenus montrent un potentiel pour de futures études et leurs tests dans différents domaines d'application (cosmétique, pharmaceutique, nutraceutique, biomédical, alimentaire), en tant qu'additifs ayant une activité antioxydante. Ceci est également favorisé par les procédures sélectionnées pour obtenir des fractions riches en espèces phénoliques antioxydantes, en utilisant uniquement des solvants compatibles avec les cellules (eau et éthanol). Ces aspects des protocoles expérimentaux établis dans cette étude sont également harmonisés avec les stratégies de développement durable.

Le 2e objectif a été accompli par les résultats présentés et discutés dans le 4e Chapitre de la thèse, traitant l'extrait optimal de son de maïs rouge de la variété Bloody Butcher, tel que détaillé pour le 3e Chapitre, afin de séparer des fractions à teneur différenciée de composés phénoliques par des traitements membranaires.

Ont été effectuées des séparations de l'extrait optimal (tel que présenté dans le 3e Chapitre, not. P₀) par des expériences de séparation utilisant différents types de membranes et également différents paramètres expérimentaux:

- Membranes en cellulose régénérée (RC), avec un diamètre moyen des pores (cut-off) de 5KDa, pour une pression utile de 5 bars;
- Membranes en polyéthersulfone (PES), avec un diamètre moyen des pores (cut-off) de 5KDa, pour une pression utile de 5 bars;

- Membrane en polyéthersulfone (PES), avec un diamètre moyen des pores (cut-off) de 10KDa, pour deux pressions utiles, 2 bar (premier passage) et respectivement 3 bar (deuxième passage).

Les fractions obtenues, appelées *fraction concentré* (not. C) et *fraction perméat* (not. P) ont été caractérisés en termes de teneur totale en composés phénoliques, de teneur totale en flavones, d'activité antioxydante. De plus, pour les fractions d'extrait résultantes, les acides phénoliques, le rutoside et la quercitine, des molécules ayant un effet biologique reconnu, selon les données de la littérature, ont été quantifiées.

Les fractions d'extrait évaluées pour la détermination de la teneur en polyphénols totaux (CTP) ont montré ces teneurs comme dépendant de la méthode de séparation utilisée (type de membrane, dimension des pores, pression utile). Les différences obtenues peuvent être attribuées d'une part à la taille des pores des membranes, capables de séparer les polyphénols présents dans l'extrait P₀ par rapport à leur poids moléculaire moyen, mais d'autre part, elles peuvent être attribuées à un affinité inférieure ou supérieure de l'extrait par rapport à la membrane utilisée.

Une comparaison des données obtenues montre que la membrane RC 5 KDa a un taux plus grand de rétention des polyphénols, contribuant à l'enrichissement de la fraction d'extrait résultante (not. P₁-C) dqns des molécules phénoliques intéressantes, comparée avec la membrane PES 5 KDa. Egalement il a été démontré que la membrane PES 10 KDa (pour une pression utile de 3 bar) favorise le contenu de polyphénols pour la fraction concentré (not. P₃-C₂), permettant probablement la suspension dans le milieu hydralcoolique des composés à masse moleculaire plus grande, tout en évitant leur perte par dépôt/piégeage en surface/dans les pores de la membrane.

Pour les membranes RC 5 KDa (5 bar) et PES 10 KDa (2 bar) ont été obtenues des fractions concentrées à haute teneur en espèces phénoliques, pendant que les membranes PES 5 KDa (5 bar) et PES 10 KDa (3 bar) mènent à des fractions concentrées et perméat aux contenu différencié en espèces phénoliques, étant considérées comme les processus de séparation les plus efficaces pour la stratégie proposée.

La teneur totale en polyphénols et l'activité antioxydante des fractions d'extrait de maïs rouge montrent de très bons résultats, notamment pour les parties concentrées, qui ont enregistré des niveaux comparables à d'autres rapports de la littérature.

Des niveaux significatifs de flavonoïdes et d'acides phénoliques ont également été observés pour les fractions concentrées dérivées de l'extrait de maïs Bloody Butcher. Dans la catégorie des acides phénoliques, l'acide syringique était le représentant prédominant dans toutes les versions d'extrait analysées. Pas moins significatives sont les concentrations d'acide chlorogénique et d'acide 4-coumarique, acides phénoliques connus pour leurs effets thérapeutiques. Le rutoside et la

quercetine, des flavonols particulièrement importants avec des applications potentielles dans l'industrie pharmaceutique et dans celle des compléments alimentaires se trouvent en concentrations assez faibles, mais le profil phytochimique général peut contribuer à l'ensemble de l'activité biologique des fractions d'extrait isolées du son de maïs rouge.

Ainsi, il a été conclu que les fractions d'extrait concentré P₂-C et P₃-C₂ résultant de la séparation à l'aide de la membrane PES (5 KDa, 5 bar et 10 KDa, 3 bar) représentent les meilleures variantes, avec une activité antioxydante notable et donc, méritent des études et des recherches plus approfondies.

Le troisième objectif, qui impliquait l'exploitation des variantes les plus prometteuses de l'extrait de son de maïs rouge Bloody Butcher dans le développement d'une préparation dermato-cosmétique, a été réalisée grâce aux activités détaillées dans le 5e Chapitre de cet article. Ainsi, la fraction concentrée de l'extrait résultant de la séparation sur la membrane PES 5 KDa (5 bar) – not. P₂-C AA (capacité antioxydante ~ 40 mg TE/ g DM) et la fraction concentrée obtenue par séparation sur la membrane PES 10 KDa (3 bar, deuxième passage) – not. P₂-C₂ (capacité antioxydante de plus de 36 mg TE/ g DM) ont été utilisés comme ingrédient antioxydant pour une émulsion dermato-cosmétique huile dans l'eau (U/A), à une concentration de 0,5%.

Une formulation de base a été établie pour une préparation de type émulsion dermato-cosmétique, en gardant la liste des ingrédients la plus simple possible, afin de savoir si les extraits proposés avec le rôle d'antioxydant exercent un rôle protecteur pour les émulsions respectives.

Les émulsions obtenues (1 émulsion témoin, not. M et 2 préparations à extrait ajouté, not. P₂-C et P₃-C₂) ont été testés par différentes méthodes, spécifiques à l'industrie cosmétique/dermato-cosmétique, la stabilité des échantillons obtenus (crèmes) étant estimée, en corrélation avec l'ajout d'extrait polyphénolique de maïs (ingrédient antioxydant 0,5%).

Le teste de stabilité au froid (4°C, frigo), indique la stabilité de toutes les préparations étudiées après 6 semaines de conservation dans ces conditions, aucun changement dans les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) n'étant perçu.

Un autre teste de stabilité pour des émulsions préparées a été effectué par exposition directe à radiation solaire. Durant les 2 premières semaines d'exposition aucun changement organoleptique n'a été observé, mais après 6 semaines d'exposition, une odeur de rance a été perçue pour l'émulsion M, non additionnée d'ingrédient antioxydant.

Des différences de comportement significatives ont été constatées entre l'émulsion témoin (M) et les deux émulsions avec ajout d'extrait antioxydant (P₂C et P₃C₂, ajout de 0,5% d'extrait polyphénolique) lors du test de stabilité par apport de température (test de vieillissement accéléré/Swing test). Dans ce cas, pour l'émulsion M, des modifications des caractéristiques organoleptiques ont été perçues au début du

2ème cycle d'essai (sur un total de 4 cycles, dans des conditions prédéterminées). L'émulsion présente une déstabilisation, par séparation des phases constitutives et, implicitement, des changements d'apparence spectaculaires, ainsi que des changements de couleur et l'apparition d'une odeur de rance.

Au contraire, les émulsions additionnées d'extrait antioxydant (les deux variantes de l'extrait, ajoutées à raison de 0,5%) ont conservé leurs caractéristiques tout au long des tests de stabilité, y compris tout au long du test Swing (4 cycles, équivalent à 4 semaines d'exposition à la chaleur). stress), l'effet antioxydant des extraits de maïs rouge étant mis en avant.

La durée de vie des préparations cosmétiques a été estimée par un protocole de calcul adapté à partir de l'équation d'Arrhenius, que le processus de vieillissement accéléré est basé sur la relation entre la température et la vitesse de réaction, une augmentation de 10°C de la température d'essai augmentant la vitesse de réaction d'environ 2 à 3 fois. Pour ce calcul, les données obtenues du test Swing ont été utilisées, chaque préparation développée et étudiée recevant une certaine période de «validité». Pour les produits additionnés d'extrait polyphénolique, P₂-C et P₃-C₂, la durée de vie estimée était plus de 2,5 fois supérieure à celle estimée pour l'émulsion M, selon les résultats obtenus (35 jours pour les émulsions M et 76 jours pour les émulsions P₂-C et P₃-C₂).

L'évaluation du pH des émulsions initiales a indiqué un niveau d'utilisation optimal, avec un pH compatible avec la peau (5-5,5) et suite aux tests de stabilité, des changements spectaculaires ont été observés pour l'émulsion non additionnée d'extrait antioxydant, notamment après le test Swing (M, pH 2-3). Il a été établi que l'exposition au stress thermique favorise les processus de dégradation oxydative des huiles végétales contenues dans la composition de la crème, formant des espèces acides (très probablement des acides gras libres), responsables de la diminution des valeurs de pH.

A travers tous les tests réalisés dans ce chapitre, le rôle protecteur contre les processus d'oxydation, exercé par les extraits de maïs rouge P₂-C et P₃-C₂, sélectionnés dans l'étude comme ingrédient antioxydant, a été mis en évidence.

Ainsi, les résultats compris dans la présente thèse de doctorat valident la stratégie de recherche proposée concernant la valorisation supérieure du son de maïs rouge (sous-produit) de la variété Bloody Butcher.

Dans le cadre de procédés durables, afin d'obtenir des produits à valeur ajoutée dans une démarche d'*économie circulaire*, pour cette stratégie de recherche, d'autres possibilités ont également été identifiées en valorisant le son jusqu'au niveau 0 des déchets de processus. À ce sens, le déchet de son résultant après des processus d'extraction pourrait être transformé en charbon actif, avec de larges applications dans divers segments industriels. En outre, les extraits polyphénoliques du son de maïs

rouge pourraient être testés dans d'autres applications dans différents domaines industriels (tels que l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique/biomédicale, le domaine vétérinaire, comme additif pour l'alimentation animale).

Ainsi, en intégrant ces sous-produits dans des stratégies durables liées à différents domaines de production, le domaine d'utilisation des sous-produits/déchets céréaliers peut être élargi et des processus adaptés au concept d'*économie circulaire* peuvent être mis en œuvre, à travers lesquels le produit d'une production végétale passant par des étapes de traitement efficaces, peut être recyclé jusqu'à des niveaux minimes/zéro de déchet.