UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université de **C**arthage

Institut **N**ational **A**gronomique **D**e **T**unis

Institut **S**upérieur **D**e **B**iotechnologie **S**idi **T**habet

Unité de **R**echerche **É**cophysiologie e**t** **P**rocédés **A**groalimentaires

Université de **L**orraine

École **N**ationale **S**upérieure d'**A**gronomie et des **I**ndustries **A**limentaires

École **D**octorale **R**essources **P**rocédés **P**roduits **E**nvironnement

Laboratoire d'**I**ngénierie des **B**iomolécules

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat en « Sciences Agronomiques»

Et de

Doctorat en « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

Présentée par : M'HIRI Nouha

Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone

Travaux réalisés dans le cadre d'une thèse en cotutelle entre l'Institut National Agronomique de Tunis et l'Université de Lorraine

Soutenue publiquement le ***25 Novembre 2015*** devant la commission d'examen :

Rapporteur	Mr. R. Ksouri	Maître de conférences au CBBC, Tunis
Rapporteur	Mr. P-Y. Pontalier	Maître de conférences à l'ENSIACET, Toulouse
Examinateur	Mr. J. Gharbi	Professeur à l'ISBM, Monastir
Directeur de thèse	Mme. N. Mihoubi Boudhrioua	Professeur à l'ISBST, Tunis
Directeur de thèse	Mr. M. Ghoul	Professeur à l'ENSAIA-UL, Nancy
Co-encadreur	Mme.I. Ioannou	Maître de conférences à l'ENSAIA-UL, Nancy

Année universitaire 2015-2016

REMERCIEMENTS

C'est avec grand respect et gratitude que je transmets mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à avoir l'opportunité de réaliser ma thèse dans de si bonnes conditions.

Je veux tout d'abord remercier particulièrement ***Ma directrice de thèse, Madame Nourhène MIHOUBI BOUDHRIOUA*** *(Professeur à l'Institut Supérieur De Biotechnologie De Sidi Thabet de l'Université de la Manouba) d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils, je lui adresse également mes remerciements distingués de m'avoir consacré son temps précieux, pour ses critiques constructives, son enthousiasme et ses qualités personnelles et professionnelles. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.*

À mon directeur de thèse, Monsieur Mohamed GHOUL, *Professeur à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de l'Université de Lorraine. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Votre intérêt, votre curiosité, votre rigueur, votre compétence ainsi que votre disponibilité ont été des éléments indispensables pour la réalisation de ce travail. Je tiens ici à vous exprimer toute ma reconnaissance pour ces années de travail au sein du votre laboratoire.*

A ***Mme Irina IOANNOU****, Maître de conférences à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de l'Université de Lorraine, qui m'a co-encadré de près lors de mon séjour à Nancy. Je vous exprime mes sincères remerciements pour les discussions enrichissantes que nous avons eu à plusieurs reprises sur les parties de la thèse, qui m'a permis d'améliorer mes connaissances et de faire progresser mon travail. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour les conseils éclairés et votre disponibilité qui m'ont permis d'élaborer ce travail. Recevez ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour vos qualités scientifiques et humaines.*

Je remercie infiniment ***Monsieur Emmanuel ROCCA****, Professeur à l'Institut Jean Lamour pour m'avoir permis d'intégrer le laboratoire «Surface et Interface, Réactivité Chimique des Matériaux» pour réaliser les analyses électrochimiques et l'analyse de surface. Je remercie infiniment* ***Madame le docteur Delphine VEYS-RENAUX*** *(Maître de conférences à l'Institut Jean Lamour) qui m'a suivi de près lors de mon séjour au laboratoire pour les analyses électrochimiques, pour sa disponibilité et son aide dans l'interprétation des résultats.*

Je tiens à remercier, ***Professeur Danielle BARTH*** *(ENSIC, LRGP, Nancy, France) pour l'opportunité qu'elle m'a donné pour utiliser le dispositif pilote de l'extraction supercritique et Mme le* ***Professeur Marie ANTON LAMBALLERIE*** *(ENITIAA, ONIRIS, Nantes) pour m'avoir permis d'utiliser le système d'extraction à haute pression.*

*Je tiens aussi à remercier **Mr Ridha GHALI**, Maître assistant à l'ISBST, pour son aide concernant l'analyse des pesticides.*

*Cette thèse effectuée en cotutelle entre l'institut National Agronomique de Tunis et l'Université de Lorraine a été financée par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique et par l'unité de recherche Écophysiologie et Procédés Agroalimentaires. Je remercie **Professeur Rafika BEN CHAOUACHA-CHEKIR,** Directrice de l'Unité de recherche Écophysiologie et Procédés Agroalimentaires de l'ISBST de l'Université de la Manouba, pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche et pour avoir contribué au financement des mes stages en France.*

Je remercie les membres de jury:

***-Mr. Riadh KSOURI,** Maître de conférences au CBBC et directeur du laboratoire des plantes aromatiques et médicinales, d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

***-Mr. Pierre-Yves PONTALIER**, Maître de conférences à l'ENSIACET de Toulouse, d'avoir aimablement accepté d'être le rapporteur de cette thèse. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.*

***-Mr. Jawhar GHARBI**, Professeur à l'ISBM, Monastir, d'avoir jugé ce travail en tant qu'examinateur. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.*

Enfin je présente mes remerciements les plus distingués à tous les techniciens et mes collègues qui ont contribué au bon fonctionnement des laboratoires dans lesquels j'ai évolué : Céline Charbonel, Cédric Paris, Thierry Schweitzer, Lise Salsi, Hind Chaaban et Manel Slimene.

Enfin, je suis très reconnaissante pour mes parents, que j'admire et je remercie également mon mari Mourad, ma sœur Chiraz et mon frère Mohamed pour leur soutien incontestable.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Activité antioxydante
bh	Base humide
bs	Base sèche
C_{dc}	Capacité de double couche
CG	Chromatographie gazeuse
CL	Chromatographie liquide
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CLHP-SM	Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse
DIC-UAE	Technologie de chute de pression instantanée contrôlée couplée à l'extraction assistée par ultrasons
DMSO	Diméthylsulfoxyde
E/ V vs ECS	Potentiel de courant (en volt) par rapport à l'électrode au calomel saturée
EAG	Equivalent acide gallique
EAM	Extraction assistée par micro-ondes
EAU	Extraction assistée par ultrasons
Eau-ASTM	Eau de mer synthétique selon la norme américaine ASTM D 1141-86
Ecorr	Potentiel de corrosion
ECS	Extraction conventionnelle par solvant
EHP	Extraction sous haute pression
SC-CO_2	Extraction par CO_2 supercritique
FI	Flavonoïdes individuels
FT	Flavonoïdes totaux
CG/SM/SM	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem.
E.I	Efficacité d'inhibition
$i/A.cm^{-2}$	Densité du courant de corrosion (ampére.cm^{-2})
LOD	Limite de détermination
LOQ	Limite de quantification
MEB	Microscopie électronique à balayage
n	Fréquence
PPO	Polyphénoloxydase
PRM	Produits de la réaction de Maillard
PT	Phénols totaux
Q	Capacité de double couche électrique
QuEChERS	Quick (rapide), Easy (facile), Cheap (bon marché), Effective (efficace), Rugged (robuste) and Safe (sûre)
R_e	Résistance de l'électrolyte
R_{ct}	Résistance de transfert de charge
SiC	Carbure de silicium
SIE	Spectroscopie d'impédance électrochimique
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (capacité antioxydante d'équivalent trolox)
$V\ s^{-1}$	Volt par seconde
Trolox	Acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique
ABTS	Acide 2,2'-azinobis (3-éthylbenzoThiazoline-6-sulfonique)
DCPIP	2,6 dichlorophénol-indophénol
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EFP	Extraction par fluide pressurisé
EESC	Extraction par eau sous-critique.

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Les résultats obtenus lors de mes travaux de thèse ont été présentés dans des congrès nationaux et internationaux (09 communications) et ont fait l'objet de publications dans des journaux scientifiques internationaux à facteur d'impact : 03 articles publiés et 02 autres articles sont soumis à des journaux internationaux à facteur d'impact.

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

- **Article 1**: **M'HIRI N**., IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. (2014). Extraction methods of citrus peel phenolic compounds: a review. *Food Reviews International*, 30:265-290. DOI: 10.1080/87559129.2014.924139. **(IF=2,205).**
- **Article 2: M'HIRI N**., IOANNOU I., MIHOUBI BOUDHRIOUA N., GHOUL M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food Bioproducts Processing*, 96: 161-170. DOI: 10.1016/j.fbp.2015.07.010. **(IF=2,043).**
- **Article 3: M'HIRI N**., VEYS-RENAUX D., IOANNOU I., ROCCA E., MIHOUBI BOUDHRIOUA N., GHOUL M. (2015). Corrosion inhibition of carbon steel in acidic medium by orange peel extract and its main antioxidant compounds. *Article in press.* Journal *of Corrosion Science.* DOI:10.1016/j.corsci.2015.09.017. **(IF=3,014).**

Publications soumises dans des revues internationales à comité de lecture

- **Article 4: M'HIRI N**., IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. (2015). Phytochemical characteristics of *Citrus* peel and effect of processing on phenolic compounds: a review. Soumis au Journal *Food Reviews International.* **(IF=2,205).**
- **Article 5: M'HIRI N**., IOANNOU I., PARIS C., MIHOUBI BOUDHRIOUA N., GHOUL M. (2015). Comparison of phenolic compounds extraction methods from orange peel and evolution of their antioxidant activity. Soumis à *European Food Research and Technology* **(IF=1,39).**

Publication dans une revue internationale indexée

- **Article 6: M'HIRI N.,** IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. (2015). Proximate chemical composition of orange peel and variation of phenols and antioxidant activity during convective air drying. *Journal of New Sciences*-Agri and biotech in volume JS-INAT (9); September 01, 2015.

Communications orales dans des congrès internationaux à comité de lecture

1. VEYS-RENAUX D., ROCCA E., **M'HIRI N**., REGUER S., IOANNOU I., GHOUL M. Corrosion inhibition of steel by flavonoid model molecules: naringin, neohesperidin, rutin. ***66th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry,*** 4-9 Octobre 2015, Taipei, Taiwan.
2. **M'HIRI N**., IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. Proximate chemical composition of orange peel and variation of phenols and antioxidant activity during convective air drying. ***2^{éme} Journées Scientifiques de l'Institut National Agronomique de Tunisie***. "From Tradtional to New Trends in Food Technology Tunis, 28-29 Mai 2015, Tunis, Tunisie.
3. **M'HIRI N**., IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. Effect of air drying temperature on individual phenolic compounds and antioxidant activity kinetics of orange peel. ***International Drying Symposium***, 24-27 août 2014, Lyon, France.
4. **M'HIRI N**., IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. Citrus peels phenolic compounds: Molecular structure, biological activity, functional properties and different extraction methods: a review. ***2èmecolloque sur la Recherche scientifique et développement durable*** « Valorisation des produits agroalimentaires pour un développement durable », 11-12 Avril 2014, Sidi Bouzid, Tunisie.
5. **M'HIRI N**., IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. Comparative investigation of the effect of extraction methods on phenolic content of orange peel. ***International Conference on Food and Biosystems Engineering, FaBE,*** 30 Mai-02 Juin 2013, Skiathos, Grèce.
6. **M'HIRI N**., IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. Study of different extraction methods of phenolic compounds in orange peel. ***Tunisian Japanese Symposium on Science, Society and technology, TJASSST***, 15-18 Novembre 2013, Hammamet, Tunisie.

Posters dans des congrès internationaux à comité de lecture

1. **M'HIRI N**., VEYS-RENAUX D., IOANNOU I., ROCCA E., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. Corrosion inhibition of steel in acidic medium by orange peel extract and its major compounds. ***11th International symposium on Electrochemical methods in Corrosion Research***. 24-29 May 2015, Troia, Portugal.
2. **M'HIRI N**., IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. Étude comparative de l'effet des procédés de déshydratation des écorces d'orange sur la cinétique d'extraction des composés phénoliques et leurs activités antioxydantes. ***Séminaire annuel Ecole Doctorale RP2E***, 16 Janvier 2014, Nancy, France.
3. **M'HIRI N**., IOANNOU I., GHOUL M., MIHOUBI BOUDHRIOUA N. Effets des traitements technologiques et des procédés sur la variabilité des composés phénoliques d'agrumes : revue. ***Séminaire Maghrébin sur les Sciences et Technologies de Séchage***, 25-28 Mars 2013, Iles Kerkennah-Sfax, Tunisie.

Liste des figures

Figure 1. Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange (D'après Huet, 1991). 9
Figure 2. Structure du phénol 18
Figure 3. Structure de base des flavonoïdes (Erdman et al., 2007). 19
Figure 4. Flavanones aglycones et leurs glycosides respectifs (Khan et al., 2014). 19
Figure 5. Structure des flavones polyméthoxylés. 21
Figure 6. Structure des flavones. 21
Figure 7. Acides hydroxycinnamiques des écorces d'agrumes. 22
Figure 8. Éléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Chebil, 2006). .. 24
Figure 9. Formation des couches barrières 52
Figure 10. Représentation schématique des modes d'adsorption des molécules organiques inhibitrices sur une surface métallique (Thomas, 1980). 53
Figure 11. Schéma de l'installation de l'extraction dynamique 71
Figure 13. Schéma du pilote hautes pressions du la Halle de Technologies d'ONIRIS (ACBPressure Systems, Nantes, France). 72
Figure 12. Photo du pilote hautes pressions installé dans la Halle de Technologies d'ONIRIS (ACB Pressure Systems, Nantes, France). Sur cette image sont visibles : l'unité de contrôle et de commande (A), l'enceinte hautes pressions (B), l'obturateur à vis (C), le thermostat (D), le capteur de pression (E) et le capteur de température (F). 72
Figure 14. Représentation de l'impédance électrochimique en coordonnées de Nyquist (a) et de Bode (b) avec HF : haute fréquence, BF : base fréquence. 78
Figure 15. Circuit de Randles d'une interface électrochimique simple (De Waard & Milliams, 1975). 79
Figure 16. Cellule électrochimique à trois électrodes comprenant une contre-électrode en platine, une électrode de référence en calomel KCI saturée et l'électrode de travail en acier (Institut Jean Lamour-UMR CNRS, Nancy, France). 81
Figure 17. Chromatogramme de l'extrait éthanolique des écorces de l'orange Maltaise obtenu par CLHP-DAD-SM à 279 nm. 88
Figure 18. Teneur en phénols totaux de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise en utilisant l'éthanol 70-80%. 97

Figure 19. Courbes d'équilibre des cinétiques de l'extraction conventionnelle par solvant (m/v:5g/50ml, 10-80 min, 35°C, éthanol 80%, agitation mécanique à l'obscurité et 5 extractions successives)..... 98
Figure 20. Effet de la puissance des ultrasons sur (a) les phénols et les flavonoïdes totaux (b), l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise..... 99
Figure 21. Formation d'une bulle de cavitation et libération du matériel végétal (Chemat et al., 2011)..... 100
Figure 22. Effet de la puissance micro-ondes sur (a) les phénols et les flavonoïdes totaux (b) l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise..... 103
Figure 23. Effet de la pression sur (a) les phénols et les flavonoïdes totaux (b) l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise..... 107
Figure 24. Effet de la température et de la pression d'extraction sur (a) les phénols et les flavonoïdes totaux (b) l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise. 110
Figure 25. Présentation de l'extraction par CO2 supercritique du soluté à partir des cellules végétales (Pereira & Meireles, 2010)..... 111
Figure 26. Teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux des extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction. Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05..... 115
Figure 27. Images de microscope électronique à balayage de la poudre d'écorces de citron avant (A), après l'extraction conventionnelle par solvant (B), l'extraction assistée par micro-ondes (C), l'extraction assistée par ultrasons (D) (Dahmoune et al., 2013)..... 116
Figure 28. Flavonoïdes individuels (majoritaires et minoritaires) des extraits des écorces de l'orange Maltaise obtenus par les différentes méthodes d'extraction exprimés en pourcentage des phénols totaux..... 118
Figure 29. Activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise obtenus par les différentes méthodes d'extraction. Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05..... 120
Figure 30. Mesures de potentiel de corrosion pendant l'immersion de l'acier dans un électrolyte à base d'eau/éthanol acidifié à pH 1 avec l'HCl..... 129
Figure 31. Courbes de polarisation cathodique et anodique enregistrées sur l'acier après 8 h d'immersion dans un électrolyte à base d'eau/éthanol acidifié à pH 1 avec l'HCl..... 129
Figure 32. Spectres d'impédance en représentation de Bode enregistrés sur l'acier dans un électrolyte à base d'eau/éthanol acidifié à pH 1 avec l'HCl..... 130

Figure 33. Circuits électriques utilisés par l'ajustement des données des spectres d'impédance. 131
Figure 34. Morphologie de la surface de l'acier immerge pendant 10 jours dans une solution à base de l'eau/éthanol acidifiée à pH 1 avec l'HCl (a) (b). 134
Figure 35. Courbes de polarisation cathodique et anodique enregistrées sur l'acier après 8 h d'immersion dans un électrolyte à base d'eau/éthanol basifiée à pH 12 avec NaOH. 137
Figure 36. Morphologie de la surface de l'acier immerge pendant 10 jours dans une solution à base de l'eau/éthanol basifiée à pH 12 avec NaOH (a) (b). 138
Figure 37. Morphologie de la surface de l'acier immerge pendant 10 jours dans une solution à base de l'eau/éthanol (a) (b). Effet de l'addition de l'extrait des écorces d'orange à 10% (c) (d), leurs composés antioxydants: (e) (f), naringine10-5M (g) (h) (i) Néohespéridine..... 139
Figure 38. Courbes de polarisation cathodique et anodique enregistrées sur l'acier après 8 h d'immersion dans un électrolyte à base d'eau/éthanol..... 140

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition chimique globale des écorces de différentes variétés d'agrumes (g/100g **bs).** 11
Tableau 2. Composition en caroténoïdes des écorces d'agrumes (µg/g bs) (Wang et al., 2008)..... 12
Tableau 3. Composés aromatiques des huiles essentielles des écorces d'agrumes 13
Tableau 4. Composition en fibres des écorces d'agrumes. 14
Tableau 5. Composition en minéraux des écorces d'agrumes. 15
Tableau 6. Propriétés fonctionnelles et domaines d'utilisation des composés non phénoliques des écorces des agrumes. 16
Tableau 7. Teneurs en flavonoïdes des écorces d'agrumes (mg/g bs). 20
Tableau 8. Teneurs en acides hydroxycinnamiques des différentes variétés des écorces d'agrumes (µg/g bs). 22
Tableau 9. Effet de la structure sur les activités antioxydants des flavonoïdes (Chebil, 2006). 25
Tableau 10. Propriétés fonctionnelles et domaines d'utilisation des composés phénoliques des écorces d'agrumes. 26
Tableau 11. Conditions opératoires de l'extraction conventionnelle par solvant des composés phénoliques des écorces d'agrumes. 30
Tableau 12. Conditions opératoires des nouvelles méthodes d'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes. 34
Tableau 13. Méthodes analytiques de la séparation et de la quantification des différentes classes des composés phénoliques des écorces d'agrumes 43
Tableau 14. Utilisation des agrumes et leurs sous produits comme des inhibiteurs de corrosion des métaux. 56
Tableau 15. Utilisation des composés phénoliques de synthèse comme des inhibiteurs de corrosion des métaux. 58
Tableau 16. Produits chimiques utilisés pour la réalisation des expérimentations. 64
Tableau 17. Caractéristiques physico- chimiques des écorces d'orange en pleine maturité. . 86
Tableau 18. Rt, pseudomoléculaire ions, ions adduits avec Na +, et UVmax des flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise identifiés par CLHP-DAD-SM. 89
Tableau 19. Flavonoïdes individuels des écorces de l'orange. 90

Tableau 20. Identification et quantification des résidus de pesticides dans les écorces de l'orange Maltaise déterminées par CL/SM/SM. 92
Tableau 21. LogP des solvants et des flavonoïdes des écorces d'orange. 96
Tableau 22. Effet de la puissance des ultrasons sur les flavonoïdes individuels (FI) des écorces d'orange (g/100g de poudre des écorces d'orange)..... 100
Tableau 23. Influence du temps d'extraction sur la teneur phénols totaux (g/100g poudre des écorces d'orange) de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise à 100 W. 102
Tableau 24. Effet de la puissance micro-ondes sur les flavonoïdes individuels (FI) des écorces d'orange (g/100g de poudre des écorces d'orange)..... 105
Tableau 25. Effet de la pression sur les flavonoïdes individuels (FI) des écorces d'orange (g/100g de poudre des écorces d'orange)..... 109
Tableau 26. Effet de la pression et de la température sur les flavonoïdes individuels (FI) des écorces d'orange (g/100g de poudre des écorces d'orange)..... 113
Tableau 27. Conditions opératoires optimales des différentes méthodes d'extraction..... 114
Tableau 28. Activité antioxydante des flavonoïdes individuels de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise..... 122
Tableau 29. Paramètres électriques déduits de l'ajustement des données d'impédance..... 132
Tableau 30. Mesure du pH du blanc, de l'extrait d'écorces d'orange et ces molécules antioxydantes..... 139

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE 1

I.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 7

I.1.AGRUMES: COMPOSITION CHIMIQUE, PROPRIETES FONCTIONNELLES ET COMPOSES PHENOLIQUES 7

I.1.1. AGRUMES 7

I.1.1.1. Données botaniques 7

I.1.1.2. Production mondiale d'agrumes 8

I.1.1.3. Importance de l'agrumiculture en Tunisie 8

I.1.1.4. Description morphologique et physiologique 9

I.1.1.5. Composition chimique globale des écorces d'agrumes 10

I.1.1.6. Propriétés fonctionnelles des composés non phénoliques des écorces d'agrumes et leurs utilisations 15

I.1.2. COMPOSES PHENOLIQUES 18

I.1.2.1. Principaux composés phénoliques des écorces des agrumes 18

I.1.2.2. Propriétés des composés phénoliques 23

I.2. METHODES D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES COMPOSES PHENOLIQUES DES ECORCES D'AGRUMES 29

I.2.1. EXTRACTION CONVENTIONNELLE PAR SOLVANT (ECS) 29

I.2.2. METHODES D'INTENSIFICATION DE L'EXTRACTION CONVENTIONNELLE PAR SOLVANT 32

I.2.2.1. Extraction assistée par ultrasons (EAU) 33

I.2.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (EAM) 35

I.2.2.3. Extraction par fluide pressurisé (EFP) 37

I.2.2.4. L'extraction par eau sous-critique (EESC) 39

I.2.2.5. Extraction par CO_2 supercritique (SC-CO_2) 39

I.2.3. Approches combinées pour l'intensification de l'extraction 41

I.2.4. METHODES D'ANALYSE DES COMPOSES PHENOLIQUES DES ECORCES D'AGRUMES ET DE LEURS ACTIVITES 42

I.2.5. MESURE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE 45

I.3. CORROSION ET PROTECTION DES MATERIAUX 48

I.3.1. INHIBITEURS DE LA CORROSION 49

I.3.1.1. Classement selon la nature de l'inhibiteur *50*
I.3.1.2. Classement selon le mécanisme d'action *51*
I.3.1.3. Classement selon le domaine d'application *54*
I.3.2. INHIBITION DE LA CORROSION PAR LES SUBSTANCES NATURELLES 54
II. MATERIEL ET METHODES 63
II.1. REALISATIONS DES EXPERIENCES 64
II.1.1. PREPARATION DES ECHANTILLONS 64
II.1.2. PRODUITS CHIMIQUES ET STANDARDS 64
II.2. CARACTERISATION CHIMIQUE GLOBALE DES ECORCES DE L'ORANGE MALTAISE 65
II.2.1. EAU 65
II.2.2. CENDRES 65
II.2.3. PROTEINES 65
II.2.4. LIPIDES 66
II.2.5. SUCRES REDUCTEURS 67
II.2.6. VITAMINE C 67
II.3. EXTRACTION, PURIFICATION ET ANALYSE DES PESTICIDES DANS LES ECORCES D'ORANGE MALTAISE 67
II.3.1. PREPARATION DE L'ECHANTILLON 67
II.3.2. EXTRACTION, PURIFICATION ET ANALYSE DES PESTICIDES DES ECORCES D'ORANGE .. 68
II.4. EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES DES ECORCES D'ORANGE MALTAISE 69
II.4.1. EXTRACTION CONVENTIONNELLE PAR SOLVANT (ECS) 69
II.4.2. EXTRACTION ASSISTEE PAR ULTRASONS (EAU) 70
II.4.3. EXTRACTION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES (EAM) 70
II.4.4. EXTRACTION PAR CO_2 SUPERCRITIQUE (SC-CO_2) 70
II.4.5. EXTRACTION SOUS HAUTE PRESSION (EHP) 71
II.4.6. TRAITEMENT POST-EXTRACTION 72
II.5. CARACTERISATION DE LA COMPOSITION PHENOLIQUE DES ECORCES D'ORANGE MALTAISE 73

II.5.1. ANALYSE DES FLAVONOÏDES ET DE LEUR ACTIVITE ANTIOXYDANTE 73
II.5.1.1. Dosage des phénols totaux 73
II.5.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux 73
II.5.1.3. Dosage des flavonoïdes individuels 74
II.5.1.4. Détermination de l'activité antioxydante 75
II.5.1.5. Additivité de l'activité antioxydante 76

II.6. ETUDE ELECTROCHIMIQUE DE L'ACIER EN PRESENCE DE L'EXTRAIT OU DE SES COMPOSES ANTIOXYDANTS : ETUDE DES TECHNIQUES ET CONDITIONS EXPERIMENTALES 77

II.6.1. TECHNIQUES D'ETUDE 77
II.6.1.1. Techniques d'études électrochimiques 77
II.6.1.2. Analyse de surface par Microscope Electronique à Balayage (MEB) 80
II.6.2. CONDITIONS EXPERIMENTALES 80
II.6.2.1. Etude électrochimiques 80
II.6.2.2. Analyse de la surface par microscope électronique à balayage (MEB) 82
II.6.2.3. Protection de l'acier contre la corrosion par l'extrait des écorces d'orange et les composés phénoliques 82
II.7. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES 83

III. RESULTATS ET DISCUSSION 84

III.1. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES ECORCES DE L'ORANGE MALTAISE 85

III.1.1. COMPOSITION PHYSICO-CHIMIQUE DES ECORCES DE L'ORANGE 85
III.1.2. COMPOSITION PHENOLIQUE DES ECORCES DE L'ORANGE MALTAISE 88
III.1.3. CARACTERISATION DES RESIDUS DE PESTICIDES DANS LES ECORCES DE L'ORANGE MALTAISE 91

III.2. EXTRACTION DES FLAVONOÏDES DES ECORCES DE L'ORANGE MALTAISE 95

III.2.1. ETUDE DE L'EFFET DES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION SUR LE PROFIL PHENOLIQUE ET L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS DES ECORCES DE L'ORANGE MALTAISE 95
III.2.1.1. Extraction conventionnelle par solvant (ECS) 95
III.2.1.2. Extraction assistée par ultrasons (EAU): effet de la puissance des ultrasons .. 99

III.2.1.3. Extraction assistée par micro-ondes (EAM): effet de la puissance micro-ondes 102

III.2.1.4. Extraction sous haute pression (EHP): effet de la pression 106

III.2.1.5. Extraction par CO_2 supercritique (SC-CO_2): effet de la pression et de la température 110

III.2.2. COMPARAISON DE L'EFFICACITE DES DIFFERENTES METHODES D'EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES ET L'EVOLUTION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES ECORCES D'ORANGE 115

III.2.2.1. Teneur en phénols et en flavonoïdes totaux (PT, FT) 115

III.2.2.2. Flavonoïdes individuels 118

III.2.2.3. Effet des méthodes d'extraction sur l'activité antioxydante 119

III.3. ETUDE DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA CORROSION DE L'ACIER AU CARBONE PAR L'EXTRAIT DES ECORCES D'ORANGE ET SES COMPOSES ANTIOXYDANTS 126

III.3.1. INHIBITION DE LA CORROSION DE L'ACIER EN MILIEU ACIDE 128

III.3.1.1. Caractérisations électrochimiques 128

III.3.1.2. Analyse de la surface 133

II.3.2. INHIBITION DE LA CORROSION DE L'ACIER EN MILIEU BASIQUE 136

III.3.2.1. Caractérisations électrochimiques 136

III.3.2.2. Analyse de la surface 137

III.3.3. EVALUATION DE LA RESISTANCE A LA CORROSION DES PLAQUES D'ACIER (DANS L'EAU ASTM) APRES « TRAITEMENT DE SURFACE » 138

III.3.3.1. Conditions de traitement de surface 138

III.3.3.2. Observations microscopiques 138

III.3.3.3. Résistance à la corrosion de l'acier traité 139

CONCLUSION GENERALE 143

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'important progrès réalisé dans le domaine de la chimie, de la biologie et de l'agriculture (conception, adaptation aux nouvelles matières, progrès techniques des procédés, amélioration génétique des plantes, …) a permis une meilleure exploitation des agro-ressources. Les récents développements industriels des produits respectueux de l'environnement (bio-diesel, le bio-solvant et les bio polymères), sous l'impulsion de la demande des consommateurs et l'instauration de réglementations restrictives, sont plus qu'encourageant pour une exploration des applications potentielles des agro-ressources. Par ailleurs, la valorisation des déchets des industries de transformation des agro-ressources permet non seulement d'alléger l'impact écologique en minimisant la pollution mais aussi de proposer de nouvelles opportunités permettant un développement économique durable de nombreux secteurs. Ainsi, la charge économique de recyclage des déchets devient une production de coproduits à haute valeur ajoutée destinés à être revendus à d'autres industries.

L'utilisation des agro-ressources et leurs coproduits est motivée par leur abondance, leur renouvelabilité, leur biodégradabilité et l'apport de valeur ajoutée qui doit justifier toute valorisation industrielle. En effet, les agro-ressources pourraient offrir une nouvelle source de matières premières dans beaucoup de domaines tels que le biomédical, l'alimentaire, le cosmétique, la chimie et la conception des matériaux d'emballage. Ainsi l'utilisation des agro-ressources et leurs coproduits issus des industries de transformation pour de nouvelles applications industrielles serait l'un des défis majeurs du XXI^{ème} siècle.

L'objectif général de ces travaux de thèse est de proposer un moyen de valorisation des écorces d'orange (coproduit majeur de l'industrie de transformation des agrumes en jus) et porte en particulier sur les composés phénoliques des écorces de l'orange Maltaise ½ sanguine.

La production mondiale d'agrumes se situe autour de 89 millions de tonnes (MT), dont 73% sont consommés en frais et 26% sont destinés à la transformation en produits dérivés essentiellement en jus (USDA, 2014). En Tunisie, la culture des agrumes est l'une des principales activités agro-économiques. La superficie actuellement occupée par la production d'agrumes en Tunisie est aux alentours de 25250 ha dont 7950 ha destinée à la culture des oranges Maltaise. Le cap bon constitue la principale zone de production avec à peu prés de 17 543 ha de vergers soit 69,48% de la surface agrumicole totale (Ministère de l'agriculture de la Tunisie, 2014).

La production Tunisienne de l'orange Maltaise ½ sanguine est estimée à 121500 tonnes pour l'année 2014. Les coproduits de l'orange Maltaise peuvent représenter 50% du poids du fruit entier (Djilas et *al.,* 2009 ; Ledesma-Escobar & Luque de Castro, 2014), ce qui correspond à plus de 60750 tonnes/an. Bien qu'à l'échelle mondiale, les industries de transformation d'agrumes en jus sont souvent munies d'unités de récupération des huiles essentielles ; en Tunisie aucune valorisation industrielle n'est actuellement disponible pour la valorisation de ces coproduits. La valorisation de ces coproduits devient alors un enjeu clé d'un point de vue environnemental et économique.

Les écorces d'orange constitue 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 (Tian et *al.,* 2001; Fisher & Phillips, 2006; Ververis et *al.,* 2007 ; Fisher & Phillips, 2008; Virot et *al.,* 2008; Chutia et *al.,* 2009; Singh et *al.,* 2010). 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 a*l.,* 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 co-produits 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'anti-corrosion 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). L'inconvénient majeur de ces études est que l'analyse phytochimique des extraits est rarement explorée et que la contribution des

différentes molécules est non identifiée. De plus, ces études sont effectuées uniquement en milieu acide.

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 antioxydante, 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 (Ramful et *al.,* 2010). 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. Certains auteurs se sont intéressés aux méthodes d'extraction par des techniques dites conventionnelles et non conventionnelles basées sur des nouvelles technologies d'extraction dites « vertes ». Ces techniques sont utilisées pour intensifier l'opération d'extraction et améliorer le rendement comme l'extraction par fluide supercritique (Cheigh et *al.,* 2012), l'extraction assistée par micro-ondes (Jawad & Langrish, 2012), l'extraction assistée par ultrasons (Khan et *al.,* 2010) l'extraction par liquide pressurisé (Li et *al.,* 2012a) et l'extraction assistée par des enzymes (Li et *al.,* 2006b). Mais l'extraction demeure une étape difficile en raison de la sensibilité des composés phénoliques à la chaleur, ce qui conduit à leur dégradation et l'altération de leurs activités antioxydantes. Ioannou et *al.* (2012) ont examiné l'effet des procédés sur les flavonoïdes. Les auteurs ont montré que ces molécules présentent une sensibilité à certaines conditions de processus telles que la température, la lumière ou la matrice alimentaire. Manach et *al.* (2004) ont signalé que le traitement entraîne souvent des changements importants des teneurs en composés phénoliques et surtout des pertes. Ainsi, les procédés d'extraction utilisés doivent être effectués dans des conditions douces pour empêcher la dégradation de composés phénoliques mais aussi pour minimiser les coûts (l'énergie, la quantité du solvant…).

Ainsi les ***deux objectifs spécifiques*** de ces travaux de thèse sont :

(i) l'étude de l'impact des différentes méthodes (méthodes conventionnelles et non conventionnelles) et conditions d'extraction sur les composés phénoliques des écorces de l'orange Maltaise et sur l'activité antioxydante des extraits,

(ii) l'étude de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone par l'extrait des écorces en milieu acide et en milieu basique.

La première partie de ce manuscrit a été consacrée à une analyse bibliographique en trois chapitres regroupant les différents thèmes de cette étude. Le premier chapitre met l'accent sur l'importance de l'agrumiculture en tant qu'une des principales activités agro-économiques du pays surtout à travers la production et l'exportation des oranges Maltaise et présente la composition chimique globale des écorces d'agrumes, la composition phénolique, leurs propriétés fonctionnelles et leurs domaines d'utilisation. Un aperçu sur les voies de valorisation des sous-produits d'agrumes est présenté aussi dans ce chapitre. Le deuxième chapitre présente les différentes méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques des écorces d'agrumes. Le troisième chapitre présente les inhibiteurs de la corrosion des métaux et leurs mécanismes d'action. Une partie de cette revue bibliographique a fait l'objet de deux publications scientifiques (une publication dans le journal « *Food Reviews International* » et un papier soumis).

La deuxième partie de ce manuscrit porte sur la méthodologie expérimentale adoptée dans ce travail. Les protocoles expérimentaux d'analyse de la composition chimique globale et la composition phénolique des écorces d'orange de la variété Maltaise ont été présentés. Les différents dispositifs expérimentaux utilisés pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange et pour l'étude de l'effet anti-corrosion de l'acier par l'extrait des écorces d'orange et leurs molécules antioxydantes ainsi que les traitements des données expérimentales ont été aussi décrits dans cette seconde partie de la thèse.

Les résultats obtenus ont fait l'objet de publications scientifiques (02 publications parues et 01 papier soumis). L'ensemble de ses résultats et leurs interprétations ont fait l'objet de la troisième partie de la thèse qui comporte trois chapitres. Le premier chapitre a été consacré à la détermination de la composition chimique globale des écorces de l'orange Maltaise ainsi que l'identification et la quantification des composés phénoliques des écorces. Le deuxième chapitre a été consacré à l'étude des effets des conditions opératoires des différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques (l'extraction conventionnelle par solvant, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction par CO_2 supercritique et l'extraction sous hautes pression) sur le profil phénolique et l'activité antioxydante des écorces de l'orange Maltaise. Une comparaison de ces méthodes d'extraction en termes de teneurs en composés phénoliques et en activités antioxydantes a été effectuée.

La valorisation de la fraction phénolique de notre extrait en tant qu'inhibiteur de la corrosion de l'acier en milieu acide (pH=1) et en milieu basique (pH=12) a fait l'objet du troisième chapitre. Pour cela, l'efficacité d'inhibition de la corrosion de l'extrait des écorces d'orange, des principaux composés phénoliques des écorces (la néohespéridine et la naringine) ainsi que celle de l'acide ascorbique a été évaluée. Finalement, l'ensemble de ce travail est clôturé par une conclusion générale avec des perspectives de recherche envisageables.

I.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.Agrumes: composition chimique, propriétés fonctionnelles et composés phénoliques

Introduction

L'agrumiculture constitue le plus grand secteur de production de fruits dans le monde, avec plus de 89 millions de tonnes produites durant l'année 2014 (USDA, 2014), plus que le tiers de cette production est transformé industriellement en jus. La quantité correspondante de déchets industriels d'agrumes est estimée à 15×10^6 tonnes (Marin et *al.,* 2007). Le coproduit de la transformation industrielle des agrumes est constitué essentiellement des écorces d'agrumes et de résidus de graines (Bocco et *al.,* 1998). Les écorces d'agrumes sont l'association du flavédo qui est la surface périphérique du fruit coloré par des pigments caroténoïdes et de l'albédo qui est la couche intérieure blanchâtre du fruit (Huet, 1991; Ramful *et al.,* 2010).

Les écorces d'agrumes sont une matrice hautement valorisable vue sa richesse en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques) ayant des applications très variées dans les industries agroalimentaires, cosmétique, nutraceutique et dans les industries de production de biocarburant et de matériaux biodégradables (Ledesma-Escobar & Luque de Castro, 2014). Les écorces d'agrumes représentent un gisement important de composés phénoliques, essentiellement des flavonoïdes et des acides phénoliques. Les flavonoïdes présents dans les agrumes sont les flavanones glycosylés et les flavones polyméthoxylés (Mouly, 1994; Kawaii et *al.,* 1999; Manthey & Grohmann, 2001). Les flavonoïdes des écorces d'agrumes sont caractérisés par leur activité antioxydante, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne (Bocco *et al.,* 1998 ; Ma et *al.,* 2009; Huang *et al.,* 2010).

L'objectif principal de ce premier chapitre est de présenter la composition chimique globale des écorces d'agrumes, leurs composés phénoliques caractéristiques ainsi que leurs propriétés fonctionnelles et leurs domaines d'utilisation.

I.1.1. Agrumes

I.1.1.1. Données botaniques

Le groupe des agrumes appartient à la famille des Rutaceae, sous famille des Aurantioideae, tribu des Citreae et sous tribu des Citrinae (Praloran, 1971).

Les agrumes se répartissent en plusieurs genres. *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* sont les trois genres les plus cultivés à travers le monde. Le genre *Poncirus* ne renferme qu'une seule espèce le *Poncirus trifoliata*. Cette espèce est essentiellement utilisée en agrumiculture comme porte greffe car ses fruits ne sont pas comestibles. Le genre *Fortunella* comprend six espèces dont deux seulement font l'objet d'une culture dans le Monde. Il s'agit de *Fortunella japonica* et *Fortunella margarita*. Le genre *Citrus* est le plus important. C'est au sein de ce genre que se rencontrent les principales espèces cultivées: les oranges (*Citrus sinensis*); les mandarines (*Citrus reticulata*); les clémentines (*Citrus clementina*); les citronniers (*Citrus limon*); et les pomelos (*Citrus paradis*).

I.1.1.2. Production mondiale d'agrumes

La production mondiale d'agrumes se situe autour de 89 millions de tonnes (MT), dont 73% de la production sont consommés en frais, 26% sont destinés à la transformation et 9% à l'exportation. Cette production est répartie en plusieurs variétés d'agrumes dans laquelle l'orange représente 57%, la mandarine 30%, le pamplemousse 7% et le citron et la lime 6% (USDA, 2014). Avec une production de 17,34 MT, le Brésil est le premier producteur d'oranges dans le monde. Il assure 34% de la production mondiale, suivi par la Chine (7,6 MT), les Etats-Unis (6,29 MT) et l'Union Européenne (6,07 MT).

Dans la région Méditerranéenne, 22,5 MT d'agrumes sont produites par les 12 pays membres du Comité de Liaison des Agrumes Méditerranéens (CLAM) dont l'Espagne, le Maroc, la Turquie, l'Italie, l'Egypte, la Grèce, la Tunisie (USDA, 2014).

I.1.1.3. Importance de l'agrumiculture en Tunisie

Cette culture généralement intensive vient au deuxième rang après les oliviers. La superficie réservée pour la culture d'agrumes est d'environ 25 250 ha dont 7950 ha destinée à la culture de l'orange Maltaise, ce qui représente environ 31% de la superficie totale. La moyenne de la production d'agrumes est estimée à 355 000 tonnes/an en 2014 représentant près de 1,5% de la production Méditerranéenne. La branche de la production de l'orange Maltaise ½ sanguine représente à elle seule 34% de la production totale des agrumes, soit une moyenne de 121 500 tonnes au cours du dernier quinquennat.

La principale zone de culture d'agrumes en Tunisie est la région de Nabeul (69%) puis la production d'agrumes se répartit un peu partout dans le pays (Ben arous, Arina, Manouba, Bizerte, Béja, Jendouba, Kairouan, Sidi bouzid) (Ministère de l'agriculture de Tunisie, 2014).

La répartition variétale d'agrumes en Tunisie montre que la variété dominante est l'orange Maltaise (34%), suivie par le citron (17%), l'orange Navel (16%), l'orange Meski (12%), la clémentine (11%), l'orange Valence (3%) et la mandarine (2%) (Ministère de l'agriculture de Tunisie, 2014). L'exportation d'agrumes représente 6% de la production totale d'agrumes en Tunisie. L'orange Maltaise représente à elle seule 84% de l'exportation totale d'agrumes suivi par le citron (10%), l'orange Thompson (3%) et les autres variétés. La France est le premier pays acheteur de l'orange Maltaise (82%), suivie par l'Algérie (13%), la Libye (4%), les autres pays Européens, et les pays du Golfe (GIF, 2014).

I.1.1.4. Description morphologique et physiologique

Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité. Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique présentée dans la **figure 1** (Ramful et *al.,* 2010). D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits charnus de type baie avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées : l'épicarpe appelé flavédo, le mésocarpe appelé albédo et l'endocarpe (pulpe). L'épicarpe est la surface périphérique du fruit. Il est coloré par des pigments caroténoïdes et représente 8 à 10% du fruit. Il contient de nombreuses glandes sécrétrices d'essences aromatiques qui sont réparties de façon irrégulière.

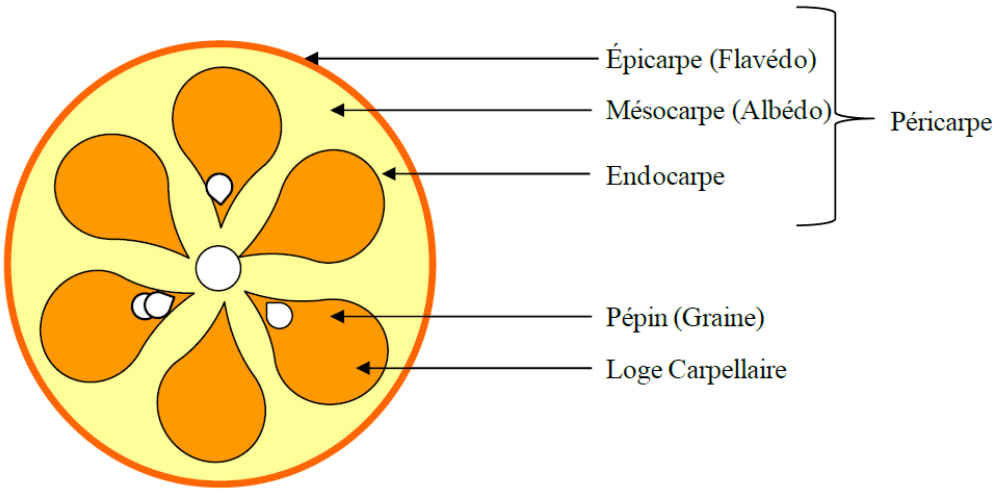


Figure 1. *Schéma détaillant la structure du péricarpe de l'orange (D'après Huet, 1991).*

Ces glandes sont des poches bordées par plusieurs assises de cellules sécrétrices dont la formation fait intervenir des cellules épidermiques et des nodules méristématiques superficiels.

Le mésocarpe est la couche intérieure blanchâtre, de structure spongieuse, plus ou moins épaisse par rapport à la taille du fruit, elle peut constituer 12 à 30% du fruit. Elle est intimement associée à l'épicarpe avec lequel elle forme ce qu'il est convenu d'appeler les écorces d'agrumes.

L'endocarpe est la partie comestible d'agrumes. Il est constitué d'une fine membrane qui tapisse les nombreuses loges carpellaires. Du côté interne, cette membrane porte des poils succulents dont l'ensemble forme la partie comestible ou pulpe renfermant les graines ou pépins (Huet, 1991; Albagnac, 2002 ; Bennici et *al.,* 2004 ; Ramful et *al.,* 2010).

I.1.1.5. Composition chimique globale des écorces d'agrumes

La composition chimique des écorces d'agrumes est sujette à des variations sous l'influence de divers facteurs et notamment la variété. De plus, dans une même variété, la teneur en divers composés dépend des facteurs climatiques et environnementaux. Le **Tableau 1** présente la composition chimique globale des écorces d'agrumes des principales variétés comestibles, exprimée en g pour 100g base sèche (bs).

Les écorces d'agrumes présentent des teneurs élevées en eau (variant de 2,97-3,79 g/g bs), soit 60% à 75% en base humide) et en sucres solubles (6,52-47,81 g/100g bs). De ce fait, c'est un coproduit hautement périssable qui fermente et présente un développement des moisissures (Farhat et *al.,* 2011; Kammoun et *al.,* 2011). De plus, ce coproduit est riche en protéines (1,79-9,06 g/100g bs) et en minéraux (2,52-10,03 g/100 bs) alors que les lipides sont très peu abondants (de 0,48 jusqu'à 4 g/100g bs).

Les écorces sont particulièrement riches en composés digestibles et offrent de nombreuses possibilités d'utilisation pour l'alimentation fonctionnelle humaine et animale ainsi qu'en tant que complément alimentaire (Bampidis & Robinson, 2006). L'utilisation des écorces fraîches en alimentation pour bétail est limitée à cause des maladies que peut provoquer la consommation de ce produit (mycotoxicose, parakératose du rumen) (Duoss-Jennings et *al.,* 2013).

Les écorces d'agrumes sont une source importante d'essences odorantes et d'huiles essentielles de 0,6 à 1% (Oreopoulou et *al.,* 2007; Yeoh et *al.,* 2008 ; Hosni et *al.,* 2010 ; Farhat et *al.,* 2011). Les écorces contiennent aussi des pigments, essentiellement des caroténoïdes (0,01-0,20 g/100g bs) mais aussi des anthocyanes (dans le cas des oranges sanguines).

Tableau 1. *Composition chimique globale des écorces de différentes variétés d'agrumes (g/100g bs*).

Variété de citrus	Orange	Mandarine	Citron	Pamplemousse
Eau	2,97[a]-3,14[b]	3,79[b]	3,01[b]	-
Lipides	0,95[a]	1,57[c]	0,48[b]	-
	1,66[b]	2,97[b]	1,51[c]	
	4,00[c]	-	1,89[d]	
Protéines	1,79[b]	2,16[e]	5,87[b]	-
	2,67[e]	7,33[c]	6,79[d]	
	7,90[f]	8,55[b]	7,88[g]	
	8,01[a]	-	-	
	9,06[c]	-	-	
Glucides	15,01[b]	8,50[c]	6,52[c]	-
	46,60[a]	18,27[b]	13,77[g]	
	47,81[c]	-	14,89[b]	
Minéraux	2,56[c]	3,96[b]	2,52[c]	-
	3,31[a]	4,06[e]	4,68[b]	
	3,45[b]	10,03[c]	-	
	4,24[e]	-	-	
Fibres	6,30[c]	7,14[e]	14,00[h]	82,69[j]
	13,38[e]	27,89[b]	-	-
	13,90[h]	-	-	-
	41,64[b]	-	-	-
	42,13[a]	-	-	-
Caroténoïdes totaux	0,04[k]	0,20[k]	0,01[k]	-
Phénols totaux	0,67[e]	0,78[e]	2,45[b]	22,32[o]
	0,96[l]	2,91[b]	4,40[n]	-
	1,13[a]	17,21[o]	13,01[o]	-
	1,89[b]	-	-	-
	2,51[l]	-	-	-
	3,94[m]	-	-	-
	7,30[n]	-	-	-
	16,03[o]	-	-	-
	19,62[p]	-	-	-
Huiles essentielles	0,6-1[r]	-	-	-
Vitamine C	0,145[s]-1,15[p]	0,280[s]	0,109[s]	-

[a] Kammoun et *al.,* 2011; [b] Ghanem et *al.,* 2012 ; [c] Marin et *al.,* 2007 ;[d] Fiaguerola et *al.,* 2005 ; [e] Magda et *al.,* 2008 ; [f] Grigelmo-Minguel et *al.,* 1999 ; [g] Masmoudi et *al.,* 2008 ; [h] Gorinstein et *al.,* 2001; [j] Chinapongtitiwat et *al.,* 2013 ; [k] Wang et *al.,* 2008 ; [l] Lagha-Bernamrouche et *al.,* 2013 ; [m] Chen et *al.,* 2011 ;[n] Cheynier et *al.,* 2006 ; [o] Ghasemi et *al.,* 2009 ; [p] Goulas et *al.,* 2012; [r] Espiard, 2002 ; [s] Barros et *al.,* 2012.

D'autre part, plusieurs études montrent que les écorces d'agrumes contiennent aussi des composés biologiquement actifs comme la vitamine C (0,109-1,150 g/100g bs) (Goulas et *al.,* 2012 ; Barros et *al.,* 2012) et les fibres alimentaires (6,30-82,69 g/100g bs) (Ghasemi et *al.,* 2009 ; Magda et *al.,* 2008). Les écorces d'agrumes sont aussi riches en composés phénoliques (0,67-22,32 g/100g bs). La composition en composés phénoliques des écorces et leurs propriétés fonctionnelles seront détaillées dans la section I.1.2.

❖ *Pigments*

La couleur verte des oranges immatures est due aux chlorophylles. Au cours de la maturité, la couleur de l'épicarpe ou flavédo vire du vert au jaune orangé. Ce virage résulte de la dégradation des chlorophylles et l'augmentation de la synthèse des caroténoïdes associée à la disparition des chloroplastes et la formation des chromoplastes (Meléndez-Martínez, 2007). Ainsi, la couleur des écorces et de la pulpe de la plupart des oranges matures est due aux pigments caroténoïdes. La couleur de certaines variétés appelées orange sanguines telles que l'orange Maltaise est due aux caroténoïdes et aux anthocyanes. Une alimentation riche en caroténoïdes peut diminuer le risque du cancer, la dégénérescence musculaire, les dommages de la peau induits par les brûlures du soleil et les maladies cardiovasculaires (Aust et *al.,* 2001; Wang et *al.,* 2008).

Le **tableau 2** montre que les teneurs en caroténoïdes des écorces sont variables d'une variété d'agrumes à une autre (orange, mandarine, citron, pamplemousse). Par exemple, pour la lutéine, les teneurs peuvent aller de 0,80 µg/g bs pour le pamplemousse jusqu'à 29,3 µg/g bs pour les oranges. Pour le β-carotène, le pamplemousse contient 0,96 µg/g bs alors que la mandarine en contient 69,2 µg/g bs.

Tableau 2. Composition en caroténoïdes des écorces d'agrumes (µg/g bs) (Wang et *al.,* 2008).

Variété	Lutéine	Zeaxanthine	β-cryptoxanthine	β-carotène
Mandarine	7,75	6,46	30,50	69,20
Orange	29,30	27,70	0,76	50,30
Citron	2,95	0,81	0,81	10,30
Pamplemousse	0,80	0,51	0,40	0,96

Les oranges contiennent la plus grande quantité de zeaxanthine (27,7 µg/g bs), suivie par la mandarine (6,46 µg/g bs), le citron et le pamplemousse et concernant la β cryptoxanthine, c'est la mandarine qui présente la concentration la plus importante (30,5 µg/g bs), suivie par les autres variétés (<1 µg/g bs).

❖ *Huiles essentielles*

Les écorces d'agrumes sont riches en huiles essentielles qui sont localisées dans des glandes situées dans le flavédo. Ces huiles essentielles sont extraites à partir des écorces par une simple pression à froid ou bien simultanément avec l'extraction du jus.

En effet, les huiles essentielles d'agrumes peuvent être extraites à froid. Ces huiles sont ensuite entraînées par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'huile se forme (Dugo et *al.,* 1997; Oreopoulou et *al.,* 2007 ; Yeoh et *al.,* 2008; Sahraoui et *al.,* 2011). Les huiles essentielles des écorces d'agrumes peuvent aussi être extraites par la distillation à la vapeur ou l'hydro-distillation (Gamiz-Garcia & Luque de Castro, 2000 ; Gamarra et *al.,* 2006) et par des solvants organiques (Lin et *al.,* 2010). La composition en huiles essentielles des écorces de trois variétés d'agrumes est présentée dans le **tableau 3.**

Tableau 3. *Composés aromatiques des huiles essentielles des écorces d'agrumes*

([a]Huet, 1991; [a, b, c]Hosni et al., 2010 ; [a]Farhat et al., 2011).

Substance aromatique	**% d'huiles essentielles**		
	Orange[a]	**Mandarine[b]**	**Pamplemousse[c]**
Monoterpènes			
α-pinène	0,21-0,45	0,61	0,15
β-pinène	0,04-1,82	1,55	1,52
Sabinène	0,10-0,60	0,34	0,19
Myrcène	0,03-2	0,03	0,03
Limonène	**94,88-97,3**	**92,6**	**95,40**
Terpinène	0,02-0,22	3,39	0,01
Terpinolène	<0,1	0,15	Nd
Sesquiterpènes			
Valencène	0,09-0,20	-	-
α -copaene	0,01-0,05	0,03	0,03
β-elemène	0,01-0,06	-	0,42
Composés carbonylés			
β-sinensal	<0,1	-	0,01
Nootkatone	<0,1		
Décanal	0,18-0,60	-	-
Nonanal	0,10-0,20		
Alcools			
Linalol	0,04-1	0,31	0,09
α –terpinéol	0,02-0,50	-	-
Terpinène-1-ol-4	0,01-0,20	-	-
Esters			
Acétat de néryles	<0,1	-	-
Acétate de géranyle	<0,1	-	-

Les hydrocarbures monoterpéniques sont les composés quantitativement les plus importants. Le limonène est le composé majoritaire dans les différentes variétés des écorces d'agrumes (92,6% pour la mandarine, 95,4% pour le pamplemousse et 94,88- 97,3% pour les oranges). Les autres hydrocarbures monoterpéniques présents en quantités importantes sont : le β-pinène (0,04-1,82%) et le myrcène (0,03-2%) pour les oranges, le β-pinène (1,55%), le terpinène (3,39%) pour la mandarine, le β-pinène (1,52%) et le sabinène (0,19%) pour le pamplemousse.

Concernant les hydrocarbures sesquiterpènes, on trouve le valencéne (0,09-0,2%) pour les oranges, le α-copaène (0,01-0,05%) pour la mandarine et le β-elemène (0,42%) pour le pamplemousse. Les huiles essentielles des écorces d'agrumes contiennent aussi des composés carbonylés, des alcools (linalol), des esters et des aldéhydes.

❖ *Fibres*

Les écorces d'agrumes sont riches en fibres (13,9-78,66 g/100g bs) et surtout en fibres hydrosolubles (pectines). En effet, les teneurs en pectine varient selon la variété d'agrumes : 2,58-3,73% pour la mandarine, 6,52-13,00% pour le citron et 0,22-23,02% pour les oranges. Le **tableau 4** récapitule la composition en fibres des écorces d'agrumes. Les écorces d'agrumes contiennent aussi des fibres insolubles (l'hémicellulose, la cellulose et la lignine). Les teneurs en lignine sont de l'ordre de 7,52% pour les oranges et de 13,54% pour la mandarine (Kratchanova et *al.,* 2004; Liu et *al.,* 2006; Marin et *al.,* 2007; Wang et *al.,* 2008), alors que pour la cellulose, c'est l'orange qui a la teneur la plus élevée par rapport à la mandarine et au citron respectivement 30,53% et 23,06%.

Tableau 4. *Composition en fibres des écorces d'agrumes.*

([a] Marin et al., 2007 ; [b]Wang et al., 2008, [c]Liu et al., 2006; [d]Kratchanova et al., 2004).

	Classes des fibres (% bs)			
Variété	**Pectine[a, b, c, d]**	**Lignine[a]**	**Cellulose[a]**	**Hémicellulose[a]**
Mandarine	2,58-3,73	13,54	30,53	11,04
Citron	6,52-13,00	7,56	23,06	8,09
Orange	0,22-23,02	7,52	37,08	11,04

Quant à l'hémicellulose, l'orange et la mandarine ont la même teneur (11,04%) (Marin et *al.,* 2007). Ainsi l'orange est l'agrume contenant le plus de fibres alimentaires, suivie de la mandarine et du citron.

❖ *Minéraux*

Les écorces d'agrumes sont riches en minéraux majeurs (Ca, Mg, K, Na) et quelques minéraux mineurs (Zn, Fer, Cu). Ces teneurs varient selon la variété considérée d'agrumes (**Tableau 5**). Selon Kammoun et *al.* (2011) les oranges Maltaise sont riches surtout en calcium (1201,21 mg/100g bs) et en potassium (220,40 mg/100g bs) alors que les mandarines sont, essentiellement, riches en potassium (641-831 mg/100g bs) (Xu et *al.,* 2008). Concernant les éléments mineurs, on remarque que les oranges « Maltaise » contiennent des

concentrations appréciables en zinc, en cuivre et en fer (1,86; 1,13; 1,58 mg/100g bs) par rapport à la mandarine qui en contient respectivement 0,42; 0,31; 2,67 mg/100g.

Tableau 5. *Composition en minéraux des écorces d'agrumes.*

([a]Kammoun et al., 2011; [b] Ghanem et al., 2012; [c]Xu et al., 2008).

Minéraux	Teneurs (mg/100g bs)			
	Orange Maltaise[a]	**Orange Thompson[b]**	**Mandarine[c]**	**Citron[b]**
Potassium	220,40	816,24	641-831	527,93
Sodium	312,89	148,28	-	188,00
Calcium	1201,21	485,73	363-584	747,36
Magnésium	156,77	111,09	63-104	182,08
Zinc	1,86	1,43	0,42-2,82	8,61
Cuivre	1,13	1,58	0,31-2,26	1,19
Fer	1,58	7,96	2,67-9,38	7,87

I.1.1.6. Propriétés fonctionnelles des composés non phénoliques des écorces d'agrumes et leurs utilisations

Le **tableau 6** récapitule les principales propriétés fonctionnelles des composés ***non phénoliques*** des écorces d'agrumes (les caroténoïdes, les fibres et les huiles essentielles).

- *Utilisation alimentaire*

Dans la cuisine tunisienne, les écorces fraîches ou sous forme de poudre de *Citrus sinensis* sont utilisées pour aromatiser le thé et pour la préparation de certains plats traditionnels ou gâteaux.

Les fibres des écorces d'agrumes sont naturellement associées avec des composés bioactifs (composés phénoliques, vitamine C) ce qui leur confère des propriétés fonctionnelles multiples. Plusieurs études ont porté sur l'extraction des fibres des écorces d'agrumes (Fernandez-Lopez et *al.,* 2004; Marin et a*l.,* 2007; Bicu et *al.,* 2011; Wang et *al.,* 2014) pour les utiliser dans la formulation des aliments diététiques. La pectine commerciale est extraite dans la plupart des cas des agrumes (le pamplemousse, le citron et l'orange) et aussi des pommes (Wang et *al.,* 2008). La pectine est utilisée en industries agroalimentaires grâce à son pouvoir épaississant, texturant mais aussi pour son pouvoir gélifiant et stabilisant. La pectine est utilisée dans plusieurs formulations (produits laitiers, préparations à base de fruits, crèmes glacés, produits à base émulsionnée, confiture et gelées) (Hawthorne *et al.,* 2000).

Tableau 6. *Propriétés fonctionnelles et domaines d'utilisation des composés non phénoliques des écorces des agrumes.*

Composé	Famille	Propriété associée	Utilisation	Références
Caroténoïdes	Pigments	-Propriété organoleptique : colorant. -Activité thérapeutique : Diminution du risque du cancer, de la dégénérescence musculaire, des brûlures de la peau et des maladies cardiovasculaires.	-Préparations alimentaires et pharmaceutiques.	Wang et *al.,* 2008 Meléndez-Martínez, 2007
Monoterpénes, alcools, esters et composés carbonylées	Huiles essentielles	-Propriétés aromatisantes.	-Industrie agro-alimentaire (boissons rafraîchissantes, crèmes glacées). -Industrie pharmaceutique. -Industries cosmétiques.	Bousbia et *al.,* 2009 Hosni et *al.,* 2010 Viuda-Martos et *al.,* 2008 ; Virot et *al.,* 2008 ; Chutia et *al.,* 2009
Limonène		-Propriétés thérapeutiques : ralentissement du développement des cellules cancéreuses responsable du cancer du sein. -Utilisation comme solvant dans de nombreux produits de nettoyage tels que les dégraissants, les agents de démoulage et les solutions de trempage. -Production du plastique biodégradable.	-Préparations pharmaceutiques. -Industries chimiques.	Li et *al.,* 2006; Farhat et *al.,* 2011; Sahraoui et *al.,* 2011 Lohrasbi et *al.,* 2010 Byrne et *al.,* 2004.
Linalol, citral		-Activité antibactérienne contre *Campylobacter jejuni, E.coli, L.monocytogenes et Bacillus cereus.* -Inactivation des bactéries de surface (biofilms).	-Industries alimentaires.	Fisher & Phillips, 2006; Fisher & Phillips, 2008; Ledesma-Escobar & Luque de Castro, 2014; Lin et *al.,* 2010
Citral		-Activité fongicide contre le *Penicillium digitatum* et *Aspergillus niger.*		Virot et *al.,* 2008; Chutia et *al.,* 2009; Singh et *al.,* 2010
Fibres hydrosolubles (pectine	Fibres	-Épaississant, texturant, gélifiant et stabilisant. -Fabrication des suspensions pharmaceutiques, des médicaments de détoxification et anti-diarrhéiques. -Agent anticancéreux, réduction du cholestérol.	-Industries agroalimentaires (produits laitiers, crèmes glacés et produits à base émulsionnés, confitures et gelées). -Industries pharmaceutiques.	Hawthorne *et al.,* 2000 ; Fernandez-Lopez et *al.,* 2004 ; Liu et *al.,* 2003; Piriyaprasarth & Sriamornsak, 2011 Maxwell et *al.,* 2012; Wang et *al.,* 2014
Fibres insolubles (cellulose, hémicellulose, lignine)		-Activité thérapeutique : favorise la croissance de la flore intestinale, améliore la digestion et facilite le transit intestinal. -La cellulose utilisée dans la production de la pâte à papier, ou de matière première pour les dérivés de cellulose.	-Préparations alimentaires et pharmaceutiques.	Larrauri et *al.,*1996 ; Kratchanova et *al.,* 2004 ; Zia-ur et *al.,* 2006; Liu et *al.,* 2006 ; Marin et *al.,* 2007; Ververis et *al.,* 2007
Glucides		-Production du biocarburant (éthanol) et du biogaz.	-Industries chimiques.	Wilkins et *al.,* 2007; Pourbafrani et *al.,* 2010 ; Lohrasbi et *al.,* 2010

Grâce à leur pouvoir adsorbant de l'eau, les fibres consommées gonflent dans l'estomac et l'intestin et jouent le rôle de coupe-faim en procurant une sensation de satiété. Les fibres insolubles facilitent le transit intestinal, tandis que les fibres solubles favorisent la croissance de la flore intestinale et améliorent par la suite la digestion. La consommation des fibres réduit le risque des maladies cardiovasculaires, du cancer du côlon et de l'obésité. Les fibres des écorces d'agrumes acquirent ainsi tous les vertus des probiotiques et sont des applications potentielles en alimentation fonctionnelle (Chau & Huang, 2004 ; Kang et *al.,* 2006 ; Marin et *al.,* 2007; Wang et *al.,* 2008 ; Kammoun et *al.,* 2011).

- *Utilisation en produits pharma et para pharmaceutiques*

Les extraits naturels des écorces sont également l'un des intrants de l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments, de savons, de parfums et autres produits cosmétiques. De plus, les écorces d'agrumes sont riches en limonène, qui est employé dans la formulation de solvants industriels mais aussi comme solvant biologique (Lohrasbi et *al.,* 2010). Le linalol et le citral extraits des écorces de pamplemousse et d'orange douce ont des effets antibactériens contre *Campylobacter jejuni, E.coli, L.monocytogenes et Bacillus cereus.* Le citral est un composé actif aussi contre le *Penicillium digitatum* et *Aspergillus niger.* Pour ces raisons, les huiles essentielles peuvent être utilisées comme une alternative aux fongicides synthétiques (Tian et *al.,* 2001; Fisher & Phillips, 2006; Fisher & Phillips, 2008; Virot et *al.,* 2008; Chutia et *al.,* 2009; Singh et *al.,* 2010).

- *Autres utilisations*

La cellulose est aussi utilisée dans la production de la pâte à papier ou comme matière première pour les dérivés de cellulose (Ververis et *al.,* 2007). Les écorces d'agrumes sont également utilisées dans les réactions biochimiques telles que la production du plastique biodégradable par la copolymérisation de limonène extrait des écorces d'agrumes et le dioxyde de carbone (Byrne et *al.,* 2004). La richesse des écorces d'agrumes en sucres a permis aussi leur utilisation pour la production de biocarburants (éthanol), des biogaz, obtenus par hydrolyse enzymatique, suivi par une fermentation en utilisant *Saccharomyces cerevisiae*. Ce procédé nécessite initialement l'enlèvement du *D*-limonène des écorces d'agrumes car il est extrêmement toxique pour l'activité biologique des microorganismes et inhibe le procédé de la digestion anaérobique. Le limonène récupéré est ensuite utilisé dans plusieurs applications comme il a été précédemment discuté (Wilkins et *al.,* 2007; Pourbafrani et *al.,* 2010 ; Lohrasbi et *al.,* 2010).

La pectine peut être utilisée dans la fabrication des suspensions pharmaceutiques (Piriyaprasarth & Sriamornsak, 2011), des médicaments de détoxification et anti-diarrhéiques (Liu et *al.,* 2003; Fernandez-Lopez et *al.,* 2004). La pectine permet de réduire le niveau de cholestérol (Wang et *al.,* 2014) et se présente aussi comme agent anticancéreux (Maxwell et *al.,* 2012).

I.1.2. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires synthétisés par les végétaux, non essentiels à la survie de la plante. Au niveau végétal, les composés phénoliques sont un moyen de défense contre le rayonnement U.V, les agressions par les pathogènes et ils contribuent à la pigmentation des plantes (Manach et *al.,* 2004; Ignat et *al.,* 2011). Ils sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique et d'un ou plusieurs groupements phénoliques dans leur structure (**Figure 2**) et se différencient par le nombre et l'enchaînement des noyaux aromatiques, le nombre et la position des groupes hydroxyles ainsi que la présence de divers substituant (groupes alkyles, glygosyles, acides organiques…) (Macheix et *al.,* 2006; Hollman et *al.,* 2010).

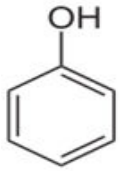


Figure 2. *Structure du phénol*

I.1.2.1. Principaux composés phénoliques des écorces des agrumes

On retrouve principalement deux classes de composés phénoliques dans les écorces d'agrumes : les flavonoïdes et les acides phénoliques.

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire possédant un squelette carboné en C_6-C_3-C_6. Ils sont constitués d'un squelette à 15 atomes de carbone (**Figure 3**) formant 2 noyaux aromatiques (A et B) et un hétérocycle (C) à oxygène dont la nature définit l'appartenance du flavonoïde à un groupe déterminé (Erdman et *al.,* 2007; Ignat et *al.,* 2011). Les principaux groupes de flavonoïdes présents dans les écorces d'agrumes sont les flavanones, les flavones et les flavonols. Chaque groupe comprend lui-même de nombreux composés qui différent selon le degré d'hydroxylation et de glycosylation.

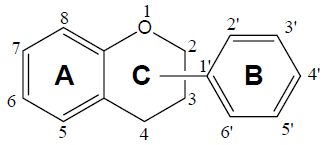


Figure 3. *Structure de base des flavonoïdes (Erdman et al., 2007).*

- **Flavanones**

Les flavanones sont rarement présents dans les fruits exceptés dans les agrumes où on les retrouve en grande quantité, concentrées dans les écorces (Tomas-Barberan et Clifford, 2000). Les flavanones les plus abondantes dans les écorces sont la naringine, l'hespéridine (**Tableau 7**).

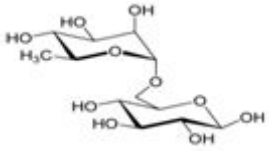
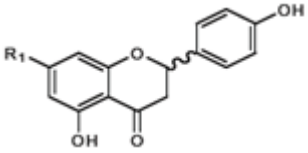
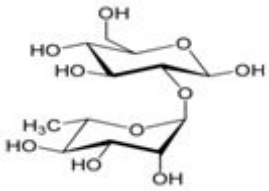
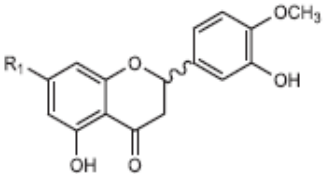
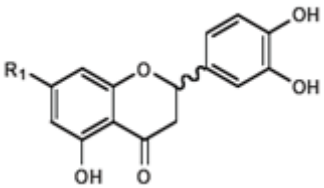
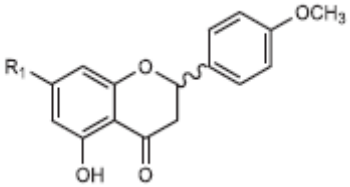
Sucres	*Aglycones*	*Glycosides*
 Rutinose 6-O-α-L-rhamnosyl-D-glucoside	 Naringenine (R_1= OH)	Narirutine R_1 = rutinoside Naringine R_1 = néohespéridoside
 Néohesperidose 2-O- α-L-rhamnosyl-D-glucoside	 Hesperetine (R_1= OH)	Hespéridine R_1 = rutinoside Néohespéridine R_1 = néohespéridoside
	 Eriodictyol (R_1= OH)	Eriocitrine R_1 = rutinoside Néoeriocitrine R_1 = néohespéridoside
	 Isosakuranetine (R_1= OH)	Didymine R_1 = rutinoside Poncirine R_1 = néohespéridoside

Figure 4. *Flavanones aglycones et leurs glycosides respectifs (Khan et al., 2014).*

Ces flavanones sont toutes glycosylées soit par du rutinose (6-*O*-α-L-rhamnosyl-D-glucose) soit par de la néohespéridose (2- O-α-L-rhamnosyl-D-glucose) liés en position 7 (Tomas-Barberan et Clifford, 2000) (**Figure 4**). L'hespéridine (0,002 à 9,42 mg/g bs) (Wang *et al.,* 2008; Russo et *al.,* 2014) est le principal flavanone dans tous les cultivars de citron tandis que les taux du diosmine et de l'eriocitrine sont les plus faibles (Del-Rio et *al.,* 2004). Les écorces de mandarine sont riches en hespéridine (3,95 à 80,90 mg/g bs) (Tumbas et *al.,* 2010; Hayat et *al.,* 2010), en narirutine (7,66 à 15,3 mg/g bs) (Xu et *al.,* 2008; Cheigh et *al.,* 2012) et en naringine (0,54 à 0,65 mg/g bs) (Tumbas et *al.,* 2010; Hayat et *al.,* 2010).

Tableau 7. *Teneurs en flavonoïdes des écorces d'agrumes (mg/g bs).*

Variété de citrus	NER	HES	NEH	NAT	NAR	NOB	TAN	SIN
Mandarine		58,40[a]	0,11[f]	13,20[e]	0,65[d]	14,05[a]	7,99[a]	0,29[f]
	-	62,00[c]		7,66[c]	0,54[f]	0,31[c]	0,16[c]	
		58,80[e]		15,30[i]	-	0,20[e]	-	
		80,90[i]		-	-	-	-	
		3,95[d]		-	-	-	-	
		72,00[m]		11,70[m]	-	-	-	
Orange	0,38[b]	29,50[f]	0,66[b]	0,03[b]	1,1[b]	-	-	0,22[f]
		20,70[f]	0,09[f]	0,36[f]	-			
		0,06[b]	-	-	-			
		66,09[j]	-	-	1,28[j]			
		35,20[o]	7,90[o]	26,90[o]	5,10[o]			
Citron	0,5[b]	9,42[f]	0,40[b]		0,45[b]	-	-	0,08[f]
	6,12[g]	0,002[h]	0,16[f]	-	1,51[f]			
	-	-	4,37[g]		6,06[g]			
	-	-	-		0,08[h]			
Pamplemousse	-	2,84[j]		0,71[j]	10,26[j]	-	-	-
		-		-	14,40[n]			
Citrus depressa	-	4,670[k]	0,05[k]	0,39[k]	0,11[k]	-	-	-

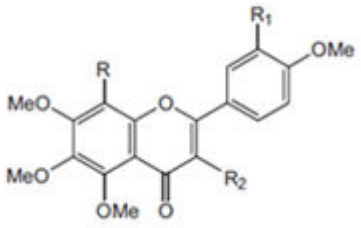
NER : neoeriocitrine ; HES : hespèridine ; NEH : néohespèridine ; NAT : narirutine ; NAR : narirutine ; NOB : nobiletine ; TAN : tangeretine ; SIN : sinensetine ; DIO : diosmine ; LUT : luteoline ; RUT : rutine ; QUR : quercetine ; KAE : kaempferol ; [(a)] Li et *al.,* 2012 ; [(b)] Cheynier et *al.,* 2006 ; [(c)] Xu et *al.,* 2008 ; [(d)] Hayat et *al.,* 2010 : [(e)] Inoue et *al.,* 2010 ; [(f)] Wang et *al.*, 2008 ; [(g)] Bocco et *al.,* 1998 ; [(h)] Russo et *al.,* 2014 ; [(i)] Tumbas et *al.,* 2010 ; [(j)] Goulas et *al.,* 2012 ; [(k)] Asikin *et al.,* 2012 ; [(l)] Khan et *al.,* 2010 ; [(m)] Cheigh et *al.,* 2012 ;[(n)] Giannuzzo et *al.,* 2003 ; [(o)] Swalha et *al.,* 2009.

La naringine, conférant un goût amer caractéristique du pamplemousse et de l'orange amère, est le flavonoïde le plus abondant dans les écorces de pamplemousse (10,26 à 14,40 mg/g bs) (Wang et *al.,* 2008; Giannuzzo et *al.,* 2003).

- *Flavones*

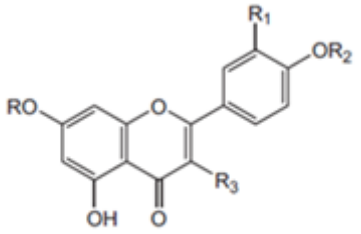
Les flavones sont caractérisés par la présence d'un groupement 4-oxo et d'une double liaison en position 2-3 (**Figures 5 et 6**).

Les écorces d'agrumes contiennent des flavones polyméthoxylés rares dans d'autres espèces (**Tableau 8)** telles que la sinensétine (0,08 à 0,29 mg/g bs), la nobiletine (0,2 à 14,05 mg/g bs), la tangérétine (0,16 à 7,99 mg/g bs) et l'hepta méthoxyflavone (Toledo-Guillén et *al.,* 2010; Gattuso et *al.,* 2007; Li et *al.,* 2012; Lee et *al.,* 2010). Les flavones glycosylés sont présents en faible quantités dans les écorces d'agrumes tels que la diosmine, la rhoifoline, l'isorhoifoline, la lutéoline.



Sinensetine	R= H, R_1= OMe, R_2= H
Nobiletine	R= R_1= OMe, R_2= H
Tangeretine	R= OMe, R_1= R_2= H
Heptamethoxyflavone	R_1= R_2= R_3= OMe

Figure 5. *Structure des flavones polyméthoxylés.*



Rutine	R= H, R_1= OH, R_2= H, R_3= O-rutinose
Isorhoifoline	R = rutinose, R_1= R_2= R_3= H
Rhoifoline	R = néohespéridose, R_1= R_2= R_3= H
Diosmine	R = rutinose, R_1= OH, R_2= Me, R_3= H

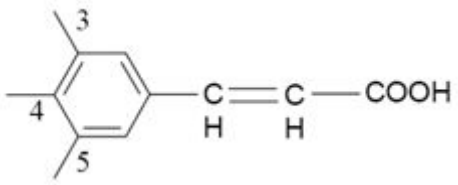
Figure 6. *Structure des flavones.*

❖ *Autres flavonoïdes*

D'autres flavonoïdes sont présents en très faibles quantités dans les écorces d'agrumes tels que les flavonols (quercétine, rutine, myricétine, kaempférol) et les anthocyanes. La quercétine et le kaempférol sont les flavonols les plus fréquemment trouvés dans les écorces d'agrumes. Les anthocyanes sont d'une importance mineure dans les agrumes et sont connus seulement en tant que constituants des oranges sanguines (Cheynier et *al.,* 2006; Zhang, 2007).

- **Acides phénoliques**

Dans les écorces d'agrumes, les acides phénoliques sont principalement représentés par les acides hydroxycinnamiques ; les acides hydroxybenzoiques qui sont peu répandus. Les acides hydroxycinnamiques sont des dérivés de l'acide cinnamique, constitués d'un noyau phénolique de type C_6-C_3 (**Figure 7**).



Composé	3	4	5
Acide caféique	**OH**	**OH**	**H**
Acide férulique	**OCH_3**	**OH**	**H**
Acide p-coumarique	**H**	**OH**	**H**
Acide sinapique	**OCH_3**	**OH**	**OCH_3**

Figure 7. *Acides hydroxycinnamiques des écorces d'agrumes.*

Le **Tableau 8** présente les teneurs en acides hydroxycinnamiques des écorces d'agrumes exprimées en µg/g bs.

Tableau 8. *Teneurs en acides hydroxycinnamiques des différentes variétés des écorces d'agrumes (µg/g bs).*

Citrus	Acide caféique	Acide p-coumarique	Acide férulique	Acide sinapique
Orange	95,00±0,80[a]	279±2,50[a]	392,00±4,00[a]	349±3,10[a]
	12,60±1,21[b]	229,1±1,21[b]	45,30±0,40[b]	44,90±1,62[b]
	229,00± 0,02[d]	193±0,01[d]	1580,00±0,13[d]	954±0,027[d]
Pamplemousse	56,00±0,50[a]	131±1,30[a]	323,00±3,10[a]	319±30[a]
Mandarine	3,06±0,03[b]	346,00±2,45[b]	150±4,89[b]	94,20±1,22[b]
	143,70±5,00[c]	299,70±6,20[c]	2755,60±43,70[b]	194,90±14,90[c]
	50,90±0,50[e]	97,90±1,20[e]	1187,60±5,30[e]	218,20±2,20[e]
	57,01±2,10[f]	106,80±1,20[f]	1299,50±88,00[f]	155,60±6,70[f]
Citron	142±1,30[a]	349,00±3,40[a]	4419±4,20[a]	421±4,10[a]
	80,00±3,72[b]	264,10±4,19[b]	59,1±0,93[b]	59,60±0,47[b]
	31,00±0,90[g]	-	46±0,50[g]	60±1,40[g]
Bergamote	6,00±0,00[d]	71,00±0,01[d]	36±0,008[d]	30±0,007[d]

[(a)] Gorinstein et *al.,* 2001; [(b)] Wang et *al.,* 2008; [(c)] Xu et *al.,* 2008 ; [(d)] Bocco et *al.,* 1998 ; [(e)] Ma et *al.*, 2009 ; [(f)] Hayat et *al.,* 2009 ; [(g)] Russo et *al.,* 2014.

Les acides hydroxycinnamiques présents dans les écorces d'agrumes sont : l'acide caféique (3,06-229,00 µg/g bs), l'acide sinapique (30,00-954,00 µg/g bs), l'acide p-coumarique (71,00-349,00 µg/g bs) et l'acide férulique (36,00-4419,00 µg/g bs) (Gorinstein et *al.,* 2001; Wang et *al.,* 2008; Xu et *al.,* 2008 ; Bocco et *al.,* 1998 ; Ma et *al.*, 2009; Hayat et *al.,* 2009; Russo et *al.,* 2014). L'acide férulique est l'acide phénolique le plus abondant des écorces d'agrumes alors que l'acide caféique se trouve en faible quantité (Bocco *et al.,* 1998; Ma et *al.,* 2009; Hayat et *al.,* 2009). Par contre, Wang et *al.* (2008) ont montré en étudiant 8 variétés d'agrumes que l'acide phénolique le plus abondant est l'acide p-coumarique.

Le profil en acides phénoliques des différentes variétés d'agrumes est le même, mais ce sont les teneurs qui varient d'une variété à une autre. Cette différence peut être expliquée par de nombreux facteurs comme la région de culture, les conditions climatiques, l'état de maturité du fruit et la variété des agrumes.

I.1.2.2. Propriétés des composés phénoliques

Les composés phénoliques, de par leur structure phénolique, sont des agents réducteurs capables de réagir avec les radicaux libres produits par notre organisme. Les composés phénoliques, apportés par l'alimentation, renforceraient les défenses antioxydantes de l'organisme en captant les radicaux libres et protégeraient les lipides, les protéines et l'ADN des dommages oxydatifs. Cependant, une fois ingérés, les composés phénoliques sont métabolisés, les modifications structurales peuvent alors entraîner des variations de leurs activités (Koga & Meydani, 2001; Turner et *al.*, 2004). Les composés phénoliques peuvent agir en tant qu'antioxydants de différentes manières.

- *Le piégeage direct des radicaux libres*

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres oxygénés (X) par transfert d'un électron ou d'un hydrogène. Le radical aryloxyle formé est stabilisé par résonance.

L'électron non apparié peut se délocaliser sur l'ensemble du cycle aromatique. Mais, il peut continuer à évoluer selon plusieurs processus (dimérisation, dismutation, recombinaison avec d'autres radicaux, réduction en molécule parent, oxydation en quinone) soit en réagissant avec des radicaux ou d'autres antioxydants, soit avec des biomolécules. L'activité antiradicalaire des phénols a été corrélée avec le potentiel d'oxydation des flavonoïdes (Van Acker et *al.,* 1996).

- *Chélation des ions métalliques (Fe^{3+}, Cu^{+})*

Le pouvoir antioxydant des flavonoïdes peut s'exercer par la complexation des métaux de transition. En effet, ces derniers accélèrent la formation d'espèces oxygénées réactives. Par ailleurs, la complexation des flavonoïdes par des métaux de transition peut améliorer leur pouvoir antioxydant en diminuant leur potentiel d'oxydation (Van Acker et *al.,* 1996*,* Afanas et *al.,* 2001).

- *Inhibition d'enzyme*

Les flavonoïdes sont connus par leur pouvoir d'inhibition d'enzyme dont, en particulier, les oxydo-réductases qui font intervenir au cours de leur cycle catalytique des espèces

radicalaires (lipoxygénase, cyclo-oxygénase, monoxygénase, xanthine oxydase, phospholipase A2, protéine kinase…) (Van Acker et *al.,* 1996).

- *Régénération des antioxydants liés aux membranes comme l'α-tocopherol*

Les éléments structuraux nécessaires à l'obtention d'une activité antioxydante optimale ont été établis par plusieurs auteurs (Van Acker et *al.,* 1996, Sroka, 2005, Aliaga & Lissi, 2004) (**Figure 8**).

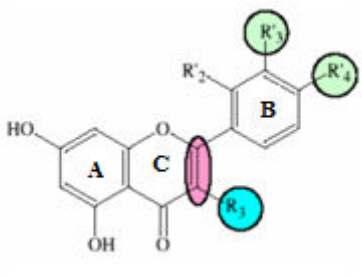


Figure 8. *Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Chebil, 2006).*

- Il s'agit de (Rice-Evans et *al.,* 1996):

- *La présence d'une fonction catéchol sur le cycle B*

La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Les radicaux phénoxy sont stabilisés par la présence d'un hydroxyle en ortho de celui qui a cédé son atome d'hydrogène. En effet, cette stabilité résulte de la délocalisation de l'électron non apparié et de la formation d'une liaison hydrogène.

- *La présence d'un motif énone dans le cycle C*

La double liaison entre C2 et C3 et la fonction carbonyle en C4 permet une délocalisation électronique stabilisante du radical phénoxy.

- *la présence de groupement hydroxyle en position 3*

La glycosylation ou la méthylation de l'hydroxyle en position 3 des flavonols conduit à une diminution importante de l'activité antioxydante.

Cet effet est moins marqué lorsque les autres groupements phénoliques sont substitués. La présence d'un groupement hydroxyle en position 3 renforce donc les propriétés antioxydantes dans le cas où le cycle C est insaturé (Heim et *al.,* 2002).

En fonction du mécanisme de l'activité antiradicalaire étudiée, quelques différences dans les relations structure-activité ont été observées comme il a été rapporté par Chebil (2006) (**Tableau 9**).

Tableau 9. *Effet de la structure sur les activités antioxydants des flavonoïdes (Chebil, 2006).*

Activité	Facteurs améliorant le pouvoir antioxydant
anti-radicalaire	▪ le nombre de groupements OH disponibles ▪ la méthylation a des effets variables et son effet esr difficile à quantifier ▪ les structures possédant une double liaison C_2-C_3 et un seul OH en position 4' ▪ une fonction catéchol sur le cycle B ▪ la présence du C4'-OH
Complexation métallique	▪ la présence d'une fonction carbonyle en C_4 et de groupe hydroxyle en C_5 et/ou C_3 ▪ la présence d'une partie catéchol ▪ la présence d'un sucre a peu d'effet

Grâce à leur pouvoir antioxydant, les composés phénoliques sont utilisés dans plusieurs domaines (**Tableau 10)**. Plusieurs études proposent le remplacement des antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyansol (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT) par des antioxydants naturels à cause de leur toxicité impliquée dans la promotion du développement des cellules cancéreuses (Moure et *al.,* 2001).

Tumbas et *al.* (2010), ont montré que la poudre des écorces de mandarine, contenant de l'hespéridine (80,9 mg/g) et de la narirutine (15,3 mg/g), a une activité antioxydante meilleure que celle de l'antioxydant synthétique BHA. Cette étude a confirmé que les écorces ont un effet protecteur contre la peroxydation des lipides que ce soit dans de l'huile de tournesol stockée 24 jours à température élevée ou dans des biscuits.

Il a aussi été montré que l'ajout de la poudre des écorces de mandarine (à raison de 10%) ne présente pas d'effet sur les propriétés organoleptiques du produit (Anagnostopoulou et *al.,* 2006; Peschel et *al.,* 2006) et que cet ajout permet la diminution du taux de cholestérol des personnes ayant ingéré ce produit (Zia-ur-Rehman, 2006). Le même résultat a été évoqué par Abd El-aal et *al.* (2009) qui ont constaté que la poudre des écorces d'orange inhibe la peroxydation de l'huile de soja à 65 °C deux fois plus que le BHT et le BHA.

Les écorces d'agrumes ont aussi été utilisées pour produire l'hespéridine et de la néohespéridine nécessaires pour la synthèse de dihydrochalcones à pouvoir sucrant (Cheynier et *al.,* 2006, Frydman *et al.,* 2005, Ortuno et *al.,* 2006).

Tableau 10. *Propriétés fonctionnelles et domaines d'utilisation des composés phénoliques des écorces d'agrumes.*

Composé	Famille	Propriété	Application	Références
Hespéridine	Flavanones	- Activité antivirale. -Activité antimicrobienne modérée contre *Salmonella typhi* et *S. typhimurium.* - Activité antiallergique via l'inhibition de la libération de l'histamine. - Réduction du risque du cancer du tube digestif. - Activité sédative. - Activité hypoglycémiante par la régulation du métabolisme du glucose. - Atténuation des anomalies de la rétine et du plasma. - Activité anti-obésité.	- Préparations pharmaceutiques. -Industrie agro-alimentaire.	Kaul et *al.,* 1985 Kawaguchi et *al.,* 2004 Matsuda et *al.*, 1991 Scalbert et *al.,* 2005 Choi et *al.,* 2011
Eriocitrine		- Utilisé dans plusieurs complexes multivitaminés. - Maintien de l'intégrité et de la circulation périphérique. - Stabilité élevée durant le traitement et le stockage.		Del Rio et *al.,* 2004
Naringine		- Réduction du niveau du cholestérol dans le plasma. - Réduction du risque de l'athérosclérose. - Protection du niveau de vitamine E dans le plasma. - Amélioration du métabolisme de l'éthanol. - Exhausteur de goût (goût amer) pour les bonbons, les boissons et les produits de boulangerie. - Stabilisant d'huile (activité antioxydante et antimutagène).		Giannuzzo et *al.,* 2003 Nogata et *al.,* 2006 Zhang et *al.,* 2007
Nohespéridine		- Synthèse des dihydrochalcones (édulcorants)		Frydman et *al.*, 2005 Ortuno et *al.,* 2006
Nobiletine, tangeretine, sinensetine	Flavones polyméthoxylés	-Activité anti-inflammatoire: activation de l'énergie vitale, la circulation sanguine et disperse la stagnation physique.	- Préparations pharmaceutiques.	Ho et *al.,* 2008; Huang et *al.,* 2010 ; Li et *al.,* 2012
Diosmine	Flavones glycosylés	-Ingrédient actif de certains médicaments (maladie de l'appareil circulatoire). -Amélioration du tonus musculaire et de la résistance vasculaire à des processus inflammatoires (veineuse chronique et l'arthrite rhumatismale).		Del Rio et *al.,* 2004
Anthocyanes	Phénols	-Propriété organoleptique : colorant.	-Industrie agroalimentaire (confiseries, produits lactés et desserts).	Mackeix et *al.,* 2006

La naringine est utilisée pour aromatiser les boissons, les bonbons et les produits de boulangerie, en raison de son goût amer typique (Giannuzzo et *al.,* 2003). En outre, les anthocyanes sont utilisés dans l'industrie alimentaire comme colorants (E163) dans la confiserie, les produits laitiers et les desserts ou pour compenser la décoloration des fruits induite par certaines étapes de traitement (Mackeix et *al.,* 2006). Les flavonoïdes d'agrumes (les flavanones et des flavones polyméthoxylés) se sont révélés avoir des propriétés intéressantes pour le domaine pharmaceutique. Ces composés grâce à leurs propriétés participent à la prévention de certaines maladies telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, l'ostéoporose, le diabète et les maladies neurodégénératives (Bocco et *al.,* 1998).

Les composés phénoliques extraits des écorces sont principalement utilisés comme antioxydants naturels dans la formulation des produits pharmaceutiques, en industrie agro-alimentaire mais aussi dans d'autres applications industrielles en tant qu'inhibiteur de la corrosion, dans les matériaux de construction navale, dans les réactions biochimiques comme la production de biocarburants et de plastique biodégradable (Wilkins et *al.,* 2007; Pourbafrani et *al.,* 2010 ; Lohrasbi *et al.,* 2010), dans l'industrie de raffinage du pétrole brut, dans le décapage à l'acide, le nettoyage industriel, le détartrage acide, et aussi dans les procédés pétrochimiques (Abiola & James, 2010 ; Hussin et *al.,* 2011). Les propriétés inhibitrices que peuvent présenter les composés phénoliques seront discutées dans le chapitre 3 de la revue bibliographique.

Conclusion

Les écorces d'agrumes sont riches en eau (60% à 75%), rendant le produit hautement périssable et causant le développement rapide des moisissures s'il n'est pas rapidement utilisé ou conservé. Ces écorces sont aussi riches en ingrédients nutritionnels comme les sucres solubles (6,52-47,81 g/100g bs), les protéines (1,79-9,06 g/100g bs) et les minéraux (2,52-10,03 g/100g bs).

Ceci explique leur utilisation en alimentation du bétail soit sous forme brute, soit après transformation en mélasse ou comme (Bocco et *al.,* 1998) fertilisant pour le sol (Manthey & Grohmann, 1996).

Les écorces d'agrumes sont aussi riches en ingrédients fonctionnels comme les huiles essentielles (0,6 à 1%), les fibres (6.30-82.69 g/100g bs), les composés phénoliques (1,09-7,3 g/100g bs) et la vitamine C (0,92-1,94 g/100g bs).

Les composés phénoliques caractéristiques des agrumes sont les **flavanones** : l'hespéridine (0,002 à 80,90 mg/g bs), la néohespéridine (0,05 à 7,9 mg/g bs), la narirutine (0,03 à 26,5 mg/g bs), la naringine (0,08 à 14,40 mg/g bs) et la neoeriocitrine (0, 38 à 6,12 ± 0,07 mg/g bs). Les écorces d'agrumes contiennent aussi des **flavones polyméthoxylés** tels que la sinensetine (0,08-0,29 mg/g bs), la nobiletine (0,20-14,05 mg/g bs) et la tangeretine (0,16-7,99 mg/g bs). Les **flavonols et les acides hydroxicinnamiques sont présents en traces**. Grâce à leur activité antioxydante, ces composés sont utilisés dans plusieurs applications alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Nous ne disposons pas de données précises concernant la quantité de coproduits générés par la transformation industrielle des agrumes en Tunisie, mais à notre connaissance aucune valorisation industrielle de ce coproduit n'est actuellement effectuée.

L'extraction des composés phénoliques est une voie de valorisation de ces coproduits qui permet d'une part de développer une nouvelle activité économique et de participer au développement de la filière d'agrumes tout en minimisant l'impact environnemental de l'industrie du jus d'orange.

La problématique essentielle de cette valorisation est la préservation des activités biologiques des molécules à valoriser durant les étapes de transformation et d'extraction du fruit. En effet, les écorces d'agrumes sont une matière première sensible due à sa richesse en eau. De plus, les composés phénoliques sont sensibles à la température et la lumière ce qui peut entraîner la dégradation de leurs activités biologiques dans certaines conditions drastiques. Une étude comparative de différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes est présentée dans le chapitre 2. Cette synthèse bibliographique nous permettra de définir les méthodes et les conditions opératoires les plus appropriées pour l'extraction des composés phénoliques des agrumes.

I.2. Méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques des écorces d'agrumes

Introduction

L'extraction des composés bioactifs peut être décrite comme étant un phénomène de transfert de masse où les solides solubles, contenus dans les structures végétales, migrent dans le solvant jusqu'à l'équilibre. Il existe plusieurs méthodes d'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes comme l'extraction conventionnelle par solvant (Manthey & Grohmann, 1996 ; Jeong et *al.,* 2004; Anagnostopoulou et *al.,* 2006 ; Li et *al.,* 2006a; Zia-ur-Rehman, 2006 ; Xu et *al.,* 2007), l'extraction par eau chaude (Xu et *al.,* 2008), l'extraction assistée par enzymes (Li et *al.,* 2006b) et l'extraction par fluide supercritique (Giannuzzo et *al.,* 2003). La méthode d'extraction conventionnelle par solvant peut causer la dégradation des composés phénoliques à cause des températures élevées et de la durée d'extraction.

De nouvelles techniques combinant l'extraction conventionnelle avec d'autres facteurs accélérant l'extraction (extraction par micro-ondes, extraction par ultrasons, extraction sous haute pression hydrostatique, extraction par fluide supercritique ou par eau sous critique) (Chemat et *al.,* 2009 ; Rawson et *al.,* 2011) sont utilisées pour pallier cette dégradation. Certains auteurs suggèrent l'utilisation d'approches combinées appliquées de manière séquentielle telles que la technologie de chute de pression instantanée contrôlée et l'extraction assistée par ultrasons (DIC-UAE) ou de manière simultanée (extraction enzymatique assistée par ultrasons, extraction par fluide supercritique assistée par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes et ultrasons) pour intensifier l'opération d'extraction et améliorer le rendement d'extraction.

Dans ce chapitre seront présentées les caractéristiques des différentes méthodes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques des écorces d'orange.

I.2.1. Extraction conventionnelle par solvant (ECS)

L'extraction conventionnelle par solvant est la méthode la plus utilisée pour l'extraction des composés phénoliques. De nombreux paramètres d'extraction doivent être pris en compte pour l'optimisation de cette méthode: le type et la concentration du solvant organique, la température, le temps d'extraction et le nombre de cycles d'extraction.

❖ *Nature du solvant*

Plusieurs auteurs ont étudié l'effet de la nature du solvant sur le contenu phénolique des écorces d'agrumes. Le **tableau 11** résume les publications les plus récentes relatives à l'extraction conventionnelle par solvant des composés phénoliques des écorces d'agrumes.

Zia-ur-Rehman (2006) a montré que le rendement le plus élevé a été obtenu en utilisant le méthanol (19,87%), suivi par de l'acétone (15%), de l'éther de diéthyle (12,75%) et de l'éthanol (11,00%). Ce résultat a été confirmé par Goulas et *al.* (2012) qui ont testé l'efficacité d'extraction de trois solvants (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle) à partir de la pulpe de « Mandora ».

Tableau 11. *Conditions opératoires de l'extraction conventionnelle par solvant des composés phénoliques des écorces d'agrumes.*

Matrice	Composé	Solvants (ratio: m/v: g/ml)	T (°C)	Temps	Agitation	Références
Citrus	Phénols	Méthanol (10:100)	TA	24h	+	Ziu-ur-Rehman et *al.,* 2006
		Acétone (10:100)	TA	24h	+	
		Diethyl éther (10:100)	TA	24h	+	
		Ethanol (10:100)	TA		+	
Mandarine	Phénols	Ethanol (2:16)	80	3h	+	Li et *al.,* 2006a
	Hespéridine, Narirutine	Méthanol (10:300)	-	20h	+	Huang et *al.,* 2010
		Eau chaude (5:100)	100	30 min	+	Xu et *al.,* 2008
		Acétone (50 ml/g)	40	2h	+	Tumbas et *al.,* 2010
	Hespéridine Narirutine	Eau chaude (2:200)	90	3h	+	Cheigh et *al.,* 2012
		Ethanol (2:200)	79	3h	+	
		Méthanol (2:200)	65	3h	+	

TA: température ambiante, T: température (°C)

Le rendement en composés phénoliques obtenu était de 70,2%, 46,1% et 9,6% respectivement dans le méthanol, l'éthanol et l'acétate d'éthyle. Li et *al.* (2006a) ont trouvé que le rendement d'extraction des phénols totaux en utilisant du méthanol et de l'éthanol était similaire (m/v=2:16; 3h sous agitation, à 80°C). Cheigh et *al.* (2012) ont comparé l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes avec trois solvants: l'éthanol, le méthanol et l'eau chaude (rapport: m/v= 1:100; 3h avec agitation, 90, 65, 79°C). L'extraction par l'éthanol a donné la teneur la plus élevée en hespéridine (3,73 g/100 g bs), suivi par le méthanol (2,24 g/100 g bs) et l'eau chaude (0,21 g/100 g bs). Xu et *al.* (2008) ont étudié l'extraction des composés phénoliques des écorces de mandarine par l'eau chaude (m/v: 1:20; 30 min; 100°C; deux cycles d'extraction). Les auteurs ont rapporté que l'extrait obtenu par l'eau chaude a une teneur en phénols totaux similaire à celui obtenu en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction.

Les paramètres d'extraction conventionnelle par solvant utilisés dans la littérature sont différents (rapport masse/volume, le temps et la température d'extraction et le nombre d'extraction). Par conséquent, il est difficile de déterminer le solvant permettant l'obtention du rendement le plus élevé en composés phénoliques.

La plupart des auteurs ont constaté que le méthanol donne le rendement le plus élevé. Cependant, dans des applications industrielles, le méthanol n'est pas utilisé du fait de sa toxicité. Il est souvent remplacé par d'autres solvants organiques non toxiques et ayant des rendements d'extraction satisfaisants, tels que l'éthanol, le n-butanol, l'isopropanol ou l'éther de pétrole (Bartnick, 2006). En raison de son efficacité et de sa sureté, l'éthanol est le solvant le plus recommandé pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes pour des applications alimentaires et cosmétiques.

- *Concentration du solvant*

L'eau est généralement ajoutée au solvant d'extraction tel que l'éthanol ou le méthanol afin d'améliorer l'extraction des composés phénoliques polaires à partir des écorces d'agrumes. Une étude sur les valeurs théoriques de l'hydrophobicité (Log P) des composés phénoliques, ainsi que ceux de certains solvants organiques a montré que le méthanol et l'éthanol mélangés avec de l'eau, sont les solvants les plus appropriés pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes. Selon Li et *al.* (2006) 85% d'éthanol est la concentration optimale pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes. Les auteurs ont montré que la teneur en phénols totaux augmente avec l'augmentation de la concentration d'éthanol jusqu'à 85%, puis elle diminue.

Ce résultat a été confirmé par Tumbas et *al.* (2010) et Cheigh et *al.* (2012). Khan et *al.* (2010) ont conclu que la concentration optimale en éthanol pour l'extraction des flavanones des écorces d'orange est de 80%.

- *Température et temps de l'extraction*

Les combinaisons temps-température utilisées par différents auteurs pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes sont résumées dans le **tableau 11**. Ces deux paramètres sont inversement proportionnels : pour une courte durée d'extraction, des températures élevées sont utilisées, et vice versa.

Par exemple, Xu et *al.* (2008) ont effectué des extractions des composés phénoliques des écorces d'agrumes à 100°C pendant 30 min, tandis que Ziu-ur-Rehman et *al.* (2006) ont utilisé un temps d'extraction de 12h à température ambiante.

Le défi est de trouver la combinaison optimale de ces deux paramètres. En fait, la température est un accélérateur d'extraction, elle augmente la solubilité des composés phénoliques dans le solvant. Toutefois, en raison de la sensibilité des composés phénoliques à la chaleur, une température trop élevée peut conduire à leur décomposition et leur dégradation (Wang & Weller, 2006; Routray & Orsat, 2012).

- *Nombre de cycles d'extraction*

Le rendement d'extraction est limité par l'atteinte de l'équilibre, qui correspond à l'épuisement des composés phénoliques dans la matière végétale. En général, il est nécessaire de renouveler le solvant en utilisant le même volume afin de déterminer le rapport optimal (m/v). L'extraction répétée améliore le rendement d'extraction et réduit la durée du chauffage (Routray & Orsat, 2012). Une seule extraction (3h, rapport: m/v: 02:16, 80°C) (Li et *al.,* 2006a) ou une double extraction (rapport: m/v: 01:10, à température ambiante, pendant une nuit) (Ziu-ur-Rehman et *al.,* 2006) sont souvent utilisées.

- *Conclusion*

Le solvant le plus utilisé pour l'extraction conventionnelle par solvant des composés phénoliques des écorces d'agrumes est le mélange éthanol/eau à un pourcentage variant de 70 à 85%. Cette extraction peut être réalisée à une température de 25 à 100°C pendant 30 min à 24h. Il y a une très grande variabilité dans les travaux rapportés, par conséquent, il est difficile de généraliser.

I.2.2. Méthodes d'intensification de l'extraction conventionnelle par solvant

Diverses nouvelles techniques d'extraction ont été développées afin de disposer de méthodes d'extraction qui sont plus respectueuses de l'environnement, utilisant moins d'énergie et moins de solvant tout en produisant des rendements plus élevés.

Certaines de ces méthodes utilisent des accélérateurs de l'extraction par solvant tels que les micro-ondes ou les ultrasons, le fluide supercritique/sous-critique et aussi les hautes pressions.

Certains auteurs ont suggéré (i) une utilisation séquentielle de deux processus tels que la technologie de chute de pression instantanée contrôlée et l'extraction assistée par ultrasons ou (ii) une approche combinée (méthodes simultanées) comme l'extraction assistée par l'emploi d'enzyme afin d'intensifier l'opération d'extraction.

Le **tableau 12** présente une synthèse des paramètres d'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes par différentes méthodes.

Les caractéristiques ainsi que les avantages et limites des différentes techniques d'extraction seront discutés dans les sections suivantes. Une synthèse plus détaillée des caractéristiques des différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes a été présentée dans une revue par (M'hiri et *al.,* 2014) (**Annexe 2**).

I.2.2.1. Extraction assistée par ultrasons (EAU)

L'extraction assistée par ultrasons est une technologie émergente utilisée pour l'extraction des composés naturels. Ces composés sont souvent extraits par la méthode conventionnelle qui dure de nombreuses heures. L'utilisation des ultrasons permet d'effectuer des extractions en quelques minutes avec une reproductibilité élevée, ce qui simplifie l'opération et donne une plus grande pureté au produit final (Chemat et a*l.,* 2011). Les ultrasons interagissent avec le matériel végétal et modifient ses propriétés physiques et chimiques. Un effet de cavitation est créé, ce qui facilite la libération des composés extractibles et améliore le transfert de matière en perturbant les parois cellulaires des plantes (Chemat et *al.,* 2011). Le choix approprié du solvant et de la température permet une meilleure extractibilité des composés phénoliques. De plus, l'optimisation des paramètres d'extraction assistée par ultrasons tels que la fréquence, la puissance des ultrasons, le temps d'extraction ainsi que la distribution d'ondes ultrasonores permet aussi d'augmenter le rendement d'extraction (Wang & Weller, 2006).

- *Type et concentration du solvant*

Le méthanol et l'éthanol ont été utilisés en tant que solvants pour l'extraction assistée par ultrasons des composés phénoliques des écorces d'agrumes. Ma et *al.* (2008, 2009) ont rapporté que le méthanol (80%) est le solvant le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques à partir des écorces de *Citrus reticulata*, suivi par l'éthanol et l'isopropanol, tandis que Khan et *al.* (2010), Dahmoune et *al.* (2013) ont utilisé l'éthanol pour extraire l'hespéridine et la narirutine des écorces d'orange. Londono-Londono et *al.* (2010) ont utilisé l'eau pour extraire les flavonoïdes des écorces d'agrumes.

- *Température et temps d'extraction*

Généralement, une augmentation de la température d'extraction entraîne une augmentation du rendement d'extraction. La température doit être inférieure à la température du solvant pour éviter son évaporation.

Tableau 12. *Conditions opératoires des nouvelles méthodes d'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes.*

Matrix	Composé	Solvant (m/v:g/ml)	T (°C)	Temps	Agitation	Autres facteurs	Méthodes d'extraction
Mandarine	Hespéridine, narirutine	Eau (1:2)	160	10 min	-	Extracteur à solvant accéléré, 100 atm	Extraction par eau sous critique [1]
	Hespéridine	Méthanol (1:40)	40	60 min	+	Bain à ultrasons, 60 kHz	Extraction assistée par ultrasons [2]
		Méthanol (2:40)	30	40 min	+	Bain à ultrasons, 30W	Extraction assistée par ultrasons [3]
	Acides cinnamiques	Méthanol (2:40)	40	10 min	+	Bain à ultrasons, 30W	
	Acides benzoïques Flavones	Méthanol (10 ml/g)	160	20 min	+	Dionex EAS instrument équipé d'un contrôleur de solvant, 1500 psi	Extraction sous haute pression[4]
		Ethanol (2:20)	140	8 min	-	Extraction assistée par micro-ondes en système fermé	Extraction assistée par micro-ondes [5]
	Hespéridine	Eau (1:2)	135	3 min	-	Puissance micro-ondes: 400W	Extraction assistée par micro-ondes [6]
	Acides phenoliques	Méthanol (16)	-	49 s	-	Puissance micro-ondes: 152W	Extraction assistée par micro-ondes [7]
	Acides phénoliques Nobiletine, tangeretine	CO_2 supercritique modifié par 9,1% d'éthanol (85%)	80	-	-	30 MPa, débit du modificateur: 0,3 ml/min; débit du CO_2: 3,0 ml/min; taille des particules: 0,375 mm	Extraction par CO_2 supercritique [8]
Citrus	Flavonoïdes	Eau (1:10)	40	30 min	+	Bain à ultrasons, 60 kHz, utilisation du Ca $(OH)_2$	Extraction assistée par ultrasons [9]
	Phénols	Ethanol (1:50)	-	30 min	-	100 atm	Extraction sous haute pression [10]
	Flavones	Eau (0.1:10)	200	60 min	-	1.4MPa	Extraction par eau sous critique [11]
	Polyméthoxylés Phénols	Solution aqueuse d'enzyme (2:16)	50	3h	-	Enzyme utilisée: Celluzyme MX (1.5% du poids des écorces)	Extraction assistée par enzyme [16]
Orange	Hespéridine, naringine	Ethanol (0,25 g/ml)	40	30 min	-	Sonde à ultrasons, 150W	Extraction assistée par ultrasons [12]
	Flavonoides	CO_2 supercritique modifié par 23% d'éthanol	60	-	-	40 MPa	Extraction par CO_2 supercritique [13]
	Phénols totaux	-	-	60µs	-	20 pulses, 5 kV/cm	Champs électrique pulsé [17]
	Hespéridine	Eau (40:4)	-	30 min	-	5 bars	Technologie de chute de pression instantanée contrôlée et l'extraction assistée par ultrasons [18]
	Naringine	Ethanol (20:1)	40	60	-	150W	
Pamplemousse	Naringine	CO_2 supercritique modifié par 15% d'éthanol	58,6	45 min	-	95 bars	Extraction par CO_2 supercritique[14]
	Flavonoides	CO_2 supercritique modifié par de l'éthanol (85%)	80	49 min	-	39 MPa, débit de CO_2: 1.0 ml/min;	Extraction par CO_2 supercritique [15]
Citron	Phénols	Ethanol (28:1 ml/g)		123s	-	Puissance micro-ondes: 400W	Extraction assistée par micro-ondes [19]
		Ethanol (40ml/g)		15,05 min	-	Amplitude : 77,79%	Extraction assistée par ultrasons[19]

[1] Cheigh et al., 2012; [2] Ma et al., 2008; [3] Ma et al., 2009; [4] Li et al., 2012; [5] Inoue et al., 2010; [6] Jawad & Langrish, 2012; [7] Hayat et al., 2010; [8] Lee et al., 2010; [9] Londono-Londono et al., 2010; [12] Khan et al., 2010; [13] Toledo-Guillen et al., 2010; [14] Giannuzzo et al., 2003; [10] Wang et al., 2011; [11] Kim et al., 2009; [15] He et al., 2012; [16] Li et al., 2006a; [17] Luengo et al., 2013 [18] Allaf et al., 2013; Dahmoune et al., 2013.

Des températures élevées peuvent également entraîner une dégradation des molécules à extraire et donc une perte du composé désiré. Ma et *al.* (2008) ont étudié l'extraction assistée par ultrasons de l'hespéridine des écorces de *Citrus reticulata*. Les auteurs ont conclu que la température optimale pour l'extraction assistée par ultrasons était de 40°C pendant 60 minutes, car des températures plus élevées, au-delà de 50°C, les composés phénoliques deviennent instables. Ceci est cohérent avec les résultats antérieurs, Londono-Londono et *al.* (2010) et Khan et *al.* (2010) ont rapporté que les conditions optimales pour l'extraction assistée par ultrasons des composés phénoliques des écorces d'agrumes ont été 40°C pendant 30 min. Ma et *al.* (2009) ont également rapporté que les conditions optimales pour l'extraction des acides cinnamiques et benzoïques étaient 40 min à 30°C et 10 min à 40°C, respectivement. Ces résultats suggèrent que l'avantage de l'extraction assistée par ultrasons est de pouvoir effectuer l'extraction à des basses températures et pendant un temps d'extraction plus court que l'extraction conventionnelle par solvant.

- *Puissance des ultrasons*

Un effet positif sur le rendement en acides phénoliques de *Citrus unshiu Marc* a été observé avec une augmentation de la puissance des ultrasons de 3,2 à 30 W (Ma et *al.,* 2009). Au-dessus de 30 W, les auteurs ont observé une faible augmentation du rendement. Ma et *al.* (2008) ont conclu que la puissance optimale des ultrasons pour l'extraction de l'hespéridine des écorces de *Citrus reticulata* était aussi de 30 W. Cependant, Khan et *al.* (2010) ont testé trois puissances des ultrasons (50, 100, 150 W) pour l'extraction des flavanones des écorces d'orange et ont conclu que 150 W était la puissance optimale.

- *Conclusion*

L'extraction assistée par ultrasons appliquée aux écorces d'agrumes est réalisable à basse température (30-40°C) pendant une courte durée de 30 à 60 minutes, en utilisant soit le méthanol ou l'éthanol en tant que solvant d'extraction et en appliquant des puissances variant de 30 W à 150 W.

I.2.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'extraction assistée par micro-ondes est un processus par lequel l'énergie micro-onde accélère l'extraction. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales (Inoue et *al.,* 2010; Jawad & Langrish, 2012).

Au cours du traitement par micro-ondes, le chauffage provoque la rupture des liaisons hydrogène faibles par la rotation dipolaire des molécules.

Une quantité considérable de pression s'accumule à l'intérieur du biomatériau, qui modifie les propriétés physiques des tissus biologiques et améliore la porosité de la matrice biologique. Ceci permet une meilleure pénétration du solvant d'extraction à travers la matrice (Kratchanova et *al.,* 2004 ; Yeoh et *al.,* 2008) et facilite l'extraction des composés entre autre les composés phénoliques (Mandal et *al.,* 2007). Les principaux paramètres de l'extraction assistée par micro-ondes sont : le type de solvant, la puissance micro-ondes et le temps d'extraction.

- *Type et concentration du solvant*

Pour l'extraction assistée par micro-ondes des flavonoïdes glycosylés et aglycones, des solutions aqueuses de méthanol ou d'éthanol ont été fréquemment utilisées (Ding et *al.,* 2010; Terigar et *al.,* 2010). Inoue et *al.* (2010) ont utilisé l'éthanol (70%) pour extraire l'hespéridine des écorces de *Citrus unshiu*, alors que Jawad & Langrish (2012) ont utilisé l'eau pour extraire les acides phénoliques totaux des écorces de mandarine. Hayat et *al.* (2010) ont rapporté l'efficacité du méthanol (66%) pour libérer et séparer les composés phénoliques des écorces de mandarine.

Le volume de solvant doit être suffisant pour s'assurer que la matrice solide demeure entièrement immergée dans le solvant. Toutefois, dans le MAE, un ratio plus élevé peut entraîner la baisse du rendement. Ceci est probablement dû à une agitation insuffisante du solvant (Spar Eskilsson et *al.,* 1999).

- *Temps d'extraction*

Le temps d'extraction a une influence positive sur le rendement d'extraction (Lucchesi et *al.,* 2007). Toutefois, une exposition prolongée peut conduire à une dégradation des composés phénoliques avec une surchauffe du système solvant/soluté.

Jawad & Langrish (2012) ont montré que la teneur maximale des composés phénoliques a été extraite après 3 min pour l'EAM. Ce résultat est cohérent avec ceux d'autres auteurs.

Les conditions optimales d'extraction varient de 49 s à 152W (Hayat et *al.,* 2010), 123 s à 400W (Dahmoune et *al.,* 2013) à 3 min à 135°C et 400W (Jawad & Langrish , 2012) et 8 min à 140°C (Inoue *et al.,* 2010).

❖ *Puissance micro-ondes et température d'extraction*

La puissance micro-ondes contrôle la quantité d'énergie fournie à l'échantillon. Une augmentation de la puissance micro-ondes permet une augmentation du rendement d'extraction (Hu et *al.,* 2008).

Cependant, la puissance élevée augmente la température du produit et peut dégrader les composés d'intérêt et diminuer le rendement d'extraction (Ma et *al.,* 2009). Cette dernière observation a été confirmée par Hayat et *al.* (2010) qui ont mentionné qu'une augmentation de la puissance micro-ondes entraîne une augmentation du rendement d'extraction des acides phénoliques jusqu'à une puissance de 160 W. Jawad & Langrish (2012) ont testé trois puissances micro-ondes (400, 600, 800 W) pour extraire les acides phénoliques des écorces de mandarine. Les auteurs ont conclu que la teneur en acides phénoliques était la même à chaque puissance mais avec une légère différence de couleur, ce qui suggère que la puissance élevée conduit à la formation de sous-produits de la réaction de Maillard en augmentant la température à 135°C. Par conséquent, il est préférable de réaliser des extractions à une puissance optimale (400 W) pour minimiser la dégradation de l'extrait.

❖ *Conclusion*

L'extraction assistée par micro-ondes est réalisée en utilisant du méthanol ou de l'éthanol, à température élevée (135-140°C) pendant une courte durée (49s-8 min). Une puissance micro-ondes inférieur à 400W permet d'éviter la dégradation des composés phénoliques.

I.2.2.3. Extraction par fluide pressurisé (EFP)

L'extraction par fluide pressurisé (EFP) a été largement appliquée pour l'extraction des flavonoïdes. En général, l'application de hautes températures et pressions entraîne une augmentation de la vitesse d'extraction et de la diffusivité du solvant dans la matrice biologique (Routray & Orsat, 2012). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que lors de l'extraction EFP, les poches d'air présentes dans les tissus des fruits sont partiellement remplies de liquide. Lorsque la pression est évacuée, l'air occlus dans les pores sort, ce qui provoque des dommages de la membrane cellulaire des plantes (Ignat *et al.,* 2011).

EFP peut également provoquer une déprotonation des groupes chargés et la rupture des ponts salins et des liaisons hydrophobes, ce qui entraîne des changements de conformation et la dénaturation des protéines. Cela rend les membranes cellulaires de moins en moins sélectives, ce qui rend les composés plus accessibles à une extraction jusqu'à l'équilibre (Corrales et *al.,* 2009; Prasad et *al.,* 2010).

L'extraction par fluide pressurisé implique une moindre utilisation du solvant par rapport à l'extraction conventionnelle par solvant et il en résulte une faible dégradation oxydative des flavonoïdes car le processus se déroule en absence d'oxygène et à l'abri de la lumière (Wang & Weller, 2006, Raynie, 2006; Stalikas, 2007). Par contre, l'utilisation de températures d'extraction élevées peut entraîner la dégradation des composés thermolabiles (Chemat et *al.,* 2011). L'influence des principaux paramètres d'extraction de cette méthode est discutée ci-dessous.

- *Type de solvant et cycles d'extraction*

Li et *al.* (2012) ont rapporté que le méthanol semble être le solvant d'extraction le plus efficace par rapport à l'éthanol et à l'eau pour l'extraction accélérée par solvant des flavones de *Citrus reticulata*. Les auteurs rapportent également qu'un cycle d'extraction est suffisant. Wang et *al.* (2011) ont utilisé l'éthanol à 40% et un seul cycle d'extraction pour l'extraction accélérée par solvant de composés phénoliques de *Citrus sulcata*.

- *Température d'extraction*

Une augmentation de la température de 80 à 160°C entraîne une augmentation du rendement d'extraction des flavones des écorces de *Citrus reticulata* (Li et *al.,* 2012a) . Ceci peut être expliqué par la diminution de la viscosité du solvant et l'augmentation de sa diffusivité à haute température, ce qui peut conduire à des rendements d'extraction élevés de flavones (Li et *al.,* 2012a, Antunes et *al.,* 2008). Au-dessus de 160°C, le rendement en flavones diminue lentement en raison de leur dégradation par la chaleur (Li et *al.,* 2012a).

- *Temps d'extraction*

Une augmentation du temps d'extraction de 5 à 20 min entraîne une augmentation du rendement d'extraction des flavones de *Citrus reticulata* (Li et *al.,* 2012a). Cependant, le rendement d'extraction diminue lorsque le temps d'extraction est supérieur à 20 min. Cela peut être dû à la décomposition des flavones en raison d'une exposition prolongée à une haute pression ou à une haute température. Ce résultat a été confirmé par Wang et *al.* (2011) qui ont rapporté la baisse du rendement d'extraction des phénols de *Citrus sulcata* à partir de 30 min d'extraction.

Peu d'études ont été menées sur l'extraction sous haute pression des composés phénoliques des écorces d'agrumes. Pour cette raison, il est difficile de conclure sur les conditions optimales d'extraction.

I.2.2.4. L'extraction par eau sous-critique (EESC)

L'extraction par eau sous-critique est une technique réalisée en utilisant de l'eau chaude à une température comprise entre 100 et 374°C sous haute pression pour maintenir l'état liquide (point critique de l'eau : 22,4 MPa et 374°C). A de telles températures, l'eau perd sa polarité, ce qui lui permet d'agir comme solvant pour les composés à la fois polaires et non polaires (Prasad et *al.,* 2010).

L'eau sous-critique pourrait être une excellente alternative pour extraire tous les flavonoïdes, même les flavanones d'agrumes non polaires (Cheigh et *al.,* 2012). Une augmentation de la température d'extraction de 100 à 160°C sous 10 MPa pendant 10 min entraîne une augmentation de la teneur en hespéridine et en narirutine des extraits des écorces de *Citrus unshiu* (Cheigh et *al.,* 2012), tandis que au-dessus de 160°C, une diminution de la teneur en hespéridine et en narirutine a été observée. Ce phénomène peut être expliqué par la dégradation des flavanones dans les écorces de *Citrus unshiu* en raison de la température élevée appliquée. Kim et *al.* (2009) ont extrait les composés phénoliques de *Citrus pomaces* à 200°C, 1,4 MPa pendant 60 min. Une augmentation des rendements en hespéridine et narirutine a été observée en augmentant le temps d'extraction jusque 10 min. Lorsque le temps d'extraction dépasse 10 min, les rendements diminuent progressivement. Cheigh et *al.* (2012) ont rapporté qu'un temps d'extraction de moins de 10 min peut diminuer l'efficacité d'EESC en raison de la solubilisation insuffisante des flavanones. D'autre part, un temps d'extraction supérieur à 10 minutes peut provoquer la dégradation des flavanones induite par leur instabilité thermique.

- *Conclusion*

L'extraction par eau sous-critique est réalisée en utilisant l'eau comme solvant, à température élevée (160-200°C) pendant une courte durée (10-60 min), et à des pressions modérées variant de 1,4 à 10 MPa.

I.2.2.5. Extraction par CO_2 supercritique (SC-CO_2)

L'utilisation de l'extraction par CO_2 supercritique permet d'éviter la dégradation thermique et la décomposition des composés labiles du fait que l'opération est effectuée à une basse température, tandis que l'absence de la lumière et de l'oxygène empêche les réactions d'oxydation (Diaaz-Reinoso et *al.,* 2006). L'efficacité de la technique d'extraction SC-CO_2 est associée à plusieurs paramètres, notamment la température, la pression, le flux de CO_2 supercritique, la présence de co-solvant et le temps d'extraction (Diaaz-Reinoso et *al.,* 2006).

❖ *Type de co-solvant*

L'extraction par CO_2 supercritique est adaptée pour extraire des huiles et des composés lipophiles, mais de nombreux composés phénoliques naturels sont peu solubles dans ce solvant (Pereira & Meireles, 2010). La présence de co-solvant permet alors d'améliorer le rendement d'extraction par augmentation de la solubilité. Le type de co-solvant utilisé est déterminé en tenant compte de l'affinité entre le co-solvant et les composés cibles (Pereira & Meireles, 2010). Les co-solvants les plus fréquemment utilisés sont le méthanol et l'éthanol qui induisent des interactions dipôle/dipôle et à former une liaison hydrogène avec des groupes fonctionnels polaires. Giannuzzo et *al*. (2003) ont indiqué que le contenu en naringine était d'environ 10,8 g naringine/kg base humide pour l'éthanol utilisé comme co-solvant contre 9,2 g naringine/kg base humide pour le méthanol. Un résultat similaire a également été observé pour l'extraction par CO_2 supercritique de la nobiletine et de la tangérétine des écorces de *Citrus depressa Hayata* (Lee et *al.,* 2010). Les rendements en nobiletine et en tangérétine (14,68 mg/g bs) sont plus élevés avec de l'éthanol qu'avec le méthanol (12,92 mg/g bs).

Cette observation est confirmée par He et *al.* (2012) et Toledo-Guillen *et al.* (2010). En effet, une augmentation des concentrations de co-solvant peut améliorer les rendements d'extraction, mais la température nécessaire pour atteindre l'état supercritique est plus élevée et peut ne pas être appropriée pour les produits naturels sensibles à la chaleur.

❖ *Pourcentage de co-solvant*

Le pourcentage d'éthanol utilisé comme co-solvant dépend des conditions opératoires du SC-CO_2. Lee *et al.* (2010) ont conclu que 9,1% d'éthanol était le ratio optimal de co-solvant pour l'extraction de la nobiletine et de la tangeretine des écorces de *Citrus depressa Hayata* dans les conditions opératoires suivantes: 80°C, 30 MPa avec un débit de CO_2 de 3,0 ml/min. Giannuzzo et *al.* (2003) ont constaté que 15% d'éthanol était la concentration optimale de co-solvant pour l'extraction de la naringine du pamplemousse à 58,6°C, 9,5 MPa pendant 45 min. Toledo-Guillen *et al.* (2010) ont montré que le pourcentage optimal de l'éthanol était de 23% pour l'extraction des flavonoïdes à partir des écorces d'orange à 60°C et 40 MPa.

❖ *Pression et température*

La température optimale dépend du choix de la pression d'extraction. Cette température est comprise entre 58,6°C et 80°C pour une pression variant de 9,5 MPa à 40 MPa.

Lee et *al.* (2010) ont constaté que 80°C (30 MPa) est la température optimale pour l'extraction de la nobiletine et de la tangeretine à partir des écorces de mandarine. Giannuzzo et *al.* (2003) ont conclu que la température optimale pour l'extraction par CO_2 supercritique de la naringine à partir des écorces de pamplemousse est de 58,6°C pendant 45 min à 9,5 MPa. Toledo-Guillen et *al.* (2010) ont indiqué que les conditions optimales pour l'extraction des flavonoïdes des écorces d'orange sont une température de 60°C à 40 MPa, alors que He et *al.* (2012) ont indiqué que les conditions optimales pour extraire les flavonoïdes des écorces de pamplemousse sont une température de 80°C à 39 MPa pendant 49 min. Lee et *al.* (2010) ont étudié l'effet de la pression sur le rendement d'extraction des composés phénoliques de *Citrus depressa Hayata* et ils ont rapporté qu'à 80°C, le contenu en nobiletine et en tangeretine augmente avec une pression croissante de 20 à 30 MPa. Cependant, le rendement d'extraction diminue significativement lorsque la pression augmente de 30 à 40 MPa.

- *Débit de CO_2*

En général, un débit élevé du solvant augmente la capacité d'extraction. Cependant, dans certains cas, des débits très élevés de solvants diminuent le rendement en raison du contact insuffisant entre le soluté et le solvant (Pereira & Meireles, 2010). Lee et *al.* (2010) ont testé trois débits de dioxyde de carbone (1,5, 3,0 et 4,5 ml/min) pour extraire la nobiletine et de la tangeretine à partir des écorces de *Citrus depressa Hayata*. Les auteurs ont constaté que 3,0 ml/min était le débit optimal. Cependant, He et *al.* (2012) ont utilisé un débit de 1,0 ml/min pour l'extraction des flavonoïdes.

- *Conclusion*

Les quelques travaux disponibles portant sur l'extraction du CO_2 supercritique des composés phénoliques des écorces d'agrumes ont montré qu'il est nécessaire d'ajouter un co-solvant au CO_2 afin d'améliorer l'extraction de ces composés. En outre, l'éthanol est le co-solvant le plus utilisé quel que soit les conditions opératoires (temps, pression, température) appliquées.

I.2.3. Approches combinées pour l'intensification de l'extraction

L'extraction des composés phénoliques peut être effectuée en combinant deux ou plusieurs techniques. Cette combinaison permet de tirer des avantages des différentes méthodes d'extraction pour augmenter l'efficacité de l'opération d'extraction (Shirsatha et *al.,* 2012). Les approches combinées pourraient être appliquées de manière séquentielle (technologie de chute de pression instantanée contrôlée et l'extraction assistée par ultrasons (DIC-UAE) ou simultanément (extraction enzymatique assistée par ultrasons, extraction par fluide

supercritique assistée par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes et ultrasons) (Pico, 2013).

Allaf et *al.* (2013) ont rapporté que l'utilisation séquentielle de DIC et UAE (éthanol 80%, m/v: 20:1, 40°C, 60 min, 150W) pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange améliore les rendements en naringine et en hespéridine. En effet, les teneurs des écorces d'orange traitées par DIC-UAE sont de 0,825 ± $1,6\times10^{-2}$ g/g bs pour l'hespéridine et $6,45\times10^{-2}$ ± $2,3\times10^{-4}$ g/g bs pour la naringine par rapport à 0,64 ± $2,7\times10^{-2}$ g/g bs et $5,7\times10^{-2}$ ± $1,6\times10^{-3}$ g/g bs, respectivement dans les échantillons extraits par solvant. Les auteurs expliquent ce phénomène par le fait que le traitement DIC conduit à une expansion de la structure cellulaire. Quel que soit le type du solvant, l'expansion de la structure peut être considérablement intensifiée par l'amélioration de la diffusivité du solvant à l'intérieur du solide (Allaf et *al.,* 2012).

Luengo et *al.* (2013) ont utilisé séquentiellement le champ électrique pulsé (60 ps, 20 impulsions, 5 kV/cm) pour améliorer l'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange (eau, m/v: 40g: 4 ml, 30 min, 5 bars). Les résultats ont montré que le traitement des écorces d'orange par champ électrique pulsé (PEF) à 5 kV/cm augmente la quantité de naringine et d'hespéridine dans l'extrait de 1 à 3,1 mg/100 g base humide et de 1,3 à 4,6 mg/100 g base humide, respectivement. Les auteurs ont rapporté que PEF induit une perméabilisation des membranes cytoplasmiques, facilitant la libération des composés intracellulaires des cellules, donnant ainsi une augmentation des rendements d'extraction des différents composés (Luengo et *al.,* 2013).

I.2.4. Méthodes d'analyse des composés phénoliques des écorces d'agrumes et de leurs activités

Afin de caractériser l'extrait des écorces d'oranges, plusieurs teneurs se rapportant aux composés phénoliques peuvent être mesurées (**Tableau 13**).

- *Teneur en phénols totaux*

Le dosage des phénols totaux est basé sur l'oxydation des composés phénoliques et le développement d'une coloration. La méthode la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu, méthode spectrophotométrique basée sur la réduction d'un mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu) en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

Tableau 13. *Méthodes analytiques de la séparation et de la quantification des différentes classes des composés phénoliques des écorces d'agrumes (Gattuso et al., 2007; Neveu et al., 2010; Pérez-Jiménez et al., 2010; Ignat et al., 2011).*

Phénols	Méthodes analytiques	Commentaires
Phénols totaux	Folin–Ciocalteu (λ)	Estimation globale des antioxydants (exprimée généralement en équivalent acide phénolique) Simple et non coûteuse Une surestimation due aux interférences avec d'autres composés comme l'acide ascorbique et les sucres présents dans les extraits des plantes.
Flavonoïdes totaux	Méthode colorimétrique	Basée sur la complexation des composés phénoliques avec le trichlorure d'aluminium Al (III).
Anthocyanes totaux	Méthode du pH différentiel	Basée sur le comportement caractéristique des anthocyanes en milieu acide.
Composés phénoliques individuels	Chromatographie gazeuse (CG)	Quantification des composés phénoliques individuels. Limitation de l'application pour l'analyse des flavonoïdes à cause de leur faible volatilité.
	Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	Méthode la plus utilisée pour l'analyse des composés phénoliques individuels des écorces d'agrumes. Utilisation de la colonne C18 en phase inverse, systéme de solvant binaire contenant de l'eau acidifiée et in solvant organique polaire. Longueur d'onde spécifique: flavanones (280- 290 nm), flavones (304-350 nm) et flavonols (352-385 nm)
	Méthodes couplées	
	CLHP-SM CLHP-IES-SM CLHP-ICPA-SM	Identification des composés phénoliques.
	CLHP-RMN	Détermination de la caractérisation structurelle et la masse moléculaire. Faible sensibilité, équipement très cher. Technique puissante pour l'élucidation des structures

CLHP-SM: Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse, IES-MS: Ionisation par électrospray couplée à la spectrométrie de masse, ICPA-SM: Ionisation chimique à pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse, CLHP-RMN: *Chromatographie liquide à haute performance couplée à la résonance magnétique nucléaire.*

L'inconvénient de la méthode de Folin-Ciocalteu est qu'elle donne des teneurs surestimées en raison des interférences avec d'autres composés comme la vitamine C et les sucres, éventuellement présents dans les aliments, qui réduisent aussi le réactif de Folin (Sanoner, 2001; Neveu et *al.,* 2010; Ignat et *al.,* 2011). Pour cette raison, Li et *al.* (2006a) et Gerorgé et *al.* (2005) ont proposé la purification de l'extrait brut avant la détermination de la teneur en phénols totaux afin d'éliminer les acides organiques et les sucres.

- *Teneur en flavonoïdes totaux*

Plusieurs méthodes sont à disposition pour mesurer la teneur en flavonoïdes totaux : (i) une méthode colorimétrique basée sur la complexation des composés phénoliques avec Al (III), (ii) la méthode au bleu de Prusse (méthode spectrophotométrique proche de la méthode de Folin, parfois utilisée pour la quantification des tanins) (Pérez -Jiménez et *al.,* 2010; Neveu et *al.,* 2010).

- *Dosage des composés phénoliques individuels*

Les méthode les plus utilisées pour doser les composés phénoliques individuels dans les agro-ressources est la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), souvent en phase inverse (PI) et la chromatographie en phase gazeuse (CG) (Jeong et *al.,* 2004). Les gradients d'élution comportent en général des proportions croissantes de méthanol ou d'acétonitrile, dans de l'eau acidifiée par de l'acide formique ou acétique. Les composés sont élués par ordre de polarité croissante : les acides hydroxycinnamiques sont donc généralement élués avant les flavonoïdes. La détection est basée sur l'absorption caractéristique des phénols dans l'UV. La plupart des flavonoïdes ont en effet deux bandes d'absorption majeures : une à 320-385 nm, caractéristique de l'absorption du noyau aromatique B et une à 280-285 nm, caractéristique de l'absorption du noyau aromatique A. Ces bandes varient cependant en fonction des substitutions possibles sur les cycles. Les flavonols présentent un maximum d'absorption dans le jaune (350 à 360 nm) et les anthocyanes dans le rouge (520-530 nm).

Pour les acides hydroxycinnamiques, ce maximum est à 320 nm. La détection en UV-visible par barrette de diode, à longueurs d'onde multiples, permet ainsi de distinguer les classes de composés (Sanoner, 2001; Ignat et *al.,* 2011).

Ces deux méthodes peuvent être couplées à la spectrométrie de masse. Cette technique permet de mesurer la masse d'une molécule et de fournir des informations structurales d'après les ions fragments formés au cours de l'analyse.

Un spectromètre de masse est composé d'un système d'induction de l'échantillon, d'une source d'ionisation (formation et éventuellement fragmentation des ions), d'un analyseur dont la fonction est de séparer les ions selon leur rapport masse/charge (m/z) et d'un détecteur. La source d'ionisation par électrospray est la plus utilisée pour les phénols. L'application d'un mode positif permet de caractériser les composés sous forme d'ions $[M+H]^+$. Le mode négatif donne les ions $[M-H]^-$ (Sanoner, 2001; Ignat et *al.,* 2011; Londoño-Londoño et *al.,* 2010).

I.2.5. Mesure de l'activité antioxydante

De nombreuses méthodes de mesure du pouvoir anti-oxydant ont été mises au point ces dernières années. On distingue les mesures faites sur des matrices vivantes (mesure in vivo) et sur des matrices alimentaires (in vitro). Lors des mesures in vitro, l'activité antioxydante est évaluée en mesurant l'inhibition de l'oxydation d'un substrat déterminé. Le substrat est d'abord oxydé dans des conditions standard, puis l'étendue de l'oxydation à un point final est mesurée. De nombreuses méthodes ont été développées combinant des substrats, des initiations et des points finaux de mesure différents.

Nature du substrat : Ils sont souvent de nature lipidique : méthyle-linoléate (Heinonen et *al.,* 1998), lipoprotéines (Davalos et *al.,* 2003) ou encore caroténoïdes (Tsao et *al.,* 2005).

Point d'initiation : L'oxydation du substrat peut être initiée par augmentation de la température (vieillissement accéléré des composés lipidiques), catalysée par des ions métalliques ou liée à la génération des radicaux libres.

Point de fin de mesure : Il est possible de mesurer l'inhibition par un composé antioxydant à la fin de la réaction d'oxydation ou au cours de la réaction, de mesurer le retard dans l'oxydation en présence d'antioxydants.

La capacité antioxydante peut également être évaluée comme le potentiel à piéger des radicaux libres, en mesurant directement l'inhibition du radical lors de l'ajout du composé antioxydant. Ces tests utilisent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), radical coloré stable, ou l'acide 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthialozine-6-sulfonique) (ABTS), dont le radical coloré peut être généré par réaction enzymatique (Rice-Evans et *al.,* 1996). La décoloration du radical après addition de l'antioxydant est alors mesurée. Le test DPPH est un des plus utilisés sur les écorces d'agrumes car simple à mettre en œuvre (Jeong et *al.,* 2004; Anagnostopoulou et *al.,* 2006; Kang et *al.,* 2006; Xu et *al.,* 2008; Abd El-aal et *al.,* 2009; Tumbas et *al.,* 2010;

Hayat et *al.,* 2010). Toutefois, le radical stable DPPH est peu représentatif des radicaux peroxyles instables responsables des dégradations des constituants cellulaires (Prior et *al.,* 2003). Les résultats sont généralement exprimés en comparaison du pouvoir inhibiteur d'un antioxydant standard, souvent le trolox. La capacité antioxydante est alors exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Activity).

Conclusion

L'extraction conventionnelle par solvant des écorces d'agrumes permet d'obtenir des rendements assez élevés (74%) en composés phénoliques cependant elle provoque la plupart du temps une dégradation des composés thermolabiles de l'extrait à cause de l'utilisation de températures élevées (50-100°C) et/ou des longues durées d'extraction (1h-24h). Pour améliorer l'extraction des composés phénoliques, d'autres moyens sont appliqués pour intensifier l'extraction tels que l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction sous haute pression h ou l'extraction par fluide supercritique.

L'extraction sous haute pression implique l'utilisation de températures élevées (50 à 200°C) et de hautes pressions (de 10 à 15 MPa), ce qui diminue le temps d'extraction mais peut conduire à une dégradation des composés phénoliques.

L'extraction assistée par ultrasons semble être une technique de choix pour les composants thermolabiles car elle utilise des basses températures (30-40°C) pendant un temps d'extraction réduit (10-60 min) et des puissances des ultrasons modérées (30-150 W).

Cependant, la répartition hétérogène de l'énergie des ultrasons dans le mélange solvant-produit limite la précision de la méthode. L'extraction assistée par micro-ondes est utilisée pour séparer les composés phénoliques polaires et non polaires durant un temps d'extraction réduit (49s-12min). Cette méthode peut être réalisée en utilisant une large gamme de solvants organiques et ne nécessite pas de conditions sélectives pour extraire les composés bioactifs.

L'extraction par CO_2 supercritique peut être appliquée sans solvant ou en utilisant de faible quantité de solvant. Cette méthode permet aussi d'obtenir des molécules d'une grande pureté.

Cependant, l'extraction par fluide supercritique, qui utilise exclusivement le CO_2 comme solvant d'extraction est limitée à l'extraction des composés apolaires et l'emploi d'un co-solvant est le plus souvent nécessaire. Les principaux avantages de cette technique est son caractère écologique et la pureté de l'extrait et/ou du composé obtenu.

Pour profiter des avantages des différentes méthodes d'extraction et limiter leurs inconvénients, des approches combinées pour l'intensification de l'extraction ont été

proposées par certains auteurs tels que la technologie de chute de pression instantanée contrôlée et l'extraction assistée par ultrasons.

De nombreuses études ont été menées pour l'optimisation mono-critère des techniques d'extraction dans le but de chercher une augmentation du rendement d'extraction des composés phénoliques mais sans tenir compte de l'évolution de leurs activités antioxydantes. Dans la littérature, on trouve quelques études portant sur la comparaison des méthodes d'extraction mais celles-ci restent partielles et souvent limitées à 2 ou 3 méthodes. Une étude tenant en compte l'efficacité de l'extraction et la préservation des activités des composés phénoliques devrait permettre une valorisation optimale du contenu phénolique des écorces d'agrumes ou d'une autre agro-ressource.

I.3. Corrosion et protection des matériaux

Introduction

La corrosion peut être définie comme étant la dégradation chimique d'un matériau et l'altération de ses propriétés physiques (notamment mécaniques) sous l'influence de son milieu environnant. C'est un phénomène naturel qui tend à faire évoluer les métaux et les alliages vers leur état originel d'oxyde, de sulfure, de carbonate ou de tout autre sel, plus stable dans le milieu ambiant (Benard et *al.,* 1969). La corrosion peut affecter de nombreuses structures particulièrement celles qui sont constituées de matériaux métalliques. En effet, les matériaux métalliques et plus particulièrement les aciers, qui constituent les matériaux de base dans la construction de nombreuses structures, sont fortement exposés à la corrosion lorsqu'ils sont au contact d'atmosphères humides, immergés en eau douce ou saline, implantés dans les sols ou en présence de solutions plus ou moins agressives.

Les processus de corrosion dans ces milieux dépendent d'un grand nombre de facteurs (la nature et la composition du matériau, l'environnement et ses caractéristiques chimiques, sa température, etc……) qui interviennent non pas individuellement mais en relation plus ou moins complexe les uns avec les autres. En matière de protection contre la corrosion, il est possible d'agir sur le matériau lui-même (choix judicieux du matériau, formes adaptées, contraintes en fonction des applications,…), sur la surface du matériau (revêtement, peinture, tout type de traitement de surface,…) ou sur l'environnement avec lequel le matériau est en contact en utilisant des inhibiteurs de corrosion. L'utilisation d'inhibiteurs pour empêcher le processus de dissolution des métaux reste une application inévitable et très répandue (Benmessaoud Left et *al.,* 2013).

Les inhibiteurs synthétiques sont efficaces dans la protection contre la corrosion des métaux mais ils sont hautement toxiques que ce soit pour l'homme ou pour l'environnement. Ces composés sont aussi chers et non biodégradables. Par conséquent, l'utilisation des huiles, des extraits des plantes et des biomolécules comme inhibiteurs de la corrosion est devenue un créneau clé de la recherche appliquée en électrochimie.

Les agro-ressources et leurs coproduits constituent un gisement de composés naturels biodégradables qui peuvent être extraits des produits et coproduits végétaux par des procédures simples et rentables.

I.3.1. Inhibiteurs de la corrosion

Conformément à la définition donnée par l'Association Nationale de l'Ingénierie de Corrosion (NACE) « un inhibiteur de corrosion est une substance qui, lorsqu'elle est ajoutée à faibles concentrations dans des milieux corrosifs, diminue la vitesse de la réaction d'oxydation du métal dans son environnement» (NACE, 1965). La diminution de la vitesse de corrosion est réalisée soit en limitant les réactions chimiques ou électrochimiques (c'est-à-dire agissant sur le processus anodique, cathodique ou les deux) soit en modifiant l'agressivité de l'électrolyte (en faisant modifier l'interface matériau/milieu) (Millet, 2008).

La protection par un inhibiteur de corrosion à la surface du matériau peut être : une protection permanente (surveillance primordiale du dispositif) (Heitz, 1975) ou une protection temporaire, durant une période ou la pièce est particulièrement sensible à la corrosion (stockage, nettoyage, décapage…) ou encore lorsque la pièce est soumise à des usinages très sévères comme le perçage, taraudage, forage, filetage. Un inhibiteur (ou un mélange d'inhibiteurs) peut être combiné à un autre moyen de protection comme la protection supplémentaire d'un alliage à haute résistance à la corrosion, l'addition d'un revêtement de surface tel que la peinture, la graisse et l'huile, etc.

Un inhibiteur de corrosion doit abaisser la vitesse de corrosion du métal tout en conservant les caractéristiques physico-chimiques de ce dernier. Il doit être non seulement stable en présence des autres constituants du milieu, mais également ne pas affecter la stabilité des composés contenus dans ce milieu.

Un inhibiteur est définitivement reconnu comme tel s'il est stable à la température d'utilisation et efficace à faible concentration. Il doit être non toxique, pas cher et disponible (Raja et *al.,* 2008). Il existe plusieurs possibilités de classement des inhibiteurs, celles-ci se distinguant les unes des autres de diverses manières (Landolt, 1993):

-Soit à partir de la nature des produits (inhibiteurs organiques ou minéraux) ;

-Soit à partir de leur mécanisme d'action électrochimique (inhibiteurs cathodiques, anodiques ou mixtes) ;

-Soit à partir de leurs mécanismes d'interface et leurs principes d'action (adsorption à la surface du métal et/ou formation d'un film protecteur) ;

-Soit à partir du domaine d'applications.

I.3.1.1. Classement selon la nature de l'inhibiteur

❖ *Inhibiteurs minéraux*

Les molécules minérales sont utilisées le plus souvent en milieu proche de la neutralité, voire en milieu alcalin et plus rarement en milieu acide.

Les produits se dissocient en solution et ce sont souvent leurs produits de dissolution qui assurent les phénomènes d'inhibition (anions et cations). Les cations inhibiteurs sont essentiellement Ca^{2+} et Zn^{2+} et ceux qui forment des sels insolubles avec certains anions tels que l'hydroxyle (OH^-). Les principaux anions inhibiteurs sont les oxo-anions de type XO_4^{n-} tels que les chromates, les molybdates, les phosphates, les silicates (Rozenfeld, 1981; Nathan, 1937). Le nombre de molécules minérales en usage comme inhibiteur de corrosion à l'heure actuelle est en restriction car la plupart des produits efficaces sont néfastes pour l'environnement. Cependant, de nouveaux complexes organiques de chrome III et d'autres cations (Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Sr^{2+}, Al^{2+}, Zr^{2+}, Fe^{2+}….) efficaces contre la corrosion et non toxiques ont été développés (Locquet et *al.,* 2002).

❖ *Inhibiteurs organiques*

Les molécules organiques sont de plus en plus utilisées pour le développement des inhibiteurs de corrosion: leur utilisation est actuellement préférée à celle d'inhibiteurs inorganiques pour des raisons d'écotoxicité essentiellement. Les inhibiteurs organiques sont généralement constitués de sous-produits de l'industrie pétrolière (Fiaud & Lemaitre, 2002). Ils possèdent au moins un centre actif susceptible d'échanger des électrons avec le métal, tel que l'azote, l'oxygène, le phosphore ou le soufre. Les groupes fonctionnels usuels, permettant leur fixation sur le métal, sont :

- le radical aminé ($-NH_2$),

-le radical mercapto (-SH),

-le radical hydroxyle (-OH),

-le radical carboxyle (-COOH).

Les inhibiteurs qui contiennent du soufre sont plus efficaces que ceux qui contiennent l'azote, parce que le soufre est un meilleur donneur d'électrons que l'azote. La principale caractéristique de ces inhibiteurs est leur efficacité élevée, même à faible concentration. L'action inhibitrice de ces composés organiques, qui est généralement indépendante des processus anodiques et cathodiques de corrosion, est liée à la formation (par adsorption) d'une

barrière plus ou moins continue, mais d'épaisseur finie, qui empêche l'accès de la solution au métal. Ce mécanisme d'action sera développé plus en détail par la suite.

I.3.1.2. Classement selon le mécanisme d'action

Il n'existe pas de mode d'action unique des inhibiteurs de corrosion. Un même composé aura d'ailleurs souvent un mécanisme d'action qui sera fonction du système de corrosion (métal/solution) en présence duquel il se trouvera. Toutefois, et quel que soit le mécanisme exact par lequel chaque inhibiteur agit dans les conditions dans lesquelles il est placé, il existe un certain nombre de considérations de base valables pour tous les inhibiteurs.

- *Mécanismes d'action électrochimique*

Ce classement des inhibiteurs tient compte de la nature électrochimique de la corrosion en phase liquide, qui met en jeu au moins deux réactions :

-Une réaction anodique de dissolution du métal (réaction d'oxydation) :

$$M \rightarrow M^{n+} + ne^-$$

Exemple: $Fe \longrightarrow Fe^{2+} + 2e^-$

-Une réaction cathodique de réduction d'un oxydant de la solution :

$$H^+ + e^- \longrightarrow \tfrac{1}{2} H_2 \text{ (milieu acide non aéré)}$$

ou : $O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$ (milieu acide aéré)

Le rôle de l'inhibiteur sera nécessairement de diminuer la vitesse de l'une des deux réactions et dans certains cas les deux à la fois. Si l'inhibiteur ralentit la réaction d'oxydation en bloquant les sites anodiques (siège de l'oxydation du métal), il est appelé *inhibiteur anodique*. De la même façon, si l'inhibiteur ralentit la réaction de réduction en bloquant les sites cathodiques (siège de la réduction de l'oxygène dissous en milieu aéré ou siège de la réduction du proton H^+ en milieu acide), il est appelé *inhibiteur cathodique*. Les *inhibiteurs mixtes* agissent à la fois pour diminuer la vitesse de la réaction anodique et celle de la réaction cathodique (**Figure 9**).

Les inhibiteurs anodiques sont des substances inorganiques comme les orthophosphates, silicates, chromates… Leur mode d'action consiste à élever la valeur du potentiel de corrosion du matériau afin de l'amener à une valeur pour laquelle il y a formation d'un film passif protecteur sur l'anode (Fiaud, 1990).

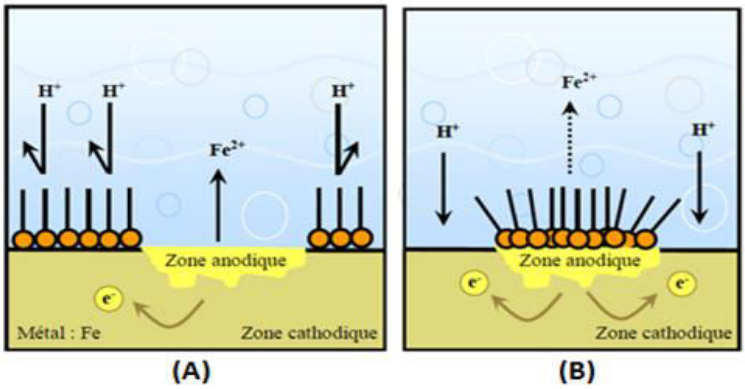


Figure 9. *Formation des couches barrières* A) cathodiques et B) anodiques interférant avec les réactions électrochimiques, dans le cas d'une inhibition en milieu acide (Schaschl, 1973).

En effet, le rapport des surfaces (anodiques et cathodiques) est important dans ce cas. L'anode se corrode d'autant plus rapidement que la surface anodique est petite par rapport à la surface cathodique. Autrement dit, si le film protecteur est altéré par une rayure ou par une dissolution, et si la quantité d'inhibiteur est insuffisante pour restaurer le film, la partie exposée se corrode en piqûre profonde.

En matière de corrosion localisée, la corrosion par piqûre est une forme particulièrement insidieuse : l'attaque se limite à des trous, très localisés et pouvant progresser très rapidement en profondeur tout en conservant le reste de la surface indemne.

L'action des inhibiteurs cathodiques se traduit par une diminution de la vitesse de la réaction cathodique et donc par un déplacement du potentiel de corrosion vers des valeurs moins nobles. Ce sont généralement des cations qui peuvent migrer vers la surface cathodique, où ils précipitent sous formes de sels basiques ou d'hydroxydes, formant des films adhérents et compacts. Ces inhibiteurs sont plus « sûrs » que les inhibiteurs anodiques, en effet, ils ne risquent pas de favoriser la corrosion localisée, même en cas de sous-dosage.

- *Mécanismes d'action interfaciale*

Cet autre mode de classement des inhibiteurs les différencie à partir de leur mode de fixation sur la surface métallique.

Les inhibiteurs d'adsorption ou "d'interface" et les inhibiteurs dits "d'interphase". Les premiers sont plutôt observés en milieu acide et agissent en formant des films mono ou bidimensionnels de molécules par adsorption à la surface du métal alors que les seconds sont spécifiques des milieux neutres ou alcalins et forment des films tridimensionnels entre le substrat corrodé et les molécules d'inhibiteur (Karman et *al.,* 1998).

Les inhibiteurs d'interphase ne se contentent ainsi pas d'être adsorbés aux interfaces métal/oxyde et oxyde/électrolyte, mais sont également incorporés dans les couches barrières (en formant des complexes par exemple); ainsi ces molécules inhibitrices d'interphase conduisent à des réseaux homogènes et denses présentant de ce fait une faible porosité et une bonne stabilité. Cette surface a donc tendance à capter atomes et molécules se trouvant à proximité. Entre l'espèce adsorbée et la surface métallique existent deux types de liaisons: liaison électrostatique et liaison chimique, donc deux types distincts d'adsorption: la **physisorption** et la **chimisorption**. Le mode d'organisation des molécules inhibitrices à la surface est représenté sur la **figure 10**.

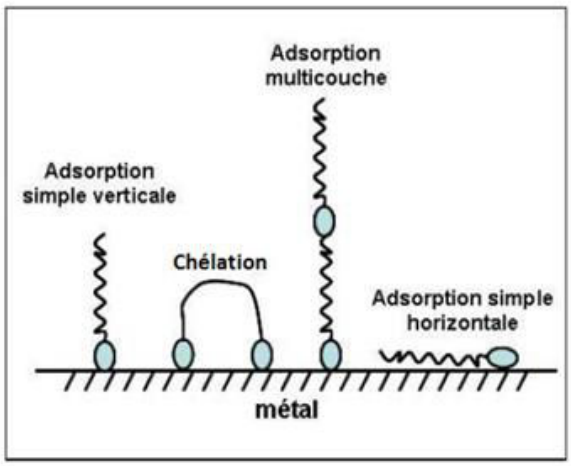


Figure 10. *Représentation schématique des modes d'adsorption des molécules organiques inhibitrices sur une surface métallique (Thomas, 1980).*

- Adsorption physique

L'adsorption physique conserve l'identité aux molécules adsorbées. On distingue ici trois types de liaisons : les liaisons de Van der Waals (toujours présentes), les liaisons polaires (dépendant des charges de surface et de l'inhibiteur) et les liaisons hydrogène (s'établissant entre un donneur de liaison hydrogène et un accepteur, uniquement N, O, P, S porteurs de doublets libres (Khaled & Al-Qahtani, 2009).

L'adsorption physique est due à l'attraction électrostatique entre les ions inhibiteurs ou les dipôles et la surface chargée électriquement du métal.

Les forces l'adsorption électrostatique sont généralement faibles. Les espèces inhibitrices adsorbées sur le métal, en raison des forces électrostatiques, peuvent également être désorbées facilement.

Une fonction principale d'adsorption électrostatique est que les ions ne sont pas en contact physique direct avec le métal. Une couche de molécules d'eau sépare le métal des ions.

Le processus d'adsorption physique a une faible énergie d'activation et relativement indépendante de la température (Mansfeld, 1985).

- Chimisorption

La chimisorption est un mécanisme plus fréquent que le mécanisme de physisorption et conduit à une efficacité plus importante de l'inhibiteur (Hackerman & Makrides, 1954). La chimisorption résulte de la mise en commun des électrons entre la surface métallique et la molécule d'inhibition (un centre actif comme les atomes N, S, P, O) et ainsi des liaisons chimiques covalentes très fortes se forment. L'inhibiteur a le comportement d'un donneur d'électrons vis-à-vis de l'atome métallique de la surface.

L'adsorption chimique s'accompagne d'une profonde modification de la répartition des charges électroniques des molécules adsorbées. La chimisorption est souvent un mécanisme irréversible (Benmessaoud Left et *al.,* 2013).

I.3.1.3. Classement selon le domaine d'application

Les inhibiteurs de corrosion sont souvent classés selon leur domaine d'application. En milieu aqueux, les inhibiteurs pour milieu acide sont employés, entre autres, pour éviter une attaque électrochimique de l'acier lors du décapage. Dans l'industrie pétrolière, on les ajoute aux fluides de forage. Les inhibiteurs pour milieux neutres servent surtout à protéger des circuits de refroidissement et les peintures à base aqueuse. En milieu organique, de grandes quantités d'inhibiteurs de corrosion sont utilisées dans les lubrifiants pour moteurs et dans l'essence puisque ces liquides contiennent souvent des traces d'eau et des espèces ioniques qui peuvent provoquer une corrosion.

I.3.2. Inhibition de la corrosion par les substances naturelles

Les composés synthétiques présentent une bonne action anticorrosion, mais la plupart d'entre eux sont hautement toxiques (Moretti *et al.,* 2004). Ces inhibiteurs peuvent causer des dommages temporaires ou permanents aux organes tels que les reins ou le foie, ou perturber le système enzymatique dans le corps (Ostovari et *al.,* 2009).

La toxicité peut se manifester soit au cours de la synthèse de ces composés soit durant leurs applications. Par conséquent, les substances naturelles sont considérées de plus en plus comme une alternative à ces inhibiteurs synthétiques, qui sont écologiques et sans danger. Les inhibiteurs d'origine naturelle sont utilisés pour la protection de métaux dans l'environnement acide, afin de remplacer les produits chimiques toxiques utilisés actuellement.

Ces inhibiteurs se distinguent d'une part par des efficacités inhibitrices des alliages métalliques en milieu HCl très élevées pouvant atteindre les 99%, et d'autre part par leur effet écologique, respect des normes de santé et d'environnement (Benmessaoud Left et *al.,* 2013).

Très récemment, de nombreux articles ont porté sur l'utilisation potentielle des huiles et des extraits de plantes comme inhibiteurs de la corrosion. Diverses substances naturelles ont été testées comme les inhibiteurs de corrosion de l'acier en milieu acide. Parmi ceux-ci, **des extraits de plantes**: l'hibiscus (El-Hosary et *al.,* 1972), l'henna (Rehan, 2003 ; Ostovari et *al.,* 2009 ; Hamdy *et al.,* 2013) le thym (Chetouani et *al.,* 2003), la camomille (Abdel-Gaber et *al.,* 2006), le blé (Rehan, 2003), des extraits des feuilles: la feuille du palmier dattier (Rehan, 2003), les feuilles d'*Andrographis paniculata* (Singh et *al.,* 2010), les feuilles d'olivier (El-Etre, 2007), les feuilles de *citrus aurantiifolia* (Saratha et *al.,* 2009), les feuilles de *Ginkgo* (Deng et *al.,* 2012), des extraits des écorces de fruits**:** les pelures de banane (Eddy & Ebenso, 2008; Ji et *al.,* 2015), les pelures d'ail (De Assunçao Araujo Pereira et *al.,* 2012), les écorces de grenade « *Punica granatum* » (Belhpour et *al.,* 2012), des extraits de graines: les extraits de graines du palmier dattier (Umoren et *al.,* 2013) et les graines d'*Ammi Visnaga* (El-Etre, 2006) ou même le café moulu (Vasconcelos Torres et *al.,* 2011), ou le miel (El-Etre & Abdallah, 2000).

La plupart des études se concentrent sur leur efficacité inhibitrice sur l'acier en milieu acide. La protection de l'aluminium dans des milieux acides (El-Etre, 2003), de zinc et de fer en solution neutre et alcaline (El-Etre et *al.,* 2005) sont rarement pris en compte. L'utilisation d'agrumes et de leurs sous produits comme étant des inhibiteurs verts de la corrosion reste limitée.

Le **tableau 14** résume les études portant sur l'utilisation d'agrumes, d'autres fruits, de leurs sous produits et de plantes comme inhibiteur de la corrosion. Saleh et *al.* (1982) ont réalisé une étude intensive sur l'effet d'inhibition, séparément, de l'extrait aqueux d'*Opuntia ficus indica,* des feuilles *Aloe eru,* des écorces d'orange, de mangues et de grenade (conditions d'extractions : m/v: 50g/300ml, eau chaude, filtration de l'extrait) sur la corrosion de l'acier, l'aluminium, du zinc et du cuivre dans les milieux HCl et H_2SO_4, à 298-313°K. Il a été démontré qu'à partir de 6% d'extrait des écorces de fruits et des feuilles d'*aloe vera* dans 5% HCl et à 298°K, l'efficacité de l'inhibition diminue dans cet ordre : mangue (82%), orange et *aloe vera* (80%), *Opuntia ficus indica* (75%) et grenade (65%).

Tableau 14.*Utilisation des agrumes et leurs sous produits comme des inhibiteurs de corrosion des métaux.*

Source de l'inhibiteur	Ingrédient actif supposé	Type du métal	Milieu	Efficacité inhibitrice	T°K	Remarque	Référence
Citrus aurantiifolia **(Extrait de feuilles)**	Acide oléique Acide linoléique Xanthyletine	Acier doux	1M HCl	97,51% pour 2,5% de l'extrait	343	Inhibiteur mixte	Saratha et *al.,* 2009
Limonène	Limonène	Acier C38	1M HCl	72% pour 220 mg/l	298-328	Inhibiteur mixte	Chaieb et *al.,* 2009
Ecorces de fruit (**orange**, mangue, fruit de la passion, noix de cajou)	Composés organiques contenus dans l'extrait : vitamine C, pectine, phénols, caroténoïdes…	Acier au carbone	1M HCl	95% pour 400 mg/l	298	Inhibiteur mixte	Da Rocha et a*l.,* 2010
Ecorces de fruit (**orange**, mangue, grenade, *d'Opuntia ficus indica*, des feuilles *Aloe vera*), mangue)	Composés organiques contenus dans l'extrait.	Acier doux	HCl (5-10%)	80% pour 6% de l'extrait	298-313	Inhibiteur mixte	Saleh et *al.,* 1982

Da Rocha et *al.* (2010) ont utilisé des extraits aqueux des écorces de fruits (mangue, orange, fruits de la passion et la noix de cajou), (conditions d'extractions : m/v: 5g/50ml, eau chaude, filtration de l'extrait) comme inhibiteurs de corrosion de l'acier au carbone dans des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) 1M. Les auteurs ont conclu que les extraits des écorces de fruits agissent comme des inhibiteurs mixtes et que l'efficacité d'inhibition obtenue en présence de 400 mg/l d'extrait aqueux est dans l'ordre suivant : orange (95%), fruit de la passion (88%), mangue (83%) et la noix de cajou (75%).

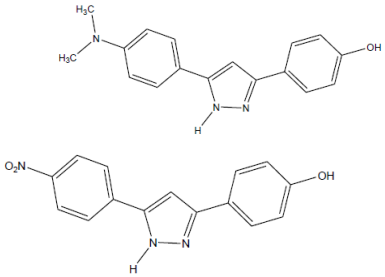
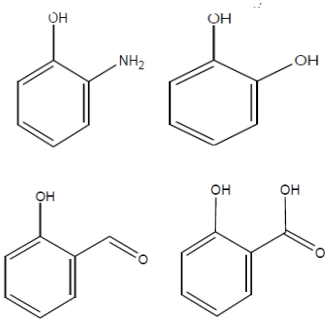
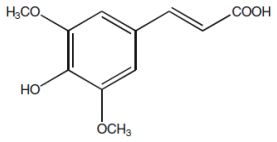
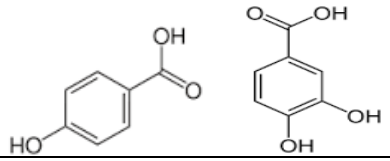
Chaieb et *al.* (2009) ont utilisé le limonène extrait de l'orange et d'agrumes après séparation et purification comme inhibiteur vert de corrosion de l'acier dans des solutions d'acide chlorhydrique. Les auteurs ont conclu que l'efficacité de l'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration de limonène jusqu'à atteindre 72% à 0,220 g/L. L'efficacité de l'inhibition est indépendante de la température variant de 298 à 328 K. L'efficacité de l'inhibition de la corrosion de l'acier doux avec l'HCl 1M par l'extrait de feuilles de *citrus aurantiifolia* (conditions d'extraction : m/v: 25g/500ml, acide chlorhydrique 1M, 24h, filtration de l'extrait) a également été confirmée par Saratha et *al.* (2009).

L'efficacité de l'inhibition est de 97,51% pour une concentration de l'extrait de 2,5% à 343°C. Les auteurs ont expliqué cette efficacité d'inhibition de la corrosion par le fait que les extraits de sous produits d'agrumes sont riches en antioxydants et en composés polycycliques comme les phénols, particulièrement les flavonoïdes, ainsi qu'en vitamine C, en caroténoïdes et en polysaccharides aidant la formation du film sur la surface métallique (Raja & Sethuraman, 2008 ; Da Rocha et *al.,* 2010).

L'inconvénient majeur de ces études est que l'analyse phytochimique des extraits est rarement réalisée de sorte que l'identification des molécules actives est difficile. Il est également probable qu'un mélange de constituants présents peut potentialiser l'efficacité inhibitrice d'une substance particulière. Cet effet synergique est rarement investigué.

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'études concernant l'effet inhibiteur de la corrosion par les composés phénoliques individuelles des écorces d'orange mais seulement quelques articles ont rapporté l'inhibition de la corrosion par d'autres composés phénoliques de synthèse (**Tableau 15**). Abdallah et *al.* (2012) ont utilisé certains composés phénoliques o-aminophénol, le catéchol, salicaldehyde et l'acide salicylique pour l'inhibition de la corrosion de l'acier au carbone dans l'acide chlorhydrique.

Tableau 15. *Utilisation des composés phénoliques de synthèse comme des inhibiteurs de corrosion des métaux.*

Ingrédient actif	Molécule	Type du métal	Milieu	Efficacité inhibitrice	T°K	Type d'inhibition	Référence
4-(5-(4-dimethylamino) phenyl)-1H-pyrazol-5-yl) phénol **4-(5-(4-nitrophenyl)-1 H-pyrazol-5-yl) phénol**		Acier doux	1M HCl	85,0% pour 21×10^{-6} M	303	Inhibiteur mixte	Fouda et *al.,* 2013
O- aminophénol **Catéchol** **Salicylaldéhyde** **Acide salicyclique**		Acier au carbone	1M HCl	89,7%; 87,9%; 87,0%; 86,3% pour 11×10^{-4} M	303	Inhibiteur mixte	Abdallah et *al.,* 2012
Acide sinapique		Alliage Al–2.5Mg alliage	0.5 mol dm^{-3} NaCl	73,6% pour 5×10^{-4} mol/dm^{-3}	293	Inhibiteur cathodique	Vrsalovic et *al.,* 2007
Acide p-hydroxybenzoique (AHB) Acide protocatéchique (APC)		Alliage CuNi10Fe	0.5 mol dm^{-3} NaCl	77,9; 62,3% pour 10^{-3} mol/dm^{-3}	293 323	Inhibiteur cathodique	Vrsalovic et *al.,* 2011

Les auteurs ont conclu que ces composés phénoliques agissent comme inhibiteur mixte et que leur efficacité d'inhibition augmente avec l'augmentation de leurs concentrations mais diminue avec l'élévation de la température.

Fouda et *al.* (2013) ont proposé de nouveaux inhibiteurs de corrosion écologiques à base de dérivés phénoliques pour la protection de l'acier doux contre la corrosion: 4-(5-(4-diméthylamino) phényl) -1 H-pyrazole-5-yl) phénol et 4- (5 - (4-nitrophényl) -1H-pyrazol-5-yl) phénol. Les auteurs ont conclu que ces composés phénoliques agissent comme inhibiteur mixte et que leur efficacité d'inhibition peut atteindre 85%.

Vrsalovic et *al.* (2007) ont utilisé l'acide sinapique comme inhibiteur de corrosion de l'aluminium dans une solution de chlorure de sodium. L'efficacité d'inhibition de l'acide sinapique est de 73,4% il s'agit d'inhibition cathodique. Le pouvoir inhibiteur de cette molécule est du à une adsorption physique de la substance organique à la surface du métal.

Vrsalovic et *al.* (2011) ont étudié l'effet des acides phénoliques p-hydroxybenzoïque (HBA) et de l'acide protocatéchique (PCA) sur l'inhibition de la corrosion du cuivre. Les auteurs ont rapporté que l'efficacité d'inhibition de ces 2 compos 77,9% et 62,5%, respectivement et que l'inhibition est de type cathodique.

Conclusion

L'utilisation des inhibiteurs de la corrosion constitue un moyen de lutte contre la dégradation des métaux et des alliages. L'originalité de cette approche provient du fait que le traitement anticorrosion ne se fait pas sur le métal lui-même, mais par l'intermédiaire du milieu corrosif, ce qui est en fait une méthode de contrôle de la corrosion facile à mettre en œuvre.

Les molécules inhibitrices peuvent agir suivant différents mécanismes, leur conférant ainsi des performances d'inhibition en fonction du milieu d'étude. Les nombreuses études consacrées à ces composés ont abouti à proposer des produits ou des mélanges de produits précis correspondant à des systèmes de corrosion définis (couples métal/milieu corrosif). Cependant la plupart des composés utilisés sont des substances chimiques synthétiques souvent toxiques.

Les extraits des agro-ressources, sources de composés organiques naturels, se sont montrés efficaces et se présentent comme de nouvelles formulations ''vertes'' pour de nombreux métaux et alliages, pouvant se substituer aux composés toxiques. Les inhibiteurs naturels sont souvent hydrosolubles et biodégradables.

Les extraits naturels destinés à des applications industrielles de ce type peuvent être obtenus par des extractions conventionnelles, faciles à mettre en œuvre et constituent un mélange de molécules organiques pouvant avoir un effet synergique recherché offrant la possibilité d'utilisation d'un extrait entier tout en s'affranchissant des étapes de purification qui sont souvent nécessaires pour les applications alimentaires ou cosmétiques.

Conclusion de la revue bibliographique

Les écorces d'agrumes représentent un gisement d'ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques) ayant des applications potentielles dans l'industrie alimentaire (formulation de nutraceutiques et d'aliments fonctionnels) et non alimentaires (cosmétique, chimique, emballage,..). En dépit de cette richesse, à l'échelle industrielle, les coproduits d'agrumes sont essentiellement utilisés pour la récupération des huiles essentielles.

Les applications potentielles des substances bioactives des écorces d'agrumes ne sont possibles que si les molécules sont extraites d'une manière optimale préservant leur fonctionnalité. Certains auteurs se sont intéressés aux méthodes d'extraction par des techniques conventionnelles provoquant la plupart du temps une dégradation des composés thermolabiles de l'extrait à cause des températures élevées ou des longues durées d'extraction. D'autres études se sont focalisées sur les nouvelles technologies d'extraction respectueuses de l'environnement et utilisant des accélérateurs tels que l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction par CO_2 supercritique et l'extraction sous haute pression ou en impliquant des approches combinées pour l'intensification de l'extraction. Ces méthodes permettent de réduire la durée d'extraction, l'utilisation de basse température, un gain de solvant mais peuvent aussi entraîner la dégradation des composés phénoliques par exemple par l'utilisation de hautes pressions. L'utilisation des extraits des écorces d'orange comme inhibiteur de la corrosion des métaux et des alliages est très récente et prometteuse.

Cette étude bibliographique montre clairement que le développement d'un procédé de valorisation des écorces/coproduits d'orange nécessite une étude rationnelle au niveau des étapes d'extraction des biomolécules actives.

Dans une première partie de l'étude, l'extraction conventionnelle par solvant a été choisie comme méthode témoin car elle est facile à mettre en œuvre et elle est très largement utilisée pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes. Par la suite nous avons caractérisé les extraits en dosant les phénols totaux, les flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante des extraits. De plus nous avons réalisé une identification et quantification des flavonoïdes individuels.

Dans un seconde partie de l'étude, les méthodes suivantes : extraction assistée par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes, extraction par CO_2 supercritique et extraction sous haute

pression ont été mises en œuvre pour l'extraction des flavonoïdes des écorces d'agrumes. Nous souhaitons trouver la méthode d'extraction qui nous permet d'obtenir l'extrait le plus riche en flavonoïdes avec l'activité antioxydante la plus élevée. Les méthodes d'extraction ont été mises en œuvre pour que nous puissions comparer leur efficacité. Pour cela, nous avons décidé de travailler à une même température d'extraction (35°C), cette température permet de ne pas dégrader les composés cibles. Par la suite chaque méthode d'extraction s'est vue utiliser avec différentes conditions opératoires afin d'étudier l'effet des conditions opératoires sur l'efficacité de chaque méthode d'extraction.

Dans une dernière partie de l'étude, nous avons abordé la valorisation de la fraction phénolique de notre extrait qui a été utilisé comme inhibiteur de la corrosion de l'acier en milieu acide (pH=1) et basique (pH=12). Pour cela, l'efficacité d'inhibition de la corrosion par l'extrait des écorces d'orange et ses principales molécules antioxydants (la néohespéridine, la naringine et l'acide ascorbique) a été évaluée en utilisant les méthodes électrochimiques (les mesures de potentiel de corrosion, les courbes de polarisation et de la spectroscopie d'impédance électrochimique) et l'analyse de surface par microscopie électronique.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Réalisations des expériences

II.1.1. Préparation des échantillons

Un approvisionnement unique d'oranges « Maltaise demi-sanguines » a été effectué pendant le mois de mars 2012 par l'intermédiaire d'un agronome de la région de Manzel Bouzalfa. Les oranges cueillies étaient à maturité commerciale de couleur orange et d'un poids moyen de 185,00±7,07 g. Dès leur réception au laboratoire, les oranges ont été lavées avec de l'eau du robinet et épluchées. Les écorces d'orange collectées représentaient environ 40% des oranges reçues. Les écorces ont été stockées à -80°C puis lyophilisées (lyophilisateur CHRIST Alpha 1-2 LD, France) pendant 72h à -50°C et 0,001 mbar. Ensuite, les écorces ont été broyées finement à l'aide d'un moulin à café (Moulinex®, France) puis tamisées afin d'atteindre une taille de particule d'environ ~ 0,315 mm. La poudre obtenue a été ensuite conditionnée dans des sacs sous vide et stockée dans un congélateur à -18°C jusqu'à son utilisation.

II.1.2. Produits chimiques et standards

Tous les produits chimiques utilisés dans les expériences effectuées au cours de ces travaux sont indiqués dans le **tableau 16**.

Tableau 16 *Produits chimiques utilisés pour la réalisation des expérimentations.*

Produit	Fournisseur	Pureté (%)
Composés phénoliques : eriocitrine, narirutine, naringine, hespéridine, néohespéridine, didymine, sinensetine, tangeretine, nobiletine et 3',4', 5,5'6,7, hexaméthoxyflavone	Extrasynthese® (Lyon, France)	≥ 95-99.0
Persulfate de potassium	Fluka (Switzerland)	
Rutine	Sigma-Aldrich (Allemagne)	≥ 94,0
Nitrite de sodium ($NaNO_2$)		≥ 97
Trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$)		99,99
1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)		-
acide 6-hydroxy-2, 5, 7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic (trolox)		≥ 97,0
2,2'-azimobis (3 éthylbenzothiazoline -6-acide sulfonique (ABTS)		≥ 98,0
Réactif de Folin-Ciocalteu		-
Carbonate de sodium (Na_2CO_3)		-
Acide gallique monohydraté		≥ 98,0
Acide ascorbique		≥ 99,0
Acide chlorhydrique		-
Hydroxide de sodium (NaOH)	Carlo Erba-SDS, (France)	-
Méthanol		-
Ethanol	VWR (Belgique)	≥ 95,0
Acide acétique		≥ 99,7

II.2. Caractérisation chimique globale des écorces de l'orange Maltaise

La caractérisation chimique globale (eau, lipides, sucres, protéines, cendres) a été effectuée à partir des écorces fraîches surgelées non lyophilisées. Toutes les analyses ont été triplées.

II.2.1. Eau

La teneur en eau des écorces de l'orange Maltaise a été déterminée selon la norme internationale ISO 5534 (ISO, 2004). La teneur en eau est mesurée par la dessiccation de l'échantillon dans une étuve ventilée (Binder, 1505, Amilabo, France) à 105°C jusqu'à poids constant (~24 heures). La teneur en eau (X) est exprimée soit par rapport à la base humide en (%) (Equation 1) soit par rapport à la matière sèche (g eau/g matière sèche) (Equation 2).

$$X_{bh} = \frac{m_i - m_s}{m_i} \times 100 \qquad Eq.1$$

$$X_{bs} = \frac{m_i - m_s}{m_s} \times 100 \qquad Eq.2$$

où m_i est la masse de l'échantillon avant dessiccation en grammes, m_s est la masse de l'échantillon après dessiccation.

II.2.2. Cendres

La teneur en cendres des écorces de l'orange Maltaise a été déterminée selon la méthode officielle AOAC 972.15 (AOAC, 2006). 5 grammes d'échantillon sont pesés dans des creusets en porcelaine préchauffés. Les creusets sont ensuite placés pendant 5 heures dans un four à moufle à 550°C. A la sortie du four, les creusets sont refroidis dans un dessiccateur, avant d'être pesés et le pourcentage de teneur en cendres est déterminé selon l'équation 3.

$$Teneur\ en\ cendres = \frac{masse\ de\ cendres}{masse\ initiale\ de\ l'échantillon} \times 100 \qquad Eq.3$$

II.2.3. Protéines

La teneur en protéines des écorces congelées de l'orange Maltaise a été déterminée selon la norme internationale ISO 8968-1 (ISO, 2001), en utilisant un appareil de Kjeldahl. La détermination a été effectuée en trois étapes : une étape de minéralisation/digestion de l'échantillon. Pendant cette étape de digestion, l'azote protéique est transformé en azote ammoniacal par oxydation de la matière organique dans l'acide sulfurique concentré à haute

température (373°C, 3 heures environ), en présence d'un catalyseur (Hg (HgO), Cu ($CuSO_4$) ou Se) et d'un sel (K_2SO_4).

L'acide sulfurique concentré a pour but d'oxyder la matière organique et de transformer l'azote protéique en ammoniac (NH_3). Il sert également à piéger l'ammoniac gazeux sous la forme de sulfate d'ammonium, par action de la base avec l'acide. Ensuite, l'addition du sel K_2SO_4 qui a pour but d'élever le point d'ébullition de la solution pour accélérer la réaction de minéralisation de la matière organique.

L'étape de distillation de l'ammoniac consiste, en un premier temps, à libérer l'ammoniac sous la forme du sel $(NH_4)_2SO_4$ par l'addition d'une solution concentrée de NaOH en excès et ensuite, à distiller l'ammoniaque à la vapeur d'eau. L'ammoniaque distillée par la vapeur d'eau est piégée dans une solution d'acide borique. Elle réagit ensuite avec l'acide borique pour former des sels borates d'ammonium. L'ammoniaque sous la forme de borates d'ammonium est titrée directement à l'aide d'une solution standardisée d'acide (HCl ou du H_2SO_4), et d'un indicateur coloré. Ensuite, le pourcentage de protéines est calculé en utilisant un facteur F de conversion de 6,25 (Équation 4). La teneur en protéines est exprimée en g pour 100 g base sèche.

$$\%\ Protéines = \%\ N \times F = \frac{(V_E - V_B) \times C_N \times 14{,}01 \times F}{m_e} \qquad Eq.4$$

Où

V_E est le volume, en ml de l'acide chlorhydrique utilisé dans l'étape de titrage ; V_B est le volume en ml de l'acide chlorhydrique utilisé dans l'essai à blanc ; C_N est la molarité de l'acide chlorhydrique ; m_e est en g la masse de la prise d'essai.

II.2.4. Lipides

La teneur en matière grasse des écorces d'orange Maltaise a été déterminée par la méthode de Soxhlet (méthode officielle AOAC (1997)). Une prise d'essai de 10 g d'échantillon (M) est introduite dans une cartouche préalablement tarée qui est ensuite placée dans un extracteur. Un ballon contenant 300 ml d'éther de pétrole (M_1) est connecté au système chauffé sur une calotte. Huit heures après, le ballon est retiré du Soxhlet et le solvant est chassé à l'évaporateur rotatif. Le ballon est ensuite séché à l'étuve à 80°C pendant 24 heures puis pesé (M_2). La teneur en matière grasse est calculée selon l'équation 5. La teneur en matière grasse est exprimée en g pour 100 g base sèche.

$$\%\ Matiére\ grasse = \frac{(M_2 - M_1)}{M} \times 100 \qquad Eq.5$$

II.2.5. Sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs a été effectué selon la méthode de DNS (acide di-nitro-3,5 salicyclique) (Miller, 1959). Une coloration orangée du au réactif DNS apparait proportionnellement à la teneur en sucres réducteurs. Le réactif DNS est obtenu par mélange de 8g de soude, 5g de l'acide di-nitro-3,5 salicyclique, 150 g de tartrate double de sodium et de potassium, complété à 500 ml avec de l'eau distillée et conservé à l'abri de la lumière. 1 ml de réactif DNS est mélangé avec 1 ml de l'échantillon à analyser. Après homogénéisation du mélange, le tout est porté à 100°C pendant 10 min. A la sortie du bain marie, les tubes sont refroidis dans un bain de glace et 10 ml d'eau distillée est ajoutée pour arrêter la réaction. La lecture de l'absorbance à 540 nm permet la détermination de la teneur en sucre réducteur de l'échantillon à partir d'une gamme étalon de glucose (concentrations comprises entre 0 et 2,5 g/l). La teneur en sucres réducteurs est exprimée en g pour 100 g base sèche.

II.2.6. Vitamine C

Le dosage de la vitamine C a été effectué selon la méthode modifiée de Tabart et *al.* (2010) par utilisation du 2,6 dichlorophénol-indophénol (DCPIP). 2 ml de l'extrait des écorces d'orange sont ajoutés à 23 ml d'une solution d'acide métaphosphorique (HPO_3) à 5%, puis, un volume de 5 ml est prélevé auquel a été ajouté 5 ml d'une solution d'acide trichloroacétique à 20% dans HPO_3. La solution obtenue est alors filtrée puis 2 ml du filtrat a été mélangé avec 5 ml d'une solution tampon à pH 7,1 et 1 ml de 2-6 dichloro phénol indophénol (DCPIP). L'absorbance est mesurée à 530 nm.

Une gamme étalon a été réalisée en utilisant l'acide ascorbique, à des concentrations de 0, 5, 10, 15, 20 µg/l (R^2=0,9995). La teneur en vitamine C est exprimée en g pour 100 g de poudre des écorces d'orange.

II.3. Extraction, purification et analyse des pesticides dans les écorces d'orange Maltaise

II.3.1. Préparation de l'échantillon

Un approvisionnement unique d'oranges « Maltaise » a été effectué pendant le mois de mars 2012 par un agronome de la région de Manzel Bouzalfa. Les oranges cueillies étaient à maturité commerciale de couleur orangée et d'un poids moyen de 185,00±7,07 g. Dès réception au laboratoire, les oranges ont été lavées avec de l'eau du robinet et épluchées.

Les écorces d'orange collectées représentaient environ 40% des oranges reçues. Les écorces ont été conditionnées dans des sacs sous vide et stockées dans un congélateur à -80°C.

II.3.2. Extraction, purification et analyse des pesticides des écorces d'orange

L'extraction, la purification et l'analyse des pesticides des écorces d'orange a été effectuée selon la méthode QuEChERS décrite dans la norme NF EN 15662. Cette méthode permet l'extraction, la purification, la détection, la confirmation de l'identité et la quantification de 19 pesticides qui sont des pesticides homologués (avec une autorisation d'importation et d'utilisation en Tunisie) et le choix a concerné les pesticides les plus utilisés par les agriculteurs tunisiens et qui sont absolument exigés en contrôle techniques par les autorités de l'union européenne (pour l'export de nos produits). La validation de la méthode et la confirmation de la contamination ou l'innocuité des échantillons analysés ont été basée sur la notion de LMR, (limite maximale des résidus). Les LMRs sont fixé par l'autorité européenne de sécurité des aliments.

Pour cela, un échantillon de 10 g des écorces congelées est prélevé dans 10 ml d'acétonitrile. Après l'addition d'un mélange de sel de tampons (4±0,2g de sulfate de magnésium, 1±0,05g de chlorure de sodium, 1±0,05g de citrate trisodique-dihydraté et 0,5±0,03g de citrate d'hydrogène disodique), le mélange est secoué vigoureusement et centrifugé pendant 5 min à 4000 tours/min, afin de séparer les phases. Un aliquote de 6 ml de la phase acétonitrile est transvasé dans un tube de 15 ml. Les tubes sont conservés au congélateur pendant une nuit (pour l'élimination des graisses). Le surnageant est transvasé, par la suite, dans un tube à centrifuger en polypropylène de 15 ml qui contenant un mélange de 150 mg de PSA (absorbant à amine primaire et secondaire) et 900 mg de sulfate de magnésium ($MgSO_4$). Le mélange est vortexé et centrifugé pendant 5 min à 4000 tr/min. 500 µl de l'extrait purifié a été injecté à CL-SM-SM. La détermination est réalisée à l'aide d'un étalon interne de pesticides en poudres de haute pureté, ajouté à l'extrait après l'addition initiale d'acétonitrile.

L'analyse chromatographique des pesticides a été réalisée en utilisant un système de chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse (CL-SM/SM) triple quadripôle (Shimadzu 8030, Duisburg, Allemagne). La machine de CL est équipée d'une colonne de type Inertsil ODS-3 (100×2,1mm, 1,9 µm, GL science, Japon) à 40°C. La phase mobile est constituée d'un mélange méthanol/eau (50/50) (v/v) + 0,1 µmol d'acétate d'ammonium avec un débit de 0,4 mL/ min et un volume d'injection de 20 µl. Les paramètres de la détection SM/SM sont optimisés afin d'améliorer la sensibilité et la reproductibilité de détecteur SM.

Les conditions opératoires adéquates sont choisis pour permettre la détection et la quantification des toutes les molécules analysées simultanément selon les étapes suivantes : l'ion précurseur est choisi par un ajustement du rapport m/z spécifique, suivie d'une optimisation du 1er quadripôle, l'ion précurseur est fragmenté dans le 2ème quadripôle qui correspond à la chambre de collision.

L'énergie de collision (CE) est optimisée pour générer les ions fils qui seront ensuite détectés par le 3ème quadripôle. Les conditions opératoires retenues sont les suivantes : un débit du gaz nébuliseur de 1,5 L/min, un débit du gaz de séchage de 10 L/min, une température de source de 400°C, et l'argon à 230 kPa comme gaz de collision.

II.4. Extraction des composés phénoliques des écorces d'orange Maltaise

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour extraire les composés phénoliques des écorces d'agrumes. La méthode la plus utilisée est l'extraction conventionnelle par solvant (ECS) qui constituera notre méthode témoin. Les autres méthodes étudiées dans ce travail sont basées sur l'ECS mais intensifiées par l'utilisation des ultrasons, des micro-ondes et des hautes pressions. L'extraction par CO_2 supercritique a été également utilisée à titre comparative puisque même si elle demeure une technique chère et nécessitant un personnel qualifié, elle représente la méthode d'extraction de référence en termes de pureté d'extraction et pour son caractère écologique. Les teneurs en composés phénoliques totaux et individuels ainsi que l'activité antioxydante des différents extraits ont été déterminés.

II.4.1. Extraction conventionnelle par solvant (ECS)

Les conditions de l'extraction conventionnelle par solvant (ECS) ont été choisies selon les données de la littérature (Zia-ur-Rehman et *al.,* 2006 ; Li et *al.,* 2006a; Sawalha et *al.,* 2009; Tumbas et *al.,* 2010; M'hiri et *al.,* 2014). Le solvant utilisé est un mélange d'éthanol/eau à 80%. En effet, les solvants donnant la teneur la plus élevée en phénols totaux sont le méthanol et l'éthanol (Li et *al.,* 2006a).

Cependant, dans les applications industrielles, l'éthanol plus respectueux pour l'environnement est le plus souvent utilisé (Bartnick et *al.,* 2006). Une concentration d'éthanol variant de 70 à 80% est la plus utilisée dans la littérature pour l'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange. La température d'extraction a été fixée à 35°C pour éviter la dégradation des composés phénoliques au cours du processus de l'extraction.

Les cinétiques d'extraction ont été tracées en utilisant les conditions précédentes (éthanol 80%, m/v : 5g : 50ml, 35°C). D'après les cinétiques obtenues, 30 minutes d'extraction sont suffisantes pour atteindre l'équilibre et 3 extractions sont suffisantes pour obtenir plus de 95% de la teneur en composés phénoliques.

II.4.2. Extraction assistée par ultrasons (EAU)

L'extraction assistée par ultrasons est réalisée dans des conditions identiques à l'ECS. L'extraction est accélérée par l'utilisation des ultrasons (VibraCell 75115, Bioblock-Fisher, Illkirch, France). Ainsi 5 g de poudre des écorces d'orange sont introduits dans le sonicateur avec 50 ml de solvant (éthanol 80%). La température de la solution est régulée à 35°C. L'extraction dure 30 minutes et répétée 3 fois. Les ultrasons peuvent varier selon la puissance du sonicateur. Les puissances suivantes ont été utilisées lors de nos essais: 100, 125, 150 et 200 W.

II.4.3. Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

L'extraction assistée par micro-ondes est réalisée dans des conditions identiques à l'ECS. Elle est accélérée par l'utilisation de micro-ondes (Multiwave 3000, Microwave Reaction System, Graz, Austria). Ainsi 5 g de poudre des écorces d'orange sont introduites dans la chambre d'extraction avec 50 ml de solvant (éthanol 80%). L'extraction dure 180s et est répétée 3 fois. Les puissances micro-ondes appliquées varient de 100 à 400 W.

L'extraction n'est pas régulée en température, ainsi pour extraire à 35°C, il faut appliquer une puissance de 170 W pendant 10 s. La température de l'extrait a été mesurée en utilisant un thermomètre-K.

II.4.4. Extraction par CO_2 supercritique (SC-CO_2)

Dans cette méthode d'extraction, le CO_2 à l'état supercritique est utilisé comme solvant. Cette extraction a été effectuée en utilisant un extracteur à l'échelle pilote (ENSIC, LRGP, Nancy, France). L'installation utilisée est un système d'extraction dynamique où l'extracteur est un cylindre métallique, placé en série avec trois séparateurs (**Figure 11**).

Cette installation comprend une bouteille de CO_2, un échangeur froid, un échangeur chaud, une pompe haute pression et plusieurs bains thermostatés. Le CO_2 supercritique est utilisé comme solvant à une pression maximale de 250 bar. 5 g de poudre des écorces d'orange ont été placés dans 50 ml du liquide d'extraction. L'éthanol (80%) a été utilisé comme co-solvant. L'extraction a été conduite pendant 30 min à 35-80°C et une pression de 10-22 MPa. Le flux

de CO_2 a été maintenu à approximativement 15 g/min en ajustant le débit avec une valve manuelle. Le surnageant a été filtré par un filtre à solvant de 0,2 µm.

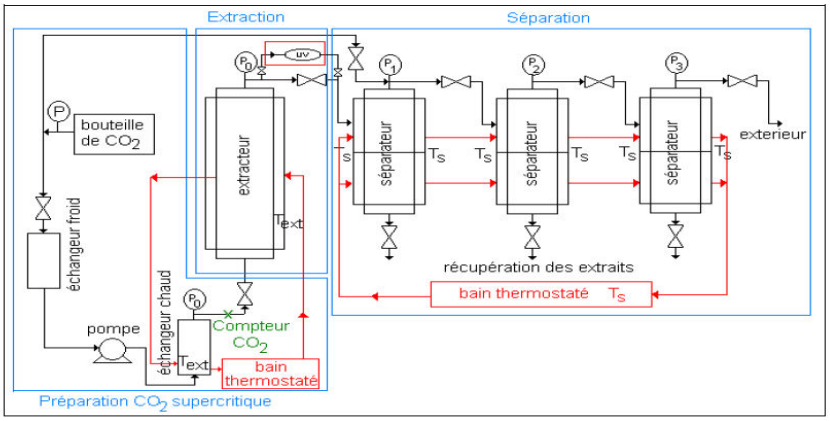


Figure 11. *Schéma de l'installation de l'extraction dynamique*

(Conditions limites d'utilisations : T= 80°C, P= 250 bar) (ENSIC, LRGP, Nancy, France).

II.4.5. Extraction sous haute pression (EHP)

L'extraction sous haute pression a été réalisée dans les mêmes conditions que l'ECS (éthanol 80%, m/v : 5g : 50ml, 35°C, 30 min) mais intensifiée par un traitement à haute pression variant de 0,1 à 100 MPa.

L'ensemble des traitements par hautes pressions a été réalisé dans la Halle de Technologie d'ONIRIS à Nantes à l'aide d'un pilote conçu par les Ateliers et Chantiers de Bretagne à Nantes (**Figure 12**).

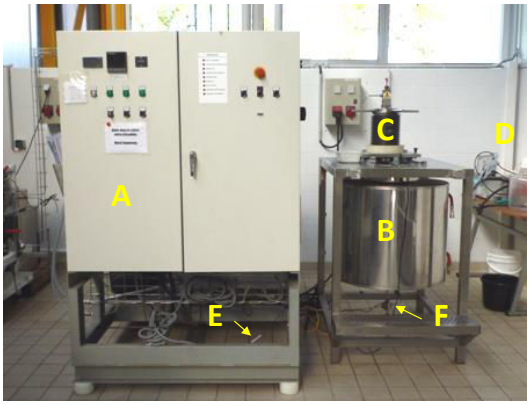


Figure 12. *Photo du pilote hautes pressions installé dans la Halle de Technologies d'ONIRIS (ACB Pressure Systems, Nantes, France). Sur cette image sont visibles : l'unité de contrôle et de commande (A), l'enceinte hautes pressions (B), l'obturateur à vis (C), le thermostat (D), le capteur de pression (E) et le capteur de température (F).*

L'enceinte du pilote est réalisée en acier inoxydable et mesure 120 mm de diamètre et 300 mm de hauteur utile pour un volume totale interne de 3,5 L. Une double enveloppe permet de réguler la température à l'intérieur de l'enceinte *via* un système thermostaté qui y fait circuler le fluide caloporteur. Le système de compression est ici un système indirect qui utilise une pompe haute pression et l'eau comme fluide de pressurisation. Cette pompe est équipée d'un vérin à piston plongeur mis un mouvement par l'arrivée et le refoulement successif d'huile. Cela permet au plongeur de comprimer l'eau, apporté par une pompe de gavage (**Figure 13**). L'enceinte hautes pressions est fermée hermétiquement à l'aide d'un obturateur à vis.

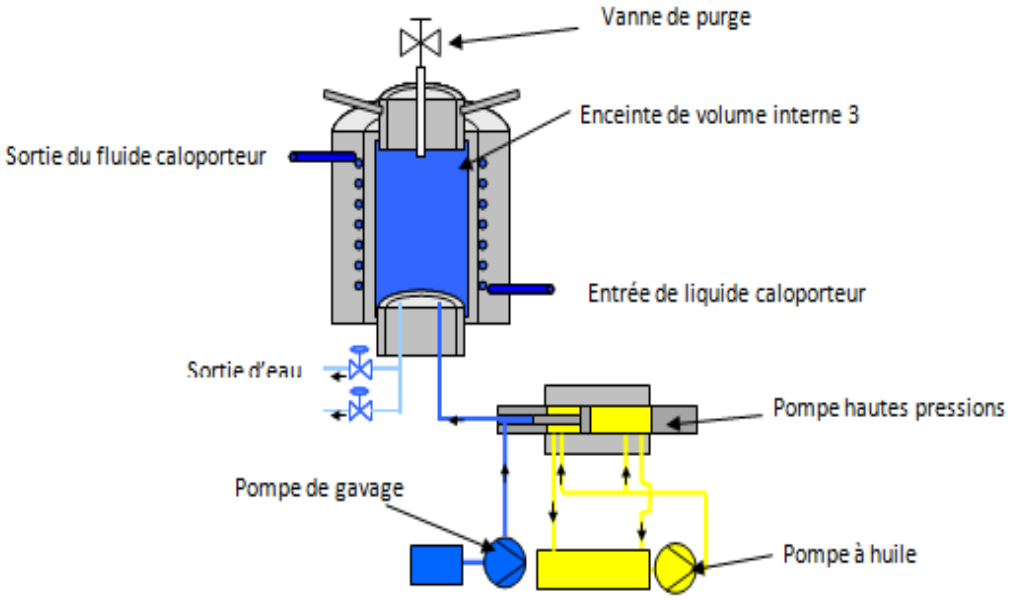


Figure 13. *Schéma du pilote hautes pressions du la Halle de Technologies d'ONIRIS (ACB Pressure Systems, Nantes, France).*

L'appareil est équipé d'un système de régulation automatique de la pression, ce qui permet de programmer une cinétique de montée en pression, d'obtenir un palier stable et de contrôler la descente en pression (de l'ordre de 2 à 3 secondes). Cet équipement peut atteindre une pression maximale de 600 MPa (Duranton, 2012).

5 g de poudre des écorces d'orange ont été extraites avec 50 ml d'éthanol/eau (80:20) dans une unité réacteur 3L (ACB Pressure Systems, Nantes, France). L'extraction a duré 30 min à 35°C et à une pression de 0,1 ; 50 ; 100 MPa.

II.4.6. Traitement post-extraction

Tous les extraits obtenus à la fin de l'étape de l'extraction sont refroidis à température ambiante et centrifugés à 8000g pendant 10 min. Les surnageants sont filtrés à l'aide d'un filtre à solvant de 0,2 µm. Les trois extraits ont été mélangés et stockés à 4°C.

II.5. Caractérisation de la composition phénolique des écorces d'orange Maltaise

II.5.1. Analyse des flavonoïdes et de leur activité antioxydante

Les phénols totaux, les flavonoïdes totaux, les flavonoïdes individuels et l'activité antioxydante ont été déterminés dans les différents extraits.

II.5.1.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux (PT) a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu modifiée selon Singleton et *al.* (1999).

40 µl de l'extrait des écorces d'orange ont été mélangés avec 200 µl de réactif de Folin-Ciocalteu et 3,160 ml d'eau déionisée. Le mélange a été agité par vortex et maintenu à température ambiante pendant 3 min, puis 600 µl de carbonate de sodium à 20% ont été ajoutés. Le mélange a été chauffé dans un bain marie à 40°C pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 765 nm en utilisant un spectrophotomètre (Genesys 10uV screnning, Thermo Electron Corporation, France).

Une gamme étalon a été réalisée en utilisant l'acide gallique, à des concentrations de 50, 100, 200, 300, 400 et 500 mg/l dans l'éthanol (R^2=0,9922). La teneur en phénols totaux a été exprimée en g d'équivalent acide gallique (GAE) par 100 g de poudre des écorces d'orange.

II.5.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux (FT) a été effectué par une méthode colorimétrique selon Zhishen et *al.* (1999) avec le trichlorure d'aluminium et la soude.

0,5 ml de l'extrait des écorces a été placé dans un tube plastique de 5 ml, puis, 2,5 ml d'eau distillée suivi par 0,15 ml de $NaNO_2$ (5%) ont été ajoutés. Après 5 min, 0,15 ml de $AlCl_3$ (10%) ont été rajoutés et enfin, après 1 ml de NaOH (1M) a été ajouté encore 5 min après. Le volume est complété par de l'eau distillée jusqu'à 5 ml. La solution a été mélangée et l'absorbance a été mesurée à 510 nm en utilisant un spectrophotomètre (Genesys 10uv screnning, Thermo Electron Corporation, France).

Une gamme étalon a été réalisée en utilisant la rutine à des concentrations de 40, 80, 120, 160 and 200 mg/l dans le méthanol (R^2=0.9985). La teneur en flavonoïdes totaux a été exprimée en g d'équivalent rutine par 100 g de poudre des écorces d'orange.

II.5.1.3. Dosage des flavonoïdes individuels

L'identification des flavonoïdes présents dans les écorces d'orange a été réalisée en deux étapes : une identification par spectrométrie de masse et une confirmation par analyse CLHP par l'utilisation de standards.

L'analyse qualitative des flavonoïdes des écorces d'orange a été réalisée en utilisant un système de chromatographie liquide à haute performance couplé à la spectrométrie de masse (CLHP-SM) (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA). La machine de CLHP est équipée d'un analyseur de masse (LTQ XL, Linear Trap Quadripole). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne C_{18} en phase inverse de type Alltima (150×2,1 mm, 5 µm porosité-Grace/Alltech, Darmstadt, Germany) équipée avec une pré-colonne C18 de type Alltima (7,5×2,1 mm, 5 µm porosité- Grace/Alltech) à 25°C. La phase mobile est constituée d'un solvant A : eau-acide formique (0,1%) et un solvant B méthanol-acide formique (0,1%). Les composés phénoliques ont été élués selon le gradient suivant : 10% à 100% de B en 78 min avec un débit de 0,2 mL/ min.

Les paramètres de la spectrométrie de masse sont comme suit: électrospray en mode ionization positive (ESI^+) activé; le voltage spray a été positionné à 5 kV; la source des gaz a été fixée (en unité arbitraire min^{-1}) pour les gaz de gaine, auxiliaire et de balayage à 40, 10 et 10, respectivement; la température capillaire est positionnée à 300°C; le voltage capillaire est positionné à 48V; les lentilles en tube, divisionnelles et frontales, ont été fixées à 138 V, -38 V et -4,25V, respectivement.

Les paramètres d'ions optiques sont optimisés par le réglage automatique en utilisant une solution de rutine (M=610) à 0,1gL^{-1} éluée dans la phase mobile (A/B: 50/50) à un débit de 5µL/min. Tous les spectres SM scannés ont été acquis de 100 à 2000 m/z.

La chromatographie en phase liquide à haute performance (Elite LaChrom, VWR-Hitachi, France) a été employée pour la séparation, l'identification et la quantification des composés phénoliques individuels de l'extrait des écorces d'orange. Elle comprend les éléments suivants : une pompe (Spectra System P4000), un détecteur ultraviolet à barrette de diodes de balayage de 290 à 340 nm (Spectra System UV 6000LP), un dégazeur (Spectra System SCM) 1000 et un injecteur/passeur automatique (Spectra System AS3000).

Ce système est équipé par un logiciel (Thermo Chromquest). L'extrait des écorces d'orange a été filtré avec un papier millipore (0,22 µm). 20 µl du filtrat a été injecté sur une colonne C_{18} en phase inverse de type Apollo (Grace, Belgium) (150×4,6 mm, 5 µm taille de particule), thermostatée à 40°C. La phase mobile est constituée d'un solvant A, eau-acide acétique (2%) et solvant B, méthanol-acide acétique (2%).

Le gradient utilisé est le suivant: 5 min, 10% B ; 78 min, 100% B ; 88 min, 100% B ; 90 min, 10% B ; 100 min, 10% B. Le volume d'injection est de 20 µL et le débit est de 1 ml/min. Les spectres UV ont été enregistrés à 280 nm pour la détermination quantitative de flavanones et à 340 nm pour les flavones polyméthoxylés. Les standards eriocitrine, naringine, narirutine, hespéridine, néohespéridine, didymine, sinensétine, tangérétine, nobiletine et 3',4',5,5'6,7, hexaméthoxyflavone sont préparés à une concentration de 250 mg/L.

L'hespéridine a été préparée à une concentration de 20 mg/L en raison de sa faible solubilité. Des dilutions appropriées avec du méthanol, de l'éthanol ou un mélange d'éthanol/DMSO à partir de solutions mères ont été réalisées. Les solutions sont filtrées sur papier Millipore (0,22 µm) avant utilisation.

Des courbes d'étalonnage ont été obtenues en traçant la surface du pic par rapport à la concentration ($R^2 \geq 0{,}98$). Les concentrations de flavonoïdes dans les extraits ont été déterminées par l'utilisation des courbes d'étalonnage obtenues (Annexe).

Les limites de détection (LOD) de la CLHP utilisée pour l'analyse des flavonoïdes sont 9000 ua pour la détection à 290 nm et 50 u.a. pour la détection à 340 nm. Les limites de quantification (LOQ) ont été calculées en fonction de chaque courbe d'étalonnage. Les résultats sont rassemblés dans le **tableau 31** de **l'annexe 1**.

II.5.1.4. Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été mesurée par deux méthodes : ABTS et DPPH.

- *Test ABTS*

L'activité antioxydante a été déterminée par le test ABTS selon la méthode modifiée de Re et *al.* (1999). Une solution étalon stable de ($ABTS^{\bullet+}$) a été préparée en faisant réagir 7mmol/l d'une solution aqueuse de ABTS avec 2,45 mmol/l de persulfate de potassium. Après l'addition de 220 µl de la solution étalon ($ABTS^{\bullet+}$) à 80 µl d'extrait d'écorces d'orange l'absorbance à 734 nm est déterminée à 30°C, exactement 1 min après l'agitation initiale (A_0) et encore une fois à 15 min (A_t) en utilisant un spectrofluorimétre (SAFAS flx Xenius, Monaco). Le pourcentage d'inhibition d'absorption, a été calculé, entre A_0 et A_t, en appliquant l'équation 6. Pour chaque essai, l'éthanol a été utilisé comme blanc.

$$Pourcentage\ d'inhibition = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100 \qquad Eq.6$$

Où A_0 est la densité optique initiale et A_t : la densité optique finale.

La pente de la droite f (pourcentage d'inhibition) = (concentration de l'extrait µM) est divisée par la pente de la droite f (pourcentage d'inhibition) = (concentration de Trolox µM).
La valeur trouvée indique la quantité de Trolox nécessaire pour obtenir un pouvoir inhibiteur équivalent à une mole de l'échantillon analysé. Les résultats ont été exprimés en capacité antioxydante d'équivalent Trolox (TEAC) en micromole Trolox équivalent. Les expériences ont été répétées 3 fois.

- *Test DPPH*

L'activité antioxydante a été déterminée selon la méthode de Burda & Oleszerk (2001). 46,7 mg/l de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) a été préparé en diluant 11,7 mg de DPPH avec 250 ml de méthanol incubé à l'abri de la lumière. 80 µl d'extrait des écorces d'orange ont été ajouté à 220 µl de la solution de DPPH. L'absorbance a été mesurée à 25°C, exactement 1 min après l'agitation initiale (A_0) et encore une fois à 30 min (A_t). Le pourcentage d'inhibition d'absorption à 515 nm, a été calculé, en utilisant un spectrofluorimètre (SAFAS flx Xenius, Monaco), entre A_0 et A_t, en utilisant l'équation 6. Le méthanol a été utilisé comme blanc.
La pente de la droite f (pourcentage d'inhibition) = (concentration de l'extrait µM) est divisée par la pente de la droite f (pourcentage d'inhibition) = (concentration de Trolox µM). La valeur trouvée indique la quantité de Trolox nécessaire pour obtenir un pouvoir inhibiteur équivalent à une mole de l'échantillon analysé. Les résultats ont été exprimés en capacité antioxydante d'équivalent Trolox (TEAC) en micromole Ttrolox équivalent. Les expériences ont été répétées 3 fois.

II.5.1.5. Additivité de l'activité antioxydante

Pour vérifier l'additivité de l'activité antioxydante, un mélange des 10 composés phénoliques identifiés précédemment a été préparé selon la composition trouvée de l'extrait obtenu par ECS. L'activité antioxydante de ce mélange a alors été mesurée (TEAC expérimental). Un TEAC prédit a été calculé à partir des activités antioxydantes des composés individuels corrigées par la fraction molaire (Équation 7).

$$TEAC\ prédicte = \sum_{i=1}^{10} \prod Mi \times TEACi \qquad Eq.7$$

Mi: Fraction molaire de chaque composé phénolique i
TEACi: Activité antioxydante de chaque composé phénolique i

II.6. Étude électrochimique de l'acier en présence de l'extrait ou de ses composés antioxydants : étude des techniques et conditions expérimentales

II.6.1. Techniques d'étude

Les méthodes d'évaluation de la corrosion sont très nombreuses. Dans le cas de l'inhibition de la corrosion des métaux en milieu acide (acide chlorhydrique, HCl), les plus utilisées et les plus citées dans la littérature dans sont: la gravimétrie, les techniques de polarisation potentiodynamique, la voltamètrie cyclique et la spectroscopie d'impédance électrochimique. L'état de surface des métaux est analysé dans la plupart des travaux étudiés par des techniques telles que la microscopie électronique à balayage (MEB) (Mercer, 1985).

II.6.1.1. Techniques d'études électrochimiques

Les méthodes électrochimiques peuvent être classées en deux groupes : les méthodes stationnaires et les méthodes non-stationnaires dites transitoires.

- **Méthodes stationnaires**

❖ *Suivi du potentiel en circuit ouvert*

Cette technique simple apporte des informations préliminaires sur la nature des processus se produisant à l'interface métal/électrolyte. Au bout d'un temps suffisamment long pour qu'un régime stationnaire soit établi, l'électrode métallique prend, par rapport à la solution un potentiel, appelé potentiel de corrosion (*Ecorr*). *Ecorr* est un indicateur qualitatif de l'état de corrosion d'un substrat métallique dans un milieu électrolytique. Cette mesure permet également de connaître la durée d'immersion minimale nécessaire à l'établissement d'un état stationnaire/stable indispensable pour le tracé des courbes de polarisation

❖ *Courbes de polarisation*

Les courbes courant-tension stationnaires permettent d'estimer la vitesse de corrosion, de connaître le type de l'inhibition (cathodique, anodique, mixte) et d'appréhender la formation de couches protectrices et/ou de films inhibiteurs. Cet effet peut se caractériser sur ces courbes par l'invariance du courant sur un large domaine de surtension appliquée.

- **Méthode transitoire: la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)**

Les techniques dites non-stationnaires ou transitoires sont basées sur la perturbation des grandeurs physiques du système électrochimique de sorte que la réponse du système puisse

être analysée dans un domaine linéaire invariant dans le temps. Ces techniques ont été développées afin de pallier un certain nombre de contraintes apparues lorsque l'on veut calculer la vitesse de corrosion d'un métal ou lorsque l'on étudie les mécanismes réactionnels mis en jeu. Si une étude stationnaire suffit parfois, elle se révèle nettement insuffisante quand le degré de complexité du système électrochimique s'accroît.

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une méthode non-stationnaire qui permet d'avoir des informations sur les étapes élémentaires qui constituent le processus électrochimique global. Son principe consiste à superposer au potentiel de l'électrode une modulation de potentiel sinusoïdale de faible amplitude et à suivre la réponse en courant sur une gamme de fréquences du signal perturbateur. La réponse en courant est également sinusoïdale, superposée à un courant stationnaire mais déphasée d'un angle Ø par rapport au potentiel. Inversement, un courant peut être imposé et le potentiel est enregistré (**Figure 14**).

❖ *Représentation traditionnelle des données*

Habituellement, il existe deux modes de représentation des diagrammes d'impédance électrochimique (**Figure 14**). Ils peuvent être tracés en coordonnées cartésiennes dans le plan complexe de Nyquist en plaçant les valeurs Z_{Re} (ω) en abscisse et $-Z_{Im}(\omega)$ en ordonnée dans un repère orthonormé. La représentation de Bode est l'autre représentation classique pour visualiser les diagrammes. Dans ce cas, le module de l'impédance |Z| (représenté en échelle logarithmique) et le déphasage ϕ sont tracés en fonction de la fréquence, elle aussi représentée en échelle logarithmique.

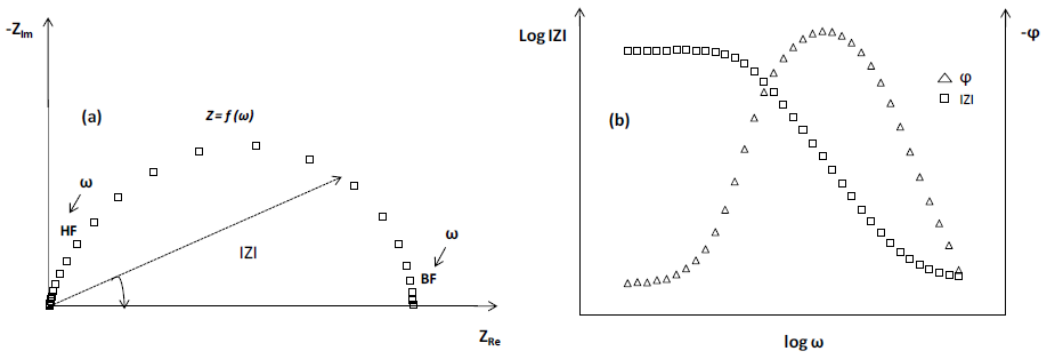


Figure 14. *Représentation de l'impédance électrochimique en coordonnées de Nyquist (a) et de Bode (b) avec HF : haute fréquence, BF : base fréquence.*

Ces deux visions différentes d'un même résultat ne sont pas en compétition, elles sont complémentaires; chacune d'entre-elles montre un aspect particulier du diagramme

d'impédance. La représentation de Nyquist permet de voir les différentes «boucles et droites» du diagramme mais masque souvent les résultats à haute fréquence. Cette représentation permet de déterminer des paramètres tels que la résistance de l'électrolyte (R_e), la résistance de transfert de charge (R_t) et la capacité de double couche (C_{dc}).

La représentation de Bode offre la vision complète du domaine de fréquence, tout en étant moins parlante pour identifier certains phénomènes caractéristiques.

❖ *Utilisation de schémas électriques équivalents*

L'impédance d'un système électrochimique peut être assimilée par analogie à une impédance électrique. Les différents processus se déroulant à l'interface électrode/électrolyte peuvent être modélisés par la construction d'un circuit électrique équivalent. Chacun des composants utilisés, branchés en séries ou en parallèle, représente un phénomène physique particulier. Ces modèles sont ensuite utilisés pour ajuster les diagrammes expérimentaux afin d'extraire les paramètres nécessaires à la compréhension du système étudié. Dans la construction de ces circuits électriques équivalents, les principaux composants utilisés sont la résistance *R*, la capacité *C* et l'inductance *L*.

D'autres composants sont propres aux processus électrochimiques comme l'impédance de Warburg liée à une diffusion semi-infinie. En régime dynamique, une interface électrode/électrolyte simple se comporte comme un condensateur appelé condensateur de double couche interfaciale et noté C_{dc}. Cette double couche étant décrite par trois principaux modèles: Helmotz, Gouy-Chapman et Stern (Landolt, 1993). Le comportement en régime dynamique d'une réaction redox en l'absence de gradient de concentration des espèces électroactives est donc analogue à celui du circuit électrique de la **figure 15**, appelé circuit de Randles simplifié.

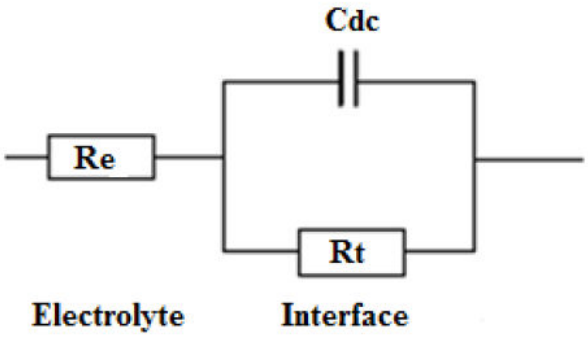


Figure 15. *Circuit de Randles d'une interface électrochimique simple (De Waard & Milliams, 1975).*

Ce circuit comprend la résistance de transfert de charges (R_t), la résistance de l'électrolyte (R_e) qui représente la chute ohmique dans l'électrolyte entre les électrodes de travail et de référence lorsqu'un courant passe. Notons que C_{dc} et R_t sont introduites en parallèle pour rendre compte qu'au niveau de l'interface, l'établissement de la double couche (modification de la répartition des charges électriques à l'interface) et le transfert de charge (transfert d'électrons à travers l'interface et qui est dû aux réactions électrochimiques) s'effectuent simultanément. Il existe bien d'autres types de circuits équivalents, chacun d'entre eux décrivant un système particulier. La manière dont est branchée chaque composant ainsi que l'ordre de leur apparition sont importants, à la fois pour le calcul de l'impédance et pour la lisibilité du modèle. Comparées aux méthodes stationnaires, les mesures d'impédance apportent une analyse plus complète du mécanisme d'action de l'inhibiteur, puisqu'elles permettent de séparer les différents mécanismes intervenant lors du processus d'inhibition. Toutefois, leur exploitation est plus délicate puisqu'il est parfois difficile de trouver le circuit électrique équivalent correspondant le mieux à l'interface électrode/électrolyte c'est-à-dire explicitant les différents phénomènes s'y produisant.

II.6.1.2. Analyse de surface par Microscope Électronique à Balayage (MEB)

Le MEB est actuellement la technique la plus utilisée en matière de topographie à l'échelle microscopique.Son avantage considérable par rapport à des microscopes optiques, par exemple, réside dans le fait que l'image ne souffre pas d'une profondeur de champ limitée. Le principe de la microscopie électronique à balayage consiste à balayer la surface d'un échantillon par un faisceau d'électrons finement localisé pour en collecter, par détecteurs respectifs, les électrons secondaires et les électrons rétrodiffusés. Le matériau analysé doit être conducteur afin d'éviter des phénomènes de charges dus aux électrons : la métallisation peut s'effectuer par exemple au carbone ou encore à l'or.

II.6.2. Conditions expérimentales

II.6.2.1. Étude électrochimiques

Les coupons d'acier (C: 0,32-0.39 wt. %, Mn: 0,5-0,8 wt. %) de 3 cm^2 de surface ont été utilisés comme électrode de travail pour les mesures électrochimiques. Afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles, l'électrode du travail subit avant chaque manipulation, un prétraitement, qui consiste en un polissage mécanique (Struers Rotopol-2 polishing machine) de la surface de l'électrode au papier abrasif de granulométrie de plus en plus fine à l'aide papier de carbure de silicium (SiC) de grade 120, 600 et 1200, suivie d'un rinçage avec de

l'eau distillée puis un dégraissage dans l'éthanol et enfin un séchage sous flux d'air. Les électrodes d'essai ont été placées au fond d'une cellule en plastique à trois électrodes en face de la contre électrode constituée d'une grille de platine de grande surface (5 cm^2) (**Figure 16**). Avant chaque expérience, la cellule a été nettoyée à l'éthanol, rincée à l'eau distillée et séchée à l'aide de papier absorbant.

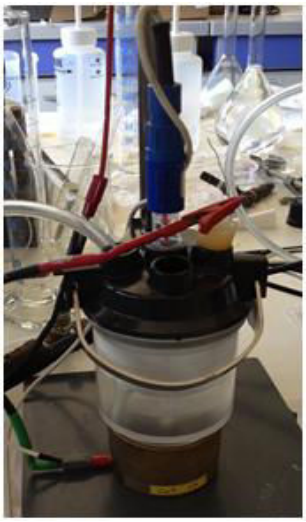


Figure 16. *Cellule électrochimique à trois électrodes comprenant une contre-électrode en platine, une électrode de référence en calomel KCI saturée et l'électrode de travail en acier (Institut Jean Lamour-UMR CNRS, Nancy, France).*

L'électrode de référence utilisée est une électrode au calomel-KCL saturée (ECS). Celle-ci présente un potentiel de + 0,241 V par rapport à l'électrode standard d'hydrogène. Les tests électrochimiques ont été réalisés sous bullage d'air industriel et à température ambiante (22°C). Le balayage du potentiel est réalisé par un Versastat4 Potentiostat piloté par le logiciel Versastudio software.

En raison de la faible solubilité des composés phénoliques testés, la caractérisation électrochimique a été réalisée dans une solution eau/éthanol (50/50). L'extrait des écorces d'orange Maltaise obtenu par extraction conventionnelle par solvant (ECS) a été dilué à 10% et 50% en utilisant une solution d'eau/éthanol (50/50).

Les molécules inhibitrices utilisées sont des molécules pures de synthèse (la néohespéridine, la naringine et l'acide ascorbique). Elles sont ajoutées séparément avec des concentrations de 10^{-5} M. Dans les différents cas, Le pH de la solution corrosive (eau/éthanol (50/50) + extrait des écorces d'orange ou molécules antioxydantes pures) a été ajusté à 1 en ajoutant de faibles quantités de HCl 1M.

Les mêmes expériences ont été réalisées aussi à pH=12 en ajustant le pH de la solution avec de la soude (NaOH) pour atteindre la valeur souhaitée.

La séquence expérimentale suivante a été utilisée:

a) Mesure du potentiel de corrosion (E_{corr}).

b) Mesure du spectre d'impédance électrochimique de 100 kHz à 5 MHz à une amplitude de 20 mV, toutes les 2 h pendant une durée de 8 heures

Les données d'impédance ont été analysées avec le logiciel ZSimpWin3.21, en utilisant l'ajustement non-linéaire par la méthode des moindres carrés (Boukamp, 1986). La résistance de transfert de charge R_{ct} a été évaluée dans chaque cas et l'efficacité de l'inhibition EI (%) a été déterminée selon l'équation 8.

$$E.I.(\%) = \frac{(R_{ct0} - R_{ct})}{R_{ct}} \qquad Eq.8$$

Où R_{ct0} est la résistance de transfert de charge calculée sans inhibiteur dans le milieu corrosif.

c) Les courbes de polarisation anodique et cathodique ont été enregistrées de façon indépendante

II.6.2.2. Analyse de la surface par microscope électronique à balayage (MEB)

Afin d'investiguer l'effet corrosion/conversion en présence d'inhibiteur (l'extrait des écorces d'orange ou les molécules antioxydants pures), des coupons d'acier (1cmx1cm) ont été immergés pendant 10 jours dans un bain composé d'eau/éthanol (50/50) contenant séparément l'extrait des écorces d'orange et les molécules inhibitrices avec une concentration de 10^{-5} M et à un pH ajusté à 1 avec HCl, à pH ajusté à 12 avec NaOH. Les échantillons ont été analysés en les scannant avec le microscope à balayage électronique (FEG-SEM Hitachi S4800). La tension d'accélération du faisceau incident a été fixée à 1 kV afin d'être sensible à la morphologie de la surface extrême.

II.6.2.3. Protection de l'acier contre la corrosion par l'extrait des écorces d'orange et les composés phénoliques

Les plaques d'acier au carbone, d'une surface de 3 $cm^{2,}$ ont été immergées dans 4 solutions: un blanc éthanol/eau (50/50), la néohespéridine, la naringine à 10^{-5}M dilués dans éthanol/eau (50/50) et l'extrait des écorces d'orange dilué à 10%.

Le pH a été mesuré pour les quatre solutions : 6,1 ; 6,2 ; 6,7 ; 6,2 ; 5,7 ; respectivement. L'immersion des plaques a duré 10 jours. Les tests électrochimiques ont été réalisés en utilisant EAU-ASTM comme solution agressive qui constitue notre milieu de corrosion et qui est comparable aux conditions de corrosion atmosphérique. Selon la norme ASTM D 1384-84, la composition de l'eau-ASTM est : [Na_2SO_4]= 0,148 g/l, [$NaHCO_3$]= 0,138 g/l et [NaCl]= 0,165 g/l.

II.7. Traitement statistique des données

Les valeurs des paramètres étudiés ont été exprimées sous forme de moyennes ± écart type. Le nombre de répétition est de 3. La comparaison entre les échantillons a été effectuée par l'analyse des variances (ANOVA) suivie du test de Duncan. Ces analyses ont été réalisées en utilisant le logiciel IBM. SPSS 20.0, le seuil de signification est de 0,05. Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test Duncan.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Caractérisation physico-chimique des écorces de l'orange Maltaise

Introduction

Les écorces d'agrumes sont des matrices hautement valorisables vue leur disponibilité et leur richesse en ingrédients nutritionnels et fonctionnels (Kammoun et *al.,* 2011). Ce coproduit industriel est surtout utilisé pour l'extraction des essences et des huiles essentielles (Tian et *al.,* 2001; Virot et *al.,* 2008; Chutia et *al.,* 2009; Singh et *al.,* 2010), l'extraction des fibres (Bicu et *al.,* 2011; Wang et *al.,* 2014), la formulation des produits alimentaires (bonbons, confitures, ..) et aussi en tant qu'aliment pour bétails (Bocco et *al.,* 1998; Bampidis & Robinson, 2006; Ledesma-Escobar & Luque de Castro, 2014). Les écorces d'agrumes sont aussi utilisées pour la production des biocarburants (éthanol) et des biogaz (Wilkins et *al.,* 2007; Pourbafrani et *al.,* 2010 ; Lohrasbi et *al.,* 2010).

Pour proposer une valorisation optimale d'un agro-produit il faudrait tout d'abord identifier sa composition chimique et estimer la teneur des composés d'intérêt (ici les composés phénoliques); ceci sera l'objectif de ce premier chapitre de la partie résultats et discussion.

III.1.1. Composition physico-chimique des écorces de l'orange

Le **tableau 17** présente la composition chimique globale (l'humidité, les sucres réducteurs, les protéines, les cendres et les lipides), les teneurs en principaux antioxydants (les phénols totaux, les flavonoïdes totaux, la vitamine C) et le pH des écorces de l'orange Maltaise et d'autres variétés d'agrumes.

Les écorces de l'orange Maltaise sont riches en eau (3,169±0,123 g eau/g de matière sèche, soit 76,015±0,054% en base humide), en ingrédients nutritionnels comme les sucres solubles (46,241±0,015 g/100g bs), les protéines (8,120±0,120g/100g bs) et les minéraux (3,170±0,035 g/100g bs). Par contre, ce coproduit renferme une faible teneur en lipides (0,800±0,030 g/100g bs). Ces résultats coïncident avec ceux rapportés par Kammoun et *al.* (2011) pour les écorces de l'orange Maltaise examinées au même stade de maturité (maturité commerciale).

Les écorces de l'orange Maltaise sont aussi riches en ingrédients fonctionnels comme les phénols totaux (1,968±0,002 g/100g bs) dont les flavonoïdes totaux (1,012±0,003 g/100g bs),

qui sont une classe des phénols caractéristique des écorces d'agrumes et aussi en vitamine C (0,105±0,003 g/100g bs).

Tableau 17. *Caractéristiques physico- chimiques des écorces d'orange en pleine maturité.*

	***Teneurs** (g/100g base sèche)*		
Composant	**Orange Maltaise** *Cette étude*	**Orange Maltaise** *(Kammoun et al., 2011)*	**Autres variétés d'agrumes***
Humidité [a, b]	3,169±0,123 76,015±0,054	2.970 ± 0.083 74,804±0,524	3,01-3,79
Sucres réducteurs[c]	46,241±0,015	46,649±1,859	6,52-47,81
Protéines[c]	8,120±0,120	8,015± 0,374	1,79-9,06
Cendres[c]	3,170±0,035	3,313 ± 0,024	2,52-10,03
Lipides[c]	0,800±0,030	0,955 ± 0,033	0,48-4,00
Phénols totaux FC[c]	1,968±0,002	1,130 ± 0,040	0,67-22,32
Flavonoïdes totaux col[c]	1,012±0,003	-	0,03-2,32
Vitamine C[c]	0,105±0,003	-	0,109-1,150
pH[c]	5,670±0,010	5,257±0,006	-

Les valeurs calculées sont les moyennes de trois répétitions±écart-type. [a] g eau/g bs ; [b] % (base humide) ; [c] g/100g bs ; FC : méthode de Folin-Ciocalteu ; Col: méthode colorimétrique.

**Kammoun et al., 2011; Ghanem et al., 2012 ; Marin et al., 2007 ; Fiaguerola et al., 2005 ; Magda et al., 2008 ; Grigelmo-Minguel et al., 1999 ; Masmoudi et al., 2008 ; Gorinstein et al., 2001; Chinapongtitiwat et al., 2013 ; Lagha-Bernamrouche et al ., 2013 ; Chen et al., 2011 ; Cheynier et al., 2006 ; Ghasemi et al., 2009 ; Goulas et al., 2012 ; Barros et al., 2012.*

Kammoun et *al.* (2011) ont rapporté que la teneur en phénols totaux des écorces de l'orange Maltaise est de 1,130±0,040 g/100g bs. Cette différence peut être due aux différentes conditions d'extraction utilisées.

Les paramètres d'extraction utilisés dans notre étude sont : éthanol 80%, ratio: 5:50, agitation mécanique à l'obscurité pendant 30 minutes à 35°C, 3 extractions successives, centrifugation, filtration de l'extrait sans évaporation ni lyophilisation du résidu pour éviter la dégradation des composés phénoliques sous l'effet de la chaleur. Par contre, Kammoun *et al.* (2011) ont effectué une extraction à température ambiante pour une durée d'extraction plus courte (1h contre 1h30) et un seul cycle d'extraction suivie d'une évaporation sous vide du filtrat et une lyophilisation du résidu.

La différence des teneurs en phénols entre les résultats obtenus pour une même matrice végétale et une même origine géographique et en utilisant une extraction conventionnelle par solvant (avec différentes conditions opératoires), montre que le rendement d'extraction des phénols est variable selon les conditions d'extraction utilisées d'où l'intérêt de standardiser le protocole d'extraction des composés bioactifs des agro-ressources.

Selon le **tableau 17**, la teneur en flavonoïdes totaux représente à peu près 50% de la teneur en phénols totaux des écorces de l'orange Maltaise.

Ce résultat est en concordance avec celui annoncé par Wang et *al.* (2011) pour les écorces de *Citrus sulcata*. D'autres études ont indiqué que les teneurs en flavonoïdes totaux des écorces d'agrumes peuvent varier d'une façon importante de 1,4% (Goulas et *al.,* 2012) à 80% (Sultana et *al.,* 2008) selon les variétés. Ces variations peuvent s'expliquer 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 avec celle d'autres variétés d'agrumes, on peut conclure que les écorces d'agrumes ont des caractéristiques chimiques communes :

-Une teneur très élevée en eau ≥ 75% rendant ce coproduit hautement périssable. Par conséquent, il est nécessaire de le stabiliser ou le conserver immédiatement pour éviter la fermentation et le développement des moisissures.

-Un extrait sec des écorces d'agrumes (orange, citron, mandarine, pamplemousse) est représenté essentiellement par les sucres totaux (6,52-47,81 g/100g bs) (Kammoun et *al.,* 2011; Ghanem et *al.,* 2012 ; Marin et *al.,* 2007 ; Masmoudi et *al.,* 2008), les protéines (1,79-9,06 g/100g bs) (Kammoun et *al.,* 2011; Ghanem et *al.,* 2012 ; Marin et *al.,* 2007 ; Fiaguerola et *al.,* 2005 ; Magda et *al.,* 2008 ; Grigelmo-Minguel et *al.,* 1999 ; Masmoudi et *al.,* 2008), les minéraux (2,52-10,03 g/100g bs) (Kammoun et *al.,* 2011; Ghanem et *al.,* 2012 ; Marin et *al.,* 2007 ; Fiaguerola et *al.,* 2005 ; Magda et *al.,* 2008), et de faibles taux de lipides (0,48-4,00 g/100g bs) (Kammoun et *al.,* 2011; Ghanem et *al.,* 2012 ; Marin et *al.,* 2007 ; Masmoudi et *al.,* 2008). La richesse des écorces en sucres solubles explique leur transformation en mélasse pour l'alimentation du bétail (Bocco et *al.,* 1998).

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.,* 2007; Causse et *al.,* 2007).

-Le potentiel antioxydant des écorces d'agrumes est représenté par les phénols totaux (0,67-22,3 g/100 bs) (Kammoun et *al.,* 2011; Ghanem et *al.,* 2012 ; Magda et *al.,* 2008 ; Gorinstein

et *al.,* 2001; Lagha-Bernamrouche et *al.,* 2013 ; Chen et *al.,* 2011 ; Cheynier et *al.,* 2006 ; Ghasemi *et al.,* 2009 ; Goulas et *al.,* 2012) dont les flavonoïdes totaux (0,03-2,32 g/100g bs) (Ghasemi et *al.,* 2009) et la vitamine C (0,109-1,150 g/100g bs) (Barros et *al.,* 2012; Goulas et *al.,*2012). Cette richesse en molécules bioactives n'a cessé d'attirer l'attention des scientifiques de différentes disciplines qui ont étudié les aspects phytochimiques, les propriétés biologiques, fonctionnelles, technologiques mais aussi les moyens de valorisation de ce coproduit pour la production/extraction de ces molécules, des extraits ou des écorces séchées (M'hiri et *al.,* 2014) (**Annexe 2**).

III.1.2. Composition phénolique des écorces de l'orange Maltaise

Le profil phénolique des écorces de l'orange Maltaise demi-sanguine, a été déterminé pour la première fois dans cette étude (M'hiri et *al.,* 2015) (**Annexe 3**) en utilisant la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP-SM). Le chromatogramme de l'analyse de l'extrait éthanolique des écorces de l'orange Maltaise est présenté dans la **figure 17**. On distingue 10 pics correspondants à des flavonoïdes.

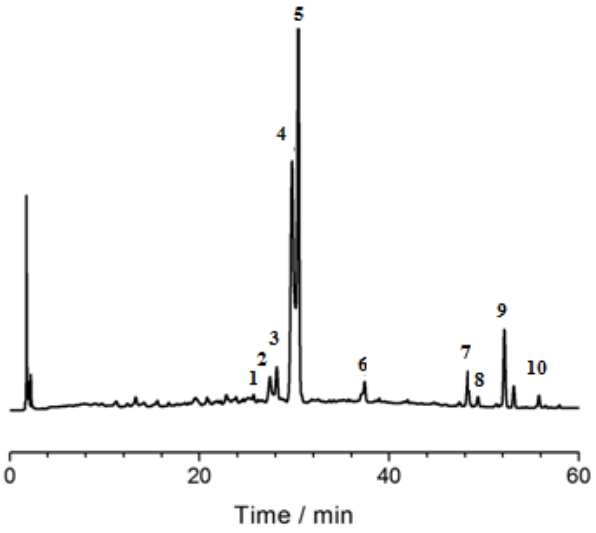


Figure 17. *Chromatogramme de l'extrait éthanolique des écorces de l'orange Maltaise obtenu par CLHP-DAD-SM à 279 nm. Extraction conventionnelle par solvant: m/v:5g/50ml, 30 min, 35°C, éthanol 80%, agitation mécanique à l'obscurité et 3 extractions successives. (1) Eriocitrine; (2) Narirutine; (3) Naringine; (4) Hespéridine; (5) Néohespéridine;(6) Didymine ; (7) Sinensetine, (8) 3',4',5,5',6,7-Hexaméthoxyflavone; (9) Nobiletine; (10) Tangeretine.*

Le **tableau 18** résume les résultats obtenus par CLHP-SM et λ_{max} UV de l'analyse de l'extrait éthanolique des écorces de l'orange de la variété Maltaise.

Tableau 18. *Rt, pseudomoléculaire ions, ions adduits avec Na +, et UVmax des flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise identifiés par CLHP-DAD-SM. Extraction conventionnelle par solvant: m/v: 5g: 50ml, 30 min, 35 ° C, 80% d'éthanol, agitation mécanique à l'obscurité et 03 extraction successives.*

Composé	R_t (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M+Na]^+$ (m/z)	UV λ_{max} (nm)	Identification
1	22.80	597	619	284, 327	Eriocitrine
2	31.85	581	603	284, 329	Narirutine
3	31.97	581	603	280, 328	Naringine
4	33.10	611	633	284, 328	Hespéridine
5	33.95	611	633	285,327	Néohespéridine
6	40.77	595	617	226, 284, 332	Didymine
7	51.58	373	395	240, 264, 328	Sinensetine
8	52.37	403	425	237, 268,320	3',4', 5,5'6,7, Hexaméthoxyflavone
9	55.29	402	425	249, 271, 334	Nobiletine
10	58.54	372	395	271, 324	Tangeretine

Les composés phénoliques identifiés sont représentés par des flavonoïdes. Les f**lavanones** présentent 95,47% des flavonoïdes totaux: l'eriocitrine, la narirutine, la naringine, l'hespéridine, la néohespéridine et la didymine. Les **flavones polyméthoxylés** constituent 4,54% des flavonoïdes totaux et sont représentés par la sinensétine, 3',4',5,5'6,7-hexaméthoxyflavone, la tangeretine et la nobiletine.

Le type de composés phénoliques présents dans les écorces varie selon la variété de l'orange. Par exemple, Anagnostopoulou et *al.* (2005) ont identifié les composés phénoliques des écorces de l'orange douce grecque de variété Navel. Les auteurs ont rapporté la présence de l'hespéridine (0,05 g/100g bs), la sinensetine (0,44 g/100g bs), la diosmine (0,03 g/100g bs) l'isorhoifoline (0,03 g/100g bs), la rutine (0,08 g/100g bs), l'apigénine (0,03 g/100g bs), l'hexaméthoxyflavone (0,56 g/100g bs), et le pentaméthoxyflavone (0,12 g/100g bs). Kanaze et *al.* (2008) rapportent que les écorces de l'orange grecque de variété Navel contiennent l'hespéridine (4,778±0,086 g/100g bs), la néohespéridine, la naringine (≤0,005±0,001 g/100g bs), la didymine, la lutéoline, la diosmine (0,216±0,015 g/100g bs), la sinensétine, la nobiletine, l'hexaméthoxyflavone, l'heptaméthoxyflavone, l'isorhoifoline, et l'acide férulique. Ces données sont en accord avec celles publiées antérieurement (Nogata et a*l.,* 1994; Manthey & Grohmann, 2001).

Le **tableau 19** présente les teneurs en flavonoïdes individuels des écorces de l'orange Maltaise obtenues dans cette étude par l'extraction conventionnelle par solvant (ECS) ainsi que celles rapportées dans la littérature pour d'autres variétés d'agrumes.

Tableau 19. *Flavonoïdes individuels des écorces de l'orange.*

Composé phénolique	Écorces de l'orange Maltaise *(g/100g de poudre des écorces)*	Écorces de l'orange Maltaise *(% des flavonoïdes totaux)*	Écorces d'agrumes* (mg/g bs) *Littérature*
Eriocitrine	0,019±0,001	1,18	-
Narirutine	0,038±0,001	2,36	0,03-26,5
Naringine	0,042±0,001	2,61	0,08-14,40
Hespéridine	0,551±0,001	34,24	0,002-80,90
Néohespéridine	0,860±0,003	53,44	0,05-7,9
Didymine	0,026±0,000	1,61	-
Sinensetine	0,020±0,001	1,24	0,08-0,29
3',4', 5,5'6,7, hexaméthoxyflavone	0,006±0,000	0,37	-
Nobiletine	0,042±0,002	2,61	0,20-14,05
Tangeretine	0,005±0,001	0,31	0,16-7,99

Toutes les valeurs calculées sont les moyennes de trois répétitions±écart-type.

**Li et al., 2012a ; Cheynier et al., 2006 ; Xu et al., 2008 ; Hayat et al., 2010 ; Inoue et al., 2010 ;Wang et al., 2008 ; Bocco et al., 1998 ; Russo et al., 2014 ; Tumbas et al., 2010 ; Goulas et al., 2012 ; Asikin et al., 2012 ; Khan et al., 2010 ; Cheigh et al., 2012 ; Giannuzzo et al., 2003 ; Sawalha et al., 2009.*

Les flavonoïdes individuels majoritaires des écorces de l'orange Maltaise sont : la néohespéridine et l'hespéridine qui représente à eux seuls 87,69% des flavonoïdes totaux, suivi par la naringine (2,61%), la nobiletine (2,61%), la narirutine (2,36%), la didymine (1,61%), la sinensetine (1,24%), l'eriocitrine (1,18%), l'hexaméthoxyflavone (0,37%) et la tangeretine (0,31%). Certains flavonoïdes se retrouvent dans quasi toutes les variétés d'agrumes mais en quantité différente. Par exemple, les composés les plus abondants dans les écorces de l'orange douce, indépendamment de la variété sont : l'hespéridine (0,066 à 66,095 mg/g bs) (Cheynier et *al.,* 2006; Goulas et *al.,* 2012), suivi par la narirutine (0,025 à 26,5 mg/g bs) (Cheynier et *al.,* 2006; Sawalha et *al.,* 2009), alors que pour l'orange amère, les principaux flavonoïdes sont la naringine (1,1 à 5,10 mg/g bs) (Cheynier et *al.,* 2006; Sawalha et *al.,* 2009) et la néohespéridine (0,66 à 7,9 mg/g bs) (Cheynier et *al.,* 2006; Sawalha et *al.,* 2009).

La néoeriocitrine est abondant dans le citron et le lime (0,5 à 6,12 mg/g bs) (Bocco et *al.,* 1998; Cheynier et *al.,* 2006). L'hespéridine (0,002 à 9,42 mg/g bs) (Wang et *al.,* 2008; Russo et *al.,* 2014) est le principal flavonoïde de tous les cultivars de citron, suivie par la diosmine et l'eriocitrine (Del-Rio et *al.,* 2004).

Les écorces de mandarine sont riches en hespéridine (3,95 à 80,90 mg/g bs) (Tumbas et *al.,* 2010; Hayat et *al.,* 2010), suivi par la narirutine (7,66 à 15,3 mg/g bs) (Xu et *al.,* 2008; Cheigh et *al.,* 2012) et la narinigine (0,54 à 0,65 mg/g bs) (Tumbas et *al.,* 2010; Hayat et *al.,* 2010).

Celle-ci, conférant un goût amer caractéristique du pamplemousse et de l'orange amère, est le flavonoïde le plus abondant des écorces de pamplemousse (10,26 à 14,40 mg/g bs) (Wang et *al.,* 2008; Giannuzzo et *al.,* 2003).

En comparant le profil phénolique des écorces de l'orange Maltaise avec celui d'autres variétés d'agrumes (l'orange, le citron, la mandarine et le pamplemousse), on constate la présence des deux classes de flavonoïdes caractéristiques d'agrumes: les flavanones et les polyméthoxyflavones. La différence entre les variétés réside dans les proportions des flavonoïdes. Selon la littérature, les écorces d'agrumes peuvent aussi contenir des flavonols et des acides hydroxycinnamiques présents sous forme de traces. Ces derniers n'ont pas été identifiés dans nos extraits.

La teneur en phénols totaux des écorces de l'orange Maltaise déterminée par le test de Folin est égale à 1,968±0,003 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange alors que la somme des dix flavonoïdes déterminés par CLHP et citée auparavant (**Tableau 19**) est égale à 1,609 g/100g de poudre des écorces d'orange. Cette différence (18,2%) est expliquée par le fait que la méthode de Folin surestime la teneur en phénols totaux à cause des interférences de ce réactif avec d'autres composés réducteurs qui peuvent exister dans la solution (Singleton et *al.,* 1999) comme les sucres réducteurs (fructose, glucose…) et les acides organiques (vitamine C, acide citrique acide malonique…). Par ailleurs, la teneur des flavonoïdes totaux déterminée par CLHP (1,609 g/100g de poudre) est supérieure à celle des flavonoïdes totaux déterminée par la méthode spectrométrique (1,012±0,003 g rutine/100g de poudre des écorces d'orange). La méthode spectrométrique du dosage des flavonoïdes totaux sous-estime la teneur réelle des flavonoïdes totaux et cela peut être expliqué par le fait que certains composés phénoliques peuvent ne pas réagir avec le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) comme l'hespéridine qui est présente en grande quantité dans les écorces de l'orange Maltaise (34,24%), mais malgré cela beaucoup d'auteurs utilisent cette mesure, ce que nous allons faire à titre comparatif avec ces travaux en plus de l'analyse systématique des extraits par CLHP.

III.1.3. Caractérisation des résidus de pesticides dans les écorces de l'orange Maltaise

Les pesticides sont largement appliqués dans les champs à la phase post-récolte pour certains fruits et de légumes contre les mauvaises herbes, les insectes, et certaines maladies (Abou-Arab et *al.,* 1999; Claeys et *al.,* 2011). Bien que l'utilisation correcte des pesticides ne provoque pas des problèmes de santé publique et de préoccupation environnementale, le

risque potentiel pour les consommateurs résultant de l'exposition alimentaire chronique est en augmentation. La qualification et la quantification des pesticides dans les écorces d'orange Maltaise a été réalisée par CL/SM/SM et CG/SM. Plusieurs types de pesticides utilisés en Tunisie pour lutter contre l'attaque d'agrumes ont été recherchés (insecticides, fongicides, acaricide et nématicide). Le **tableau 20** montre que les écorces d'orange ne contiennent qu'un seul pesticide le « Malathion » utilisé comme un insecticide pour diminuer les dégâts causés par la mouche méditerranéenne « la cératite ».

Tableau 20. *Identification et quantification des résidus de pesticides dans les écorces de l'orange Maltaise déterminées par CL/SM/SM.*

Molécules	Résultat (ppm)	LQ (ppm)	LMR-EU (ppm)	Méthode de détection
Acétamipride	< LQ	0,010	1	CL/SM/SM
Abamectine	< LQ	0,010	0,01	CL/SM/SM
Bifénazate	< LQ	0,010	0,9	CL/SM/SM
Deltaméthrine	< LQ	0,010	0,05	CL/SM/SM
Flufénoxuron	< LQ	0,010	0,3	CL/SM/SM
Imidaclopride	< LQ	0,010	1	CL/SM/SM
Lufénurone	< LQ	0,010	1	CL/SM/SM
Malathion	**0,005**	0,010	0,02	CL/SM/SM
Spinosad	< LQ	0,010	0,3	CL/SM/SM
Spirodiclofène	< LQ	0,010	0,5	CL/SM/SM
Thiaméthoxame	< LQ	0,010	0,2	CL/SM/SM
Méthidathion	< LQ	0,010	0,02	CL/SM/SM
Héxythiazox	< LQ	0,010	1	CL/SM/SM
Diméthoate	< LQ	0,010	0,02	CL/SM/SM
Spirotétramate	< LQ	0,010	1	CL/SM/SM
Diflubenzuron	< LQ	0,010	1	CL/SM/SM
Diafenthiuron	< LQ	0,010	***	CL/SM/SM
Thiophanate méthyl	< LQ	0,010	-	CL/SM/SM
Bifenthrine	< LQ	0,010	0,1	CG/SM

LQ : limite de quantification ; ppm : mg/kg ; LMR-EU : limite maximale des résidus-Union Européenne, l'abréviation « LQ » signifie que la molécule est absente dans l'échantillon selon les limites de quantification de la méthode et des instruments de mesures utilisés

La teneur en Malathion trouvé dans les écorces de l'orange Maltaise est de 0,005 mg/kg. Cette valeur est inférieure à la limite maximale fixée par l'Union-Européenne (0,02 mg/kg). D'autres pesticides peuvent être détectés dans les écorces d'orange comme la Guazatine (fongicide) (Scordino et *al.,* 2008), l'imazalil et le thiabendazole (Malaj et *al.,* 2012), le spirodiclofene (Sun et *al.,* 2013), le kresoxim-méthyl et le trifloxystrobine (Zhu et *al.,* 2013).

De nombreuses études ont rapporté que la transformation des aliments, y compris le lavage, l'épluchage et la transformation en jus, peuvent largement réduire la teneur en résidu de pesticides dans les produits agricoles (Zhang et *al.,* 2007).

Cependant, certains traitements, comme le séchage, induit à une concentration élevée en pesticides en raison de la perte d'eau (Cabras et *al.,* 1997 ; Lentza-Rizos et *al.,* 2006). Par ailleurs, certains résidus de pesticides seront transformés en autres formes chimiques à cause des effets de la température et de l'activité des micro-organismes (De sliva et *al.,* 2010).

Li et *al.* (2012b) ont étudié l'effet des procèdes de fabrication du jus sur la teneur en résidu de pesticides. Les pesticides trouvés dans le fruit entier, les écorces, la pulpe, l'huile, le jus et le marc d'orange douce, variété Beibei 447 sont : des insecticides (imidaclopride, cyperméthrine, abamectine) et des fongicides (carbendazime, prochloraz). Les auteurs ont rapporté que le résidu de pesticides a été distribué principalement dans les écorces d'orange ; le marc d'orange contient de 7 à 94,7% du résidu total des pesticides, alors qu'environ 7,5 à 17,9% de la teneur total en pesticides a été retrouvée dans la pulpe des oranges non lavés, à l'exception du prochloraz présent à 65,4% dans la pulpe des oranges non lavés. Cette teneur diminue de 43,6 à 85,4% après le lavage. Les résidus de pesticides trouvés dans les écorces d'orange pourraient être partiellement éliminés par lavage à l'eau pendant le traitement commerciale de jus d'orange. Ce lavage permet de perdre 85,4, 73,0, 57,3, 47,8 et 43,6% du carbendazime, de l'abamectine, de l'imidaclopride, du prochloraz, et du cyperméthrine, respectivement dans le fruit entier. L'épluchage réduit aussi la teneur en résidu de pesticides de manière significative dans la partie comestible des oranges. Une faible teneur en résidu de pesticides a été observée dans le jus pressé, variant de 1 à 4,5%. La filtration pourrait réduire davantage la teneur en résidu. Dans notre étude, il est possible que le traitement par les pesticides se soit effectué plusieurs jours avant la récolte. Le lavage des fruits avant épluchage aurait probablement contribué à l'élimination de résidus de pesticides. Les écorces d'orange Maltaise récolté dans la région de Nabeul sont donc dépourvues de résidus et peuvent être utilisées dans les différentes applications alimentaires et non alimentaires (pharmaceutiques, cosmétiques,..) sans aucun problème de toxicité.

Conclusion

La détermination de la composition chimique globale ainsi que la composition phénolique des écorces de l'orange Maltaise est une étape importante à prendre en compte pour leur

valorisation et leur exploitation dans les domaines agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique et chimique.

Les écorces de l'orange Maltaise sont riches en eau (3,169±0,123 g eau/g de matière sèche, soit 76,015±0,054% en base humide), en ingrédients nutritionnels comme les sucres solubles (46,241±0,015 g/100g bs), en protéines (8,120±0,120g/100g bs) et en minéraux (3,170±0,035 g/100g bs). Une étude plus approfondie de la composition chimique des écorces de l'orange Maltaise (les fibres, la pectine, les caroténoïdes, les huiles essentielles) serait donc intéressante afin de pouvoir les impliquer dans des applications en agro-alimentaire.

Les écorces de l'orange Maltaise sont aussi riches en ingrédients fonctionnels comme la vitamine C (0,105±0,003 g/100g bs), les phénols totaux (1,968±0,002 g/100g bs) dont les flavonoïdes totaux (1,012±0,003 g/100g bs).

Les flavonoïdes caractéristiques des écorces de l'orange Maltaise, exprimé en g/100g de poudre des écorces d'orange et déterminés par l'extraction conventionnelle par solvant, sont la néohespéridine (0,860±0,003), suivi par l'hespéridine (0,551±0,001), la naringine (0,042±0,001), la nobiletine (0,042±0,002), la narirutine (0,038±0,001), la didymine (0,026±0,000), la sinensetine (0,020±0,001), l'eriocitrine (0,019±0,001), l'hexaméthoxyflavone (0,006±0,000) et la tangeretine (0,005±0,001). Les flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise sont caractérisés par leur activité antioxydante, thérapeutique, antivirale, antifongique et antibactérienne. Cette richesse a attiré l'attention de plusieurs scientifiques pour extraire ces molécules et les purifier dans l'objectif de les utiliser dans plusieurs domaines. Le chapitre 2 qui succède est une continuation à ce travail *via* l'étude de l'extraction des flavonoïdes des écorces de l'orange.

III.2. Extraction des flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise

Introduction

Plusieurs études ont porté sur l'extraction des composés phénoliques des écorces d'agrumes dans le but de chercher une augmentation du rendement d'extraction des composés phénoliques mais sans tenir compte de l'impact sur leurs activités biologiques qui peuvent se dégrader suite aux conditions drastiques (température, pression, temps d'extraction…) de l'opération de l'extraction. Quelques comparaisons de différentes méthodes d'extraction ont été réalisées dans la littérature mais elles restent partielles parce ce que seulement deux ou trois méthodes étaient comparées dans un même travail (Hayat et *al.,* 2009 ; Khan et *al.,* 2010 ; Li et *al.,* 2012a) et cette comparaison ne porte que sur l'efficacité d'extraction.

Une étude tenant compte à la fois de l'efficacité d'extraction et de la préservation des activités des composés phénoliques devrait permettre une valorisation optimale du contenu phénolique des écorces d'agrumes permettant ainsi une exploitation maximale des composés phénoliques de ce sous produit industriel.

L'objectif de ce chapitre est d'aborder une étude comparative de l'effet de l'extraction conventionnelle par solvant (méthode classique), avec d'autres méthodes non conventionnelles (extraction assistée par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes, extraction sous haute pression) et l'extraction par CO_2 supercritique, méthode de référence en terme de pureté et non toxicité, sur (i) le rendement en composés phénoliques, (ii) le profil phénolique et (iii) l'activité antioxydante des écorces de l'orange Maltaise. Ces méthodes d'extraction citées précédemment sont les techniques les plus étudiées dans la littérature pour extraire les composés phénoliques des écorces d'agrumes.

III.2.1. Étude de l'effet des différentes méthodes d'extraction sur le profil phénolique et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise

III.2.1.1. Extraction conventionnelle par solvant (ECS)

Dans le but de déterminer le solvant à utiliser pour l'extraction des flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise, nous avons effectué une étude de l'hydrophobicité des flavonoïdes ainsi que celles des solvants en déterminant leurs coefficient de partition (logP) de la dite molécule entre l'eau et l'octanol. Le logiciel Pallas30® a été utilisé pour la prédiction des valeurs de

logP selon la structure des molécules. Pour la détermination de l'hydrophobicité des mélanges de solvant, le calcul de LogP selon l'équation 9, a été effectué pour sélectionner le solvant le plus approprié d'extraction selon la polarité empirique des composés phénoliques des écorces d'agrumes.

$$LogP_{mélange} = X_1\ LogP_1 + X_2 LogP_2 \qquad Eq.9$$

Où X_1 et X_2 sont les fractions molaires du composé 1 et 2 respectivement.
Les valeurs de LogP sont résumées dans le **tableau 21**. Le choix du solvant est basé sur la solubilité et la polarité des flavonoïdes recherchés et celle du solvant. Les flavonoïdes se dissolvent mieux dans des solvants ayant les valeurs de LogP les plus proches (Kassing et *al.,* 2010; Jawad & Langrish, 2012).

Les flavonoïdes majoritaires des écorces de l'orange Maltaise, représentant 93,22% des flavonoïdes totaux, sont la néohespéridine (-1,154), l'hespéridine (-0,537), la naringine (-1,017), la narirutine (-1,122), la didymine (-0,619) et l'eriocitrine (-0,480). Le solvant ayant le LogP proche des LogP de ces composés est l'éthanol et le méthanol à une concentration allant de 70% à 80%.

Tableau 21 *LogP des solvants et des flavonoïdes des écorces d'orange.*

Solvant	LogP	Composé phénolique	LogP
Acétone	-0.069	Naringine	-1.017
Dichlorométhane	1.218	Narirutine	-1.122
Diéthylether	1.112	Hespéridine	-0.537
Eau	-1.309	Néohespéridine	-1.154
Ethanol	0.016	Didymine	-0.619
Ethylacétate	0.540	Eriocitrine	-0.498
Isopropanol	0.550	Diosmine	-0.647
Méthanol	-0.440	Nobiletine	3.561
Ethanol (70%)	-0,770	Sinensetine	3.697
Ethanol (80%)	-0,600	Tangeretine	3.599
Méthanol (70%)	-0,870	Rhoifoline	-0.608
Méthanol (80%)	-0,760	Kaempferol	1.690

Le méthanol est souvent écarté vu sa toxicité. Il est remplacé par d'autres solvants organiques non toxiques, tels que l'éthanol, le n-butanol, l'isopropanol, l'acétone, l'éther diéthylique et l'éther de pétrole (Bartnick et *al.,* 2006). Mais l'éthanol est le plus couramment utilisé parmi ces solvants pour l'extraction des composés actifs des agro-ressources.

Nous avons effectué une comparaison de la teneur en phénols totaux (méthode de Folin-Ciocalteu) de l'extrait des écorces d'orange obtenue en utilisant l'éthanol à 70 et 80% (**Figure 18**). La **figure 18** montre bien que la teneur en phénols totaux de l'extrait des écorces d'orange obtenue après trois extractions successives par l'éthanol 80% est plus élevée que celle obtenue par l'éthanol 70% (1,968±0,018 g EAG/100g contre 1,880±0,003 g EAG/100 de poudre des écorces d'orange, respectivement). Par conséquent, l'éthanol 80% a été retenu pour la suite de l'étude.

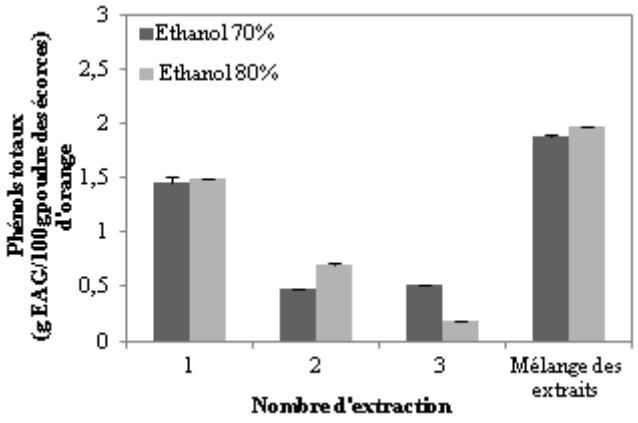


Figure 18. *Teneur en phénols totaux de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise en utilisant l'éthanol 70-80%. Extraction conventionnelle par solvant: m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C et agitation mécanique à l'obscurité.*

Les flavonoïdes sont sensibles à la température et à la lumière (Ioannou et *al.,* 2012) d'où le choix d'effectuer une extraction à 35°C et à l'obscurité. La cinétique d'extraction est présentée dans la **figure 19**. Cinq extractions successives ont été effectuées jusqu'à l'épuisement du matériel végétal en composés phénoliques. La **figure 19** montre que pour la première extraction, seulement cinq minutes sont nécessaires pour atteindre l'équilibre thermodynamique et pour une extraction quasi instantanée d'une grande partie des flavonoïdes. Cette extraction conduit à une teneur en phénols totaux de 1,580±0,004 g EAG/100 g de poudre des écorces d'orange.

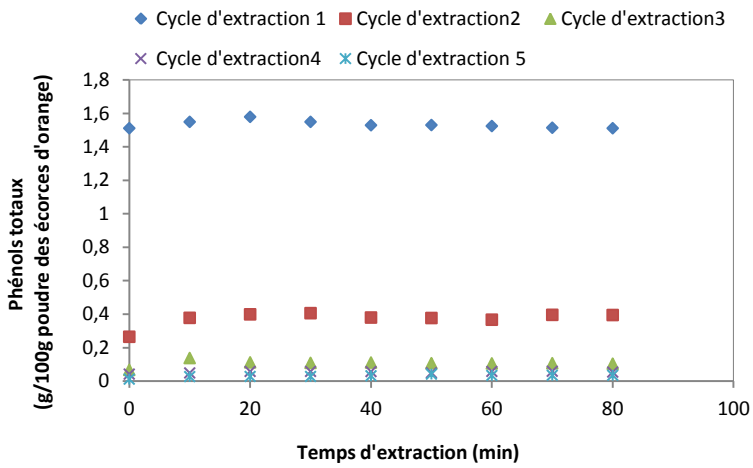


Figure 19. *Courbes d'équilibre des cinétiques de l'extraction conventionnelle par solvant (m/v:5g/50ml, 10-80 min, 35°C, éthanol 80%, agitation mécanique à l'obscurité et 5 extractions successives).*

L'équilibre de la seconde extraction est accessible en 20 minutes avec une faible teneur en PT de 0,390±0,045 g EAG/100 g de poudre des écorces d'orange; de même pour la troisième extraction, une teneur en PT de 0,109±0,001 g EAG/100 g.

La quatrième et la cinquième extraction donnent une très faible teneur PT de 0,055±0,007; 0,026±0,05 g EAG/100 g de poudre des écorces d'orange. Ainsi, trois extractions successives sont suffisantes pour extraire le maximum (96,15%) des phénols totaux des écorces d'orange dans ces conditions.

Un temps d'extraction de 30 min a été retenu pour s'assurer de l'atteinte de l'équilibre. En conséquence, pour les prochaines investigations, les paramètres de l'extraction conventionnelle par solvant seront les suivants: rapport m/v:5g:50ml; 80% d'éthanol/eau, agitation mécanique à l'obscurité, temps d'extraction de 30 min, une température d'extraction de 35°C et 3 extractions successives. Pour les autres méthodes d'extraction (extraction assistée par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes, extraction sous haute pression, extraction par CO_2 supercritique), ces conditions seront maintenues lorsque le dispositif expérimental utilisé le permet. Les valeurs correspondant à ces conditions de l'ECS seront considérées comme les valeurs du témoin, sauf pour EAM et EHP. Pour EAM, Le témoin correspond à une ECS à une température de 67°C parce que l'extraction assistée par micro-ondes a été réalisée entre 100 et 400 W conduisant à une température de l'échantillon supérieure à 67°C. Pour HPE, le témoin correspond à une seule extraction par ECS car l'extraction par haute pression a été réalisée qu'une seule fois.

III.2.1.2. Extraction assistée par ultrasons (EAU): effet de la puissance des ultrasons

L'effet de la puissance des ultrasons (100, 125, 150, 200 W) sur les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux ainsi que sur l'activité antioxydante des extraits est présenté dans la **figure 20**. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de l'extraction conventionnelle par solvant.

La **figure 20a** montre que l'utilisation des ultrasons permet une augmentation de la teneur en phénols totaux : 1,968±0,003 par rapport à 2,140±0,057 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange pour une puissance des ultrasons de 125 W. L'augmentation de la puissance des ultrasons de 100 W à 200 W entraîne une légère augmentation de la teneur en phénols totaux.

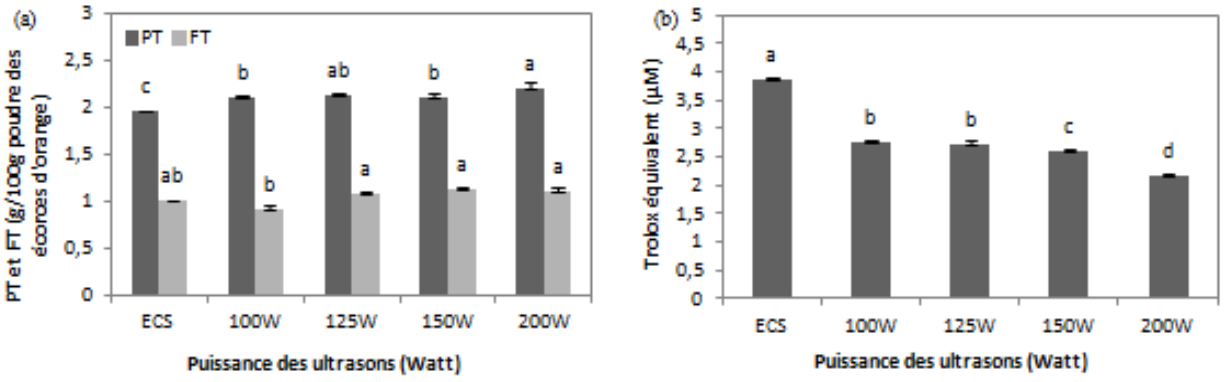


Figure 20. *Effet de la puissance des ultrasons sur (a) les phénols et les flavonoïdes totaux (b), l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise.*
Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05. Conditions d'extraction EAU: m/v:5g/50ml, 30 min, 35°C, éthanol 80%, ***100-200W****, agitation à l'obscurité et 3 extractions successives. Conditions d'extraction EAU: m/v:5g/50ml, 30 min, 35°C, éthanol 80%, agitation à l'obscurité et 3 extractions successives.*

Pour les flavonoïdes totaux, une faible augmentation a été observée de 1,012±0,005 à 100 W à 1,136±0,030 g rutine équivalent/100g de poudre des écorces d'orange à 125 W. Selon l'analyse statistique, la teneur en flavonoïdes totaux reste constante à 150 et 200 W. L'intensification de l'extraction par l'utilisation des ultrasons peut être attribuée à la propagation des ondes de pression ultrasonores dans le solvant (Rombaut et *al.,* 2014). Un phénomène de cavitation acoustique est créé (**Figure 21**).

Une bulle de cavitation peut être générée à proximité de la surface du matériel végétal (a), puis pendant un cycle de compression, cette bulle s'effondre (b) et un microjet dirigé vers la matrice végétale est créé (b et c). La haute pression et la température impliquées dans ce processus vont détruire les parois cellulaires de la matrice du végétal, ce qui facilite la

libération de composés extractibles et améliore le transport de masse en perturbant les parois cellulaires du produit et son contenu peut être libéré dans le milieu (d) (Chemat et *al.,* 2011).

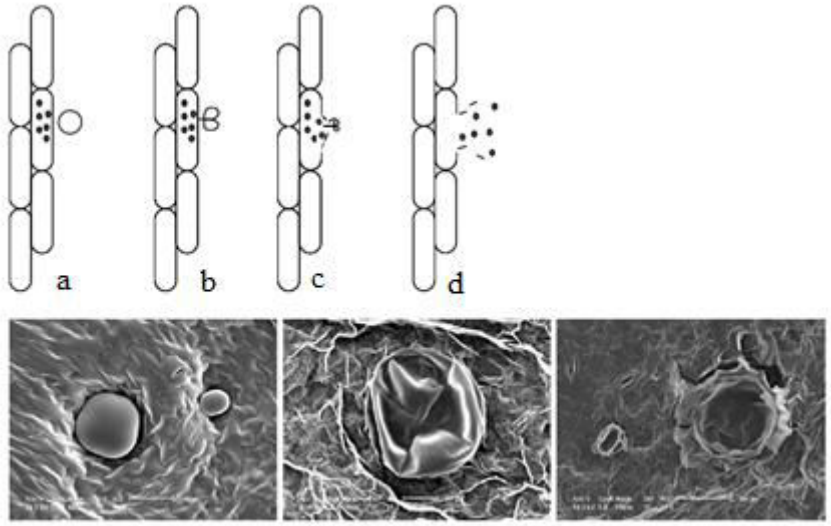


Figure 21. *Formation d'une bulle de cavitation et libération du matériel végétal (Chemat et al., 2011).*

L'effet de la puissance des ultrasons sur le profil phénolique des écorces de l'orange Maltaise est présenté dans le **tableau 22**.

Tableau 22 *Effet de la puissance des ultrasons sur les flavonoïdes individuels (FI) des écorces d'orange (g/100g de poudre des écorces d'orange).*

Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05.

FI	Témoin	100W	125W	150W	200W
Hespéridine	0,551±0,001^{b}	0,792±0,003^{a}	0.836±0,029^{a}	0,794±0,029^{a}	0,794±0,029^{a}
Néohespéridine	0,860±0,003^{c}	0,925±0,027^{b}	0,986±0,006^{a}	0,988±0,002^{a}	0,982±0,002^{a}
Eriocitrine	0,019±0,001^{c}	0,029±0,005^{a}	0,019±0,001^{c}	0,024±0,001^{b}	0,024±0,001^{b}
Narirutine	0,038±0,001^{a}	0,036±0,001^{a}	0,017±0,001^{b}	0,016±0,002^{b}	0,016±0,002^{b}
Naringine	0,042±0,001^{b}	0,098±0,017^{a}	0,082±0,009^{a}	0,080±0,010^{a}	0,080±0,001^{a}
Didymine	0,026±0,001^{b}	0,042±0,004^{a}	0,041±0,003^{a}	0,042±0,002^{a}	0,042±0,002^{a}
Sinensetine	0,020±0,001^{b}	0,040±0,001^{a}	0,040±0,002^{a}	0,041±0,001^{a}	0,041±0,001^{a}
Hexaméthoxyflavone	0,006±0,001^{b}	0,007±0,002^{b}	0,010±0,001^{a}	0,010±0,002^{a}	0,010±0,002^{a}
Tangeretine	0,005±0,001^{c}	0,007±0,008^{b}	0,008±0,003^{b}	0,010±0,010^{a}	0,010±0,001^{a}
Nobiletine	0,042±0,002^{b}	0,073±0,001^{a}	0,074±0,003^{a}	0,075±0,001^{a}	0,075±0,001^{a}

L'extraction assistée par ultrasons augmente significativement les teneurs en flavonoïdes individuels par rapport à ECS.

L'effet de la puissance est différent selon le type du flavonoïde. Pour l'hespéridine, la didymine, la sinensétine, la nobiletine et la tangeretine, il n'y a pas de différences significatives constatées lorsque la puissance des ultrasons augmente de 100 à 200 W. Cependant, nous notons une légère augmentation de la néohespéridine et l'hexaméthoxyflavone suite à l'augmentation de la puissance des ultrasons. Par exemple, la teneur en hespéridine augmente de 0,926±0,027 à 100 W à 0,986±0,006 g/100 g de poudre des écorces d'orange à 125 W.

Les teneurs en eriocitrine, narirutine et en naringine diminuent avec l'augmentation de la puissance des ultrasons de 100 W à 125 W, puis restent constantes. Par exemple, la teneur en narirutine est de 0,036±0,014 à 100 W et 0,017±0,000 g/100 g de poudre des écorces d'orange à 125 W. Cette hypothèse est confirmée par Ma et *al.* (2009) qui ont rapporté qu'une augmentation de la puissance des ultrasons de 3,2 à 30 W entraîne une augmentation des teneurs en acides phénoliques de l'extrait de *Citrus unshiu Marc.* Au-dessus de 30 W, les auteurs ont observé une diminution lente. Ce résultat peut être expliqué par le fait que certains composés phénoliques sont instables au traitement par ultrasons et peuvent se dégrader à cause de l'application des fréquences élevées donc des pressions élevées. Un temps d'extraction lent peuvent ainsi causer l'endommagement de la qualité des extraits (Wang & Weller, 2006; Khan et *al.,* 2010).

Sur la base de ces résultats, on peut conclure qu'il est préférable d'extraire les flavonoïdes majoritaires des écorces d'orange à des faibles puissances comme à 100 ou 125 W.

L'effet de la puissance des ultrasons sur l'activité antioxydant des écorces de l'orange Maltaise est présenté dans la **figure 20b**. Cette dernière montre que l'extraction par ultrasons des flavonoïdes entraîne une diminution de l'activité antioxydant de l'extrait par rapport à celle obtenue par ECS (2,746±0,038 contre 3,867±0,024 µM). L'impact positif des ultrasons à 100 W sur le rendement d'extraction des phénols totaux n'est pas associé à une augmentation de l'activité antioxydant de l'extrait.

En plus, l'augmentation de la puissance de 125 à 200 W conduit à la diminution de l'activité antioxydant de 44% à 200 W en comparaissant avec ECS. L'activité antioxydant la plus élevée est obtenue à des puissances de 100 et 125 W avec une diminution de 29%. Ce résultat est similaire à celui rapporté par Dahmoune et *al.* (2013). Les auteurs ont montré que l'activité antioxydante de l'extrait des écorces de citron obtenu ECS est plus élevée que celle obtenue par EAU.

Cela peut être expliqué par le fait que les ultrasons pourrait induire la formation de radicaux libres dans le milieu liquide et améliore les réactions sonochimiques et les réactions de polymérisation/dépolymérisation, provoquant ainsi l'oxydation et la dégradation des composés bioactifs et l'altération de la qualité sensorielle du produit (Hayat et *al.,* 2009, Pingret et *al.,* 2012 ; Pingret et *al.,* 2013 ; Dahmoune et *al.,* 2013). Ainsi, une puissance modérée des ultrasons (100-125 W) est la plus appropriée dans nos conditions pour obtenir une teneur maximale en PT, FT, FI et une activité antioxydant maximale des écorces de l'orange Maltaise.

III.2.1.3. Extraction assistée par micro-ondes (EAM): effet de la puissance micro-ondes

Le traitement micro-ondes peut être utilisé pour intensifier l'extraction des composés bioactifs. Les deux paramètres affectant l'extraction sont la puissance micro-ondes et la durée de l'extraction. Pour cela, nous avons déterminé, en premier lieu le temps d'extraction qui permet d'obtenir la teneur la plus élevée en phénols totaux.

L'extraction assistée par micro-ondes a été effectuée à 100 W pendant un temps d'extraction variant de 30 à 180s. Les conditions d'extraction conventionnelle par solvant sont maintenues (80% d'éthanol, ratio liquide/solide de 05:50, 3 extractions successives). Les résultats de l'extraction à différents temps d'extraction sont présentés dans le **tableau 23**.

Tableau 23. *Influence du temps d'extraction sur la teneur phénols totaux (g/100g poudre des écorces d'orange) de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise à 100 W. Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05. Conditions d'extraction: m/v:5g/50ml, éthanol 80%,* ***100 W****, 3 extractions successives.*

Temps (seconde)	Température (°C)	Phénols totaux
30	25	2.048 ± 0.008^{d}
60	40	2.225 ± 0.019^{c}
90	43	2.274 ± 0.004^{b}
180	67	2.340 ± 0.012^{a}

L'augmentation du temps d'extraction de 30 à 180s entraîne l'augmentation de la température d'extraction de 25 à 67°C et l'augmentation des teneurs en phénols totaux. Le temps d'extraction assistée par micro-ondes est fixé à 180s pour obtenir la teneur la plus élevée en phénols totaux.

La **Figure 22** présente l'effet de la puissance micro-ondes (100, 200, 300, 400 W) sur les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux et l'activité antioxydante des écorces de l'orange Maltaise.

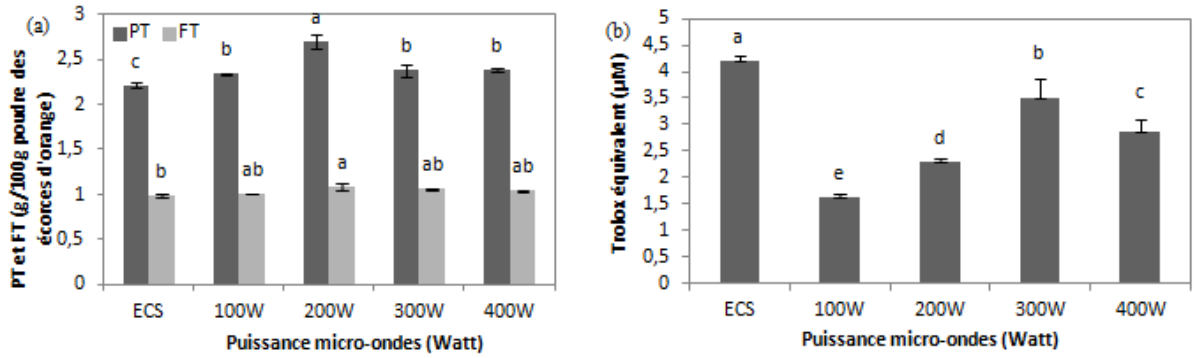


Figure 22. *Effet de la puissance micro-ondes sur (a) les phénols et les flavonoïdes totaux (b) l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise.*

Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05. Conditions d'extraction EAM: m/v:5g/50ml, éthanol 80%, ***180s****,* ***100-400W****,* ***67-108°C****, 3 extractions successives. Conditions d'extraction ECS: m/v:5g/50ml, éthanol 80%,* ***180s****,* ***67°C****, 3 extractions successives.*

Les résultats obtenus ont été comparés à ceux de l'extraction conventionnelle par solvant. En effet, une puissance micro-ondes de 100 W permet une légère augmentation de la teneur en phénols et flavonoïdes totaux (2,340±0,012 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange; 1,009±0,012 g rutine/100g de poudre des écorces d'orange, respectivement) par rapport à l'extrait obtenu par ECS (2,213±0,036 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange; 0,993±0,020 g rutine équivalent/100g de poudre des écorces d'orange, respectivement). Ces deux extractions ont été réalisées à une température de 67°C. Par conséquent, on peut conclure que l'utilisation des micro-ondes améliore le rendement d'extraction. En effet, l'extraction assistée par micro-ondes est un processus par lequel l'énergie micro-ondes accélère l'extraction. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales (Inoue et *al.,* 2010 ; Jawad & Langrish, 2012). Au cours du traitement par micro-ondes, le chauffage provoque la rupture des liaisons hydrogène faibles préconisées par la rotation dipolaire des molécules. Une quantité considérable de la pression s'accumule à l'intérieur du biomatériau, qui modifie les propriétés physiques des tissus biologiques et améliore la porosité de la matrice biologique.

Ceci permet une meilleure pénétration du solvant d'extraction à travers la matrice (Kratchanova et *al.,* 2004 ; Yeoh et *al.,* 2008) et facilite l'extraction des flavonoïdes (Mandal et *al.,* 2007).

En plus, l'augmentation de la puissance micro-ondes de 100 W (67°C) à 200 W (76°C) entraîne l'augmentation de la teneur en phénols et en flavonoïdes totaux : 2,340±0,012 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange ; 1,009±0,039 g rutine/100g de poudre des écorces d'orange (100 W, 180s) à 2,688±0,078 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange; 1,076±0,008 g rutine/100g de poudre des écorces d'orange (200 W, 180s), respectivement. Cependant, au-dessus de 200 W, la teneur en PT diminue pour atteindre 2,381±0,028 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange à 400 W. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait qu'une puissance micro-ondes élevée induit une température plus élevée (400 W correspond à 108°C), donc une possibilité de dégradation thermique des composés bio-disponibles. Cette idée est confirmée par Hayat et *al.* (2010) qui indiquent que l'augmentation de la puissance micro-ondes augmente le rendement d'extraction des acides phénoliques jusqu'à 160 W, puis diminue.

Jawad & Langrish (2012) ont testé trois puissances de micro-ondes (ratio m/v:1:2 ; 3 min; 135°C, 400, 600, 800 W) pour extraire les acides phénoliques des écorces de mandarine. Les auteurs ont conclu que la teneur en acides phénoliques était la même pour toutes les puissances mais avec une légère différence de couleur, ce qui suggère que la puissance élevée entraîne la formation de sous produits de la réaction de Maillard (PRM) pour une température au-dessus de 135°C. Par conséquent, dans cette étude, la puissance micro-ondes 200 W permet d'obtenir le maximum de PT et FT des écorces de l'orange Maltaise.

L'effet de la puissance micro-ondes (100 à 400 W) durant 180s sur l'extraction des flavonoïdes individuels des écorces de l'orange Maltaise est présenté par le **tableau 24.** Ce dernier tableau montre que les teneurs en flavonoïdes individuels augmentent ou restent constantes en utilisant les micro-ondes par rapport à l'ECS. Les flavonoïdes individuels ont un comportement différent vis à vis de l'augmentation de la puissance micro-ondes. Les teneurs en hespéridine, néohespéridine, naringine et didymine des écorces d'orange augmentent avec l'augmentation de la puissance micro-ondes jusqu'à 200 W et ensuite diminuent. Par exemple, la teneur en hespéridine est de 0,690 ± 0,014 à 100W et atteint 0,929 ± 0,001 à 200 W, puis diminue à 0,765 ± 0,012 g/100 g de poudre des écorces d'orange à 300 W.

On peut conclure que pour les flavonoïdes majoritaires (les flavanones) des écorces de l'orange Maltaise (l'hespéridine, la néohespéridine, la naringine, la didymine), la puissance micro-ondes à appliquer est de 200 W. Ce résultat est cohérent avec l'effet de la puissance micro-ondes sur PT.

Tableau 24. *Effet de la puissance micro-ondes sur les flavonoïdes individuels (FI) des écorces d'orange (g/100g de poudre des écorces d'orange).Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05.*

FI	Témoin	100 W	200 W	300 W	400 W
Hespéridine	0,620±0,001^{c}	0,690±0,014^{bc}	0,928±0,007^{a}	0,766±0,123^{b}	0,724±0,005^{bc}
Néohesperidine	0,994±0,003^{c}	1,137±0,043^{b}	1,222±0,017^{a}	1,095±0,014^{b}	1,154±0,146^{b}
Eriocitrine	0,019±0,001^{b}	0,035±0,001^{a}	0,027±0,008^{ab}	0,026±0,002^{ab}	0,034±0,001^{a}
Narirutine	0,009±0,001^{b}	0,009±0,003^{b}	0,009±0,005^{b}	0,016±0,002^{a}	0,019±0,010^{a}
Naringine	0,070±0,001^{b}	0,084±0,027^{ab}	0,126±0,001^{a}	0,082±0,001^{ab}	0,048±0,001^{b}
Didymine	0,056±0,001^{bc}	0,068±0,007^{a}	0,064±0,001^{ab}	0,065±0,001^{ab}	0,051±0,001^{c}
Sinensetine	0,041±0,001^{a}	0,041±0,001^{a}	0,041±0,030^{a}	0.043±0,001^{a}	0,044±0,002^{a}
Hexaméthoxyflavone	0,009±0,001^{a}	0,009±0,001^{a}	0,009±0,001^{a}	0,011±0,001^{a}	0,011±0,001^{a}
Tangeretine	0,010±0,001^{a}	0.010±0,001^{a}	0,010±0,001^{a}	0,010±0,001^{a}	0,010±0,001^{a}
Nobiletine	0,069±0,002^{c}	0,074±0,006^{b}	0,075±0,006^{b}	0,075±0,006^{b}	0,078±0,006^{a}

Cependant, nous constatons qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'augmentation de la puissance micro-ondes sur les teneurs en flavones polyméthoxylés (la nobiletine, la tangeretine, l'hexaméthoxyflavone, la sinensétine) et l'eriocitrine. Par conséquent, une puissance micro-ondes de 100 W est suffisante pour extraire ces flavonoïdes. Seul la teneur en narirutine augmente d'avantage avec l'augmentation de la puissance micro-ondes de 0,009 ± 0,003 à 100 W à 0,020 ± 0,001 g/100 g de poudre des écorces d'orange à 400 W.

L'effet de la puissance micro-ondes sur l'activité de piégeage des radicaux libres de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise est représenté par la **figure 22b**. Cette dernière montre que l'activité antioxydante (exprimée en µM équivalent Trolox) de l'extrait des écorces d'orange obtenu par EAM pour toutes les puissances (1,622±0,078; 100 W, 2,313±0,068; 200 W, 3,510±0,364; 300 W et 2,852±0,254; 400 W) est inférieure à celle de l'extrait obtenu par ECS (4,215±0,085). Ces résultats ne sont pas cohérents avec l'effet de la puissance micro-ondes sur les teneurs en PT et FT qui augmentent en appliquant une puissance de 100 à 200 W. L'augmentation de la puissance micro-ondes entraîne une augmentation de l'activité antioxydante jusqu'à 300 W puis diminue à 400 W.

Ceci pourrait être expliqué par le fait que les composés phénoliques des écorces d'orange à l'état libre ou lié subissent une modification/dégradation égale de leurs structures au cours de l'extraction à puissance élevée. Les antioxydants se dégradent en produisant de nouveaux composés avec un fort potentiel antioxydant.

Nayak et *al.* (2011) suggèrent que les composés bioactifs d'un poids moléculaire élevé se décomposent en plusieurs petits composés à faible poids moléculaire augmentant ainsi le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante par rapport aux produits non traités par micro-ondes. Nicoli et *al.* (1994) ont rapporté que les composés phénoliques à l'état intermédiaire d'oxydation présentent une efficacité élevée de piégeage des radicaux libres que ceux non-oxydés. L'élévation de l'activité antioxydante des flavonoïdes partiellement oxydés est attribuée à leur capacité accrue à donner un atome d'hydrogène du groupe hydroxyle aromatique à un radical libre et/ou à la capacité de leurs structures aromatiques à appuyer l'électron non apparié travers la délocalisation électronique autour du système π. Ainsi, les antioxydants phénoliques ne suivent pas un ordre réaction spécifique (Nayak et *al.,* 2015). Jawad & Langrish (2012) ont corrélé l'activité antioxydante élevée des extraits obtenus par EAM à la présence des sous produits de la réaction de Maillard.

L'activité antioxydante de ces sous produits est plus élevée que celle des flavonoïdes et de l'acide ascorbique qui eux se dégradent à hautes puissances.

Pour conclure, une puissance micro-ondes de 200 W appliquée pendant 180s permet d'atteindre la teneur la plus élevée en PT/FT et en flavanones (l'hespéridine, la néohespéridine, la naringine et la didymine, sauf la narirutine et l'eriocitrine). L'activité antioxydante la plus élevée est obtenue à 300 W pendant 180s (correspondant à 93°C) qui peut être due à la formation des produits de la réaction de Maillard d'où la nécessité d'appliquer des puissances modérées pour éviter l'augmentation de la température favorisant cette réaction.

III.2.1.4. Extraction sous haute pression (EHP): effet de la pression

L'effet des hautes pressions sur l'extraction des phénols et des flavonoïdes totaux, des flavonoïdes individuels et l'activité antioxydante des écorces de l'orange Maltaise a été étudié.

La **figure 23** présente l'effet de la pression (0,1; 50; 100 MPa) lors de l'extraction à HP sur les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux.

La **figure 23a** montre que quelle que soit la pression utilisée (0,1; 50; 100 MPa), les extraits obtenus par EHP ont une teneur en phénols totaux inférieure (1,252±0,019; 1,328±0,035; 1,221±0,059 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange, respectivement) à celle obtenue par ECS (1,580±0,004 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange).

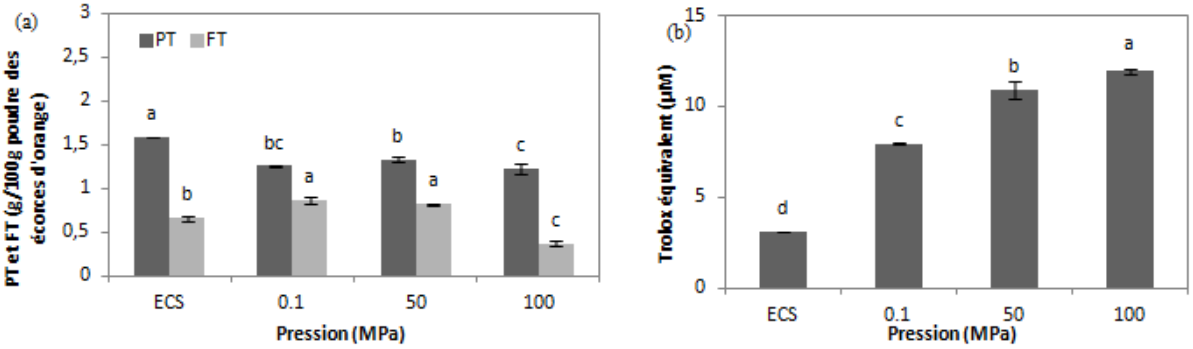


Figure 23. *Effet de la pression sur (a) les phénols et les flavonoïdes totaux (b) l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise.*
Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05. Conditions d'extraction EHP: m/v:5g/50ml, éthanol 80%, 30 min, 35°C, ***0,1-100 MPa, 1 seule extraction****. Conditions d'extraction ECS: m/v:5g/50ml, éthanol 80%, 30 min, 35°C,* ***1 seule extraction****.*

Casquete et *al.* (2014) ont étudié l'effet de l'extraction sous hautes pressions plus élevées que celles testées dans notre étude (300 MPa/3 min ; 300 MPa/10min ; 500 MPa/3 min ; 500 MPa/10min ; 10°C) des composés phénoliques des écorces de l'orange douce (*Camellia sinensis*). Les auteurs ont montré qu'il n'y a pas un effet significatif de la pression sur la teneur en phénols totaux par rapport au témoin (ECS: éthanol aqueux 80%, agitation magnétique pendant 1h à 25°C, 2 extractions successives).

La **figure 23a** montre aussi que la teneur en flavonoïdes totaux à 0,1 et 50 MPa (0,865±0,027, 0,1 MPa ; 0,820±0,011 g rutine/100g de poudre des écorces d'orange; 50 MPa) est plus élevée que celle obtenue par ECS (0,658±0,027 g rutine/100g de poudre des écorces d'orange). La diminution de la teneur en phénols pourrait être au moins en partie attribuée à l'oxydation enzymatique. L'extraction par HP entraîne la perturbation, la désorganisation des tissus et surtout la décompartimentation cellulaire conduisant à une importante interaction enzyme-substrat pendant le traitement d'où une augmentation du risque de l'oxydation enzymatique comme par exemple par la polyphénoloxydase (PPO).

La PPO est une enzyme à deux substrats dont l'un est l'oxygène moléculaire et l'autre un composé phénolique. Son pH optimum se trouve souvent entre 4,5 et 5,5 et sa température optimale se situe vers 30-35°C.

De plus, la PPO n'est pas particulièrement thermostable, son inactivation débute dès que la température dépasse 40°C. Elle est totale dès 75-80°C (Nicoli *et al.*, 1994). Par conséquent, les conditions de l'extraction sous haute pression sont très favorables à l'activité enzymatique. La PPO catalyse l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones. Ces *o*-quinones sont très instables et très réactives en milieux aqueux et entrent dans une série complexe d'auto-oxydations, de polymérisations et de combinaisons avec d'autres molécules présentes in situ conduisant à l'apparition de composés de couleur brune. Les quinones formées par oxydation enzymatique, via la PPO, sont des espèces chimiques très réactives. Etant à la fois fortement oxydantes et électrophiles, elles mènent à une grande diversité de produits (Hodge, 1953; Yaylayan & Haffenden, 2003; Chen et *al.,* 2005). En outre, les hautes pressions peuvent causer l'amélioration de l'activité enzymatique et le changement dans la spécifié enzyme-substrat (Richard, 1992; Tauscher, 1995; Zhang et *al.,* 2005; Altuner et *al.,* 2006; Simonin et *al.,* 2012; Altuner & Tokusoglu, 2013) entraînant ainsi la dégradation de composés phénoliques dans les végétaux (Tauscher, 1995; Ahmed & Ramaswamy, 2006; Terefe et *al.,* 2013). Ainsi, les hautes pressions conduisent à une dégradation de la structure cellulaire du matériel végétal qui permet l'amélioration de l'efficacité d'extraction.

Par contre, leur utilisation entraîne la dégradation des composés phénoliques après leur extraction, soit par oxydation ou par réarrangement avec d'autres molécules. Tous les composés phénoliques n'ont pas la même sensibilité à ces phénomènes qui explique la diminution de PT et l'augmentation de FT.

L'effet des hautes pressions sur les flavonoïdes individuels des écorces de l'orange Maltaise est présenté dans le **tableau 25**.

L'utilisation des hautes pressions entraîne la diminution des teneurs en flavanones majoritaires des écorces d'orange (l'hespéridine, la néohespéridine et la naringine) par rapport à l'extrait obtenu par ECS.

Par conséquent, EHP n'est pas adapté pour l'extraction de ces 3 composés. Li et *al.* (2012a) ont étudié l'extraction sous haute pression (méthanol; ratio: 10 ml/g; 20 min, 160°C, 10 MPa) des flavones des écorces de *Citrus reticulata*. Les auteurs ont montré qu'une augmentation du temps d'extraction de 5 à 20 min entraîne une augmentation du rendement d'extraction des composés phénoliques. Cependant, le rendement d'extraction diminue lorsque le temps d'extraction est supérieur à 20 min.

Tableau 25. *Effet de la pression sur les flavonoïdes individuels (FI) des écorces d'orange (g/100g de poudre des écorces d'orange). Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05.*

FI	Témoin	0,1 MPa	50 MPa	100 MPa
Hespéridine	0,341±0,001^{a}	0,233±0,009^{b}	0,219±0,005^{b}	0,197±0,008^{b}
Néohespéridine	0,571±0,003^{a}	0,349±0,007^{b}	0,334±0,005^{b}	0,301±0,006^{c}
Eriocitrine	0,014±0,001^{b}	0,019±0,002^{a}	0,019±0,002^{a}	0,016±0,005^{ab}
Narirutine	0,018±0,001^{b}	0,025±0,001^{a}	0,025±0,001^{a}	0,023±0,001^{a}
Naringine	0,017±0,001^{a}	0,003±0,001^{b}	0,004±0,001^{b}	0,0003±0,001^{b}
Didymine	0,013±0,001^{b}	0,016±0,002^{a}	0,014±0,001^{ab}	0,013±0,001^{b}
Sinensetine	0,008±0,001^{b}	0,034±0,001^{a}	0.034±0,006^{a}	0,034±0,006^{a}
Hexaméthoxyflavone	0,002±0,001^{b}	0,008±0,001^{a}	0,008±0,001^{a}	0,008±0,001^{a}
Tangeretine	0,002±0,001^{b}	0,008±0,001^{a}	0,008±0,001^{a}	0,008±0,001^{a}
Nobiletin	0,016±0,002^{b}	0,060±0,006^{a}	0,059±0,001^{a}	0,059±0,002^{a}

Cela peut être dû à la décomposition de flavones en raison d'une exposition prolongée à une pression et température élevée. Ce résultat est cohérent avec celui rapporté par Wang et *al.,* (2011) qui ont indiqué la baisse de la teneur en hespéridine et en narirutine des écorces de *Citrus sulcata* à partir d'un temps d'extraction de 30 min. Pour les autres composés phénoliques, la teneur maximale de l'ériocitrine et de la didymine ont été obtenues à 0,1 MPa. Par contre, les teneurs en flavones polyméthoxylés (la nobiletine, la sinensetine, la tangeretine, l'hexaméthoxyflavone) augmentent avec l'augmentation de la pression.

Le pouvoir de piégeage des radicaux libres de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise obtenu par l'extraction sous haute pression est représenté dans la **figure 23b**. Cette dernière figure montre que l'activité antioxydante de l'extrait EHP (0,1 MPa) est supérieure à celle de l'extrait obtenu par ECS (7,941±0,051 ; 3,066±0,027 µM équivalent Trolox, respectivement). De plus l'augmentation de la pression de 0,1 à 100 MPa entraîne une augmentation de 33% de l'activité antioxydante. Cette activité antioxydante à 100 MPa peut être due, comme expliqué précédemment, à la formation de nouveaux produits obtenus après exposition à des pressions élevées. Ces produits peuvent être issus soit des réactions de Maillard soit des réactions d'oxydation enzymatique qui donnent des substances intermédiaires antioxydantes (Schwartz et *al.,* 2003). Au cours de l'EHP, la structure cellulaire de la matière végétale contenant des composés phénoliques est dégradée permettant ainsi la libération de ces composés dans le milieu extracellulaire.

Ces composés peuvent interagir pendant l'extraction pour former d'autres composés qui pourraient présenter des structures et des propriétés différentes à celles d'origine (Plaza et *al.,* 2010; Gil-Chavez et *al.,* 2013).

Les composés néoformés au cours du processus d'extraction dérivés de la réaction de Maillard et la thermo-oxydation affectent la capacité antioxydante de l'extrait. En conséquence, il est nécessaire d'identifier la structure d'autres antioxydants (produits de polymérisation des phénols…) et leur contribution individuelle à la capacité antioxydante totale de l'extrait.

III.2.1.5. Extraction par CO_2 supercritique (SC-CO_2): effet de la pression et de la température

L'effet de la pression et de la température d'extraction par CO_2 supercritique des flavonoïdes a été examiné. En effet, La température et la pression de l'extraction par CO_2 ont une grande influence sur la masse volumique du fluide supercritique qui atteint une valeur maximale à des pressions très élevées et des températures proches du point critique. Dans ces conditions, le pouvoir solvant augmente et la solubilité du soluté dans le fluide supercritique est maximale. Trois couples de température/pression de l'extraction par CO_2 supercritique ont été fixés (35°C/10 MPa; 35°C/22 MPa; 80°C/10 MPa).

L'effet de la pression/température sur les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux, flavonoïdes individuels et sur l'activité antioxydante est présenté dans la **figure 24**.

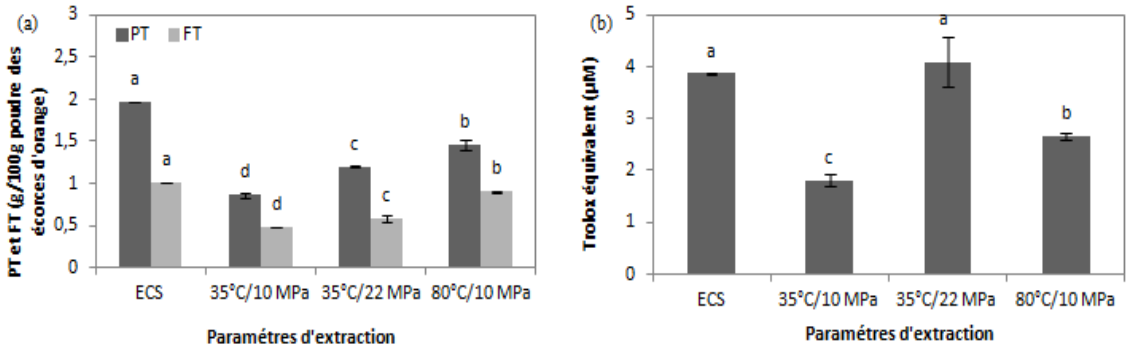


Figure 24. *Effet de la température et de la pression d'extraction sur (a) les phénols et les flavonoïdes totaux (b) l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise.*
Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05. Conditions d'extraction ESC: m/v:5g/50ml, 30 min, ***35-80°C****, éthanol 80%,* ***10-22 MPa*** *et 3 extractions successives. Conditions d'extraction ECS : m/v:5g/50ml, 30 min,* ***35°C****, éthanol 80% et 3 extractions successives.*

Cette dernière figure montre que les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux sont plus élevées pour ECS que pour SC-CO_2. Ce résultat peut être expliqué par le fait que le écorces d'orange sont riche en composés phénoliques polaires (flavanones glycosylés) que ceux non

polaires (flavones polyméthoxylés), alors que l'extraction SC-CO_2 est plus adaptée aux composés non-polaires. Toledo-Guillen et *al.* (2010) ont également rapporté que l'ECS est plus efficace que l'extraction par CO_2 supercritique pour l'extraction des flavanones glycosylés. Cette observation est attribuée à la masse moléculaire élevée et la polarité des flavonoïdes, alors que SC-CO_2 une technique hautement sélective et efficace pour obtenir les flavones polyméthoxylés.

Le phénomène d'extraction par CO_2 supercritique peut être décrit comme suit: (1) le substrat solide sous pression absorbe le solvant supercritique, provoquant la dilatation des structures cellulaires. Cette étape facilite l'écoulement du solvant en diminuant la résistance au transfert de masse; (2) en même temps, les composés solubles dans le CO_2 supercritique sont dissout par le solvant; (3) les composés dissous sont transférés par diffusion à la surface du solide; et (4) les composés sont transportés par le solvant dans l'extracteur puis récupérés (**Figure 25**) (Pereira & Meireles, 2010).

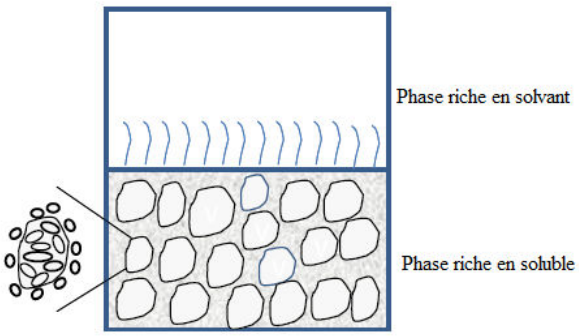


Figure 25. *Présentation de l'extraction par CO2 supercritique du soluté à partir des cellules végétales (Pereira & Meireles, 2010).*

Une augmentation de la température (80°C au lieu de 35°C) à 10 MPa (**Figure 24a**) entraîne une augmentation de la teneur en PT de 0,860±0,027 à 1,458±0,054 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange et en FT de 0,483±0,009 à 0,901±0,013 g rutine équivalent/100g de poudre des écorces d'orange. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'augmentation de la température d'extraction peut provoquer une ouverture de la matrice cellulaire, améliorant ainsi l'extraction des composés phénoliques. Pendant ce temps, la diminution de la viscosité du solvant et l'augmentation de la diffusivité du solvant à haute température peut conduire à des rendements d'extraction élevés (Antunes et *al.,* 2008; Li et *al.,* 2006a).

Ces résultats coïncident avec ceux trouvés dans d'autres études. Lee et *al.* (2010) ont trouvé que la température optimale de l'extraction de la nobiletine et de la tangeretine à partir des écorces de mandarine est de 80°C/30 MPa. He et *al.* (2012) ont rapporté que les conditions optimales pour extraire les flavonoïdes des écorces de pamplemousse sont 80°C à 39 MPa, 49 min alors que Giannuzzo et *al.* (2003) ont conclu que la température optimale pour l'extraction de la naringine des écorces de pamplemousse a été de 58,6°C pendant 45 minutes à 9,5 MPa. Toledo-Guillen et *al.* (2010) ont indiqué que les conditions optimales pour l'extraction des flavonoïdes des écorces d'orange étaient de 60°C à 40 MPa.

La **figure 24a** illustre également l'effet de la pression (10 et 22 MPa, 35°C). Les teneurs en PT et FT augmentent avec l'élévation de la pression de 10 à 22 MPa, de 0,860±0,027 à 1,204±0,019 g EAG/100g de poudre des écorces d'orange et de 0,483 ± 0,009 à 0,589 ± 0,036 g équivalent rutine/100gde poudre des écorces d'orange, respectivement. Ceci peut être attribué à l'augmentation du pouvoir solvant du CO_2 à haute pression en raison de l'augmentation de sa masse volumique.

Diaaz-Reinoso et *al.* (2006) ont rapporté que l'augmentation de la pression induit l'amélioration de l'extraction des composés phénoliques polaires, de poids moléculaire élevé, alors qu'en absence de ces composés, une augmentation de la pression ne renforce pas le rendement d'extraction. Pour notre étude, le pilote utilisé ne permet pas d'appliquer une pression de 22 MPa à 80°C.

La variation de la température ou de la pression induit un changement de la densité du fluide, ce qui affecte l'extraction par solvant supercritique. En général, la température élevée réduit la densité du solvant et diminue le taux d'extraction et améliore la solubilisation. Une augmentation de pression peut se traduire par une augmentation de la densité du fluide, ce qui modifie la solubilité du soluté. La composition de l'extrait peut donc être contrôlée à l'aide de paramètres de pression et de température (Pereira & Meireles, 2010).

En conclusion, une augmentation de la pression et de la température du fluide supercritique entraîne l'augmentation des PT et FT mais on ne peut pas proposer un couple optimal vu qu'une plus large gamme de pression devrait être exploitée.

L'effet des trois couples de température/pression de l'extraction par CO_2 supercritique sur les teneurs en flavonoïdes individuels des écorces de l'orange Maltaise est présenté dans le **tableau 26**.

Tableau 26. *Effet de la pression et de la température sur les flavonoïdes individuels (FI) des écorces d'orange (g/100g de poudre des écorces d'orange).Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05.*

FI	Témoin	35°C/10MPa	35°C/22MPa	80°C/10MPa
Hespéridine	0,551±0,001^{a}	0,076±0,009^{c}	0,407±0,008^{b}	0,510±0,020^{a}
Néohespéridine	0,860±0,003^{a}	0,130±0,006^{d}	0,624±0,013^{c}	0,710±0,018^{b}
Eriocitrine	0,019±0,001^{a}	0,004±0,006^{d}	0,007±0,001^{c}	0,013±0,001^{b}
Narirutine	0,038±0,001^{a}	0,004±0,001^{d}	0,008±0,001^{c}	0,017±0,001^{b}
Naringine	0,042±0,001^{b}	0,018±0,007^{c}	0,043±0,005^{b}	0,065±0,001^{a}
Didymine	0,026±0,001^{a}	0,017±0,010^{a}	0,018±0,001^{a}	0,024±0,002^{a}
Sinensetine	0,020±0,001^{a}	0,017±0,010^{a}	0,045±0,002^{a}	0,023±0,001^{a}
Hexaméthoxyflavone	0,007±0,001^{c}	0,009±0,007^{b}	0,010±0,006^{a}	0,007±0,006^{c}
Tangeretine	0,005±0,001^{d}	0,010±0,001^{a}	0,008±0,001^{b}	0,006±0,001^{c}
Nobiletine	0,042±0.002^{d}	0,071±0,001^{a}	0,068±0,001^{b}	0,049±0,001^{c}

L'extraction par CO_2 supercritique en comparaison avec l'extraction conventionnelle par solvant (témoin) entraîne une augmentation de la teneur en nobiletine, tangeretine et une diminution de la néohespéridine, de l'eriocitrine et de la narirutine.

Les teneurs en didymine et en sinensétine restent constantes. Par contre, les teneurs en hespéridine, naringine et en hexaméthoxyflavone, restent constantes, augmentent ou diminuent légèrement selon le couple pression/température appliqué. L'effet du couple pression/température est différent selon le type du flavonoïde extrait. Les teneurs les plus élevées en flavanones glycosylées (eriocitrine, narirutine, naringine, néohespéridine, hespéridine, didymine) ont été obtenues par SC-CO_2 à 80°C et une pression de 10 MPa. Toutefois, le maximum des flavones polyméthoxylés (sinensétine, tangeretine, nobiletine, hexaméthoxyflavone) a été obtenu par SC-CO_2 à 35°C et une pression de 22 MPa. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'une température élevée de 80°C entraîne la dégradation thermique de certains flavonoïdes comme les flavones polyméthoxylés (Li et *al.,* 2012a). Sur la base de ces résultats, les conditions d'extraction optimales pour les flavones polyméthoxylés est de 35°C à 22 MPa et 80°C à 10 MPa pour les flavanones glycosylées. Giannuzzo et *al.* (2003) ont rapporté que la teneur en naringine extraite par CO_2 supercritique à partir des écorces de pamplemousse est plus élevée (1,44 g/100 g bs) que celle obtenue par ECS (1,11 g/100g bs). He et *al.* (2012) ont rapporté que l'extraction des flavonoïdes par CO_2 supercritique des écorces de pamplemousse est plus efficace (2,370% ± 0,083) que ECS (1,510 ± 0,061%).

L'effet des trois couples de pression/température de l'extraction par CO_2 sur l'activité de piégeage des radicaux libres de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise est représenté dans la **figure 24b**. Cette dernière figure montre que l'activité antioxydante de l'extrait obtenu par SC-CO_2 est inférieure à celle du témoin (ECS) sauf pour l'extrait obtenu à 35°C/22 MPa. Les conditions d'extraction de 35°C/22 MPa donne un extrait ayant une activité antioxydante égale à celle du témoin or ces conditions correspondent également à un extrait plus riche en flavones polyméthoxylés. Une augmentation de la température (35°C à 80°C, 10 MPa) entraîne une augmentation de 31,78% de l'activité antioxydante de l'extrait, alors qu'elle de 55,72% pour une augmentation de la pression (10 à 22 MPa, 35°C).

Une augmentation de température de 35 à 80°C a un effet plus important qu'une augmentation de pression de 10 à 22 MPa sur les teneurs en PT, FT et en flavanones glycosylées alors que l'effet inverse est observé sur les teneurs en flavones polyméthoxylés et l'activité antioxydante totale de l'extrait. Ces résultats pourraient s'expliquer par la sensibilité de certains flavonoïdes aux températures élevées (au-delà de 50°C), causant leur polymérisation et leur oxydation (Diaaz-Reinoso et *al.,* 2006). Ainsi, Pour préserver leur activité antioxydante, la température d'extraction doit être basse. L'augmentation de la pression peut être une alternative pour augmenter la teneur en flavonoïdes sans diminuer leur activité antioxydante.

Après l'étude de l'effet des différents paramètres de méthodes d'extraction conventionnelle et non conventionnelle (l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction sous haute pression et l'extraction par CO_2 supercritique), les conditions optimales de chaque méthode d'extraction (**Tableau 27**) ont été comparées pour trouver la technique permettant d'avoir les teneurs maximales en flavonoïdes et la meilleure activité antioxydante. Cette comparaison a été menée dans la section qui succède.

Tableau 27 *Conditions opératoires optimales des différentes méthodes d'extraction.*

Méthode d'extraction	Conditions d'extraction
ECS	Éthanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C et agitation mécanique à l'obscurité, 3 extractions successives.
EAU	Éthanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C et agitation magnétique à l'obscurité, **125W**, 3 extractions successives.
EAM	Ethanol (80%), m/v: 5g: 50ml, **10s,** 35°C, **170W**, 3 extractions successives.
EHP	Éthanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C, **50 MPa, 1 seule extraction**.
SC-CO_2	Éthanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, **35°C, 22 MPa**, 3 extractions successives.

III.2.2. Comparaison de l'efficacité des différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques et l'évolution de l'activité antioxydante des écorces d'orange

III.2.2.1. Teneur en phénols et en flavonoïdes totaux (PT, FT)

La **figure 26** présente les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux des extraits des écorces de l'orange Maltaise obtenus par l'extraction conventionnelle par solvant, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée micro-ondes, l'extraction par CO_2 supercritique et par l'extraction sous haute pression.

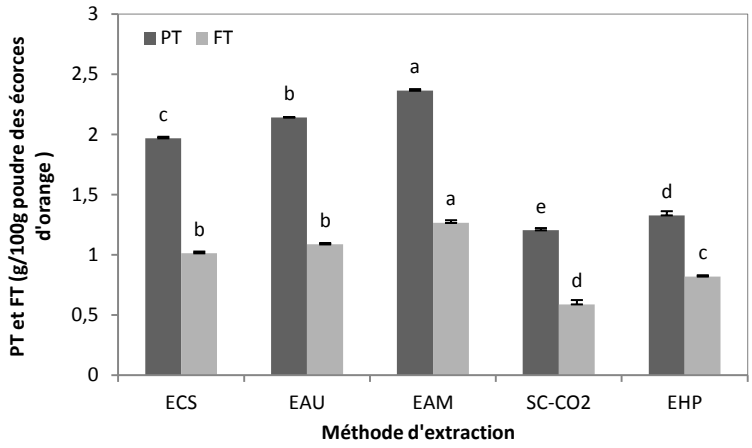


Figure 26. *Teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux des extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction. Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05.*

La **figure 26** indique que les teneurs en phénols totaux (2,363±0,014 g EAG/100 g de poudre des écorces d'orange) et en flavonoïdes totaux (1,265±0,023 g rutine/100 g de poudre des écorces d'orange) de l'extrait obtenu par la méthode EAM sont plus élevées que celles obtenues dans l'extrait obtenu par EAU, ECS suivi par EHP et l'extraction SC-CO_2. Selon ces résultats, la classification des différentes méthodes d'extraction sur la base des teneurs en phénols et flavonoïdes totaux les plus élevées est: l'extraction assistée par micro-ondes (*ratio: m/v:5g/50ml, 10 s, 35°C, éthanol 80%, 170 W et 3 extractions successives.*), l'extraction assistée par ultrasons (*ratio: m/v:5g/50ml, 30 min, 35°C, éthanol 80%, 125 W et 3 extractions successives);* l'extraction conventionnelle par solvant (*ratio: m/v:5g/50ml, 30 min, 35°C, éthanol 80%, agitation à l'obscurité et 3 extractions successive)*. Les deux méthodes donnant les teneurs en PT et FT les plus basses sont : l'extraction par CO_2 supercritique *ratio: m/v:5g/50ml, 30 min, 35°C, éthanol 80%, 22 MPa et 3 extractions successives*) et l'extraction sous haute pression (*ratio: m/v:5g/50ml, 30 min, 35°C, éthanol 80%, 50 MPa et 1 seule*

extraction). Ces résultats sont en accord avec la littérature. Dahmoune et *al.* (2013) ont comparé 3 méthodes d'extraction des composés phénoliques des écorces de citron : ECS, EAU et EAM. Les auteurs ont rapporté qu'il n'y a pas de différence significative entre les teneurs en PT des extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction. Par contre, l'extrait obtenu par EAM présente l'activité antioxydante la plus élevée, suivie par ECS et EAU. L'activité antioxydante faible des extraits obtenus par EAU et ECS peut être due à la durée prolongée d'extraction d'où l'exposition aux conditions défavorables (la lumière et l'oxygène).

L'observation microscopique (**Figure 27**) des extraits obtenus par ECS, EAU et EAM, a montré que par rapport à la poudre des écorces d'orange non traitée par micro-ondes et ultrasons, l'extraction conventionnelle par solvant entraîne des changements au niveau des cellules mais les dommages causés sont différents selon la méthode d'extraction.

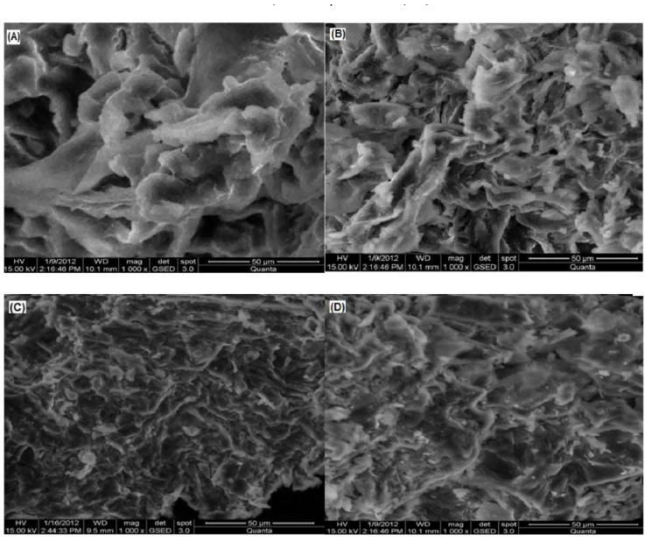


Figure 27. *Images de microscope électronique à balayage de la poudre d'écorces de citron avant (A), après l'extraction conventionnelle par solvant (B), l'extraction assistée par micro-ondes (C), l'extraction assistée par ultrasons (D) (Dahmoune et al., 2013).*

Les ultrasons entraînent la perturbation des cellules végétales par le phénomène de cavitation (Kong et *al.,* 2010). Les particules de la poudre des écorces de citron sont résistantes à l'énergie ultrasonore (Aspé & Fernández, 2011). La montée de la pression dans les pores cellulaires provoque une rupture plus rapide en comparaison avec le contrôle. Par contre, EAM entraîne une dégradation plus intense des tissus sous l'action des micro-ondes. En effet, EAM déshydrate le cellulose et réduit sa résistance mécanique, ce qui permet une pénétration facile du solvant dans les canaux cellulaires (Dahmoune et *al.,* 2013).

Le chauffage par micro-ondes provoque un dommage cellulaire et une microstructure fragilisée qui aide à libérer rapidement le soluté dans le solvant.

Notre étude a montré que l'extraction par CO_2 supercritique donne la teneur la plus faible en composés phénoliques par rapport aux autres méthodes d'extraction. La technique SC-CO_2 n'utilise pas ou seulement une quantité minimale du solvant organique (modificateurs organiques) pour l'extraction. C'est une technique d'extraction plus écologique que l'extraction conventionnelle par solvant. En outre, le CO_2 est peu coûteux et peut facilement être obtenu à une haute pureté et de qualité alimentaire (Boonkird et *al.,* 2008).

L'utilisation de fluide supercritique offre un extrait final pur dépourvu de composés indésirables tels que les polluants organiques, les toxines et les pesticides. L'extrait obtenu peut être utilisé directement sans parvenir à l'étape de séparation du solvant/soluté, mais par une simple dépressurisation du fluide supercritique (Gil-Chavez et *al.,* 2013; Azmir et *al.,* 2013). Un autre avantage est que SC-CO_2 par peut être sélectif par la possibilité de manipuler la pression et la température. Cela rend l'application plus utile pour les matrices végétales, dans lesquelles les composés ciblés sont en général présents à des faibles concentrations et ont une composition complexe (Lang & Wai, 2001). Cependant, la caractéristique non-polaire de CO_2 a limité son application pour l'extraction de composés polaires qui sont les principaux composés phénoliques des écorces d'orange. Le coût de fonctionnement du processus de l'ESC a restreint les applications à certains domaines spécialisés tels que décaféination (Galanakis, 2012).

L'extraction assistée par ultrasons et par micro-ondes donnent le contenu phénolique le plus élevé. L'extraction assistée par ultrasons est également une technique d'extraction moderne qui permet l'extraction des composés thermolabiles car la température peut rester faible au cours du processus, en maintenant ainsi la qualité de l'extrait (Chemat et *al.,* 2008; Routray & Orsat, 2012). Néanmoins, il est nécessaire de noter qu'étant donné que les ultrasons génèrent de la chaleur, il est important de contrôler avec précision la température d'extraction. Le temps de traitement aux ultrasons doit également être examiné avec soin parce qu'un excès de sonication peut endommager la qualité des extraits (Wang & Weller, 2006).

L'EAU est une technique qui a le potentiel d'être mise à l'échelle industriel en raison des coûts d'exploitation modérés (Boonkird et *al.,* 2008). L'extraction assistée par micro-ondes a montré des avantages évidents en termes d'efficacité d'extraction élevée pendant une courte durée d'extraction.

Par contre, il faut éviter les puissances élevées pour empêcher la dégradation des composés phénoliques et la formation de nouveaux produits qui peuvent être toxiques. Ces résultats sont en accord avec les conclusions d'autres chercheurs (Hayat et *al.,* 2010; Jawad & Langrish, 2012). Enfin, l'extraction sous hautes pressions est efficace pour augmenter l'activité antioxydante des extraits, mais cela est certainement dû à des produits autres que les composés phénoliques. Une identification de ces composés serait nécessaire pour assurer de la sécurité de l'extrait (produits toxiques…).

III.2.2.2. Flavonoïdes individuels

L'analyse CLHP montre que pour les différentes méthodes d'extraction utilisées, les écorces de l'orange Maltaise contiennent les mêmes flavonoïdes: l'hespéridine, la néohespéridine, l'eriocitrine, la narirutine, la naringine, la didymine, la sinensetine, le 3',4',5,5',6,7-hexaméthoxyflavone, la tangeretine et la nobiletine. Les pourcentages de ces composés rapportés à la teneur en flavonoïdes totaux sont résumés dans la **figure 28**.

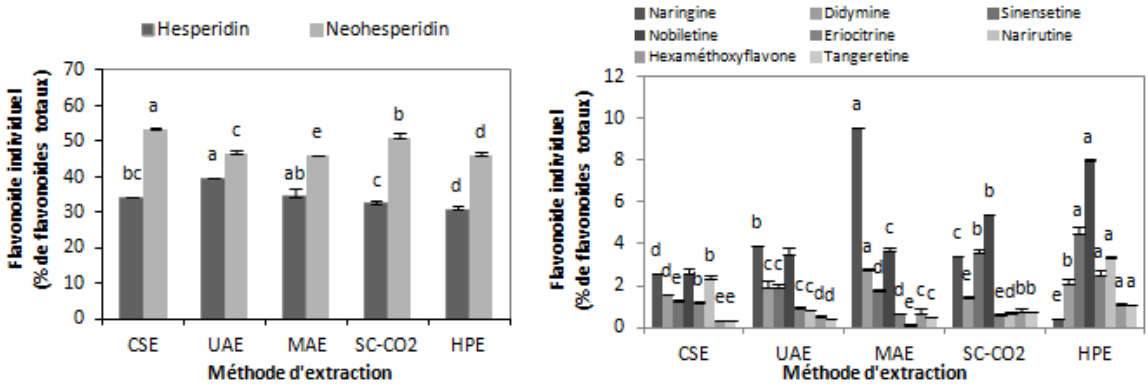


Figure 28. *Flavonoïdes individuels (majoritaires et minoritaires) des extraits des écorces de l'orange Maltaise obtenus par les différentes méthodes d'extraction exprimés en pourcentage des phénols totaux.*
Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05.

L'hespéridine et la néohespéridine sont les principaux flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise. Pour un flavonoïde donné, le pourcentage extrait varie de manière significative selon la méthode d'extraction et l'ampleur de cette variation est différent d'un flavonoïde à un autre: la néohespéridine (45,93% par EAM-53,45% par ECS), suivie par l'hespéridine (30,86% par EHP-39,55% par EAU), la naringine (0,40% par EHP-9,58% par EAM), la nobiletine (2,61% par ECS-7,95% par EHP), la sinensétine (1,24% par ECS-4,50% par EHP), la didymine (1,43% par SC-CO_2- 2,73% par EAM), l'eriocitrine (0,56% par SC-CO_2- 2,52% par EHP), la narirutine (0,09% par EAM-3,31% par EHP), l'hexaméthoxyflavone (0,37% par ECS-1,06% par EHP) et la tangeretine (0,31% par ECS- 1,06% par EHP).

Les résultats obtenus indiquent que l'efficacité de l'extraction pour une méthode donnée dépend du composé (structure chimique, polarité, poids moléculaire…). Les teneurs les plus élevées en néohespéridine, hespéridine, didymine, tangeretine, hexaméthoxyflavone, nobiletine et naringine sont obtenues par EAM. L'eriocitrine est obtenue avec une teneur maximale par EAU, ECS, EHP (différence non significative) alors que c'est les méthodes de SC-CO_2 et d'ECS qui permettent d'obtenir respectivement les teneurs les plus élevées en sinensétine et en narirutine. Ces résultats coïncident avec ceux rapportés dans la littérature. En effet, Hayat et *al.* (2009) ont comparé ECS, EAU, EAM pour l'extraction des acides phénoliques des écorces de mandarine. L'EAM donne la teneur la plus élevée en acide férulique (0,239 g /100 g bs) par rapport à EAU (0,235g/100 g bs) et ECS (0,205 g/100 g bs).

Khan et *al.* (2010) ont rapporté que les teneurs en naringine et en hespéridine des écorces d'orange variété Valencia, obtenues par EAU étaient considérablement plus élevées (0,250 et 0,070 g/100g bs, respectivement) que celles obtenues par ECS (0,145 et 0,051 g/100 g bs, respectivement).

III.2.2.3. Effet des méthodes d'extraction sur l'activité antioxydante

L'activité antioxydante peut être mesurée par une large gamme de dosages spectrophotométriques. La plupart des tests utilisent le même principe: la génération d'un composé radicalaire synthétique coloré ou d'un composé actif redox et la capacité d'un extrait biologique à piéger le radical ou à réduire ce composé actif redox.

En outre, il existe deux grands groupes de test: les dosages basés sur la réaction de transfert d'électrons unique, affichés par un changement de couleur quand l'oxydant est réduit tels que (FRAP, ABTS, DPPH), et des dosages basés sur un transfert d'atomes d'hydrogène, qui mesurent l'activité de l'antioxydant à piéger les radicaux peroxyle, tels que le paramètre d'antioxydant total de piégeage des radicaux (TRAP) et la capacité d'absorbance d'oxygène radical (ORAC) (Müller et *al.,* 2011). Dans les spécifications, l'essai ABTS est basé sur la génération d'un bleu/vert $ABTS^+$ qui peut être réduit par des antioxydants; alors que le dosage de DPPH est basée sur la réduction du DPPH pourpre à 1,1-diphényl-2-picryl hydrazine (Floegel et *al.,* 2011).

Roginsky & Lissi (2005) ont rapporté que le DPPH ne réagit pas avec les flavonoïdes qui ne contiennent pas de groupes OH en cycle B ainsi qu'avec les acides aromatiques. Le DPPH ne peut pas mesurer l'activité des autres constituants tels que les caroténoïdes des écorces d'orange.

Cependant, il est moins sélectif car les composés réducteurs non antioxydants (sucres, acide citrique) peuvent réagir avec les réactifs oxydants (Goulas et *al.,* 2012). En plus, pour le test DPPH, les flavanones (composés majoritaires des écorces de l'orange Maltaise) sont exceptés d'avoir une faible contribution. Par conséquent, comparé au dosage de DPPH, l'ABTS permet de donner de meilleures estimations assez complémentaires de la capacité antioxydante des différentes molécules des extraits, en particulier ceux des fruits et des légumes.

Parmi ces 2 tests, le test d'ABTS serait plus recommandé pour mesurer l'activité antioxydante des écorces de l'orange Maltaise. Comme il a été indiqué précédemment, la teneur en flavonoïdes des extraits des écorces de l'orange Maltaise dépend de la méthode d'extraction utilisée et de l'apparition de nouveaux produits suite à des réactions d'oxydation et de polymérisation. Ces deux points peuvent affecter l'activité antioxydante des différents extraits.

Pour évaluer cet effet, l'activité antioxydante a été mesurée dans notre étude par les deux méthodes DPPH et ABTS (**Figure 29**). La vitamine C contenue dans les différents extraits a été quantifiée. Cette teneur reste constante (200 µM) dans les différents extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction sauf pour l'extraction sous haute pression. En effet, celle-ci est plus faible car il n'y a qu'une seule extraction et non pas trois extractions successives comme pour les autres extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction. Par conséquent, la variation de l'activité antioxydante observée ne peut pas être attribuée à cette molécule.

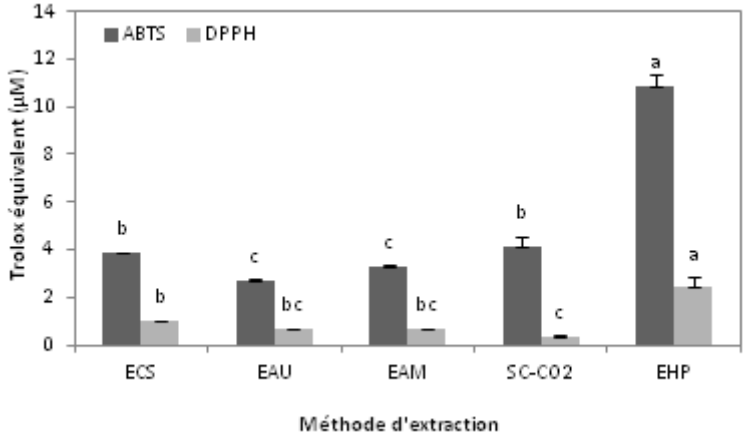


Figure 29. *Activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange Maltaise obtenus par les différentes méthodes d'extraction. Moyennes de 3 répétitions ± écart-type. Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différentes à p< 0,05.*

Ces résultats montrent que les écorces d'orange extraits par EHP présente la capacité de piégeage des radicaux libres la plus importante par rapport aux extraits obtenus par les autres

méthodes d'extraction. En outre, on constate une diminution significative de la concentration (µM équivalent Trolox) de la méthode ABTS dans l'ordre suivant: EHP, ECS, SC-CO_2, EAM, EAU. L'ordre de la diminution de la concentration (µM équivalent Trolox) de la méthode DPPH est: EHP, ECS, EAM, EAU et SC-CO_2. Ces résultats ne sont pas cohérents avec l'évolution des teneurs en phénols et flavonoïdes totaux selon les différentes méthodes d'extraction. En effet, l'extrait EAM contient la teneur la plus élevée en phénols totaux et pourtant il ne possède pas l'activité antioxydante la plus importante, il est classé 4^e selon le dosage ABTS et 3^e avec le dosage DPPH. L'extrait qui a l'activité antioxydante la plus élevée (EHP), a une teneur en phénols totaux la plus faible avec l'extraction par CO_2. Cela peut s'expliquer d'une part par une composition phénolique différente des extraits et d'autre part par l'apparition de nouveaux produits possédant eux aussi une activité antioxydante. Ces produits sont issus (1) de l'oxydation par la polyphénoloxydase en appliquant les hautes pressions (dans le cas de l'EHP), les produits formés sont des quinones, (2) de la réaction de Maillard suite à l'utilisation des températures élevées (dans le cas de l'EAM). Les produits de la réaction de Maillard (PRM) pourraient être divisés en différents groupes. Au cours de la première phase de la formation PRM, des petites molécules telles que glyoxyl, méthyloxyl et quelques autres dicarbonyls sont formés (Chen et *al.,* 2005; Hodge, 1953; Yaylayan & Haffenden, 2003). Étant donné que ces composés ont un potentiel oxydatif élevé et une activité chimique, les PRM formés à ce stade ont tendance à être pro-oxydant. L'activité chimique élevée de ces produits entre eux conduit alors à des produits à poids moléculaires élevés et une couleur brune à travers une série de condensation et de réaction de polymérisation (Nicoli et *al.,* 1994). Les complexes des PRM à l'étape ultérieure sont antioxydant et ont été nommés collectivement mélanoïdines (Knol et *al.,* 2005; Liu et *al.,* 2008; Martins & Van Boekel, 2005). En plus, des interactions entre les produits de dégradation peuvent avoir lieu, résultant ainsi des synergies positives ou négatives de l'activité antioxydante (Hidalgo et *al.,* 2010). La composition phénolique des extraits est différente selon la méthode d'extraction et le pouvoir antioxydant des flavonoïdes est différent. Par conséquent, dès que la composition de l'extrait est modifié, l'activité antioxydante peut être modifiée mais en des proportions plus grandes.

Le **tableau 28** présente l'activité antioxydante des flavonoïdes individuels de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise. Les résultats obtenus indiquent que l'activité antioxydante de l'extrait obtenu par ECS (3,867 µM) est supérieure aux contributions des flavonoïdes individuels ainsi que celle de la vitamine C.

Tableau 28. *Activité antioxydante des flavonoïdes individuels de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise.*

Composé	ABTS (µM Trolox)	DPPH (µM Trolox)	Concentration dans l'extrait (µM)
Néohespéridine	1,297±0,032	0,095±0,012	467
Hespéridine	1,216±0,019	0,054±0,002	300
Vitamine C	0,846±0,029	1,224±0,027	200
Eriocitrine	0,838±0,022	1,009±0,012	11
Narirutine	0,221±0,012	ND at 344 µM	22
Didymine	0,020±0,002	0,083 ± 0,019	15
Naringine	0,111±0,002	0,056±0,021	24
Hexaméthoxyflavone	0,077±0,002	0,038±0,009	5
Tangeretine	0,004±0,001	0,115±0,022	4
Nobiletine	ND at 932 µM	ND at 932 µM	35
Sinensetine	ND at 537 µM	ND at 1 mM	18
TEAC prédite	1,012±0,003	0,332±0,001	-
TEAC expérimentale	0,552±0,004	0,100±0,013	-

ND: Non détecté.

Le **tableau 28** montre que le classement des dix flavonoïdes varie en fonction de la méthode de détermination de l'activité antioxydante utilisée. Parmi les composés antioxydants identifiés et quantifiés dans cette étude, la néohespéridine et l'hespéridine qui présentent des valeurs d'activité antioxydante similaires (1,297 et 1,216 µM, respectivement, pour le tes ABTS).

Par contre, les valeurs sont de 0,095 et 0,054 pour le test DPPH. Ce résultat peut être expliqué par le fait que particulièrement pour le test DPPH, les flavanones sont exceptés d'avoir une faible contribution (Khan et *al.,* 2010).

L'acide ascorbique montre une valeur inférieure de 30% (0,846 µM équivalent Trolox). L'activité antioxydante de la nobiletine est si faible qu'elle ne peut pas être détectée par cette méthode. La naringine et la narirutine ont une activité antioxydante dix fois plus faible que celle de la néohespéridine ou l'hespéridine qui est dû aux différences dans leurs structures chimiques.

En effet, la structure phénolique est un déterminant important du potentiel antioxydant (Rice-Evans et *al.,* 1996). L'activité antioxydante élevée de ces molécules est expliqué par la présence de groupe ène-diol pour l'acide ascorbique et les groupes -OCH_3 et OH dans le noyau B pour la néohespéridine et l'hespéridine qui se traduit par une activité de piégeage des radicaux comparable à celle observée en présence d'un groupe catéchol (Van Acker et *al.,* 1996).

La configuration des hydroxyles du noyau B est le paramètre structural le plus significatif de l'activité antioxydante. Ces deux types de fonctions organiques ont une activité de piégeage des radicaux libres comparable à celle observée en présence d'un groupe catéchol. L'activité antioxydante élevée de l'eriocitrine (0,838 (ABTS), 1,009 (DPPH)) est due à la présence de 2 groupements -OH sur le noyau B. Par contre, la narirutine et la naringine contiennent juste un seul groupe -OH dans le noyau B, par conséquent, leur activité est beaucoup plus faible (Xiao et *al.,* 2009; Van Acker et *al.,* 1996).

Afin de vérifier l'effet de la composition de l'extrait sur l'activité antioxydante, l'activité antioxydante d'un mélange constitué des dix flavonoïdes identifiés dans l'extrait obtenu par ECS a été mesurée et comparée à celle prédite à partir des valeurs de l'activité antioxydante de chaque flavonoïde corrigée par leur fraction molaire. Les résultats ont montré qu'avec le test ABTS et DPPH, nous avons un effet synergique clair. L'activité antioxydante de l'échantillon préparé à base des flavonoïdes individuels est de 0,552±0,004 pour la valeur mesurée par ABTS contre 1,012±0,003 pour celle prédite. Pour le test DPPH, la valeur mesurée est de 0,100±0,013 contre 0,332±0,001 (prédite).

Ces résultats coïncident avec ceux trouvés par Hidalgo et *al.* (2010) qui ont conclu qu'il est impossible de prédire l'activité antioxydante d'un extrait juste en étudiant un seul type de flavonoïdes ou autres types d'antioxydants contenus dans l'extrait comme la vitamine C ou E. Dans certains cas, des effets synergiques ou antagonistes peuvent avoir lieu entraînant ainsi l'augmentation ou la diminution de l'activité antioxydante totale de l'extrait (Reber et *al.,* 2011).

Peyrat-Maillard et *al.* (2003) ont suggéré que la combinaison des antioxydants agit d'une manière de régénération, soit avec l'antioxydant fort ou le plus faible. Cela peut avoir un effet globalement positif (synergique) si l'antioxydant faible régénère l'antioxydant le plus fort, ou un effet négatif global (antagonistes) et le contraire se produit.

D'autres hypothèses sont données pour expliquer les interactions d'antioxydants comprennent les vitesses de réaction des antioxydants, la polarité des molécules interagissant entre elles et la concentration efficace des antioxydants au site d'oxydation (Reber et *al.,* 2011).

Conclusion

Dans cette étude, les effets des conditions opératoires (température, pression, puissance) de quarte méthodes d'extraction de phénols des écorces de l'orange Maltaise (extraction assistée

par ultrasons : EAU *(100-200W),* extraction assistée par micro-ondes : EAM (*100-400W*), extraction par CO_2 supercritique : SC-CO_2 (*35-80°C/10-22 MPa*), et extraction sous hautes pressions : EHP (*0,1-100 MPa*)) ont été étudiés puis comparés pour des conditions similaires à l'extraction conventionnelle par solvant (ECS). La comparaison de l'efficacité des différentes méthodes a porté sur : la teneur en phénols et en flavonoïdes totaux, les teneurs en flavonoïdes individuels et l'activité antioxydante des extraits.

Les conditions optimales pour l'extraction conventionnelle par solvant (ECS) sont : un rapport m/v:5g:50 ml; 80% d'éthanol avec agitation mécanique, un temps d'extraction de 30 min, une température d'extraction de 35°C et 3 extractions successives. Pour l'EAM, une puissance de 300 W qui correspond à une température de 92°C est préférable pour maximiser l'activité antioxydante de l'extrait, alors qu'une puissance de 200 W correspondante à une température de 76°C permet d'avoir la teneur en phénols totaux la plus élevée (2,688±0,070 g EAG/100g).

Pour l'EAU, une puissance de 125 W permet d'avoir les teneurs les plus élevées en phénols (2,140±0,005 g EAG/100g), en flavonoïdes totaux (1,087±0,012 g rutine/100g) et une activité antioxydante de 2,735±0,048 µM équivalent Trolox (test ABTS). Une température de 80°C et une pression de 10 MPa pour l'extraction SC-CO_2 donnent les teneurs les plus élevées en phénols (1,458±0,054 g EAG/100g), en flavonoïdes totaux (0,906±0,012 g rutine 100g) et une activité antioxydante de 2,658±0,059 µM équivalent Trolox (test ABTS). Une pression de 50 MPa est utilisée pour l'EHP dans le but d'obtenir la teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux, tandis qu'une pression de 100 MPa donne la meilleure activité antioxydante (11,911±0,151 µM équivalent Trolox, test ABTS).

Une comparaison de ces différentes méthodes d'extraction pour des conditions opératoires similaires à celle de l'ECS (rapport m/v:5g:50 ml; 80% d'éthanol avec agitation mécanique et une température d'extraction de 35°C) a été effectuée. Dans ces conditions, les résultats ont montré que l'EAM a été jugée la meilleure approche pour l'extraction des flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise, suivie par l'EAU, l'ECS, l'EHP et l'extraction SC-CO_2. En fait, l'EAM permet une augmentation de 20% en PT et de 24% en FT, alors qu'elle est de 9,4% et 7,4% pour l'EAU, en les comparants avec l'ECS.

Les deux autres méthodes (EHP, SC-CO_2) entraînent une diminution des teneurs en PT (32-38%) et en FT (19-42%), respectivement. L'EAM donne les teneurs les plus élevées en flavonoïdes individuels (FI) majoritaires des écorces de l'orange Maltaise, essentiellement la

néohespéridine (1,045±0,001 g/100g de poudre des écorces d'orange). Par contre, les résultats de l'activité antioxydante ne sont pas systématiquement corrélés avec ceux des PT, FT et FI. Cela peut être expliqué par la modification de la composition de l'extrait selon la méthode d'extraction utilisée mais aussi par la formation dans certaines conditions de nouveaux composés antioxydants (produits de polymérisation, produits de réaction de Maillard). Le résultat de l'activité antioxydante peut différer selon le type de test utilisé. Quel que soit le test utilisé, l'activité antioxydante des autres extraits diminue par rapport à celle de l'extrait obtenu par ECS, sauf pour l'extrait obtenu par EHP qui présente une augmentation de l'activité antioxydante de 35% avec le test ABTS et de 42% pour le test DPPH.

En conclusion, l'EAM peut être considérer, dans ces conditions, la meilleure méthode d'extraction des flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise mais elle n'améliore cependant pas l'activité antioxydante de l'extrait qui reste inférieure à celle du témoin (ECS). Par contre, l'EAM présente de nombreux autres avantages par rapport à l'ECS, tels que un temps d'extraction réduit, un rendement d'extraction élevée d'où une économie d'énergie et des meilleurs produits à moindre coût. Par conséquent, l'EAM peut remplacer les méthodes conventionnelles d'extraction des flavonoïdes des écorces d'orange.

III.3. Étude de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone par l'extrait des écorces d'orange et ses composés antioxydants

Introduction

La corrosion affecte la plupart des secteurs industriels et peut coûter des milliards de dollars chaque année (Hussin & Kassim, 2011). A titre d'exemple dans le cas des procédés industriels les métaux sont exposés à l'action des acides mais parfois aussi des bases, qui agissent comme agents corrosifs. Ces acides jouent un rôle important dans l'industrie, surtout dans les systèmes de nettoyage en industries alimentaire, le raffinage du pétrole brut, le décapage à l'acide, le nettoyage industriel, le détartrage acide et dans les procédés pétrochimiques (Abiola & James, 2010 ; Hussin & Kassim, 2011).

L'efficacité des antioxydants issus des agro-ressources comme inhibiteurs de la corrosion des métaux a été découverte à la fin du XIX^{ème} siècle. Ce moyen de protection d'origine naturelle a été supplanté par le développement et l'utilisation extensive des inhibiteurs inorganiques très efficaces (tels que les phosphates, les chromates et les nitrites) ou des molécules simples de synthèse organique montrant également un pouvoir inhibiteur intéressant (les polyamines, les carboxylates à longue chaîne, l'imidazole et les composés dérivées). Cependant, la production de ces molécules n'est pas seulement coûteuse mais aussi souvent toxique. Dans le cadre des nouvelles règles toxicologiques et écologiques (comme le règlement REACH et l'eau des directives européennes sur les eaux usées rejetées (Directive 2000/60/EC, 2000), les molécules organiques extraites des végétaux apparaissent comme un outil alternatif dans le domaine de l'inhibition de la corrosion en raison de leur biodégradabilité, disponibilité et de leur non-toxicité. Par conséquent, plusieurs chercheurs ont mis l'accent sur l'utilisation potentielle de ces inhibiteurs verts depuis environ dix ans.

Diverses substances naturelles ont été testées comme inhibiteurs de corrosion de l'acier en milieu acide (Saleh et *al.,* 1982; Raja & Sethuraman , 2008). Parmi ceux-ci, des extraits de plantes l'hibiscus (El-Hosary et *al.,* 1972), l'henna (Rehan, 2003 ; Ostovari et *al.,* 2009 ; Hamdy et *al.,* 2013) le thym (Chetouani *et al.,* 2003), la camomille (Abdel-Gaber et *al.,* 2006), le blé (Rehan, 2003), des extraits des feuilles: la feuille du palmier dattier (Rehan,

2003), les feuilles d'*Andrographis paniculata* (Singh et *al.,* 2010), les feuilles d'olivier (El-Etre, 2007), les feuilles de *citrus aurantiifolia* (Saratha et *al.,* 2009), les feuilles de *Ginkgo* (Deng et *al.,* 2012), les feuilles du thym (Ibrahim et *al.,* 2012), des extraits des écorces de fruits**:** les pelures de banane (Eddy & Ebenso, 2008; Ji et *al.,* 2015), les pelures d'ail (De Assunçao Araujo Pereira et *al.,* 2012), les écorces de grenade « *Punica granatum* » (Belhpour et *al.,* 2012), des extraits de graines: les extraits de graines du palmier dattier (Umoren et *al.,* 2013) et les graines d'*Ammi Visnaga* (El-Etre, 2006) ou même le café moulu (Vasconcelos Torres et *al.,* 2011), ou le miel (El-Etre & Abdallah, 2000). Ces extraits naturels ont prouvé leur efficacité.

L'inhibition de la corrosion par les extraits naturels est généralement attribuée à la présence de métabolites secondaires contenant des constituants antioxydants tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, et les tannins condensés (Lebrini et *al.,* 2011 ; Behpoura et *al.,* 2012 ; Rahim et *al.,* 2007). L'efficacité de la protection dépend du substrat, des molécules organiques actives et du milieu corrosif. L'adsorption de type Langmuir de monocouches sur des surfaces métalliques a été décrite, ainsi que la formation de films de conversion tridimensionnels. Toutefois, en raison de la grande variété de molécules contenues dans les extraits naturels, les mécanismes d'inhibition restent largement inconnus.

Dans ce travail, le pouvoir inhibiteur d'un extrait des écorces de l'orange Maltaise sur l'acier au carbone dans l'acide chlorhydrique et la soude est étudié. Le but de cette partie de l'étude est de corréler l'activité antioxydante des molécules extraites des écorces d'orange et l'efficacité de l'inhibition de la corrosion de l'extrait naturel.

Le pouvoir inhibiteur de molécules flavonoïdes choisies (la néohespéridine et la naringine) ainsi que celui de l'acide ascorbique a été évalué en utilisant des méthodes électrochimiques (mesures de potentiel de corrosion, courbes de polarisation et la spectroscopie d'impédance électrochimique) et comparée par rapport à leur activité antioxydante évaluée par le test ABTS. Le mécanisme d'inhibition de la corrosion de l'extrait des écorces d'orange a été étudié en combinant les résultats de l'analyse du comportement électrochimique et les observations de l'analyse de surface après immersion dans le milieu corrosif. Cette partie à fait l'objet d'une publication scientifique (M'hiri et *al.,* 2015) (**Annexe 4**)

D'autre part, une évaluation de la résistance de l'acier après un traitement de surface dans une solution contenant l'extrait ou les molécules antioxydantes choisies a été menée.

III.3.1. Inhibition de la corrosion de l'acier en milieu acide

L'étude de l'efficacité de l'inhibition de la corrosion de l'acier en milieu acide par l'extrait des écorces d'orange a été menée à pH=1. Les flavonoïdes majoritaires des écorces d'orange sont : la néohespéridine, l'hespéridine, la nobiletine, la naringine, la narirutine.

Parmi ces composés antioxydants identifiés et quantifiés dans cette étude, la néohespéridine et l'hespéridine présentent des valeurs d'activité antioxydante similaires (1,297 et 1,216 respectivement), en raison de leur structure chimique très proche. La narirutine et la naringine sont des isomères de conformation et ont une activité antioxydante cinq à dix fois plus faible que l'hespéridine ou la néohespéridine (respectivement 0,221 et 0,111), en raison de l'absence de groupe catéchol sur le noyau B (Van Acker et *al.,* 1996 ; Xiao et *al.,* 2009). En ce qui concerne la nobiletine, son activité antioxydante est si faible qu'elle ne peut pas être détectée par la méthode ABTS. On peut noter que l'acide ascorbique pur montre une valeur inférieure de 30% (0.846) que l'un des flavonoïdes.

Par conséquent, pour les caractérisations électrochimiques et l'analyse de la surface, la néohespéridine, la naringine et l'acide ascorbique ont été choisis comme les molécules antioxydantes représentatives de l'extrait des écorces d'orange.

III.3.1.1. Caractérisations électrochimiques

La caractérisation électrochimique de l'acier a été étudié en HCl 0,1 M (eau/éthanol 50/50 vol. %). L'effet inhibiteur de l'extrait a été étudié par des expériences électrochimiques: mesures de potentiel de corrosion (**Figure 30**), courbes de polarisations (**Figure 31**) et spectroscopie d'impédance électrochimique (**Figure 32**) après dilution de l'extrait à 50% et 10%. La néohespéridine, la naringine et l'acide ascorbique ont été testés séparément en tant que molécules antioxydantes pures à 10^{-5} mol L^{-1}. Cette concentration correspond à l'ordre de grandeur des quantités des molécules antioxydantes dans l'extrait dilué à 10%.

- *Mesures de potentiel de corrosion*

Comme le montre la **figure 30**, le potentiel de corrosion à la surface de l'acier mesuré dans HCl 0,1 M avec ou sans inhibiteur ou l'extrait des écorces d'orange atteint rapidement une valeur stable (environ -0,50 V/ECS) après 30 minutes d'immersion.

Toutes les valeurs mesurées sont confinées dans une gamme réduite de potentiels (entre -0,52 V/ECS et -0,45 V/ECS) et seulement de légères différences peuvent être remarquées.

Toutefois, le potentiel le plus bas est obtenu en présence d'acide ascorbique alors que le potentiel le plus élevé est observé en présence de néohespéridine.

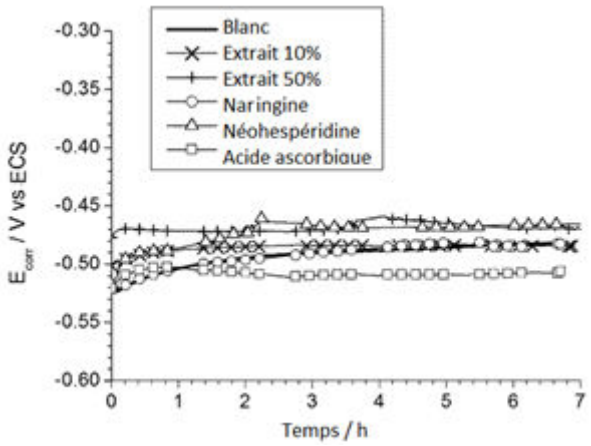


Figure 30. *Mesures de potentiel de corrosion pendant l'immersion de l'acier dans un électrolyte à base d'eau/éthanol acidifié à pH 1 avec l'HCl.*

Effet de l'addition de l'extrait des écorces d'orange et leurs composés antioxydants : néohespéridine 10^{-5}M, naringine 10^{-5}M et acide ascorbique 10^{-5}M.

❖ *Courbes de polarisation potentiodynamique*

Les courbes de polarisation cathodique et anodique, enregistrées au bout de 8 heures d'immersion dans le milieu corrosif, montrent que l'extrait des écorces d'orange agit à la fois comme un inhibiteur cathodique et anodique (**Figure 31a**).

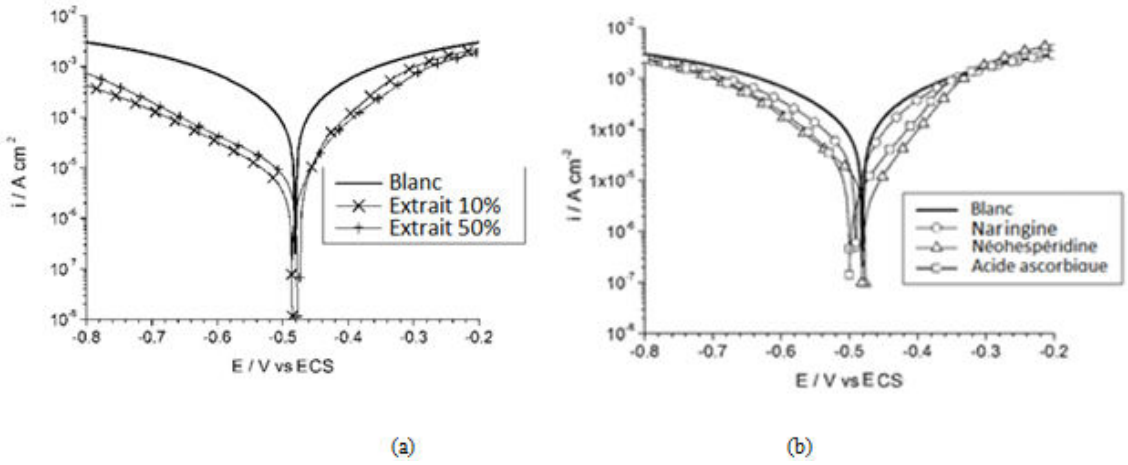


Figure 31. *Courbes de polarisation cathodique et anodique enregistrées sur l'acier après 8 h d'immersion dans un électrolyte à base d'eau/éthanol acidifié à pH 1 avec l'HCl. Effet de l'addition de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise et leurs composés antioxydants : néohespéridine 10^{-5}M, naringine 10^{-5}M et acide ascorbique 10^{-5}M.*

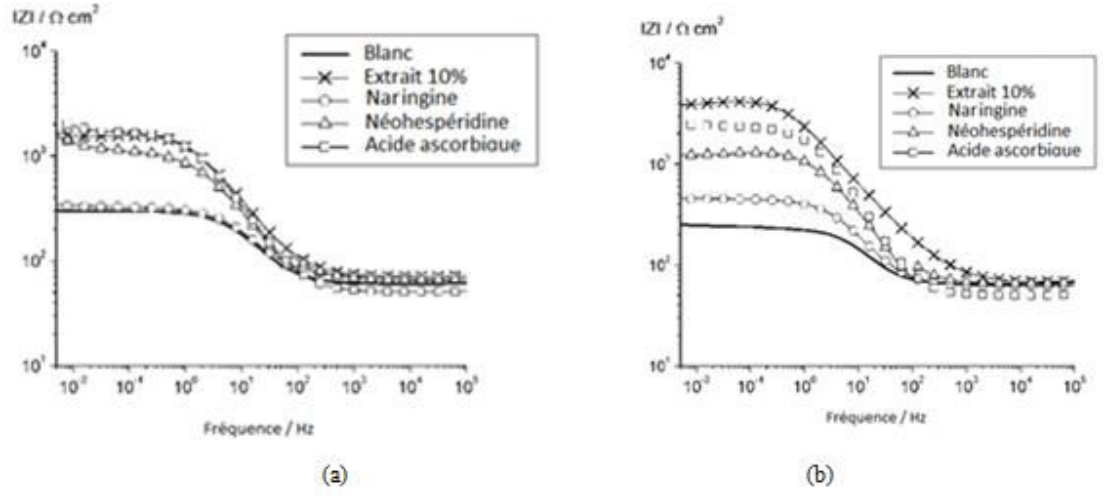
Du côté cathodique, la densité de courant relative à la cinétique de la réduction de H^+ est divisée par un facteur 10 en présence de l'extrait des écorces d'orange dans le milieu corrosif quel que soit sa concentration (dilué à 10% ou 50%).

Cette inhibition cathodique est également observée pour les trois molécules antioxydantes pures. L'effet est similaire dans les trois cas, mais plus léger que l'effet de l'extrait (**Figure 31a**). Néanmoins, l'inhibition anodique induite par la présence de l'acide ascorbique et la néohesperidine est plus importante que l'effet anodique de la naringine.

La cinétique de l'oxydation du fer est également réduite en présence d'extrait des écorces d'orange, comme indiqué par la partie anodique de la courbe de polarisation (**Figure 31a**). Cependant, l'effet anodique est moins important que le cathodique. En ce qui concerne l'inhibition anodique induite par la présence des molécules antioxydantes pures (**Figure 31b**), la néohespéridine et l'acide ascorbique ont un effet comparable et supérieur par rapport à celui observé pour la naringine. Étant donné que la concentration de l'extrait des écorces d'orange dans le milieu corrosif ne semble pas avoir un effet sur l'efficacité de l'inhibition, une seule dilution de l'extrait (à 10%) sera étudiée dans les investigations de l'étude d'impédance électrochimique.

- *Spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)*

Les résultats des mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique sont présentés relativement après 2 heures (**Figure 32a, c**) et 8 heures (**Figure 32b, d**) d'immersion dans le milieu corrosif.



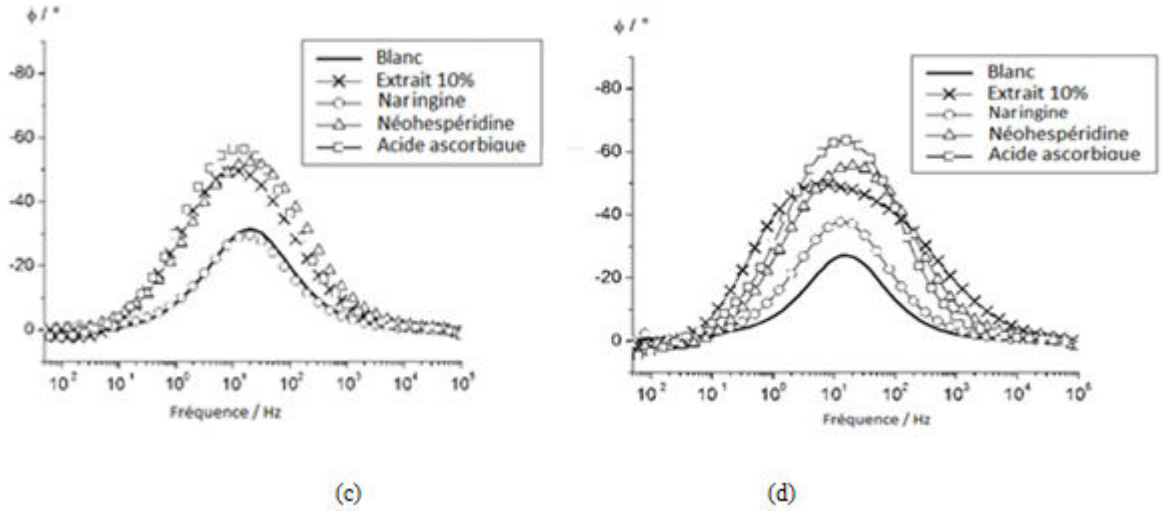


Figure 32. *Spectres d'impédance en représentation de Bode enregistrés sur l'acier dans un électrolyte à base d'eau/éthanol acidifié à pH 1 avec l'HCl. Effet de l'addition de l'extrait des écorces d'orange et leurs composés antioxydants (néohespéridine, naringine, acide ascorbique) après 2 h (a)(c) et 8 h (b)(d).*

Les résultats sont présentés dans la représentation de Bode de la **figure 32**. Les spectres d'impédance sont ajustés avec le circuit électrique équivalent donné dans la **figure 33** contenant une seule boucle (R_1, CPE_1), excepté après 8 heures d'immersion dans le milieu corrosif en présence de l'extrait d'écorce d'orange. Dans ce dernier cas, une deuxième boucle (R_2, CPE_2) doit être ajoutée dans le circuit équivalent utilisé pour ajuster les données expérimentales (**Figure 33**).

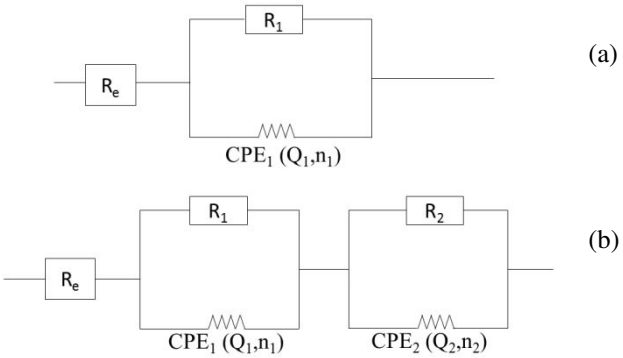


Figure 33. *Circuits électriques utilisés par l'ajustement des données des spectres d'impédance.*

R_1 peut être attribuée à la résistance de transfert de charge (R_{ct}) à l'interface métal/électrolyte. Les résultats montrent que l'extrait des écorces d'orange et les molécules pures antioxydantes ont un effet inhibiteur qui augmente avec le temps d'immersion dans le milieu corrosif. Les paramètres électriques déduits de l'ajustement des données expérimentales sont rassemblés dans le **tableau 29**.

Tableau 29 *Paramètres électriques déduits de l'ajustement des données d'impédance.*

	$R_1 = R_{ct}$ Ω cm²		Q_1 S s^n cm^{-2}		n_1		$Ceff_1$ µF cm^{-2}		E.I. (%)	
	2 h	8 h	2 h	8 h	2 h	8 h	2 h	8 h	2h	8 h
Sans inhibiteur	240	173	$1.9\ 10^{-4}$	$2.6\ 10^{-4}$	0.8	0.8	59	85	-	-
Néohespéridine 10^{-5} M	1112	1313	$1.3\ 10^{-4}$	$1.0\ 10^{-4}$	0.8	0.8	34	24	78	87
Naringine 10 µmol/L	257	390	$2.0\ 10^{-4}$	$1.9\ 10^{-4}$	0.8	0.8	65	60	7	56
Acide ascorbique 10^{-5} M	1556	2129	$9.8\ 10^{-5}$	$5.9\ 10^{-5}$	0.7	0.8	10	14	85	92
Extrait (dilué à 10%)	1593	3207	$1.0\ 10^{-4}$	$8.4\ 10^{-5}$	0.8	0.9	29	47	85	95

R_1 : résistance de transfert de charge, Q_1 : capacité de double couche électrique, n_1 : fréquence, $Ceff_1$: efficacité effective ; E.I : efficacité d'inhibition.

Dans le cas particulier de la naringine, l'effet est très faible au début de l'immersion et même après 8 heures, le taux de corrosion de l'acier est juste divisé par un facteur 2 (correspondant à une efficacité d'inhibition de 50%).

En présence de la néohespéridine, de l'acide ascorbique ou de l'extrait des écorces d'orange dilué à 10%, la vitesse de corrosion de l'acier est divisée par un facteur 5 après 2 heures d'immersion dans le milieu corrosif. Cette résistance à la corrosion reste constante avec la durée d'immersion en présence de la néohespéridine mais elle est améliorée jusqu'à un facteur 12 en présence d'acide ascorbique et de 20 en présence de l'extrait des écorces d'orange dilué à 10% après 8 heures d'immersion.

Les éléments de la phase constante CPE_1 associés à la première constante de temps (avec une impédance $Z = (Q_1 (j\omega)^{n}]^{-1}$) présentent des valeurs similaires quel que soit le milieu corrosif et la durée d'immersion, de l'ordre de grandeur de 100-200 µS s^n cm^{-2}, qui est supérieure à la capacité de double couche généralement observée sur le métal nu (15 à 50 µF cm^{-2}) (Ozarem & Tribollet, 2008). Cependant, le processus de corrosion qui se produise sur l'acier dans le milieu corrosif à base de HCl/éthanol conduit à une attaque hétérogène des grains induisant une distribution bidimensionnelle du courant et du potentiel à la surface et par conséquent un facteur n_1 inférieur à 1 (environ 0,8 dans tous les cas). Dans ce cas, une capacité effective (C_{eff1}) peut être calculée par l'équation 10 (Brug et al., 1984) :

$$C_{eff1} = \left[Q_1 \times \left(\frac{1}{R_e} + \frac{1}{R_{ct}} \right)^{n-1} \right]^{1/n} \qquad \textit{Eq.10}$$

Où R_e est la résistance de l'électrolyte et R_{ct} la résistance de transfert de charge.

Les capacités effectives calculées indiquées dans le **tableau 29** correspondent à des capacités de double couche, à l'exception sans inhibiteur ou avec une faible efficacité inhibitrice (avec la naringine). Réellement, une forte attaque électrochimique conduit à une sous-estimation de la surface active, induisant une surestimation de la capacité.

Dans le cas particulier de l'acier immergé pendant 8 heures dans l'extrait dilué, la seconde constante de temps ($R_{2=}$887 cm^2, Q_2=1,3 10^{-4} S s^n cm^{-2}) peut être attribuée à un processus de diffusion des ions H^+ et Fe^{2+} à travers l'interface métal/électrolyte comme indiqué par le facteur n_2 égal à 0,6 (près de 0,5).

III.3.1.2. Analyse de la surface

La morphologie de la surface observée après immersion de l'acier dans le milieu eau/éthanol acidifié (**Figure 34a, b**) est similaire à ce qui est classiquement observé après immersion dans un milieu acide aqueux pur.

Le métal est attaqué et la microstructure des grains est révélée. En présence des trois molécules antioxydantes pures testées dans cette étude, la surface extrême est également dissoute (**Figure 34e-j**). En plus des zones attaquées, les zones sombres correspondent à des dépôts organiques ou organo-métalliques dans les milieux corrosifs contenant des espèces inhibiteurs organiques (**Figure 34e-j**), en particulier en présence de l'acide ascorbique (**Figure 34i-j**).

La morphologie de l'extrême surface de l'acier immergé pendant dix jours dans l'extrait des écorces d'orange dilué à 10% est tout à fait différente: la face partiellement attaquée a été remplacée par la présence d'un film recouvrant totalement la surface.

L'activité antioxydante des principaux composés identifiés dans l'extrait des écorces d'orange dépend de la molécule. La néohespéridine montre une activité antioxydante élevée par rapport à la naringine qui est environ dix fois moins efficace. Cette différence peut s'expliquer par les différences de structure des molécules.

Cette activité antioxydante des molécules pures est ensuite directement liée à l'efficacité d'inhibition de la corrosion de l'acier évaluée en milieu acide. En effet, d'un point de vue anti-corrosion, les performances de la naringine sont inférieures à celles de l'acide ascorbique ou la néohespérdine (Sekine et *al.,* 1988; Ferreira et *al.,* 2004).

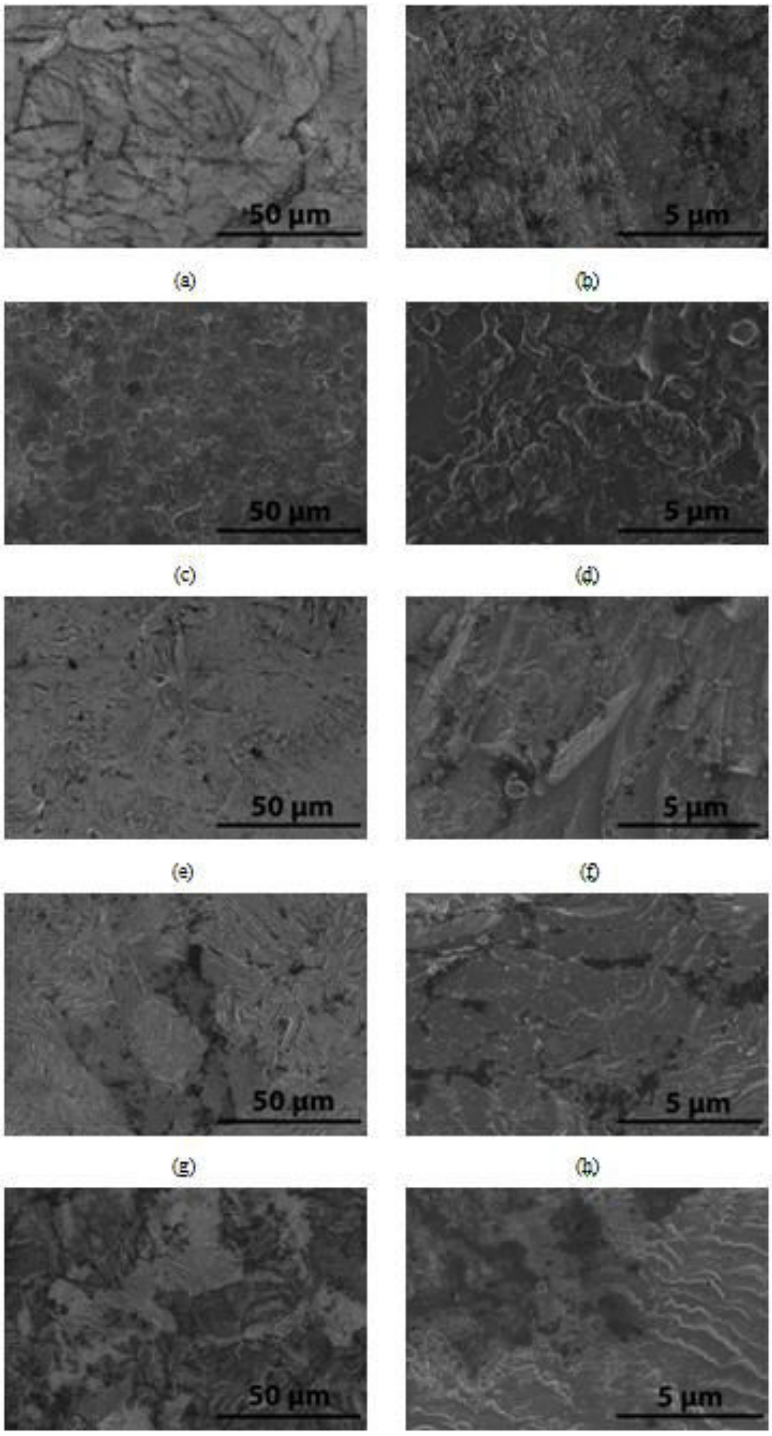


Figure 34. *Morphologie de la surface de l'acier immerge pendant 10 jours dans une solution à base de l'eau/éthanol acidifiée à pH 1 avec l'HCl (a) (b). Effet de l'addition de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise à 10% (c) (d), leurs composés antioxydants: néohespéridine10^{-5}M (e)et (f), naringine10^{-5}M (g) et (h) et l'acide ascorbique 10^{-5}M (i)et (j).*

En fait, les propriétés de piégeage de radicaux de molécules antioxydantes sont connues pour être associées à leur capacité à chélater les cations métalliques et en particulier Fe^{2+} (Van Acker et *al.,* 1996) puisque les mêmes groupes fonctionnels sont impliqués.

Le mécanisme d'inhibition de la corrosion peut donc être considéré comme chimisorption des molécules organiques sur de l'acier avec la formation de produits de conversion entre Fe^{2+} et les composés antioxydants organiques. Les dépôts organiques observés par MEB sur la surface extrême de l'acier après une longue période d'immersion en présence des molécules inhibitrices pures confirment cette explication.

D'après les observations MEB, l'addition de l'acide ascorbique ou de la néohespéridine dans le milieu corrosif entraîne une formation plus importante de dépôt organique sur la surface de l'acier par rapport à la naringine. Une meilleure capacité de chélation de l'acide ascorbique et la néohepéridine à l'égard du Fe^{2+} pourrait expliquer ce comportement (Sekine et *al.,* 1988 ; Ferreira et *al.,* 2004). Enfin, concernant les propriétés anti-corrosion des molécules pures, ils sont directement liés à leur structure chimique. En effet, l'activité antioxydante et la capacité de chélation de la néohesperidine (Fernandeza et *al.,* 2002) et de l'acide ascorbique (Sekine et *al.,* 1988 ; Ferreira et *al.,* 2004) sont meilleures que les propriétés de la naringine, d'où un faible pouvoir de l'inhibition de la corrosion.

En ce qui concerne l'activité antioxydante et l'efficacité de l'inhibition de la corrosion par l'extrait des écorces d'orange, ils peuvent être expliqués en partie par les contributions individuelles des principales molécules antioxydantes identifiées et quantifiées dans l'extrait des écorces d'orange. L'activité antioxydante de l'extrait des écorces d'orange est supérieure à la valeur attendue en additionnant les contributions individuelles. D'autres antioxydants naturels (tels que les caroténoïdes) non pris en compte dans cette étude pourraient contribuer à l'activité antioxydante totale de l'extrait (Khan et *al.,* 2010) et/ou des effets synergiques peuvent être observés entre les différentes molécules antioxydantes, en particulier entre les flavonoïdes et l'acide ascorbique (Zhang et *al.,* 2012 ; Choueiri et *al.,* 2012 ; De Souza & Giovani, 2004).

Rusznyák & Szent-Györgyi (1936), ont montré que les flavonoïdes et la vitamine C des *Citrus* agissent en synergie pour renforcer les capillaires. Leur interaction peut affecter la capacité antioxydante totale de l'extrait qui peut expliquer les résultats obtenus lorsqu'on mesure l'activité antioxydante des extraits (Hidalgo et al., 2010).

Du point de vue de la corrosion, l'inhibition induite par l'extrait des écorces d'orange est également plus élevée que celle des contributions individuelles. La vitesse de corrosion est effectivement réduite par la formation progressive d'un film tridimensionnel recouvrant totalement la surface comme observé par MEB après immersion de longue durée.

Ce résultat est cohérent avec l'apparition du phénomène de diffusion au cours de l'immersion seulement en présence de l'extrait et nécessaire pour ajuster les résultats d'impédance. Ce film pourrait être formé par des composés extraits des écorces d'orange, qui ne sont pas connus pour leurs propriétés antioxydantes, mais qui pourraient couvrir la surface de l'acier et piéger la molécule antioxydante chélatant Fe^{2+}. Par exemple, les écorces d'orange sont riches en fibres (13,9-78,66 g/100g bs) et essentiellement en pectine (0,22-23,02%) (Marin et *al.,* 2007; Wang et *al.,* 2008, Liu et *al.,* 2006; Kratchanova et *al.,* 2004), qui ont été récemment étudiés comme inhibiteurs de la corrosion (Solomon et *al.,* 2010; Fiori-Bimbi et *al.,* 2015). Les polysaccharides peuvent également être cités comme des composés pouvant former un film améliorant ainsi les propriétés anti-corrosion en fixant les molécules antioxydantes à la surface de l'acier (Banerjee & Srinastava, 2012).

II.3.2. Inhibition de la corrosion de l'acier en milieu basique

L'inhibition de la corrosion de l'acier est surtout étudiée en milieu acide et rarement en milieu basique. El-Etre et *al.* (2005) ont étudié l'inhibition de la corrosion des métaux (l'acier, le nickel, le zinc) par l'extrait des feuilles de henna dans plusieurs milieux corrosifs (acide, alcalin et neutre). Les auteurs ont montré que l'efficacité de l'inhibition de la corrosion dépend à la fois du type du métal et du milieu corrosif et que le taux d'inhibition de la corrosion de l'acier diminue dans l'ordre suivant: acide 95,78% ; neutre 91,01% et alcalin 69,56%. Pour l'utilisation des écorces d'orange comme un inhibiteur de la corrosion de l'acier, les 2 études existantes sont réalisées en milieu acide. Les études de l'inhibition de la corrosion en milieu basique sont surtout menées sur l'aluminium (Oguzie, 2007; Abdel-Gaber et *al.,* 2008) et peu sur l'acier (El-Etre et *al.,* 2005).

Une étude de l'inhibition de la corrosion de l'acier au carbone dans un milieu basique (pH=12) en présence de l'extrait des écorces d'orange à 10% et des molécules antioxydantes pures : la néohespéridine et la naringine à 10^{-5} mol/L a été menée en déterminant les courbes de polarisation (**Figure 35**) et l'analyse de la surface (**Figure 36**).

III.3.2.1. Caractérisations électrochimiques

- *Courbes de polarisation potentiodynamique*

Les courbes de polarisation cathodique et anodique, enregistrées au bout de 8 heures d'immersion dans le milieu corrosif, montrent que l'extrait des écorces d'orange agit comme un inhibiteur mixte mais essentiellement anodique (**Figure 35**).

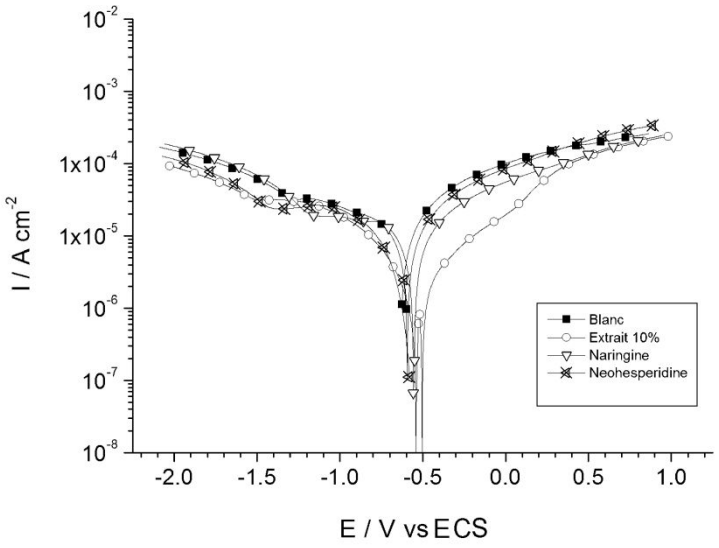


Figure 35. *Courbes de polarisation cathodique et anodique enregistrées sur l'acier après 8 h d'immersion dans un électrolyte à base d'eau/éthanol basifiée à pH 12 avec NaOH. Effet de l'addition de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise et leurs composés antioxydants : néohespéridine 10^{-5}M, et naringine 10^{-5}M.*

Sur le côté cathodique, c'est l'extrait des écorces d'orange à 10% ainsi que la néohespéridine à 10^{-5}M qui présentent un pouvoir inhibiteur de la corrosion en milieu basique alors qu'on a constaté un très léger effet pour la naringine. La cinétique de l'oxydation du fer est également réduite en présence d'extrait des écorces d'orange, comme indiqué par la partie anodique de la courbe de polarisation et l'effet anodique est beaucoup plus important que l'effet cathodique. Cependant, en ce qui concerne l'inhibition anodique induite par la présence des molécules antioxydantes pures, on constate un effet inhibiteur très faible et dans le sens inverse, on trouve la naringine et la néohespéridine.

On peut conclure que l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone en présence de l'extrait est plus élevé que celui des molécules antioxydantes mais qui reste faible par rapport à celui en milieu acide.

III.3.2.2. Analyse de la surface

Les observations au MEB effectuées après 10 jours d'immersion de l'acier au carbone dans un milieu eau/éthanol basifié en présence de l'extrait des écorces d'orange à 10% et des molécules antioxydantes pures : la néohespéridine et la naringine à 10^{-5} mol/L sont présentées dans la **figure 36**. On a pu constater qu'en présence de l'extrait des écorces d'orange (**Figure 36c-d**), il y a la formation d'un film à la surface de la plaque de l'acier mais qui reste partiel car celui-ci ne couvre pas toute la facette attaquée par la corrosion.

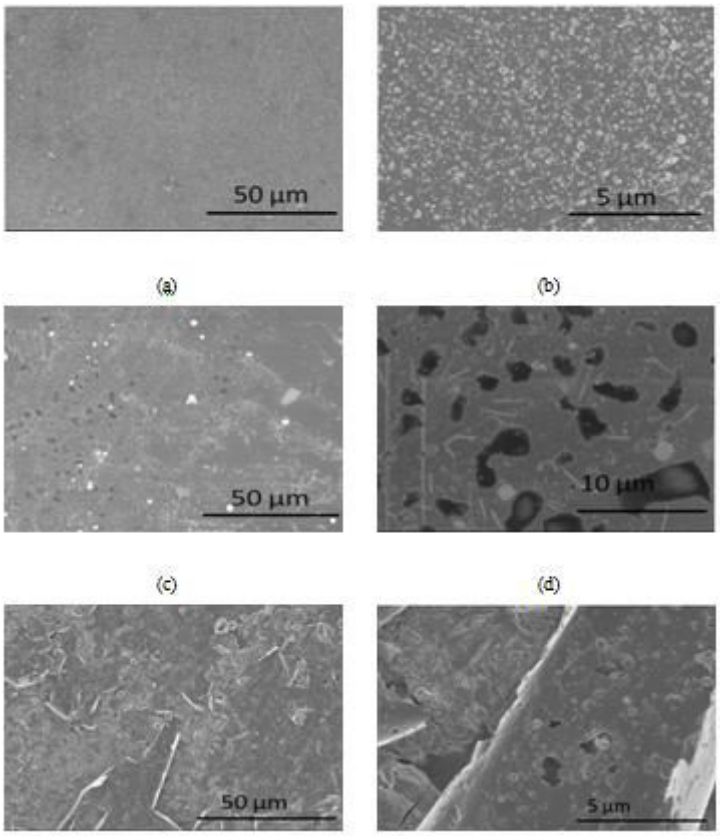


Figure 36. *Morphologie de la surface de l'acier immerge pendant 10 jours dans une solution à base de l'eau/éthanol basifiée à pH 12 avec NaOH (a) (b). Effet de l'addition de l'extrait des écorces d'orange à 10% (c) (d), leurs composés antioxydants: (e) (f) naringine10^{-5}M.*

Concernant les molécules antioxydantes, la **figure (36e-f)** montre que pour la naringine, on assiste au début de la formation d'un léger film à la surface de l'acier, ce qui explique l'effet inhibiteur indiqué dans la section précédente.

III.3.3. Evaluation de la résistance à la corrosion des plaques d'acier (dans l'eau ASTM) après « traitement de surface »

III.3.3.1. Conditions de traitement de surface

La résistance de l'acier à la corrosion a été évaluée après un traitement de surface des plaques d'acier en les immergeant pendant 10 jours dans des différentes solutions contenant soit l'extrait des écorces d'orange soit une de ces 2 molécules antioxydantes séparément (naringine10^{-5}M et néohespéridine 10^{-5} M) pour former un film à la surface de l'acier.

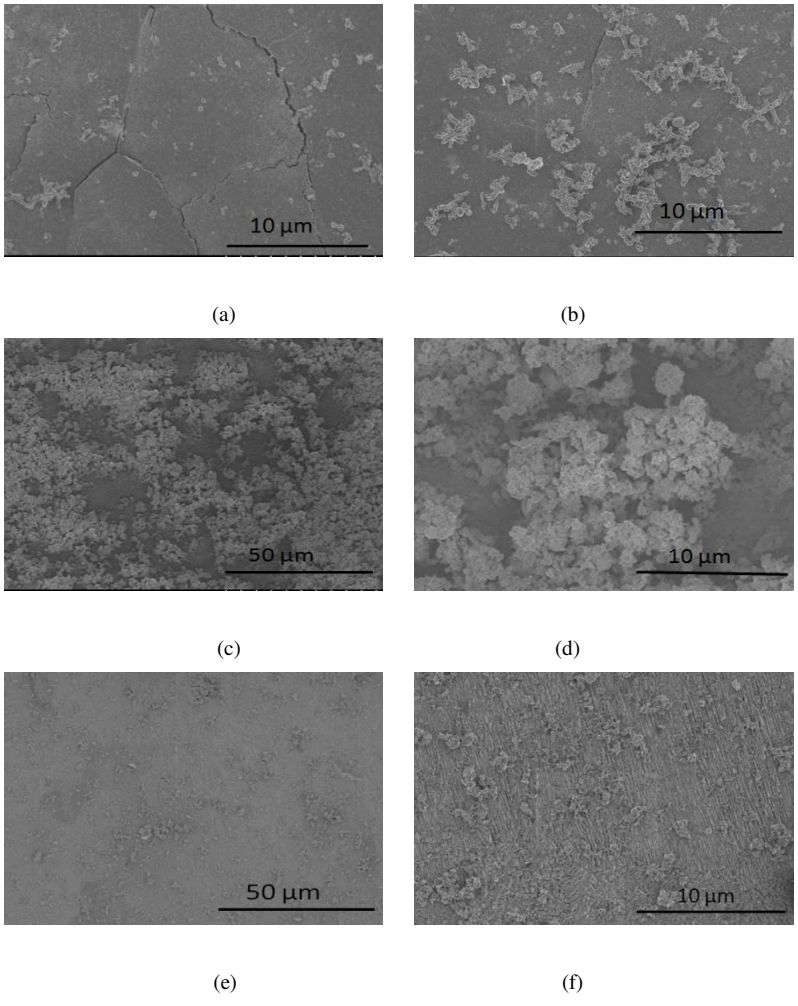
Par la suite, les plaques traitées sont testées en milieu corrosif à base de l'eau-ASTM (représentant les conditions de la corrosion atmosphérique) en étudiant leur comportement électrochimique (courbes de polarisation) pour évaluer leur résistance à la corrosion après le traitement de surface. Le pH des différentes solutions a été mesuré (**Tableau 30**).

Tableau 30. *Mesure du pH du blanc, de l'extrait d'écorces d'orange et ces molécules antioxydantes.*

Solution	pH
Blanc éthanol/eau (50%)	6,1
Extrait (10%)	5,7
Néohespéridine 10^{-5} M	6,7
Naringine10^{-5} M	6,2

III.3.3.2. Observations microscopiques

Les observations par microscopie électronique montrent que la surface de la plaque d'acier (**Figure 37**) immergée dans la solution éthanol/eau est totalement couverte par la rouille. Par contre la plaque immergée dans l'extrait présente un dépôt de matière organique mais qui n'est pas parfaitement adhérent. Pour les 2 molécules antioxydantes de l'extrait, c'est la même observation que celle de l'extrait mais avec un dépôt moins important.



(a) (b)

(c) (d)

(e) (f)

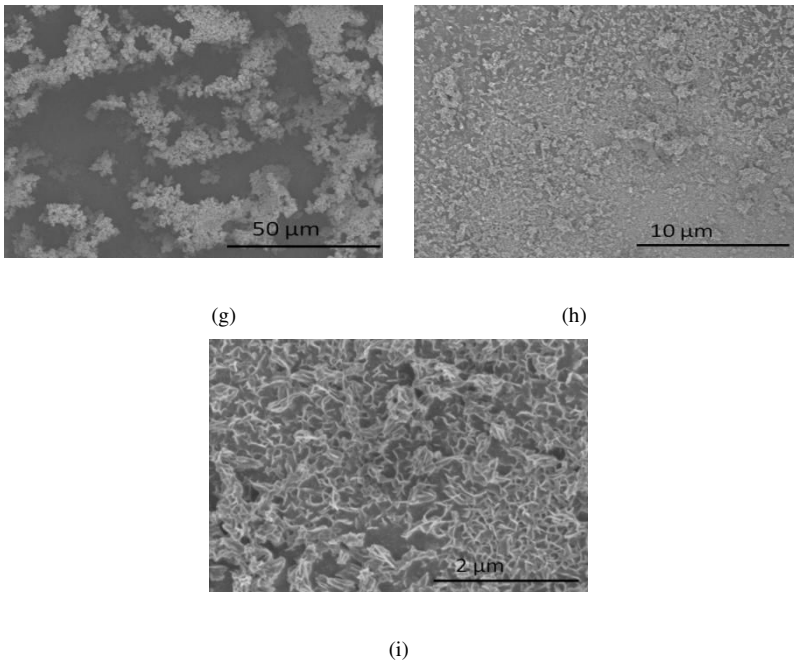


Figure 37. *Morphologie de la surface de l'acier immerge pendant 10 jours dans une solution à base de l'eau/éthanol (a) (b). Effet de l'addition de l'extrait des écorces d'orange à 10% (c) (d), leurs composés antioxydants: (e) (f), naringine10-5M (g) (h) (i) Néohespéridine.*

III.3.3.3. Résistance à la corrosion de l'acier traité

❖ *Courbes de polarisation potentiodynamiques*

Les courbes de polarisation cathodique et anodique, enregistrées au bout de 8 heures d'immersion dans le milieu corrosif est présentées dans la **figure 38**.

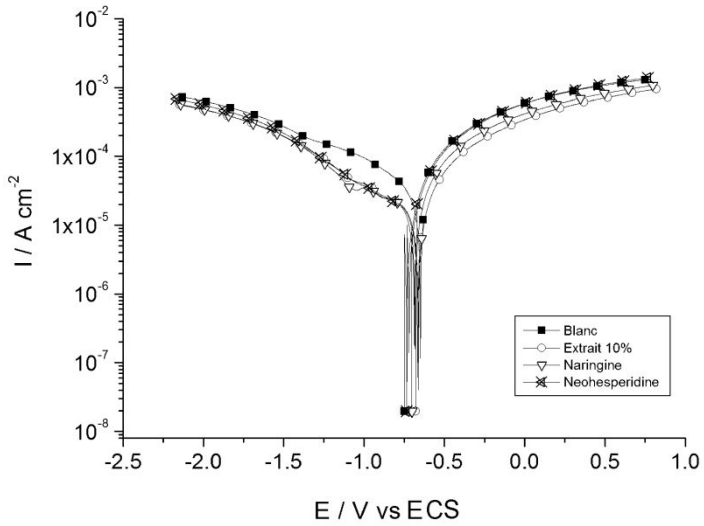


Figure 38. *Courbes de polarisation cathodique et anodique enregistrées sur l'acier après 8 h d'immersion dans un électrolyte à base d'eau/éthanol. Effet de l'addition de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise et leurs composés antioxydants : néohespéridine 10^{-5}M et naringine 10^{-5}M.*

Cette figure montre que la cinétique de réduction de l'oxygène a diminué grâce à la présence de l'extrait des écorces d'orange et des molécules antioxydantes emprisonnés dans le film protecteur formé à la surface des plaques d'acier au cours du traitement de surface par immersion. Par contre, vue la mauvaise adhérence du film, on n'observe pas d'inhibition anodique. Du côté cathodique, l'extrait, la naringine et la néohespéridine présente la même efficacité anti-corrosive. Par contre du côté anodique, c'est seulement l'extrait et la naringine qui montre un effet inhibiteur.

En conclusion, le traitement par l'extrait des écorces d'orange permet d'améliorer la résistance de l'acier à la corrosion par la formation d'un dépôt de matière organique mais il n'est pas trop efficace car le film n'est pas totalement adhérent à la surface de l'acier. Par contre, le traitement de surface par l'extrait des écorces d'orange reste plus efficace que les 2 molécules antioxydantes testées séparément (la néohespéridine et la naringine).

Conclusion

Comme le montre la présente étude, la présence de fonctions ène-diol ou catéchol ou d'autres fonctions dérivées sont responsables de l'activité antioxydante des molécules et explique en partie l'inhibition de la réaction cathodique.

Les mêmes types de fonctions sont également responsables de l'inhibition anodique en raison de leurs propriétés de chélation à l'égard des cations. Cependant, l'efficacité d'inhibition significative obtenue avec l'extrait est également due à la formation d'un film tridimensionnel sur la surface de l'acier, qui peut être formé par d'autres macromolécules qui agissent en synergie avec les molécules antioxydantes. La propriété anti-corrosion de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise ne peut pas être expliquée seulement par les propriétés antioxydantes des flavonoïdes, contenus dans cet extrait. D'autres études sont nécessaires pour comprendre le mécanisme d'inhibition de la corrosion des extraits naturels. La réalisation de la technique de spectrométrie de masse à ionisation secondaire à temps de vol (TOF-SIMS) pourra aider à déterminer la nature des composés organiques qui forment le film tridimensionnel à la surface de l'acier et étudier par la suite leur pouvoir inhibiteur comme celui de la pectine et des caroténoïdes. D'autres travaux sont aussi nécessaires pour optimiser l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier par l'extrait des écorces de l'orange Maltaise et ses principaux flavonoïdes en milieu basique ainsi que pour leur utilisation comme traitement de surface pour réduire l'impact de la corrosion atmosphérique.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE ET PRESPECTIVES

Cette étude a porté sur la détermination quantitative et qualitative des flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise, leur extraction ainsi que l'utilisation de l'extrait comme inhibiteur de la corrosion. Les écorces de l'orange Maltaise ont été utilisées comme un produit modèle.

D'abord, une analyse de la composition chimique globale et des teneurs en pesticides des écorces a été effectuée. Une étude comparative de l'impact des différentes conditions de cinq techniques d'extraction sur non seulement les composés phénoliques mais aussi sur l'activité antioxydante des extraits des écorces d'orange Maltaise a été abordée. Cette partie de l'étude constitue la première originalité de ce travail. Par ailleurs, l'exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier par l'extrait des écorces en milieu acide et en milieu basique a été réalisée pour la première fois dans cette étude et constitue la seconde originalité de ce travail.

L'identification des caractéristiques chimiques d'une agro-ressource est une étape essentielle préalable à toute valorisation ultérieure. Les écorces de l'orange Maltaise se sont montrées et conformément à la littérature une véritable source d'ingrédients nutritionnels comme les sucres solubles (46,241±0,015 g/100g bs), les protéines (8,120±0,120g/100g bs) et les minéraux (3,170±0,035 g/100g bs).

Les écorces de l'orange Maltaise sont aussi riches en ingrédients fonctionnels comme les phénols totaux (1,968±0,002 g/100g bs) et la vitamine C (0,105±0,003 g/100g bs). L'analyse des résidus des pesticides dans les écorces par CL/SM/SM et CG/SM a montré que celles-ci ne contiennent qu'un seul insecticide le Malathion dont la teneur demeure inférieure à la limite maximale fixée par l'Union-Européenne.

Une étude plus exhaustive portant sur les coproduits issus de différentes régions de la Tunisie et examinant l'effet du lavage et des traitements industriels préalables à la transformation est essentielle avant d'affirmer la non toxicité de ces coproduits. Les applications pour des formulations alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques seraient alors sans risques pour ces coproduits.

L'humidité élevée (3,169±0,123 kg d'eau/kg bs) des écorces d'orange, les rendant fortement périssables, exigent leur stabilisation par déshydratation ou par congélation avant toute exploitation.

L'identification et la quantification des composés phénoliques des écorces de l'orange Maltaise ½ sanguine par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide à haute performance ont été effectuées pour la première fois dans cette étude et ont révélé que les écorces de l'orange Maltaise sont riches en flavonoïdes, essentiellement des flavanones

(93,22%) mais aussi des flavones polyméthoxylés (6,78%). Les teneurs en ces composés exprimées en g/100g de poudre des écorces d'orange et déterminées par l'extraction conventionnelle par solvant, sont : la néohespéridine (0,860±0,003), suivi par l'hespéridine (0,551±0,001), la naringine (0,042±0,001), la nobiletine (0,042±0,002), la narirutine (0,038±0,001), la didymine (0,026±0,000), la sinensetine (0,020±0,001), l'eriocitrine (0,019±0,001), l'hexaméthoxyflavone (0,006±0,000) et la tangeretine (0,005±0,001).

Les effets des conditions opératoires de quatre méthodes d'extraction Maltaise (extraction assistée par ultrasons : EAU *(100-200W),* extraction assistée par micro-ondes : EAM (*100-400W*), extraction par CO_2 supercritique : SC-CO_2 (*35-80°C/10-22 MPa*), et extraction sous hautes pressions : EHP (*0,1-100 MPa*)), sur les teneurs en phénols, en flavonoïdes totaux, en flavonoïdes individuels et en activité antioxydante des extraits ont été étudiés. L'efficacité des méthodes examinées ont été aussi comparées pour des conditions opératoires communes et similaires à celles de l'ECS (rapport m/v:5g:50 ml; 80% d'éthanol avec agitation mécanique, durée : 30 min, 3 cycles d'extraction) qui ont été définies au préalable.

Les résultats ont montré que pour l'EAM, une puissance de 300 W qui correspond à 92°C est préférable pour maximiser l'activité antioxydante, alors qu'une puissance de 200 W correspondante à 76°C donne la teneur en phénols totaux la plus élevée (2,688±0,070 g EAG/100g). L'utilisation des puissances micro-ondes et/ou des températures élevées conduisent à l'altération des composés phénoliques des écorces d'orange et provoque probablement le déclenchement de la réaction de Maillard qui entraîne la formation des produits de forte activité antioxydante mais qui sont au même temps toxiques et cancérigènes et entraînent aussi l'altération de la qualité organoleptique du produit (couleur, odeur…).

Pour l'EAU à une puissance de 125 W donne les teneurs en phénols (2,140±0,005 g EAG/100g) et flavonoïdes totaux (1,087±0,012 g rutine/100g) les plus élevées et une activité antioxydante de 2,735±0,048 µM équivalent Trolox (test ABTS). Les puissances élevées des ultrasons sont à éviter car elles entraînent la formation des radicaux libres dans le milieu aqueux conduisant ainsi à la diminution de l'activité antioxydante. Pour cette raison, il est recommandé d'appliquer des puissances modérées lors de l'extraction.

Une température de 80°C et une pression de 10 MPa sont les conditions de l'extraction SC-CO_2 qui donnent les teneurs les plus élevées en phénols (1,458±0,054 g EAG/100g) et flavonoïdes totaux (0,906±0,012 g rutine 100g) et une activité antioxydante de 2,658±0,059 µM équivalent Trolox (test ABTS).

Par contre, l'extraction SC-CO_2 n'est pas adaptée pour l'extraction des flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise car le CO_2 est apolaire et par conséquent, cette méthode permet surtout d'extraire les flavones polyméthoxylés (apolaire). L'utilisation d'une teneur plus élevée de co-solvant polaire (ici l'éthanol) pourrait améliorer l'efficacité de cette méthode pour l'extraction des phénols apolaires.

Une pression de 50 MPa pour l'EHP permet l'obtention d'une teneur élevée en flavonoïdes totaux, tandis qu'une pression de 100 MPa donne la meilleure activité antioxydante (11,911±0,151 µM équivalent Trolox, test ABTS). Cette augmentation de l'activité antioxydante par rapport au témoin (obtenu par ECS) peut être expliquée par la formation des produits issus de l'oxydation enzymatique qui peuvent être toxiques. Par conséquent, dans ces conditions, l'EHP n'est pas adaptée à l'extraction des flavonoïdes des écorces d'orange de la variété Maltaise car les teneurs en PT, FT et en FI sont plus faibles que celles de l'extrait témoin.

La comparaison des cinq méthodes d'extraction des flavonoïdes des écorces de l'orange Maltaise a été ensuite réalisée pour les mêmes conditions opératoires (rapport m/v:5g:50 ml; 80% d'éthanol avec agitation à l'obscurité, 35°C, 3 extractions successives), sauf pour l'EHP, pour laquelle une seule extraction a été réalisée.

L'EAM a été jugée la meilleure méthode d'extraction de phénols, suivie par l'EAU, l'ECS, l'EHP et SC-CO_2. En effet, l'EAM permet une augmentation de 20% en PT et de 24% en FT, alors qu'elle est de 9,4% et 7,4% pour l'EAU, en les comparants avec le témoin (ECS). L'EAM permet d'obtenir des teneurs élevées en flavonoïdes individuels (FI) majoritaires des écorces de l'orange Maltaise (exprimées en g/100g de poudre des écorces d'orange) tels que la néohespéridine (1,045±0,001), l'hespéridine (0,781±0,074), la didymine (0,062±0,001), la naringine (0,218±0,001), la nobiletine (0,084±0,001), 3',4',5,5'6,7, Hexaméthoxyflavone (0,016±0,002) et la tangeretine (0,011±0,000).

En revanche, les meilleures activités antioxydantes ne correspondent pas systématiquement aux teneurs en phénols les plus élevées. Les valeurs de ces activités diffèrent aussi selon le test utilisé. Cependant, les valeurs des activités antioxydantes obtenues pour les quatres méthodes d'extraction sont inférieures à celle de l'extrait obtenu par ECS, sauf pour l'extrait obtenu par EHP qui montre une augmentation de l'activité antioxydante de 35% avec le test ABTS et de 42% pour le test DPPH. Pour le test ABTS, l'ordre décroissant des valeurs de

l'activité antioxydante est: EHP, ECS, SC-CO_2, EAM, EAU, alors que c'est EHP, ECS, EAM, EAU, SC-CO_2 pour le test DPPH.

Une optimisation multicritères (tenant compte des rendements d'extraction et des activités des extraits) en explorant simultanément plusieurs facteurs (temps, température et/ou puissance) à travers l'établissement d'un plan d'expériences permettrait l'optimisation des méthodes d'EAM et de l'EHP. L'inconvénient d'une telle approche est que souvent un nombre d'expériences est souvent nécessaire ce qui alourdit la démarche expérimentale surtout lorsque plusieurs techniques et paramètres sont explorés.

Sur le plan méthodologie, d'autres méthodes sont aussi prometteuses pour l'exploration du potentiel antioxydant des agro-ressources comme l'utilisation d'approches combinées appliquées de manière séquentielle telles que la technologie de chute de pression instantanée contrôlée et l'extraction assistée par ultrasons (DIC-UAE) ou de manière simultanée (extraction enzymatique assistée par ultrasons, extraction par fluide supercritique assistée par ultrasons, extraction assistée par micro-ondes et ultrasons) pour intensifier l'opération d'extraction et améliorer le rendement d'extraction.

Une étude technico-économique des différentes méthodes d'extraction des composés phénoliques des écorces d'orange serait également envisagée en perspectives en vue d'évaluer leur performance en termes de consommation d'énergie et de coût.

L'étude de l'effet anti-corrosion de l'acier en milieu acide par l'extrait des écorces d'orange de la variété Maltaise et certaines molécules antioxydantes (néohespéridine, naringine et acide ascorbique) a révélé que la néohespéridine et l'acide ascorbique présentent un effet inhibiteur supérieur à celui de la naringine mais cela n'est pas suffisant pour expliquer la propriété anti-corrosion de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise. Ce pouvoir inhibiteur est dû en partie à l'activité antioxydante des flavonoïdes et de l'acide ascorbique contenus dans notre extrait. En effet, l'activité antioxydante varie selon le type du groupement positionné sur le noyau aromatique de la molécule. La présence de fonctions ène-diol ou catéchol ou d'autres fonctions dérivées sont responsables de l'activité antioxydante des molécules et en partie à expliquer l'inhibition de la réaction cathodique. Les mêmes types de fonctions sont également responsables de l'inhibition anodique en raison de leurs propriétés de chélation à l'égard des cations. Cependant, l'efficacité d'inhibition significative obtenue par l'extrait est également due à la formation d'un film tridimensionnel à la surface de l'acier, qui peut être formé par

d'autres macromolécules qui agissent en synergie avec les molécules antioxydantes comme les polysaccharides (la pectine…) et les caroténoïdes.

D'autres études sont donc nécessaires pour comprendre le mécanisme d'inhibition de la corrosion de ces extraits. La réalisation de la technique de spectrométrie de masse à ionisation secondaire à temps de vol (TOF-SIMS) pourra aider à déterminer la nature des composés organiques qui forment le film tridimensionnel à la surface de l'acier et étudier par la suite leur pouvoir inhibiteur comme celui de la pectine et des caroténoïdes. D'autres études complémentaires peuvent être effectuées pour comprendre le couplage/la synergie entre les molécules et les relations structures-activités des molécules contenues dans l'extrait des écorces d'orange.

L'étude de l'effet anti-corrosion de l'acier en milieu basique par l'extrait des écorces d'orange de la variété Maltaise et des molécules antioxydantes (néohespéridine et naringine) a montré que l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone en présence de l'extrait est plus élevé que celui des molécules antioxydantes mais qui reste faible par rapport à celui observé en milieu acide.

Le traitement par l'extrait des écorces d'orange permet d'améliorer la résistance de l'acier à la corrosion par la formation d'un dépôt de matière organique mais il n'est pas trop efficace car le film n'est pas totalement adhérent à la surface de l'acier. Le traitement de surface par l'extrait des écorces d'orange reste plus efficace que les 2 molécules antioxydantes pures utilisées séparément (néohespéridine et naringine). Ainsi, d'autres travaux sont nécessaires pour optimiser l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier par l'extrait des écorces de l'orange Maltaise et ses principaux flavonoïdes en milieu basique ainsi que pour leur utilisation comme traitement de surface pour réduire l'impact de la corrosion atmosphérique.

La démarche entreprise dans cette étude pour la valorisation des écorces de l'orange Maltaise à travers l'exploration du pouvoir anti-corrosif de ses composés antioxydants permettrait d'élargir le spectre des applications de ces molécules. Cette démarche est parfaitement transposable aux coproduits d'autres variétés exploités à l'échelle industrielle comme le citron mais aussi à d'autres végétaux (légumes, fruits, plantes) et leurs coproduits qui sont naturellement riches en antioxydants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abd El-aal, H.A., Halaweish, F.T., 2009. Food Preservative Activity of Phénolique Compounds in orange peel extracts (Citrus sinensis L.). *Lucrări Ştiinţifice*. 53, 457-464.
- Abdallah, M., Basim H.A., I., Zaafarany, I., Fouda, A.S., 2012. The Inhibition of Carbon Steel Corrosion in Hydrochloric Acid Solution using Some Phenolic Compounds. *International Journal of Electrochemical Science*. 7, 282-304.
- Abdel-Gaber, A.M., Abd-El-Nabey, B.A., Sidahmed, I.M., El-Zayady, A.M., Saadawy, M., 2006. Inhibitive action of some plant extracts on the corrosion of steel in acidic media. *Corrosion Science*. 48, 2765-2779.
- Abiola, O.K., James, A.O., 2010. Gossipium hirsutum L. extracts as green corrosion inhibitor for aluminum in NaOH solution. *Corrosion Science.* 52, 661-664.
- Abou-Arab, A.A.K., 1999. Behavior of pesticides in tomatoes during commercial and home preparation. *Food Chemistry*. 65, 509-514.
- Afanas, rsquo, eva, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal, rsquo, chik, E.V. Ibragimova, G. A., Korkina, L.G., 2006. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology***.** 61 (6), 677-684.
- Ahmed, J., Ramaswamy, H.D., 2006. Changes in colour during high pressure processing of fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Review*. 5, 1-8.
- Albagnac, G., Varoquaux, P., Montigaud, J.C., 2002. Technologie de transformation des fruits, *Lavoisier*, Paris, 302-304.
- Aliaga, C., Lissi, A. E., 2004. Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study. *Canadian Journal of Chemistry.* 82, 1668- 1673.
- Allaf, A., Tomao, V., Ruiz, K., Chemat, F., 2013. Instant controlled pressure drop technology and ultrasound assisted extraction for sequential extraction of essential oil and antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry*. 20, 239-246.

- Allaf, T., Mounirc, S., Tomao, V., Chemat, F., 2012. Instant controlled pressure drop combined to ultrasounds as innovative extraction process combination: Fundamental aspects. *Procedia Enginnering*. 42, 1061-1078.

- Altuner, E.M., Alpas, H., Erdem, Y.K. Bozoglu, F., 2006. Effect of high hydrostatic pressure on physicochemical and biochemical properties of milk. *European Food Research and Technology*. 222, 392-396.

- Altuner, E.M., Tokusoglu, E.M.O., 2013. The effect of high hydrostatic pressure processing on the extraction, retention and stability of anthocyanins and flavonols contents of berry fruits and berry juices: Review. *International Journal of Food Science and Technology*. 48, 1991-1997

- Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Kokkalou, E., Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, F.P., 2005. Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC–diode array detection–electrospray ionization mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 19, 138-148.
- Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., Boskou, D., 2006. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (Citrus *sinensis). Food Chemistry*. 94, 19-25.

- Antunes, P., Viana, P., Vinhas, T., Capelo, J.L., Rivera, J., Gaspar, E.M., 2008. Optimization of pressurized liquid extraction (PLE) of dioxin-furans and dioxinlike PCBs from environmental samples. *Talanta*, 75, 916-925.

- AOAC, 1997. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

- AOAC, 2006. Official Methods of Analysis, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

- Asikin, Y., Taira, I., Inafuku-Teramoto, S., Sumi, H., Ohta, H., Takara, K., Wada, K., 2012. The Composition of Volatile Aroma Components, Flavanones, and Polymethoxylated Flavones in Shiikuwasha (Citrus depressa Hayata) Peels of Different Cultivation Lines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 60, 7973-7980.

- Aspé, E., Fernández, K., 2011. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from Pinus radiataBark. *Industrial Crops and Products*. 34, 838-844.

- Aust, O., Sies, H., Stahl, W., Polidori, M.C., 2001. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *Journal of Chromatography A*, 936 (1-2), 83-93.

- Azmir, J., Zaidul, I.S.M, Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.A.H., Ghafoor, A., Norulaini, N.A.N., Omar, K.A.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 117, 426-436.

B

- Bampidis, V.A., Robinson, P.H., 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: a review. Animal Feed Science Technology. 128, 175-217.

- Banerjee, S., Srinastava, V., Singh, M.M., 2012. Chemically modified natural polysaccharide as green corrosion inhibitor for mild steel in acidic medium. *Corrosion Science*. 59, 35-41.

- Barros, H. R.D.M., Ferreira, T.A. P.D.C., Genovese, M. I., 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*. 134, 1892-1898.

- Bartnick, D.D., Mohler, C.M., Houlihan, M., 2006. Methods for the production of food grade extracts. *United States Patent Application*. 20060088627.

- Behpour, M., Ghoreishi, S.M., Khayatkashani, M., Soltani, N., 2012. Green approach to corrosion inhibition of mild steel in two acidic solutions by the extract of Punica granatum peel and main constituents, *Materials Chemistry and Physics*. 131, 621-633.

- Benard, J., Michel, A., Philibert, J., Talbot, J., 1969. Métallurgie générale, Masson Editeurs.

- Benmessaoud Left, D., Zertoubi, M., Irhzo, A., Azzi, M., 2013. Revue: Huiles et Extraits de plantes comme inhibiteurs de corrosion pour différents métaux et alliages dans le

milieu acide chlorhydrique. *Journal of Materials and Environmental Science*. 4 (6), 855-866

- Bennici A., Tani C., 2004. Anatomical and ultrastrucural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. *Flora*. 199, 464-475.
- Bicu, I., Mustata, F., 2011. Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. *Bioresource Technology*. 102, 10013-10019.
- Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 6, 2123-2129.
- Boonkird, S., Phisalaphong, C., Phisalaphong, M., 2008. Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from Capsicum frutescens on a lab-and pilot-plant scale. *Ultrasonics Sonochemistry*. 15, 1075-1079.
- Bousbia, N., Vian, M.A., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Chemat, F., 2009. A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*. 90, 409-413.
- Brug, G.J., Van den Eeden, A.L.G., Sluyters-Rehbach, M., Sluyters, J.H., 1984. The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 176, 275-295.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49, 2774-2779.
- 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

- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V.L., Minelli, E.V., Cabitza, F., Cubeddu, M., 1997. Residues of some pesticides in fresh and dried apricots. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45, 3221-3222.

- Casquete, R., Castro, S.M., Villalobos, M.C., Serradilla, M.J., Queirós, R.P., Saraiva, J.A., Córdoba, M.G., Teixeira, P., 2014. High pressure extraction of phenolic compounds from citrus peels. *High Pressure Research*. 34 (4), 447-451.
- 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.
- Chaieb, E., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Berrabah, M., 2009. Limonene as Green Inhibitor for Steel Corrosion in Hydrochloric Acid Solutions, *Acta Physico Chimica Sinica*. 25 (7), 1254-1258.
- Chau C.F., Huang Y.L., Lin C.Y., 2004. Investigation of the cholesterol-lowering action of insoluble fibre derived from the peel of Citrus sinensis L. cv. Liucheng. *Food Chemistry*. 87, 361-366.
- Chauhan, L.R., Gunasekaran, G., 2007. Corrosion inhibition of mild steel by plant extract in dilute HCl medium. *Corrosion Science*. 49, 1143-1161.
- Chebil, L., 2006. Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thése de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Cheigh, C.I., Chung, E.Y., Chung, M.S., 2012. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from *Citrus unshiu* peel using subcritical water. *Journal of Food Engineering*. 110, 472-477.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Zill-e-Huma, 2009. Microwave assisted-separations: green chemistry in action. In: Pearlman, J.T. (Ed.), Green Chemistry Research Trends. *Nova Science Publishers Inc., United States*. 1-30.
- Chemat, F., Huma, Z., Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonincs Sonochemistry*. 18, 813-835.
- Chemat, F., Tomao, V., Virot, M., 2008. Ultrasound-assisted extraction in food analysis. In Handbook of Food Analysis Instruments by Semih Ötles; Boca Raton, FL: CRC Press, 85-103.

- Chen, M.L, Yang, D.J, Liu, S.C., 2011. Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus fruit (Citrus sinensis (L.) Osbeck) peels. *International Journal of Food Science and Technology*. 46, 1179-1185.
- Chen, S.L., Jin, S.Y., Chen, C.S., 2005. Relative reactivities of glucose and galactose in browning and pyruvaldehyde formation in sugar/glycine model systems. *Food Chemistry*. 92 (4), 597-605.
- Chetouani, A., Hammouti, B., 2003. Corrosion inhibition of iron in hydrochloric acid solutions by naturally henna. *Bulletin of Electrochemistry*. 19 (1), 23-25.
- Cheynier, V., Sarni-Manchado, P., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. 50-59. Lavoisier-Tec & Doc, Paris.
- Chinapongtitiwat, V., Jongaroontaprangsee, S., Chiewchan, N., Devahastin, S., 2013. Important flavonoids and limonin in selected Thai citrus residues. *Journal of functional foods*. 5, 1151-1158.
- Choi, M.Y., Chai, C., Parka, J.H., Lim, J., Leec, J., Kwon, S.W., 2011. Effects of storage period and heat treatment on phenolic compound composition in dried Citrus peels (Chenpi) and discrimination of Chenpi with different storage periods through targeted metabolomic study using HPLC-DAD analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54, 638-645.
- Choueiri, L., Chedea, V.S., Calokerinos, A., Kefalas, P., 2012. Antioxidant/pro-oxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC-MS. *Food Chemistry*. 133, 1039-1044.
- Chutia, M., Deka Bhuyan, 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.
- Claeys, W.L., Schmit, J.F., Bragard, C., Maghuin-Rogister, G., Pussemier, L., Schiffers, B., 2011. Exposure of several Belgian consume groups to pesticide residues through fresh fruit and vegetable consumption. *Food Control*. 22, 508-516.
- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B., 2008. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonic, high hydrostatic pressure or

pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technology*. 9, 85-91.

D

- Da Rocha, Da Cunha Ponciano Gomes, J.C., D'Elia, E., 2010. Corrosion inhibition of carbon steel in hydrochloric acid solution by fruit peel aqueous extracts. *Corrosion Science*. 52, 2341-2348.

- Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., Madani, K., 2013. Valorization of citrus limon residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*. 50, 77-87.

- Davalos, R.V., Rubinsky, B., Mir, L.M., 2003. Theoretical analysis of the thermal effects during in vivo tissue electroporation. *Bioelectrochemistry*. 61 (1-2), 99-107.
- De Assunçao Araujo Pereira, S.S., Macedo Pegas, M., Lopez Fernandez, T., Magalhaes, M., Gadiole Schöntag, T., Lago, D.C., Ferreira de Senna, L., D'Elia, E., 2012. Inhibitory action of aqueous garlic peel extract on the corrosion of carbon steel in HCl solution. *Corrosion Science.* 65, 360-366.
- Del Rio, J.A., Fustera, M.D., Gomeza, P., Porras, I., Garcia-Lidon, A., Ortun, A., 2004. Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chemistry*. 84, 457-461.

- Deng, S., Li, X., 2012. Inhibition by Ginkgo leaves extract of the corrosion of steel in HCl and H_2SO_4 solutions. *Corrosion Science*. 55, 407-415.
- De Silva, P.M.C.S., Pathiratne, A., Van Gestel, C.A.M., 2010. Toxicity of chlorpyrifos, carbendazim, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm Perionyx excavatus. *Applied Soil Ecology*. 44, 56-60.

- De Souza, R.F.V., De Giovani, W.F., 2004. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Report*. 9, 97-104.

- De Waard, C., Milliams, D.E., 1975. Carbonic Acid Corrosion of Steel. *Corrosion*. 31 (5), 177-181.

- Diaaz-Reinoso, B., Moure, S., Domianguez, H., Parajoa, J.C., 2006. Supercritical CO_2 extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 2441-2469.
- Ding, L., Li, Y., Li, M.J., Liu, Z.Y., Zhang, H.Q., 2003. A novel microwave-assisted extraction method for extracting flavonoids from Radix and Caulis Acanthopanacis senticosi [Chinese]. *Chemical Journal of Chinese University*. 24, 1403-1405.
- Djilas, S., Canadanovic-Brunet, J., Cetkovic, G., 2009. By-products of fruits processing as a source of phytochemicals. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*. 15, 191-202.
- 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.
- Dugo, P., Mondello, L., Lamonica, G., Dugo, G., 1997. Characterization of cold-pressed key and Persian lime oils by Gas chromatography, Gas Chromatography/Mass spectroscopy, high performance liquid chromatography, and physicochemical indices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(9), 3608-3616.
- Duoss-Jennings, H. A., Schmidt, T. B., Callaway, T. R., Carroll, J. A., Martin, J. M., Shields-Menard, S.A., 2013. Effect of citrus byproducts on survival of O157:H7 and non-O157 Escherichia coli serogroups within in vitro bovine ruminal microbial fermentations. *International Journal of Microbiology*. 1-5.
- Duranton, F., 2012. Potentiel des hautes pressions pour la formulation raisonnée de produits carnés à base de viande de porc. Thèse de doctorat, Université de Nantes.

E

- Eddy, N.O., Ebenso, E.E., 2008. Adsorption and inhibitive properties of ethanol extracts of Mus sapientum peels as a green corrosion inhibitor for mild steel in H2SO4. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*. 2 (6), 46-54.
- El Hosary, A., Saleh, R.M., Shams El Din, A. M., 1972. Corrosion inhibition by naturally occurringsubstances-I. The effect of Hibiscus subdariffa (karkade) extract on the dissolution of Al and Zn. *Corrosion Science.* 12 (12), 897-904.

- El-Etre, A.Y., 2006. Khillah extract as inhibitor for acid corrosion of SX 316 steel. *Applied Surface Science*. 252, 8521-8525.
- El-Etre, A.Y., 2007. Inhibition of acid corrosion of carbon steel using aqueous extract of olive leaves. *Journal of Colloid and Interface Science*. 314, 578-583.
- El-Etre, A.Y., Abdallah, M., 2000. Natural honey as corrosion inhibitor for metals and alloys. II. C-steel in high saline water. *Corrosion Science*. 42, 731-738.
- El-Etre, A.Y., Abdallah, M., El-Tantawy, Z.E., 2005. Corrosion inhibition of some metals using lawsonia extract. *Corrosion Science*. 47, 385-395.
- El-Etre, Y., 2003. Inhibition of aluminum corrosion using Opuntia extract. *Corrosion Science*. 45 (11) 2485-2495.
- Erdman J., Balentine D., Arab L. Beecher G., Hollman P., Keen C.L., Mazza G., Messina M., Scalbert A., Vita J., Williamson G., Burrowes J., 2007. Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop May 31-June 1, 2005, Washington, DC1–4. *Journal of Nutrition*. 137, 718-737.
- Espiard, E., 2002. Introduction à la transformation industrielle des fruits. (Ed) TEC &DOC. France, 259-265.
- EU Water Framework Directive 2000/60/EC, Oct. 23 2000.

F

- Farhat A., Fabiano-Tixier A.S., El Maataoui M., Maingonnat J.F., Romdhane M., Chemat F., 2011. Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*. 125, 255-261.
- Fernandeza, T., Lurdes Miraa, M., Helena Florencioa, M., Jenning, K.R., 2002. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 92, 105-111.
- 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.
- Ferreira, E.S., Giacomelli, C., Giacomelli, F.C., Spinelli, A., 2004. Evaluation of the inhibitor effect of L-ascorbic acid on the corrosion of mild steel. *Materials Chemistry & Physics*. 83, 129-134.

- Fiaud, C., 1990. Inhibiteurs de corrosion. *Corrosion-Vieillissement*, COR1005, 14. www.techniques-ingenieur.fr.

- Fiaud, C., Lemaitre, C., Pébère, N., 2002. Mécanique et ingénierie des Matériaux. Lavoisier, Paris, Hermés Science Publications, 245.

- Figuerola, F., Hurtado, M.L., Estevez, A.M., Chiffelle, I., Asenjo, F., 2005. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*. 91, 395-401.

- Fiori-Bimbi, M.V., Alvarez, P.E., Vaca, H., Gervasi, C.A., 2015. Corrosion inhibition of mild steel in HCl solution by pectin. *Corrosion Science*. 92, 192-195.

- Fisher K., Phillips 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.

- Fisher K., Phillips C., 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*.19, 156-164.

- Floegel, A., Kim, D.K., Chung, S.J., Koo, S.I., Chun, O.K., 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24, 1043-1048.

- Fouda, A.S., Eldesoky, A.M., Elmorsi, M.A., Fayed, T.A., Atia, M.F., 2013. New Eco-Friendly Corrosion Inhibitors Based on Phenolic Derivatives for Protection Mild Steel Corrosion, *International Journal of Electrochemical Science*. 8, 10219-10238.

- Frydman, A., Weisshaus, O., Huhman, D.V., Sumner, L., Bar-Peled, M., Lewinsohn, E., Fluhr, R., Gressel, J., Eyal, Y., 2005. Metabolic Engineering of plant cells for biotransformation of hesperedin into neohesperidin, a substrate for production of the low-calorie sweetener and flavor enhancer NHDC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 53, 9708-9712

G

- Galanakis, C.M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*. 26, 68-87.

- Gamarra, F. M. C., Sakanaka, L. S., Tambourgi, E. B., Cabral, F. A., 2006. Influence on the quality of essential lemon (Citrus aurantifolia) oil by distillation process. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 23, 147-151.

- Gamiz-Gracia, L., Luque de Castro, M. D., 2000. Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*. 51(6), 1179-1185.

- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., Caristi, C., 2007. Flavonoid Composition of *Citrus* Juices. *Molecules*. 12, 1641-1673.

- Georgé, S., Brat, P., Alterand, P., Amio, M.J., 2005. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1370-1373.

- Ghanem, N., Mihoubi, D., Kechaoua, N., Boudhrioua Mihoubi, N., 2012. Microwave dehydration of three citrus peel cultivars: Effect on water and oil retention capacities, color, shrinkage and total phenols content. *Industrial Crops and Products*. 40, 167-177.

- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., EbrahimZadeh, M.A., 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 22, 3, 277-281.

- Giannuzzo, A.N., Boggetti, H.J., Nazareno, M.A., Mishima, H.T., 2003. Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of Citrus paradise. *Phytochemical Analysis*. 14, 221-223.

- Gil Chavez, G.J, Villa, J.A., Ayala-Zavala, J.F, Heredia, J.B, Sepulveda, D., Yahia, E.M., Gonzalez-Aguilar, G.A., 2013. Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12, 5-19.

- Gorinstein S., Martin-Belloso O., Park Y., Haruenkit R., Lojek A., Caspi A., Libman I., Trakhtenberg S., 2001. Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*. 74, 309-315.

- Goulas V., Manganaris, G.A., 2012. Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food Chemistry*. 131, 39-47.

- Grigelmo-Miguel, N., Martin-Belloso, O., 1999. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 32, 503-508.

- GilFruit (Groupement interprofessionnel des légumes), 2014. Rapport d'activité annuel : 6-7.

H

- Hackerman, N., Makrides, A.C., 1954. Action of Polar Organic Inhibitors in Acid Dissolution of Metals. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*. 46, 523-527.

- Hamdy, A., El-Gendy, N.S., 2013. Thermodynamic, adsorption and electrochemical studies for corrosion inhibition of carbon steel by henna extract in acid medium. *Egyptian Journal of Petroleum.* 22, 17-25.
- Hawthorne, S.B., Grabanski, C.B., Martin, E., Miller, D.J., 2000. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix, *Journal of Chromatography A*. 892, 421-433.

- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Ji, C., Zhang, X., Xia, W., 2009. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*. 70, 63-70.
- Hayat, K., Zhang, X., Chen, H., Xi, S., Jia, C., Zhong, F., 2010. Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity**.** *Separation and Purification Technology*. 73, 371-376.
- He, J.Z., Shao, P., Liu, J.H., Ru, Q.M., 2012. Supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peel and their antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*. 13, 13065-13078.

- Heitz, E., 1975. Proc. 4th European Symposium on Corrosion Inhibitors, Ann, Univ. Ferrara, Italy, N.S., Sez. V, Suppl. 6, 432.

- Heinonen, I. M., Lehtonen, P. J., Hopia, A.I., 1998. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 46, 25-31

- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., De Pascual-Teresa, S., 2010. Flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 121, 691-696.
- Ho S.C., Lin C.C., 2008. Investigation of heat treating conditions for enhancing the anti-inflammatory of Citrus fruit (*Citrus Reticulata*) peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 7976-7982.

- Hodge, J.E., 1953. Dehydrated foods-chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1 (15), 928-943.
- Hollman P., Cassidy A., Comte B., Hatzold T., Heinonen M., Richling E., 2010. Antioxidant activity of polyphenols and cardiovascular health: application of the PASSCLAIM criteria. *Journal of Nutrition*, 29, 989-1009.

- Hosni, K., Zhaed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Sebei H., 2010. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence. *Food chemistry*. 123, 1098-1104.

- Hu, Z., Cai, M., Liang, H.H., 2008. Desirability function approach for the optimization of microwave assisted extraction of saikosaponins from *Radix bupleuri*. *Separation and Purification Technology*. 61, 266–275.

- Huang, Y.S., Ho, S.C., 2010. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food Chemistry*. 119, 868-873.

- Huet R., 1991. Les huiles essentielles d'agrumes. Fruits, 4, 551-576.

- Hussin, M. H., Kassim, M. J., 2011. The corrosion inhibition and adsorption behavior of *Uncaria Gambir* extract on mild steel in 1M HCl. *Materials Chemistry and Physics*. 125, 461-468.

I

- Ignat I., Volf I., Popa V., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 126, 1821-1835.

- Inoue, T., Tsubaki, S., Ogawa, B., Onishi, K., Azuma, J.I., 2010. Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*. 123, 542-547.

- Ioannou, I., Hafsa, I., Hamdi, S., Charbonnel, C., Ghoul, M., 2012. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behavior. *Journal of Food Engineering*. 111, 208-217.

- ISO 5534, 2004. Détermination de la teneur totale en matière sèche (Méthode de référence).

- ISO 8968-1, 2001. Détermination de la teneur en azote -- Partie 1: Méthode Kjeldahl et calcul de la teneur en protéines brutes.

J

- Jawad, A., Langrish, T.A.G., 2012. Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*. 109, 162-174.

- Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Jo, S.C., Nam, K.C., Ahn, D.U., Lee, S.C., 2004. Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3389-3393.

- Ji, G., Anjum, S., Sundaram, S., Prakash, R., 2015. Musa paradisica peel extract as green corrosion inhibitor for mild steel in HCl solution. *Corrosion Science*. 90, 107-117.

K

- 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.

- Karman, F.H., IFelhosi, I., Kalman, E., Cserny, I., Kover, L., 1998. *Electrochimica. Acta*. 43, 75-80.

- Kanaze, F.I., Termentzi, A., Gabrieli, C., Niopas, I., Georgarakis, M., and Kokkaloua, E., 2008. The phytochemical analysis and antioxidant activity assessment of orange peel (Citrus sinensis) cultivated in Greece–Crete indicates a new commercial source of hesperidin. *Biomedical Chromatography*. 23, 239-249.

- Kang, H.J., Chawla, S.P., Jo C., Kwon, J.H., Byun, M.W., 2006. Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresource Technology*. 97, 614-620.

- Kassing, M., Jenelten, U., Schenk, J., Strube, J., 2010. A new approach for process development of plant-based extraction processes. *Chemical Engineering & Technology* 33 (3), 377-387.

- Kaul, T.N., Middleton, E., Ogra, P.L., 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*. 15, 71-79.
- Kawaguchi, K., Kikuchi, S., Hasunuma, R., Maruyama, H., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., 2004. A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27, 679-683.

- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M., 1999. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation. *Anticancer Research*. 19, 1261-1269.
- Khaled, K. Al-Qahtani, M.M., 2009. The inhibitive effect of some tetrazole derivatives towards Al corrosion in acid solution: Chemical, electrochemical and theoretical studies. *Materials Chemistry and Physics*. 113 (1), 150-158.
- Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., Chemat, F., 2010. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*. 119, 851-858.

- Khan, M.K., Zill-E-Huma, Dangles, O., 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 33, 85-104

- Kim, J.W., Nagaoka, T., Ishida, Y., Hasegawa, T., Kitagawa, K., Lee, S.C., 2009. Subcritical water extraction of nutraceutical compounds from *Citrus pomaces*. *Separation Science and Technology*. 44, 2598-2608.

- Knol, J.J., Van Loon, W.A.M., Linssen, J.P.H., Ruck, A.L., Van Boekel, M., Voragen, A.G.J., 2005. Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose-asparagine reaction system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (15), 6133-6139.
- Koga, T., Meydani, M., 2001. Effect of plasma metabolites of (+)-catechin and quercetin on monocyte adhesion to human aortic endothelial cells. *Journal of Clinical Nutrition.* 73 (5), 941-948.
- Kong, Y., Zu, Y.G., Fu, Y.J., Liu, W., Chang, F.R., Li, J., Chen, Y.H., Zhang, S., Gu, C.B., 2010.Optimization of microwave-assisted extraction of cajaninstilbene acid andpinostrobin from pigeonpea leaves followed by RP-HPLC-DAD determination. *Journal of Food Composition and Analysis*. 23, 382-388
- Kratchanova, M., Pavlova, E., Panchev, I., 2004. The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrates Polymers*. 56, 181-185.

L

- Lagha-Benamrouche, S., Madani, K., 2013. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (Citrus sinensis L. and Citrus aurantium L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*. 50, 723-730.
- Landolt, D., 1993. Corrosion et chimie de surfaces des métaux (Traité des matériaux), Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 165-205, ISBN 2-88074-245-5.
- Lang, Q., Wai, C.M., 2001. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-A practical review. *Talanta*. 53, 771-782.
- Larrauri, J. A., Rupbrez, P. Bravo, L. Calixto, F. S., 1996. High dietary fibre peels: associated powders from orange and lime polyphenols and antioxidant capacity. *Food Research International*. 29, 751-162.
- Lebrini, M., Robert, F., Lecante, A., Roos, C., 2011. Corrosion inhibition of C38 steel in 1 M hydrochloric acid medium by alkaloids extract from Oxandra asbeckii plant. *Corrosion Science*. 53, 687-695.
- Ledesma-Escobar, C.A., Luque de Castro, M.D., 2014. Towards a comprehensive exploitation of citrus. *Trends Food Science and Technology*. 39, 63-75.

- Lee, Y.H., Charles, A.L., Kung, H.F., Ho, H.F., Huang, T.C., 2010. Extraction of nobiletin and tangeretin from *Citrus depressa* Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier. *Industrial Crops and Products*. 31, 59-64.

- Lentza-Rizos, C., Avramides, E.J., Kokkinaki, K., 2006. Residues of Azoxystrobin from grapes to raisins. *Joural of Agriculture and Food Chemistry*. 54, 138-141.

- 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.
- Li B.B., Smith B, Hossain M.M., 2006b. Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*. 48, 189-196.
- Li W., Wang Z., Wang Y.P., Qun Liu C.J., Sun Y.S., Zheng Y.N., 2012a. Pressurised liquid extraction combining LC–DAD–ESI/MS analysis as an alternative method to extract three major flavones in Citrus reticulata 'Chachi' (Guangchenpi). *Food Chemistry*. 130, 1044-1049.

- Li, Y., Jiao, B., Zhao, Q., Wang, C., Gong, Y., Zhang, Y., Chen, W., 2012b. Effect of commercial processing on pesticide residues in orange products. European Food Research and Technology. 234, 449-456.
- Lin, C.M., Sheu, S.R., Hsu, S.C., Tsai, Y.H., 2010. Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. *Food Control*. 2, 1710-1715.

- Liu, L., Fishman, M. L., Kost, J., Hicks, K. B., 2003. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*. 24, 3333-3343.

- Liu, S.C., Yang, D.J., Jin, S.Y., Hsu, C.H., Chen, S.L., 2008. Kinetics of color development, pH decreasing, and anti-oxidative activity reduction of Maillard reaction in galactose/glycine model systems. *Food Chemistry*. 108 (2) 533-541.
- Liu, Y., Shi, J., Langrish, T.A.G., 2006. Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Journal of Chemical Engineering Data*. 120, 203-209

- Locquet, S., Lagrenée, M., Bonnans, J., Bentiss, F., 2002. Patent Wo, 10179.

- Lohrasbi, M., Pourbafrani, M., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2010. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. *Bioresource Technology*. 101, 7382-7388.

- Londoño-Londoño, J., Rodrigues de Lima, V., Lara, O., Gil, L., Crecsynski Pasa, T.B., Arango, G.J., Ramirez Pineda, J., 2010. Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*. 119, 81-87.

- Lucchesi, M.E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw,W., Chemat, F., 2007. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*. 79, 1079-1086.

- Luengo, E., Álvarez, I., Raso, J., 2013. Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science Emerging Technologies*. 17, 79-84.

M

- Ma, Y., Chen, J., Liu, D., Ye, X., 2008. Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel. *Journal of Food Sciences*. 73, 115-120.
- Ma, Y., Chen, J., Liu, D., Ye, X., 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 16, 57-62.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., 2006. Composés phénoliques dans la plante-Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In Les polyphénols en agroalimentaire, 398 p. Sarni-Manchado P., Cheynier V., Eds. Paris: Lavoisier. 1-28.

- Magda, R.A., Awad, A.M., Selim, K.A., 2008. Evaluation of mandarin and orange peels as natural sources of antioxidant in biscuits. *Journal of Food Science & Technology*. 75-82.

- Malaj, M., Ouyang, Z., Sindona, G., Cooks, R.G., 2012. Analysis of pesticide residues by leaf spray mass spectrometry. *Analytical Methods*. 4, 1913-1920.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Journal of Clinical Nutrition*. 79 (5), 727-747.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S., 2007. Microwave assisted extraction-An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*. 1, 7-18.
- Mansfeld, F., Kendig, M.W., Lorenz, W.J., 1985. Corrosion Inhibition in Neutral Aerated Media. *Journal of the Electrochemical Society*. 132 (2), 290-296.
- Manthey, J.A., Grohmann, K., 1996. Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 811-814.
- Manthey J.A., Grohmann K., 2001. Phenols in Citrus Peel Byproducts. Concentrations of Hydroxycinnamates and Polymethoxylated Flavones in Citrus Peel Molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 3268-3273.
- 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.
- Martins, S., Van Boekel, M., 2005. A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways. *Food Chemistry.* 90, 1(2), 257-269.
- Masmoudi, M., Besbes, S., Chaabouni, S., Robert, C., Paquot, M., Blecker, C., 751 Attia, H., 2008. Optimization of pectin extraction from lemon by-product with 752 acidified date juice using response surface methodology.*Carbohydrate Polymers*. 74, 185-192.
- Matsuda, H., Yano, M., Kubo M., Iinuma, M., Oyama, M., Mizuno, M., 1991. Pharmacological study on citrus fruits. II. Anti-allergic effect of fruit of *Citrus unshiu*. On flavonoid components. *Yakugaku Zasshi.* 111, 193-198.
- Maxwell, E.G., Belshaw, N. J., Waldron, K. W., Morris, V. J., 2012. Pectin an emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science and Technology.* 24 (2), 64-73.
- Meléndez-Martinez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J., 2007. Critical Review Review: Analysis of carotenoids in orange juice, *Journal of Food Composition and Analysis*. 20, 638-649.

- Mercer, A.D., Wormwell, F., 1958. Research and Experience with Sodium Benzoate and Sodium Nitrite Mixtures as Corrosion Inhibitors in Engine Coolants, SCI Monograph **4**, The Protection of Motor Vehicles from Corrosion. Society of Chemical Industry; Belgrave Square, London, 69.

- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.

- Millet, J.P., 2008. Durabilité et corrosion (cours Master Science et Technologie des Matériaux), Pitesti.

- Ministère de l'agriculture de Tunisie, 2014. Rapport d'activité annuel : 12-15.

- M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., Ghoul, M., 2015. Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. F*ood and Bioproducts Processing*. 96, 161-170. DOI information: 10.1016/j.fbp.2015.07.010.

- M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., Mihoubi Boudhrioua, N., 2014. Extraction methods of citrus peel phenolic compounds: a review. *Food Reviews International*. 30, 265-290. DOI: 10.1080/87559129.2014.924139.

- Moretti, G., Guidi, F., Grion, G., 2004. Tryptamine as a green iron corrosion inhibitor in 0.5 M deaerated sulphuric acid. *Corrosion Science*. 46 (2), 387-403.
- Mouly P. P., Arzouyan C. R., Gaydo, E. M., Estienne J. M., 1994. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42, 70-79.
- Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J., Parajo, J.C., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 72, 145-171.
- Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V., 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. *Food Chemistry*. 129, 139-148.

N

- NACE Glossary of Corrosion Terms. Materials Protection, 4 (1965) 79.
- Nathan, C.C., 1973. Corrosion Inhibitors, NACE, Houston.

- Nayak, B., Berrios, J. D. J., Powers, J. R. and Tang, J., 2011. Effect of extrusion on the antioxidant capacity and color attributes of expanded extrudates prepared from purple potato and yellow pea flour mixes. *Journal of Food Science.* 76, 874-883.

- Nayak, B., Liu, R.H., Tang, J., 2015. Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains-A Review. *Critical Reviews on Food Science and Nutrition*. 55, 887-918.

- Neveu V., Perez-Jimenez J., Vos F., Crespy 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

- NF EN 15662, 2009. Aliments d'origine végétale - Méthode polyvalente de détermination des résidus des pesticides par CG-SM et SL/SM/SM avec extraction/partition avec de l'acétonitrile et nettoyage par SPE dispersés - Méthode QuEChERS.

- Nicoli, M.C., Anese, M., Severini, C., 1994. Combined effects in preventing enzymatic bowning reactions in minimally processed fruit. *Journal of Food Quality*. 17, 221-229.

- Nogata, Y., Ohta, H., Yoza, K., Berhow, M., Hasegawa, S., 1994. High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in *Citrus* with a photodiode array detector. *Journal of Chromatography A*. 667, 59-66.

- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., Ohto, H., 2006. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 70, 178-192.

O

- Oguzie, E.E., 2008. Evaluation of the inhibitive effect of some plant extracts on the acid corrosion of mild steel. *Corrosion Science*. 50, 2993-2998.

- Oreopoulou, V., Tzia, C., 2007. In Utilization of By-products and Treatment of Waste in the Food, chapitre 11: Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants and colorants. *Springer*, USA: 209-232.

- Ortuno, A., Garcia-Puig, D., Fuster, M.D., Perez, M.L., Sabater, F., Porras, I., Garcia-Lindon, A., Del Rio, J.A., 1995. "Flavanone and nootkanone levels in different varieties of grapefruit and pummelo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43, 1-5.

- Ostovari, A., Hoseinieh, S.M., Peikari, M., Shadizadeh, S.R., Hashemi, S.J., 2009. Corrosion inhibition of mild steel in 1 M HCl solution by henna extract: a comparative study of the inhibition by henna and its constituents (Lawsone, Gallic acid, α-d-Glucose and Tannic acid). *Corrosion Science.* 51(9), 1935-1949.

P

- Pereira C.G., Meireles, M.A.A., 2010. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food Bioprocess Technology*. 3, 340-372.

- Pérez-Jiménez J., Neveu V., Vos F., Scalbert A., 2010. Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols-An application of the Phenol-Explorer database. *Journal of Clinical Nutrition*. 64 (3), 112-120.

- Peschel W., Sànchez-Rabaneda F., Diekmann W., Plescher A., Gartzìa I., Jiménez D., Lamuela- Raventós R., Buxaderas S., Codina C., 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*. 97, 137-150.

- Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E., Berset, C. 2003. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,20-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 80, 1007-1012.

- Pico, Y., 2013. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *Trends Analytical Chemistry*. 43, 84-99.

- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F., 2013. Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*. 31, 593-606.

- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Petitcolas, E., Canselier, J.P., Chemat, F., 2012. First investigation on ultrasound-assisted preparation of food products: sensory and physicochemical characteristics. *Journal of Food Science*. 76, 287-292.

- Piriyaprasarth, S., Sriamornsak, P., 2011. Flocculating and suspending properties of commercial citrus pectin and pectin extracted from pomelo (Citrus maxima) peel. *Carbohydrates Polymers*. 83 (2), 561-568.

- Plaza, M., Amigo-Benavent, M., Del Castillo, M., Ibanez, E., Herrero, M., 2010. Neoformation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions. *Food Research International*. 43(4), 1123-1129.
- Pourbafrani, M., Forgacs, G., Horváth, I.S., Niklasson, C., 2010. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresource Technology*. 101, 4246-4250.

- Praloran, J.C., 1971. Les agrumes, Maisonneuve G.P., Larose, Paris.
- Prasad, dK. N., Hao, J., Shi, J., Liu, T., Li, J., Wei, X.Y., 2010. Antioxidant and anticancer activities of high pressure-assisted extract of longan (Dimocarpus longan Lour.) fruit pericarp. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10, 4, 413-419.
- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L.W., Wu, X.L., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D.J., Ou, B.X., Jacob, R., 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (Orac(FI))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51 (11), 3273-3279.

R

- Rahim, A.A., Rocca, E., Steinmetz, J., Kassim, M.J., Adnan, R., Sani Ibrahim, M., 2007. Mangrove tannins and their flavonoid monomers as alternative steel corrosion inhibitors in acidic medium. *Corrosion Science*. 49, 402-417.

- Raja, P.B., Sethuraman, M.G., 2008. Natural products as corrosion inhibitor for metals in corrosive media: a review. *Materials Letters*. 62, 113-116.

- Ramful, D., Bahorunb, T., Bourdonc, E., Tarnusc, E., Aruoma, O.I., 2010. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*. 278, 75-87.

- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T., Brunton, N., 2011. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic

fruits and their products: *Review of recent advances. Food Research International*. 44 (7), 1875-1887.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231-1237.
- Reber, J.D., Eggett, D.L., Parker, T.L., 2011. Antioxidant capacity interactions and a chemical/structural model of phenolic compounds found in strawberries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 62, 445-452.
- Rehan, H.H., 2003. Corrosion control by water soluble extracts from leaves of economic plants. *Werkstofftech*. 34, 232-237.
- Rice-Evans C., Miller, N., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships between flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medecine.* 20, 933-956.
- Richard, J.S., 1992. High Pressure Phase Behaviour of Multicomponent Fluid Mixtures. Amsterdam: Elsevier
- Roginsky, V., Lissi, E.A., 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*. 92, 235-254.
- Rombaut, N., Tixier, A.S., Bily, A., Chemat, F., 2014. Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. 8, 530-544.
- Routray, W., Orsat, V., 2012. Microwave-assisted extraction of flavonoids: A review. *Food Bioprocess Technology*. 5, 409-424.
- Rozenfeld, I.L., 1981. Corrosion Inhibitors, McGraw-Hill.
- Russo, M., Bonaccorsi, I., Torre, G., Sarò, M., Dugo, P., Mondello, L., 2014. Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fibre: Availability in lemon's by-products. *Journal of functional foods*. 9, 18-26.
- Rusznyák, S., Szent-Györgyi, A., 1936. Vitamin P: Flavonols as vitamins. Nature. 138, 27.

S

- Sahraoui, N., Abert Vian, M., El Maataoui, M., Boutekedjiret, Chemat, F., 2011. Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD). *Innovative Food Science Emerging Tec*hnologies. 12, 163-170.

- Saleh, R.M., Ismail, A.A., EI Hosary, A.A., 1982. Corrosion inhibition by naturally occurring substances. *British Corrosion Journal*. 17 (3), 130-135.

- Sanoner P., 2001. Les polyphénols de la pomme à cidre: diversité variétale et oxydation. Thèse de doctorat, Université de Caen, 316.

- Saratha, R., Priya, S.V., Thilagavathy, P., 2009. Investigation of *Citrus aurantiifolia* Leaves Extract as Corrosion Inhibitor for Mild Steel in 1 M HCL. *Journal of Chemistry*. 6(3), 785-795.

- Sawalha, S.M.S., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2009. Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE–MS/MS. *Food Chemistry*. 116, 567-574.

- Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., 2005. Dietary polyphénols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 454, 287-306.
- Schaschl, E., 1973. NACE Corrosion Inhibitors, USA, National Association of Corrosion Engineers, 28.

- Schwartz, M., Quast, P., von Baer, D., Winterhalter, P., 2003. Vitisin A content of chilean wines from Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon and contribution to the colour of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 6261-6267.
- Scordino, M., Sabatino, L., Traulo, P., Gagliano, G., Gargano, M., Pantò, V., Gambino, G.L., 2008. LC/MS/MS detection of fungicide guazatine residues for quality assessment of commercial citrus fruit. *European Food Research and Technology*. 227, 1339-1347.
- Sekine, I., Nakahata, Y., Tanabe, H., 1988. The corrosion inhibition of mild steel by ascorbic and folic acids. *Corrosion Science*. 28, 987-1001.

- Shirsatha, S.R., Sonawane, S.H., Gogate, P.R., 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status. *Chemical Engineering and Processing*. 53, 10-23.

- Simonin, H., Duranton, F., De Lamballerie, M., 2012. New Insights into the High-Pressure Processing of Meat and Meat Products. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*. 11, 285-306.

- Singh, A., Singh, V.K., Quraishi, M.A., 2010. Effect of fruit extracts of some environmentally benign green corrosion inhibitors on corrosion of mild steel in hydrochloric acid solution. *Journal of Materials and Environmental Science.* 1, 162-174.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Kumar, P., 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chemical Toxicology*. 48, 1734-1740.

- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1988. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299, 152-178.

- Solomon, M.M., Umoren, S.A., Udosoro, I.I., Udoh, A.P., 2010. Inhibitive and adsorption behavior of carboxymethyl cellulose on mild steel corrosion in sulphuric acid solution. *Corrosion Science*. 52, 1317-1325.

- Spar Eskilsson, S., Bjorklund, E., Mathiasson, L., Karlsson, L., Torstensson, A., 1999. Microwave assisted extraction of felodipine tablets. *Journal of Chromatography A*. 840, 59-70.

- Sroka, Z., 2005. Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z. Naturforsch C.* 60 (11-12), 833-843.

- Sultana, B., Anwar, F., Asi, M.R. Chatha, S.A.S., 2008. Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *Grasas y Aceites*. 59 (3), 205-217.
- Sun, H., Liu, C Wang, S., Liu, Y., Liu, M., 2013. Dissipation, residues, and risk assessment of spirodiclofen in citrus. Environmental Monitoring Assessment. 185, 10473-10477.

T

- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J., 2010. Evaluation of spectrometric methods for antioxidant compound measurement in relation to total antioxidant capacity in beverages. *Food Chemistry*. 120, 607- 614.

- Tauscher, B., 1995. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. *Z Lebensmittel-Untersuchungund Forschung*. 200, 3-13.
- Terefe, N.S., Kleintschek, T., Gamage, T., Fanning, K.J., Netzel, G., Versteeg, C., Netzel, M., 2013. Comparative effects of thermal and high pressure processing on phenolic phytochemicals in different strawberry cultivars. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 19, 57-65.
- Terigar, B.G., Balasubramanian, S., Boldor, D., Xu, Z.; Lima, M., Sabliov, C.M., 2010. Continuous microwave-assisted isoflavone extraction system: Design and performance evaluation. *Bioresource Technology*. 101, 2466-2471.
- Thomas, J.G.N., 1980. 5th European Symposium on Corrosion Inhibitors, Ann. Univ. Ferrara, Italy, 453.
- Thomas-Barberan, F.A., Clifford, M.N., 2000. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 (7), 1024-1032.
- 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*. 40,180-184.
- Tiwari, B.K., Brunton, N.P., Brennan, C.S., 2013. *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability, and Extraction*; Chichester, UK: John Wiley and Sons.
- Toledo-Guillén, A.R., Higuera-Ciapara, I., García-Navarrete, G., De la Fuente, J.C., 2010. Extraction of bioactive flavonoid compounds from orange (*Citrus sinensis*) peel using supercritical CO_2. *Journal of Biotechnology*. 150-576.
- Tsao, M.L., Tian, F., Schultz, P.G., 2005. Selective Staudinger modification of proteins containing p-azidophenylalanine**.** *European Journal of Chemical Biology***.** 6 (12), 2147-2159.
- Tumbas, V.T., Ćetkovic, G.S., Djilas, S.M., Canadanovic-Brunet, J.M., Vulic, J.J., Knez, Z., 2010. Antioxidant activity of mandarin (Citrus reticulata) peel. *Biblid*. 40, 195-203.
- Turner, R., Baron, B., Wolffram, S., Minihane, A.M., Cassidy, A., Rimbach, G., Weinberg D., 2004. Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein. *Free Radical Research*. 38 (2), 209-216.

U

- Umoren, S.A., Gasem, Z.M., Obot, I.B., 2013. Natural Products for Material Protection: Inhibition of Mild Steel Corrosion by Date Palm Seed Extracts in Acidic Media. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 52, 14855-14865.
- USDA (United Sates Department of Agriculture). 2014. Citrus: World Markets and Trade.

V

- Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D.J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medecine*. 20, 331-342.
- Vasconcelos Torres, V., Salgado Amado, R., Faia de Sa, C., Lopez Fernadez, T., Alberto da Silva Riehl, C., Guedes Torres, A., D'Elia, E., 2011. Inhibitory action of coffea ground extracts on the corrosion of carbon steel in HCl solution. *Corrosion Science*. 53, 2385-2392.
- 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.
- 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.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (Citrus lemon L.), mandarin (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.) and orange (Citrus sinensis L.) essential oils. *Food Control*. 19(12), 1130-1138.
- Vrsalovic, L., Oguzie, E., Klissic, M., Gudic, S., 2011. Corrosion Inhibition of CuNi10Fe Alloy with Phenolic Acids. *Chemical Engineering Communications*. 198, 380-1393.

- Vrsalovic, L., Oguzie, E., Klissic, M., Radosevic, J., Gudic, S., 2007. Sinapinic acid as Al–2.5Mg alloy corrosion inhibitor in sodium chloride solution. *Journal of Applied Electrochemistry*. 37, 325-330.

- Wagner, K.H., Derkits, S., Herr, M., Schuh, W., Elmadfa, I., 2002. Antioxidative potential of melanoidins isolated from a roasted glucose-glycine model. *Food Chemistry.* 78 (3), 375-382.

W

- Wang, A.Y., Zhou, M.Y., Lin, W.C., 2011. Antioxidative and anti-inflammatory properties of *Citrus sulcata* extracts. *Food Chemistry*. 124, 958-963.

- Wang, L., Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*. 17, 300-312.
- Wang, X., Chen, Q., & Lu, X., 2014. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*. 38, 129-137.

- Wang, Y.C., Chuang, Y.C., Hsu, H.W., 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*. 106, 1, 277-284.

- 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.

X

- Xiao, H., Yang, C.S., Li, S., Jin, H., Ho, C.T., Patel, T., 2009. Monodemethylated polymethoxyflavones from sweet orange (Citrus sinensis) peel Inhibit growth of human lung cancer cells by apoptosis, *Molecular Nutrition & Food Research*. 53, 398-406.

- Xu, G., Ye, X., Chen, J., Liu, D., 2007. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. Journal of Agricultural and *Food Chemistry*. 55, 330-335.

- Xu, G.H, Chen, J.C., Zhang, Y.H., Iang, P.J., Ye, X.Q., 2008. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of Citrus peel extract by hot water. *Food Chemistry.* 73, 1, 11-17.

Y

- Yaylayan, V.A., Haffenden, L.J.W., 2003. Mechanism of imidazole and oxazole formation in c-13-2-labelled glycine and alanine model systems. *Food Chemistry*. 81 (3), 403-409.
- Yeoh, S., Shi J., Langrish, T.A.G., 2008. Comparisons between different techniques for waterbased extraction of pectin from orange peels. *Desalination.* 218, 229-237.

Z

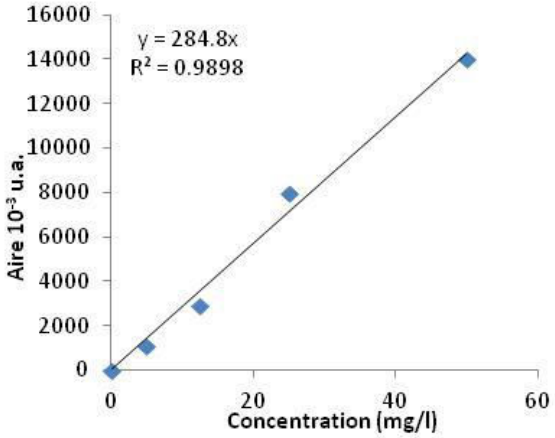
- Zhang J., 2007. Flavonoids in Grapefruit and comercual Grapefruit juices: concentration, distribution and potential health benefits. *Proceedings of the Florida. State Horticultural Society*. 120, 288-294.
- Zhang, Z.Y., Liu, X.J., Hong, X.Y., 2007. Effects of home preparation on pesticide residues in cabbage. *Food Control*. 18, 1484-1487.
- Zhang, S., Xi, J., Wang, C.Z., 2005. Effect of high hydrostatic pressure on extraction of flavonoids in propolis. Food *Science and Technology International*. 11, 213-216.
- Zhang, Y., Zheng, B., Tian, Y., Huang, S., 2012. Microwave-assisted extraction and antioxidation activity of polyphenols from lotus (Nelumo nucifera Gaertn.) seeds. *Food Science & Biotechnology*. 21, 1577-1584.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jiamming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effecs on superoxide radicals. *Food chemistry*. 64, 555-559.
- Zhu, J., Dai, X.J., Fang, J.J., Zhu, H.M., 2013. Simultaneous detection and degradation patterns of kresoxim-methyl and trifloxystrobin residues in citrus fruits by HPLC combined with QuEChERS. *Journal of Environmental Science and Health.* 48, 470-476.
- Zia-ur-Rehman., 2006. Citrus peel extract-A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*. 99, 450-454.

ANNEXE

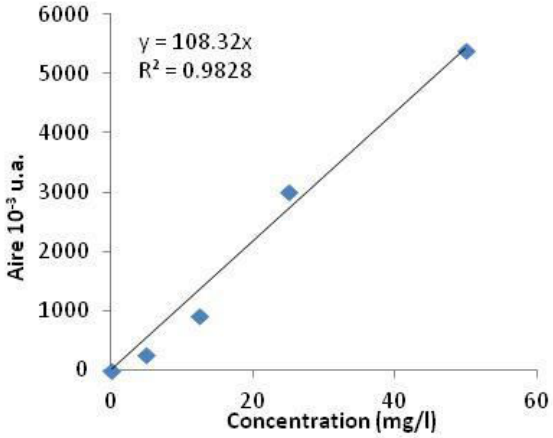
Annexe 1

Courbes d'étalonnage des flavonoïdes individuels

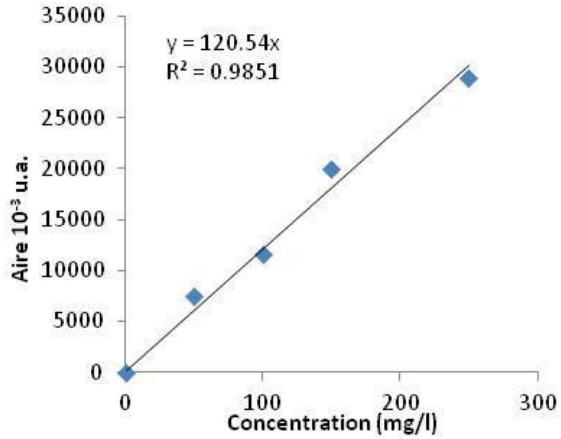
Eriocitrine



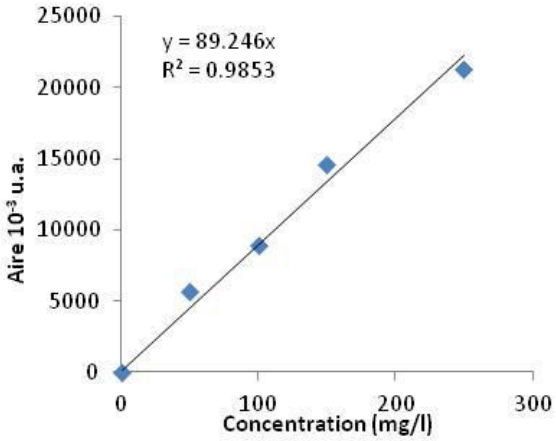
Naringine



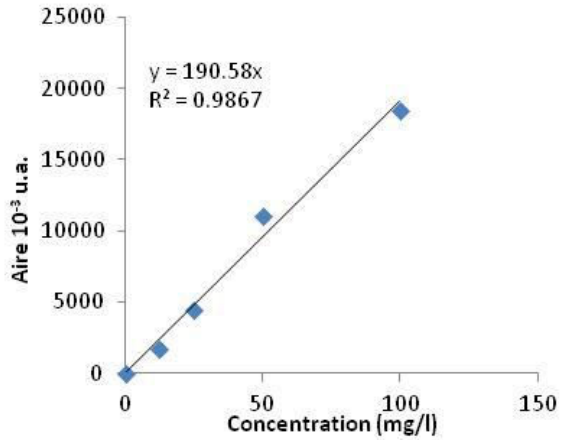
Narirutine



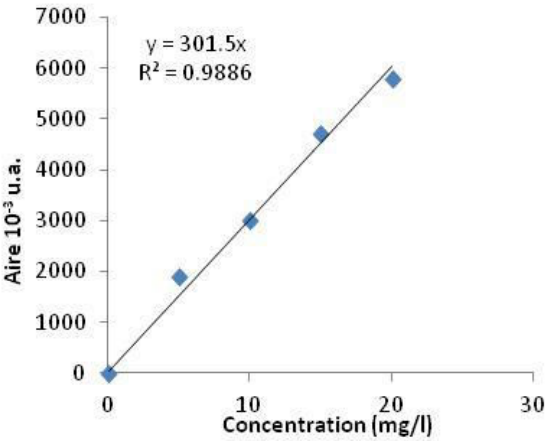
Néohespéridine



Didymine



Sinensetine



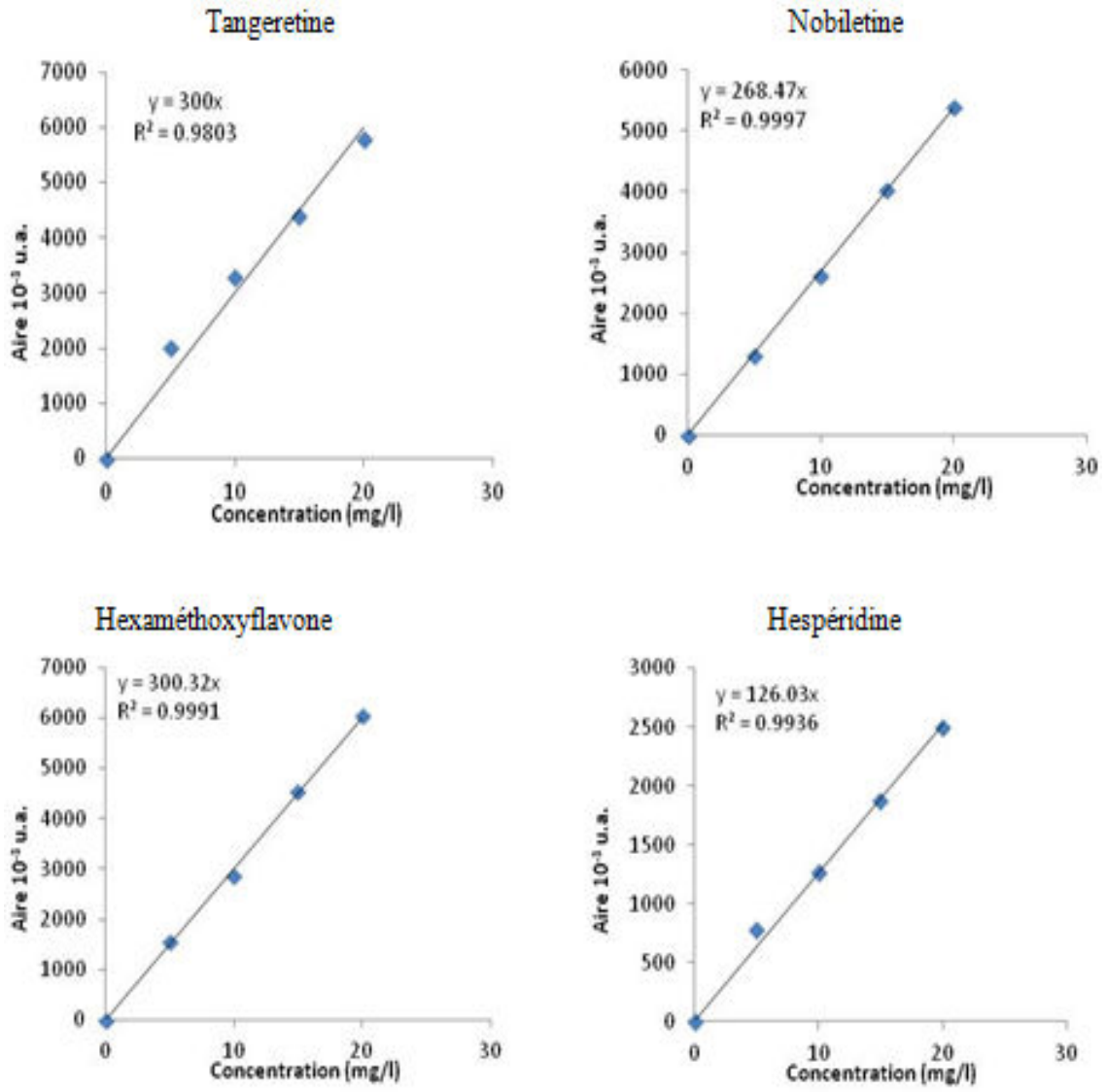


Figure 39. *Courbes détalonnage eriocitrine, naringine, narirutine, néohespéridine, didymine, sinensetine, tangeretine, nobiletine, 3',4',5,5'6,7,-hexaméthoxyflavone.*

Tableau 31. *Limite de quantification de chaque étalon interne*

Standard	LOQ (mg/l)	Standard	LOQ (mg/l)
Eriocitrine	0.032	Naringine	0.083
Narirutine	0.075	Néohespéridine	0.101
Didymine	0.00026	Sinensetine	0.00017
Tangeretine	0.00017	Nobiletine	0.00018
Hexaméthoxyflavone	0.00017	Hespéridine	0.071

Annexe 2

Article 1: Extraction methods of citrus peel phenolic compounds: a review.

M'HIRI Nouha., IOANNOU Irina., GHOUL Mohamed., MIHOUBI BOUDHRIOUA Nourhène.

UR11ES44, Ecophysiologie et Procédés Agroalimentaires, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet, Université de la Manouba, Ariana-Tunis, Tunisia.

ENSAIA–Laboratoire d'Ingénierie de biomoléc de biomolécules (LIBio), Université de Lorraine, Vandoeuvre, France.

Annexe 3

Article 2: Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel.

M'HIRI Nouha., IOANNOU Irina., MIHOUBI BOUDHRIOUA Nourhène., GHOUL Mohamed.

UR11ES44, Ecophysiologie et Procédés Agroalimentaires, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet, Université de la Manouba, Ariana-Tunis, Tunisia.

ENSAIA–Laboratoire d'Ingénierie de biomoléc de biomolécules (LIBio), Université de Lorraine, Vandoeuvre, France.

Annexe 4

Article 3: Corrosion inhibition of carbon steel in acidic medium by orange peel extract and its main antioxidant compounds.

M'HIRI Nouha., VEYS-RENAUX Delphine, ROCCA Emmanuel, IOANNOU Irina., MIHOUBI BOUDHRIOUA Nourhène., GHOUL Mohamed.

UR11ES44, Ecophysiologie et Procédés Agroalimentaires, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet, Université de la Manouba, Ariana-Tunis, Tunisia.

Institut Jean Lamour-UMR CNRS 7198, BP 70239, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy 54506, France.

ENSAIA–Laboratoire d'Ingénierie de biomoléc de biomolécules (LIBio), Université de Lorraine, Vandoeuvre, France.

<u>Titre :</u> Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange « Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone

<u>Résumé</u>

Ce travail de thèse est une contribution à la valorisation des écorces de l'orange « Maltaise demi-sanguine » tunisienne. L'objectif de ce travail est (i) d'étudier l'efficacité des différentes méthodes d'extraction en termes de teneurs en phénols totaux (PT), en flavonoïdes totaux (FT), en flavonoïdes individuels (FI) et en activité antioxydante des extraits et (ii) d'examiner l'effet inhibiteur de l'extrait contre la corrosion de l'acier en milieu acide et basique. Pour cela, cinq méthodes d'extraction ont été utilisées : l'extraction conventionnelle par solvant, ECS (*éthanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C et agitation mécanique à l'obscurité, 3 extractions successives*), l'extraction assistée par micro-ondes, EAM (*éthanol (80%), m/v: 5g:50ml, 3 extractions successives, 180s, 67-108°C et 100-400W ou à 35°C*), l'extraction assistée par ultrasons, EAU (*éthanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C, 100-200W et 3 extractions successives*), l'extraction sous haute pression, EHP (*éthanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C, 0,1-100 MPa et 1 seule extraction*) et l'extraction par CO_2 supercritique, SC-CO_2 (*éthanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35-80°C/10-22 MPa et 3 extractions successives*). Ce coproduit est riche en ingrédients fonctionnels comme les phénols totaux (1,968±0,002 g EAG/100g MS) et la vitamine C (0,105±0,003 g/100g MS). Dix flavonoïdes individuels (FI) ont été identifiés dans l'extrait des écorces de l'orange Maltaise. La néohespéridine (0,860±0,003 g/100g de poudre des écorces d'orange) et l'hespéridine (0,551±0,001 g/100g de poudre des écorces d'orange) sont les composés majoritaires. Les conditions opératoires d'extraction qui ont permis d'obtenir les teneurs les plus élevées en PT et FT sont 200 W, 76°C pendant 180s pour l'EAM, 125 W pendant 30 min à 35°C pour l'EAU, 80°C et 10 MPa pour l'extraction SC-CO_2 et 50 MPa, 35°C pendant 30 min pour l'EHP. La comparaison des différentes méthodes d'extraction aux mêmes conditions opératoires (*m/v:5g/50ml, éthanol 80%, 35°C, 3 extractions successives)* montre que l'EAM présente les teneurs les plus élevées en PT et en FT, suivie par EAU, ECS, EHP et l'extraction SC-CO_2, ainsi qu'en flavonoïdes individuels majoritaires. Cependant, la valeur de l'activité antioxydante n'est pas systématiquement corrélée à la teneur en phénols la plus élevée et elle diffère selon le test utilisé. Pour le test ABTS, l'activité antioxydante suit l'ordre décroissant suivant : EHP, ECS, SC-CO_2, EAM, EAU, alors que c'est EHP, ECS, EAM, EAU, SC-CO_2, pour le test DPPH. L'étude de l'effet anti-corrosion de l'extrait des écorces de l'orange Maltaise ainsi que ses composés antioxydants majoritaires (la néohespéridine, la naringine et l'acide ascorbique) a révélé une efficacité d'inhibition significative de la corrosion de l'acier par l'extrait des écorces d'orange (95%) par rapport à celle de ses composés antioxydants individuels : l'acide ascorbique (92%), la néohespéridine (87%) et la naringine (56%). Le potentiel anti-corrosion de l'extrait des écorces d'orange n'est pas due uniquement à l'activité antioxydante de ces composés mais probablement à des actions en synergie de différentes molécules et à la formation d'un film tridimensionnel de surface attribué à d'autres composés présents dans l'extrait comme la pectine.

Mots clés : écorces d'orange, flavonoïdes, activité antioxydante, extraction, inhibition de la corrosion, acier, MEB, SIE.

Title: Comparative study of the effect of extraction methods on phenols and antioxidant activity of orange peel extracts «Maltease variety and exploration of the inhibitory effect of corrosion of carbon steel

Abstract

This work is a contribution to the valorization of "Maltease peel". The objectives of this research are (i) to study the efficiency of different extraction methods in terms of total phenol contents (TPC), total flavonoid contents (TFC), individual flavonoids (FI) and antioxidant activity of extracts and (ii) to examine the corrosion inhibition of carbon steel in acidic and basic medium by orange peel extract and its main antioxidant compounds. For this, five extraction methods were used: conventional solvent extraction, CSE (*ethanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C, mechanical stirring in the dark and 3 successive extractions*), microwave assisted extraction, MAE (*ethanol (80%), m/v: 5g:50ml, 3 successive extractions, and 180s, 67-108°C, 100-400W or at 35°C*), ultrasound-assisted extraction, UAE *(ethanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C, 100-200W and 3 successive extraction)*, high-pressure extraction, HPE (*ethanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35°C, 0,1-100 MPa and one extraction*) and supercritical CO_2 extraction, SC-CO_2 (*ethanol (80%), m/v: 5g:50ml, 30 min, 35-80°C/10-22 MPa and 3 successive extractions*). This byproduct is rich in functional ingredients such as total phenols (1.96 ±0.002 g GAE/100g DM) and vitamin C (0.10±0.003 g/100g DM). Ten individual flavonoids (FI) were identified in the extract of Maltease orange peel. Neohesperidin (0.860±0.003 g/100g orange peel powder) and hesperidin (0.551±0.001 g/100g orange peel powder) are the major compounds. The operating conditions of extraction that have achieved the highest levels of total phenol and flavonoid contents are 200 W, 76°C during 180s for MAE; 125 W during 30 min at 35°C for UAE; 80°C and 10 MPa for SC-CO_2 extraction and 50 MPa,35°C during 30 min for HPE. The comparison of the different extraction methods performed at the same operating conditions *(m/v: 5g/50ml, 80% ethanol, 35°C, 3 successive extractions)* shows that the MAE has the highest levels of TPC and TFC, followed by UAE, CSE, HPE and SC-CO_2 extraction, as well as the major individual flavonoids. However, results concerning antioxidant activity cannot be correlated to TPC, TFC or individual flavonoids and it differs depending on the test used. Orange peel extracted by HPE presents higher radical scavenging capacity compared to extracts obtained by other extraction methods. Moreover, it can be noticed a significant decrease of the antioxidant activity measured by the ABTS method in the following order: HPE, CSE, SC-CO_2, MAE, UAE, whereas, it is EHP, ECS, EAM, EAU, SC-CO_2 extraction for DPPH test. The study of the anti-corrosion effect of the orange extract and its antioxidant compounds (neohesperidin, naringin and ascorbic acid) showed a significant inhibition effectiveness of the corrosion steel with orange peel extract (95%) relative to that of its antioxidant compounds: ascorbic acid (92%), neohesperidin (87%) and naringin (56%). The anti-corrosion efficiency of orange peel extract is not only due to the antioxidant activity of identified compounds, but probably also to a synergic effect of molecules and to the formation of a three-dimensional surface of the film. This film can be formed due to the presence of other compounds in the extract such as pectin.

Keywords: orange peel, flavonoids, antioxidant activity, extraction, corrosion inhibition, steel, SEM, EIS.