جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵙⵉⴷⵉ ⵎⵓⵃⴰⵎⵎⴷ ⴱⵏ ⵄⴱⴷⵍⵍⴰⵀ ⵖ ⴼⴰⵙ
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم ظهر المهراز فاس
ⵜⴰⵖⵡⵍⵍⵉⵜ ⵖ ⵜⵎⵓⵙⵙⵉⵜ ⴰⵎⵓⵔ ⵎⵎⵓⵔⴰⵣ ⴼⴰⵙ
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MAHRAZ FES

*N° d'Ordre* : **48 /2022**

***Formation Doctorale : Molécules bioactives, Santé et Biotechnologies***

***Disciplines : Chimie et Biologie***

***Spécialité : Biochimie et Biotechnologie***

***Laboratoire : Biotechnologie, Environnement, Agroalimentaire et Santé***

# THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par

## Malak TABIB

# Valorisation des co-produits de l'amande par l'éco-extraction de composés bioactifs et étude de leurs activités antioxydante et antimicrobienne

Soutenue le 17 / 09 / 2022 devant le jury composé de :

| | | |
|---|---|---|
| ***Pr. Adnane REMMAL*** | ***Faculté des Sciences Dhar el Mahraz - Fès*** | ***Directeur de thèse*** |
| ***Pr. Abdelkhalek LEGSSYER*** | ***Faculté des Sciences- Oujda*** | ***Président*** |
| ***Pr. Abdellah FARAH*** | ***Faculté des Sciences et Technologies - Fès*** | ***Rapporteur*** |
| ***Pr. Hassan HAJJAJ*** | ***Faculté des Sciences - Meknès*** | ***Rapporteur*** |
| ***Pr. Abderrahim ZIYYAT*** | ***Faculté des Sciences - Oujda*** | ***Rapporteur*** |
| ***Pr. Mohammed BENYAHYA*** | ***Faculté des Sciences Dhar El Mahraz - Fès*** | ***Membre*** |
| ***Pr. Bouchra OUMOKHTAR*** | ***Faculté de Médecine et de Pharmacie - Fès*** | ***Membre*** |
| ***Dr. El Mostapha OUAHDI*** | ***Biorésine Internationale – Sidi Slimane*** | ***Invité*** |

**Année universitaire: 2021/2022**

**“Sometimes you climb out of bed in the morning and you think, I'm not going to make it, but you laugh inside — remembering all the times you've felt that way.”**

**Charles Bukowski**

# Résumé

Au XXIe siècle, la transformation de produits alimentaires est un défi à relever pour garantir la production alimentaire, réduire les sous-produits, protéger à la fois l'environnement et les consommateurs et renforcer simultanément la concurrence entre les industries pour qu'elles soient plus écologiques, économiques et innovantes. L'intérêt pour les composés végétaux bioactifs a augmenté de façon significative en raison de leurs avantages supposés pour la santé. Les coproduits naturels sous-utilisés des amandes font l'objet de cette étude et représentent une riche source de polyphénols, connus pour leur couleur, la promotion de la santé, la prévention des maladies et leur activité antimicrobienne. Les enjeux économiques et environnementaux exigent actuellement des technologies durables, vertes et innovantes en matière de traitement, de pasteurisation et d'extraction. Dans ce contexte, ce manuscrit présente d'abord une étude bibliographique sur l'extraction verte. Après avoir détaillé ses six principes, il s'articule autour de quatre procédés d'éco-extraction, en plus d'une revue générale sur les polyphénols. Ensuite, l'utilisation des ultrasons pour l'émondage et pour l'extraction du contenu phénolique des peaux d'amande en une seule étape est suggérée. Cette partie présente l'ensemble des effets des ultrasons sur la peau, les protéines et les lipides des amandes, ainsi qu'une analyse détaillée des extraits. L'objectif de cette étude est de séparer la peau de l'amande et d'extraire son contenu en polyphénols en utilisant l'extraction assistée par ultrasons (UAE) à température ambiante. Une autre alternative de valorisation de coproduits de l'amande a été proposée. Ce travail vise à ouvrir la voie à l'utilisation de l'adsorption sur la résine macroporeuse XAD-7 HP avec un lit fixe à contre-courant pour le traitement des eaux usées. Cette technique prometteuse pourrait être facilement mise à l'échelle et intégrée dans les lignes de production existantes. Grâce à cette approche, il a été possible de concentrer jusqu'à cinq fois le contenu phénolique de l'eau de blanchiment initiale. Les extraits sont évalués pour déterminer leur activité antioxydante. Enfin, des tests microbiologiques sont effectués pour déterminer leur activité microbienne seuls et en combinaison avec d'autres composés, y compris des composés majoritaires d'huiles essentielles et un antibiotique.

**Mots clés :** Chimie Verte, Eco-extraction, Amandes, Transformation, Coproduits, Polyphénols, Valorisation, Adsorption, Pouvoir Antimicrobien.

# Abstract

In the 21st century, food processing is a challenge to ensure food production, reduce by-products, protect both the environment and consumers, and simultaneously increase competition among industries to be more environmentally friendly, economical, and innovative. Interest in bioactive plant compounds has increased significantly due to their purported health benefits. The underutilized natural co-products of almonds are the focus of this study and represent a rich source of polyphenols, known for their color, health promotion, disease prevention, and antimicrobial activity. Economic and environmental issues currently require sustainable, green, and innovative technologies for processing, pasteurization, and extraction. In this context, this manuscript first introduces a bibliographic study on green extraction. After detailing its six principles, it focuses on four eco-extraction processes, in addition to a general review of polyphenols. Next, the use of ultrasound for pruning and for extracting the phenolic content of almond skins in a single step is suggested. This section presents the overall effects of ultrasound on almond skin, proteins, and lipids, as well as a detailed analysis of the extracts. The objective of this study is to separate the skin from the almond kernel and extract its polyphenol content using ultrasonic-assisted extraction (UAE) at room temperature. Another alternative for the valorization of almond co-products has been proposed. This work aims to pave the way for the use of adsorption on XAD-7 HP macroporous resin with a countercurrent fixed bed for wastewater treatment. This promising technique could be easily scaled up and integrated into existing production lines. Using this approach, it was possible to concentrate up to five times the phenolic content of the initial blanch water. The extracts are evaluated for their antioxidant activity. Finally, microbiological tests are performed to determine their microbial activity alone and in combination with other compounds, including major compounds of essential oils and an antibiotic.



**Keywords**: Green Chemistry, Eco-extraction, Almonds, Green Food Processing, Co-products, Polyphenols, Valorization, Adsorption, Antimicrobial activity.

# Remerciements

La rédaction des remerciements est la partie finale et la plus délicate. Ces trois dernières années ont été une expérience marquante, aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Il est l'occasion de se remémorer les différentes embûches qu'il a fallu surmonter mais surtout les personnes qui m'ont soutenue de loin ou de près par leur présence, leurs conseils et leur bienveillance.

Je tiens d'abord à remercier sincèrement mon directeur de thèse, Pr. **Adnane REMMAL**, qui m'a accueilli dans son laboratoire. Votre confiance, vos conseils avisés ainsi que vos qualités scientifiques et humaines ont été les moteurs de ma réussite. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec vous. Je vous exprime ma sincère gratitude et mon profond respect.

Je remercie aussi **Christian GINIES** pour votre aide et votre expertise dans le domaine de la chromatographie. Merci de m'avoir initié à cette technique analytique et d'avoir pris le temps de m'expliquer la lecture des données. Mes remerciements s'adressent aussi à **Isabelle BORNARD** pour les études réalisées en microscopie électronique à balayage. Votre disponibilité et votre intérêt pour la découverte de nouvelles matrices ainsi que votre bonne humeur m'ont permis de réaliser de nombreux travaux de microscopie dans des conditions optimales. Sans oublier **Yang TAO** pour son travail concernant les études de modélisation.

Un grand merci à toute l'équipe du GREEN : Pr. **Farid CHEMAT** qui m'a initié à la recherche scientifique. Je vous exprime ma gratitude pour vos directives, vos idées et votre encadrement. Je suis réellement reconnaissante pour cette opportunité ; **Njara RAKOTOMANOMANA**, je souhaite vous remercier pour vos efforts, votre patience, vos longues heures de correction, vos directives et votre implication au laboratoire ; **Anne-sylvie FABIANO TIXIER**, **Maryline VIAN**, **Emmanuel PETITCOLAS**, **Karine RUIZ, Julien MATOIS**, et **Sandrine PERINO**; sans oublier tous les doctorants et post-doctorants m'ayant accompagné durant ces trois dernières années : **Harish**, **Nazifa**, **Léna**, **Amandine**, **Cathy**, **Emma**, **Léo**, **Ombéline**, **Léa** et **Vincent**. Votre

compagnie à l'université et nos échanges (scientifiques ou pas☺) ont été un réel plaisir ! Je remercie sincèrement **Boutheina KHADHRAOUI** pour ta sagesse et ton soutien, surtout pendant les moments difficiles.

J'adresse également mes remerciements à l'équipe LIAV : **Mounia OUKHOUIA** pour tes conseils, ton accompagnement et pour ton intérêt porté à mes travaux, **Assia HOUIAT** pour ton sourire au quotidien et pour ton soutien indéfectible, sans oublier **Soukayna HRIOUECH**, **Samira OUKHOUIA**, **Chaimae SQUALLI** et **Maroua KHOUKH** pour votre sympathie et votre amitié. J'ai eu beaucoup de plaisir travailler au sein de votre équipe. Le cadre de travail était convivial et idéal.

---

Mes remerciements ne seraient pas complets sans avoir remercié mes parents **Fatima Zohra** et **Jaouad** et mes deux petites sœurs **Maha** et **Marwa** à qui je dois tout. Merci de m'avoir soutenu et conseillé, merci pour votre investissement et votre présence dans les moments d'incertitude et les moments de joie. Votre amour inconditionnel m'a inspiré. Je vous dédie ce modeste travail. J'espère que vous êtes fiers de moi.

Je veux aussi envoyer tout mon amour à ma grand-mère **Maria** qui me manque beaucoup, et à ma grand-mère **FDILA**, à qui j'exprime mon affection.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à toute la famille **EL KHAOUA**, petits et grands. Merci pour votre accompagnement, votre aide, votre soutien et vos encouragements tout au long de ces années passées à Avignon. Vous êtes ma deuxième famille.

Je tiens également à remercier mes amis au Maroc, en France et dans le monde entier, qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours :

**Sara**, **Jiji** et **Souki**, mes amies, mes sœurs de cœur (et mes tatas d'amour 😁), merci pour m'avoir aidé à traverser les moments difficiles et pour tout le soutien émotionnel, le divertissement et l'attention que vous m'avez apportés. Merci pour nos fous rires et nos longues discussions. Votre amitié est précieuse, je vous souhaite le meilleur pour l'avenir.

**Imad, Mimi** et **Simo**, merci de m'avoir épaulé, merci pour votre soutien moral ininterrompu. Votre façon de relativiser la vie m'a permis de relativiser pas mal de choses

concernant cette dernière année. Malgré la distance, votre présence et votre aide constante m'ont servi d'inspiration et m'ont donné ma force motrice, surtout pendant mes crises. Sans vos encouragements et votre compréhension, il m'aurait été difficile de traverser cette expérience. Merci d'avoir cru en moi !

**Rhita, Zineb, Marwane, Sara, Fifo, Slima, Mona** et **Hamza**, je vous remercie massivement pour votre contribution à cette aventure. Merci d'avoir été toujours fidèles à vous-mêmes et pour tous nos moments de folie. Vous avez chacun, à votre manière, apporté de la bonne humeur et de l'optimisme au cours de cette thèse.

**Full love!**

# Productions scientifiques

## Articles

- Malak Tabib, Yang Tao, Christian Ginies, Isabelle Bornard, Njara Rakotomanomana, Adnane Remmal, Farid Chemat. (2020). A one-pot ultrasound-assisted almond skin separation/polyphenols extraction and its effects on structure, polyphenols, lipids, and proteins quality. Applied Sciences, 10(10), 3628.
- Malak Tabib, Christian Ginies, Njara Rakotomanomana, Adnane Remmal. (2022). Adsorption of Polyphenols from Almond Blanching Water by Macroporous Resin. International Journal of Food Science, vol. 2022, Article ID 7847276, 11 pages.

## Posters

- Malak Tabib, Njara Rakotomanomana, Christian Ginies, Isabelle Bornard, Adnane Remmal, Farid Chemat. Extraction of Almond polyphenols (Prunus dulcis). Journées Ultrasons et Procédés (JSUP-2019), Orange, France.
- Malak Tabib, Njara Rakotomanomana, Christian Ginies, Isabelle Bornard, Adnane Remmal, Farid Chemat. Valorization of almond (Prunus dulcis) blanch water. 25th Annual Green Chemistry & Engineering Conference, ACS - en ligne (2021).

## Chapitre d'ouvrage

- Malak Tabib, Njara Rakotomanomana, Adnane Remmal, Farid Chemat. Green Extraction Techniques. Green Extraction Techniques in Food Analysis, Bentham Science.

# Abréviations

**ACV** : Analyse du Cycle de Vie

**AG** : Acides Gras

**AIE** : Agence Internationale de l'Energie

**AMC** : Amoxicilline + acide clavulanique

**ANOVA** : ANalysis Of Variance

**ATCC** : American Type Culture Collection

**ATP** : Adenosine TriPhosphate

**BA** : Blanched Almonds

**BBD** : Box- Behnken Design

**BHA** : Butylated HydroxyAnisole

**BHT** : Butylated HydroxyToluene

**BSA** : Bovine Serum Albumin

**BW** : Blanching Water

**CCD** : Central Composite Design

**CFI** : Concentration Fractionnaire Inhibitrice

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**COV** : Composés organiques volatiles

**DES** : Deep Eutectic Solvents

**DIC** : Détente Instantanée Contrôlée

**DMASE** : Dynamic Microwave Assisted Solvent Extraction

**DP** : Degré de Polymérisation

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**E/H** : Eau / Huile

**EUCAST** : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**FAME** : Fatty Acid Methyl Ester

**FAO** : Food and Agriculture Organization

**F-C** : Folin-Ciocalteu

**FDE** : Freeze-Dried Extracts

**FRSA** : Free Radical Scavenging Activity

**GC-FID** : Gas Chromatography–Flame Ionization Detectors

**GC-MS** : Gas Chromatography–Mass Spectrometry

**HCT** : High Capacity ion Traps

**HDL** : High Density Lipoprotein

**HPLC-DAD** : High-Performance Liquid Chromatography With Diode-Array Detection

**HPLC-DAD-ESI-MS²** : High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

**HPLC-VWD** : High-Performance Liquid Chromatography-Variable Wavelength Detector

**LC-MS** : Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

**LDL** : Low-Density Lipoprotein

**LPS** : LipoPolySaccharides

**MAE** : Microwave-Assisted Extraction

**MAHD** : Microwave-Assisted HydroDiffusion

**MASE** : Microwave-Assisted Solvent Extraction

**MASE** : Microwave-Assisted Solvent Extraction

**mDP** : Mean Degree of Polymerization

**MEB** : Microscopie Electronique à Balayage

**MHA** : Mueller Hinton Agar

**MHB** : Mueller Hinton Broth

**MHG** : Microwave Hydrodiffusion And Gravity

**MIS** : Microwave-Integrated Soxhlet Extraction

**MRSA** : Methicillin-resistant Staphylococcus aureus

**MTS** : ManoThermoSonication

**NA** : Natural Almonds

**NADH** : Nicotinamide adenine dinucleotide

**NADPH** : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

**NCCLS** : National Committee for Clinical Laboratory Standards

**NS** : Natural Skin

**NUA** : Non-Ultrasonicated Almonds

**OMS** : Organisation Mondiale de Santé

**PC** : Procyanidins Concentration

**PDI** : Protein Dispersibility Index

**PEF** : Pulsed Electric Field

**REACH** : Registration, Evaluation, Authorisation, and restriction of CHemicals

**RMSE** : Root Mean Square Error

**ROE** : Resin Obtained Extract

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**RSM** : Response Surface Methodology

**sc$CO_2$** : Supercritical carbon dioxide

**SCMC** : Sodium CarboxyMethyl Cellulose

**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis

**SF** : Supercritical Fluids

**SFE** : Supercritical Fluid Extraction

**SFMAE** : Solvent Free Microwave-Assisted Extraction

**SFME** : Solvent-Free Microwave Extraction

**SST** : Skin Separation Time

**SWE** : Subcritical Water Extraction

**TAG** : TriAcylGlyceride

**TBHQ** : Tert-ButylHydroQuinone

**TC** : Tannins Condensés

**TPC** : Total Polyphenol Content

**TR** : Temps de Rétention

**UA** : Ultrasonicated Almonds

**UAE** : Ultrasound-Assisted Extraction

**UE** : Union Européenne

**UHPLC / UPLC**: Ultra-High-Performance Liquid Chromatography

**UHPLC-QToF-MS** : Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry

**UI** : Ultrasound Intensity

**UMAE** : Ultrasound Microwave Assisted Extraction

**US** : UltraSons

**USDA** : United States Department of Agriculture

**UV** : Ultra-Violets

**VMHD** : Vacuum Microwave Hydrodistillation

# Table de matières

**Introduction générale** ..... 23
**Etat de l'art** ..... 24
1- Axe de recherche de la thèse ..... 25
2- Plan d'étude de la thèse ..... 27
**CHAPITRE I** ..... 30
**Synthèse bibliographique** ..... 30
I- Techniques d'extraction verte ..... 31
1- Introduction ..... 31
2- Extraction verte : définition et principes ..... 32
3- Techniques d'extraction verte ..... 47
a. Extraction Assistée par microondes ..... 47
i. Principe ..... 47
ii. Instrumentation ..... 50
iii. Applications dans l'analyse des aliments ..... 52
b. Extraction Assistée par Ultrasons ..... 57
i. Principe ..... 58
ii. Instrumentation ..... 60
iii. Applications dans l'analyse des aliments ..... 62
c. Extraction par eau sub-critique ..... 64
i. Principe ..... 64
ii. Instrumentation ..... 66
iii. Applications dans l'analyse des aliments ..... 68
d. Extraction par fluide supercritique ..... 69
i. Principe ..... 69
ii. Instrumentation ..... 71
iii. Application dans l'analyse des aliments ..... 73
4- Comparaison et tendances futures ..... 74
II- Amandes – Amandier *Prunus dulcis* ..... 77
1- Place de l'amande de 1400 avant J.-C. à nos jours ..... 77
2- Description botanique ..... 77
3- Cycle de vie des amandes ..... 79

4- Composition et bienfaits ..... 80
5- Production mondiale ..... 84
III- Composés phénoliques ..... 85
1- Classes de polyphénols ..... 86
a. Acides phénoliques ..... 86
b. Flavonoïdes ..... 87
i. Flavan-3-ols ..... 88
ii. Flavonols ..... 88
iii. Flavones ..... 89
iv. Flavanones ..... 89
v. Isoflavones ..... 89
vi. Anthocyanidines ..... 89
c. Alcools phénoliques ..... 90
d. Tanins ..... 90
2- Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des polyphénols ..... 92
a. Propriétés antioxydantes ..... 92
b. Propriétés antimicrobiennes ..... 94
3- Applications – encapsulation des polyphénols ..... 96
a. Prilling ..... 96
b. Atomisation ..... 98
c. Lyophilisation ..... 98
d. Emulsion ..... 99
**CHAPITRE II** ..... 103
**Séparation de la peau d'amande et extraction des polyphénols à l'aide de la technique d'ultrasons** ..... 103
I- Introduction ..... 104
II- Matériels et méthodes ..... 105
1- Polyphénols de la peau d'amande ..... 105
a. Extraction assistée par ultrasons (UAE) ..... 105
c. Cinétique d'extraction ..... 109
d. Polyphénols totaux ..... 109
e. Sonication localisée – observation sous MEB ..... 109
f. Analyse par UPLC-MS ..... 110
i. Teneur en polyphénols ..... 112

ii. Teneur en procyanidines ... 112
2- Huile d'amande ... 113
a. Extraction de l'huile ... 113
b. Préparation d'esters méthyliques d'acides gras (FAME) - Trans estérification ... 113
c. Analyse par GC–FID ... 114
3- Protéines de l'amande ... 114
a. Extraction de protéines ... 114
b. Electrophorèse ... 114
c. Indice de dispersibilité des protéines ... 116
4- Modélisation ... 116
III- Résultats et discussion ... 118
1- Polyphenols ... 118
a. Plan experimental ... 118
b. Cinétique ... 121
c. Effet des ultrasons sur la structure des peaux d'amande ... 122
d. Analyse du contenu phénolique des peaux d'amandes ... 125
2- Effet des ultrasons sur l'huile d'amande ... 130
3- Effet des ultrasons sur les protéines d'amande ... 131
4- Modélisation de la diffusion et simulation numérique pour l'extraction des polyphénols ... 133
IV- Conclusion ... 135
**CHAPITRE III** ... 138
**Concentration d'un système dilué – cas de l'eau de blanchiment des amandes : adsorption sur résine, analyse et applications** ... 138
I- Introduction ... 139
**II- Matériels et méthodes** ... 140
1- Blanchiment des amandes ... 140
2- Préparation de la résine ... 140
3- Etapes d'adsorption/désorption ... 141
4- Activité antioxydante ... 142
5- Chromatographie liquide à haute performance ... 143
6- Activité antimicrobienne ... 145
7- Applications ... 145
a- Prilling ... 145

b- Atomisation ..... 148
III- Résultats et discussion ..... 149
1- Adsorption / désorption sur résine ..... 149
2- Identification des composés phénoliques de l'extrait ..... 152
3- Activité antioxydante ..... 156
4- Activité antibactérienne ..... 157
5- Applications ..... 157
a- Encapsulation / prilling ..... 158
b- Atomisation ..... 160
IV- Conclusion ..... 161
**CHAPITRE IV** ..... 164
**Activité antibactérienne de l'extrait de peau d'amande** ..... 164
I- Introduction ..... 165
II- Matériels et méthodes ..... 166
1- Milieux de culture ..... 166
2- Agents utilisés ..... 166
3- Souches bactériennes ..... 167
4- Préparation de l'inoculum ..... 167
5- Détermination des CMI des composés ..... 167
6- Tests d'association de l'extrait avec des composés majoritaires et l'antibiotique ..... 169
III- Résultats et discussion ..... 172
1- Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) ..... 172
2- Effet de l'association de l'extrait de la peau d'amande à l'un des composés majoritaires ou à l'antibiotique ..... 174
**a- Combinaison de l'extrait avec l'amoxicilline – acide clavulanique :** ..... 176
**b- Combinaison de l'extrait avec le thymol et l'eugénol** ..... 177
IV- Conclusion ..... 178
**Conclusion générale & Perspectives** ..... 180
**Références :** ..... **Erreur ! Signet non défini.**

# Liste des figures

**Figure 1.** Principes de la chimie verte ..... 24
**Figure 2.** Illustration graphique du chapitre II ..... 28
**Figure 3.** Illustration graphique du chapitre III ..... 29
**Figure 4.** Illustration graphique du chapitre IV ..... 29
**Figure 5.** Exemples de solvants verts ..... 36
**Figure 6.** Bioraffinerie de dechets pour la valorisation de produits a valeur ajoutee ..... 42
**Figure 7.** Principe d'intensification du processus d'extraction ..... 43
**Figure 8.** Analyse du cycle de vie (ACV) de l'extraction de produits naturels ..... 46
**Figure 9.** Exemples de labels avec des valeurs biologiques/naturelles ..... 46
**Figure 10**. Mecanismes d'extraction dans le MAE des produits naturels ..... 49
**Figure 11.** Extraction par solvant assistee par micro-ondes ..... 50
**Figure 12.** Hydrodistillation par micro-ondes sans solvant (SFME) (A) et hydrodiffusion par micro-ondes et gravite (MHG) (B) ..... 52
**Figure 13.** Procede d'extraction par ultrasons a l'echelle industrielle (2 × 500 L) comme technique d'intensification de l'extraction a partir d'huiles vegetales (Reus—www.etsreus.com) ..... 57
**Figure 14.** Gammes de frequences ..... 58
**Figure 15.** Extraction assistee par ultrasons - mecanisme ..... 59
**Figure 16.** Types d'appareils UAE. (A) Sonde a ultrasons ; (B) Bain a ultrasons ; (C) Reacteur a ultrasons ..... 61
**Figure 17.** Diagramme de phase de l'eau (Alkhateeb, 2015) ..... 64
**Figure 18.** Mecanisme d'extraction des composes actifs d'une matrice naturelle en utilisant l'eau subcritique comme solvant ..... 65
**Figure 19.** Representation schematique d'une unite d'extraction d'eau subcritique ; exemple d'une installation par lots a l'echelle du laboratoire ..... 67
**Figure 20.** Diagramme de phases du $CO_2$ (Pironon et al., 2007) ..... 70
**Figure 21.** Schema de principe du systeme SC-CO2 ..... 72
**Figure 22.** Role du scCO2 comme solvant dans les techniques de formation de particules (Chemat and Vorobiev, 2019) ..... 72
**Figure 23.** Amandes en fleur et amandes mures (Mascleef, 1890) ..... 78

**FIGURE 24.** COMPOSITION DE L'AMANDE ..... 81
**FIGURE 25.** CARTE MONDIALE DE LA PRODUCTION D'AMANDES EN TONNES (FAOSTAT-2019) ..... 85
**FIGURE 26.** ACIDES HYDROXYBENZOÏQUES ET DERIVES ..... 86
**FIGURE 27.** ACIDES HYDROXYCINNAMIQUES ET DERIVES ..... 87
**FIGURE 28.** CLASSES, SOUS-CLASSES ET PRINCIPALES SOURCES NATURELLES DE FLAVONOÏDES ..... 88
**FIGURE 29.** TYROSOL (A) ET HYDROXYTYROSOL (B) ..... 90
**FIGURE 30.** (A) TANIN HYDROLYSABLE. GA : ACIDE GALLIQUE. (B) TANIN CONDENSE (PROCYANIDINE) (LAMY ET AL., 2011) ..... 92
**FIGURE 31.** (1) & (2) MODE D'ACTION DES ANTIOXYDANTS PAR TRANSFERT D'HYDROGENE. (3) STABILISATION DU RADICAL PHENOLIQUE PAR MESOMERIE (CHEYNIER ET AL., 2006; DUCHENE-MASSIAS, 2015) ..... 93
**FIGURE 32.** MODE D'ACTION DES ANTIOXYDANTS PAR TRANSFERT D'ELECTRON (DUCHENE-MASSIAS, 2015) ..... 93
**FIGURE 33.** SCHEMA GENERAL DE BIODISPONIBILITE DES POLYPHENOLS (MANACH ET AL., 2006; ACHAT, 2013) ..... 94
**FIGURE 34.** DIFFERENTS SITES D'ACTION DES POLYPHENOLS ANTIMICROBIENS AU NIVEAU CELLULAIRE (BOUARAB CHIBANE ET AL., 2019) ..... 95
**FIGURE 35.** PROCEDE DE PRODUCTION DE CAPSULES. UNE CAPSULE EST FORMEE PAR CO-EXTRUSION DE LA SOLUTION DU NOYAU (EAU OU HUILE) ET DE LA SOLUTION D'ALGINATE. LORSQU'ON LE LAISSE TOMBER DANS UN BAIN DE CALCIUM, L'ALGINATE SE GELIFIE INSTANTANEMENT POUR FORMER UNE CAPSULE (DOMEJEAN, 2014; ROLLAND, 2013) ..... 97
**FIGURE 36.** APPAREIL A ULTRASONS DE LABORATOIRE UTILISE POUR L'EXTRACTION ASSISTEE PAR ULTRASONS ..... 106
**FIGURE 37.** REPRESENTATION GRAPHIQUE DES POINTS EXPERIMENTAUX DU PLAN COMPOSITE CENTRE ..... 108
**FIGURE 38.** PROCEDURE EXPERIMENTALE : SONICATION LOCALISEE ET ETUDE DES MODIFICATIONS STRUCTURELLES ..... 110
**FIGURE 39**. UPLC-MS ..... 111
**FIGURE 40.** DEPOLYMERISATION DES TANINS CONDENSES PAR PHLOROGLUCINOLYSE (ARAPITSAS ET AL., 2021) ..... 112

**FIGURE 41.** ÉTAPES D'ELECTROPHORESE. (A) DIALYSE ; (B) ELECTROPHORESE ; (C) FIXATION DES BANDES ..... 115
**FIGURE 42.** SURFACE DE REPONSE - OPTIMISATION MULTI-REPONSE DES DEUX VARIABLES TPC ET SST ..... 120
**FIGURE 43.** (I) GRAPHIQUE PARETO POUR TPC ; (II) GRAPHIQUE PARETO POUR LE TEMPS D'EMONDAGE ..... 120
**FIGURE 44.** CINETIQUE DU TPC (EXPRIME EN EQ MG NARINGENINE/G AMANDES) AVEC ET SANS ULTRASONS. LES EXPERIENCES ONT ETE REALISEES EN TRIPLICATA. US (JAUNE) VERSUS SANS US (ORANGE) ..... 121
**FIGURE 45.** OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB) DE LA PEAU D'AMANDE AVANT (A-C) ET APRES (D-F) SONICATION LOCALISEE. (A, D) : 100X ; (B, E) : 500X ; (C, F) : 2000X ..... 123
**FIGURE 46.** EFFETS PRIMAIRES (A, B), EFFETS SECONDAIRES (C) ET EROSION (D) APRES 20 MIN DE SONICATION A 3 MM DE DISTANCE DE LA SONDE ULTRASONIQUE. (A, B) : 40 000× ; (C) : 10 000× ; (D) : 600×. ..... 124
**FIGURE 47.** EFFET DES ULTRASONS SUR LA PEAU D'AMANDE. (A*) :* 75X ; (B, C) 200X ..... 125
**FIGURE 48.** CHROMATOGRAMME UPLC DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES PEAUX D'AMANDES ..... 125
**FIGURE 49.** CHROMATOGRAMMES UPLC DES COMPOSES RESULTANT DE LA PHLOROGLUCINOLYSE DES EXTRAITS UA, NUA, BA ET NA. A : PHLOROGLUCINOL-CATECHINE + PHLOROGLUCINOL-EPICATECHINE ; B : CATECHINE ; C : EPICATECHINE ..... 127
**FIGURE 50.** STRUCTURES DES PRINCIPAUX POLYPHENOLS DE LA PEAU D'AMANDE. LES SUCRES CONJUGUES AUX FORMES AGLYCONES PEUVENT ETRE DU GLUCOSE, DU GALACTOSE OU DU RUTINOSE, UN DISACCHARIDE COMPOSE DE RHAMNOSE (6-DEOXY-L-MANNOSE) ET DE GLUCOSE. ..... 130
**FIGURE 51.** COMPARAISON ENTRE LES PROFILS PROTEIQUES EN SDS-PAGE DE NA, BA ET UA DANS DES CONDITIONS REDUCTRICES ET DANS DES CONDITIONS REDUCTRICES. ..... 133
**FIGURE 52.** CINETIQUE D'EXTRACTION EXPERIMENTALE PAR RAPPORT A LA CINETIQUE D'EXTRACTION PREDITE DES COMPOSES PHENOLIQUES DES AMANDES. ● : SONICATION ; ●:NON-SONICATION. LA LIGNE CONTINUE DENOTE AU MODELE DIFFUSIONNEL. ..... 134
**FIGURE 53.** DISTRIBUTION DES SUBSTANCES PHENOLIQUES DANS LA PEAU DES AMANDES PENDANT L'EXTRACTION ..... 135
**FIGURE 54.** APPAREILLAGE D'ADSORPTION ..... 141

**FIGURE 55.** REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ENCAPSULATEUR B-395 PRO– PRODUCTION DE BILLES (WWW.BUCHI.COM/FR) ..... 146
**FIGURE 56.** REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ENCAPSULATEUR B-395 PRO – PRODUCTION DE CAPSULES (WWW.BUCHI.COM/FR) ..... 147
**FIGURE 57.** PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE L'AIR DE SECHAGE DANS L'ATOMISEUR B-290 (WWW.BUCHI.COM/FR) ..... 148
**FIGURE 58.** AGITATEUR - ADSORPTION SUR RESINE (ESSAI 1) ..... 149
**FIGURE 59.** FRACTIONS RECUPEREES APRES DESORPTION ..... 150
**FIGURE 60.** MASSES EXTRAITES APRES ADSORPTION DE 1 L, 2 L, 3 L ET 4 L D'EAU DE BLANCHIMENT, EXPRIMEES EN G ..... 151
**FIGURE 62.** CHROMATOGRAMME UPLC DES COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES PEAUX D'AMANDES ..... 152
**FIGURE 63.** FERMETURE DU NOYAU CHALCONE (SISA ET AL., 2010) ..... 156
**FIGURE 64.** OBSERVATION A LA LOUPE BINOCULAIRE. A . UNE PERLE D'ALGINATE UNIQUE (SOMBRE) ET DEUX CAPSULES A NOYAU AQUEUX DE TAILLES DIFFERENTES (450-900 µM ET 300-500 µM) COMPAREES AU CENTRE (DISQUE NOIR) DE TAILLE 1,5 MM. LE DIAMETRE DES CAPSULES EST D'ENVIRON 2 MM, 1,84 MM ET 1,45 MM, RESPECTIVEMENT. B. CAPSULES DE NOYAU D'HUILE OBTENUES AVEC DES BUSES DE 450-600µM. LES TAILLES SONT D'ENVIRON 1,45 ± 0,21 MM ..... 158
**FIGURE 65.** PRILLING ..... 160
**FIGURE 66.** ATOMISATION ..... 161
**FIGURE 67.** STRUCTURES CHIMIQUES DES COMPOSES A TESTER ..... 167
**FIGURE 68.** MODELE DE MICROPLAQUE POUR LA DETERMINATION DES CMI ..... 169
**FIGURE 69.** DIFFERENCES ENTRE LES BARRIERES DE PERMEABILITE DES GRAM-POSITIFS ET DES GRAM-NEGATIFS. **A** = TRANSPORTEURS ACTIFS ; **B** = POMPES D'EFFLUX DE LA MEMBRANE UNIQUE ; **C** = PORE DE DIFFUSION DE LA MEMBRANE EXTERNE ; **D** = PORINE GENERALE DE LA MEMBRANE EXTERNE ; **E** = POMPE D'EFFLUX (SINGH ET AL., 2017) ..... 173

# Liste des tableaux

**Tableau 1.** Extraction Assistee par Microondes ..... 56
**Tableau 2.** Extraction assistee par ultrasons ..... 63
**Tableau 3.** Extraction a l'eau sub-critique ..... 68
**Tableau 4.** Extraction par fluide supercritique ..... 74
**Tableau 5.** Comparaison des techniques de preparation des echantillons ..... 76
**Tableau 6.** Taxonomie de l'amandier ..... 79
**Tableau 7.** Comparaison des nutriments des fruits a coque (FoodData Central, 2019) ..... 82
**Tableau 8.** Production d'amandes par les 7 premiers pays producteurs d'amandes. Les donnees sont exprimees en tonnes par an. ..... 85
**Tableau 9.** Quelques techniques d'encapsulation (Fang and Bhandari, 2010; Benoit et al., 2013) ..... 101
**Tableau 10.** Variables du plan composite centre ..... 108
**Tableau 11.** Plan composite centre (CCD) et reponses obtenues pour la teneur totale en polyphenols (TPC) et le temps de separation de la peau (SST) ..... 119
***Tableau 12.*** *Valeurs P pour les effets (A : temperature ; B : intensite des ultrasons)* 119
**Tableau 13.** Composes phenoliques identifies par UPLC-DAD/ESI-MSn dans des extraits de peau d'amande ..... 126
**Tableau 14.** Teneur en composes phenoliques dans les extraits NS, NUA, UA et BA (µg/100 g d'amande) ..... 128
**Tableau 15.** Analyse GC et rendements en huile de NA, BA et UA - Extraction Soxhlet ..... 130
**Tableau 16.** Teneur en proteines (%) et indice de dispersibilite des proteines pour NA, BA et UA (Van Eys et al., 2004) ..... 132
**Tableau 17.** Valeur De des composes phenoliques pendant l'extraction et adequation du modele de diffusion ..... 134
**Tableau 18.** Concentration des extraits dans quatre volumes de eau de blanchiment (1-4 L) avant l'adsorption exprimee en g/L de BW et apres adsorption exprimee en g/L d'acetone. ..... 151
**Tableau 19.** Composes phenoliques identifies par UPLC-DAD/ESI-MSn dans des extraits de peau d'amande ..... 154

**TABLEAU 20.** TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES DANS LES ROE ET FDE (MG/KG D'AMANDE) ..... 155
**TABLEAU 21.** PARAMETRES DE FONCTIONNEMENT DE L'ATOMISEUR ET MASSE DE L'EXTRAIT RECUPERE ..... 160
**TABLEAU 22.** CONCENTRATIONS FINALES DES COMPOSES DANS LES PUITS ..... 168
**TABLEAU 23.** MODELE DE MICROPLAQUE DE COMBINAISON DE L'EXTRAIT AVEC L'UN DES COMPOSES MAJORITAIRES / AMC ..... 171
**TABLEAU 24.** VALEURS DES CMI OBTENUES PAR LA METHODE DE MICRO-DILUTION ..... 172
**TABLEAU 25.** EFFET DE L'ASSOCIATION DE L'EXTRAIT AVEC L'AMC ..... 175
**TABLEAU 26.** EFFET DE L'ASSOCIATION DE L'EXTRAIT AVEC LE THYMOL ..... 175
**TABLEAU 27.** EFFET DE L'ASSOCIATION DE L'EXTRAIT AVEC L'EUGENOL ..... 176

# *Introduction générale*

## Etat de l'art

L'industrie agroalimentaire est l'une des industries prometteuses qui s'implique dans l'économie mondiale et pour la durabilité environnementale (Qureshi et al., 2019). Elle fait partie des différents domaines concernés par la chimie verte (figure 1), particulièrement pertinente pour les processus de conservation, de transformation, de bioraffinage et d'extraction (Putnik et al., 2018).

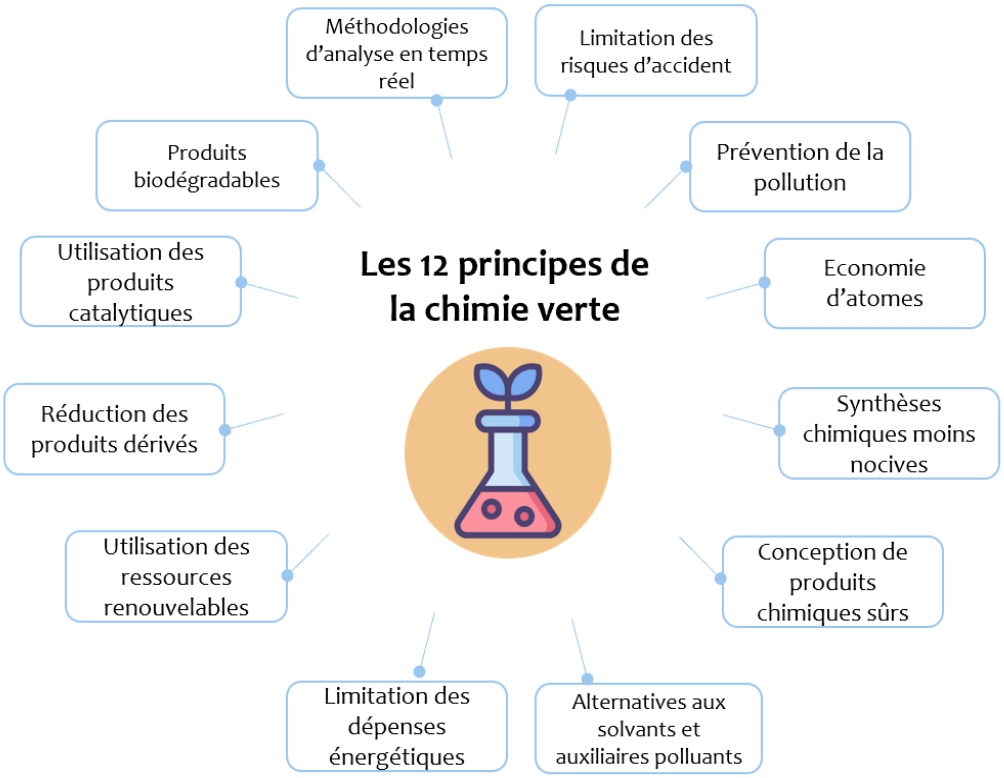



**Figure 1.** Principes de la chimie verte

La transformation des aliments représente un nouveau concept permettant de relever les défis du 21$^{e}$ siècle (Chemat et al., 2017a), de protéger à la fois l'environnement et les consommateurs et de renforcer simultanément la concurrence entre les industries pour qu'elles soient plus écologiques, économiques et innovantes. L'un des aspects du développement de la science alimentaire consiste à tester et à adapter des technologies avancées pour la production alimentaire qui permettent d'économiser les ressources et d'améliorer la qualité des aliments (Barba et al., 2019).

Les enjeux politiques, économiques, sociétaux et environnementaux exigent désormais des innovations technologiques durables, « vertes et innovantes » dans le traitement, la

pasteurisation et l'extraction. Contrairement aux techniques conventionnelles, les nouvelles techniques sont mieux adaptées aux défis de la chimie verte, en raison de leur implication dans la réduction du temps de traitement, de la diminution de la consommation de solvants et d'énergie avec des procédés en continu.

En plus de son impact sur les produits primaires tels que les fruits et les légumes (Putnik et al., 2017), le sucre, les produits laitiers (Moreno et al., 2020; Musina et al., 2017) et les viandes (Domínguez et al., 2018), l'intérêt du domaine de la transformation des aliments s'élargit pour inclure la valorisation des déchets et des coproduits de l'industrie agroalimentaire, afin d'obtenir des composés à haute valeur ajoutée tels que les fibres (Clementz et al., 2019), les arômes (Castro-Muñoz et al., 2021), les pigments, les antioxydants (Borrajo et al., 2019), ou encore les vitamines et les minéraux (Khattak and Rahman, 2017). Ces composés peuvent ensuite être utilisés comme additifs alimentaires potentiels et/ou nutraceutiques, notamment.

Ainsi, depuis plusieurs décennies, l'utilisation des coproduits s'est graduellement accrue pour des raisons économiques et environnementales tout en assurant le respect des normes réglementaires et sanitaires (Shi et al., 2021; van Zanten et al., 2014).

## 1- Axe de recherche de la thèse

L'amande est le fruit à coque le plus produit dans le monde ces dernières années. *Prunus dulcis* appartient à la famille des Rosaceae et se caractérise par sa culture dans des zones arides aux conditions sèches, ce qui motive la mise en place de pratiques d'irrigation durables ainsi qu'une bonne sensibilisation pour assurer une production élevée et, en même temps, réaliser un développement efficace (Prgomet et al., 2019). Elles constituent des denrées alimentaires nutritives à forte teneur en lipides qui fournissent un large éventail de composés bioactifs bénéfiques pour la santé. Elles sont reconnues en gastronomie pour leur saveur distinguée, et leur consommation est recommandée par les nutritionnistes et les médecins pour leur apport en antioxydants, en molécules bioactives et en nutriments (Alasalvar et al., 2020; Barral-Martinez et al., 2021).

Au Maroc, la culture des amandes est l'espèce fruitière qui occupe le plus de superficie après la culture des oliviers. Selon les données de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) en 2019, cette superficie a atteint plus de 186 250

Ha en 2018 pour atteindre une production de 120 075 tonnes en 2019. Il existe deux types de plantations (Agrimaroc, 2020):

- Les vergers traditionnels localisés essentiellement en montagne ;
- Les plantations semi-intensives et modernes situées dans les provinces de Fès, Meknès, Béni-Mellal, Azilal, Marrakech, Safi et Essaouira.

Le Maroc demeure un faible exportateur de l'amande, puisque sa production est destinée à la consommation intérieure.

Aujourd'hui, la France occupe la 5ème place au niveau mondial. L'essentiel de cette production provient de la Provence, le Languedoc-Roussillon et la Corse qui assurent 80 % de la production d'amandes en France. Cette production ne représente que 4 % de la consommation française qui atteint jusqu'à 25 à 30 000 tonnes par an (Planetoscope, 2016). La France reste loin des États-Unis qui culminent à 80 %. L'exemple du succès des plantations californiennes peut être pris pour reproduire leurs critères de productivité. En effet, les plantations d'amandes californiennes et leurs méthodes de culture sont une tendance qui se reproduit en France.

Ces dernières années, de nombreuses plantations irriguées ont été installées avec un plan de plantation intensif ou super intensif qui offrent une productivité très intéressante. Néanmoins, la plantation d'amandiers est parfaitement adaptée au manque d'eau et reste une possibilité valable sur des terrains non irrigués.

L'amande est la partie comestible, tandis que le mésocarpe et l'endocarpe ne peuvent être consommés qu'au début de sa maturation. Les principales parties structurelles de l'amande incluent une enveloppe extérieure verdâtre appelée la brou (52,7 % du fruit), une coque intermédiaire (32,8 % du fruit) , une peau brune et enfin la graine comestible, appelée amande, chair ou noix (14,5 % du fruit) (Monagas et al., 2007).

Le processus industriel de traitement des amandes pour la consommation implique l'élimination des parties externes du fruit de l'amande dans un processus séquentiel, obtenant ainsi la chair de l'amande suivie de différents processus : le grillage, dans lequel la peau de l'amande est détachée mais pas éliminée, et le blanchiment, dans lequel les amandes pelées sont générées, jetant ainsi la peau et générant un autre sous-produit connu sous le nom d'eau de blanchiment (Bartolomé et al., 2010; Mandalari et al., 2010b). Dans

ces processus, différentes formes d'équipement sont utilisées pour séparer la chair de la partie extérieure de l'amande, notamment des machines à décortiquer et à émonder. Ce type de machines se trouve généralement dans des installations proches des zones de récolte, ce qui réduit l'impact environnemental du transport du produit. Lors du traitement final, les amandes sont emballées et stockées en vue de leur distribution.

Le blanchiment des amandes induit une perte importante des polyphénols contenus dans la peau d'amande (70 – 100 % du contenu phénolique total de l'amande). Par conséquent, l'eau de blanchiment figure parmi les coproduits de l'amande qui soulèvent un problème de gestion des résidus, et peut être potentiellement convertie en produits ou ingrédients revalorisés afin d'assurer leur réduction, ce qui minimiserait également leur impact environnemental (Mandalari et al., 2010b). Une étude plus approfondie de la composition phytochimique et physicochimique de ce fruit et de ses sous-produits peut permettre la récupération d'ingrédients naturels et fonctionnels avec une application potentielle dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires pour le développement de produits innovants et durables à valeur ajoutée (Barral-Martinez et al., 2021).

L'objectif de ce travail est de focaliser l'effort de recherche sur la valorisation de l'eau de blanchiment des amandes en tant que coproduit riche en composés phénoliques. Dans un premier temps, nous avons décidé de nous intéresser à la technique d'extraction par ultrasons utilisée pour émonder et intensifier l'extraction des polyphénols. Cette technique basée sur la conception de procédés d'éco-extraction qui réduisent la consommation d'énergie, utilisent des solvants alternatifs et des ressources végétales renouvelables, tout en garantissant un produit/extrait sûr et de haute qualité. La deuxième partie de ce travail est focalisée sur une méthode pour concentrer en polyphénols l'eau de blanchiment qui correspond à un « système dilué » en polyphénols par adsorption / désorption sur résine. Enfin, la troisième partie de ce mémoire se consacre à l'étude microbiologique de l'extrait obtenu.

## 2- Plan d'étude de la thèse

Le présent manuscrit est décliné en quatre chapitres.

Le 1$^{er}$ chapitre est une étude bibliographique sur l'extraction verte. Après avoir détaillé ses six principes, il s'articulera autour de quatre procédés d'éco-extraction :

- L’extraction assistée par microondes
- L’extraction assistée par ultrasons
- L’extraction par eau subcritique
- L’extraction par fluides supercritiques

Pour chaque item, le principe, l’instrumentation et des exemples d’application dans l’analyse des aliments seront dressés. Ensuite, une deuxième partie sera consacrée à l’amande. Une dernière partie décrira les différentes classes de composés phénoliques avec leurs activités microbiologiques et antioxydantes.

Le chapitre II proposera l’utilisation des ultrasons pour l’émondage et pour l’extraction du contenu phénolique des peaux d’amande en une seule étape. Un plan d’expériences permettra de définir les paramètres d’extraction (intensité ultrasonore et température) optimaux pour maximiser le rendement de composés phénoliques. Les effets des ultrasons sur la structure des peaux, les profils lipidiques et protéiques seront ensuite étudiés. Enfin, une analyse qualitative et quantitative des extraits sera présentée ainsi qu’une modélisation de la diffusion et la simulation numérique pour l'extraction des polyphénols (figure 2).

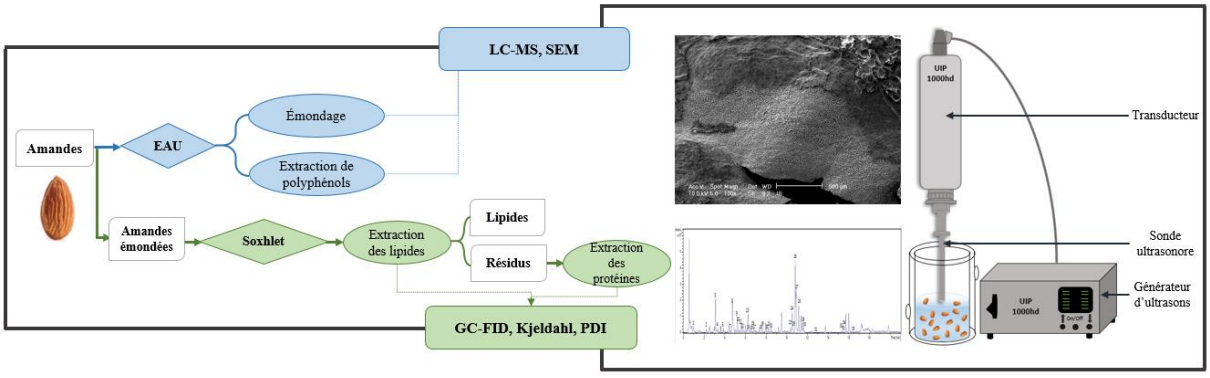



**Figure 2.** Illustration graphique du chapitre II

Le chapitre III sera consacré à la description de la valorisation de l'eau de blanchiment en tant que système dilué en composés phénoliques. Les extraits résultants seront évalués pour déterminer leurs activités antioxydante et antibactérienne contre deux souches de bactéries à Gram + et Gram -, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. En outre, une analyse du contenu phénolique de l'extrait a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur de masse (UPLC-MS). Des applications d'encapsulation seront ainsi proposées pour la protection et la stabilisation des composés phénoliques (figure 3).

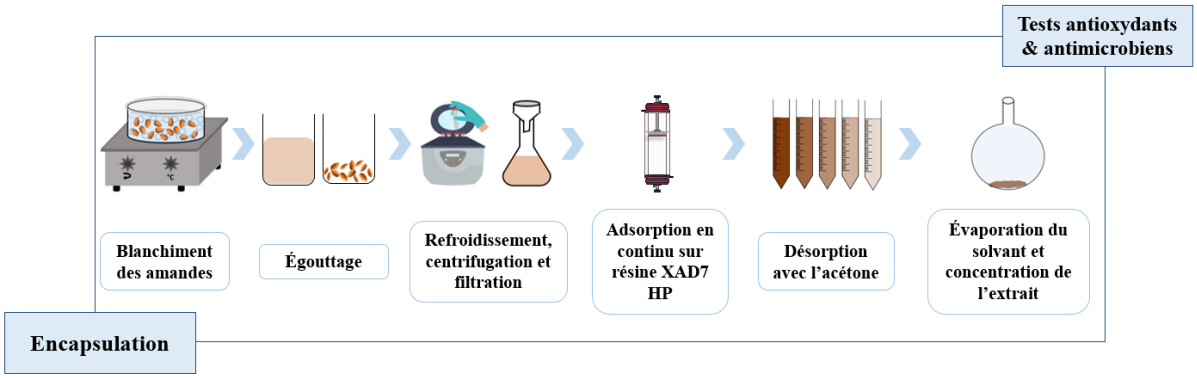



**Figure 3.** Illustration graphique du chapitre III

Le chapitre IV présentera enfin l'ensemble des tests microbiologiques *in vitro* effectués sur l'extrait seul ou en association avec l'amoxicilline + l'acide clavulanique comme exemple d'antibiotique, en plus de quatre composés majoritaires d'huiles essentielles : le thymol, l'eugénol, le carvacrol et le cinéol (figure 4).

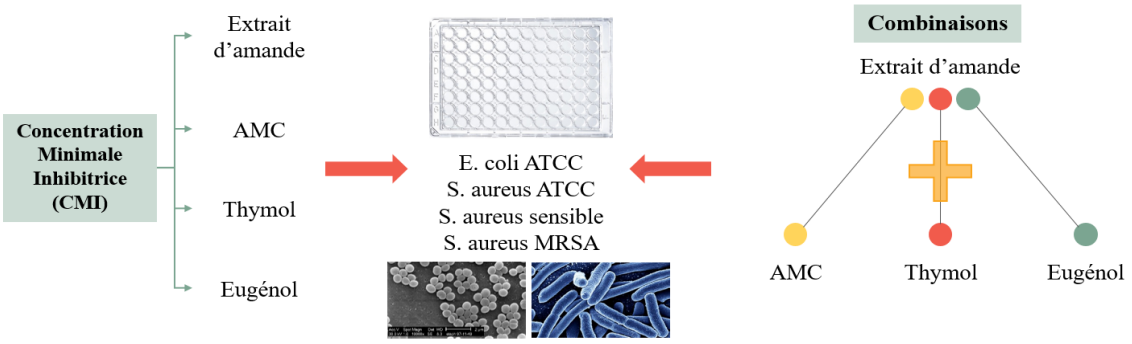



**Figure 4.** Illustration graphique du chapitre IV

Les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité seront exposées.

# *CHAPITRE I*
# *Synthèse bibliographique*

**Green Extraction Techniques.**

M. Tabib, N. Rakotomanomana, A. Remmal, F. Chemat. 2022. Bentham books, ISBN

# I- Techniques d'extraction verte

## 1- Introduction

Le développement durable est l'un des termes les plus couramment utilisés dans les débats actuels. Il est considéré comme un développement qui satisfait les exigences du présent sans compromettre la capacité et les aspirations des générations futures à répondre à leurs propres besoins. Cette demande touche tous les domaines de la société, y compris celui de la chimie. Dès lors, il convient de réfléchir à la manière dont la chimie peut contribuer à une plus grande durabilité de notre société en garantissant sa pérennité, aujourd'hui et dans l'avenir.

L'une des contributions de la chimie pour relever le défi d'une plus grande durabilité dans le développement de notre société est de promouvoir une action durable dans la recherche et la production industrielle. Sous le nom de chimie verte (ou chimie durable en Europe), de nombreux efforts ont été déployés pour rendre la chimie de demain moins toxique et moins dangereuse. La chimie verte vise ainsi à rendre la chimie plus économe en énergie, à réduire l'élimination des déchets et/ou à inventer des produits innovants en utilisant moins de ressources naturelles, surtout celles qui sont fossiles. Des procédés et des voies de réaction alternatifs sont conçus, de nouveaux matériaux et produits sont développés pour contribuer à assurer nos besoins actuels, tout en tenant davantage compte des intérêts des générations futures.

L'extraction est considérée comme une étape clé de la transformation des aliments. Elle consiste à séparer les composés souhaités de la matière première et à transférer ces composés dans un solvant. Elle comprend plusieurs méthodes, telles que l'extraction par solvant, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction par Soxhlet, l'extraction par fluide supercritique et l'extraction par eau subcritique. Dans l'ensemble, l'extraction des produits naturels passe par les phases suivantes:

- Le solvant pénètre dans la matrice solide ;
- Le soluté se dissout dans les solvants ;
- Le soluté est diffusé hors de la matrice solide ;
- Les solutés extraits sont collectés.

L'efficacité de l'extraction est conditionnée par divers paramètres, notamment la taille des particules, le solvant d'extraction, le rapport solvant/matrice, la température et la durée de l'extraction.

Ces méthodes d'extraction permettent une séparation plus rapide et durable des composants, car elles utilisent moins de solvants toxiques (Tiwari, 2015) et d'énergie (Chemat et al., 2012). En outre, elles simplifient la manipulation et la préparation des échantillons, donnent une grande pureté et un rendement élevé de l'extrait final et éliminent le post-traitement des eaux usées (Chemat et al., 2020). De nombreuses classes de composés telles que les vitamines, les sucres, les protéines, les lipides, les fibres, les arômes, les pigments, les antioxydants et d'autres composés organiques et minéraux ont été extraits de diverses matrices, principalement à partir des insectes (Ravi et al., 2019a), des matières végétales (Esquivel-Hernández et al., 2017; Hilali et al., 2018; Li et al., 2014; Tabib et al., 2020), et des tissus animaux (Ivanovs and Blumberga, 2017).

Ce chapitre donne un aperçu des connaissances actuelles sur les méthodes innovantes de préparation d'échantillons de produits naturels. Il donne le cadre théorique fondamental et quelques détails sur l'extraction et ses six principes, en plus de l'extraction assistée par ultrasons comme exemple, en détaillant ses principes, ses instruments et ses applications dans l'analyse alimentaire.

## 2- Extraction verte : définition et principes

Malgré les opinions préjudiciables de certains dirigeants du monde d'aujourd'hui, la conscience environnementale mondiale continue de progresser. Des termes tels que « vert », « bioraffinerie » et « durabilité » sont de plus en plus importants dans toutes les facettes du développement mondial. Cette idée est étroitement associée aux principes de l'extraction verte, qui peut être définie comme un processus d'obtention d'un extrait en utilisant le moins possible de solvants dangereux/pétroliers, en réduisant la consommation d'énergie et les déchets et en garantissant des extraits sûrs et de haute qualité. Il s'agit d'un concept qui vise à relever les défis du 21$^{ème}$ siècle en protégeant l'environnement et les consommateurs, tout en augmentant la concurrence entre les universités et les industries pour être plus respectueuses de l'environnement, plus économiques et plus innovants (Chemat et al., 2012; Chemat et al., 2019; Herrero and Ibañez, 2018).

Selon (Chemat et al., 2012), la liste des « Six principes de l'extraction verte des produits naturels » peut être consultée par les industriels et les scientifiques comme une direction pour établir un label, une charte et un standard innovants et verts, et comme une réflexion pour innover non seulement dans le processus, mais dans tous les aspects de l'extraction solide-liquide. Les principes ont été identifiés et décrits non pas comme des règles, mais plutôt comme des exemples innovants à suivre, découverts par des scientifiques et appliqués avec succès par l'industrie.

## Principe 1 : Innovation par la sélection et utilisation de ressources végétales renouvelables

La demande croissante de produits et d'extraits naturels pour répondre aux besoins des industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques entraîne une surexploitation des ressources végétales. L'utilisation des sous-produits agricoles est devenue à la mode et fournit des revenus supplémentaires aux producteurs primaires et aux industries et améliore la chaîne de valeur agricole globale. Aujourd'hui, la tendance est à l'augmentation de la valeur ajoutée des sous-produits botaniques, depuis les engrais organiques et les granulés de matières premières jusqu'aux ingrédients fonctionnels (Chemat et al., 2018; Chemat et al., 2019; Chemat and Strube, 2015).

Les ressources végétales/culturales sont définies comme des matières premières issues de la flore naturelle et des processus de transformation de nombreuses industries (alimentation humaine, alimentation animale, fibres, etc.). L'hypothèse sous-jacente est que ces ressources sont renouvelables sur une courte période, grâce à l'utilisation de cultures annuelles, de plantes vivaces et d'espèces ligneuses à courte rotation. La réutilisation de ces ressources végétales comme matière première pour la production industrielle ou comme source d'énergie est assez limitée. Cela est dû à la faible adaptation avec le système de traitement des hydrocarbures qui, contrairement à ces matériaux, a été développé de manière plus avancée pour utiliser les combustibles fossiles.

Les ressources végétales renouvelables représentent une option stratégique pour répondre aux besoins croissants en composants industriels, permettant des avantages économiques, environnementaux et sociétaux. L'opportunité est clairement avantageuse. Néanmoins, elle nécessite une perspective prospective, l'intégration des parties prenantes,

l'investissement dans de nouvelles approches et la coordination de la recherche pour générer un avenir sûr garanti par la préservation de l'écosystème dans sa totale diversité.

On peut illustrer ce propos par la technique de sélection des plantes. Les plantes médicinales, par exemple, jouent un rôle important dans la prévention et le traitement. Comme l'indique l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), elles ont été adoptées par plus de 80 % de la population mondiale sur une base régulière, comme en Chine ou dans les pays du continent africain depuis plusieurs décennies (Wang et al., 2020). La relation entre les médicaments et la durabilité des plantes médicinales est de plus en plus reconnue et fait l'objet d'une attention croissante dans les accords internationaux et les systèmes d'étiquetage commercial. Néanmoins, les entreprises traditionnelles ne se sont pas souciées des aspects du commerce équitable dans ce secteur (Bodeker et al., 2014).

La sélection variétale représente une alternative largement utilisée pour l'exploitation intensive de ces plantes (Reynolds, 2015). Cette technique vise à sélectionner de nouvelles variétés présentant des ensembles de caractères transmis génétiquement et bien adaptés aux objectifs des producteurs et des consommateurs. Dans ce cas, elle implique la transmission de molécules contenant des principes actifs. *Schizonepeta tenuifolia* par exemple est une plante chinoise cultivée pour ses vertus médicinales. Cette race s'est avérée avoir une production élevée, une résistance accrue aux maladies et des concentrations élevées de composés actifs (Cao et al., 2009; Wang et al., 2020).

La culture des plantes est une autre alternative pour la conservation de la biodiversité, car la demande en plantes médicinales est en constante augmentation (Wiersum et al., 2006). Une étude a été menée sur le prunier d'Afrique (*Prunus africana* (Hook.f.) Kalkman), une plante d'Afrique sub-saharienne, principalement utilisée depuis des générations pour son effet anticancer de la prostate (Bodeker et al., 2014; Komakech et al., 2017). Elle est écorcée des racines aux branches, ce qui entraîne sa mort. Dans ce contexte, de nouveaux programmes sont mis en place pour régénérer cette plante et encourager sa culture afin de mettre fin à son exploitation excessive.

## Principe 2 : Utilisation de solvants alternatifs (eau et agro-solvants)

Depuis quelques années, les procédés d'extraction dépendent considérablement des solvants, dont la grande majorité est d'origine pétrolière, soupçonnés d'être dangereux pour la santé humaine et l'environnement. L'extraction par solvants est utilisée par les

industries depuis des siècles dans des domaines variés, allant de la synthèse chimique au traitement des déchets. Une grande partie de ces solvants étant des composés organiques volatils (COV), le risque d'incendie et d'explosion en est accru, ce qui entraîne en plus de ces risques, des impacts environnementaux favorisant le réchauffement de la planète. De même, la simple exposition à ces composés peut entraîner des problèmes de santé. L'un des solvants les plus utilisés dans l'extraction est le n-hexane, le plus efficace pour l'extraction du pétrole. Malgré ses nombreux avantages (élimination facile en raison de son faible point d'ébullition, rendement d'extraction plus élevé par rapport à d'autres solvants, faible énergie pour l'extraction), l'exposition à ce solvant peut provoquer des vertiges, des nausées et peut affecter fortement le système nerveux. De plus, il a été classé CMR 3 (substances cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques), ce qui implique qu'il est suspecté d'être reprotoxique selon les directives européennes et la réglementation REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals) (Chemat et al., 2019).

La sélection des solvants est basée sur les critères suivants : (i) la sécurité des travailleurs (dangerosité, cancérogénicité, mutagénicité), (ii) la sécurité opérationnelle (inflammabilité, explosivité, volatilité), (iii) la protection de l'environnement (persistance, contamination), (iiii) et la durabilité du processus (recyclage et réutilisation) (Cvjetko Bubalo et al., 2018). Ainsi, il est devenu obligatoire de les remplacer par des alternatives plus vertes malgré leurs nombreux avantages. L'intérêt des industries porte de plus en plus sur les solvants verts (Figure 5).

Il est clair que les avantages de l'utilisation de ces derniers sont nombreux. Il s'agit notamment de coûts et de temps d'extraction réduits, de risques moindres dus à la surpression, d'une *upscaling* facile et d'une pureté accrue de l'extrait. Parmi ces solvants, nous trouvons les bio-solvants qui sont définis comme étant des solvants produits à partir de sources de biomasse telles que les cultures énergétiques (par exemple, le maïs), les produits forestiers (e.g., le bois), la biomasse aquatique (comme les microalgues) et les déchets (exemple des déchets urbains).

L'eau, par exemple, est considérée comme le solvant le plus écologique car elle n'est pas toxique pour la santé et l'environnement. En outre, c'est le solvant le moins cher, le plus abondant et le plus ininflammable dans la nature. L'eau a l'avantage de faire varier ses

propriétés physico-chimiques en changeant la température. Ainsi, l'utilisation de l'eau subcritique, qui consiste à augmenter suffisamment la température et la pression de l'eau pour la maintenir à l'état liquide, s'est développée à un rythme exponentiel ces dernières années. La petite taille de l'eau (diamètre de la sphère 2,75 Å) contribue de manière substantielle à l'hydratation des solutés. Quant à la polarité, elle est due aux charges positives partielles des deux atomes d'hydrogène et à la charge négative partielle de l'atome d'oxygène. Cela implique son interaction avec des molécules polaires et non polaires, et donc l'extraction d'un large éventail de molécules, telles que les sucres, les protéines, les acides organiques et les substances inorganiques (Castro-Puyana, 2017).

L'éthanol est un autre bio-solvant courant. Il a été largement utilisé comme solvant viable au cours des dernières décennies, et est considéré comme un produit vert souhaitable pour l'environnement, car il est obtenu par la fermentation de sources renouvelables, y compris les sucres, les amidons et les matières lignocellulosiques. Son prix relativement bas (Tekin et al., 2018), son faible point d'ébullition et sa biodisponibilité pure font qu'il peut être utilisé comme solvant à grande échelle.

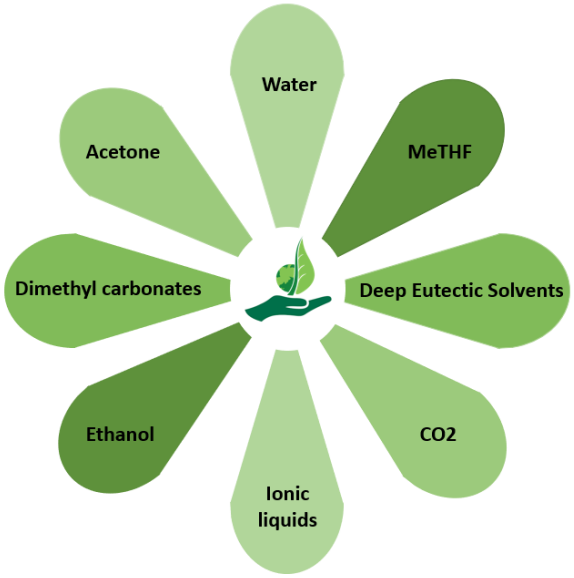



**Figure 5.** Exemples de solvants verts

Les solutions de rechange sans solvant suscitent un grand intérêt et ont été largement appliquées. Leurs avantages sont évidents : une réduction des prix et des volumes de solvant, mise à l'échelle facile, une réduction du temps d'extraction et des risques de surpression et d'explosion, et une plus grande pureté des extraits. Des techniques innovantes telles que l'hydrodiffusion et la gravité par micro-ondes (MHG), le champ

électrique pulsé (PEF) et la Détente Instantanée Contrôlée (DIC) ont été développées et utilisées de plus en plus au cours des dernières années pour l'extraction de divers produits (arômes, huiles, antioxydants, etc.) (Chemat et al., 2015, 2012; Chemat et al., 2019; Chemat and Strube, 2015).

### Principe 3 : Réduction de la consommation énergétique et utilisation de technologies innovantes

La consommation d'énergie est l'une des principales préoccupations des industries, quel que soit leur domaine d'activité, car les coûts peuvent représenter des dépenses importantes. Elle peut être liée à la quantité d'énergie que consomme un processus de production pour être accompli, comme le chauffage, le refroidissement, la transformation et l'assemblage, la vapeur et la cogénération, l'éclairage, le chauffage et le refroidissement des bâtiments. Selon le Dr Fatih Birol, directeur exécutif de l'AIE (Agence Internationale de l'Energie), « *le monde doit de toute urgence se concentrer comme un laser sur la réduction des émissions mondiales. Cela nécessite une grande coalition englobant les gouvernements, les investisseurs, les entreprises et tous ceux qui s'engagent à lutter contre le changement climatique* » (Birol, 2019).

Comme l'indique le World Energy Outlook 2019 (EA, 2019), la demande en énergie augmentera de 1% par an jusqu'en 2040. Les industries se concentrent de plus en plus sur les ressources à faible teneur en carbone, principalement le solaire photovoltaïque qui contribue à plus de la moitié de cette croissance, et le gaz naturel qui fournit un autre tiers. La demande de pétrole se stabilisera dans les années 2030, et l'utilisation du charbon diminuera. Bien que certains pays aspirent à un « bilan zéro » et s'efforcent de modifier leur consommation et leur approvisionnement en énergie, l'élan donné aux technologies énergétiques propres est insuffisant pour contrebalancer les effets de l'accroissement de la population et de l'économie. Le monde est donc loin d'atteindre les objectifs de durabilité escomptés. Le défi devient dans ce cas de prioriser et de généraliser la compréhension de l'utilisation des sources d'énergie afin d'en réduire la consommation d'énergie et de promouvoir le recyclage. Heureusement, la plupart des membres de l'industrie s'orientent vers une diminution de la consommation d'énergie par la récupération d'énergie et la réduction des opérations unitaires, en favorisant des processus

sûrs, robustes et contrôlés, notamment, l'augmentation des énergies dites douces ou vertes.

Le secteur industriel peut être classé en trois groupes :

(i) L'industrie manufacturière à forte intensité énergétique (alimentation, pâte à papier, produits chimiques de base, raffinage, fer et acier, métaux non ferreux, minéraux non métalliques) ;

(ii) L'industrie manufacturière non intensive en énergie. Elle concerne les autres produits chimiques divers tels que les détergents pharmaceutiques, la peinture, les revêtements et autres produits industriels, y compris les produits électroniques, de transport, les machines et les produits électriques;

(iii) L'industrie non manufacturière (agriculture, mines et construction).

26% des industries les plus énergivores appartiennent au secteur de la chimie et de la fabrication de plastiques et 16% au secteur de la transformation alimentaire. Le domaine de l'extraction des plantes peut être considéré comme faisant partie de ces deux catégories ; l'optimisation des processus d'extraction pour l'efficacité énergétique est au centre des préoccupations. En outre, plusieurs techniques d'extraction traditionnelles nécessitent beaucoup d'énergie, par exemple la distillation. Cela représente une opportunité unique d'optimiser la consommation d'énergie (EA, 2019; U.S. Energy Information Administration, 2016).

La chimie verte s'appuie de plus en plus sur des procédés « à faible consommation d'énergie» basés sur :

- L'extraction à température et pression ambiantes ;
- L'optimisation du temps d'extraction et de la consommation de solvant ;
- Le développement de processus innovants ;
- L'optimisation des ressources énergétiques et la promotion du recyclage.

Par exemple, les extractions assistées par ultrasons et micro-ondes ont été largement utilisées comme techniques innovantes pour améliorer les rendements d'extraction tout en optimisant la consommation d'énergie. Leur utilisation dans l'extraction des huiles essentielles, à la place de l'hydrodistillation, permet d'augmenter et d'intensifier le rendement d'extraction tout en diminuant le temps et l'énergie utilisés. L'Extraction

Assistée par Ultrasons (en anglais ; UAE) a été utilisée par Altemimi et al., (2016) pour optimiser l'extraction des composés phénoliques des pêches et des citrouilles. Elle a prouvé son efficacité en termes de rendement, de temps d'extraction et de consommation d'énergie par rapport à l'extraction conventionnelle.

Outre les techniques précédemment citées visant à réduire la consommation d'énergie, la récupération d'énergie représente une option intéressante et attrayante dans le domaine industriel. Comme l'indiquent Woolley et al., (2018) elle repose sur le principe selon lequel «*l'énergie n'est jamais réellement consommée, elle est seulement convertie d'une forme à une autre*» et il est donc possible de la capturer et de l'utiliser comme source d'énergie.

Dans l'ensemble, les technologies d'extraction citées précédemment sont efficaces sur le plan énergétique, car elles permettent d'obtenir des rendements élevés en un temps réduit. D'autres procédés innovants sont en développement continu pour répondre aux besoins de l'industrie en matière d'économie d'énergie tout, en maintenant une qualité constante des extraits (Chemat et al., 2012; Chemat et al., 2019).

### Principe 4 : Génération de coproduits au lieu de déchets

Le principe d'une bioraffinerie peut être comparé à celui d'une raffinerie de pétrole, où la biomasse est transformée en produits chimiques (par exemple, des carburants). La différence réside dans la nature de la matière première utilisée et dans la technologie employée. Parmi les nombreuses définitions de la bioraffinerie, la plus complète et exhaustive est la suivante : « *l'utilisation optimisée de la biomasse pour des matériaux, des produits chimiques, des carburants et des applications énergétiques, l'utilisation étant liée aux coûts, à l'économie, aux marchés, au rendement, à l'environnement, à l'impact, au bilan carbone et aux aspects sociaux* ». En d'autres termes, il faut optimiser l'utilisation des ressources, maximiser la rentabilité, maximiser les bénéfices et minimiser les déchets (Bridgwater, 2013).

Le concept de bioraffinerie a d'abord été dérivé de la raffinerie de pétrole, dans laquelle diverses technologies étaient utilisées pour fabriquer de multiples produits chimiques et carburants à partir du pétrole (Vernès et al., 2019). Comme l'indiquent Kamm et Kamm, (2004), la bioraffinerie peut être classée en trois phases :

- La phase I, où une bioraffinerie n'est pas adaptable et utilise un seul type de biomasse, un seul procédé et un seul produit spécifique. Un exemple de cette phase est l'usine d'éthanol par broyage à sec, où le maïs est broyé, saccharifié et fermenté pour donner de l'éthanol (Kwiatkowski et al., 2006) ;
- Dans la phase II, davantage de produits résultent du processus. Par exemple, le broyage par voie humide, également appelé broyage en milieu humide, est un procédé dans lequel les particules sont dispersées dans un liquide par cisaillement, impact ou écrasement, ou par attrition. Ce procédé est également utilisé pour le maïs, où il est mis au point pour séparer et purifier efficacement ses constituants (amidon, huile, protéines et fibres) afin de les utiliser comme ingrédients pour l'alimentation humaine et animale, comme produits industriels ou comme matières premières pour la transformation en d'autres produits à valeur ajoutée. D'autres produits finaux sont obtenus, tels que le sirop, l'éthanol et l'acide lactique (Rausch et al., 2019). Ce type ouvre de nombreuses possibilités pour relier des lignes de produits industriels à des unités de production agricole existantes, améliorant ainsi substantiellement la performance économique globale du processus de bioraffinage;
- La phase III est non seulement capable de produire une large gamme de produits à valeur ajoutée, mais aussi d'utiliser différents types de matières premières et de méthodes de traitement. Les industries s'orientent vers cette phase de bioraffinage, qui garantira un approvisionnement continu, et améliorera donc la possibilité de valoriser les déchets industriels. Cette phase se concentre sur la flexibilité des matières premières utilisées afin de pouvoir s'adapter aux changements de la demande et de l'offre de produits finaux.

Cinq dimensions doivent être prises en considération afin d'optimiser les critères d'une bioraffinerie :

- *La dimension économique* : créer une bioraffinerie autonome, sans réinvestissement pour augmenter la rentabilité. Des indicateurs tels que la maximisation du profit ou la valeur actuelle nette permettent d'évaluer cette dimension. Il est alors important d'inclure la diversification et la vente de sous-produits ;
- *La dimension sociale* : offrir plus d'opportunités de travail, augmenter la sécurité des produits à consommer et promouvoir des conditions de travail responsables ;

- *La dimension environnementale* : analyser les problèmes concernant la qualité de l'air, du sol, de l'eau et la gestion des déchets ;
- *La dimension technologique* : prendre en considération les nouvelles techniques utilisées ou en cours de développement, ainsi que les tendances technologiques dans l'utilisation et la production de produits biosourcés ;
- *La dimension politique* : soutenir par des initiatives de durabilité (cadres réglementaires, systèmes de certification, etc.). En général, il s'agit de promotions ou de restrictions adoptées par les gouvernements (Bautista et al., 2016; Pérez et al., 2017).

Le concept de bioraffinerie couvre un large éventail d'industries et peut utiliser une variété de biomasses provenant de la sylviculture, de l'agriculture, des résidus industriels ou des ménages, notamment des résidus organiques, du bois, des cultures agricoles, etc. (De Jong et Jungmeier, 2015). On s'attend à ce qu'il améliore la compétitivité et la richesse des pays en fournissant des produits biosourcés et de l'énergie de manière durable. De nombreuses industries, notamment celles de l'amidon, du sucre, du papier et de la pâte à papier, peuvent être considérées comme des bioraffineries (De Jong et Jungmeier, 2015). De nos jours, un nombre considérable de bioraffineries sont développées, car de nombreux projets de recherche dans ce domaine sont en cours (F. Chemat et al., 2019; Hingsamer and Jungmeier, 2019). Par exemple, les microalgues sont devenues une matière première très intéressante pour les carburants renouvelables. Cette industrie ne parvient pas à répondre aux besoins économiques des consommateurs et l'investissement en capital des opérations est excessif. Des coproduits intéressants résultent de l'extraction de fractions d'algues pour améliorer l'économie de la bioraffinerie, tels que des pigments, des lipides, des glucides, des vitamines, des antioxydants, des protéines qui peuvent être utilisés dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. L'installation d'une bioraffinerie de microalgues est donc envisageable pour récupérer ces produits à haute valeur ajoutée et assurer la durabilité du processus (Chew et al., 2017; Mohan et al., 2016) (Figure 6).

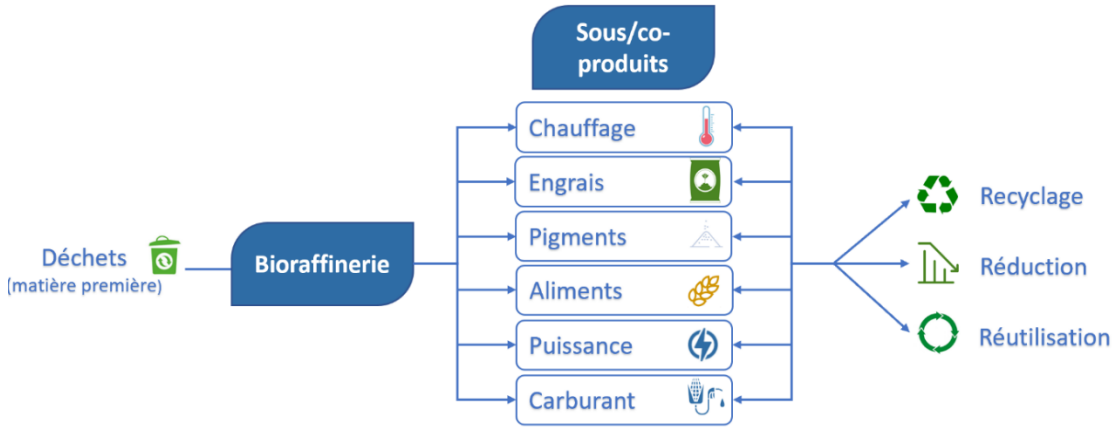



**Figure 6.** Bioraffinerie de déchets pour la valorisation de produits à valeur ajoutée

## Principe 5 : Réduction des opérations unitaires et favorisation de processus sûrs, robustes et contrôlés

Le défi pour les industries du 21ème siècle se concentre sur le développement de procédés efficaces en termes de rendements d'extraction, de propreté de l'environnement, d'optimisation de l'utilisation de l'espace et de sécurité des opérateurs. Les techniques d'extraction conventionnelles suivent généralement quatre étapes (Chemat et al., 2019):

- Prétraitement : nettoyage, séchage et broyage en poudre pour augmenter la surface de contact ;
- Première extraction solide-liquide avec solvant ;
- Deuxième extraction solide - liquide par centrifugation ou filtration ;
- Élimination du solvant pour obtenir l'extrait pur final.

Ces procédés sont généralement très longs et consomment beaucoup d'énergie. Ce problème peut être résolu par l'intensification, un processus qui aboutit à des techniques plus propres, plus sûres et plus efficaces sur le plan énergétique, tout en augmentant la qualité, la pureté et le rendement des produits en réduisant le temps, les déchets et la quantité de solvants utilisés, ce qui réduit l'empreinte environnementale (Baldea, 2014; Garg et al., 2018; Reay et al., 2013).

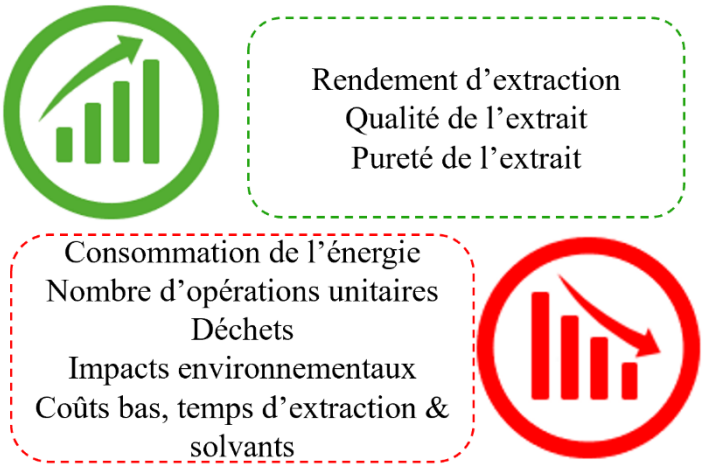



**Figure 7.** Principe d'intensification du processus d'extraction

L'intensification va de pair avec l'introduction de techniques plus écologiques et plus durables afin de progresser de manière substantielle par rapport aux autres méthodes d'extraction. Elle vise à remplacer les procédés longs, très consommateurs d'énergie (par exemple, vapeur, eau de refroidissement), par des procédés plus courts en réduisant le nombre d'opérations unitaires, malgré les multiples défis (économies d'énergie et de matières premières, maîtrise de la sécurité, réduction des déchets et de l'empreinte écologique, etc.) (Chemat et al., 2012; Chemat et al., 2019) (Figure 7).

L'extraction solide-liquide est une technique largement utilisée dans les procédés pharmaceutiques, chimiques et biotechnologiques de l'industrie pour la récupération des composés actifs des matières végétales. Les procédés tels que la distillation à la vapeur (Cassel et al., 2009) ou l'extraction par solvant (Belova et al., 2009) peuvent être très consommateurs d'énergie et prennent beaucoup de temps. Il devient donc nécessaire d'utiliser des techniques à haute performance (Shirsath et al., 2012). Par exemple, l'application des ultrasons a attiré davantage l'attention au cours des dernières années. Cette méthode est appliquée avec succès pour augmenter le rendement des composés extraits. Cela peut s'expliquer par le phénomène de cavitation, qui produit des effets physiques (turbulence du liquide et courants de circulation) entraînant un taux de transfert de masse important (Shirsath et al., 2012). Shirsath et al., (2017) ont appliqué l'extraction assistée par ultrasons pour obtenir la curcumine à partir de rhizomes de *Curcuma amada*. Un rendement intéressant de 72% a été récupéré en 1 heure à 35 °C, ce qui est supérieur

au traitement conventionnel où seulement 62% ont été récupérés après 8 heures d'extraction.

D'autres applications d'extraction sur des plantes ont été réalisées avec du dioxyde de carbone supercritique $CO_2$. Il s'agit d'une alternative intéressante qui permet d'éliminer totalement le $CO_2$ aqueux de l'extrait après avoir ramené sa pression au niveau atmosphérique, retrouvant ainsi l'état gazeux. Elle permet également d'obtenir des rendements élevés, des temps réduits, sans dégradation thermique et hydrolytique des composés labiles et sans résidus de solvants toxiques (Araus et al., 2009; Chemat et al., 2019). Cette technique d'extraction s'est avérée efficace pour l'extraction de composés bioactifs de *l'Hibiscus sabdariffa*, où elle s'est révélée sélective et adaptée aux acides organiques, aux phénols et autres composés polaires (Pimentel-Moral et al., 2019).

### Principe 6 : Viser un extrait non dénaturé et biodégradable sans contaminants

Après extraction, les produits obtenus doivent répondre à un certain nombre de critères de qualité. Contrairement à certaines idées reçues, le terme « naturel » ne signifie pas un produit non dangereux pour l'environnement ou l'homme. En effet, une substance naturelle est définie selon la législation REACH comme «*une substance naturelle en tant que telle, non transformée ou transformée uniquement par des procédés manuels, mécaniques ou gravitationnels, par dissolution dans l'eau, par flottation, par extraction à l'eau ou par distillation à la vapeur*» (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression de Fraudes (DGCCRF), 2009).

En d'autres termes, une substance naturelle ne peut pas être modifiée chimiquement, et ses propriétés physico-chimiques doivent donc être conservées de manière appropriée, sans aucun additif ou résidu (polluants, pesticides, métaux lourds, toxines, etc.) (Sanchez-Siles et al., 2019). Le caractère naturel d'un produit n'est pas toujours lié au solvant utilisé pour son extraction. Dans certains cas, un produit dit naturel est indépendant du solvant utilisé tant que sa structure moléculaire reste intacte. Dans d'autres cas, le produit naturel est directement lié au type de solvant utilisé, qui doit être naturel ou d'origine naturelle. Quoi qu'il en soit, les extraits obtenus doivent être correctement conservés afin d'assurer leur qualité, de préserver leurs composés actifs, d'éviter leur dénaturation et d'assurer leur qualité antimicrobienne pour leur sécurité.

Selon la norme ISO 16128, les ingrédients naturels dans le domaine cosmétique sont exclusivement obtenus à partir de plantes, d'animaux, de microorganismes ou de minéraux au moyen de procédés physiques (tels que le broyage, le séchage, la distillation), de réactions de fermentation naturelles ou d'autres procédures de préparation (autorisées) (par exemple, l'extraction par solvant, à l'exception des solvants non naturels issus de la pétrochimie) sans intention de modifier chimiquement l'ingrédient (Guissart et Barragan-Montero, 2020).

L'extrait vert ou l'éco-extrait qui en résulte est déterminé à l'aide de l'Analyse du Cycle de Vie (ACV), un cadre innovant développé dans un contexte de durabilité environnementale (You et Wang, 2019). Comme indiqué par Ilgin et Gupta, (2010), l'ACV est « *une méthode utilisée pour évaluer l'impact environnemental d'un produit tout au long de son cycle de vie, qui comprend l'extraction et le traitement des matières premières, la fabrication, la distribution, l'utilisation, le recyclage et l'élimination finale* ». Cette méthode vise à répertorier les différents impacts d'un processus allant de la collecte des matières premières à l'élimination des déchets, en tenant compte des consommations de ressources naturelles, d'énergie et des émissions environnementales. Ces dernières peuvent être évaluées en calculant la contribution des flux aux impacts environnementaux (écotoxicité, pollution photochimique, eutrophisation, destruction de la couche d'ozone, etc) (Chemat et al., 2012; Itskos et al., 2016).

L'analyse du cycle de vie a été introduite pour la première fois dans les années 1960, lorsque les préoccupations mondiales concernant l'épuisement rapide des ressources finies en matières premières et en énergie ont suscité un intérêt pour trouver des moyens de comprendre et de prévoir l'approvisionnement et l'utilisation futurs de l'énergie et des ressources. Aujourd'hui, l'Organisation Internationale de Normalisation a publié la norme ISO14040:2006 pour définir et examiner les principes et les lignes directrices du cadre de gestion environnementale (Standardization, 2006; You et Wang, 2019) (figure 8).

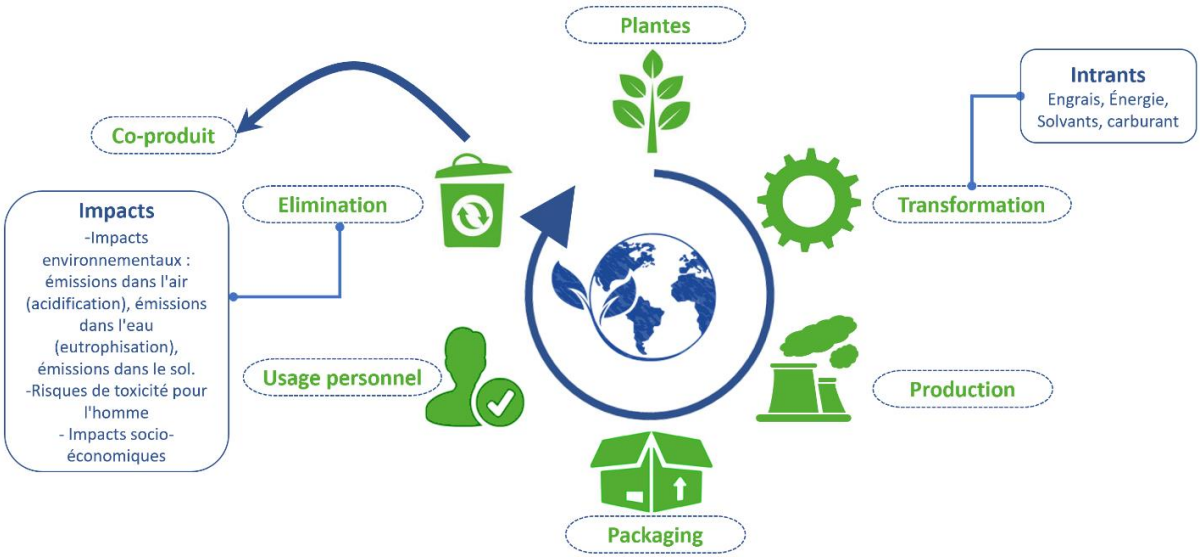



**Figure 8.** Analyse du cycle de vie (ACV) de l'extraction de produits naturels

Comme de nombreuses techniques d'extraction nécessitent l'utilisation de solvants autres que l'eau, plusieurs points de vue s'opposent sur la définition du caractère « naturel » des substances obtenues. De nombreuses certifications dans le monde sont devenues indispensables pour commercialiser des produits certifiés « biologiques » qui ont suivi des conditions de production très strictes dans différents domaines, comme la certification biologique du département de l'agriculture des États-Unis (USDA), la certification biologique de l'UE ou la certification Ecocert (figure 9).




**Figure 9.** Exemples de labels avec des valeurs biologiques/naturelles

Tout bien considéré, un « éco-extrait » doit être naturel avec des propriétés de haute fonctionnalité (arôme, colorant, antioxydant...), avec un faible impact environnemental et

en conformité avec les législations spécifiques selon le secteur d'application (industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétique...).

## 3- Techniques d'extraction verte

### a. Extraction Assistée par microondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques non-ionisantes dont la fréquence varie de 300 MHz à 300 GHz (Letellier et Budzinski, 1999). Elles servent à de nombreux usages, principalement à l'extraction grâce à leur capacité à convertir partiellement l'énergie électromagnétique en énergie thermique (Mandal et al., 2007). L'extraction assistée par micro-ondes (en anglais : Microwave-Assisted Extraction ; MAE) a été développée par Ganzler et al., (1986) pour l'extraction de composés biologiques et leur analyse. Au cours des deux dernières décennies, de nombreux laboratoires ont étudié la possibilité de récupérer différentes classes de composés (composés bioactifs, phyto-nutriments, ingrédients alimentaires fonctionnels, substances pharmaceutiques actives) (Both et al., 2015) à partir de matrices végétales ou animales (Chemat et al., 2020). Les développements dans le domaine de l'extraction par micro-ondes ont donné naissance à deux catégories de technologies, notamment l'extraction par solvant assistée par micro-ondes (en anglais : Microwave-Assisted Solvent Extraction ; MASE) et l'extraction par micro-ondes sans solvant (en anglais : Solvent Free Microwave Extraction ; SFME) (Pingret et al., 2012).

#### i. Principe

Généralement, le matériel végétal est immergé dans un solvant non-absorbant des microondes, puis exposé aux microondes. Ces dernières pénètrent facilement dans la matrice, et provoquent une augmentation de la température après interaction avec des molécules polaires comme l'eau (Wang et Weller, 2006). La MAE est une méthode d'extraction efficace et rapide car elle génère des changements dans la structure cellulaire causés par les ondes électromagnétiques (Chemat et Cravotto, 2013; Pingret et al., 2012) par rapport aux méthodes conventionnelles. Plusieurs classes de composés ont été extraites efficacement, comme les arômes, les phénols, les couleurs, les antioxydants, ainsi que d'autres métabolites primaires et secondaires de plusieurs matrices.

Le mécanisme d'extraction comprend trois étapes successives :

(i) La désorption / dégradation des solutés des cellules sous hautes pression et température ;

(ii) La diffusion du solvant dans la matrice ;

(iii) Le transfert des solutés de la matrice vers le solvant d'extraction puis hors de la matrice (Alupului et al., 2012).

L'efficacité du procédé et son rendement d'extraction élevé peuvent s'expliquer par deux facteurs agissant simultanément : une meilleure solubilité et un meilleur transfert de masse, ainsi qu'une perturbation accrue de l'équilibre de surface (Alupului et al., 2012; Chemat et Cravotto, 2013) (figure 10). Des rendements plus élevés peuvent être obtenus en sélectionnant des solvants ayant une valeur tan δ élevée, et en augmentant la température, ce qui permet une pénétration plus rapide du solvant dans les parois cellulaires. Tan δ ou le facteur de dissipation est donné par l'équation suivante (1) :

$$\tan \delta = \varepsilon'' / \varepsilon' \quad (1)$$

Où ε" est la perte diélectrique qui est l'efficacité de la conversion des micro-ondes en chauffage, et ε' correspond à la constante diélectrique, c'est-à-dire, la mesure de la capacité à absorber l'énergie des micro-ondes. Des exemples de solvants comme l'éthanol et le méthanol absorbent moins les micro-ondes que l'eau en raison de leur faible constante diélectrique, mais la valeur de tan δ restera supérieure à celle de l'eau. D'autres solvants comme le chloroforme ou l'hexane n'absorbent pas l'énergie des micro-ondes, ils ne produisent donc pas de chaleur (Mandal et al., 2007; Tatke et Jaiswal, 2011).

Dans le MAE, le transfert de chaleur et de masse se fait de l'intérieur vers l'extérieur, contrairement à l'extraction conventionnelle, où le transfert de chaleur se fait de l'extérieur vers l'intérieur. De plus, le chauffage du solvant et de la matrice solide est rapide, homogène et efficace (Wang et Weller, 2006).

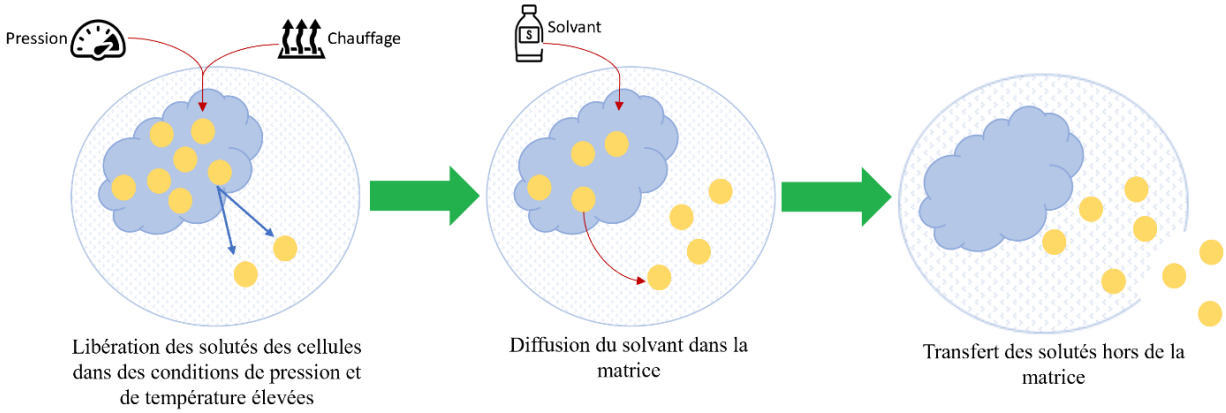



**Figure 10**. Mécanismes d'extraction dans le MAE des produits naturels

L'extraction par micro-ondes sans solvant (SFME) est une technique récente brevetée en 2004 et conçue pour la récupération des huiles essentielles à partir de matériel végétal aromatique (Chemat et al., 2004). Il s'agit d'une combinaison entre la méthode de distillation et le chauffage par micro-ondes. L'extraction est réalisée à la pression atmosphérique. Elle est basée sur le placement du matériel biologique dans un réacteur à micro-ondes sans solvant, qui est chauffé au moyen d'une irradiation par micro-ondes, entraînant l'évaporation de l'eau située dans la cellule qui se rompt et libère des exsudats riches en composants actifs, qui dans ce cas sont des molécules d'huiles (Tatke et Jaiswal, 2011). Un système de refroidissement refroidit continuellement l'extrait, et l'eau excédentaire retourne dans le récipient d'extraction pour récupérer l'eau *in situ* dans la plante (Chemat et al., 2004; Chemat et Cravotto, 2013)

L'hydrodiffusion par micro-ondes et gravité (en anglais : Microwave Hydrodiffusion and Gravity ; MHG) est un nouveau procédé conçu également pour extraire les huiles essentielles sans solvant ni eau. Brevetée en 2008 (Chemat et al., 2008), cette technique combine les micro-ondes pour l'hydrodiffusion des composés actifs en dehors du matériel biologique, et la gravité terrestre pour recueillir et séparer les extraits (Pingret et al., 2012; Vian et al., 2008). Elle consiste à placer le matériel végétal dans le réacteur à micro-ondes à pression atmosphérique. L'eau *in situ* est alors chauffée provoquant la distension des cellules et l'éclatement des glandes renfermant l'huile essentielle. Il se produit ensuite le phénomène d'hydrodiffusion, où l'eau *in situ* et l'huile essentielle libérée tombent par gravité hors du réacteur à micro-ondes et sont recueillies dans un récipient en pyrex après être passées par un système de refroidissement. L'extrait est ensuite transféré dans une « fiole florentine », un récipient traditionnel utilisé pour la séparation de l'eau et de l'huile.

En effet, l'huile essentielle flotte à la surface car elle est plus légère que l'eau. Contrairement à la distillation, l'évaporation, la MAE et la SFME qui utilisent des solvants et l'évaporation, la MHG est une technique très avantageuse car elle est peu consommatrice d'énergie.

ii. Instrumentation

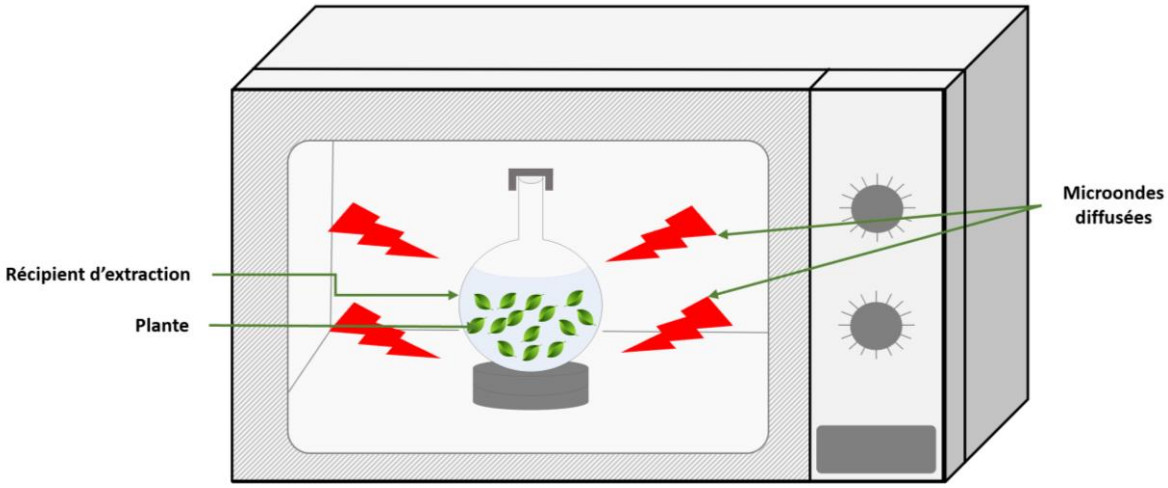



**Figure 11.** Extraction par solvant assistée par micro-ondes

Les systèmes d'extraction assistée par micro-ondes sont disponibles sous deux formes : les récipients fermés, dont la pression et la température sont contrôlées, et les récipients ouverts à pression atmosphérique. La plupart des systèmes fermés sont disponibles sous forme de micro- ondes multimodes, permettant une dispersion aléatoire des radiations micro-ondes qui irradient uniformément la matrice biologique et accélèrent le transfert de masse des composés actifs (Figure 11). Dans ces méthodes, des températures plus élevées peuvent être atteintes grâce à l'augmentation de la pression à l'intérieur du récipient d'extraction, le risque de perte de composés volatils est faible et la contamination est réduite.

D'autres dispositifs ont été développés, tels que les fours à micro-ondes focalisés, où seule la partie du récipient d'extraction contenant l'échantillon est irradiée. Dans ce cas, le solvant est chauffé et reflue à travers l'échantillon pour permettre un chauffage homogène et efficace. Quant à l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes, deux techniques

principales sont brevetées : L'hydrodistillation par micro-ondes sans solvant (SMFE) et l'hydrodiffusion par micro-ondes et gravité (MHG) (figure 12).

Les systèmes à vase ouvert, en revanche, contribuent à accroître la sécurité puisque l'extraction est réalisée à la pression atmosphérique et permettent l'extraction sur une grande quantité d'échantillons biologiques sans système de refroidissement.

L'extraction par micro-ondes est une technique d'extraction verte potentielle conçue pour remplacer l'extraction solide-liquide traditionnelle, car elle utilise moins de solvant et permet d'obtenir une extraction en moins de temps et avec des rendements plus élevés. Cette méthode est en développement continu ; les scientifiques améliorent l'extraction par micro-ondes en créant de nouvelles techniques telles que l'extraction assistée par ultrasons et par micro-ondes (UMAE), l'hydrodistillation sous vide par micro-ondes (VMHD), l'extraction dynamique par solvant assistée par micro-ondes en ligne (DMASE en ligne), l'extraction Soxhlet intégrée par micro-ondes (MIS), l'extraction par solvant assistée par micro-ondes en colonne (MASE en colonne) et plus encore (Pingret et al., 2012; Tatke et Jaiswal, 2011).

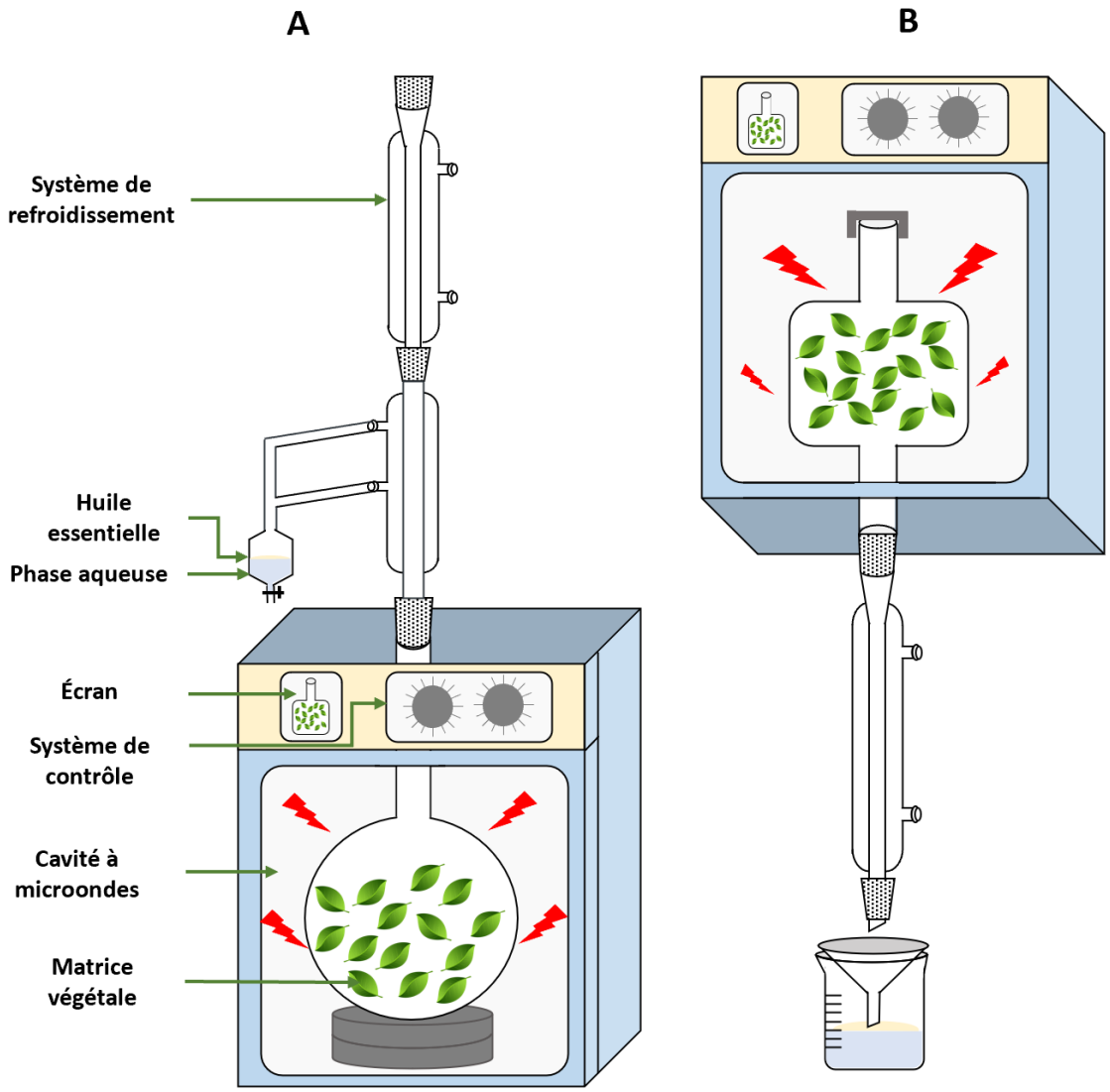



**Figure 12.** Hydrodistillation par micro-ondes sans solvant (SFME) (A) et hydrodiffusion par micro-ondes et gravité (MHG) (B)

iii. Applications dans l'analyse des aliments

Plusieurs études ont été réalisées pour comparer le MAE aux extractions conventionnelles (Tableau 1), allant des arômes et parfums aux huiles et antioxydants. Trois paramètres majeurs peuvent être étudiés afin d'améliorer l'efficacité et les rendements, notamment le temps d'irradiation, la puissance et le solvant utilisé.

Tran et al., (2018) ont décrit l'extraction de l'huile essentielle d'une variété vietnamienne de basilic en utilisant l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (en anglais : Microwave-Assisted HydroDiffusion ; MAHD), qui a été choisie par rapport à une méthode conventionnelle (hydrodistillation) pour sa consommation d'énergie réduite, son

temps et son coût réduits, et sa faible empreinte environnementale. Cette étude a été réalisée à l'aide d'une méthode de surface de réponse (en anglais : Response Surface Methodology ; RSM), largement utilisée pour l'optimisation. Dans ce cas, quatre facteurs ont été étudiés : la taille de la matière première, le rapport eau/feuilles, le temps d'extraction et la puissance des micro-ondes. Les résultats ont montré qu'un rendement en huile essentielle de 0,6 % peut être extrait de feuilles de basilic broyées dans les conditions optimales suivantes : rapport eau/feuilles de 3,2:1, durée d'extraction de 97 minutes et puissance des micro-ondes de 430 W. Les principaux composants de l'huile extraite sont l'estragole (87,869 %), l'α-bergamotène (2,922 %), le τ-cadinol (2,770 %) et le linalol (1,347 %).

L'extraction par micro-ondes sans solvant (SFME) est une autre technique avantageuse largement employée pour l'extraction de l'huile essentielle à partir de matrices fraîches ou séchées pré-humidifiées. Elle est connue pour son efficacité, sa faible consommation d'énergie et de temps et son très faible impact environnemental. Liu et al., (2018) ont comparé l'efficacité de cette méthode à celle de l'hydrodistillation conventionnelle pour récupérer l'huile essentielle des feuilles de *Cinnamomum camphora*. Ce procédé a été optimisé par RSM couplé à un plan de Box- Behnken (BBD). La SFME s'est avérée plus efficace avec un rendement de 3,51 ± 0,12 % en 23 min contre 3,35 ± 0,10 % en 240 min. En outre, des composés oxygénés plus élevés ont été extraits (83,93 % contre 74,81 %), avec une consommation d'énergie plus faible (0,22 kWh contre 4 kWh) et un impact environnemental réduit (177,87 g de $CO_2$ contre 3200 g de $CO_2$).

D'autres études ont été publiées pour l'extraction des antioxydants. Bouras et al., (2015) ont étudié l'extraction de composés antioxydants de l'écorce de *Quercus* en utilisant le MAE. Une comparaison des résultats de cette extraction avec une autre technique conventionnelle prouve que l'irradiation par micro-ondes permet des rendements plus élevés d'antioxydants dans des conditions optimisées (45 W, 60 min, 33% d'éthanol et 0,38% de méthanol). En outre, l'efficacité de l'extraction a triplé pour le contenu phénolique total et doublé pour les récupérations d'antioxydants par rapport à d'autres techniques conventionnelles avec les mêmes paramètres mais sans micro-ondes. Les extraits obtenus étaient riches en certains composés phénoliques, à savoir (+)-catéchine, (-)- épicatéchine, (-)-épigallocatéchine, acide syringique, acide p-coumarique, acide sinapique et naringénine. Des antioxydants ont également été obtenus par irradiation aux

micro-ondes à partir de feuilles d'olivier. Şahin et al., (2017) ont optimisé les conditions pour obtenir un contenu phénolique total (Total Polyphenol Content ; TPC) et des rendements en oleuropéine optimaux avec une extraction assistée par micro-ondes sans solvant (SFMAE) : 250 W, 2 min et 5 g d'échantillon. Le rendement maximal de TPC et d'oleuropéine était de 2,480 ± 0,060 ppm et 0,060 ± 0,012 ppm respectivement, et les extraits ont démontré une activité antimicrobienne contre *S. aureus* et *S. epidermidis* avec une valeur de concentration minimale inhibitrice (CMI) de 1,25 mg/mL.

L'extraction assistée par micro-ondes a été utilisée par Hu et al., (2017) pour l'extraction de l'huile des pupes du ver à soie. Elle a donné un rendement de 30,16% dans des conditions optimales de 360W, un rapport liquide/solide de 7,5/1 mL/g, 29 minutes et un mélange de solvants d'éthanol et d'hexane (1/1, v/v). Bien que ce rendement soit similaire à celui obtenu avec l'extraction Soxhlet conventionnelle, la stabilité à l'oxydation et les propriétés physicochimiques de l'huile ont été améliorées, ainsi que sa teneur en composés phénoliques. Des résultats intéressants ont également été observés dans le rapport de Yanık, (2017) sur les paramètres d'extraction par solvant de l'huile de grignons d'olive assistée par micro-ondes. Un rendement maximal de 6,85 g/100 g de matière sèche a été récupéré avec un microonde pressurisé à récipient fermé dans les conditions optimisées suivantes : 287 W, rapport solvant/matrice 10:1, et 16 min. En outre, la teneur en acide caféique et en tocophérols était plus élevée avec un total de 985 mg/ kg d'huile et 278,07 mg/kg d'huile respectivement, et une quantité réduite de peroxydes et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (17,8 meq O2/kg d'huile et 0,44 µg de benzo[α]pyrène/kg d'huile respectivement).

L'extraction de colorants alimentaires naturels par irradiation micro-ondes a été étudiée par Jafari et al., (2019) dans son article. Les fleurs de safran représentent une source riche en anthocyanines qui sont largement utilisées pour remplacer les colorants synthétiques dans les industries, mais elles sont très vulnérables aux paramètres d'extraction drastiques tels que le pH, la température, la lumière, les solvants, etc. L'extraction assistée par micro-ondes est une technique rapide et efficace car elle détruit la paroi cellulaire et favorise la pénétration rapide des solvants. Une optimisation du processus d'extraction a été étudiée (77,5 ml/g, 48 °C, 9,3 minutes), conduisant à un rendement maximal d'anthocyanines de 101 mg/g.

En conclusion, le MAE peut être considéré comme une aubaine pour l'extraction de composés biologiques grâce à son chauffage efficace, son transfert d'énergie rapide, la taille réduite de son équipement, son faible impact sur l'environnement, son temps d'extraction court, ses rendements accrus et sa faible utilisation de solvants.

**Tableau 1.** Extraction Assistée par Microondes

| Matrice | Analyte | Conditions expérimentales | Détection et analyse | Référence |
|---|---|---|---|---|
| Arômes et parfums | | | | |
| **Feuilles de basilic vietnamiennes** | Huile essentielle | MAHD **A,** atm **B**, 430 **C**, - **D**, 97 **E**, rapport eau/matière de 3,2:1 **F.** rendement en huile essentielle 0,6%. Composants principaux : Estragole (87,869 %), α-Bergamotène (2,922 %), τ-Cadinol (2,770 %) et Linalol (1,347 %). | GC-MS | (Tran et al., 2018) |
| ***Feuilles de Cinnamomum camphora*** | Huile essentielle | SFME **A,** atm **B**, 580 **C**, - **D**, 23 **E**, - **F.** 3,51 ± 0,12 % en 23 min pour SFME contre 3,35 ± 0,10 % en 240 min pour hydrodistillation conventionnelle | GC-MS | (Liu et al., 2018) |
| Extraits antioxydants | | | | |
| **Ecorce de *Quercus*** | Polyphénols | MAE **A,** atm **B,** 45 **C,** - **D,** 60 **E,** 33% éthanol ; 0,38% Méthanol **F.** Les efficacités d'extraction ont augmenté de 3 fois et de 2 fois respectivement pour le contenu phénolique total et les récupérations d'antioxydants par rapport aux méthodes conventionnelles qui utilisent les mêmes paramètres mais sans MAE. | LC-MS | (Bouras et al., 2015) |
| **Feuilles d'olivier** | Polyphénols | SFMAE **A,** atm **B,** 250 **C,** - **D,** 2 **E,** - **F.** Meilleures récupérations de TPC et d'oleuropéine : 2,50 et 0,06 ppm, respectivement. | HPLC-DAD | (Şahin et al., 2017) |
| *Extraction du pétrole* | | | | |
| **Nymphes de vers à soie** | Huile | MAE **A**, atm **B**, 360 **C**, - **D**, 29 **E**, éthanol - n-hexane (1:1, v/v) **F.** Huile extraite par MAE : teneur plus élevée en phénolique total, activités antioxydantes plus fortes. | GC-MS | (Hu et al., 2017) |
| **Huile de grignons d'olive** | Huile | MASE **A**, atm **B**, 287 **C**, - **D**, 16 **E**, 10:1 (rapport solvant/échantillon) **F**. Contenu phénolique total et quantité de tocophérols plus élevés (278,07 mg/kg d'huile) et indice de peroxyde plus faible (17,8 meq O2/kg d'huile) et teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques (0,44 µg de benzo[α]pyrène/kg d'huile) dans l'extraction par solvant assistée par micro-ondes par rapport à la méthode d'extraction industrielle conventionnelle. | GC-MS | (Yanık, 2017) |
| *Extraction de colorants alimentaires naturels* | | | | |
| **Pétale de la fleur de safran (*Crocus sativus*)** | Anthocyanines | MAE **A**, atm **B**, 360 **C**, 48 **D**, 9,3 **E**, rapport solvant/échantillon 77,5 ml/g **F**. Technique rapide et efficace pour les anthocyanes de safran grâce à la rupture des parois cellulaires sous irradiation micro-ondes. | Méthode du pH différentiel | (Jafari et al., 2019) |
| **A** : technique, **B** : pression, **C** : puissance (W), **D** : température (°C), **E** : temps (min), **F** : solvant. | | | | |

## b. Extraction Assistée par Ultrasons

L'extraction est une étape cruciale lorsqu'il s'agit de récupérer des composés bioactifs à partir de matrices biologiques à l'échelle industrielle (figure 13). Des techniques écologiques sont de plus en plus utilisées à cette fin pour remplacer les techniques conventionnelles qui consomment de grandes quantités de solvant et donnent des rendements relativement faibles avec des temps d'extraction longs. L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est un procédé d'extraction d'une substance de n'importe quelle matrice vers une phase liquide appropriée (milieu d'extraction), assistée par des ondes ultrasonores (fréquence ≥ 20 KHz) qui se propagent dans le milieu liquide. C'est une méthode qui a prouvé son efficacité pour récupérer des composés d'intérêt et en préserver la qualité. Le phénomène de cavitation augmente efficacement les rendements d'extraction tout en diminuant la quantité d'énergie, de solvant et de temps d'extraction (Kumar et al., 2020). L'UAE a été considérée comme un outil précieux dans les processus d'ingénierie et il a été employé pour l'extraction de divers composés actifs, à savoir les phénols, les arômes, les protéines, les polysaccharides, et plus encore (Esclapez et al., 2011; Chemat and Strube, 2015).



**Figure 13.** Procédé d'extraction par ultrasons à l'échelle industrielle (2 × 500 L) comme technique d'intensification de l'extraction à partir d'huiles végétales (Reus—www.etsreus.com)

i. Principe

Les ondes ultrasonores ont des fréquences allant de 20 kHz à 10 MHz, qui sont supérieures aux fréquences de l'audition humaine (20 Hz - 20 kHz) [60] (figure 14). Les principales variables d'une extraction par ultrasons sont :

- L'amplitude ;
- La fréquence : dépend de l'équipement utilisé pour l'extraction ;
- La puissance : représente l'énergie transmise à la matrice par le milieu. Elle est exprimée en puissance (W), en intensité (W/cm$^2$) ou en densité de puissance (W/cm$^3$ ou W/mL). La puissance ultrasonore peut être calculée comme suit (2) :

$$P = m \times C_p \times \frac{dT}{dt} \quad (2)$$

Où *Cp* est la capacité thermique à pression constante (J. g$^{-1}$. K$^{-1}$), *m* est la masse du solvant (g), *dT/dt* est la variation de température en fonction du temps (K.min$^{-1}$). Quant à l'intensité ultrasonore, elle peut être exprimée par la puissance calculée comme le montre l'équation 3 :

$$UI = \frac{4P}{2\pi D} \quad (3)$$

Où *P* est la puissance et *D* est le diamètre interne de la sonde ultrasonique (cm) (Esclapez et al., 2011; Tabib et al., 2020).

Deux approches de l'application des ultrasons ont été étudiées au cours des dernières années (Esclapez et al., 2011):

- Ultrasons haute fréquence de faible intensité : utilisés pour le contrôle de la qualité des produits ou des processus (par exemple, l'évaluation de la maturation du fromage) ;
- Ultrasons basse fréquence de forte puissance : se concentre sur l'amélioration du processus (inactivation microbienne, extraction, opération de découpe des aliments, émulsions, etc.)

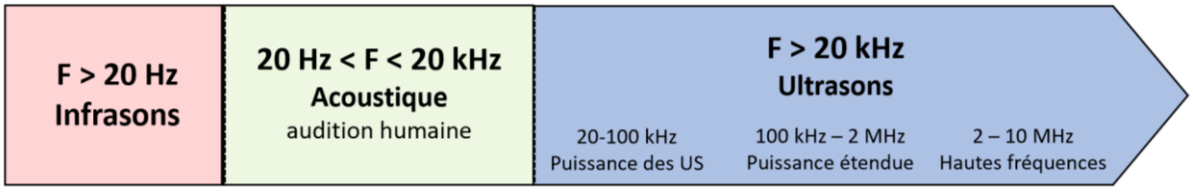



**Figure 14.** Gammes de fréquences

Le processus d'extraction peut être expliqué comme suit (Figure 15) : l'ultrasonication se produit lorsque l'entrée de puissance acoustique augmente, induisant la production de bulles de cavitation qui sont initiées dans les sites de nucléation (14-1). Ces bulles passent par une série de phases de compression et de raréfaction pendant que les ondes ultrasonores traversent le solvant. Après avoir atteint une taille critique, elles implosent pendant le cycle de compression à la surface des cellules en générant des micro-jets (14-2) qui engendrent de nombreux effets tels que l'érosion, le pelage et la dégradation des particules. Cette implosion peut s'expliquer par une conversion de l'énergie sonique en énergie mécanique en raison de la pression et de la température élevées, estimées respectivement à 100 MPa et 5000 K, qui augmentent le taux de transfert de masse des analytes vers le solvant (14-3) (Wen et al., 2018; Vernès et al., 2020). De plus, les bulles provoquent des macro-turbulences conduisant à un micro-mélange (Wang and Weller, 2006; Pingret et al., 2012; Chemat and Strube, 2015; Chemat et al., 2017b; Pacheco-Fernández and Pino, 2020). Au niveau moléculaire, les sites de nucléation sont en fait des vides créés dans le liquide lorsque les molécules dépassent la distance critique après avoir été déplacées puis replacées dans leur position initiale en raison des mouvements des ondes sonores et de l'énergie cinétique impliquée (Pingret et al., 2012).

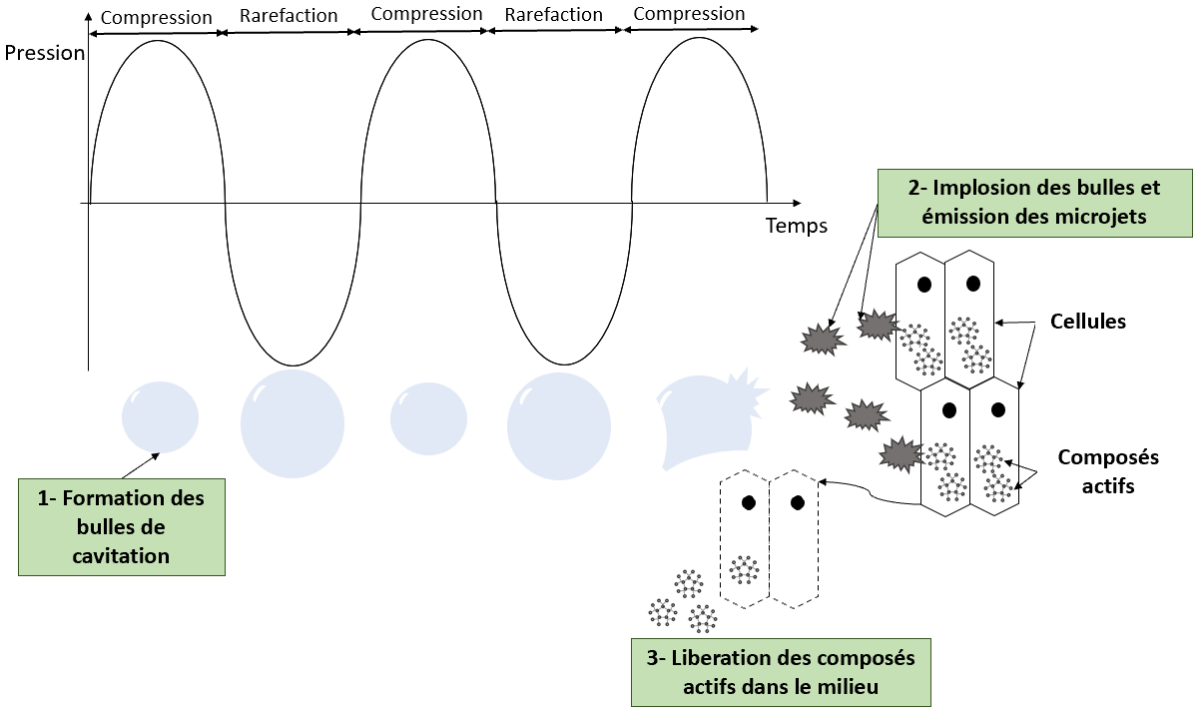



**Figure 15.** Extraction assistée par ultrasons - mécanisme

D'autres applications des ultrasons ont été étudiées sur la base de différents principes autres que la cavitation, tels que l'uniformisation du transfert de chaleur (séchage, congélation, cuisson), l'augmentation du transfert de masse (marinage), le phénomène de compression- réfaction (dégazage) et la vibration (filtrage et démoulage) (Chemat et al., 2011).

ii. Instrumentation

Trois dispositifs sont couramment utilisés pour les UAE : les bains, les réacteurs et les sondes, tous basés sur des transducteurs et une source d'énergie ultrasonore (Chemat et al., 2017b).

Les bains à ultrasons sont la forme la plus disponible et la plus répandue d'équipement ultrasonique et se présentent sous la forme de cuves en acier inoxydable avec un ou plusieurs transducteurs qui convertissent l'énergie électrique en énergie sonore par vibration mécanique à des fréquences ultrasoniques (Vernès et al., 2020). Ils peuvent fonctionner à 40 kHz et peuvent être trouvés équipés d'un contrôle de température.

Un aspect avantageux de cet appareil est qu'il peut traiter simultanément deux ou plusieurs échantillons. Malgré cela, sa faible puissance, sa faible intensité délivrée en raison de l'atténuation par l'eau et les récipients en verre des échantillons réduisent sa reproductibilité (Chemat et al., 2017b). Les réacteurs sont une forme de bain ultrasonique. Ils sont très fréquemment utilisés pour les extractions, et se présentent sous la forme d'un récipient cylindrique en acier inoxydable, équipé d'une double enveloppe pour le contrôle de la température. Ils ont été développés par REUS, et fonctionnent à 25 kHz.

Les sondes à ultrasons de haute puissance sont les plus utilisées en extraction. En effet, elles peuvent délivrer une intensité ultrasonore jusqu'à 100 fois supérieure à celle des bains à ultrasons. Les sondes ayant des surfaces plus petites sont les plus puissantes (cf. équation 2). Elles sont généralement reliées à un transducteur et fonctionnent à 20 kHz lorsqu'elles sont immergées dans le milieu, ce qui permet de délivrer directement l'énergie ultrasonore avec une perte minimale. Les sondes sont disponibles en différentes longueurs, formes de pointe et diamètres. L'intensité des ultrasons libère une énergie élevée et provoque un réchauffement rapide du milieu. Il est donc nécessaire de connecter le système avec une double enveloppe de refroidissement (Chemat et al., 2017b; Vernès

et al., 2020) (Figure 16). D'autres dispositifs ont été développés pour des volumes plus importants comme les sonores à flux continu ou recyclé, qui consistent en des réacteurs en acier inoxydable où le mélange est pompé en continu à la pression atmosphérique ou à haute pression. Le système peut être couplé à une double enveloppe pour le contrôle de la température.

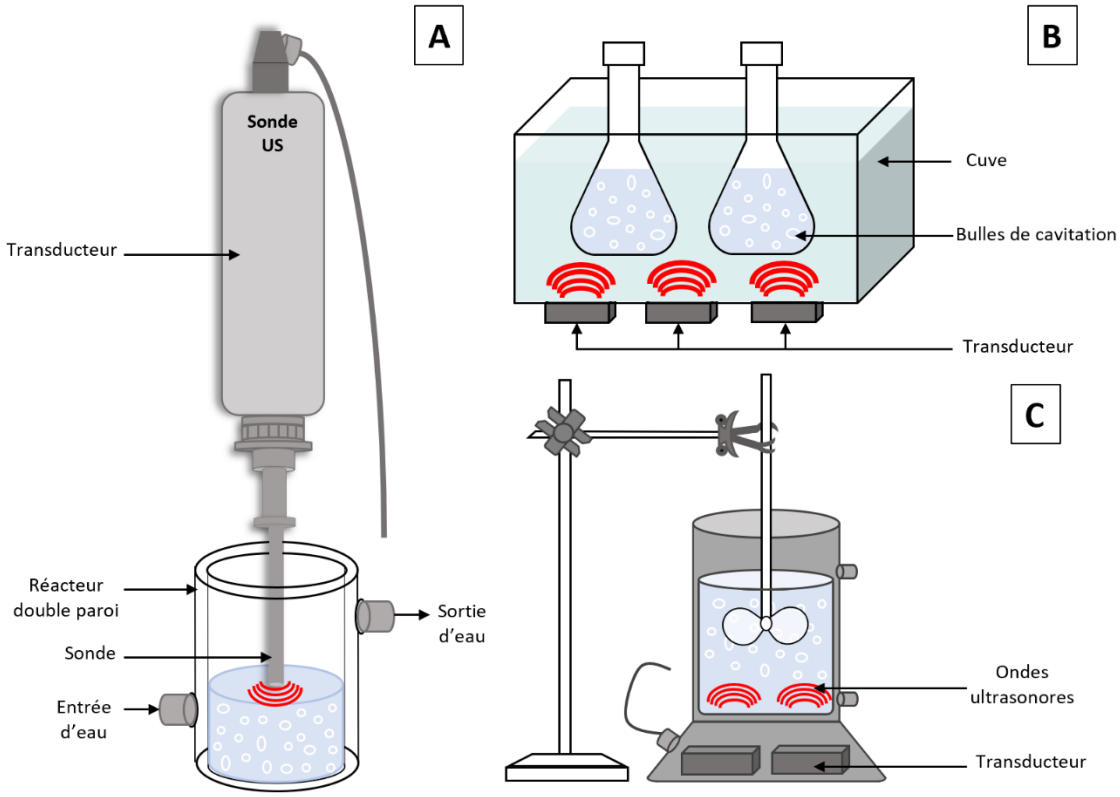



**Figure 16.** Types d'appareils UAE. (A) Sonde à ultrasons ; (B) Bain à ultrasons ; (C) Réacteur à ultrasons

Le passage à l'échelle de l'UAE a nécessité la mise à niveau de l'équipement, à savoir des appareils à ultrasons multi-transducteurs qui fournissent une puissance plus élevée pour les grands échantillons, et d'autres combinaisons de l'équipement à ultrasons existant avec d'autres techniques / solvants. Par exemple, Milani et al., (2020) ont couplé les ultrasons et les solvants eutectiques profonds (DES) pour l'extraction des glycosides de stéviol. Les DES représentent une alternative intéressante pour une extraction plus verte et un impact environnemental plus faible. Les ultrasons ont également été couplés aux micro-ondes pour la récupération d'Harpagoside à partir d'*Harpagophytum procumbens* (Baghdikian et al., 2016) et ont été comparés aux techniques conventionnelles. Cette méthode a prouvé son efficacité puisqu'elle est économe en énergie, en temps et en solvants. D'autres exemples tels que les Sono-Soxhlets ont été utilisés pour améliorer l'extraction de l'huile

et accélérer l'extraction conventionnelle par Soxhlet tout en réduisant sa consommation de solvant (Chemat et al., 2017b).

La forme et la taille de l'équipement ultrasonique représentent des paramètres fondamentaux pour optimiser l'extraction. Il est important d'utiliser des récipients à fond plat avec une épaisseur minimale afin de réduire la réflexion et l'atténuation des ondes ultrasonores (Santos et al., 2009). La taille optimale du récipient et la position de la sonde par rapport au transducteur doivent être calculées pour réduire la perte d'énergie.

iii. Applications dans l'analyse des aliments

Les ultrasons ont été utilisés sur de nombreuses matrices pour l'extraction d'antioxydants, de protéines, de lipides et d'autres composés actifs. Cette technique est de plus en plus utilisée dans un contexte d'éco-extraction, visant la réduction de la consommation de solvant, de temps et d'énergie tout en augmentant les rendements d'extraction, et remplaçant ainsi les techniques conventionnelles.

Sicaire et al., (2016) ont extrait l'huile de colza avec une sonde ultrasonore et l'ont comparée à une macération conventionnelle. L'optimisation a été réalisée par la Méthodologie de la Surface de Réponse (en anglais Response Surface Methodology ; RSM), et les paramètres optimisés ont été définis comme suit : 7,7 W/cm² pour l'intensité de la puissance ultrasonique, 40 °C pour la température de traitement, et un rapport solide/liquide de 1/15 pour obtenir jusqu'à 97 % d'huile totale. L'UAE a démontré son efficacité en termes d'extraction, de réduction du temps et de la quantité de solvant ainsi qu'une meilleure qualité d'huile. Dans une autre étude, les ultrasons ont été explorés pour l'extraction des protéines de la spiruline. Vernes et al., (2019) ont optimisé la récupération des protéines en utilisant la manothermosonication (MTS), une technique verte et innovante qui combine l'extraction conventionnelle assistée par ultrasons et le contrôle de la pression et de la température. Il s'agit en effet d'une méthode efficace puisqu'elle a permis d'augmenter le rendement de 229 % par rapport à la méthode conventionnelle sans ultrasons, soit plus de 28 g pour 100 g de poids sec.

Les ultrasons peuvent également être exploités comme prétraitement. Zhu et al., (2017) ont extrait les protéines et les polyphénols de la patate douce pourpre dans les conditions optimales suivantes : 40 minutes, pH 2,5, 58% d'éthanol et une extraction supplémentaire à chaud à 80 °C pendant un maximum de 120 minutes. Le rendement obtenu était d'environ 3,877 mg/g de polyphénols dont 0,293 mg/g d'anthocyanines, et 0,753 mg/g de

protéines. La consommation d'énergie calculée était avantageuse et minimale (8406 J/mg).

Khadhraoui et al., (2018) ont décrit les mécanismes responsables de l'effet des ultrasons sur les feuilles de romarin. Il met en évidence une succession d'impacts, à savoir l'érosion, les forces de cisaillement, la sonoporation, la fragmentation, l'effet capillaire et la détexturation. Le traitement par UAE peut également être intéressant pour une utilisation combinée. Dans ce contexte, une autre étude récente de notre équipe (laboratoire Green – Université d'Avignon en France) discutée par Tabib et al., (2020) a décrit la séparation de la peau d'amande et l'extraction des polyphénols par ultrasons. Les paramètres influents dans ce processus sont la température, le temps et l'intensité des ultrasons. L'extraction des phénols était 258% plus élevée avec les UAE par rapport à la méthode conventionnelle, et de nombreux effets ont été observés macroscopiquement et microscopiquement après observation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB), tels que l'érosion, la fragmentation et la sonoporation.

**Tableau 2.** Extraction assistée par ultrasons

| **Matrice** | **Analyte** | **Conditions expérimentales** | **Détection et analyse** | **Référence** |
|---|---|---|---|---|
| Huile de colza | Lipides | 40 **A**, 15 **B**, 20 **C**, 7.7 W/cm² **D**, Hexane **E**, Sonde ultrasonore **F** | GC-FID | (Sicaire et al., 2016) |
| Spiruline | Protéines | 24 **A,** 20 **B**, 20 **C**, 55 W/cm² **D**, Tampon de phosphate de sodium 1:20 (g/g) **E**, Probe **F** | Méthode de Lowry | (Vernes et al., 2019) |
| Patate douce violette | Protéines, polyphénols | 25 **A,** 40 **B**, 45 **C**, 178 W **D**, 1:20 (PSP/solution hydroalcoolique) **E**, bain à ultrasons | HPLC-DAD-ESI-MS² | (Zhu et al., 2017) |
| Feuilles de romarin | Phénols | 25 **A**, 60 **B**, 20 **C**, 41.7 W/cm² ± 0.4 **D**, eau déminéralisée **E**, sonde **F** | UHPLC | (Khadhraoui et al., 2018) |
| Amandes | Polyphénols | 20 **A**, 20 **B**, 20 **C**, 9.47 W/cm² **D**, eau distillée **E**, sonde **F** | UHPLC DAD/ ESI-MSn | (Tabib et al., 2020) |
| Déchets de grenades | Caroténoïdes | 51,5 **A,** 30 **B**, 20 **C**, 130 W **D**, Huile de tournesol (rapport peau/solvant 0,10) **E**, sonde **F** | Spectrophoto-métrie 470 nm | (Goula et al., 2017) |
| Mûres | Anthocyanines | 48 **A**, 10 **B**, 24 W **C**, 200 **D**, Méthanol 76% **E**, sonde **F** | UHPLC-QToF-MS | (Espada-Bellido et al., 2017) |
| **A** : température (°C), **B** : temps (min), **C** : fréquence (kHz), **D** : puissance, **E** : solvant, **F** : type d'appareil à ultrasons | | | | |

Un rendement élevé de caroténoïdes récupérés à partir de la peau de grenade a été observé par Goula et al., (2017) avec des conditions optimales d'UAE (51,5 °C, rapport peau/solvant de 0:10, 58,8 % du niveau d'amplitude, et huile de tournesol comme solvant). De même, les paramètres optimaux ont été étudiés pour la détermination des anthocyanes et des composés phénoliques totaux dans les mûres (Espada-Bellido et al., 2017), y compris la composition du méthanol, le rapport de solvant, la température, l'amplitude, le cycle et le pH. Cette méthode a montré une reproductibilité et une répétabilité élevées et s'est avérée facile et respectueuse de l'environnement.

### c. Extraction par eau sub-critique

L'eau est très abondante et très utilisée dans la vie quotidienne, et ses variations physico-chimiques en font un solvant très intéressant. L'état subcritique est atteint lorsque l'eau est maintenue à l'état liquide à une température comprise entre 100 et 374°C sous une pression comprise entre 1 et 221 bars (Chakraborty et al., 2021) (figure 17). Plusieurs études ont été menées dans ce cadre pour évaluer la faisabilité de l'extraction de composés bioactifs (polaires et non polaires) à partir de matrices naturelles.

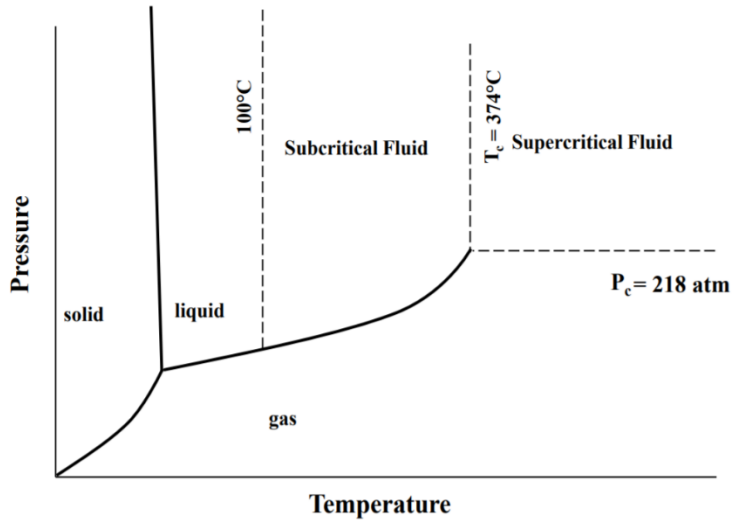



**Figure 17.** Diagramme de phase de l'eau *(Alkhateeb, 2015)*

#### i. Principe

L'extraction à l'eau sub-critique (en anglais : Subcritical Water Extraction ; SWE), également appelée extraction à l'eau surchauffée ou extraction à l'eau chaude pressurisée, est une technique verte qui utilise uniquement l'eau comme solvant à son état subcritique (Gbashi et al., 2017; Ko et al., 2020). La SWE dépend de plusieurs paramètres : température, pression, débit du solvant et taille des particules. D'autres facteurs peuvent

également affecter l'extraction comme les co-solvants, le temps, et le ratio solvant/échantillon. À part la pression et la température de l'eau, les conditions de SWE peuvent être comparées à une macération conventionnelle.

Le point critique peut être défini comme l'état où les propriétés de l'eau (comportement thermique, densité, viscosité) sont modifiées sous deux paramètres principaux : la température (374°C) et la pression (221 bars). Sous ce point, l'eau est maintenue à l'état liquide en évitant sa vaporisation et en faisant varier sa température entre 100 et 374°C et sa pression entre 1 et 221 bars (Smith, 2006; Chemat and Strube, 2015). Les changements des propriétés chimiques et physiques de l'eau entraînent une variation de sa polarité, mesurée par la constante diélectrique ($\varepsilon$ = 80 à 25 °C et à la pression atmosphérique) (Gbashi et al., 2017). Ce paramètre s'abaisse à l'état subcritique, et l'eau devient similaire aux solvants organiques faiblement polaires permettant l'extraction de composés moyennement polaires tels que les terpénoïdes, les aromatiques ou les polyphénols. Par exemple, la constante diélectrique de l'eau à 250 °C et 50 bars est égale à celle de l'éthanol ($\varepsilon$ = 27) et devient proche de celle du méthanol ($\varepsilon$ = 33) à 25 °C et 1 bar (Castro-Puyana, 2017; Chemat and Strube, 2015; Ko et al., 2020).

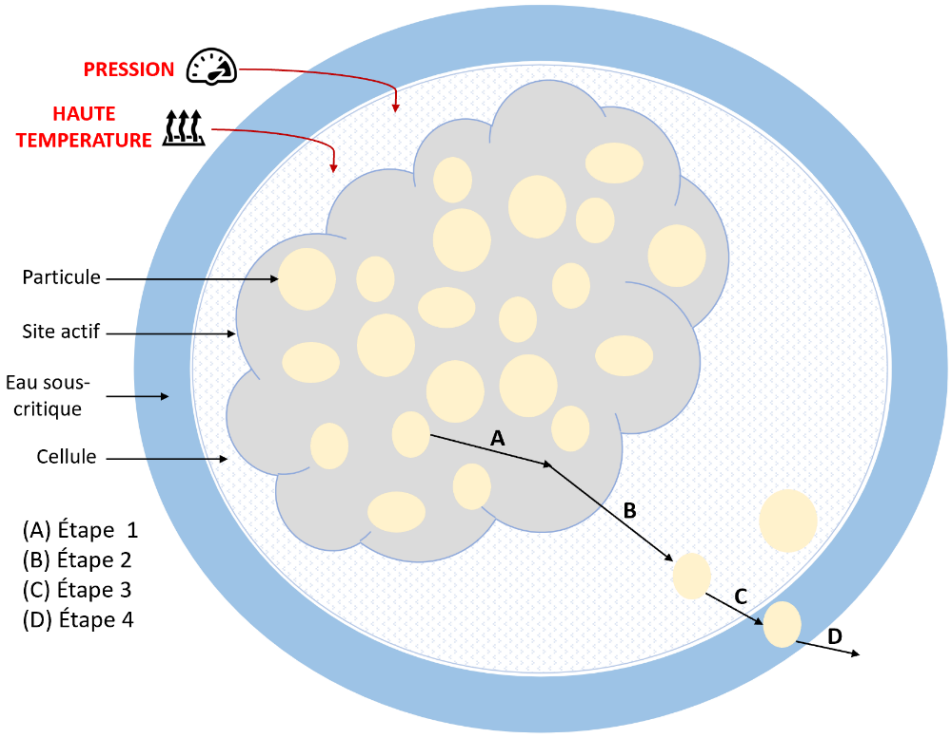



**Figure 18.** Mécanisme d'extraction des composés actifs d'une matrice naturelle en utilisant l'eau subcritique comme solvant

L'eau subcritique est un solvant non toxique, non corrosif et non agressif. Elle améliore le rendement d'extraction et la qualité des extraits en un temps plus court. De plus, la viscosité est réduite et la diffusibilité est augmentée. C'est un meilleur solvant pour les composés hydrophobes que l'eau ambiante, car sa concentration en $H_3O^+$ et $OH^-$ varie avec l'augmentation de la température (Chakraborty et al., 2021). Quatre étapes majeures se produisent dans le SWE (J. Zhang et al., 2020) (Figure 18) :

- Étape 1 : désorption du soluté des sites actifs de la matrice à haute température et pression ;
- Étape 2 : diffusion des solutés dans la matrice ;
- Étape 3 : diffusion des solutés de la matrice dans le solvant ;
- Étape 4 : séparation des extraits du solvant par chromatographie.

Ainsi, plusieurs améliorations peuvent être envisagées, notamment la solubilité et le transfert de masse de la matrice vers le solvant ainsi que la destruction du matériau de surface favorisée par la haute pression.

ii. Instrumentation

Les équipements SWE comprennent deux méthodes principales d'extraction : (i) le mode statique ou batch, où nous avons deux alternatives possibles : dans la première, le matériel végétal est introduit dans une colonne avec une charge neutre. La colonne est ensuite placée dans un four et remplie d'eau à l'aide d'une pompe. Sous température et pression contrôlées et sous agitation continue, le solvant et la matrice restent en contact pendant un temps déterminé. Ils sont ensuite évacués à l'aide d'une vanne avec le gaz, refroidis et collectés. La deuxième voie est un système fermé sous pression et à haute température (figure 19) ; (ii) le mode dynamique ou continu est similaire à la percolation, où l'eau subcritique traverse le matériel végétal placé préalablement dans le récipient d'extraction avec un débit de solvant contrôlé. Il se compose d'une pompe, d'une chambre d'extraction, d'un collecteur, d'un système de chauffage et d'un système de contrôle de la pression. Une température constante est maintenue tout au long du processus d'extraction grâce à un tube inoxydable enroulé à l'intérieur du réchauffeur (Chemat and Strube, 2015; J. Zhang et al., 2020).

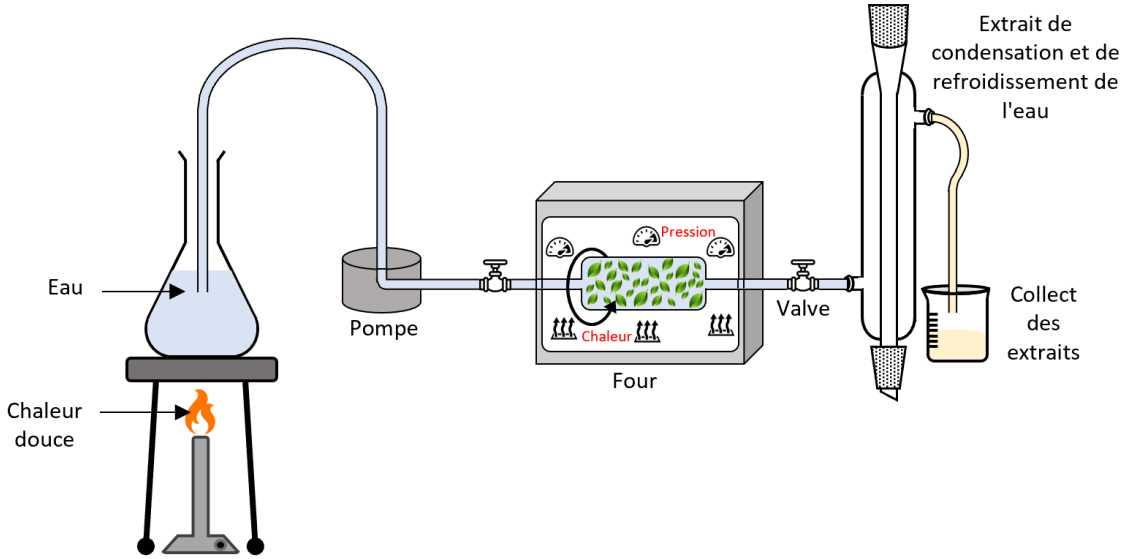



**Figure 19.** Représentation schématique d'une unité d'extraction d'eau subcritique ; exemple d'une installation par lots à l'échelle du laboratoire

La SWE peut être combinée à d'autres techniques écologiques pour améliorer son efficacité. Par exemple, l'extraction subcritique par micro-ondes est une méthode intéressante car elle permet de diminuer la pression nécessaire pour atteindre l'état subcritique et d'obtenir des rendements plus élevés. Une étude récente menée par Yang et al., (2019) a montré que cette combinaison est une alternative intéressante et prometteuse pour l'extraction conventionnelle des glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana*, car elle réduit considérablement le temps d'extraction de 45 minutes à seulement 1 minute avec moins de solvant utilisé pour obtenir le même rendement.

### iii. Applications dans l'analyse des aliments

**Tableau 3.** Extraction à l'eau sub-critique

| Matrice | | Analyte | Conditions expérimentales | Détection et analyse | Références |
|---|---|---|---|---|---|
| Pelure de pomme de terre | | Glucides<br>Phénols<br>Antioxydants | 40 **A**, 9 **B**, 190 **C** | HPLC-UV | (Alvarez et al., 2014) |
| Tabac | Feuilles | Glucides<br>Phénols | 580 **A**, 25 **B**, 160 **C.** Rapport solvant-solide 23 mL/g | HPLC-VWD | (Jokić et al., 2019) |
| | Escarpement | | 580 **A**, 23 **B**, 150 **C.** Rapport solvant-solide 28 mL/g | | |
| | Poussière | | 580 **A**, 20 **B**, 160 **C.** Rapport solvant-solide 10 mL/g | | |
| | Nervure | | 580 **A**, 25 **B**, 150 **C.** Rapport solvant-solide 30 mL/g | | |
| Menthe japonaise | | Huile essentielle | 200 **A**, 5 **B**, 180 **C** | GC-FID | (Chiou et al., 2020) |
| *Chlorella pyrenoidosa* | | Protéines | 55 **A**, 10 **B**, 270 **C.** 15 % de biomasse microalgale | Essai Lowry | (Zainan et al., 2020) |
| | | Glucides | 23,2 **A**, 5 **B**, 220 **C.** 10% de biomasse microalgale | Méthode du phénol et de l'acide sulfurique | |
| Kanuka | | Phénols | 40 **A**, 20 **B**, 170 **C.** rapport solide/solvant 15 g/L | HPLC-DAD | (Essien et al., 2020) |
| Racines de Ginseng | | Sucres<br>Phénols | 60 **A**, 20*2 **B**, 200 **C.** | Méthode au phénol et à l'acide sulfurique ;<br>UFLC-MS/MS | (Zhang et al., 2018) |
| | | Protéines | 60 **A**, 20*2 **B**, 180 **C** | Test de Bradford | |
| **A** : pression (bar), **B** : temps (min), **C** : température (°C) | | | | | |

La faisabilité de l'extraction subcritique a été étudiée sur diverses matrices et plusieurs articles ont été publiés à ce sujet. Cette technique est en pleine expansion et de plus en plus d'actualité. Le tableau 3 montre que la SWE peut être appliquée pour la récupération de divers composés : glucides (Alvarez et al., 2014; Zhang et al., 2018; Jokić et al., 2019; Zainan et al., 2020), phénoliques (Alvarez et al., 2014; Zhang et al., 2018; Jokić et al., 2019; Essien et al., 2020), huile essentielle (Chiou et al., 2020), sucres et autres. L'intérêt pour l'industrialisation de ce procédé est croissant puisqu'il a été initialement utilisé à petite échelle.

### d. Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique (en anglais : Supercritical Fluid Extraction ; SFE) est l'une des techniques les plus utilisées pour l'extraction de produits bioactifs à partir de plantes. Elle utilise une phase fluide dont les propriétés se situent entre celles d'un gaz et d'un liquide pour influencer la solubilisation des composés actifs (Gandhi et al., 2017). Cette méthode a été introduite à grande échelle dans les années 1970 pour diverses applications, notamment la récupération des arômes et des piquants des épices, la décaféination du café et du thé, etc. (Manjare and Dhingra, 2019). L'application du SFE dans les domaines de la purification et de l'extraction ne cessera de croître.

#### i. Principe

La SFE est basée sur l'utilisation des fluides supercritiques (SF) comme alternative verte aux solvants organiques. L'état supercritique est une phase homogène atteinte à haute pression et à une température supérieure au point critique (Khaw et al., 2017). Il combine les deux caractéristiques de l'état liquide et de l'état gazeux du fluide. En effet, la densité du fluide supercritique est de type liquide est supérieure à celle de l'état gazeux, la viscosité est de type gazeux, et la diffusivité est deux fois supérieure à celle de l'état liquide (Chemat and Vian, 2014). Les variations de température et de pression entraînent des changements de la constante diélectrique et de la solubilité du SF, induisant ainsi une densité et une sélectivité variables et permettant un transfert de masse amélioré de différentes classes de composés actifs (Attard et al., 2018; Chemat and Vorobiev, 2019). D'autres paramètres peuvent influencer le processus d'extraction, notamment l'aspect de la matrice solide (taille des particules, porosité, conditions de l'échantillon, prétraitements...), le solvant et le co-solvant (débit, ratio), les solutés (polarité, volatilité),

le temps, la géométrie de l'extracteur, etc. (Chemat and Vian, 2014; Chemat and Vorobiev, 2019; Molino, 2020).

L'un des principaux avantages de cette technique est l'élimination facile du solvant qui peut être obtenue soit en diminuant la pression, soit en augmentant la température après la sortie de la colonne d'extraction. De plus, elle peut être considérée comme une technologie prometteuse grâce à sa haute sélectivité, son temps d'extraction court et son absence de danger pour la santé et l'environnement pour produire des extraits de haute pureté (Uddin et al., 2015).

Le dioxyde de carbone supercritique ($scCO_2$) est de loin le plus utilisé dans la SFE : Il peut être mis en oeuvre à des températures voisines de l'ambiante (sa température critique est de 31°C) et à des pressions élevées (sa pression critique est de 74 bar) mais facilement atteignables avec les technologies disponibles aujourd'hui (Figure 20). Il présente une polarité analogue à celle de l'hexane et peut voir sa polarité modifiée jusqu'à celle du méthanol par l'ajout d'un « dopant » polaire communément appelé co-solvant permettant ainsi d'augmenter le spectre des molécules extraites tout en préservant les composés thermolabiles (Molino, 2020).

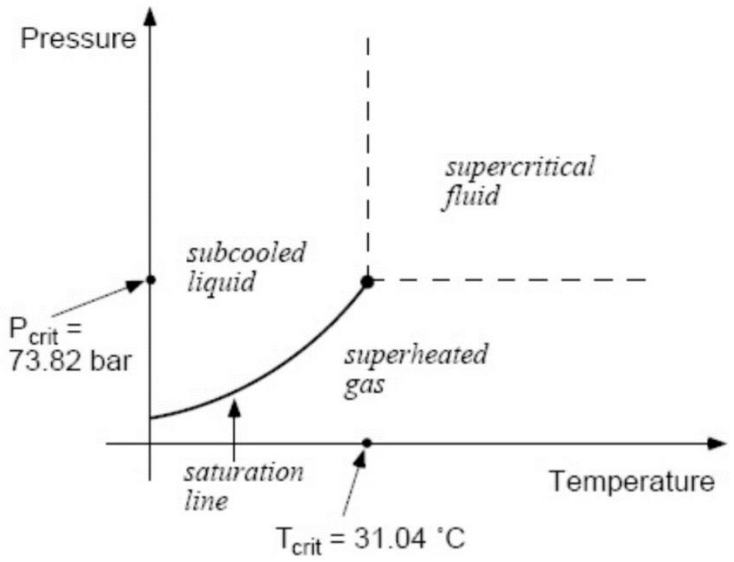



**Figure 20.** Diagramme de phases du $CO_2$ *(Pironon et al., 2007)*

Le $ScCO_2$ est utilisé dans plus de 90% des extractions SFE pour ses nombreux avantages: disponibilité, réutilisabilité, non-explosivité, haute densité permettant une haute sélectivité, faible toxicité, ininflammabilité, et faible prix (Chemat and Vorobiev, 2019; Khaw et al., 2017). De plus, la phase de séparation de l'extrait et du solvant est plus simple

car la dépressurisation du dioxyde de carbone entraîne son retour à l'état gazeux et peut-être ainsi récupéré et recyclé dans le réservoir de stockage.

Les applications du SFE couvrent la déterpénation des huiles essentielles (Danielski et al., 2008), les séparations et purifications chimiques, la régénération des adsorbants, le séchage aux points critiques, le traitement des eaux usées et des déchets solides, etc. Ce système a été développé au cours des dernières décennies, conduisant à un processus de mise à l'échelle industrielle afin de reproduire les mêmes extractions réalisées à l'échelle du laboratoire.

ii. Instrumentation

Comme d'autres techniques, l'équipement SFE est disponible à l'échelle du laboratoire, du pilote ou de l'industrie. Les éléments communs entre ces trois échelles sont les suivants : une pompe pour le solvant, une pompe modificatrice pour les solvants organiques ou l'eau, une cellule pour conserver l'échantillon, un régulateur de pression, une cuve d'extraction et une cuve de fractionnement (Figure 21). Par exemple, lorsque le $CO_2$ est utilisé comme solvant, il est transféré sous forme liquide (en dessous de 5°C) vers une zone de chauffage où il est chauffé sous haute pression pour atteindre l'état supercritique. Il s'écoule ensuite dans le récipient d'extraction à travers la matière biologique. Le mélange solvant-extrait arrive au séparateur où la pression est réduite. Celle-ci induit la variation de la densité du solvant, et donc de son pouvoir dissolvant, induisant le dépôt des extraits et le retour du $CO_2$ à l'état gazeux après refroidissement et décompression (Figure 22). Il peut être soit recyclé, soit rejeté dans l'atmosphère. (Sapkale et al., 2010; Gandhi et al., 2017; Khaw et al., 2017).

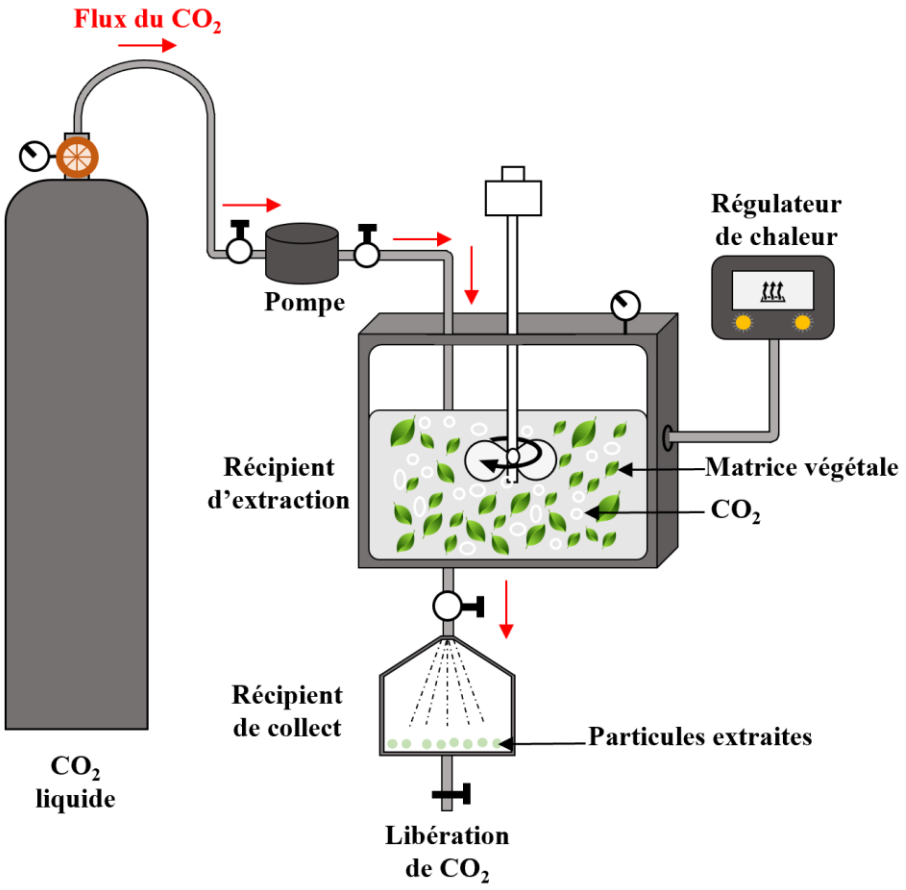



**Figure 21.** Schéma de principe du système SC-CO2

Un brevet récemment publié par Zhang et al., (2020) décrit un nouvel appareil portable d'extraction de fluide supercritique. Contrairement aux équipements industriels, cet appareil a l'avantage d'être léger et de pouvoir être porté par une seule personne, avec des composants mécaniquement passifs. Divers solvants peuvent être utilisés, dont le dioxyde de carbone, le n-hexane, l'éthanol, le méthanol, etc.

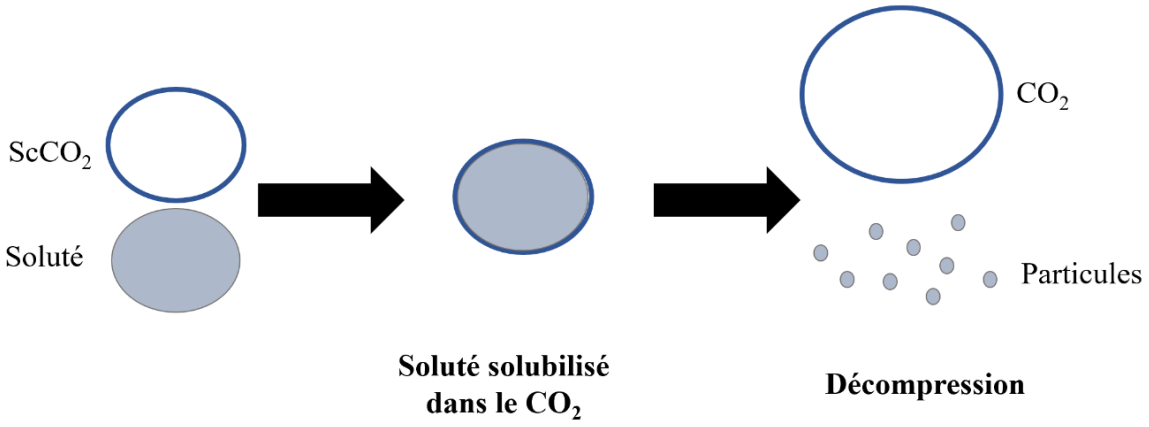



**Figure 22.** Rôle du scCO2 comme solvant dans les techniques de formation de particules (Chemat and Vorobiev, 2019)

### iii. Application dans l'analyse des aliments

L'application du SFE à l'échelle industrielle est de plus en plus courante pour répondre à la demande d'un processus plus durable et plus écologique. Cette technique utilise des quantités réduites de solvants, généralement verts, qui peuvent être recyclés et améliore les rendements d'extraction. Sa sélectivité lui permet d'extraire plusieurs composés d'intérêt de diverses matrices, à savoir les phénols, les huiles essentielles, et plus encore (Conde-Hernández et al., 2017; Valadez-Carmona et al., 2018; Frohlich et al., 2019; Patel et al., 2019; Soh et al., 2019; Alexandre et al., 2020; Rochfort et al., 2020).

**Tableau 4.** Extraction par fluide supercritique

| Matrice | Analyte | Conditions expérimentales | Détection et analyse | Référence |
|---|---|---|---|---|
| Cosse de cacao | Phénols | 60 **A**, 299 **B**, 6 mL/min **C**, 150 **D**, $CO_2$ + 13,7% Ethanol **E** | Méthode Folin-Ciocalteu | (Valadez-Carmona et al., 2018) |
| *Rosmarinus officinalis* | Huile essentielle | 40 **A**, 172.4 **B**, 126,2 ± 2 mL/min **C**, 180 **D**, $CO_2$ **E** | GC-MS | (Conde-Hernández et al., 2017) |
| Patchouli | Huile essentielle | 40 **A**, 120 **B**, 0,1667 g/s **C**, 240 **D**, $CO_2$ **E.** Taille des particules 0,3-0,6 mm | - | (Soh et al., 2019) |
| Feuilles de girofle (*Syzygium aromaticum)* | Eugénol | 40 **A**, 220 **B**, 1,99 g/min **C**, 80 **D**, $CO_2$ **E** | GC-MS | (Frohlich et al., 2019) |
| *Arbutus unedo* | Phénols | 55 **A**, 300 **B**, 10 g/min **C**, 90 **D**, $CO_2$ + 20% Ethanol **E** | GC-MS, LC- MS/MS | (Alexandre et al., 2020) |
| Cannabis | Cannabi-noïdes | 60 **A**, 320 **B**, 150 g/min **C**, 600 **D**, $CO_2$ **E** | UPLC-MS | (Rochfort et al., 2020) |
| Péricarpe de melon amer mûr | β-carotène | 70 **A**, ~390 **B**, 35 mL/min **C**, 190 **D**, $CO_2$ **E** | Chromatographie SF – Système UPC² | (Patel et al., 2019) |
| **A** : température (°C), **B** : pression (bar), **C** : débit, **D** : temps (min), **E** : solvant | | | | |

## 4- Comparaison et tendances futures

Le tableau 5 compare les avantages et les limites des techniques d'extraction abordées dans ce chapitre : l'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction par eau sous- critique (SWE) et l'extraction par fluide supercritique (SFE). Dans ce contexte, de nombreuses exigences en termes de directives de contrôle de la qualité, de réduction ou de substitution de l'utilisation de solvants, de réduction du temps d'extraction et de faibles coûts sont définies pour éviter l'aspect dangereux induit par ces techniques, à savoir les problèmes de pollution de l'eau et de l'environnement qui sont directement liés à l'utilisation intensive de solvants organiques volatils et à des intrants énergétiques plus élevés. Dans ce contexte, la combinaison de la chimie verte avec des technologies plus respectueuses de l'environnement devient obligatoire. Sans oublier les exigences de plus en plus manifestes des consommateurs qui deviennent plus sensibles aux modes de production respectueux de l'environnement, et de ce fait, ils incitent à l'usage permanent des énergies vertes.

L'extraction est par ailleurs une étape limitante ayant un impact important sur le développement, la modernisation et la valorisation du matériel biologique. Avec le développement de l'industrie, les exigences d'optimisation des rendements et de la qualité des extraits augmentent. Pour servir cet objectif, les techniques existantes sont développées pour améliorer la préparation des échantillons et les paramètres d'extraction afin d'augmenter l'efficacité tout en respectant l'aspect environnemental. Un nombre croissant de rapports sont publiés à ce sujet, incluant des combinaisons de techniques existantes, ou la réduction de l'utilisation de solvants dangereux.

**Tableau 5.** Comparaison des techniques de préparation des échantillons

| Nom | Extraction assistée par ultrasons (UAE) | Extraction assistée par micro-ondes (MAE) | Extraction à l'eau sous-critique (SWE) | Extraction par fluide supercritique (SFE) |
|---|---|---|---|---|
| **Description du système** | L'échantillon est immergé dans le solvant et soumis aux ultrasons à l'aide d'une sonde US ou d'un bain US. | L'échantillon est placé dans un récipient avec et sans solvant et soumis à l'énergie des micro-ondes. | L'échantillon est extrait sous haute pression (1-22,1 MPa) et température (100 °C - 374 °C). | L'échantillon est extrait en utilisant un fluide supercritique comme solvant (la température et la pression sont supérieures au point critique). |
| **Investissement** | Faible | Modéré | Haut | Modéré |
| **Facilité d'utilisation** | Facile à utiliser | Facile à utiliser | Facile à utiliser | Relativité facile à utiliser |
| **Utilisation de solvants** | 10 - 1000 ml par extraction | 10 - 1000 ml par extraction | 10 mL - 300mL par extraction | 10 - 1000 ml par extraction |
| **Taille de l'échantillon** | 1-100g | 11-100g | 1-100g | 1-100g |
| **Temps d'extraction** | 10-60 min | 3-30 min | 5-30 min | 5-30 min |
| **Principaux inconvénients** | Grand volume de solvant ; étape de filtration nécessaire ; non sélectif | Le solvant d'extraction doit absorber l'énergie des micro-ondes ; une étape de filtration est nécessaire ; faible sélectivité des solvants et des molécules. | Élimination difficile de l'humidité ; une dégradation thermique peut se produire à des températures plus élevées ; installation coûteuse. | Coût d'installation élevé ; connaissance technique des propriétés du SCF requise (par exemple, comportement de phase, région de croisement). |
| **Principaux avantages** | Facile à utiliser ; faible apport énergétique ; extraction rapide ; coût supplémentaire relativement faible. | Extraction rapide ; facile à manipuler ; pas de consommation de solvant ni de consommation modérée ; stabilité et reproductibilité élevées, coût modéré. | L'eau en tant que solvant est écologique, bon marché et facilement disponible ; l'extraction de composés polaires, modérément polaires, faiblement polaires et non polaires peut être séparée ; taux de diffusion élevé. | Petite quantité de solvant organique ou absence de solvant ; préserve les composés thermiquement labiles ; extraction sélective (petit nombre de composés extraits) ; peu coûteux à mettre en œuvre. |

# II- Amandes – Amandier *Prunus dulcis*

L'amandier [*Prunus dulcis* (Miller)] est un arbre de culture économiquement important. Comme en Méditerranée, les meilleurs climats pour les amandiers sont des étés chauds et secs et des hivers doux mais humides. En effet, la température idéale de croissance se situe entre 15 et 30 degrés Celsius. En plus de son intérêt économique incontestable, l'amandier a un intérêt reconnu dans le développement des écosystèmes fragiles, l'amélioration des terres marginales et l'embellissement du paysage.

## 1- Place de l'amande de 1400 avant J.-C. à nos jours

1400 avant J.-C., les amandes ont été mentionnées dans tous les domaines, de la mythologie grecque à la bible. Le livre des Nombres de la Bible raconte que le bâton d'Aaron a fleuri et porté des amandes. Dans la Rome antique, les romains dénommaient les amandes « noix grecques ». Ainsi, les jeunes mariés étaient couverts d'amandes, considérées alors comme un charme de fertilité. C'est le cas aujourd'hui en Amérique du Nord, où l'on offre des dragées. La culture de l'amandier s'est étendue entre le VII et le X$^{ème}$ siècle. Les amandiers fleurissent dans des régions telles que l'Espagne, le Maroc, la Grèce et Israël. L'Espagne est le seul pays à avoir conservé une industrie de l'amande importante, et a toujours été un producteur d'amandes. Au XVII$^{ème}$ siècle, les moines franciscains ont apporté l'amandier d'Espagne en Californie, mais le temps humide et frais a empêché toute plantation réussie avant le XIX$^{ème}$ siècle.

Au début du XX$^{ème}$ siècle, l'industrie californienne de l'amande est solidement établie et les croisements ont permis de créer plusieurs des variétés courantes d'aujourd'hui. Actuellement, l'État de Californie est le plus grand producteur d'amandes, avec environ 80 % de la production mondiale. Les amandes sont la première exportation agricole de la Californie et la plus grande culture de fruits à coque en termes de valeur totale en dollars et en superficie. Elles représentent également la plus grande exportation de cultures spécialisées des États-Unis (almonds.com).

## 2- Description botanique

L'amandier est une espèce qui appartient au sous-genre *Amygdalus* à l'intérieur du genre *Prunus*, de la famille des *Rosaceae* et de l'ordre des Rosales (Čolić et al., 2019; Martínez-Gómez et al., 2007) (Figure 23). Les amandiers sont des arbres à tronc et branches noueux et à des feuilles caduques et alternes avec une dormance rustique. D'une hauteur typique

de 3 à 4,5 mètres, les arbres sont d'une beauté saisissante lorsqu'ils sont en fleur. Ils produisent des fleurs parfumées, à cinq pétales, de couleur rose clair à blanc, en Février. En Mars avant le développement des feuilles, les fleurs sont auto-incompatibles et nécessitent donc des insectes pollinisateurs pour faciliter la pollinisation croisée avec d'autres variétés. Le fruit en pleine croissance (drupe) ressemble à une pêche jusqu'à ce qu'il arrive à maturité, où l'enveloppe extérieure coriace, ou brou, se fend, s'enroule vers l'extérieur et libère le noyau. Les amandes douces ont une longueur moyenne de 2,3 cm, une largeur de 1,4 cm et une épaisseur de 0,8 à 1,0 cm. Elles ont une saveur délicate, aromatique et sucrée. Extérieurement, les graines sont ovales, asymétriques, aplaties, pointues à une extrémité et arrondies à l'autre, avec une enveloppe externe qui les protège des conditions environnementales et de la récolte (Beltrán Sanahuja et al., 2021).

Malgré leur appellation courante, les amandes ne sont pas de véritables noix (un type de fruit sec), mais plutôt des graines enfermées dans une enveloppe de fruit dur (Petruzzello, 2021).




**Figure 23.** Amandes en fleur et amandes mûres (Masclef, 1890)

**Tableau 6.** Taxonomie de l'amandier

| | |
|---|---|
| **Règne** | *Plantae* |
| **Sous-règne** | *Viridaeplantae* |
| **Classe** | *Equisetopsida* |
| **Sous-classe** | *Magnoliidae* |
| **Ordre** | *Rosales* |
| **Famille** | *Rosaceae* |
| **Genre** | *Prunus L/* |
| **Espèce** | *Prunus dulcis (Mill.) D.A.Webb* |

## 3- Cycle de vie des amandes

Pendant la période d'inactivité, de novembre à janvier, les amandiers passent par une période de dormance, perdant leurs feuilles et se refroidissant dans les hivers frais et humides. Les sols des vergers stockent l'eau de pluie pour la saison de croissance à venir, et les arbres stockent les nutriments et l'énergie pour la récolte de l'année suivante. Vers la fin de la période de dormance, les bourgeons commencent à gonfler sur les branches de chaque arbre en vue de la floraison.

Entre mi-février et mi-mars, les bourgeons des amandiers éclatent en fleurs blanches et rose pâle. Pendant cette période, les apiculteurs amènent des ruches dans les vergers pour aider à la pollinisation de la culture. À mesure que les arbres fleurissent, les abeilles butinent le pollen et le nectar, qu'elles ramènent à leur ruche comme leur première source de nourriture naturelle de l'année. Lorsque les abeilles se déplacent d'un arbre à l'autre, elles assurent la pollinisation des amandes en cours de route en déplaçant le pollen entre les différentes variétés d'arbres cultivés dans chaque verger.

De mars à juin, les amandes mûrissent et atteignent leur taille maximale, tandis que la coque durcit autour d'elles. Toutes deux protégées par une coque extérieure duveteuse (brou). Une fois que les pluies printanières cessent et que le temps se réchauffe, les agriculteurs commencent à irriguer leurs vergers pour soutenir la récolte en cours. C'est également à cette période que les amandes vertes peuvent être récoltées pour diverses utilisations culinaires.

En juillet, les coques des amandes s'ouvrent, exposant la coque de l'amande et permettant à celle-ci et à l'amande à l'intérieur de sécher. Peu avant la récolte, les coques prennent une couleur jaune paille et s'ouvrent complètement.

D'août à octobre, des « secoueurs » mécaniques d'arbres recueillent la récolte en la secouant vigoureusement au sol. Protégées par leurs enveloppes et leurs coques, les amandes sèchent ensuite naturellement au soleil pendant 7 à 10 jours. Chaque variété d'amande est récoltée séparément.

Les amandes vont dans une installation de décorticage où elles passent dans un rouleau pour enlever la coque, le brou et tous les débris du verger, comme les bâtons et les pierres. Elles sont ensuite soit stockées pour conditionnement, soit expédiées pour traitements ultérieures (Topitzhofer et al., 2019).

Des amandes entières aux amandes blanchies, tranchées et coupées en dés, en passant par la farine d'amande, la pâte d'amande, le beurre, l'huile, le lait et bien d'autres encore, les amandes sont très polyvalentes, rassasiantes et riches en éléments nutritifs d'origine végétale.

## 4- Composition et bienfaits

Les amandes sont riches en nutriments - elles ont un faible indice glycémique et pour environ 23 amandes, elles fournissent 6 grammes de protéines végétales, 4 grammes de fibres alimentaires rassasiantes, 13 grammes de graisses insaturées, ainsi que des vitamines et des minéraux importants, notamment de la vitamine E (50 % de la valeur quotidienne), du magnésium (20 % de la valeur quotidienne) et du potassium (4 % de la valeur quotidienne) - ce qui en fait un produit idéal pour un mode de vie sain (figure 24).

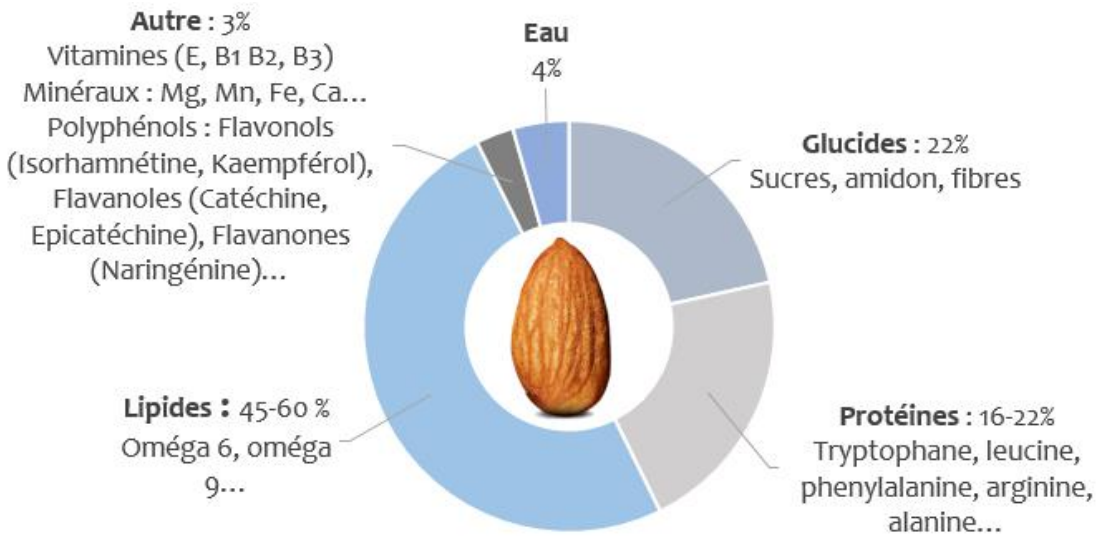



**Figure 24.** Composition de l'amande

Comparées à d'autres fruits à coques, les amandes sont les plus riches en vitamine E et de riboflavine. Elles sont également faibles en calories et en graisses saturées et offrent 4 grammes de fibres dans chaque poignée. Le tableau suivant une comparaison des amandes avec d'autres fruits à coques.

**Tableau 7.** Comparaison des nutriments des fruits à coque *(FoodData Central, 2019)*

| Résultats basés sur une portion de 28 g | Amandes | Noix de cajou | Noisette | Noix de pécan | Pistache | Noix |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Calories** | 160 | 160 | 180 | 200 | 160 | 190 |
| **Protéines (g)** | 6 | 4 | 4 | 3 | 6 | 4 |
| **Lipides (g)** | 14 | 13 | 17 | 20 | 13 | 18 |
| **Acides gras saturés (g)** | 1 | 3 | 1.3 | 2 | 1.5 | 1.5 |
| **Acides gras polyinsaturés (g)** | 3.5 | 2 | 2 | 6 | 4 | 13 |
| **Acides gras mono-insaturés (g)** | 9 | 8 | 13 | 12 | 7 | 2.5 |
| **Glucides (g)** | 6 | 9 | 5 | 4 | 8 | 4 |
| **Fibres (g)** | 4 | 1 | 3 | 3 | 3 | 2 |
| **Folate (mg)** | 12 | 20 | 32 | 6 | 14 | 28 |
| **Niacine (mg)** | 1 | 0.4 | 0.5 | 0.3 | 0.4 | 0.3 |
| **Riboflavine (mg)** | 0.3 | 0.1 | 0 | 0 | 0.1 | 0 |
| **Vitamine B6 (mg)** | 0 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.3 | 0.2 |
| **Vitamine E (mg)** | 7/3 | 0.3 | 4.3 | 0.4 | 0.6 | 0.2 |
| **Calcium (mg)** | 76 | 13 | 32 | 20 | 30 | 28 |
| **Cuivre (mg)** | 0.3 | 0.6 | 0.5 | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| **Fer (mg)** | 1.1 | 1.7 | 1.3 | 0.7 | 1.1 | 0.8 |
| **Magnésium (mg)** | 77 | 74 | 46 | 34 | 31 | 45 |
| **Manganèse (mg)** | 0.6 | 0.2 | 1.8 | 1.3 | 0.4 | 1 |
| **Phosphore (mg)** | 136 | 139 | 82 | 79 | 133 | 98 |
| **Potassium (mg)** | 208 | 160 | 193 | 116 | 285 | 125 |
| **Zinc (mg)** | 0.9 | 1.6 | 0.7 | 1.3 | 0.7 | 0.9 |

Une méta-analyse et une revue systématique de 2016 ont examiné l'étendue des recherches sur les amandes et la santé cardiaque. L'analyse de 18 essais contrôlés aléatoires publiés avec un total de 837 participants a montré des effets favorables significatifs des amandes sur le cholestérol total, le cholestérol LDL (Low Density Lipoprotein, ou lipoprotéines de faible densité) et les triglycérides, sans changement des niveaux de cholestérol HDL (High Density Lipoprotein , ou lipoprotéine de haute densité) (Musa-Veloso et al., 2016; Harnafi et al., 2021). Les effets des amandes sur le cholestérol total étaient dose-dépendants, une plus grande consommation d'amandes entraînant une plus grande réduction du cholestérol total.

Dans la majorité des études menées auprès de personnes souffrant d'hypercholestérolémie, la consommation quotidienne de 28 à 114 grammes d'amandes a entraîné une réduction significative des taux de cholestérol total et de LDL (Jenkins et al., 2002; Spiller et al., 1998; Tamizifar et al., 2005).

D'autres études ont examiné les effets sur les facteurs de risque émergents des maladies cardiovasculaires, tels que l'inflammation et la graisse abdominale. Une étude d'alimentation croisée contrôlée a évalué les effets des amandes sur les marqueurs de l'inflammation chez 25 adultes en bonne santé (âgés de 22 à 53 ans) (Rajaram et al., 2010). Les participants ont été soumis à trois régimes alimentaires différents pendant quatre semaines chacun : un régime de contrôle sain pour le cœur (pas de noix, <30% des calories provenant des graisses), un régime modéré à base d'amandes (10% des calories provenant des amandes) et un régime riche en amandes (20% des calories provenant des amandes). La sélectine-E (un marqueur d'inflammation) diminuait à mesure que le pourcentage d'énergie provenant des amandes augmentait. La protéine C-réactive (un autre marqueur d'inflammation) était plus faible dans les deux régimes aux amandes par rapport au régime de contrôle. Bien que tous les marqueurs d'inflammation n'aient pas été améliorés, ces résultats suggèrent que l'inclusion des amandes dans un régime alimentaire sain pour le cœur peut aider à améliorer deux marqueurs importants, la protéine C-réactive et la sélectine-E, et contribuer ainsi à la prévention des maladies cardiaques.

Les amandes peuvent avoir un effet sur le diabète. En 2019, une étude d'une durée de six mois menée auprès de 50 Indiens d'Asie atteints de diabète de type 2 et présentant un taux de cholestérol élevé a examiné l'effet de la consommation des amandes sur les facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (Wien et al., 2010). Pendant une période de test de trois semaines, les participants ont suivi un régime alimentaire standard conforme aux recommandations diététiques pour les Indiens d'Asie et adapté au diabète. Les participants ont également été amenés à marcher pendant 45 minutes au moins cinq jours par semaine afin de normaliser leur activité physique et ont reçu pour instruction de maintenir le même niveau d'activité pendant le reste de l'étude. Des amandes entières naturelles non grillées (20 % de l'apport énergétique) ont substitué les graisses (telles que l'huile de cuisson et le beurre) et certains glucides dans le groupe. Après la consommation des amandes, le tour de taille, le rapport taille-hauteur, le cholestérol total, les triglycérides, le cholestérol LDL, la protéine C-réactive (un indicateur d'inflammation) et l'hémoglobine A1 (un indicateur de contrôle de la glycémie à long terme) se sont améliorés chez les participants. Les

résultats de l'étude montrent que l'incorporation d'amandes dans un régime alimentaire sain et équilibré a de multiples effets bénéfiques sur la glycémie et les facteurs de risque cardiovasculaire.

L'ensemble des preuves scientifiques précédemment énoncées suggère qu'en dépit de leur densité énergétique relativement élevée, les amandes, lorsqu'elles sont consommées dans le cadre d'une alimentation saine, ne provoquent pas de prise de poids et peuvent même avoir des effets bénéfiques sur la composition corporelle, en particulier chez les adultes en surpoids ou obèses.

Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer les associations positives entre les amandes et les autres fruits à coque, d'une part, et l'équilibre énergétique et le poids corporel, d'autre part. Ces mécanismes incluent leurs forts effets de satiété et l'augmentation possible de la dépense énergétique au repos (Flores-Mateo et al., 2013).

## 5- Production mondiale

Les amandes ont besoin de soleil, d'un climat chaud et d'une grande quantité d'eau pour se développer et produire des noix. Comme elles sont particulièrement vulnérables au froid, des endroits comme la Californie sont idéaux pour la culture des amandes. Au cours des dernières années, la production d'amandes décortiquées a augmenté dans le monde entier, passant de 1,03 millions de tonnes en 2014/2015 à 1,35 million de tonnes en 2018/2019 (Tableau 3)(Beltrán Sanahuja et al., 2021).

L'amande est le fruit à coque le plus important au monde en termes de production commerciale. Sur la base des données de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization – FAOSTAT 2019), la production d'amandes s'élève actuellement à environ 3,54 millions de tonnes (moyenne, en coque). Cette production est menée par les États-Unis fournissant 55 % du total mondial. Les autres principaux producteurs étaient l'Espagne, l'Iran et la Turquie. Le Maroc, quant à lui, a été classé parmi les 7 pays producteurs à l'échelle mondiale et est responsable de la production de plus de 4% des amandes (Figure 25).

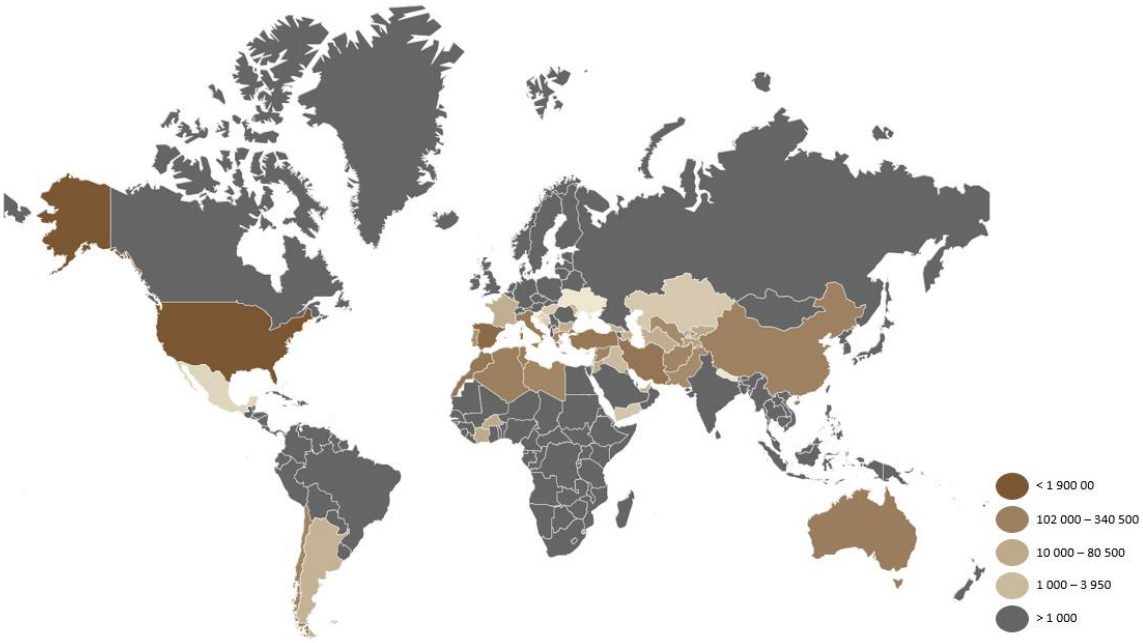



**Figure 25.** Carte mondiale de la production d'amandes en tonnes (FAOSTAT-2019)

**Tableau 8.** Production d'amandes par les 7 premiers pays producteurs d'amandes. Les données sont exprimées en tonnes par an.

| Pays | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Etats-Unis** | 1 545 500 | 1 302 998 | 1 376 337 | 1 476 539 | 1 872 500 | 1 936 840 |
| **Espagne** | 195 704 | 211 084 | 199 167 | 255 503 | 339 033 | 340 420 |
| **Australie** | 55 978 | 63 331 | 72 902 | 75 373 | 69 880 | 146 410 |
| **Maroc** | 101 026 | 97 723 | 112 681 | 116 923 | 117 270 | 102 185 |
| **Iran** | 136 338 | 146 000 | 111 845 | 129 566 | 139 029 | 177 015 |
| **Italie** | 74 016 | 70 399 | 74 584 | 79 599 | 79 801 | 77 300 |
| **Turquie** | 73 230 | 80 000 | 85 000 | 90 000 | 1000 | 1500 |

## III- Composés phénoliques

La dénomination générale « composés phénoliques » fait référence aux mono-, di- et polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs cycles benzéniques portant un ou plusieurs groupes hydroxyles (-OH), libres ou engagés à une autre fonction éther, ester ou hétéroside (Balasundram et al., 2006).

On trouve généralement les composés phénoliques dans la nature sous forme de glycosides (Macheix et al., 2005). Ils font partie des métabolites secondaires retrouvés

dans les plantes et jouent un rôle important dans leurs interactions avec leur environnement (Richter, 1993).

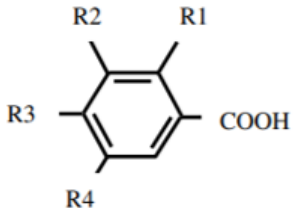
Les études sur les métabolites secondaires des plantes se sont multipliées au cours des 16 dernières années et ces composés ont été sérieusement considérés pour leurs fonctions biologiques diverses. En plus de leur capacité à améliorer la santé humaine (Spiller et al., 1998; Jenkins et al., 2002; Wien et al., 2010; Valdés et al., 2015), les polyphénols peuvent agir en tant que antiappétents, phytoalexines (accumulation en réponse à une attaque par des microorganismes), attractifs pour les pollinisateurs, pigments, saveurs, agents antioxydants et de protection contre les UV (Naczk and Shahidi, 2004, 2006). À l'avenir, leur utilisation devrait augmenter progressivement en raison de la demande croissante de produits peu transformés, de préférence ceux contenant des additifs naturels.

## 1- Classes de polyphénols

La classe de composés phénoliques englobe plus de 8000 composés naturels classés en plusieurs catégories selon leur structure (Keys and VAN BUCHEM, 1981; Gerber, 1994; Garcia-Salas et al., 2010). Leur taille varie d'environ cent daltons à plusieurs milliers de daltons (Phenol Explorer, 2016) .

### a. Acides phénoliques

Ces composés sont divisés en deux catégories : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ils sont présents sous forme libre ou liée à des esters ou des hétérosides (figure 26) (Farag et al., 2003; Kapsokefalou et al., 2006).



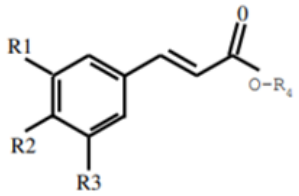

R1 = R2 = R3 = R4 = H : **acide benzoïque** (non phénolique)
R1 = R2 = R4 = H, R3 = OH : **acide p-hydroxybenzoïque**
R1 = R4 = H, R2 = R3 = OH : **acide protocatéchique**
R1 = R4 = H, R2 = OCH3, R3 = OH : **acide vanillique**
R1 = H, R2 = R3 = R4 = OH : **acide gallique**

**Figure 26.** Acides hydroxybenzoïques et dérivés

Les acides hydroxybenzoïques sont abondants sous forme simple comme l'acide gallique ou l'acide protocatéchique, ou de structure complexe (gallotanins dans les mangues et

ellagitannins dans les fruits rouges et l'oignon) (Manach et al., 2004; Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Il existe des plantes riches en acides hydroxybenzoïques, et leur concentration atteind plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme. Par exemple, les feuilles de thé peuvent contenir jusqu'à 4,5 g d'acide gallique /kg de poids frais.

Les acides hydroxycinnamiques sont plus présents dans les plantes que les acides hydroxybenzoïques. Ils sont souvent retrouvés sous forme estérifiée, amidifiée ou combinée avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou polyols (acide quinique) (Achat, 2013) (Figure 27). L'acide caféique, principal représentant de cette classe, est omniprésent dans les plantes, en particulier dans les fruits (Goupy et al., 1990). Il est présent sous forme libre et estérifiée (acide chlorogénique) et représente plus de 75% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques. L'acide chlorogénique est très abondant dans le café. Une tasse peut contenir jusqu'à 350 mg (Manach et al., 2004).




R1 = R2 = R3 = R4 = H : **acide cinnamique** (non phénolique)
R1 = R3 = R4 = H, R2 = OH : **acide p-coumarique**
R1 = R2 = OH, R3 = R4 = H : **acide caféique**
R1 = OCH3, R2 = OH, R3 = R4 = H : **acide férulique**
R1 = R3 = OCH3, R2 = OH, R4 = H : **acide sinapique**
R1 = R2 = OH, R3 = H, R4 = **acide quinique : acide chlorogénique**

**Figure 27.** Acides hydroxycinnamiques et dérivés

b. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent une classe de métabolites secondaires très présents chez les végétaux. Ce sont des pigments pratiquement universels chez les plantes et sont partiellement responsables de la coloration des fleurs et dans le processus de défense contre les UV et les attaques des microorganismes (Panche et al., 2016). Ils sont composés de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane formant une structure $C_6$-$C_3$-$C_6$.

Le terme flavonoïde couvre une très large gamme de composés polyphénoliques naturels qui peuvent être divisés en plusieurs sous-classes selon la structure de de l'hétérocycle central et le degré d'oxydation (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). On trouve principalement : les flavan-3-ols, les flavonols, les flavones, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines (Figure 28).

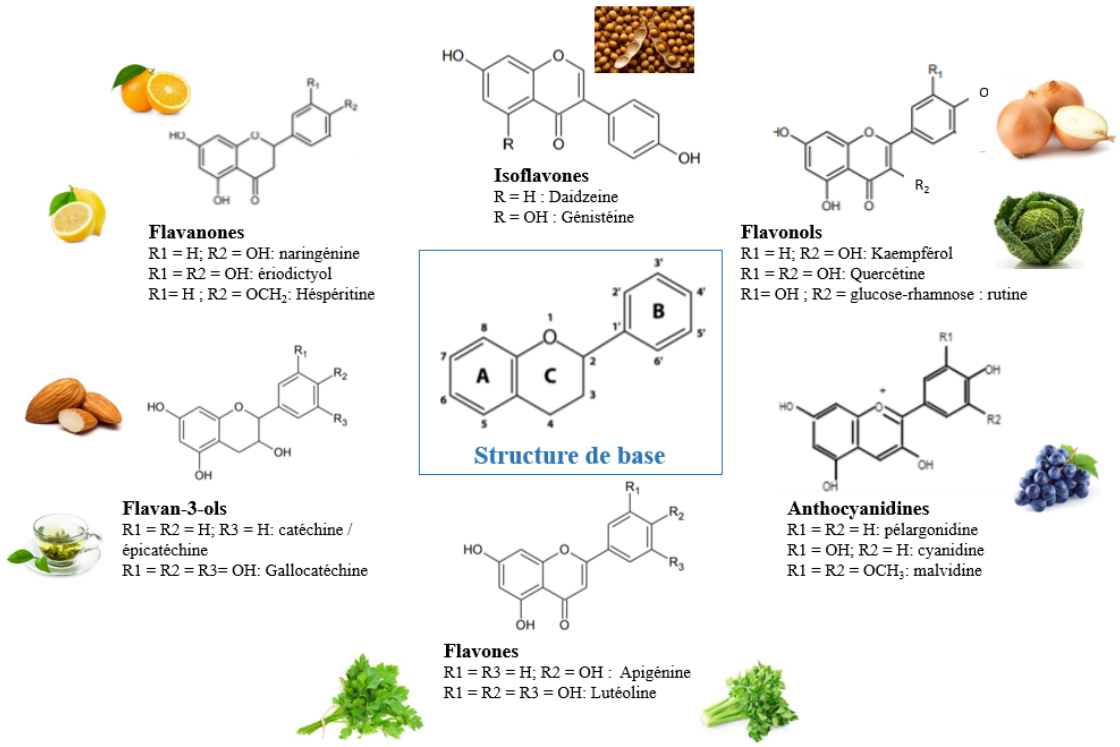



**Figure 28.** Classes, sous-classes et principales sources naturelles de flavonoïdes

i. Flavan-3-ols

Les flavan-3-ols sont la classe la plus complexe des flavonoïdes et la plus importante dans les amandes. Ils existent sous forme monomérique (catéchine et son isomère épicatéchine), oligomérique, et polymérique (proanthocyanidines). Ils peuvent ainsi être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines qui se trouvent surtout dans le thé (Chira et al., 2008).

ii. Flavonols

Les flavonols sont les plus présents dans les aliments. Ils existent sous forme d'aglycone ou d'hétérosides (liés à des aldoses : D-glucose et L-rhamnose) (Crozier, 2003). Les molécules principales qui représentent cette classe sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les sources les plus riches en flavonols incluent les oignons (jusqu'à 1,2 g/kg de

matière fraiche), le chou, le poireau et les baies (cassis) (115 mg/kg de matière sèche) (El Gharras, 2009).

iii. Flavones

Les flavones sont largement présents dans les feuilles, les fleurs et les fruits sous forme de glucosides. Le céleri, le persil, les poivrons rouges, la camomille et la menthe sont parmi les principales sources de flavones. La lutéoline et l'apigénine appartiennent à cette sous-classe de flavonoïdes. Ils peuvent aussi se trouver sous forme de flavones polyméthoxylées dans les peaux de citron (Manach et al., 2004; Panche et al., 2016).

iv. Flavanones

Les flavanones, appelés également dihydroflavonols, sont généralement présents dans les agrumes, les tomates et certaines plantes aromatiques. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'hespéritine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron (Shahidi and Naczk, 2003). Les flavonones présentent beaucoup d'avantages pour la santé en raison de leurs propriétés de piégeage des radicaux libres. Ces composés sont responsables du le goût amer du jus et de l'écorce des agrumes (Panche et al., 2016).

v. Isoflavones

Les isoflavones ont une distribution limitée dans le règne végétal et se trouvent principalement dans le soja (entre 140 et 1530 mg par kg de matière fraiche) et d'autres légumineuses (Eisen et al., 2003). Ces sources contiennent les trois principales molécules (génistéine, daidzéine et glycitéine). Les isoflavones sont généralement considérées comme des phyto-œstrogènes en raison de leur activité œstrogénique dans certains modèles animaux (Panche et al., 2016).

vi. Anthocyanidines

Les anthocyanes, un sous-groupe des anthocyanidines, sont des pigments responsables des couleurs des plantes, des fleurs et des fruits. La cyanidine, la delphinidine, la malvidine, la pélargonidine et la péonidine sont les anthocyanines les plus étudiées. Elles se trouvent principalement dans les couches cellulaires externes de divers fruits tels que les canneberges, les cassis, les raisins rouges, les raisins merlot, les framboises, les fraises, les myrtilles, les myrtilles et les mûres. La stabilité de ces composés, associée à leurs avantages pour la santé, facilite leur utilisation dans l'industrie alimentaire pour diverses

applications. Ces pigments sont rouges en milieu acide et virent au bleu-violet en milieu neutre ou faiblement alcalin (Giusti and Wrolstad, 2003; Košir et al., 2004; Achat, 2013).

c. Alcools phénoliques

Les alcools phénoliques sont des composés qui possèdent au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Les principales molécules de cette classe sont le tyrosol (4-hydroxyphényléthanol) et l'hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphényléthanol) (Figure 29). Ces molécules sont présentes abondamment dans les feuilles et fruits de l'olivier sous forme libre ou associée à l'acide élénolique (Micol et al., 2005; Long et al., 2010; Silva et al., 2010; Achat, 2013).

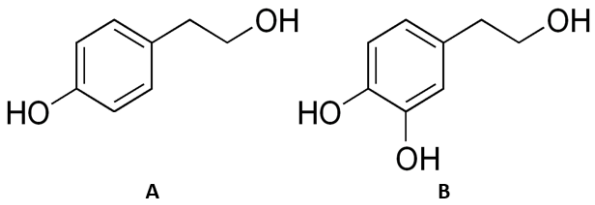



**Figure 29.** Tyrosol (A) et Hydroxytyrosol (B)

d. Tanins

Le terme tanin désigne le groupe des composés phénoliques qui ont la capacité à tanner le cuir après combinaison aux protéines. Ces composés complexes forment un groupe de polyphénols à haut poids moléculaire fortement hydroxylées. Ils peuvent former des composés insolubles en s'associant aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives et réduisent ainsi la digestibilité des aliments (Ref'at et al., 2008). Les tanins sont divisés en deux groupes (Figure 30) :

- Tanins hydrolysables : esters du D-glucose et de l'acide gallique ou dérivés. Ces composés d'hydrolysent facilement par voie chimique ou enzymatique
- Tanins condensés (TC) :

Appelés également proanthocyanidines, ce sont des polymères de flavan-3,4-diol liés majoritairement par des liaisons C4-C8 (parfois C4-C6). Les proanthocyanidines contenant exclusivement l'(épi)- catéchine sont appelées procyanidines, tandis que celles contenant de l'afzéléchine ou de la gallocatéchine sont appelés propélargonidines ou prodelphinidines, respectivement (L. Zhang et al., 2016).

Suite à leur complexation avec les protéines salivaires, ils sont responsables de l'astringence des fruits avant maturité, de certaines boissons et de l'amertume du chocolat (Achat, 2013).

Les procyanidines occupent la deuxième place parmi les composés phénoliques naturels les plus abondants sur terre (Hou and Wang, 2021) et sont retrouvés principalement dans les fruits, les légumes, les fleurs, le vin, les noix, les haricots et les graines (Gu et al., 2004; Meeran and Katiyar, 2008). En plus de leur pouvoir antioxydant, ils sont utilisées pour stabiliser les colorants alimentaires et prévenir le rancissement dû à l'oxydation des graisses insaturées (Rue et al., 2018).

Les TC peuvent être classifiés selon leur degré de polymérisation (DP) ; les TC dont le degré de polymérisation est compris entre 2 et 4 et supérieur à 4 sont appelés respectivement procyanidines oligomères et procyanidines polymères (Yamakoshi et al., 2002). Les oligomères sont biodisponibles, alors que les polymères ne le sont pas. L'intérêt de dépolymériser les procyanidines est de transformer les polymères en oligomères absorbables (Liu et al., 2013).

Après l'administration orale de procyanidines, le premier passage d'absorption est la digestion gastrique in vivo. Il a été rapporté que les oligomères de procyanidines pouvaient être décomposés en dimères et monomères (épicatéchine ou catéchine) dans le suc gastrique à pH 2,0 (L. Zhang et al., 2016). Ainsi, ils peuvent être dépolymérisés en anthocyanidols ou anthocyanidines par traitement acide à chaud (Dupent, 2019). La dépolymérisation alcaline est également possible pour produire des procyanidines de faible poids moléculaire.

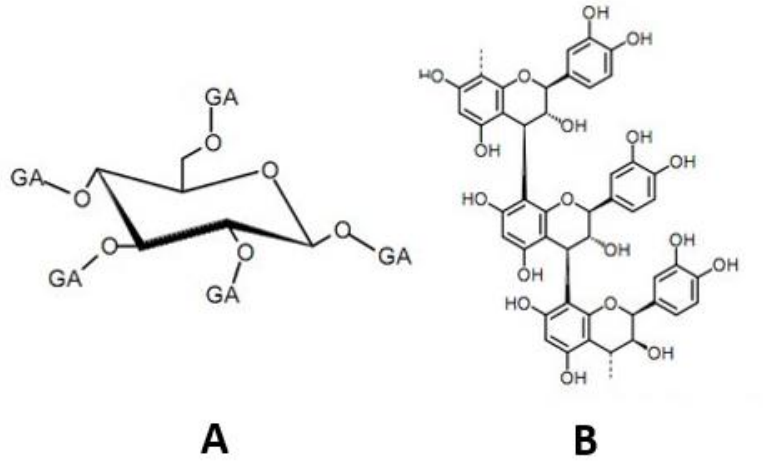



**Figure 30.** (A) Tanin hydrolysable. GA *:* Acide gallique. (B) Tanin condensé (procyanidine) (Lamy et al., 2011)

## 2- Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des polyphénols

### a. Propriétés antioxydantes

Les composés phénoliques jouent un rôle primordial dans la protection contre les effets délétères de l'oxygène. L'activité antioxydante des polyphénols est basée sur leur caractère réducteur et donneur d'électrons aux radicaux libres qui récupèrent des électrons pour retrouver un état plus stable (Dangles, 2006). Ces espèces oxygénées réactives sont responsables du développement de certaines pathologies dégénératives ou encore de la dégradation de lipides polyinsaturés dans les aliments. Ce processus conduit à la formation d'espèces lipidiques oxydées (époxydes, hydroperoxydes, aldéhydes) qui diminuent les propriétés organoleptiques (détérioration du goût, rancissement) et la valeur nutritionnelle des aliments en réagissant avec les autres ingrédients alimentaires (vitamines, protéines, autres lipides) (Sánchez-Alonso et al., 2007; Gülçin et al., 2010; Achat, 2013).

Les polyphénols agissent selon deux modes d'action :

- Transfert d'hydrogène : stabilisation des radicaux libres peroxyles ROO• sous forme d'hydro peroxydes (ROOH). Les radicaux phénoliques sont stabilisés par mésomérie (Figure 31).

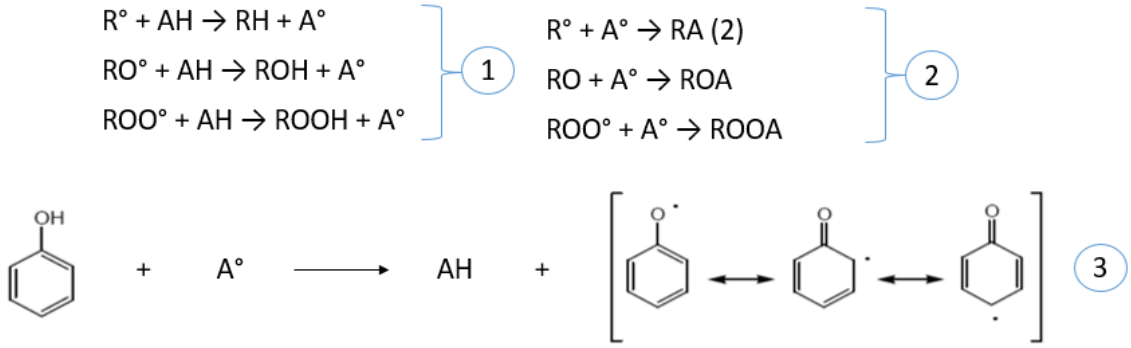



**Figure 31.** (1) & (2) Mode d'action des antioxydants par transfert d'hydrogène. (3) Stabilisation du radical phénolique par mésomérie (Cheynier et al., 2006; Duchêne-Massias, 2015)

- Transfert d'électrons : formation d'un radical cation puis déprotonation rapide et réversible en solution (figure 32).

$RO_2^{\circ} + ArOH \rightarrow RO_2^{-} + ArOH^{+}$ (transfert d'électrons)
$ArOH^{+} + H_2O \rightarrow ArO^{\circ} + H_3O^{+}$ (équilibre de déprotonation)
$RO_2^{-} + H_3O + \rightarrow ROOH + H_2O$ (formation de l'hydropéroxyde)

$RO2^{\circ} + ArOH \rightarrow ROOH + ArO^{\circ}$ (bilan)

**Figure 32.** Mode d'action des antioxydants par transfert d'électron (Duchêne-Massias, 2015)

Les composés phénoliques ayant une activité antioxydante ont été identifiés par plusieurs auteurs dans différents produits et sous-produits agricoles, tels que les olives, les raisins et les amandes (Adámez et al., 2012; Oroian and Escriche, 2015; Martillanes et al., 2017; Tabib et al., 2020). Cette activité a été comparée à celle des antioxydants synthétiques alimentaires tels que le butyl-hydroxytoluène (BHT), le butyl-hydroxyanisole (BHA) et la tertbutylhydroquinone (TBHQ) (Marranzano et al., 2018). Dans l'industrie agroalimentaire, les antioxydants d'origine végétale sont applicables sur des huiles comestibles. Par exemple, des extraits de coque de pistache utilisés à une concentration de 0,06 % (p/p) étaient aussi efficaces que le BHA et le BHT à 0,02 % pour inhiber l'oxydation de l'huile de soja à 60 °C (Goli et al., 2005).

Les polyphénols à fort pouvoir antioxydant sont utilisés de manière progressive pour leurs effets bénéfiques pour la santé grâce à leur rôle dans la prévention de nombreuses maladies, telles que le cancer et l'activité inflammatoire (Veeriah et al., 2006; García-Lafuente et al., 2009; Boateng and Verghese, 2012). Cet effet implique une biodisponibilité au niveau des intestins, le métabolisme par la microflore, le métabolisme

hépatique et intestinal, la captation cellulaire, le métabolisme dans les tissus cibles, la sécrétion biliaire et l'excrétion urinaire (Manach et al., 2006) (Figure 33).

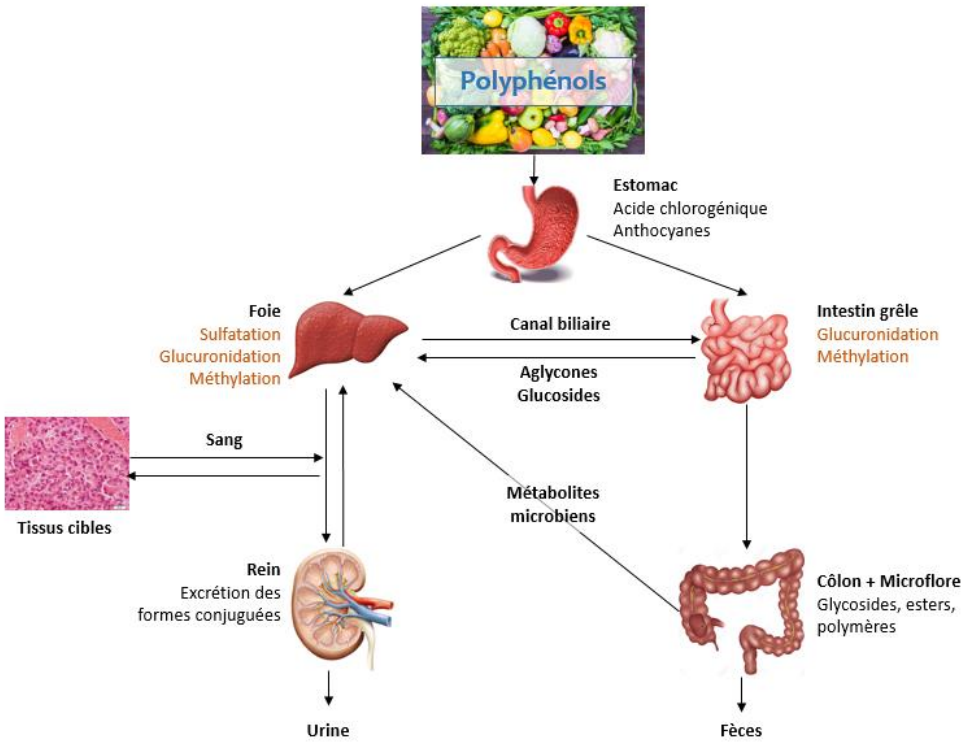



**Figure 33.** Schéma général de biodisponibilité des polyphénols (Manach et al., 2006; Achat, 2013)

b. Propriétés antimicrobiennes

L'utilisation d'antimicrobiens naturels pour la conservation des aliments est une tendance suivie à la fois par les consommateurs et les industriels de l'agroalimentaire. Les exigences et la demande croissante d'aliments bio suscitent un intérêt croissant pour les antimicrobiens naturels, qui présentent un effet antagoniste efficace contre un large éventail de micro-organismes indésirables dans les aliments. Dans ce contexte, il a été démontré que les polyphénols prolongent la durée de conservation de certains produits alimentaires grâce à leur activité antimicrobienne, et qu'ils peuvent également agir comme inhibiteurs des micro-organismes pathogènes.

Les extraits phénoliques peuvent affecter la croissance et le métabolisme de plusieurs micro-organismes, notamment *Listeria monocytogenes* (Vaquero et al., 2007), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella poona*, *Bacillus cereus* (Mandalari et al., 2010a) ainsi que sur diverses souches de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*.

Mécanisme : Les groupes OH des composés phénoliques interagissent avec la membrane cellulaire des bactéries par liaison hydrogène. Il est important de noter que la présence de groupes fonctionnels OH est pertinente pour l'activité antibactérienne de nombreux composés phénoliques (Bouarab Chibane et al., 2019). En effet, l'interaction des composés phytochimiques avec les membranes cellulaires bactériennes provoque généralement soit la rupture de la structure membranaire, ce qui induit une perte de contenu cellulaire, soit la délocalisation des électrons (à cause des doubles liaisons du noyau aromatique), ce qui entraîne une dépolarisation des bactéries (agissant comme des échangeurs de protons) et affecte ainsi la force motrice protonique, réduisant le gradient de pH à travers la membrane et le niveau du pool d'ATP60. Cette série de mécanismes initiés par les groupes hydroxyle actifs des substances phénoliques peut conduire à la mort cellulaire. En outre, il a été signalé que la position relative du groupe OH sur le noyau phénolique influence l'efficacité antibactérienne des composés phénoliques (Figure 34).

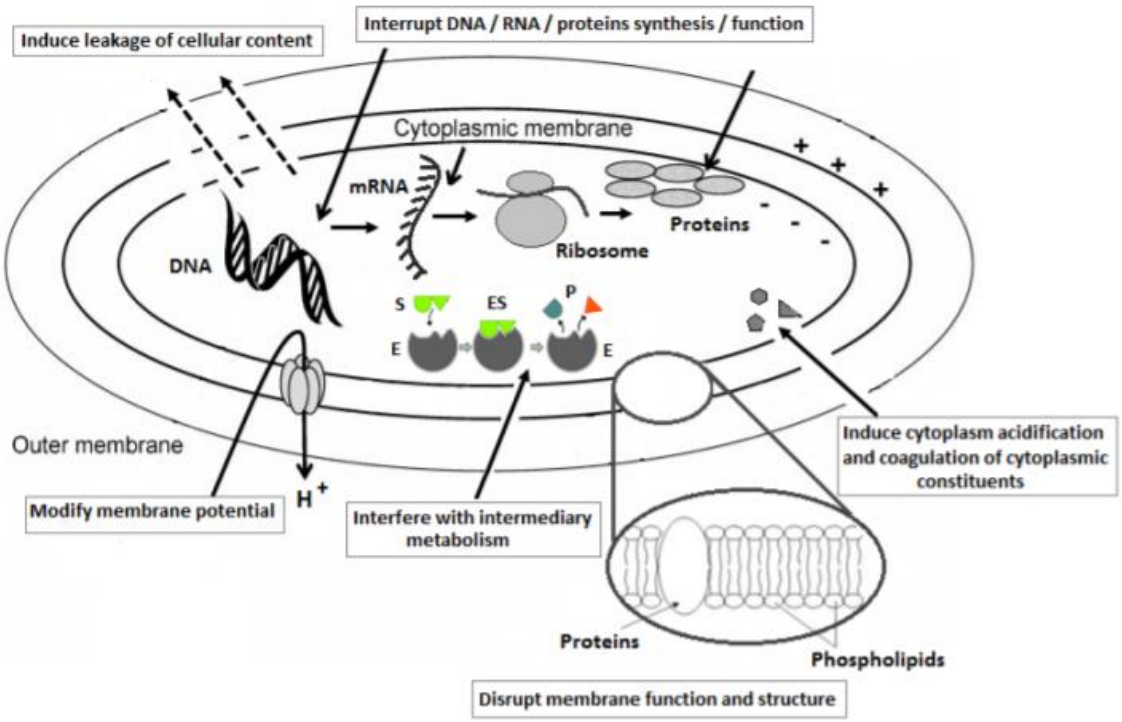



**Figure 34.** Différents sites d'action des polyphénols antimicrobiens au niveau cellulaire (Bouarab Chibane et al., 2019)

## 3- Applications – encapsulation des polyphénols

L'efficacité des polyphénols dépend de la préservation de la stabilité, de la bioactivité et de la biodisponibilité des principes actifs. Le goût désagréable de la plupart des composés phénoliques limite également leur application. L'utilisation de polyphénols encapsulés, au lieu de composés libres, peut pallier efficacement ces déficiences.

L'encapsulation fait référence aux technologies permettant de formuler un (ou plusieurs) actif(s) au sein de particules individualisées présentant des propriétés spécifiques. Son objectif principal est la protection du matériau central des conditions environnementales défavorables (lumière UV, humidité, oxygène). Elle permet donc de contribuer à une augmentation de la durée de conservation du produit et de promouvoir une libération contrôlée de l'encapsulé (Fang and Bhandari, 2010).

L'encapsulation des molécules bioactives touche de nombreux secteurs d'activité de l'industrie, dont l'alimentation humaine et animale, l'agriculture et l'environnement, et la cosmétique. (Franco et al., 2017; Kozlowska et al., 2019). Les avantages de l'encapsulation des ingrédients alimentaires comprennent notamment (Gómez et al., 2018):

- Une augmentation de la biodisponibilité et de la solubilité des composés de base ;
- Une facilité du conditionnement, du transport ou de la commercialisation du produit obtenu ;
- Une dissimulation de propriétés indésirables (odeurs, saveurs) ;
- Une amélioration de la stabilité et de la conservation des aliments.

Diverses techniques sont utilisées pour l'encapsulation des polyphénols, dont le procédé par rupture de jet (prilling), l'atomisation, la lyophilisation et l'émulsion (tableau 9). Les recherches, les développements et les tendances actuels s'orientent davantage vers ce domaine.

### a. Prilling

Le prilling consiste à produire des gouttelettes par extrusion d'un liquide à travers un injecteur ou un orifice (Poncelet and Dreffier, 2007). Elle est ainsi définie comme une technologie de conditionnement de matières solides, liquides ou gazeuses dans des capsules miniatures et scellées qui peuvent libérer leur contenu à des taux contrôlés dans des conditions spécifiques (Fang and Bhandari, 2010).

Le prilling conduit à l'obtention de microsphères par l'utilisation d'une buse unique ou de microcapsules par une double buse concentrique. Dans ce cas, le centre de la buse est alimenté par le cœur de la microcapsule, et la périphérie de la buse est alimentée par l'enveloppe de la microcapsule (Benoît et al., 2013). Le jet est ensuite formé et se rompt symétriquement sous forme de gouttelettes par des vibrations symétriques ou par des forces de frottement élevées présentes lors de la pulvérisation du jet (Camelo, 2015). Les gouttes sont réceptionnées dans une solution aqueuse de polymères capables de former des gels sous une action physique ou chimique. Par exemple, les gouttelettes formées par l'alginate de sodium se transforment instantanément en microcapsules de gel sphériques au contact d'une solution gélifiante contenant le chlorure de calcium (figure 35) (Benoît et al., 2013).

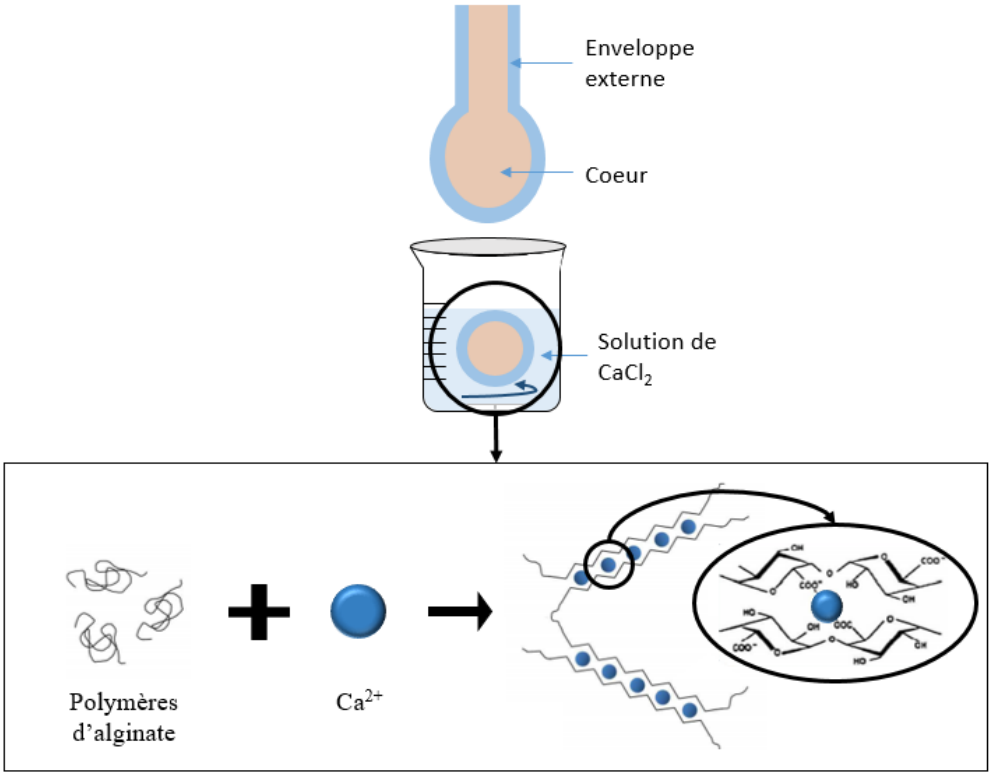



**Figure 35.** Procédé de production de capsules. Une capsule est formée par co-extrusion de la solution du noyau (eau ou huile) et de la solution d'alginate. Lorsqu'on le laisse tomber dans un bain de calcium, l'alginate se gélifie instantanément pour former une capsule (Doméjean, 2014; Rolland, 2013)

Par exemple, une étude s'est intéressée à la récupération des déchets des vins rouges et blancs riches en composés phénoliques. Une encapsulation sélective (excluant la plupart des sucres et autres composés organiques) a été réalisée en utilisant l'alginate-chitosane.

Son efficacité pour tous les extraits était comprise entre 55 % et 79 % (Moschona and Liakopoulou-Kyriakides, 2018).

b. Atomisation

L'atomisation consiste à pulvériser en continu des gouttelettes contenant le ou les principes actifs (solution aqueuse ou émulsion H/E) dans de l'air chaud (séchage). Cette technique permet de créer des microcapsules en poudre faciles à manipuler à partir d'un matériau liquide en une seule opération simple et évolutive (Samborska et al., 2021). Cette poudre qui est constituée de matériaux de support (amidon modifié, maltodextrine, gomme ou d'autres substances) enferme les composants actifs dans une couche extérieure protectrice pendant que l'alimentation liquide est transformée en une forme sèche et stable. Pendant le séchage par atomisation, l'alimentation liquide homogène est pompée à travers une buse chauffée et atomisée en gouttelettes de taille réduite en utilisant de l'air comprimé. Ces gouttelettes sont ensuite pulvérisées dans une chambre de séchage après évaporation de l'eau par l'air chaud en contact avec le matériau atomisé. Les capsules sont ensuite recueillies après être tombées au fond du séchoir (Franco et al., 2017; Gómez et al., 2018). La forme typique des particules séchées par atomisation est sphérique, avec une taille moyenne comprise entre 10 et 100 µm.

L'utilisation du séchage par atomisation comme méthode prédominante, tant à l'échelle du laboratoire qu'à l'échelle industrielle, a une longue histoire. Comparée à l'évaporation rapide de l'eau, cette technique offre plusieurs avantages, notamment la continuité, la simplicité, la reproductibilité, la vitesse élevée, la mise à l'échelle facile sans modifications majeures et de faibles coûts de production (Abbas et al., 2012; Gómez et al., 2018). De surcroît, cette méthode permet de créer des microcapsules en poudre faciles à manipuler à partir d'un matériau liquide. Pour des applications industrielles, différents composés antioxydants (acide caféique, acide chlorogénique et acide rosmarinique) ont été séchés par atomisation avec de la carboxyméthylcellulose de sodium (SCMC – Sodium CarboxyMethyl Cellulose), démontrant une grande efficacité d'encapsulation, la stabilité et la préservation de leur activité antioxydante (Aguiar et al., 2017).

c. Lyophilisation

La lyophilisation, également connue sous le nom de cryodessiccation, est un procédé utilisé pour la déshydratation de presque tous les matériaux et arômes sensibles à la chaleur. La lyophilisation consiste à congeler le matériau, puis à réduire la pression

environnante et à ajouter suffisamment de chaleur pour permettre à l'eau gelée du matériau de passer directement de la phase solide à la phase gazeuse (Oetjen and Haseley, 2004; Rezvankhah et al., 2020). L'encapsulation par lyophilisation est obtenue lorsque les substances du cœur s'homogénéisent dans des solutions matricielles, puis se co-lyophilisent. la lyophilisation est une technique simple pour encapsuler des composés bioactifs sensibles dont les essences et les arômes naturels solubles dans l'eau, ainsi que certains médicaments (Fang and Bhandari, 2010).

Néanmoins, par rapport au séchage par atomisation, le principal inconvénient de cette technique est son coût, qui est 30 à 50 fois plus élevé (Gharsallaoui et al., 2007), ce qui s'explique par les conditions opérationnelles qui nécessitent généralement de 8 à 24 heures, ce qui entraîne une grande incidence des coûts énergétiques requis pour maintenir les niveaux de vide et de réfrigération.

Un exemple de cette application a été rapporté par Ursache et al., (2018). Dans leur étude, ils ont utilisé avec succès la coacervation et la lyophilisation pour la valorisation des caroténoïdes de l'argousier par microencapsulation avec des protéines de lactosérum et de la gomme d'acacia comme matériaux de paroi (formulation de produits alimentaires à haute valeur ajoutée). Les muffins avec la poudre microencapsulée ont été préférés par tous les panélistes, car la poudre microencapsulée ajoutée donnait une belle couleur jaune.

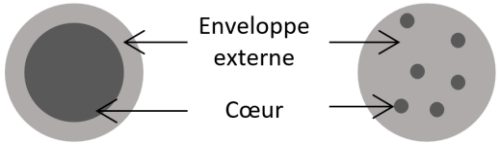
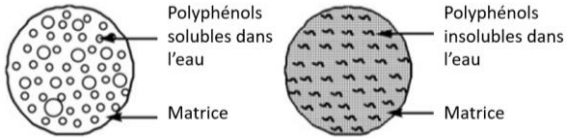
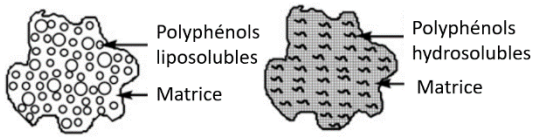
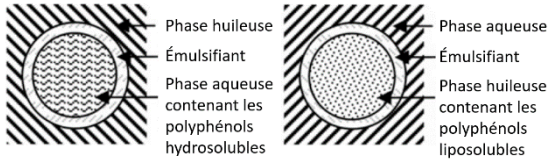
d. Emulsion

L’émulsion a pour objectif de stabiliser les gouttelettes contenant le(s) principe(s) actif(s) formées par émulsion (h/e, e/h, doubles émulsions) par coacervation, réticulation, gélification thermique, solidification, polymérisation interfaciale ou *in situ*, évaporation de solvant. Cette technologie est généralement appliquée pour l'encapsulation de substances bioactives dans des solutions aqueuses qui peuvent être utilisées directement à l'état liquide ou être séchées pour former des poudres (par exemple, par pulvérisation, séchage sur rouleau ou lyophilisation) après émulsification. Il s'agit donc en fait d'une partie du processus d'encapsulation (Fang and Bhandari, 2010).

Les émulsions ont été utilisées pour les polyphénols qui sont naturellement insolubles ou ont une faible solubilité dans l'eau et l'huile. L'avantage évident est donc qu'elles contiennent une concentration élevée de polyphénols. La plupart des recherches récentes concernant les émulsions de polyphénols ont été menées pour réduire l'oxydation des lipides ou augmenter leur stabilité.

Dans une étude menée par Almajano et al., (2008), de l'huile de tournesol (dont les tocophérols ont été retirés) a été ajoutée goutte à goutte à un échantillon aqueux de Tween 20 dissous dans de l'eau contenant de l'infusion de thé lyophilisée et de l'albumine de sérum bovin (BSA). L'ensemble a été placé dans un bain de glace et soniqué pendant 5 min. Les émulsions E/H contenant des extraits de thé ont montré une forte activité antioxydante contre l'oxydation des huiles.

**Tableau 9.** Quelques techniques d'encapsulation (Fang and Bhandari, 2010; Benoît et al., 2013)

| Procédé | Morphologie | Matériaux enrobants | Illustration des caractéristiques | Type de libération | Avantages | Inconvénients |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Prilling** | Microsphère<br>Microcapsule | Alginate de sodium<br>Chitosane<br>Corps gras solides<br>Glycérides |  | Libération prolongée et libération déclenchée par effet thermique | - Productivité élevée<br>- Contrôle de la taille et de la distribution de taille possibles<br>- Substances GRAS (Generally Recognized as Safe)<br>- Facilité de manipulation et d'upscalling | Dégradation thermique |
| **Atomisation** | Microsphère | Maltodextrine<br>Amidons modifiés<br>Gomme arabique<br>Chitosane<br>Lécithine de soja-caséinates de sodium |  | - Libération prolongée par diffusion à travers la membrane ou la matrice<br>- Libération déclenchée (effet de pH, déshydratation, effet mécanique, dissolution, attaque enzymatique) | Productivité élevée | - Dégradation thermique<br>- Peu de matériaux enrobants disponibles |
| **Lyophilisation** | Microsphère | Maltodextrines (DE20, DE5-8, DE18,5…) |  | | Préservation des composés thermosensibles | Temps de lyophilisation long |
| **Emulsion** | Microsphère | Corps gras solides<br>Glycérides<br>Cires |  | | - Teneur élevée en actif<br>- Faibles diamètres | Procédé à fort taux de cisaillement |

# CHAPTER 2

# Green Extraction Techniques

**Malak Tabib[1,2], Njara Rakotomanomana[2], Adnane Remmal[1*], Farid Chemat[2*]**

[1]*Department of Biology, Faculty of Science Dhar El-Mahraz, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, P.O. Box 1796, Fez 30050, Morocco.*

[2]*Avignon University, INRAE, UMR 408, Green Extraction Team, F-84000 Avignon, France.*

**Abstract:** Green extraction of natural products was and will always remain an important research subject in various fields. It is based on developing techniques that meet the six principles of eco-extraction. This concept responds to the challenges of the 21stcentury, aiming to protect the environment, the operator, and the consumer by reducing hazardous solvent consumption and by favoring the use of more environmentally friendly methods. In this chapter, we review the principles of eco-extraction in detail, followed by an overview of four methods widely used in extraction, namely ultrasound-assisted extraction (UAE), microwave-assisted extraction (MAE), subcritical water extraction (SWE), and supercritical fluid extraction (SFE).

**Keywords:** Green extraction techniques, principles, ultrasound-assisted extraction (UAE), microwave-assisted extraction (MAE), subcritical water extraction (SWE), and supercritical fluid extraction (SFE).

## LIST OF ABBREVIATIONS

UAE – Ultrasound-Assisted Extraction
MAE – Microwave-assisted Extraction
SWE – Subcritical Water Extraction
SFE – Supercritical Fluid Extraction
WHO – World Health Organization
VOCs – Volatile Organic Compounds
CMR – Carcinogenic, Mutagenic, and Reprotoxic substances
REACH – Registration, Evaluation, Authorization, and restriction of Chemicals

***Corresponding authors Adnane Remmal:** Department of Biology, Faculty of Science Dhar El-Mahraz, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, P.O. Box 1796, Fez 30050, Morocco. E-mail: adnaneremmal@gmail.com. **Farid Chemat:** Avignon University, INRAE, UMR 408, Green Extraction Team, F-84000 Avignon, France. E-mail: farid.chemat@univ-avignon.fr

**Merichel Plaza & María Luisa Marina (Ed.)**
**Current and Future Developments in Food Science (Vol. 3)**
**All rights reserved-© 2022 Bentham Science Publishers**

# *CHAPITRE II*

# *Séparation de la peau d'amande et extraction des polyphénols à l'aide de la technique d'ultrasons*

Réalisé à Avignon Université sous la direction de Pr. Farid CHEMAT

**A one-pot ultrasound-assisted almond skin separation/polyphenols extraction and its effects on structure, polyphenols, lipids, and proteins quality.**

M. Tabib, Y. Tao, C. Ginies, I. Bornard, N. Rakotomanomana, A. Remmal, F. Chemat. (2020). Applied Sciences, 10(10), 3628

# I- Introduction

L'amande (*Prunus dulcis*, famille des Rosaceae) est l'une des drupes les plus consommées au monde. Elle est appréciée pour son goût agréable et son abondance en composés nutritionnels (protéines, polyphénols, oméga 6, oméga 9...). elle est aussi connue pour sa capacité à réduire l'hypercholestérolémie (Chen et al., 2006; Jenkins et al., 2003). Les Etats-Unis d'Amérique, en particulier la Californie, domine la production mondiale d'amandes, suivis par l'Union européenne, les pays du Maghreb et le Japon. Les fruits de l'amandier sont des drupes déhiscentes. La paroi de l'ovaire devient un péricarpe avec un mésocarpe coriace (également appelé coque), un endocarpe ligneux (coquille) qui contient et protège les amandes (cerneaux) recouvertes d'une peau brune (Almond board of California, 2017). Lors de la transformation industrielle des aliments, les amandes sont séparées de la peau par blanchiment (Salas-Salvadó, 2005). La peau de l'amande représente en moyenne 4 % du poids total de l'amande mais recouvre 70 à 100 % des polyphénols totaux présents dans la drupe (Chen et al., 2010; Milbury et al., 2006). Les sous-produits dérivés de la transformation des amandes (peaux, coquilles, écales, eau de blanchiment) sont généralement utilisés pour l'alimentation du bétail et comme matière première pour la production d'énergie (Mandalari et al., 2010a). Néanmoins, au cours des dernières années, des recherches ont été menées pour évaluer l'utilisation possible de ces sous-produits comme source d'extraits riches en polyphénols qui peuvent être utilisés comme ingrédients pour des applications alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Siriwardhana and Shahidi, 2002; Amarowicz et al., 2005; Monagas et al., 2007; Mandalari et al., 2010a; Bolling, 2017).

Selon Mandalari et al., (2010b), le blanchiment à l'eau bouillante a un impact négatif sur les polyphénols initialement présents dans la peau naturelle des amandes. Cette technique de blanchiment est utilisée dans le monde entier mais implique une diminution des polyphénols de l'amande, une grande consommation d'énergie (chauffage), et une dénaturation des protéines de l'amande. Comme rapporté par Chemat et al., (2017b), la technique des ultrasons est une technologie clé pour atteindre l'objectif d'une extraction « verte » et durable. En utilisant les ultrasons, des extractions complètes peuvent être réalisées en quelques minutes avec une grande reproductibilité, réduisant la consommation de solvant, simplifiant la manipulation et le travail et donnant une plus grande pureté du produit final. Elle permet également d'endommager la paroi cellulaire, libérant ainsi des composés bioactifs dans la solution aqueuse. L'efficacité des ultrasons

a déjà été prouvée dans l'extraction de substances d'intérêt telles que les polyphénols et peut être considérée comme une alternative aux méthodes conventionnelles (Gunathilake et al., 2018).

Les mécanismes des ultrasons peuvent être expliqués comme suit : les phénomènes de cavitation entraînent des forces de cisaillement élevées dans le milieu, provoquant l'implosion de bulles de cavitation sur la surface d'un produit et libérant des micro-jets qui génèrent plusieurs effets tels que le décollement de la surface, l'érosion et la rupture des particules. De plus, l'implosion de bulles de cavitation dans un milieu liquide entraîne des macro-turbulences et un micro-mélange (Bhosle et al., 2015).

L'objectif de cette étude est d'utiliser les ultrasons pour combiner la séparation de la peau d'amande et l'extraction des polyphénols. Notre objectif est d'obtenir un processus rapide et respectueux de l'environnement pour une mise à l'échelle impliquant la séparation de la peau et nécessitant une dégradation des cellules pour améliorer l'efficacité de l'extraction des composés intracellulaires en utilisant l'Extraction Assistée par Ultrasons (UAE). Les extraits seront analysés pour quantifier la composition en polyphénols des amandes ultrasoniquées comparés aux amandes naturelles, aux amandes blanchies et aux amandes non ultrasoniquées. Un autre objectif de cette partie de travail est d'explorer l'effet des ultrasons sur l'intégrité des cellules de la peau des amandes, et enfin d'évaluer leur action sur les protéines et les lipides contenus dans les amandes.

# II- Matériels et méthodes

## 1- Polyphénols de la peau d’amande

### a. Extraction assistée par ultrasons (UAE)

Les amandes californiennes (Prunus dulcis) ont été fournies par le service d'approvisionnement du laboratoire GREEN (Université d'Avignon, France). Elles ont été stockées dans des emballages plastiques scellés et à l'abri de la lumière. Deux principaux procédés d'extraction ont été mis en œuvre : l'extraction assistée par ultrasons et le blanchiment des amandes (procédé conventionnel). Les paramètres de l'UAE (intensité des ultrasons UI et température T°) ont été déterminés en fonction des résultats fournis par un plan expérimental (plan composite central). L'UAE a été réalisé à basses fréquences (20 kHz) avec un processeur ultrasonique de 1000 W (UIP1000hd, Hielscher

Ultrasonics, GmbH, Allemagne) équipé d'un générateur d'ultrasons et lié à une sonotrode en titane BS4d18 (longueur 125 mm, diamètre 18 mm) (Figure 36).

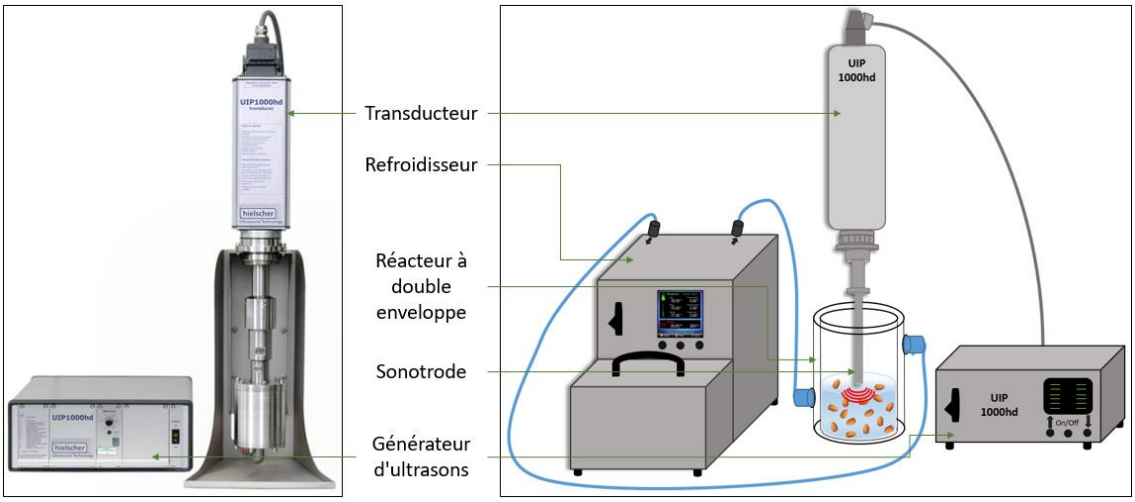



**Figure 36.** Appareil à ultrasons de laboratoire utilisé pour l'extraction assistée par ultrasons

Afin de calculer la fraction de la puissance convertie en chaleur dissipée dans le milieu, des mesures calorimétriques ont été effectuées pour évaluer la puissance ultrasonore réelle. Les valeurs de puissance ont ensuite été déterminées à l'aide de l'équation (1) (Boukroufa et al., 2017) :

$$P = mCp\frac{dT}{dt} \quad (1)$$

Où *m* est la masse du solvant (g), *Cp* est la capacité thermique du solvant à pression constante ($J.g^{-1}\,K^{-1}$), et *dT/dt* est la variation de la température en fonction du temps. La puissance ultrasonore appliquée a ensuite été déterminée en utilisant la puissance calculée comme indiqué dans l'équation (2) (Boukroufa et al., 2017):

$$UI = \frac{4P}{D^2} \quad (2)$$

Où *UI* est l'intensité ultrasonore ($W.cm^{-2}$), *P* est la puissance ultrasonore (W) calculée par l'équation (1), et *D* est le diamètre (cm) de la corne à ultrasons.

Vingt grammes d'amandes entières ont été immergés dans 100 ml d'eau distillée (1/5 : p/v) et introduits dans un réacteur à double enveloppe pendant vingt minutes. La température souhaitée a été maintenue par un système de refroidissement (Huber, Allemagne). Pour le processus de blanchiment, le même rapport 1/5 (p/v) a été utilisé. Les amandes ont été blanchies pendant cinq minutes. Ces deux procédés ont été comparés aux amandes non ultrasoniquées (NUA) où le même rapport a été utilisé sans agitation et

sans ultrasons et à la même température optimale du traitement des amandes ultrasoniquées.

Après traitement, les amandes ont été conservées et réservés à d'autres usages à température ambiante à l'abri de la lumière. Les extraits aqueux ont été transférés dans des flacons de verre ombragés puis lyophilisés pour l'analyse des polyphénols en utilisant un lyophilisateur (COSMOS -80 ˚C/6 L + POMPE EDWARDS RV5) et stockés à +4 ˚C.

### b. Plan composite centré

Le plan composite centré (Central Composite Design ; CCD), également appelée plan Box-Wilson, a été utilisé pour évaluer la pertinence de deux paramètres contrôlés dans le processus d'extraction (intensité ultrasonique et température) et pour évaluer les interactions entre les variables. Le CCD a également été réalisé pour trouver des réponses pour les concentrations les plus élevées d'extraits de polyphénols et le temps optimal de séparation de la peau du noyau. Cette étude fournit une exploration du domaine expérimental étudié à l'aide d'un plan factoriel complet à deux niveaux (codé ±1), superposé par des points centraux (codés 0) et des « points axiaux » ou «étoile» (codés $\pm\alpha = 1{,}414$), permettant un nombre réduit d'expériences. Ce nombre a été calculé à partir de l'équation suivante :

$$N = k^2 + 2k + cp \qquad (3)$$

Où *k* est le nombre de variables et *cp* est le nombre de répétitions du point central. Pour cette étude, *N* est égal à quatorze expériences avec six répétitions au centre (Figure 37).

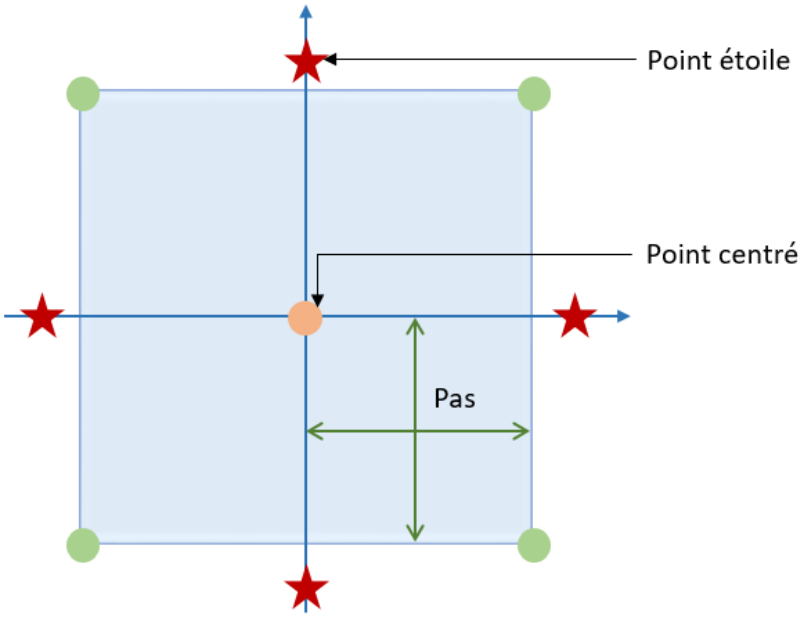



**Figure 37.** Représentation graphique des points expérimentaux du plan composite centré

Les points axiaux permettent d'estimer la courbure. Si la distance entre les points centraux et un point factoriel est ±1, la distance entre le centre de l'espace du plan et un point étoile est $|\alpha| > 1$. La valeur de α dépend du nombre de passages expérimentaux dans la partie factorielle du plan composite centré :

$$\alpha = [2k]^{¼} \quad (4)$$

Dans ce cas :

$$\alpha = [2*2]^{¼} = 1.414 \quad (5)$$

Les valeurs limites ont été choisies en fonction des limitations de l'appareil à ultrasons (l'intensité élevée des ultrasons endommage la sonde et réduit son efficacité) et de la température d'extraction des protéines (dégradation au-dessus de 55 ◦C). Un intervalle de 5,84 à 8,94 $W.cm^{-2}$ a été choisi pour correspondre aux limites de ce dispositif ultrasonique.

**Tableau 10.** Variables du plan composite centré

| | **Paramètres** | **Limites** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Inférieure (-1)** | **Supérieure (+1)** | **Centre (0)** | **-α** | **+α** | **Unité** |
| **A** | **Amplitude** | 20 | 60 | 40 | 11.716 | 68.284 | % |
| **T°** | **Température** | 25 | 55 | 40 | 18.787 | 61.213 | °C |

### c. Cinétique d'extraction

L'étude cinétique a été réalisée aux paramètres sélectionnés par le plan composite centré avec les ultrasons (intensité des ultrasons et température du milieu) et sans ultrasons avec le même ratio solide/liquide (1/5 : w/v ; g/mL) en utilisant de l'eau distillée. L'évolution de la teneur totale en polyphénols (Total Polyphenol Content ; TPC) extraite a été analysée toutes les 30 secondes pendant les deux premières minutes et demie, puis toutes les 2,5 min pendant vingt minutes. Tous les échantillons ont été lyophilisés et stockés à 4 °C. Pour l'analyse, les extraits ont été mélangés à 500 µL d'une solution 80/20 de méthanol/eau (v/v).

### d. Polyphénols totaux

L'estimation des polyphénols totaux a été évaluée par la capacité à réduire le réactif de Folin-Ciocalteu (F-C). Tous les extraits de BA (amandes blanchies), UA (amandes ultrasoniquées) et NUA (extraits non-ultrasoniqués) ont été lyophilisés, puis dissous dans 35 ml d'une solution 80/20 de méthanol/eau (v/v). La méthode suggérée par Singleton et al., (1999) a été utilisée avec quelques modifications mineures : 50 µL de chaque échantillon, du standard (naringénine) et du blanc ont été mis en réaction avec 1250 µL d'une solution diluée au 1/5 de la réaction F-C et 1000 µL de $Na_2CO_3$ à 10%. Les solutions ont été incubées à température ambiante (22 °C) pendant 30 min, à l'abri de la lumière. Ensuite, les absorbances ont été mesurées à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (UV-1800, Shimadzu, Japon). Les résultats ont été exprimés en équivalent mg de Naringénine par gramme d'amandes.

Comme pour les NA (amandes naturelles), les peaux ont été récupérées comme décrit par Mandalari et al., (2010b) avec quelques modifications. Les amandes ont été immergées deux fois dans l'azote liquide pendant 20-30 min et laissées décongeler à température ambiante. Les peaux ont ensuite été retirées à la main et broyées à l'aide du broyeur IKA A11 avec de l'azote liquide et stockées à -20 °C.

### e. Sonication localisée – observation sous MEB

Afin d'évaluer précisément l'impact des ultrasons sur le matériel végétal, des amandes non traitées ont été immergées dans de l'eau distillée puis exposées individuellement à une sonde à ultrasons dans les conditions optimales fournies par le CCD pendant vingt minutes. Une demi-amande a été fixée dans un disque perforé dont l'ouverture centrale

avait un diamètre de 1 cm. Le disque contenant l'amande a été introduit dans un réacteur à double manteau relié à un système de refroidissement pour maintenir la température à 20 ± 1 ˚C. Le même volume d'eau et la même intensité ont été utilisés. La distance séparant les peaux d'amandes de la sonde ultrasonique était de 0,2 cm. Le même processus expérimental a été utilisé sans ultrasons pour réaliser la procédure conventionnelle. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata.

L'effet progressif des ultrasons sur les couches de la peau des amandes a été évalué par microscopie électronique à balayage (MEB, XL30, FEI Philips, France.). Les échantillons découpés ont été fixés sur des supports métalliques, collés à l'aide d'un adhésif au carbone et recouverts d'atomes d'or avant l'observation (Figure 38).

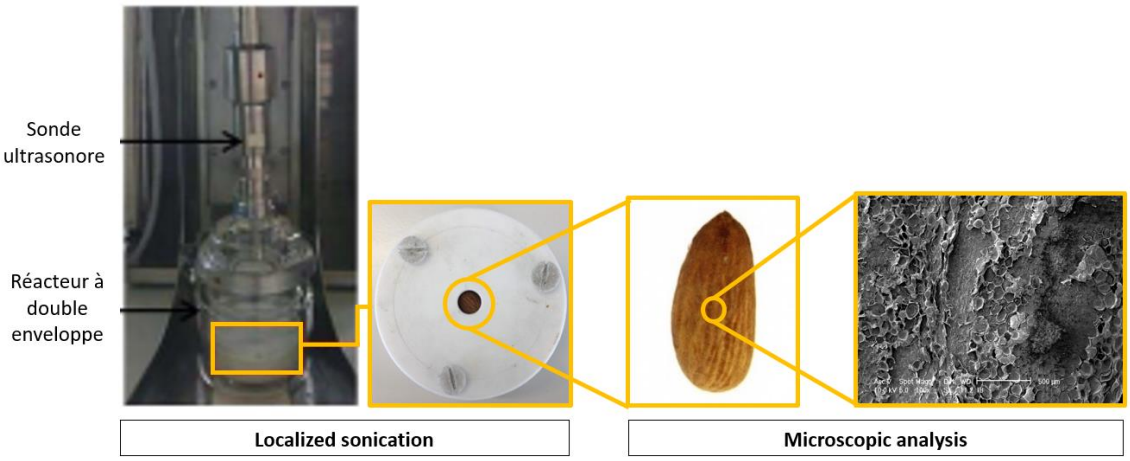



**Figure 38.** Procédure expérimentale : Sonication localisée et étude des modifications structurelles

### f. Analyse par UPLC-MS

Les extraits de polyphénols ont été analysés par chromatographie liquide ultra performante (UPLC) à l'aide d'un système ACQUITY UPLC® (Waters Corp., Milford, MA, USA) relié simultanément à un détecteur à barrette de diodes 190-800 nm (UPLC DAD, Waters, Milford, MA, USA) et à un piège à ions linéaire Bruker Daltonics HCT (High Capacity Ion Traps) équipé d'une source d'ions electrospray (UPLC DAD/ESI-MSn) (Figure 39). L'analyse a été réalisée à l'aide d'une colonne C18 ACQUITY UPLC® BEH (100 mm × 2,1 mm, i.d, 1,7 µm ; Waters Corp., Milford, MA, États-Unis). La température de la colonne a été maintenue à 35 ˚C. Le volume d'injection a été fixé à 5 µL. La phase mobile était de l'eau contenant 0,1 % d'acide formique (solvant A) et de l'acétonitrile (solvant B) au débit de 0,4 ml/min. Les conditions de gradient étaient comme

suit : A, 99-75%, 0-14 min ; A, 75-20%, 14-18 min ; A, 20-0%, 18-19 min ; A, 099%, 19-19,5 min.

Le piège à ions a fonctionné en mode Ultra Scan de m/z 100 à 1500. La cible ICC était réglée à 100 000 avec un temps d'accumulation maximum de 50 ms. De l'azote (pureté de 99,99 %) a été utilisé comme gaz de désolvatation. L'ionisation a été réalisée en utilisant une source ESI en négatif. Les paramètres de la source d'ionisation ont été réglés comme suit : température sèche 365 ◦C, pression du nébuliseur 50 psi, débit de gaz sec. 9 L.min$, tension capillaire -2 kV.

Les pics chromatographiques ont été provisoirement identifiés par leurs spectres de masse MS et $MS^2$ et, lorsque cela était possible, par l'injection d'un standard. La quantification a été réalisée par signal UV sur la base de la courbe d'étalonnage de la catéchine, de l'épicatéchine et de l'acide vanillique à 280 nm, de l'acide chlorogénique à 330 nm, de l'isorhamnétine, du kaempférol et de la naringénine à 360 nm. Les autres composés pour lesquels des standards n'étaient pas disponibles (procyanidines, hétérosides) sont exprimés en équivalent des standards injectés.




**Figure 39**. UPLC-MS

i. Teneur en polyphénols

15 ± 1 mg des extraits lyophilisés d'amandes ultrasoniquées (UA), d'amandes non ultrasoniquées (NUA) et de peau naturelle (NS) ont été mélangés avec 0,6 mL de MeOH – acide formique 0,2 %. Les mélanges ont été placés dans de petits tubes, mélangés par vortex et soniqués pendant 5 minutes chacun. Après centrifugation, les surnageants ont été injectés pour analyse. Les échantillons lyophilisés d'amandes blanchies (BA) ont été mélangés avec 0.8 ml de MeOH – acide formique 0,2 % et ont été dilués deux fois avant l'injection.

ii. Teneur en procyanidines

Les procyanidines dans les quatre extraits ont été quantifiées comme décrit par Kennedy and Jones, (2001) avec quelques modifications.

Le protocole suivant a été utilisé : premièrement, une solution de HCl 0,2 M dans MeOH, contenant 50 g/L de phloroglucinol et 10 g/L d'acide ascorbique a été préparée. Ensuite, 15 ± 1 mg d'extraits lyophilisés (BA, UA et NUA) et de peau de NS ont été mélangés à 400 µL de la solution précédente. Les procyanidines d'intérêt ont été mises en réaction dans cette solution à 50 °C pendant 20 min. La réaction a ensuite été arrêtée avec 400 µL de solution de formiate d'ammonium (12,6 g/L). Après agitation et centrifugation, le surnageant a été dilué deux fois et injecté pour analyse (Figure 40).

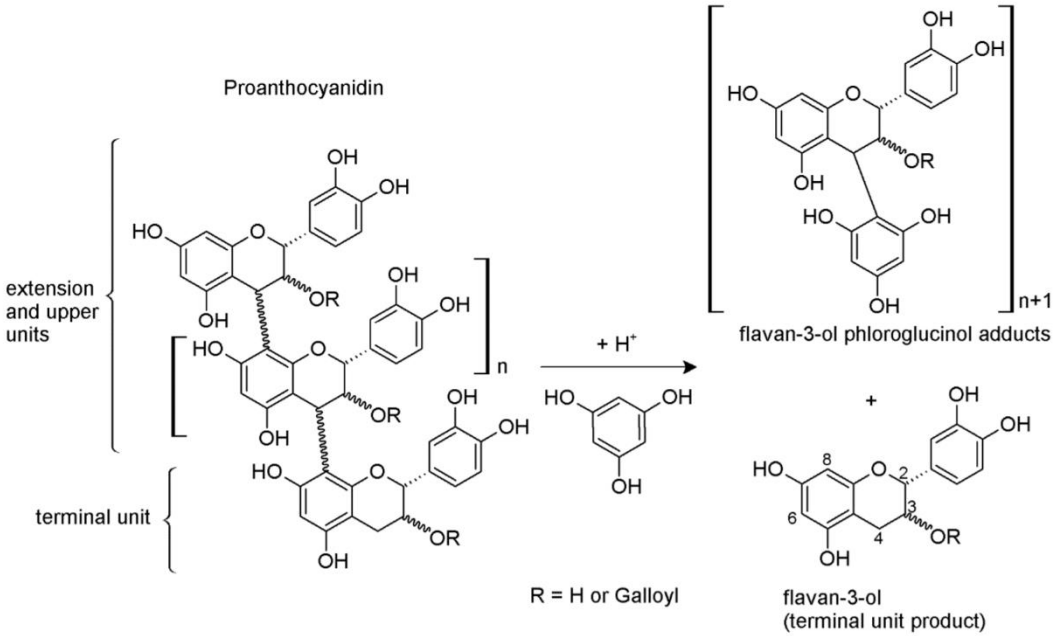



**Figure 40.** Dépolymérisation des tanins condensés par phloroglucinolyse (Arapitsas et al., 2021)

La concentration des procyanidines (PC) dans la peau d'amande a été calculée comme indiqué dans les équations ci-dessous (Cheynier et al., 2001) :

$$PC = ([upper\ and\ extension\ units]_M + [end\ units]_M) \quad (6)$$

$$PC = ([cat_P] - [cat_C]) + ([epicat_P] - [epicat_C]) + [Phloroglucinol\text{-}cat/epicat] \quad (7)$$

Où $[cat_p]$ et $[epicat_p]$ sont les concentrations de catéchine et d'épicatéchine après la phloroglucinolyse, $[cat_C]$ et $[epicat_C]$ sont les concentrations de catéchine et d'épicatéchine brutes avant traitement, et *[Phloroglucinol-cat/epicat]* est la concentration de phloroglucinol-catéchine + phloroglucinol-epicatéchine.

Outre la concentration de procyanidines, cette réaction permet de déterminer le degré moyen de polymérisation (mDP), c'est-à-dire le nombre moyen d'unités dans le polymère. Le DP moyen des procyanidines dans les quatre extraits a été calculé selon l'équation (5) (Cheynier et al., 2001) :

$$mDP = \frac{[upper\ and\ extension\ units]M + [end\ units]M}{[\text{end units}]M} \quad (8)$$

## 2- Huile d'amande

### a. Extraction de l'huile

L'huile d'amande a été extraite de 15 g de farine d'amande (NA, BA et UA) à l'aide de 170 ml d'hexane (VWR). L'extraction a duré 8 heures et a été réalisée à l'aide du système d'extraction Büchi B-811 (Soxhlet automatique, Büchi, Allemagne). L'hexane a été évaporé et les extraits ont été conservés à +4 ◦C à l'abri de la lumière.

### b. Préparation d'esters méthyliques d'acides gras (FAME) - Trans estérification

Les esters méthyliques d'acides gras ont été préparés selon la méthode de Breil et al., (2016). Ensuite, 12 à 15 mg de chaque échantillon d'huile ont été ajoutés à 1 mL d'acide sulfurique méthanolique (5%). Le mélange a été chauffé dans un bloc chauffant pendant 90 min à 85 ◦C pour faciliter la transméthylation. Après avoir atteint la température ambiante, 1.5 mL de solution de chlorure de sodium (0,9%) et 1 mL de n-hexane ont été ajoutés. La solution a ensuite été agitée pendant 30 secondes et la phase organique a été recueillie pour une analyse par chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatography – GC). La triheptadécanoine (C17:0 ; TAG) a été utilisée comme standard interne et le mélange Superclo 37 d'esters d'acides gras (FAME) a été utilisé pour calibrer le système.

c. Analyse par GC–FID

Les échantillons d'huile transestérifiée extraits de NA, de BA et d'UA ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un système de détection par ionisation de flamme (GC-FID). Le système était équipé d'une colonne capillaire BD-EN14103 de dimensions 30 m × 320 µm × 0,25 µm. La vitesse du gaz porteur (He) était réglée à 33 $cm.s^{-1}$. Le volume d'injection de l'échantillon était de 2 µL et deux lavages avec du n-hexane ont été effectués pour éviter les résidus après chaque passage d'échantillon. La détection a été activée en mode split (rapport de split 1:20), la température d'injection a été fixée à 250 ˚C. Le gradient de température du four était initialement de 50 ˚C pendant 1 min, puis il a augmenté à un taux constant de 20 ˚C/min de 50 ˚C à 180 ˚C, puis il est passé de 180 ˚C à 220 ˚C à un taux de 2 ˚C/min. Une fois qu'elle a atteint 230 ˚C, la température a été maintenue pendant une période de 10 min et les esters méthyliques d'acides gras ont été identifiés en fonction du temps de rétention et des normes utilisées pour l'étalonnage.

## 3- Protéines de l'amande

a. Extraction de protéines

Afin de comprendre l'effet de l'UAE sur les protéines, les résidus d'amandes des extractions précédentes ont été récupérées et leurs protéines ont été extraites.

Les extraits protéiques purs d'amandes ont été obtenus selon la méthode de Janssen et al., (2017) avec quelques modifications à partir de la farine d'amande dégraissée (obtenue après extraction Soxhlet et séchée à température ambiante). De ce fait, 10 g de chaque échantillon ont été mélangés à 100 ml de tampon phosphate (pH 7.4) et agité avec un agitateur magnétique pendant une heure. Le mélange a été centrifugé à 9000 rpm pendant 20 min et filtré à l'aide d'un filtre Büchner sous vide. Le filtrat a été placé dans des membranes de dialyse pendant 48 h puis pendant 3 h pour éliminer les molécules (y compris les protéines) dont l'unité de masse atomique est inférieure à 10 kDa. Les échantillons ont ensuite été placés dans le lyophilisateur afin d'obtenir des protéines purifiées pour l'analyse par électrophorèse.

b. Electrophorèse

Pour déterminer la distribution du poids moléculaire des protéines solubles, nous avons utilisé l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide et de dodécylsulfate de sodium (SDS-

PAGE) (Figure 41). La distribution du poids moléculaire des protéines d'amandes de NA, UA et BA a été évaluée dans des conditions réductrices (avec du 2-mercaptoéthanol) et non réductrices (sans 2-mercaptoéthanol). Ceci a été exécuté pour évaluer l'impact du traitement initial ou de la transformation sur le profil protéique des amandes. Dans des conditions réductrices, la protéine soluble 2 mg/ml dans l'eau milli-Q a été dénaturée par l'addition d'un volume égal de tampon d'échantillon Laemmli (65,8 mM Tris-HCl à pH 6,8, 26,3% (p/v) de glycérol, 2,1% SDS, 0,01% de bleu de bromophénol, 5% de 2-mercaptoéthanol) à 90 °C pendant 5 minutes. L'électrophorèse a été réalisée dans un système Bio-Rad mini-PROTEAN en utilisant des gels coulés TGX pre227 (4-15%). Le même protocole a été adopté sans 2-mercaptoéthanol pour les conditions non réductrices.

La fixation a été réalisée dans une solution à 40% éthanol/10% acide acétique pendant 15 minutes. Ensuite, le gel est rincé avec 100 ml d'eau. Le colorant a été ajouté au gel et coloré pendant 1h avec une légère agitation dans l'agitateur IKA ROCKER 2D basic. Le gel est ensuite décoloré par lavage à l'eau pendant une heure, avec changement d'eau (> 3 fois).

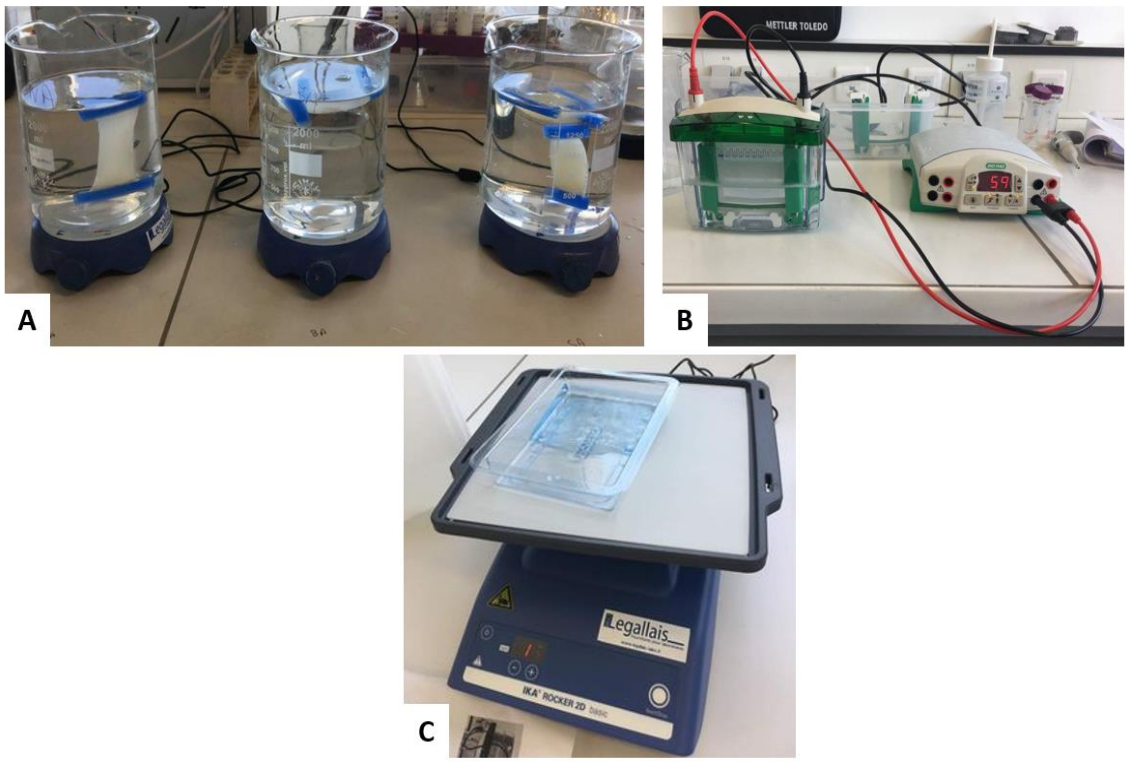



**Figure 41.** Étapes d'électrophorèse. (A) Dialyse ; (B) Electrophorèse ; (C) Fixation des bandes

c. Indice de dispersibilité des protéines

L'indice de dispersibilité des protéines (Protein Dispersibility Index ; PDI) détermine les protéines dispersibles dans les produits de soja dans les conditions de l'essai. C'est un moyen de comparer la solubilité d'une protéine dans l'eau.

La teneur en azote des échantillons d'amandes (% de protéine totale) a été analysée par Kjeldahl (système Büchi Speed Digester K-425) et la teneur en protéines des fractions liquides (% protéines dispersables dans l'eau) a été calculée par la méthode de Lowry avec la BSA comme standard. La qualité protéique de la farine d'amande dégraissée a été évaluée conformément au manuel d'analyse de la qualité des produits à base de soja dans l'industrie de l'alimentation animale (Van Eys et al., 2004) où l'indice de dispersibilité des protéines (PDI) a été calculé :

$$PDI = \frac{\%\ water\ dispersible\ protein \times 100}{\%\ total\ protein} \quad (9)$$

## 4- Modélisation

La théorie de la diffusion sur la base de la deuxième loi de Fick a été utilisée pour modéliser la cinétique d'extraction des phénols de la peau d'amande. Avant la modélisation, plusieurs hypothèses ont été faites :

- La peau d'amande a été considérée comme une géométrie de dalle en raison de sa faible épaisseur (40 µm en moyenne mesurée par un pied à coulisse). Le transfert phénolique dans la peau d'amande a eu lieu dans une seule direction de la surface intérieure vers la surface extérieure, et la valeur de l'épaisseur de la peau d'amande se réfère à la distance de transfert de masse (Tao et al., 2018) ;
- Les substances phénoliques étaient réparties de manière homogène dans la peau des amandes avant l'extraction ;
- La diffusivité phénolique est restée constante pendant l'extraction, et le contenu phénolique de la peau d'amande a varié en fonction de la position et du temps ;
- Dans cette modélisation, nous avons négligé la résistance externe au transfert de masse due à la sonication ou à l'agitation périodique à chaque temps d'échantillonnage.

Par conséquent, l'équation directrice et les conditions initiales et limites pour le modèle de diffusion spécifiant la géométrie de la dalle sont écrites comme suit :

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = D_e \frac{\partial C_s^2}{\partial x^2} \quad (10)$$

$$C_s = C_{s,0} \qquad C_L = 0 \qquad t = 0 \quad (11)$$

$$\left.\frac{\partial C_s}{\partial x}\right|_{x=0} = 0 \quad (12)$$

$$-D_e A \left.\frac{\partial C_s(x,t)}{\partial x}\right|_{x=l} = V \frac{dC_L(t)}{dt} \quad (13)$$

où $C_s$ est la teneur phénolique totale dans la peau d'amande (mg/g), $C_{s,o}$ est la teneur phénolique initiale dans la peau d'amande, soit 40 mg/g de peau d'amande, t est le temps (min), $D_e$ est la diffusivité effective des composés phénoliques ($m^2$/s), $x$ est la distance de transfert de masse (m), $C_L$ est le contenu phénolique total dans la solution (mg/L), $A$ est la surface des échantillons d'amandes utilisés pour chaque extraction ($m^2$), $L$ est la valeur de l'épaisseur de la peau d'amande, $V$ est le volume de solvant utilisé pour chaque extraction (ml). Les équations différentielles partielles ont été résolues à l'aide de la fonction *pdepe* de Matlab. À cette fin, la valeur de $D_e$ a été modifiée de manière itérative pour minimiser l'erreur quadratique moyenne (Root Mean Square Error ; *RMSE*) entre les teneurs expérimentales et prédites en composés phénoliques totaux dans la peau d'amande (Tao et al., 2017) :

$$RMSE(\text{mg/g}) = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\left[C_{S,p}(t) - C_{S,e}(t)\right]^2} \quad (14)$$

Où $C_{S,e}$ et $C_{S,p}$ sont les valeurs expérimentales et calculées du contenu phénolique total dans la peau d'amande (mg/g), respectivement. $n$ désigne le nombre de données expérimentales.

Pour valider davantage la précision du modèle de diffusion, le $R^2$ (coefficient de détermination), le *RMSE* et le module d'écart relatif moyen (%) ont été calculés sur la base des données relatives au rendement d'extraction après l'optimisation de $D_e$ (Tao et al., 2020) :

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(Y_e - Y_p)^2}{\sum_{i=1}^{n}(Y_e - Y_m)^2} \quad (15)$$

$$RMSE(\text{mg/g}) = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\left[Y_p(t) - Y_e(t)\right]^2} \quad (16)$$

$$E\ (\%) = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n}(|Y_e - Y_p|)/Y_e}{n}\right] \times 100 \quad (17)$$

Où $Y_e$ et $Y_p$ sont les rendements d'extraction expérimentaux et prédits des composés phénoliques totaux (mg/g). $Y_m$ est le rendement d'extraction moyen des substances phénoliques totales déterminé expérimentalement (mg/g). Ensuite, la distribution des substances phénoliques dans la peau d'amande pendant l'extraction a été visualisée par codage de programme dans Matlab.

# III- Résultats et discussion

## 1- Polyphenols

### a. Plan experimental

La puissance et la température des ultrasons sont les variables impliquées dans le plan d'expériences qui pourraient potentiellement affecter l'efficacité de l'extraction des polyphénols afin d'évaluer et d'optimiser l'extraction des polyphénols par ultrasons (TPC) et le temps d'émondage (Skin Separation Time ; SST). Les expériences fournies par le logiciel STATGRAPHICS ont été réalisées à une intensité ultrasonore (Ultrasonic Intensity – UI) maximale de 9,47 $W.cm^{-2}$ pour correspondre aux limites de l'appareil à ultrasons, et à des températures comprises entre 18 ˚C et 61 ˚C. En fait, les températures relativement basses étaient choisies pour garder l'intégrité des composés organiques (protéines) et permettre ainsi de futures applications à l'échelle pilote. Enfin, à la température et à l'intensité les plus basses, la séparation de la peau commence à 20 ± 3 min de réaction. Ainsi, la durée de traitement a été fixée à 20 min.

Les expériences entièrement codées et les réponses obtenues pour chaque essai du plan d'expérience sont représentées dans le tableau 11. Les réponses varient en fonction des variables du système (de 0,024 à 0,063 mg d'équivalent naringénine pour un gramme d'amande, et de cinq à vingt minutes de temps de séparation de la peau). Les résultats similaires des expériences 2, 4, 7 à 9 et 13 (points centraux) sont des indicateurs de la qualité des données et de la fiabilité statistique des variables principales.

**Tableau 11.** Plan composite centré (CCD) et réponses obtenues pour la teneur totale en polyphénols (TPC) et le temps de séparation de la peau (SST)

| No. | UI | Température | TPC (eq mg naringénine /g almonds) | SST (min) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | -1 | +1 | 0.061 | 5 |
| 2 | 0 | 0 | 0.039 | 10 |
| 3 | 0 | -α | 0.030 | 10 |
| 4 | 0 | 0 | 0.041 | 11 |
| 5 | +1 | -1 | 0.035 | 17 |
| 6 | + α | 0 | 0.063 | 6 |
| 7 | 0 | 0 | 0.041 | 10 |
| 8 | 0 | 0 | 0.041 | 11 |
| 9 | 0 | 0 | 0.042 | 10 |
| 10 | 0 | + α | 0.046 | 10 |
| 11 | - α | 0 | 0.031 | 20 |
| 12 | +1 | +1 | 0.057 | 7 |
| 13 | 0 | 0 | 0.040 | 10 |
| 14 | -1 | -1 | 0.024 | 20 |

La signification et la pertinence de la conception ont été étudiées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA). La signification statistique de chaque effet (y compris les termes d'interaction, les effets linéaires et quadratiques) a été déterminée en utilisant la probabilité p (valeur p) indiquée dans le tableau 12.

***Tableau 12.*** *Valeurs P pour les effets (A : température ; B : intensité des ultrasons)*

| Effet | Valeur P (TPC) | Valeur P (SST) |
|---|---|---|
| A: temperature | 0,0000 | 0,0000 |
| B: UI | 0,0076 | 0,6929 |
| $A^2$ | 0,0113 | 0,0014 |
| AB | 0,0338 | 0,0200 |
| $B^2$ | 0,3757 | 0,9493 |

Les réponses du plan d'expériences ont été optimisées afin d'obtenir des conditions optimales pour l'expérimentation. Un TPC plus élevé et un SST optimal (calculé par STATGRAPHICS - optimisation multiréponse) ont été obtenus avec 9,47 $W.cm^{-2}$ à 18,8 °C. La température a été arrondie à 20 °C (Figure 42).

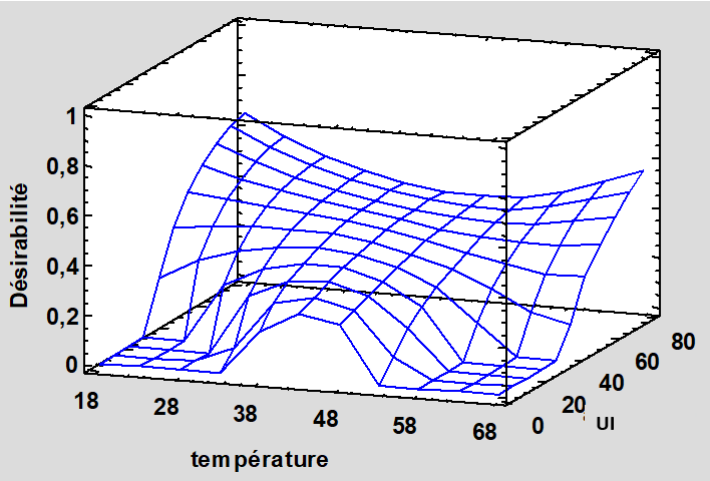



**Figure 42.** Surface de réponse - optimisation multi-réponse des deux variables TPC et SST

Les graphiques de Pareto sont représentés ci-dessous (Figure 43) pour visualiser la relation significative reliant les niveaux des variables (TPC et SST) et les surfaces de réponses estimées. Les résultats présentés dans la figure 43-I ont montré que la température du système avait un effet positif et hautement significatif sur l'extraction des polyphénols, ce qui est bien plus efficace que l'UI. L'absence de signification des termes croisés (BB : $UI^2$) suggère l'absence d'interactions entre les variables. Comme pour la figure 43-II, la température indique un effet significatif mais négatif sur le temps d'émondage. L'UI n'a pas d'effet significatif dans ce cas, en plus de son produit croisé, ce qui implique l'absence d'interaction entre eux.

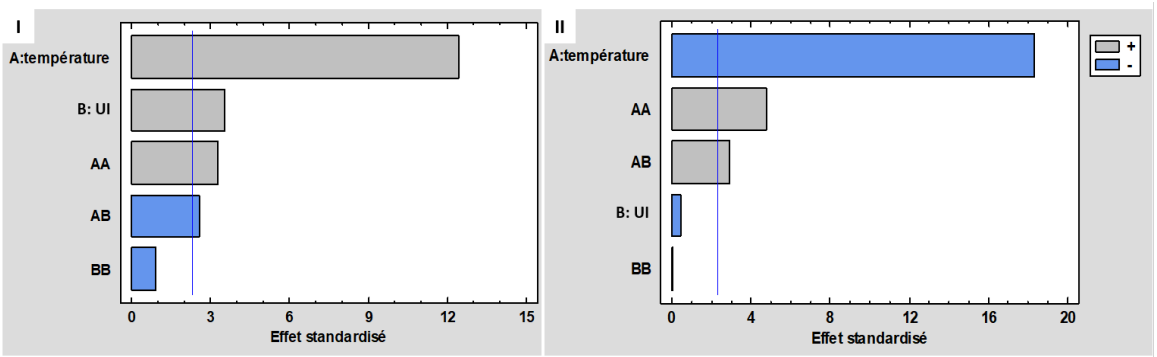



**Figure 43.** (I) Graphique Pareto pour TPC ; (II) Graphique Pareto pour le temps d'émondage

Un coefficient de détermination ($R^2$) de 95,88 % pour les polyphénols totaux (TPC) et de 97,87 % pour la SST a impliqué que ce modèle polynomial était pleinement performant pour prédire la réponse.

### b. Cinétique

Pour évaluer l'influence de l'extraction assistée par ultrasons dans les conditions optimisées (UI=9,47 $W.cm^{-2}$ et T=20 °C) obtenues par optimisation multi-réponse données par le plan d'expériences, une étude comparative a été réalisée entre les extractions par ultrasons et sans ultrasons. Cette dernière a été réalisée dans les mêmes conditions d'extraction par ultrasons avec une intensité ultrasonore nulle.

D'après la figure 44, il est possible d'observer que le rendement en TPC a augmenté dans les deux cas, davantage pour les amandes ultrasoniquées que pour les amandes non-ultrasoniquées. Comme l'indiquent ces résultats, le rendement en TPC était 258 % plus élevé avec l'UAE (0,820 ± 0,028 Eq mg de naringénine par g d'amandes) que le témoin sans ultrasons (0,228 ± 3,4 × $10^{-17}$ Eq mg de naringénine par g d'amandes) après 20 min d'extraction. Cette comparaison révèle une nette amélioration de l'extraction, qui est principalement attribuée à la cavitation ultrasonique (Figure 15), puisque le traitement a été réalisé à température ambiante (25 °C).

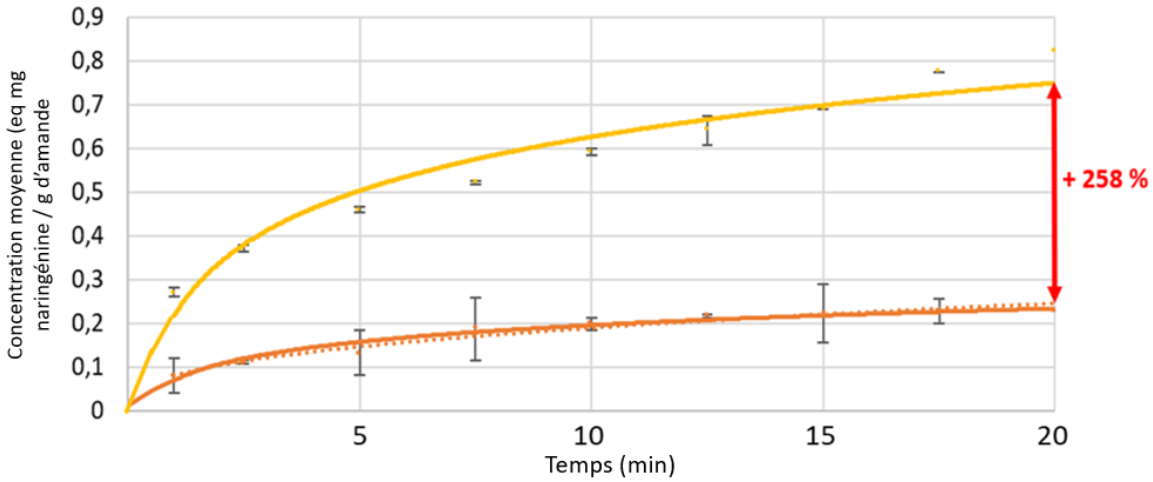



**Figure 44.** Cinétique du TPC (exprimé en eq mg Naringénine/g amandes) avec et sans ultrasons. Les expériences ont été réalisées en triplicata. US (jaune) versus Sans US (orange)

### c. Effet des ultrasons sur la structure des peaux d'amande

Afin de visualiser le mécanisme de cavitation des ondes ultrasonores, la microstructure de la peau d'amande après ultrasons a été étudiée à l'aide du MEB (figures 42 – 44).

Comme le montre la figure 45, les observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont fourni des informations sur la destruction des couches de la peau. La figure 45-D a montré que les effets des ultrasons sont progressifs. Ainsi, deux principaux effets ont été détectés : la fragmentation et l'érosion cellulaire. Ces effets sont :

- Une fragmentation de toutes les couches de la peau de l'amande ;
- Une érosion cellulaire : élimination des cellules du parenchyme, de la cuticule et des parois cellulaires de l'aleurone supérieur ;
- Une érosion cellulaire : élimination des cellules du parenchyme et de la cuticule + élimination partielle des parois cellulaires de l'aleurone supérieur ;
- Une érosion cellulaire avec une élimination des cellules du parenchyme.

**Référence (peau d'amande non traitée)** **Peau d'amande traitée**

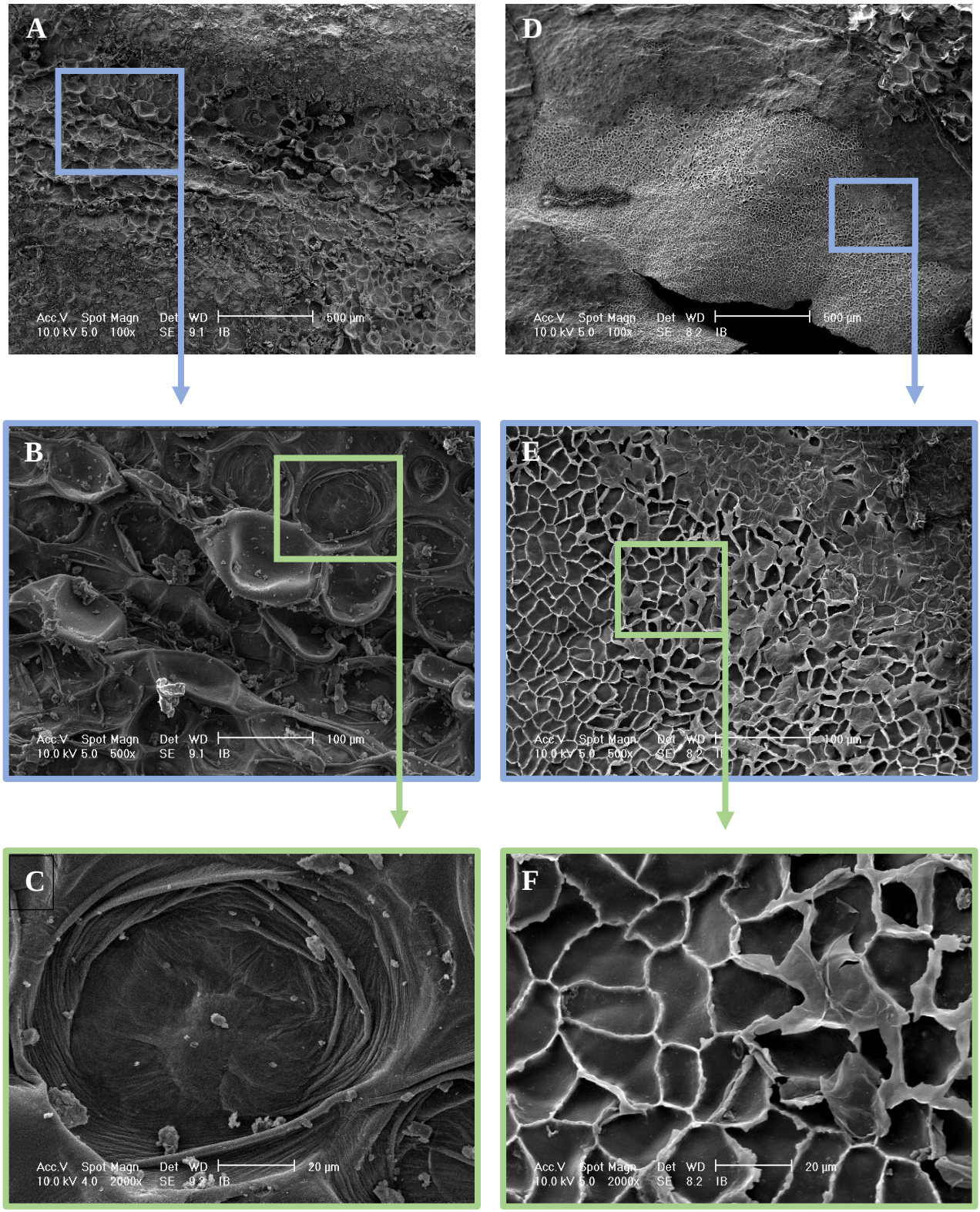



**Figure 45.** Observation au microscope électronique à balayage (MEB) de la peau d'amande avant (A-C) et après (D-F) sonication localisée. (A, D) : 100x ; (B, E) : 500x ; (C, F) : 2000x

Les couches de la peau de l'amande sont décrites dans l'article de Mandalari et al., (2010b).

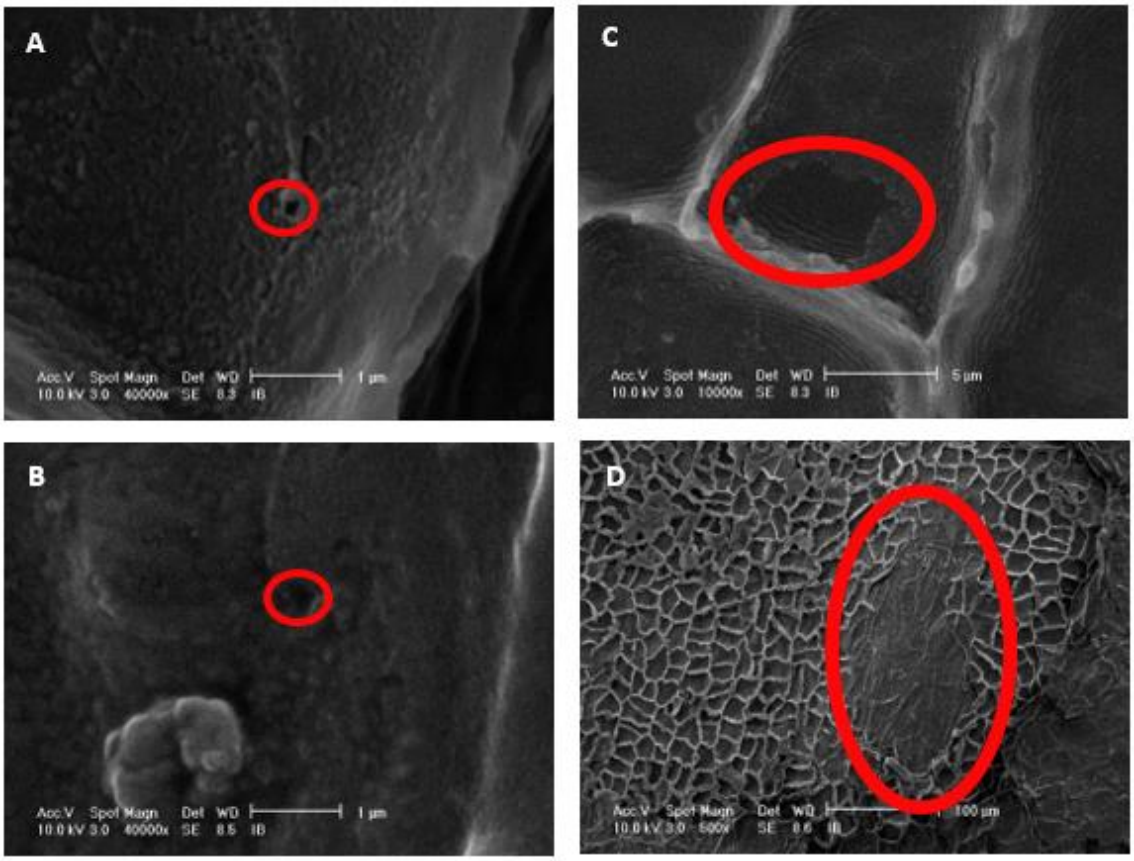



**Figure 46.** Effets primaires (A, B), effets secondaires (C) et érosion (D) après 20 min de sonication à 3 mm de distance de la sonde ultrasonique. (A, B) : 40 000× ; (C) : 10 000× ; (D) : 600×.

D'autres images au MEB sont illustrées dans la figure 46 montrant les effets primaires (< 0,5 µm) et secondaires (> 1 µm), également appelés sonoporation, en plus de l'érosion des parois cellulaires après 20 min de sonication. En fait, les effets primaires constituent des zones de nucléation, agissant par elles-mêmes comme des sites de nucléation, facilitant la formation de bulles, et donc favorisant l'érosion de la surface. La formation de nouvelles bulles augmente en fonction du temps. Les bulles fugaces s'effondrent ensuite à une « distance de cycle acoustique » du site de nucléation et créent une accumulation de zones d'impact. Ces effets conduisent à l'interconnexion de fissures constituant les plus grandes zones endommagées (Dular et al., 2004; Dular and Osterman, 2008).

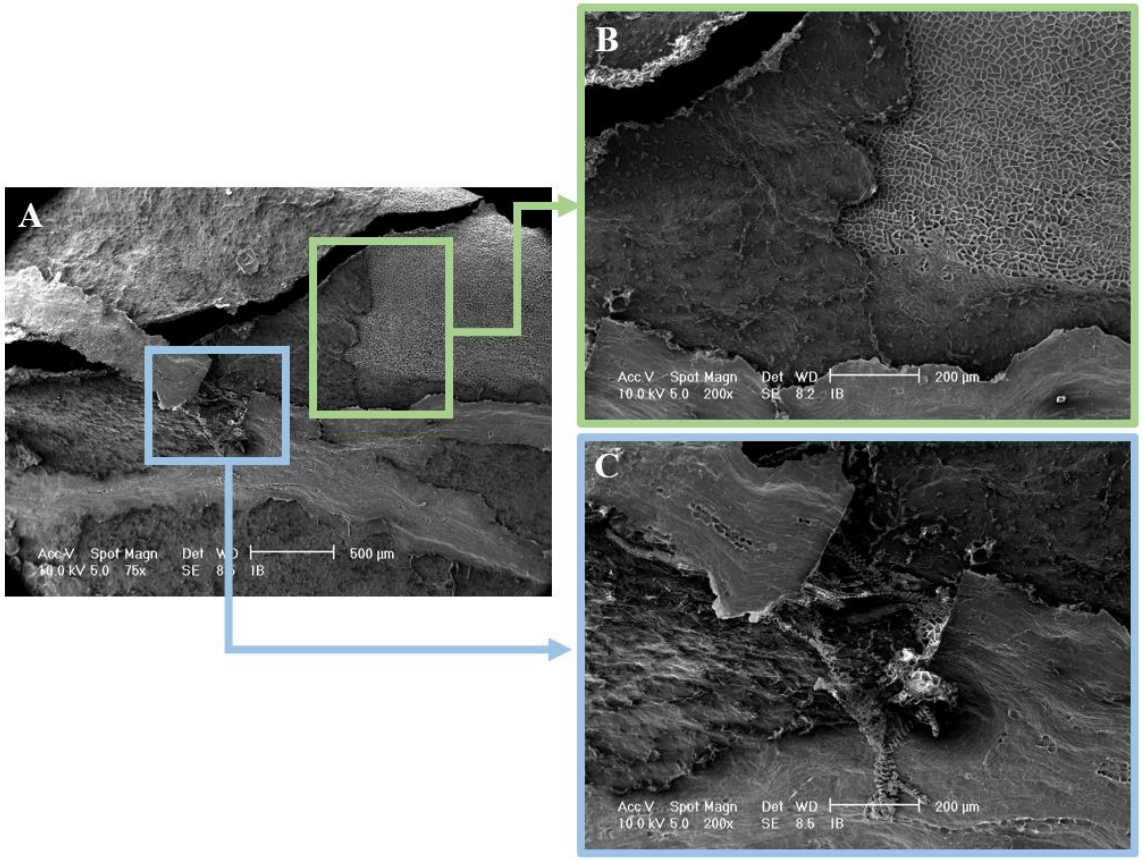



**Figure 47.** Effet des ultrasons sur la peau d'amande. (A*) :* 75x ; (B, C) 200x.

Par conséquent, les altérations provoquées par les ultrasons sur les cellules de la peau d'amande expliquent la présence du contenu cellulaire (polyphénols) qui a été extrait. L'augmentation du temps de traitement a un effet positif sur les rendements d'extraction des TPC. Ces derniers ont été étudiés et analysés par chromatographie liquide à ultra-haute performance (UPLC).

### d. Analyse du contenu phénolique des peaux d'amandes

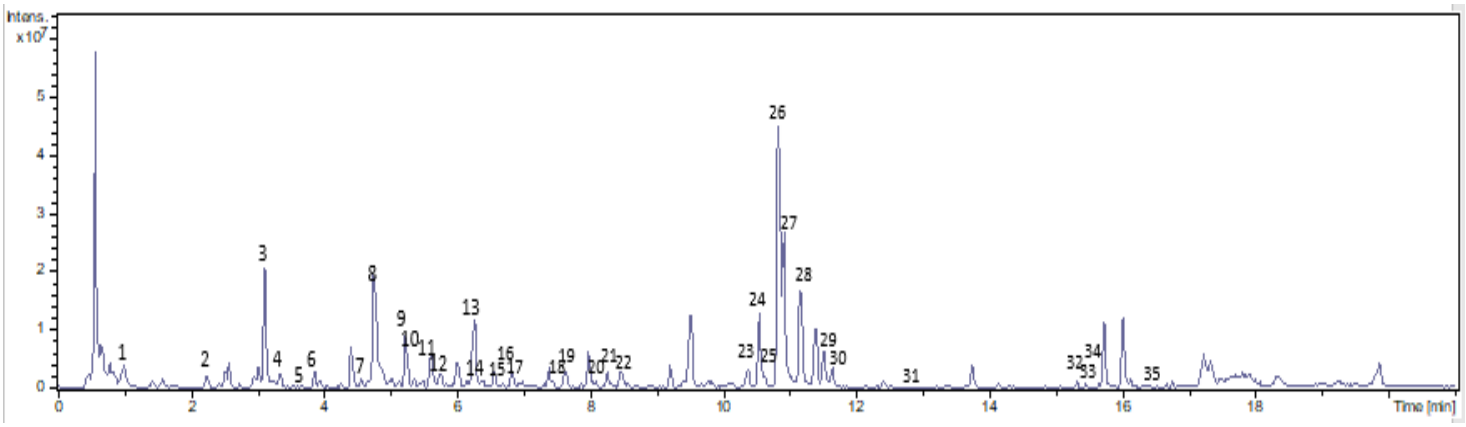



**Figure 48.** Chromatogramme UPLC des composés phénoliques dans les peaux d'amandes

**Qualification des composés phénoliques dans les extraits de peau d'amande** : La figure 48 illustre le chromatogramme UPLC des composés phénoliques des peaux d'amandes. Un total de 35 polyphénols (Flavanols, Flavonols, flavanones et non-flavonoïdes) et acides phénoliques ont été identifiés (Tableau 13) sur la base de leur temps de rétention (TR) et de leurs spectres UV et de masse.

**Tableau 13.** Composés phénoliques identifiés par UPLC-DAD/ESI-MSn dans des extraits de peau d'amande

| Pic | Composé | TR (min) | $[M-H]^-$ (*m/z*) | UV (nm) | MS2 (m/z) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Acide quinique | 1 | 191 | 203 ;221 | 111 ;173 |
| 2 | Di-hexoside d'acide vanillique | 2,3 | 491 | 204 ;223 ;268 ;275 | 167 |
| 3 | Di-hexoside d'acide vanillique | 3,1 | 491 | 205;213,5;221,5;281 | 167 |
| 4 | Di-hexoside d'acide vanillique | 3,4 | 491 | 232;277,5;286 | 167 |
| 5 | (Epi)Catéchine-hexoside | 3,8 | 451 | 279 | 161;289 |
| 6 | Di-hexoside d'acide vanillique | 3,9 | 491 | 206;227;278 | 167 |
| 7 | (Epi)Catéchine -hexoside | 4,6 | 451 | 279 | 289 |
| 8 | Dimère type B | 4,8 | 577 | 280 | 559;451;425;280 |
| 9 | Catéchine | 5,2 | 289 | 279 | |
| 10 | Acide chlorogénique | 5,3 | 353 | 286;330;346 | |
| 11 | Trimère type B | 5,6 | 865 | 279 | 289 |
| 12 | Trimère et Tetramère | 5,8 | 576;1153 | 233;279 | 289 |
| 13 | Dimère type B | 6,3 | 577 | 280;203,5;231 | 559;451;425;289 |
| 14 | Pentamère type B | 6,4 | 1441 | | 289 |
| 15 | Dimère type B | 6,7 | 577 | 279 | 289 |
| 16 | Epicatéchine | 6,8 | 289 | 204;279 | |
| 17 | Trimère type A (Epi)cat-(epi)cat- A→(epi)cat | 6,9 | 863 | 228;279 | 289 |
| 18 | Tetramère type B | 7,4 | 1153 | 279 | 289;863 |
| 19 | Trimère type B | 7,6 | 865 | 279 | 695;577;287 |
| 20 | Tetramère type B | 8,1 | 1153 | 279 | 289;863 |
| 21 | Pentamère type B | 8,2 | 1441 | | |
| 22 | Dimère type A | 8,5 | 575 | 279 | 287 |
| 23 | Dimère type A | 10,3 | 575 | 579 | 287 |
| 24 | Kaempferol-3-O-glucoside | 10,4 | 447 | 233;278 | 285 |
| 25 | Kaempferol-3-O-rutinoside | 10,6 | 593 | 233;268;346 | |
| 26 | Isorhamnétine-3-O-rutinoside | 10,8 | 623 | 227;254;356 | 315 |
| 27 | Isorhamnétine-3-O-glucoside | 10,9 | 477 | 254;339;357 | 315 |
| 28 | Isorhamnétine-3-O-glucoside | 11,2 | 477 | 234;339;346 | 315 |
| 29 | Dimère type A | 11,5 | 575 | 236;279 | 287 |
| 30 | Dimère type A | 11,6 | 575 | 237;279 | 287 |
| 31 | Naringénine-7-O-glucoside | 12,8 | 433 | 360 | |
| 32 | Naringénine | 15,3 | 271 | 360 | |
| 33 | Kaempferol | 15,5 | 285 | | |
| 34 | Isorhamnétine | 15,7 | 315 | 255;371 | |
| 35 | Isorhamnétine | 16,5 | 315 | 254;339;357 | |

Les composés phénoliques absorbent à 280 nm (acide vanillique, flavanols), 330 nm (acide chlorogénique) et 360 nm (flavonols, flavanones) (Monagas et al., 2007).

Les flavanols se présentent sous forme de monomères, d'oligomères et de polymères. Ces derniers étant également appelés procyanidines (dimères, trimères, tétramères et pentamères de type A et B), qui sont les principaux composés de la peau d'amande. Les unités monomères comprennent principalement la catéchine et l'épicatéchine.

Diverses procyanidines ont été identifiées malgré le mode Ultra Scan avec *m/z* 1500 comme maximum. La quantification des procyanidines a été effectuée après la phloroglucinolyse. En plus de la concentration des procyanidines, cette réaction permet de déterminer le degré moyen de polymérisation (mDP). L'analyse des produits formés en présence de phloroglucinol a révélé que trois produits majeurs étaient formés : le phloroglucinol-catéchine + le phloroglucinol-épicatéchine (A), la catéchine (Cat) (B) et l'épicatéchine (Epicat) (C) (Figure 49). La concentration de procyanidines (PC) dans la peau d'amande a été calculée comme indiqué dans les équations (6) et (7) (Cheynier et al., 2001).

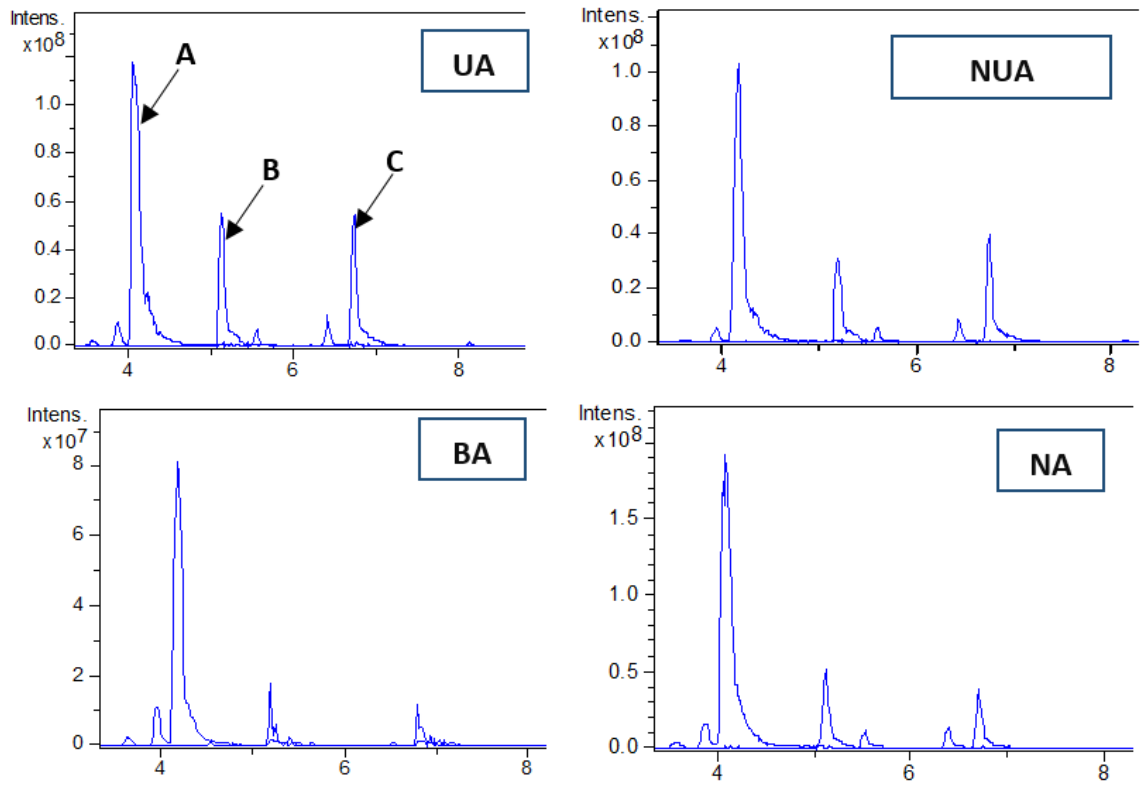



**Figure 49.** Chromatogrammes UPLC des composés résultant de la phloroglucinolyse des extraits UA, NUA, BA et NA. A : Phloroglucinol-Catéchine + Phloroglucinol-Epicatéchine ; B : Catéchine ; C : Epicatéchine

La catéchine et l'épicatéchine ont également été observées liées aux hexoses (Monagas et al., 2007). De petites quantités de non-flavonoïdes comme l'acide vanillique et l'acide chlorogénique ont été identifiées. L'acide vanillique était lié à deux hexoses, probablement du glucose et/ou du galactose. Les flavonols sont liés ou non à des sucres (glucose et/ou rhamnose et/ou galactose). Deux principaux flavonols ont été quantifiés : l'isorhamnétine et le kaempférol. Les composés identifiés appartenant aux flavanones comprennent la naringénine et le dérivé 7-O-glucoside correpondant.

Le tableau 14 résume la teneur en composés phénoliques en µg/100 g d'amande identifiés dans les extraits de peau naturelle (NS), d'amandes non ultrasoniquées (NUA), d'amandes ultrasoniquées (UA) et d'amandes blanchies (BA). La teneur en procyanidines dans les quatre échantillons est remarquablement la plus élevée, suivie par l'Isorhamnetin-3-O-rutinoside.

**Tableau 14.** Teneur en composés phénoliques dans les extraits NS, NUA, UA et BA (µg/100 g d'amande)

| Composé | NS (µg/100 g d'amandes) | NUA (µg/100 g d'amandes) | UA (µg/100 g d'amandes) | BA (µg/100 g d'amandes) |
|---|---|---|---|---|
| Di-hexoside d'acide vanillique | 1078,755 ± 34,918 | 66,542 ± 5,362 | 423,466 ± 49,448 | 244,954 ± 13,703 |
| Catéchine | 648,606 ± 13,761 | 72,697 ± 21,458 | 492,983 ± 245,115 | 335,874 ± 24,128 |
| Epicatéchine | 263,880 ± 18,180 | 37,630 ± 10,412 | 152,687 ± 44,656 | 219,992 ± 3,952 |
| (Epi)Catéchine -hexose | 198,438 ± 19,883 | 11,014 ± 3,064 | 136,352 ± 19,898 | 146,868 ± 44,053 |
| Acide chlorogénique | 34,413 ± 2,090 | 5,170 ± 1,481 | 33,300 ± 6,768 | 12,670 ± 0,506 |
| Isorhamnétine | 262,335 ± 2,433 | 9,128 ± 1,993 | 60,673 ± 7,481 | 28,303 ± 2,247 |
| Isorhamnétine-3-O-rutinoside | 2399,938 ± 117,987 | 161,525 ± 36,391 | 957,444 ± 66,744 | 522,461 ± 20,777 |
| Isorhamnétine-3-O-glucoside | 1571,872 ± 62,864 | 87,078 ± 19,874 | 487,314 ± 31,982 | 316,990 ± 15,035 |
| Kaempférol-3-O-glucoside | 72,047 ± 3,514 | 5,854 ± 1,417 | 29,543 ± 3,402 | 23,051 ±1,427 |
| Kaempférol-3-O-rutinoside | 228,887 ± 23,476 | 16,263 ± 3,056 | 105,088 ± 6,546 | 61,567 ± 3,382 |
| Naringénine | 23,806 ± 0,238 | 1,590 ± 0,161 | 10,671 ± 1,483 | 13,209 ± 1,017 |
| Procyanidines | 64636,825 ± 2670,149 | 2438,395 ± 617,387 | 21003,501 ± 3086,195 | 3994,015 ±77,235 |
| Total | 71419,802 | 2912,887 | 23893,023 | 5919,955 |
| | **100,00%** | **4,08%** | **33,45%** | **8,29%** |

**Quantification des composés phénoliques dans les extraits de peau d'amande** : en considérant le NS comme référence, l'extraction assistée par ultrasons (EAU) est la

technique la plus efficace pour extraire les composés phénoliques (33,45%) par rapport aux autres extractions (4,1% et 8,3% pour le NUA et le BA, respectivement). L'utilisation de solvants (méthanol dans ce cas pour les peaux naturelles) semble être plus efficace pour l'extraction des polyphénols par rapport aux ultrasons, mais cette dernière est certainement plus écologique et meilleure d'un point de vue environnemental puisque l'eau a été utilisée comme solvant, et qu'aucun chauffage n'est nécessaire. L'UAE pourrait être un substitut très intéressant pour l'utilisation des polyphénols dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques.

Pour le blanchiment des amandes, nous avons remarqué que la quantité de polyphénols extraits est faible par rapport aux amandes naturelles. Les résultats des travaux de Mandalari et al., 2010b montrent que la peau blanchie est riche en polyphénols par rapport à l'eau de blanchiment. Ceci peut être expliqué par la faible diffusion des polyphénols, puisque la température n'affecte pas leur stabilité (Volf et al., 2014). L'article de Boussetta et al., 2013 montre que augmenter la température semble être une méthode efficace pour l'extraction des polyphénols. La faible diffusion peut être expliquée par la courte durée d'exposition à la haute température (5 min), conduisant à une faible concentration de polyphénols extraits. Le pourcentage de composés phénoliques extraits avec la méthode de référence est négligeable (4,08%) en raison de la basse température (20 °C) et de l'absence d'agitation, donc de la faible diffusion.

Ces résultats peuvent être confirmés par le degré de polymérisation moyen. Pour NS, NUA, UA et BA, les degrés de polymérisation moyens (mDP) étaient respectivement de 8, 7, 7 et 5. On peut noter à partir de ces résultats que la température élevée utilisée pour le blanchiment a dépolymérisé les procyanidines et a réduit le degré moyen de polymérisation de 8 à 5. Il est clair que la quantité de procyanidines dans la peau d'amande est la plus élevée parmi les autres composés, en plus des flavanols sous leurs formes aglycones. En effet, les procyanidines représentent 90,50%, 83,71%, 87,91% et 67,47% des polyphénols totaux extraits pour chaque extrait de peau d'amande respectivement dans NA, NUA, UA et BA. Les glucosides de flavonol étaient également abondants et représentaient le deuxième composé phénolique le plus important dans les quatre extraits.

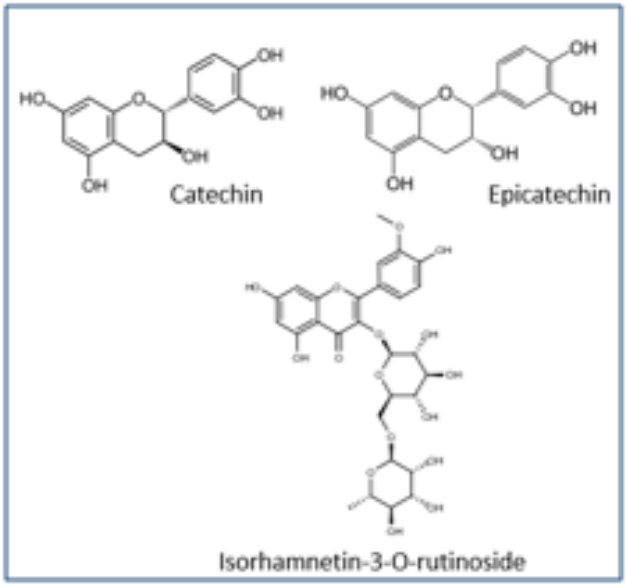



**Figure 50.** Structures des principaux polyphénols de la peau d'amande. Les sucres conjugués aux formes aglycones peuvent être du glucose, du galactose ou du rutinose, un disaccharide composé de rhamnose (6-déoxy-L-mannose) et de glucose.

## 2- Effet des ultrasons sur l'huile d'amande

Afin de comprendre l'effet des ultrasons sur l'huile d'amande, les amandes restantes de UA, BA et NA ont été récupérées et épurées de leur matière lipidique en utilisant une extraction Soxhlet automatique avec du n-hexane. Les rendements et le profil des acides gras ont ensuite été comparés.

**Tableau 15.** Analyse GC et rendements en huile de NA, BA et UA - Extraction Soxhlet

| Acides gras | NA (%) | BA (%) | UA (%) |
|---|---|---|---|
| **C16:0** | 6,069 ± 0,011 | 6,055 ± 0,068 | 5,903 ± 0,007 |
| **C16:1 n7** | 0,494 ± 0,001 | 0,522 ± 0,009 | 0,434 ± 0,001 |
| **C18:0** | 1,131 ± 0,009 | 1,158 ± 0,000 | 1,206 ± 0,000 |
| **C18:1 n9** | 71,475 ± 0,009 | 71,903 ± 0,596 | 72,065 ± 0,012 |
| **C18:2 n6** | 20,490 ± 0,010 | 20,590 ± 0,189 | 20,060 ± 0,001 |
| **Rendement en matière fraiche (%)** | 52,050 ± 0,015 | 52,500 ± 0,002 | 51,680 ± 0,024 |

D'après le tableau 15, les traitements thermiques n'altèrent pas les huiles d'amandes. Visiblement, le rendement des huiles extraites entre les systèmes conventionnel et ultrasonique par rapport aux amandes naturelles est resté stable avec une moyenne de 53% de l'huile d'amande totale extraite. Le profil des acides gras (AG) était également constant ; l'acide oléique (C18:1 n9) était l'AG le plus abondant dans les échantillons étudiés avec 71 %, suivi par l'acide linoléique (C18:2 n6) avec près de 20 %, l'acide palmitique (C16) avec près de 6 %, l'acide stéarique (C18) avec près de 1,1 % et l'acide palmitoléique (C16:1) avec près de 0,5 %. Dans tous les articles de recherche précédents qui ont étudié le profil des acides gras des amandes, l'acide oléique s'est avéré être le principal acide gras avec 57,54% à 73,94% (Sathe et al., 2008; Özcan et al., 2011). Compte tenu de ces résultats, l'UAE, présente l'avantage d'être une technique d'extraction non destructive puisqu'elle permet d'extraire le contenu phénolique des amandes sans endommager les acides gras essentiels qui pourraient être utilisés pour leurs nombreux avantages pour la santé (Ahmad, 2010).

Historiquement, l'huile d'amande a été utilisée pour ses nombreux bienfaits pour la santé et la beauté dans les anciennes écoles de médecine chinoise, ayurvédique et gréco-persane. L'huile d'amande douce contient de grandes quantités de vitamines E et K qui favorisent la régénération de la peau et maintiennent son élasticité, raison pour laquelle elle est utilisée dans de nombreux produits cosmétiques. L'huile d'amande est l'une des huiles les plus populaires utilisées en aromathérapie et en massothérapie, car elle convient à tous les types de peau (Čolić et al., 2019). L'huile d'amande peut également être utilisée comme huile alimentaire, principalement comme assaisonnement de salade et dans les trempettes de légumes.

## 3- Effet des ultrasons sur les protéines d'amande

L'analyse des protéines d'amandes traitées et non traitées par ultrasons a été effectuée en comparant leur teneur en protéines totales et leur profil d'acides aminés. Les résultats de la teneur en protéines des échantillons NA, BA et UA sont illustrés dans le tableau 16. Comme le montre le tableau, les teneurs en protéines des trois échantillons sont similaires avec une moyenne de 25,5 %. Selon des articles de recherche antérieurs sur la teneur en protéines des amandes, ces molécules se situaient entre 20 et 23% (Ahrens et al., 2005), ce qui confirme les résultats actuels.

**Tableau 16.** Teneur en protéines (%) et indice de dispersibilité des protéines pour NA, BA et UA (Van Eys et al., 2004)

| Échantillon | Teneur en protéines (%) | PDI (%) |
|---|---|---|
| NA | 26,127 ± 0,081 | 49,239 ± 0,517 |
| BA | 25,734 ± 0,298 | 39,260 ± 0,579 |
| UA | 25,396 ± 0,155 | 45,804 ± 1,055 |

En ce qui concerne le PDI (Protein Dispersibility Index), les résultats observés dans le tableau 16 mettent en évidence une différence de solubilité des protéines dans l'eau pour les extraits blanchis. En effet, la température a dénaturé les protéines ce qui explique la faible solubilité (39,26%). En revanche, le pourcentage de PDI pour l'UA est presque le même que celui des extraits d'amandes naturelles. Ces deux résultats combinés (teneur en protéines et PDI) prouvent que les ultrasons n'ont pas d'effet négatif sur les protéines des amandes, puisqu'il n'y a pas eu d'augmentation de la température. Ainsi, les protéines des amandes traitées par ultrasons sont solubles dans l'eau et sont également digestibles.

Afin d'illustrer la différence entre les profils d'acides aminés de NA, BA et UA, l'électrophorèse suivante a été réalisée (Figure 51). La distribution du poids moléculaire des protéines d'amande a été évaluée par SDS-PAGE dans des conditions réductrices (avec 2-marceptoéthanol) et non réductrices (sans 2-marceptoéthanol). Ce test a été mené pour confirmer l'impact du traitement initial ou de la transformation sur le profil protéique des amandes. De toute évidence, aucune différence dans les profils protéiques de l'amande blanchie n'a été observée dans des conditions réductrices et non réductrices, ce qui prouve une dénaturation élevée des protéines (Y. Zhang et al., 2016), alors que dans le cas des amandes ultrasoniquées et des amandes naturelles, le profil protéique était différent dans des conditions non-réductrices par rapport aux conditions réductrices. Nous pouvons observer une agrégation des protéines à ~30 kDa, similaire au profil protéique de la BA. Ces résultats montrent donc que les protéines UA sont plus solubles et plus digestibles que les protéines BA. Par conséquent, le traitement par ultrasons a un impact minimal sur la qualité des protéines par rapport au blanchiment.

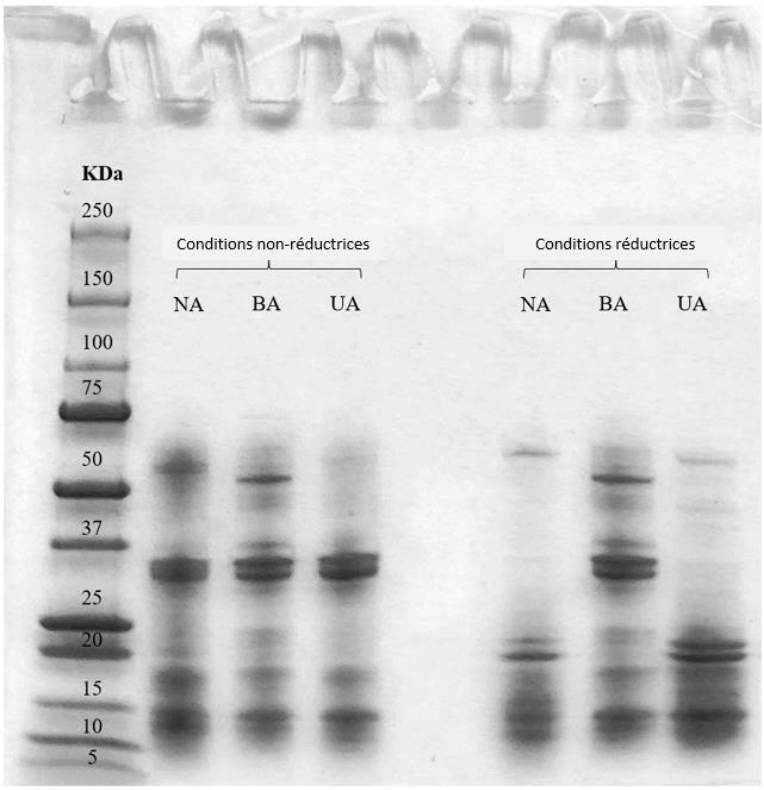



**Figure 51.** Comparaison entre les profils protéiques en SDS-PAGE de NA, BA et UA dans des conditions réductrices et dans des conditions réductrices.

De nos jours, il existe une tendance croissante vers des alternatives vertes et écologiques dans le domaine industriel. Les traitements commerciaux, y compris le blanchiment, sont utilisés lorsque l'élimination de la peau est nécessaire afin de transformer l'amande en sous-produits tels que la poudre d'amande, les amandes effilées, le lait d'amande (Berger, 1999), les confiseries, etc. Les ultrasons pourraient être introduites dans la chaîne de production, évitant le chauffage à haute température, donc la dénaturation et l'agrégation des protéines (Sathe and Sze, 1997; Venkatachalam et al., 2002), et permettant de préserver leur qualité nutritionnelle et leur digestibilité.

## 4- Modélisation de la diffusion et simulation numérique pour l'extraction des polyphénols

Les rendements d'extraction prédits ont été comparés aux rendements d'extraction déterminés expérimentalement et représentés sur la figure 52. On peut constater que malgré certaines divergences dans les courbes cinétiques d'extraction, en particulier dans la dernière étape de l'extraction assistée par ultrasons, le modèle de diffusion peut décrire de manière satisfaisante l'évolution du rendement phénolique total pendant l'extraction

avec et sans sonication. Des résultats similaires ont également été rapportés dans les études de Tao et al., (2017) et de Ravi et al., (2019b). Les faibles valeurs de l'erreur quadratique moyenne (*RMSE)* et *E%* (inférieures à 10 %) et la valeur $R^2$ élevée (supérieure à 0,93) répertoriées dans le tableau 17 démontrent toutes la précision considérablement élevée des résultats de la modélisation diffusionnelle.

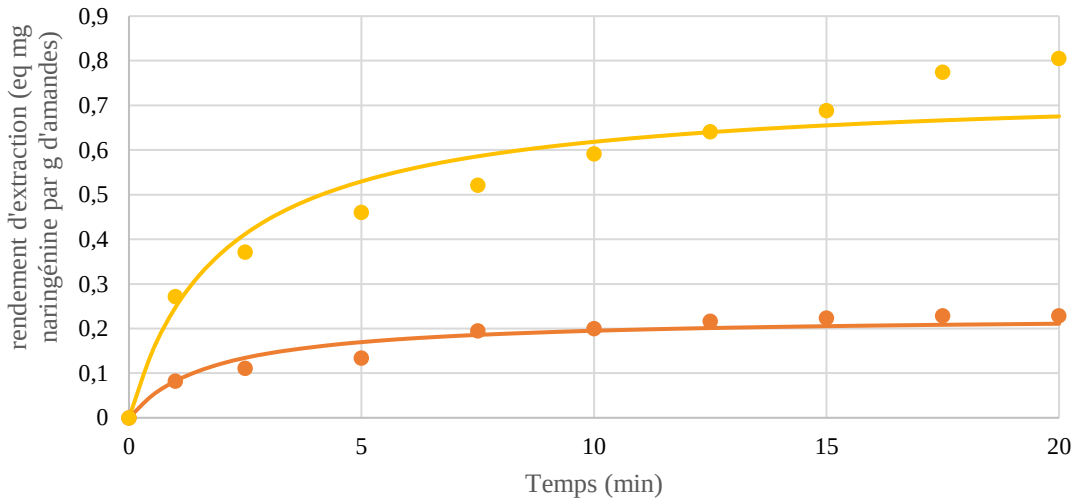



**Figure 52.** Cinétique d'extraction expérimentale par rapport à la cinétique d'extraction prédite des composés phénoliques des amandes. ● : sonication ; ●:non-sonication. La ligne continue dénote au modèle diffusionnel.

La valeur $D_e$ dérivée de la modélisation diffusionnelle pour l'extraction assistée par ultrasons était de 7,17 × $10^{-10}$ $m^2.s^{-1}$, et la valeur correspondante pour l'extraction incorporée sans ultrasons était de 1,83 × $10^{-10}$ $m^2.s^{-1}$. Les deux valeurs de $D_e$ étaient dans la même gamme que celle des phénoliques pendant l'extraction assistée par ultrasons de la courbe rouge (Tao et al., 2017). La diffusivité plus élevée des composés phénoliques pour l'extraction assistée par ultrasons était cohérente avec les résultats cinétiques, vérifiant que les ultrasons peuvent intensifier la diffusion des composés phénoliques dans la peau des amandes.

**Tableau 17.** Valeur *De* des composés phénoliques pendant l'extraction et adéquation du modèle de diffusion

| **Traitement** | ***De* ($m^2/s$)** | ***R*²** | ***RMSE* (mg/g)** | ***E* (%)** |
|---|---|---|---|---|
| **Sonication** | 7.17 × $10^{-10}$ | 0.934 | 0.0412 | 8.322 |
| **Non-sonication** | 1.83 × $10^{-10}$ | 0.947 | 0.0056 | 9.202 |

Sur la base des résultats numériques, les distributions des substances phénoliques dans la peau des amandes à différents stades de l'extraction sont visualisées dans la figure 53. Le gradient de concentration des composés phénoliques dans la peau des amandes pendant l'extraction peut être ignoré en raison de la faible valeur de l'épaisseur. Au même stade, une rétention plus faible des composés phénoliques dans la peau d'amande sous ultrasons a été observée, ce qui indique un rendement d'extraction plus élevé.

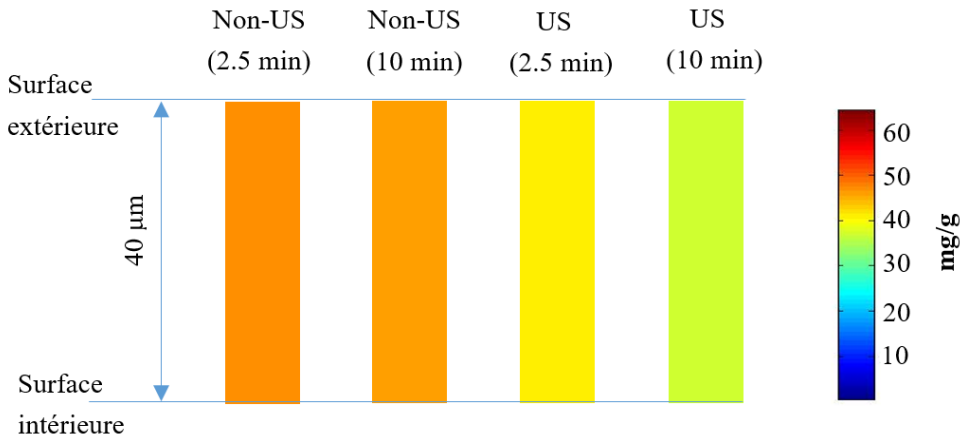



**Figure 53.** Distribution des substances phénoliques dans la peau des amandes pendant l'extraction

## IV- Conclusion

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) a permis de combiner l'extraction des polyphénols et la séparation de la peau d'amande avec une efficacité allant jusqu'à +258% par rapport à l'extraction silencieuse. L'étude microscopique des peaux d'amandes traitées a montré un impact notable des ultrasons sur les cellules de la peau, agissant par un mécanisme de détexturation à la chaîne en respectant les étapes suivantes : érosion locale, forces de cisaillement, sonoporation et fragmentation.

L'analyse des polyphénols a indiqué que les extraits de peaux d'amandes ont une concentration très élevée en procyanidines (jusqu'à 87%) et en glucosides d'isorhamnétine principalement. Les résultats de l'analyse des lipides ont révélé que les ultrasons n'ont pas d'effet négatif sur les huiles d'amandes puisque les rendements pour les amandes naturelles non traitées (NA) et les amandes traitées par ultrasons (UA) sont égaux. L'électrophorèse et le PDI ont montré une légère différence entre le profil des acides aminés de UA et NA et la solubilité des protéines dans l'eau.

Dans l'ensemble, les résultats indiquent que l'UAE est un procédé innovant et durable permettant une extraction efficace des polyphénols et une séparation de la peau, sans

aucun effet négatif sur les protéines et les lipides des amandes. En guise de perspective, l'extraction assistée par ultrasons pourrait être introduite dans la ligne de production, permettant la séparation de la peau à température ambiante, et conduisant à une réutilisation de l'eau de blanchiment, la préservation de la qualité des protéines et des huiles vers des industries plus écologiques et vertes telles que les cosmétiques, l'agriculture et la pharmacie. Dans cet article, nous donnons un exemple de réussite potentielle dans le traitement des aliments qui pourrait répondre à ces défis du 21$^{ème}$ siècle pour améliorer la qualité nutritionnelle, réduire l'énergie et les opérations unitaires pour le traitement, éliminer les déchets et les sous-produits, réduire l'utilisation de l'eau, et plus important encore, éliminer la faim, l'insécurité alimentaire et la malnutrition dans le monde.

applied sciences

MDPI

*Article*

# A One-Pot Ultrasound-Assisted Almond Skin Separation/Polyphenols Extraction and its Effects on Structure, Polyphenols, Lipids, and Proteins Quality

**Malak Tabib [1,2], Yang Tao [3], Christian Ginies [4], Isabelle Bornard [5], Njara Rakotomanomana [2], Adnane Remmal [1,*] and Farid Chemat [2,*]**

1 Department of Biology, Faculty of Science Dhar El-Mahraz, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, P.O. Box 1796, Fez 30050, Morocco; malak.tabib@alumni.univ-avignon.fr
2 INRAE, Avignon University, UMR 408, Green Extraction Team, F-84000 Avignon, France; njara.rakotomanomana@univ-avignon.fr
3 College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; YANG.TAO@NJAU.EDUC.CN
4 INRAE, Avignon University, UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84914 Avignon, France; christian.ginies@inrae.fr
5 INRAE, Unité de Pathologie Végétale, F-84140 Avignon, France; isabelle.bornard@inrae.fr
* Correspondence: adnaneremmal@gmail.com (A.R.); farid.chemat@univ-avignon.fr (F.C.)

Received: 9 May 2020; Accepted: 20 May 2020; Published: 24 May 2020

check for updates

**Featured Application: In the 21st century, we have to meet the challenges of green food processing to secure food production, reduce by-products, and protect both the environment and consumers. Ultrasound has been used as a non-thermal processing technique at the same time for processing (skin separation) and extraction (polyphenol extract). This new process to obtain peeled almonds reduces by-products and produces high value extract rich in polyphenols. The results of this investigation pave the way for the set-up of an industrial application of ultrasound to almond processing but also open up the way for combined utilization of ultrasound.**

**Abstract:** Almond skin is an important by-product in the almond processing industry, rich in potentially health-promoting phenolic compounds. The objective of this present study is to separate the skin from the almond and extract its polyphenol contents using Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) at room temperature. Optimization was performed according to a two-variable central composite design (CCD), and the optimum combination of ultrasonic intensity and extraction temperature was obtained through multi-response optimization: ultrasonic intensity (UI), 9.47 $W.cm^{-2}$; and temperature, 20 °C for an extraction time of 20 min. Under the above-mentioned conditions, total phenolic content was 258% higher with UAE than silent experiment. Mathematic modelling and microscopic investigations were achieved to enable understanding physical and structural effects of ultrasound on almond skins and comprehension of the mechanism behind the enhancement of mass transfer phenomena. Scanning Electron Microscopy (SEM) showed different acoustic cavitation impacts including fragmentation, sonoporation, and erosion. Extracts were analyzed by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS), identifying a combination of flavanols, flavanones and non-flavonoids. UAE shows no negative effect on almond proteins and lipids when compared to natural almonds (NS).

**Keywords:** Ultrasound; green food processing; extraction; almond; skin; microscopy; polyphenols; lipids; proteins

# *CHAPITRE III*

# *Concentration d'un système dilué – cas de l'eau de blanchiment des amandes : adsorption sur résine, analyse et applications*

Réalisé à Avignon Université sous la direction de Dr. Njara RAKOTOMANOMANA

**Adsorption of polyphenols from almond blanching water by macroporous resin**

M. Tabib, C. Ginies, N. Rakotomanomana, A. Remmal. (2022). International Journal of Food Science, vol. 2022, Article ID 7847276, 11 pages.

# I- Introduction

La grande production et la transformation des amandes génèrent des tonnes de déchets par an. Les amandes sont industriellement séparées de la peau par le processus de blanchiment effectué par immersion dans l'eau bouillante (Mandalari et al., 2010a). Par la suite, deux sous-produits ont suscité beaucoup d'attention : la peau des amandes et l'eau de blanchiment, cette dernière étant considérée comme une excellente source durable de substances phytochimiques, telles que les flavonoïdes, les tanins et les acides phénoliques (Garcia-Perez et al., 2021; Mandalari et al., 2010b; Prgomet et al., 2017). Compte tenu de la législation actuelle, l'eau de blanchiment doit être éliminée comme un déchet particulier, tandis que les téguments sont occasionnellement donnés aux animaux comme fourrage (Bottone et al., 2020). Par conséquent, l'exploitation des sous-produits de l'amande doit être intégrée dans un contexte de durabilité, en définissant des stratégies visant à établir une économie circulaire autour de l'industrie de l'amande (Barral-Martinez et al., 2021). Les polyphénols d'amandes peuvent être récupérés à partir de l'eau de blanchiment (Tabib et al., 2020) qui est facilement disponible et peu coûteuse. L'adsorption sur résine s'est avérée être l'une des techniques les plus efficaces pour l'enrichissement et la récupération des métabolites secondaires polyphénoliques des plantes (Kammerer et al., 2010).

Les résines sont relativement simples dans leur conception et faciles à régénérer, avec une capacité élevée et un taux favorable (Pérez-Larrán et al., 2018; Soto et al., 2011). Cette technique est utilisée pour le traitement des substances organiques et la concentration des polyphénols dans les eaux usées (par exemple, les eaux usées des moulins à olives) et les flux industriels (Vavouraki et al., 2021). Par rapport aux adsorbants classiques tels que les gels de silice, l'alumine et les charbons actifs, les résines polymériques macroporeuses sont considérées comme des alternatives plus intéressantes en raison de leur large éventail de structures de pores et de caractéristiques physico-chimiques (Li et al., 2001). En outre, les processus d'adsorption peuvent être facilement mis à l'échelle et certaines résines sont de qualité alimentaire (Thi Le T et al., 2020). Cette technique présente de nombreux avantages, notamment la possibilité de recyclage et de réutilisation, l'absence de coupure moléculaire et l'applicabilité à l'échelle industrielle (Kammerer et al., 2010). L'adsorption des polyphénols d'amandes sur résine a rarement été abordée dans les travaux précédents. À notre connaissance, le seul travail publié qui

traite de l'adsorption des polyphénols de l'eau de blanchiment sur la résine est la publication de Hellwig and Gasser (2020), où ils suggèrent la valorisation de l'eau de blanchiment de la production de massepain comme un flux de déchets de l'industrie alimentaire. Cependant, cet article de synthèse ne décrit pas l'ensemble des matériaux et méthodes et ne donne pas de résultats sur les rendements obtenus. C'est donc la première fois que les méthodes, ainsi que toutes les caractéristiques de l'extrait obtenu, sont décrites dans leur intégralité.

Dans le cadre de la sensibilisation à l'environnement, un intérêt croissant pour la valorisation des flux de déchets destinés à répondre à la demande alimentaire mondiale actuelle a été remarqué. La présente étude présente la résine macroporeuse XAD-7 HP comme une approche pour récupérer les polyphénols de l'eau de blanchiment des amandes. Après la détermination des paramètres d'adsorption, l'extrait sec obtenu après désorption et évaporation de l'acétone a été analysé par UPLC-MS pour quantifier les phénols retenus pendant le processus d'adsorption. En outre, ses activités antioxydantes et antimicrobiennes ont été étudiées. Enfin, des exemples d'applications telles que l'atomisation et le prilling ont été proposés pour assurer leur immobilisation, leur protection et leur stabilisation.

## II- Matériels et méthodes

### 1- Blanchiment des amandes

Les amandes issues de l'agriculture biologique (*Prunus dulcis*) ont été fournies par Auchan (lot n° 2002M19, Avignon - France).

Le blanchiment des amandes a été réalisé avec un ratio de 1:5 (m/v ; g/mL) pendant cinq minutes (Tabib et al., 2020). Après égouttage des amandes, l'eau de blanchiment (Blanching Water ; BW) a été refroidie instantanément dans un bain de glace jusqu'à température ambiante, centrifugée deux fois à 9000 tours/minute pendant 10 min (20 °C) (SIGMA 4-16KS, Allemagne), et filtrée dans un entonnoir à filtre Pyrex® avec disque en verre fritté (porosité 4). L'eau de blanchiment (blanching water ; BW) résultante a été utilisée immédiatement sans être stockée pour éviter le risque d'oxydation.

### 2- Préparation de la résine

La résine Amberlite® XAD-7 HP a été fournie par ThermoFisher SCIENTIFIC (USA) (Hellwig and Gasser, 2020). Selon le fabricant, ces billes acryliques ont une surface de

380 m²/g, une taille de pore moyenne de 300-400 Å et un volume de pore de 0,5 ml/g. Avant l'adsorption, la résine a été prétraitée pour éliminer les impuretés et le blocage des pores selon la méthode de Sun et al., (2013) avec de légères modifications. Brièvement, 300 grammes de résine brute ont été rincés six fois avec 100 mL d'éthanol à 95 %, puis avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'éluant soit clair. Ensuite, elle a été lavée avec 600 mL de HCl à 5% et rincée avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le pH de l'éluant soit neutre. Après cette étape, elle a été lavée avec 600 mL de NaOH à 3%, rincée avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'éluant soit neutre. Enfin, la résine est nettoyée avec de l'éther diéthylique et séchée au moyen d'un rotavapor (Büchi Rotavapor R II, Suisse) fonctionnant à 40 °C.

## 3- Etapes d'adsorption/désorption

Les expériences d'adsorption en lit fixe ont été réalisées dans une colonne en verre à double enveloppe XK 50 (Angleterre) d'une longueur de 30 cm et d'un diamètre interne de 5 cm (Figure 54). La colonne est remplie de 150 g de résine préparée à l'avance jusqu'à une hauteur de 16 cm, puis rincée à l'eau distillée pour dilater la résine. Les polyphénols du BW sont adsorbés par flux ascendant à l'aide d'une pompe péristaltique. Le temps d'adsorption a duré 2 heures. Le système est connecté avec une entrée d'azote pour limiter l'oxydation des polyphénols.



**Figure 54.** Appareillage d'adsorption

Pour l'étape de désorption, la résine a été rincée avec de l'acétone dans un flux descendant jusqu'à l'obtention de fractions claires. Ainsi, la résine retrouve sa couleur initiale. Les volumes d'acétone utilisés étaient les suivants : 250 mL pour 1 L, 350 mL pour 2 L, et 500 mL pour 3 L et 4 L de BW adsorbé (qualité HPLC, VWR Chemicals). Les fractions ont ensuite été recueillies dans un flacon en verre à fond rond et à ébullition. L'acétone a été évaporée à l'aide d'un rotavapor fonctionnant à 40°C. L'extrait sec résultant a été récupéré et conservé dans des tubes à hémolyse à -20°C. Les expériences se sont arrêtées à l'adsorption de 4 L puisque l'équilibre a été atteint lorsque la masse extraite a atteint l'équilibre.

Le processus d'adsorption est généralement exprimé par la capacité d'adsorption, qui représente la quantité de soluté retenue par unité de masse de l'adsorbant solide en fonction de la de la concentration à l'équilibre du soluté dans la phase liquide à une température constante. La capacité d'adsorption Q (mg/g de résine sèche) à l'équilibre est déterminée selon l'équation suivante (Wang et al., 2019) :

$$Q = \frac{(C_0 - C_e)\, x\, V_a}{M} \quad (1)$$

Où $C_0$ et $C_e$ sont les concentrations initiales et d'équilibre des polyphénols dans la BW, exprimées en mg/L, $V_a$ représente le volume du BW utilisé pour l'adsorption en ml, et $M$ est le poids sec de la résine utilisée en g.

La capacité d'adsorption à surface spécifique (SA, quantité de composés bioactifs adsorbés par $m^2$ de résine, équation (2)) a été calculée comme suit :

$$SA = \frac{(C0 - Ce) \times Va}{M \times SS} \quad (2)$$

Où SA est la capacité d'adsorption en surface ($mg/m^2$) et SS est la surface spécifique de la résine ($m^2/g$) (Thi Le T et al., 2020). La même résine a été recyclée comme décrit dans la section 2.2 et réutilisée pour toutes les expériences.

## 4- Activité antioxydante

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un réactif très coloré qui permet de fixer un atome d'hydrogène retiré de l'antioxydant contenu dans l'extrait avec la formation concomitante d'une hydrazine incolore (DPPH-H) (Mimica-Dukic et al., 2004). Le test FRSA (Free Radical Scavenging Activity) a été réalisé comme décrit par (Mimica-Dukic

et al., 2004) avec quelques modifications : l'extrait sec obtenu est dissous dans du méthanol aqueux à 80 % (v/v) avec une concentration finale de 10 g/L. Dans une microplaque, 50 µL de la solution sont introduits dans les puits de la microplaque et mélangés avec le même volume d'une solution méthanolique de DPPH 0,5 mM. L'absorbance est ensuite lue à 520 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Allemagne).

Le pourcentage d'inhibition est calculé à partir de l'équation suivante :

$$I\% = \frac{A0-AE}{A0} \times 100 \quad (3)$$

Où *A0* est l'absorbance du blanc (sans l'extrait) et *AE* est l'absorbance de l'extrait à différentes concentrations (Périno-Issartier et al., 2011). La valeur IC50 (concentration donnant I%=50) est calculée en traçant I% en fonction des concentrations de l'extrait.

## 5- Chromatographie liquide à haute performance

Les extraits de polyphénols ont été analysés par chromatographie liquide ultra performante (UPLC) à l'aide d'un système ACQUITY UPLC® (Waters Corp., Milford, MA, USA) relié simultanément à un détecteur à barrette de diodes 190-800 nm (UPLC DAD, Waters, Milford, MA, USA) et à un spectromètre de masse Bruker Daltonics HCT (High Capacity Ion Traps) équipé d'une source d'ions electrospray (UPLC DAD/ESI-MSn). L'analyse est réalisée à l'aide d'une colonne C18 ACQUITY UPLC® BEH (100 mm × 2,1 mm, d.i., 1,7 µm ; Waters Corp., Milford, MA, USA). La température de la colonne est réglée à 40 ˚C. Le volume d'injection a été fixé à 2 µL. La phase mobile était de l'eau contenant 0,1% de FA (acide formique) (solvant A) et 0,1% de FA Acetonitrile (solvant B). Les conditions de débit et de gradient étaient les suivantes : débit initial 0,6mL/min et variation linéaire à 0,4 mL/min à 6 min. Gradient linéaire A, 97-90%, 0-6 min ; A, 90-70%, 6-13 min ; A, 70-35%, 13-14 min ; A, 35-30%, 14-15 min ; A, 30-0%, 15-15,5 min ; A 0-97%, 15,5-16 min.

Le piège à ions a fonctionné en mode Ultra Scan de m/z 100 à 1500. La cible ICC était réglée sur 100 000 avec un temps d'accumulation maximal de 50 ms. L'azote (pureté de 99,99 %) est utilisé comme gaz de désolvatation. L'ionisation a été réalisée en utilisant une source ESI en négatif. Les paramètres de la source d'ionisation étaient réglés comme suit : température sèche 365 ˚C, pression du nébuliseur 50 psi, débit de gaz sec 9 L\min $^{-1}$, tension capillaire -2 kV.

Les pics chromatographiques ont été provisoirement identifiés par leurs spectres de masse MS et lorsque cela était possible, par injection d'étalon. La quantification a été effectuée avec le signal UV sur la base de la courbe d'étalonnage de la catéchine, de l'épicatéchine et de l'acide vanillique à 280 nm, de l'acide chlorogénique à 330 nm, de l'isorhamnétine, du kaempférol et à 360 nm.

Les autres composés pour lesquels des standards n'étaient pas disponibles (procyanidines, hétérosides) sont exprimés en équivalent des standards injectés.

Teneur en polyphénols : une masse connue d'extraits obtenus par résine (Resin Obtained Extract ; ROE) et d'extraits lyophilisés (Freeze-Dried Extracts ; FDE) de BW est dissoute dans 500 µL d'une solution de méthanol à 80%. Les solutions sont mélangées par vortex et soniquées pendant 5 minutes. Après centrifugation, les surnageants sont recueillis puis dilués deux fois avec de l'eau distillée avant d'être injectés.

Teneur en procyanidines : les procyanidines dans les deux extraits ont été évaluées de la manière suivante : brièvement, une masse connue des ROE et FDE est ajoutée à 600 µL d'une solution de menthofurane (6 g/L dans du méthanol) et 200 µL d'une solution de HCl anhydre (0,4 M dans du méthanol). Les solutions sont ensuite incubées pendant une heure à 40 °C sous agitation continue, puis injectées pour analyse (Billerach et al., 2020).

La concentration de procyanidines (Procyanidins Concentration ; PC) dans la peau des amandes a été calculée à l'aide des équations suivantes (Cheynier et al., 2001) :

$$PC = ([\text{upper and extension units}]_M + [\text{end units}]_M) \quad (4)$$

$$PC = ([\text{cat}_{MF}] - [\text{cat}_C]) + ([\text{epicat}_{MF}] - [\text{epicat}_C]) + [\text{cat-MF}] + [\text{epicat-MF}] \quad (5)$$

Où *[cat MF]* et *[epicat MF]* sont les concentrations de catéchine et d'épicatéchine après menthofuranolyse, *[cat C]* et *[epicat C]* sont les concentrations de catéchine et d'épicatéchine brutes avant traitement, *[cat-MF]* et *[epicat-MF]* sont les concentrations respectives de catéchine-menthofurane et d'épicatéchine-menthofurane, respectivement.

Le degré moyen de polymérisation (mDP), c'est-à-dire le nombre moyen d'unités dans le polymère, peut également être déterminé en plus de la concentration en procyanidines. Le mDP de l'extrait est calculé selon l'équation 4 :

$$mDP = \frac{[\text{upper and extension units}]M + [\text{end units}]M}{[\text{end units}]M} \quad (6)$$

## 6- Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de l'extrait a été évaluée contre deux souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram -) et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Gram+). La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée en utilisant une plaque de 96 puits. Dix concentrations de l'extrait ont été préparées avec de l'eau distillée stérile et se situaient entre 30 mg/mL et 0,25 mg/mL.

Les suspensions bactériennes ont été préparées comme suit : brièvement, des cultures de souches conservées dans une gélose Mueller-Hinton (MHA, Biokar®) à 4 °C ont été mises en suspension dans une solution saline stérile (9 g/L NaCl). Après mise en suspension, leur densité est ajustée à la turbidité d'un standard McFarland de 0,5 (équivalent à 1,5 x $10^8$ CFU/ml) (Hriouech et al., 2020). Les concentrations de l'extrait préparé précédemment ont été diluées avec des volumes appropriés du milieu Mueller-Hinton (MHB, Biokar®) et introduites dans la plaque de 96 puits avec les cultures bactériennes. Les plaques sont ensuite agitées pendant 10 minutes dans un agitateur numérique IKA® MS 3 (Chine), puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les deux expériences, en plus d'un blanc, ont été réalisées en duplicate.

## 7- Applications

### a- Prilling

Des capsules et des billes d'alginate ont été produites avec un appareil de vibration à haute fréquence. Un encapsulateur Büchi B-395 Pro (Suisse) a été utilisé pour régler les paramètres du processus afin d'obtenir des billes/capsules de taille uniforme pour encapsuler les solutions d'extrait d'amande. Deux types de buses ont été utilisés ; une buse unique pour les billes et une buse concentrique pour les capsules à noyau aqueux et à noyau huileux. Les paramètres de fonctionnement du Büchi B-395 Pro ont défini des valeurs pour la tension (250-2500 V), la fréquence de vibration (40-6000 Hz), le système de pompe à air (0,5-200 ml/min) et le système de pompe à seringue (0,01-50 ml/min).

Trois produits différents ont été obtenus :

- Billes : une solution de 1 g/L de ROE a été préparée dans une solution d'alginate de sodium à 1,5 % (p/p) de faible viscosité dans de l'eau osmosée (Büchi, Suisse). Une buse unique d'une taille de 1000 µm a été utilisée. Après dégazage, le réglage et

ajusté les paramètres de fréquence, de pression et de débit, la solution a été pulvérisée dans un bécher de 150 mL contenant 75 mL d'une solution de chlorure de calcium à 5% (Merck) sous agitation continue (Figure 55);

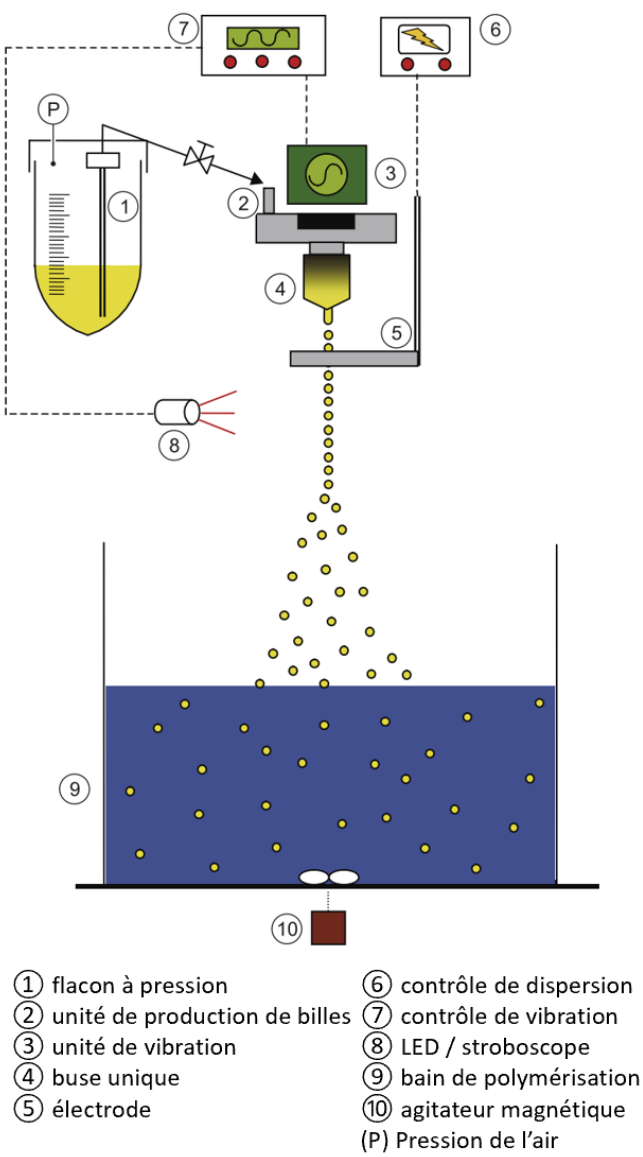



**Figure 55.** Représentation schématique de l'encapsulateur B-395 Pro– production de billes (www.buchi.com/fr)

- Capsules à noyau d'huile : une solution de 0,2 g/L a été préparée après dissolution d'une masse de l'extrait dans de l'huile de tournesol. Après sonication, la solution de noyau est introduite dans une seringue et reliée à la chambre de pulsation. Cette même chambre a été reliée à une bouteille à pression contenant une solution d'alginate de sodium à 2% (p/p) préalablement dégazée. Un bécher de 150 mL a été rempli de chlorure de calcium à 5 % (p/p) et placé sous la buse de l'agitateur

magnétique. En fonction des diamètres interne et externe des buses, les paramètres de l'encapsulateur ont été réglés pour obtenir des particules précise à la lumière d'une lampe stroboscope (Figure 56);

- Capsules à noyau aqueux : le noyau est constitué d'une solution de l'extrait obtenu par résine (ROE) à 1 g/L. Le flacon à pression est rempli d'une solution dégazée d'alginate de sodium à 2% avec du SDS à 10 mM. Les capsules sont recueillies dans une solution de $CaCl_2$ et Tween 20 à 5% et 0,1%, respectivement. Les mêmes paramètres précédemment cités ont été modifiés pour avoir des capsules de taille uniforme en fonction des diamètres des buses internes et externes (Figure 56).

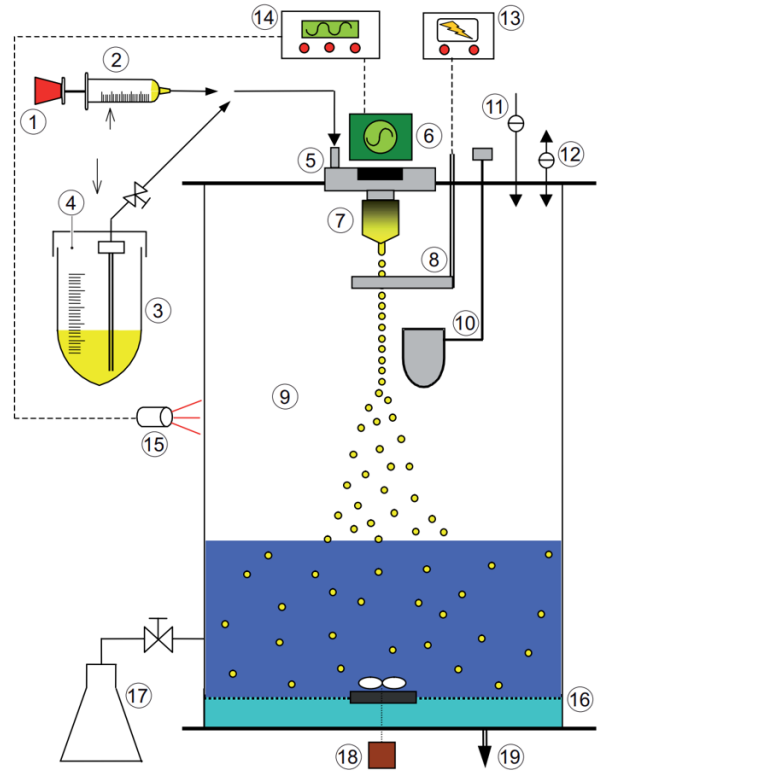



**Figure 56.** Représentation schématique de l'encapsulateur B-395 Pro – production de capsules (www.buchi.com/fr)

Un test de libération du contenu de la capsule a été réalisé sur les billes obtenues par les buses de 1000 µm. Pour cela, une solution de pH 5 a été obtenue en mélangeant 2,57g de

citrate de sodium et 0,24 d'acide citrique dans une solution aqueuse (eau osmosée). Les variations de pH (ajustées à 3, 5 et 12) ont été obtenues en ajoutant des solutions de HCl 0,1 M et de NaOH 0,1 M. En outre, l'effet destructeur d'une solution de NaCl 1M a été testé sur les billes.

### b- Atomisation

L'équipement de séchage par pulvérisation consistait en un Mini Spray-Dryer Büchi B-290. Une solution d'alimentation aqueuse de 200 mL composée de 16 % de maltodextrine, 20 % de gomme d'acacia, 0,1 % de ROE et 1 % d'huile essentielle (par exemple l'huile essentielle de *Citrus limonum*) a été préparée à l'aide d'un agitateur magnétique. Les variables de fonctionnement du procédé ont été sélectionnées sur la base des résultats de plusieurs essais réalisés avec des échantillons.

La solution d'alimentation est transférée par une pompe péristaltique à travers une buse vers la chambre de séchage préalablement chauffée à une température d'entrée de 120 °C. Les particules séchées sont ensuite conduites vers le flacon de collecte par la technique du cyclone. L'azote comprimé est utilisé comme gaz d'atomisation tandis que l'air ambiant conditionné a servi de gaz d'entrée (Figure 57).

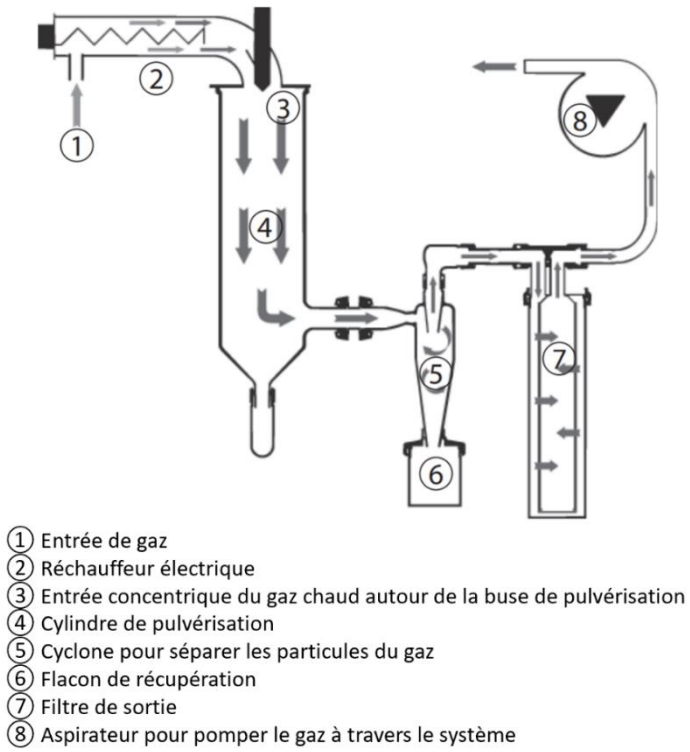



**Figure 57.** Principe de fonctionnement de l'air de séchage dans l'atomiseur B-290 (www.buchi.com/fr)

# III- Résultats et discussion

## 1- Adsorption / désorption sur résine

L'objectif de cette étude était de déterminer l'équilibre d'adsorption des polyphénols de BW sur la résine XAD-7 HP. Des premiers essais ont été réalisés, où 2 grammes de résine à l'état sec ont été mises en réaction avec 100 mL d'eau de blanchiment pendant 24 heures à température ambiante avec agitation continue (Figure 58). Les limitations majeures de cette méthode incluent le temps long d'adsorption et les concentrations faibles adsorbées par les résines.

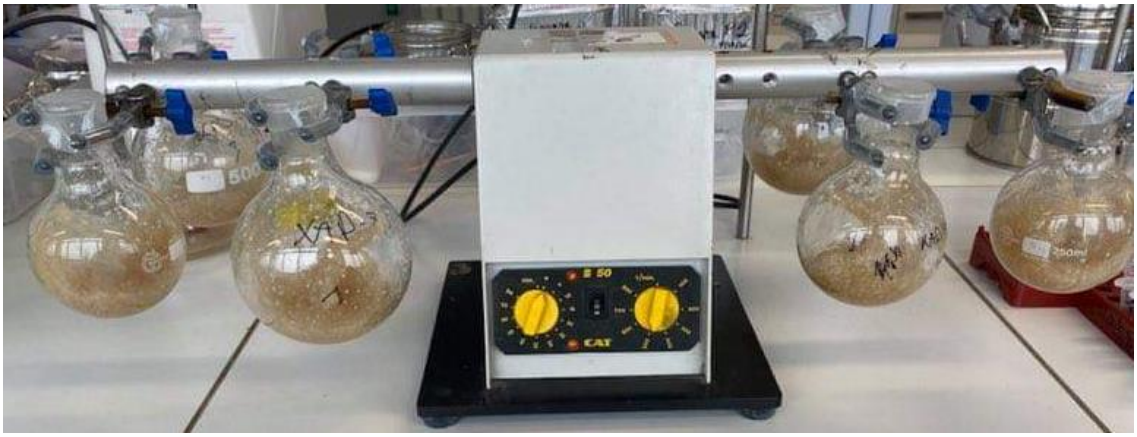


**Figure 58.** Agitateur - adsorption sur résine (essai 1)

Un deuxième essai a été réalisé, où 1 L d'eau de blanchiment a été adsorbé sur 30 g de résine. Le processus d'adsorption a duré 2 heures suivant un fonctionnement en lit fixe à un flux descendant utilisant une colonne en verre. En effet, les limitations précédemment citées ont été résolues et des quantités intéressantes d'extrait sec ont été récupérées. Cependant, la résine pouvant être saturée, un troisième test a été mené. Pour ce faire, des volumes croissants de l'eau de blanchiment (BW) ont été adsorbés sur 150 g de résine XAD-7 HP (1L à 3L). La même résine a été recyclée selon la méthode décrite dans la section II.2 et réutilisée pour toutes les expériences. Des fractions concentrées en extrait ont été récupérées après désorption à l'acétone (volumes décrits en section II-3 ; figure 59).




**Figure 59.** Fractions récupérées après désorption

Le processus d'adsorption est généralement exprimé par la capacité d'adsorption qui représente la quantité de soluté retenue par unité de masse de l'adsorbant solide en fonction de la concentration d'équilibre du soluté dans la phase liquide à température constante. Il est donc nécessaire de calculer la quantité de soluté retenue par unité de masse de l'adsorbant correspondant à chacune des concentrations d'équilibre déterminées expérimentalement. Ce paramètre a été calculé selon l'équation (1). La capacité d'adsorption de la résine est ≈ 22 mg/g de résine. Les expériences se sont arrêtées au bout de 3L d'adsorption puisque l'équilibre a été atteint.

La figure 60 présente les concentrations des extraits dans les trois volumes d'eau de blanchiment avant et après adsorption ainsi que les masses obtenues. D'après les graphiques A et B, on peut constater que la concentration moyenne extraite par litre d'eau de blanchiment a été multipliée par plus de cinq après adsorption. La résine XAD-7 HP est donc une technique efficace pour la concentration de l'eau de blanchiment des amandes en système dilué.

Le tableau 18 illustre les concentrations moyennes des extraits dans les trois volumes d'eau de blanchiment avant et après adsorption ainsi que les masses d'extrait obtenues. On peut observer que l'adsorption de l'eau de blanchiment des amandes permet de multiplier jusqu'à cinq fois sa concentration, où la concentration augmente considérablement, passant d'une moyenne de 1,1 g/L de BW à environ 5,9 g/L d'acétone. La résine XAD-7 HP est donc une technique efficace pour la concentration de l'eau de blanchiment des amandes, considérée comme un système dilué.

L'équilibre a été atteint après l'adsorption de 3 L de BW. La différence entre les Cf correspondant à 3 L et 4 L n'est pas significative.

**Tableau 18.** Concentration des extraits dans quatre volumes de eau de blanchiment (1-4 L) avant l'adsorption exprimée en g/L de BW et après adsorption exprimée en g/L d'acétone.

| BW (L) | $C_0$ (g/L de BW) | $C_f$ (g/L d'acétone) |
|---|---|---|
| 1 | 1.260 ± 0.126 | 5.040 ± 0.306 |
| 2 | 1.092 ± 0.036 | 6.240 ± 0.103 |
| 3 | 1.098 ± 0.044 | 6.588 ± 0.088 |
| 4 | 1.160 ± 0.113 | 6.605 ± 0.056 |

La figure 60 confirme les résultats présentés dans le tableau 18. Elle montre une augmentation régulière de la masse de l'extrait après l'adsorption de 1 L à 3 L de volumes de BW sur la résine et se stabilise après l'adsorption de 4 L de BW. L'évaporation complète de l'acétone a donné lieu à une poudre de couleur brun foncé qui a été récupérée puis stockée dans un récipient en verre à -20°C pour des analyses ultérieures.

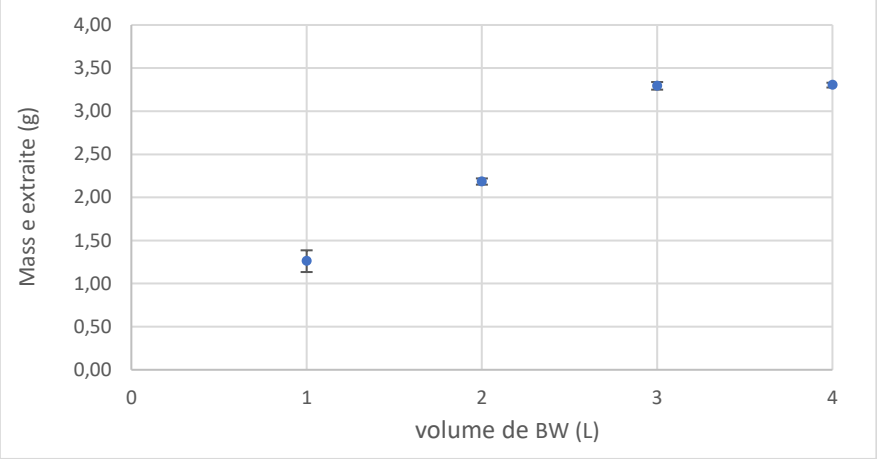



**Figure 60.** Masses extraites après adsorption de 1 L, 2 L, 3 L et 4 L d'eau de blanchiment, exprimées en g

Selon les équations (1) et (2), la capacité d'adsorption (Q) de la résine est de 21 ± 0.29 mg/g de résine, et la capacité d'adsorption de surface (SA) est d'environ 0.06 mg/m$^2$.

Parallèlement aux résultats décrits ci-dessus, l'efficacité de la résine macroporeuse comme adsorbant des polyphénols dans les effluents a été décrite dans de nombreuses études récentes. L'exemple de l'adsorption des eaux usées de la trituration des olives (OMW) sur les résines a été largement étudié. Les résultats de l'article de Vavouraki et al. (2021) ont montré que les résines représentent une méthode efficace pour la récupération des polyphénols à partir des OMW. Une réduction de 75% du contenu phénolique soluble a été observée lorsque la résine FPX 66 a été utilisée. Une autre

déclaration dans l'article de Thi Le T et al. (2020) a montré que la résine XAD7 avait une meilleure capacité d'adsorption de surface (0.027 ± 0.00146 mg/m$^2$) que la résine XAD16 pour l'adsorption de composés phénoliques à partir d'un sous-produit aqueux de la production d'isolat de protéines de tournesol. Ce résultat est presque similaire à celui obtenu dans cette étude, en considérant la surface spécifique (450 m$^2$/g contre 380 m$^2$/g) et le type de composés phénoliques à adsorber (acides phénoliques par rapport aux flavonoïdes). Une autre étude a suggéré une méthodologie alternative pour fabriquer des produits à valeur ajoutée produits à valeur ajoutée à partir de la fibre de noix de coco verte (de Araujo Padilha et al., 2019). Les résultats de cet article Les résultats de cet article ont montré que l'adsorption à l'aide d'une résine XAD-7HP la récupération de composés bioactifs, notamment la catéchine l'épicatéchine et les tanins condensés.

## 2- Identification des composés phénoliques de l'extrait

Qualification des composés phénoliques dans les extraits de peau d'amande. La figure 62 montre le chromatogramme UPLC des composés phénoliques de la peau d'amande. Un total de 21 composants, dont des flavanols, des flavonols, des flavanones et des non-flavonoïdes, ont été identifiés (tableau 19) sur la base de leur temps de rétention et de leurs spectres UV et de masse.

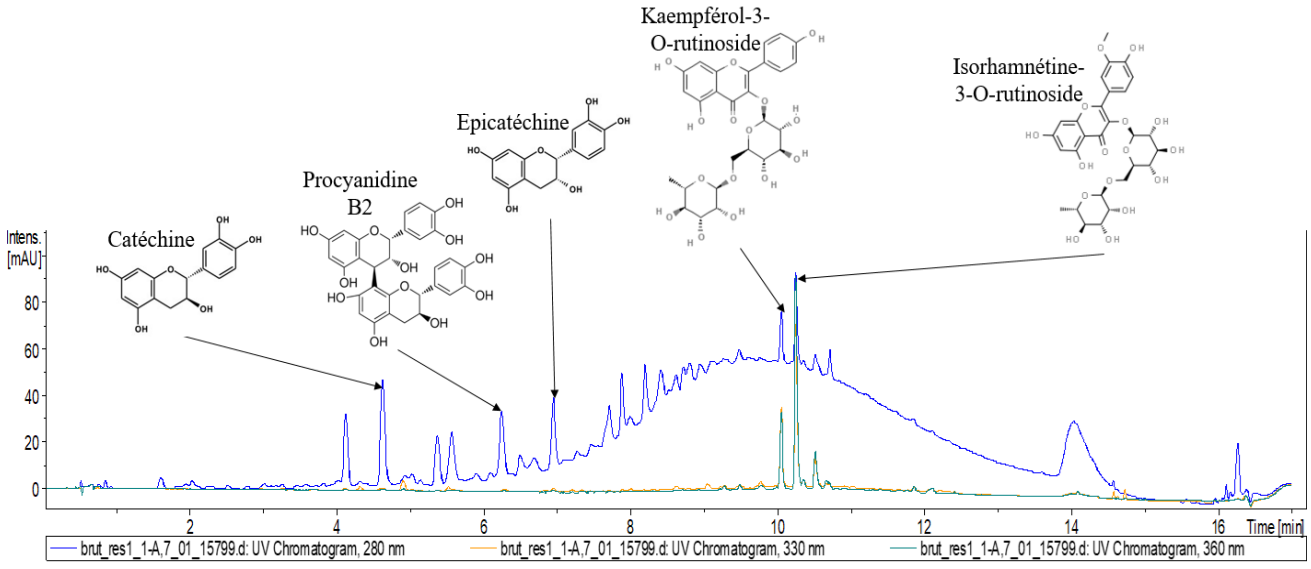



**Figure 61.** Chromatogramme UPLC des composés phénoliques dans les peaux d'amandes

Comme d'autres auteurs (Hellwig and Gasser, 2020; Tabib et al., 2020), les composants phénoliques les plus abondants ont été identifiés en faisant correspondre le temps de

rétention et leur longueur d'onde d'absorption moyenne (280 nm pour l'acide vanillique et les flavanols, 330 nm pour l'acide chlorogénique et 360 nm pour les flavonols).

Les flavanols étaient les principaux flavonoïdes d'amande identifiés, y compris la catéchine et l'épicatéchine en tant que monomères, les procyanidines en tant que polymères (type B) et les oligomères. La catéchine et l'épicatéchine ont été détectées à 4,6 et 7 avec un ion moléculaire ($[M-H]^-$) à m/z 289 et correspondent aux pics 11 et 16, respectivement. Quant aux dérivés de catéchine, le digallate de (épi)catéchine et le di-hexose de (Epi)Catéchine correspondaient aux pics 1 et 8 avec des masses moléculaires respectives de 593 et 613.

L'acide vanillique a également été identifié lié à un ou deux hexoses (glucose et/ou galactose ; m/z 329 et 491). Les flavonols ont été identifiés dans les pics 17 à 20 et correspondent au Kaempferol (sous forme de -3-O-rutinoside et -3-O-glucoside) et à l'Isorhamnétine (sous forme de -3-O-rutinoside). Le 3-O-caféoylquinique a été trouvé à 2,9, tandis que l'acide chlorogénique a été détecté à 4,75 (m/z 353).

Les pics 2, 10 et 21 appartiennent au dihexose Protocatéchique ou à l'hexose caféique Protocatéchique, à l'acide 4-p-Coumaroylquinique et à la Rutine (m/z 477, 337 et 609).

**Tableau 19.** Composés phénoliques identifiés par UPLC-DAD/ESI-MSn dans des extraits de peau d'amande

| Pic | Composé | Rt* (min) | $[M-H]^-$ (*m/z*) | MS2 (*m/z*) | UV (nm) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Digallate d'(épi)catéchine | 1,5 | 593 | 441; 315; 289 | 277 |
| 2 | Dihexose protocatéchique | 1,9 | 477 | 323; 225; 153 | 277 |
| 3 | Di-hexoside d'acide vanillique | 2 | 491 | 323;167 | 256;288 |
| 4 | Hexoside d'acide vanillique | 2,2 | 329 | 167 | 254;291 |
| 5 | Di-hexoside d'acide vanillique | 3 | 491 | 323;167 | 279 |
| 6 | Acide 3-O-caféoylquinique | 2,9 | 353 | 191 | 211 ; 344 |
| 7 | (Epi)Catéchine -hexoside | 3,2 | 613 | 289 | 280 |
| 8 | Dimère type B | 4 | 577 | 289 | 280 |
| 9 | Acide 4-p-coumaroylquinique | 4,2 | 337 | 163;191 | 308 |
| 10 | Catéchine | 4,6 | 289 | 245 | 280 |
| 11 | Acide chlorogénique | 4,75 | 353 | 191;179 | 325 |
| 12 | Trimère type B | 5,3 | 865 | 577 | 280 |
| 13 | Tétramère type B | 5,6 | 1153 | 289 ; 865 | 280 |
| 14 | Dimère type B | 6,25 | 577 | 289 | 280 |
| 15 | Epicatéchine | 7 | 289 | 245 ; 205 | 279 |
| 16 | Kaempférol-3-O-rutinoside | 10 | 593 | 285 | 347 |
| 17 | Isorhamnétine-3-O-rutinoside | 10,2 | 623 | 315 | 346 |
| 18 | Isorhamnétine-3-O-glucoside | 10,3 | 477 | 315 | 346 |
| 19 | Kaempférol-3-O-glucoside | 10 | 447 | 285 | 347 |
| 20 | Rutine | 10,9 | 609 | 301 | 350 |

*Rt : Temps de rétention

Quantification des composés phénoliques dans la peau d'amande : Le tableau 20 résume la concentration des composés phénoliques identifiés dans le ROE et le FDE, exprimée en mg/kg d'amandes.

**Tableau 20.** Teneur en composés phénoliques dans les ROE et FDE (mg/kg d'amande)

| | ROE | FDE |
|---|---|---|
| Acide chlorogénique | 0,876 ± 0,021 | 0,847 ± 0,036 |
| Catéchine | 30,973 ± 0,677 | 15,101 ± 0,487 |
| Acide 4-p-coumaroylquinique | 0,436 ± 0,021 | 0,428 ± 0,028 |
| Epicatéchine | 15,224 ± 0,151 | 6,960 ± 0,241 |
| Digallate d'(épi)catéchine | 2,352 ± 0,138 | 1,218 ± 0,129 |
| Isorhamnétine-3-O-rutinoside | 12,473 ± 0,393 | 5,575 ± 0,285 |
| Kaempférol-3-O-glucoside | 2,704 ± 0,102 | 1,643 ± 0,020 |
| Kaempférol-3-O-rutinoside | 4,852 ± 0,245 | 2,684 ± 0,050 |
| Di-hexoside d'acide vanillique | 3,834 ± 0,811 | 4,787 ± 0,167 |
| Hexoside d'acide vanillique | 0,000 ± 0,000 | 1,955 ± 0,111 |
| Procyanidines | 640,398 ± 30,993 | 347,527 ± 7,044 |
| TOTAL | 713,963 ± 32,443 | 388,724 ± 6,496 |

Les mêmes composés ont été ajoutés, y compris les polymères de flavanol (dimères, trimères et tétramères) qui ont été comptabilisés comme procyanidines.

Les procyanidines représentent les composés majoritaires des deux extraits, suivis par la catéchine, l'épicatéchine et l'isorhamnetin-3-O-rutinoside. La quantification des procyanidines a été réalisée en utilisant la menthofuranolyse. En effet, le menthofurane a la capacité de dépolymériser les procyanidines, permettant leur caractérisation (degré moyen de polymérisation) et leur quantification comme cela peut être fait par thiolyse sans l'inconvénient d'une odeur nauséabonde (Billerach et al., 2020). Outre la concentration, la menthofuranolyse permet de déterminer le degré moyen de polymérisation (mDP) qui était approximativement de 6 pour les deux extraits. Ce résultat est parfaitement cohérent avec les conclusions d'une étude précédente (Tabib et al., 2020). L'analyse des produits après la menthofuranolyse a montré quatre produits majeurs, dont la catéchine, l'épicatéchine, la catéchine-menthofurane et l'épicatéchine-menthofurane.

Nous avons également observé que l'hexose de l'acide vanillique n'a pas été retrouvé dans le ROE, ce qui peut signifier qu'il n'a pas été adsorbé par la résine.

Une observation concerne les concentrations de flavonoïdes pour la ROE par rapport à la FDE. On peut penser que lorsque l'opération de concentration de l'eau de blanchiment

des amandes a duré 2 heures, les noyaux de chalcone des flavonoïdes présents naturellement dans la peau des amandes (Aneklaphakij et al., 2021) ont pu se refermer en flavonoïdes (Khan et al., 2011), comme l'explique la figure 63. La mesure des concentrations étant effectuée par rapport aux échantillons de flavonoïdes cyclisés, cela expliquerait la différence de concentration en catéchine, d'épicatéchine et de leurs oligomères, ainsi que de kaempférol et de l'isorhamnétine. De plus, le coefficient d'adsorption est différent en UV entre l'adsorption initiale et après l'adsorption de l'eau de blanchiment.

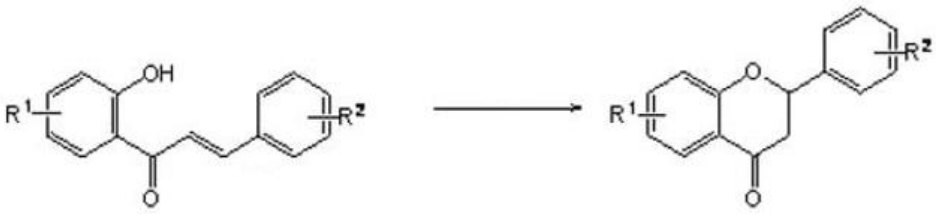



**Figure 62.** Fermeture du noyau chalcone (Sisa et al., 2010)

## 3- Activité antioxydante

Le potentiel antioxydant de l'extrait a été évalué. Les antioxydants phénoliques sont généralement capables de réduire rapidement les espèces réactives de l'oxygène (ROS), notamment les radicaux libres, protégeant ainsi les biomolécules (par exemple, les acides gras poly-insaturés) contre l'oxydation (Olivier Dangles, 2006). La IC50 représente la concentration de Trolox® qui permet de piéger 50% des radicaux présents (Rezaire, 2012). La valeur de l'IC50 de l'extrait était de 8.019 mg/ml ou 2,675 g d'équivalent Trolox/g d'extrait sec.

Wood et al., 2002 ont indiqué dans leur étude que les procyanidines présentent un effet antioxydant intéressant dans des conditions acides et basiques, mais un effet modéré dans des solutions neutres. Ceci peut expliquer la valeur élevée de l'IC50 de l'extrait, puisque les procyanidines représentent près de 90 % de l'extrait total. De plus, le pouvoir antioxydant des procyanidines n'est pas élevé selon la méthode DPPH. Cependant, lorsqu'ils sont ingérés, l'absorption de ces produits est facilitée au niveau de l'intestin. Ainsi, leur pouvoir antioxydant est beaucoup plus élevé compte tenu du fait qu'avec le temps, ces tanins condensés sont hydrolysés en catéchines et épicatéchines, d'où la valeur ajoutée de ces extraits (Smeriglio et al., 2017).

## 4- Activité antibactérienne

Après 24 heures d'incubation, nous avons remarqué que l'extrait n'avait aucun effet sur la croissance bactérienne d'*E. coli*. Cependant, un effet intéressant a été remarqué pour *S. aureus* ATCC 29213, puisque l'extrait a inhibé leur croissance bactérienne avec une CMI de 2 mg/ml. Des volumes de 50 µL ont été prélevés dans les puits contenant les CMI, CMI x2 et CMI x4 afin de déterminer l'effet bactéricide/bactériostatique de l'extrait. Aucune croissance ne s'est produite en utilisant le MIC seul, ce qui prouve que cette dose est bactéricide.

Comme rapporté par Mandalari et al., (2010a), l'extrait riche en flavonoïdes de la peau d'amande blanchie a eu un effet inhibiteur bactériostatique à 0,5 mg/ml sur la souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Ces résultats corroborent les résultats obtenus ci-dessus. Notons que cet extrait a un impact sur la croissance des bactéries Gram + mais aucun effet significatif sur les bactéries Gram -. Il serait préférable de mener des études complémentaires sur l'effet de chaque composé de l'extrait afin de déterminer la molécule responsable de cet effet inhibiteur de croissance et les mécanismes de ces interactions.

## 5- Applications

La production industrielle contemporaine d'aliments implique l'ajout d'ingrédients fonctionnels pour adapter la saveur, la couleur, la texture ou les propriétés de conservation. La dernière tendance est l'inclusion de composés bioactifs extraits de sources naturelles présentant des avantages potentiels pour la santé, comme les antioxydants et les probiotiques (Đorđević et al., 2015).

Les principaux objectifs de l'utilisation des techniques d'encapsulation des polyphénols consistent à assurer la protection et la stabilisation d'un composé actif, ainsi que sa libération contrôlée à l'aide d'un polymère naturel (Benoît et al., 2013; Fang and Bhandari, 2010). En effet, ce sont des paramètres critiques pour leur incorporation réussie dans divers systèmes alimentaires, en plus de leur libération contrôlée dans le tractus gastro-intestinal, car leur soumission et leur métabolisme de premier passage rapide entraîne une transformation de la structure chimique et des changements dans leur bioactivité. (Đorđević et al., 2015).

### a- Encapsulation / prilling

Dans cette étude, trois types de capsules ont été produits au moyen de l'encapsulateur B-395 Pro. Pour les billes d'extrait d'alginate, différentes buses ont été utilisées. Il a été remarqué que seules les billes obtenues avec la buse de 1000 µm étaient stables. Une augmentation de la concentration du bain de $CaCL_2$ de 1,47% à 5% était également obligatoire pour ralentir la libération de l'extrait.

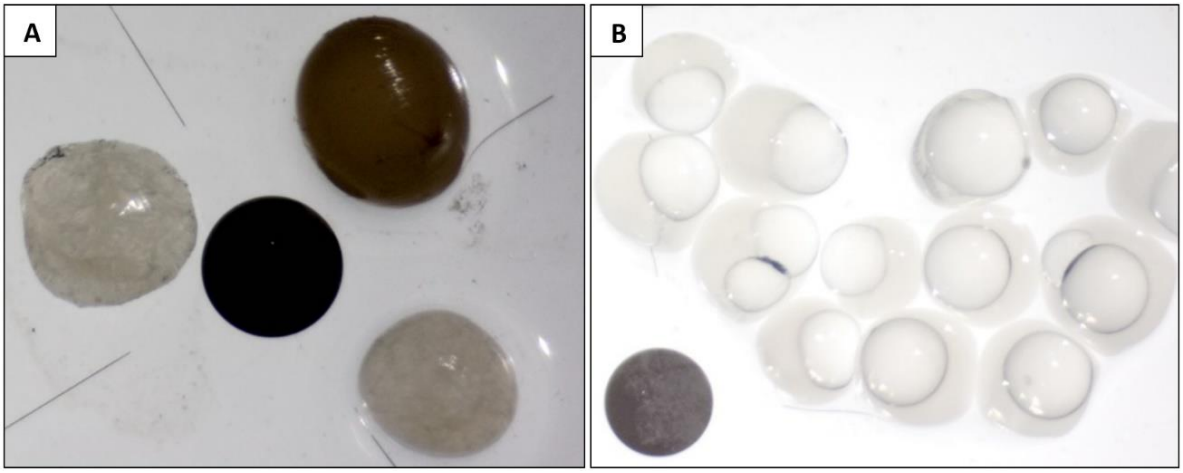



**Figure 63.** Observation à la loupe binoculaire. A . une perle d'alginate unique (sombre) et deux capsules à noyau aqueux de tailles différentes (450-900 µm et 300-500 µm) comparées au centre (disque noir) de taille 1,5 mm. Le diamètre des capsules est d'environ 2 mm, 1,84 mm et 1,45 mm, respectivement. B. Capsules de noyau d'huile obtenues avec des buses de 450-600µm. Les tailles sont d'environ 1,45 ± 0,21 mm

Des capsules à noyau d'huile ont été obtenues avec succès avec différentes tailles de buses après réglage des paramètres de fréquence et de pression, notamment 120 µm – 300 µm, 150 µm – 300 µm, 200 µm – 300 µm, 300 µm – 500 µm et 450 µm – 600 µm (tailles des buses du cœur et de l'enveloppe, respectivement) (figure 64).

Les capsules à noyau aqueux ont été obtenues selon la méthode décrite par Doméjean (Doméjean, 2014) avec les mêmes tailles de buses que celles utilisées pour les capsules à noyau d'huile. Comme le noyau et l'enveloppe sont des solutions aqueuses, l'ajout de SDS est important pour la stabilité des capsules. La formation du précipité avec le CaCl2 confère une certaine rigidité à la membrane de la capsule qui limite la déformation et le mélange des fluides à l'impact et facilite ainsi la formation de la capsule. De plus, comme le Tween 20, le SDS favorise le mouillage de la capsule dans le bain de CaCl2.

D'autres tests ont été réalisés sur la réversibilité des capsules et la libération de leur contenu phénolique. En effet, un effet destructeur a été observé après 10 minutes et 24 minutes d'ajustement du pH à 5 et 12, respectivement. D'autre part, le temps de libération du contenu des billes à pH 3 est considérablement long (plus de 45 minutes). Un effet intéressant mais partiel a été remarqué après l'ajout d'une solution de NaCl uniquement, laissant les particules d'alginate en suspension.

Pour conclure sur la technologie du prilling, les formes de capsules ou " hydrogels " sont réversibles puisque le réseau est un enchevêtrement de polymères maintenus par des forces secondaires telles que des liaisons hydrogène, ioniques ou hydrophobes. L'alginate reste un candidat idéal pour les applications biomédicales et biotechnologiques (Augst et al., 2006; Rolland, 2013). De plus, sa gélification en présence d'ions calcium est simple à mettre en œuvre, instantanée et permet de former un hydrogel physique relativement rigide. Les inconvénients de cette technique résident dans la faible solubilisation de l'extrait dans l'huile et la stabilité limitée des billes de diamètre faible.

Jusqu'à présent, l'encapsulation des ingrédients alimentaires fonctionnels/composés bioactifs est encore réalisée à des niveaux faibles (1-5%), car le coût maximal acceptable d'un processus d'encapsulation est plutôt bas, 0,1 €/kg de nouveau produit (Đorđević et al., 2015). Par conséquent, un nombre croissant de d'industriels agroalimentaires proposent d'améliorer le processus d'encapsulation et d'étudier la faisabilité de la mise en échelle. La société française Capsulæ, par exemple, offre la possibilité de faire évoluer le processus de microencapsulation à l'échelle industrielle. Elle propose des solutions de conception et résout les problématiques d'encapsulation afin de générer des techniques commercialement viables avec un large spectre d'applications de produits (Capsulæ, n.d.).

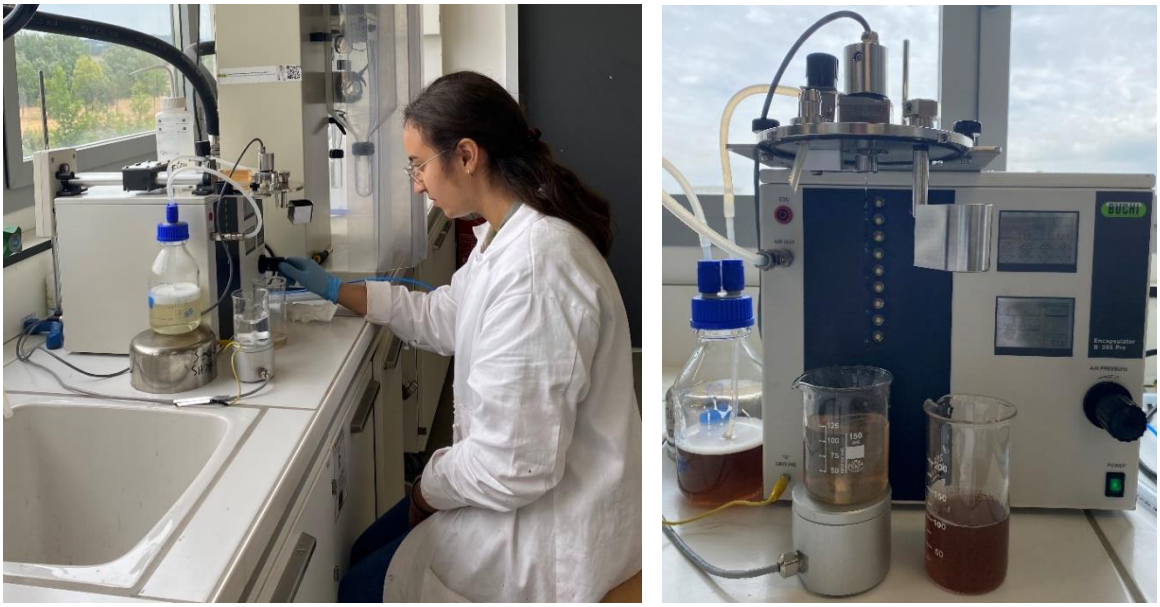



**Figure 64.** Prilling

## b- Atomisation

Les paramètres de l'atomiseur qui ont été appliqués dans l'étude sont énumérés dans le tableau 1. La technique de séchage par atomisation s'est avérée être une technique efficace pour l'encapsulation des polyphénols avec la maltodextrine comme support, car elle est flexible, fonctionne en continu et produit des particules de bonne qualité. Elle est largement utilisée dans l'industrie alimentaire pour les additifs alimentaires et les arômes (Desai and Jin Park, 2005; Fang and Bhandari, 2010).

**Tableau 21.** Paramètres de fonctionnement de l'atomiseur et masse de l'extrait récupéré

| **Température à l'entrée (°C)** | **Température à la sortie (°C)** | **Aspirateur (%)** | **Pompe à échantillon (%)** | **Débit d'air (mm)** | **Masse du produit obtenu (g)** |
|---|---|---|---|---|---|
| 120 | 68 | 100 | 30 | 40 | 20.656 |

Le procédé de séchage par atomisation est un procédé facilement industrialisable. Il est basé sur une technologie bien établie et relativement peu coûteuse, qui nécessite des équipements déjà utilisés dans les secteurs industriels (production alimentaire, pharmaceutique et chimique). En effet, le passage du laboratoire à la production nécessite le contrôle de nombreux facteurs, notamment la formulation (concentration des composés actifs et des matériaux d'enrobage, viscosité, etc.), la température d'entrée et le débit.



**Figure 65.** Atomisation

## IV- Conclusion

L'adsorption des composés bioactifs sur la résine XAD-7 HP s'est avérée être un processus très favorable pour la concentration des polyphénols de l'eau de blanchiment des amandes. La méthodologie a permis d'augmenter de plus de 5 fois la concentration du contenu phénolique de l'eau de blanchiment. Ces résultats peuvent conduire à une mise à l'échelle potentielle pour la récupération des polyphénols dans l'industrie de l'amande, car il a été prouvé que c'est une méthode peu coûteuse. Les extraits obtenus ont montré des concentrations élevées de tanins condensés, de catéchine, d'épicatéchine et d'isorhamnétine-3-O-rutinoside. Ils ont également démontré un effet antibactérien intéressant sur *Staphylococcus aureus*. Ces fractions récupérées peuvent être utilisées dans l'industrie alimentaire, dans les cosmétiques ou dans les produits pharmaceutiques

sous les formes présentées précédemment, notamment sous forme de capsules, de billes et d'extraits atomisés qui peuvent être facilement incorporés dans les préparations. En perspective, le procédé d'adsorption peut être mis à l'échelle pour récupérer des composés phénoliques de grand intérêt dans le cadre d'une chimie verte orientée vers les ressources renouvelables.

Hindawi
International Journal of Food Science
Volume 2022, Article ID 7847276, 11 pages
https://doi.org/10.1155/2022/7847276

*Research Article*

# Adsorption of Polyphenols from Almond Blanching Water by Macroporous Resin

**Malak Tabib,[1,2] Christian Ginies,[3] Njara Rakotomanomana,[2] and Adnane Remmal[1]**

[1]*Department of Biology, Faculty of Science Dhar El-Mahraz, University Sidi Mohammed Ben Abdellah, P.O. Box 1796, Fez 30050, Morocco*
[2]*INRAE, Avignon University, UMR A 408, Green Extraction Team, F-84000 Avignon, France*
[3]*INRAE, Avignon University, UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Micronut Team, F-84914 Avignon, France*

Correspondence should be addressed to Adnane Remmal; adnaneremmal@gmail.com

Received 24 March 2022; Revised 4 May 2022; Accepted 13 May 2022; Published 7 June 2022

Academic Editor: Amarat (Amy) Simonne

Copyright © 2022 Malak Tabib et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The almond processing industry generates large volumes of effluent after the blanching process. Blanching water is one of the main by-products with a potential source of polyphenols. However, before being used or discharged, this by-product requires pretreatment. This work was aimed at paving the way toward using adsorption on XAD-7 HP macroporous resin for wastewater treatment. This promising technique could be easily scaled up and integrated into existing production lines. Adsorption was carried out with a fixed bed in counterflow, while desorption was performed by acetone in downflow. With this approach, it was possible to concentrate up to five times the phenolic content of the initial blanching water. The resulting extract was analyzed by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), identifying more than 89% procyanidins, in addition to catechin, epicatechin, and isorhamnetin-3-O-rutinoside. Applications such as spray-drying and prilling techniques were suggested to improve the efficiency of polyphenols by preserving their stability, bioactivity, and bioavailability.

## 1. Introduction

The great production and transformation of almonds generate tons of waste yearly. Almond kernels are industrially separated from the skin by the blanching process performed by immersion in boiling water [1]. Subsequently, two by-products have received much attention: almond skins and blanching water, the latter being considered a great candidate to be a sustainable source of phytochemicals, such as flavonoids, tannins, and phenolic acids [2–4] Given the current legislation, blanching water must be disposed of as special waste, while the integuments are occasionally fed to animals as fodder [5]. Hence, the exploitation of almond by-products must be integrated into a sustainability context, outlining strategies to establish a circular economy around the almond industry [6].

Almond polyphenols can be recovered from blanching water [7] which is readily available and inexpensive. Resin adsorption has proven to be one of the most efficient techniques for the enrichment and recovery of polyphenolic plant secondary metabolites [8]. Resins are relatively simple in design and easy to regenerate, with a high capacity and favorable rate [9–10]. This technique is used for the treatment of organic substances and the concentration of polyphenols from wastewater (e.g., olive mill wastewater) and industrial streams [11]. Compared to conventional adsorbents such as silica gels, alumina, and activated carbons, macroporous polymer resins are considered more attractive alternatives due to their wide range of pore structures and physicochemical characteristics [12]. Furthermore, the adsorption processes can be easily scaled up and some resins are food-grade [13]. This technique provides many advantages, including the possibility of recycling and reuse, the absence of molecular cut-off, and applicability on an industrial scale [8]. The adsorption of almond polyphenols on resin has rarely been discussed in previous works. To our knowledge, the only published work that deals with the adsorption of blanching water polyphenols on the resin is the publication by Hellwig and Gasser [14], where they suggest the valorization of blanching water from

# *CHAPITRE IV*
# *Activité antibactérienne de l'extrait de peau d'amande*

Réalisé à La Faculté des Sciences Dhar el Mahraz sous la direction de Pr. Adnane REMMAL

# I- Introduction

À une époque où la résistance aux antibiotiques ne cesse de croître (Zaman et al., 2017), l'élaboration de nouvelles stratégies de lutte contre les bactéries est opportune et en constante expansion (Munita and Arias, 2016). En effet, les bactéries ont acquis des mécanismes de résistance sous l'influence de la pression exercée par les antibiotiques. En outre, les thérapies actuelles peuvent entrainer l'administration de doses élevées des antibiotiques commerciaux. Cette problématique implique un intérêt croissant pour la recherche de nouvelles alternatives naturelles afin de lutter contre la résistance bactérienne.

Il a été démontré que les polyphénols, notamment les flavonoïdes et les tanins alimentaires, exercent des effets antioxydants (Dybkowska et al., 2017; Chedea et al., 2018), anti-inflammatoires (Ben Salem et al., 2017), anticancéreux (Abdal Dayem et al., 2016) et antibactériens (Smullen et al., 2007; Daglia, 2012; Xie et al., 2017) et peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine. L'activité antimicrobienne des polyphénols a été largement étudiée et des centaines de publications rapportant l'activité antimicrobienne des polyphénols ont été récemment publiées (Dziedziński et al., 2020; Gośliński et al., 2020; Jouneghani et al., 2020; Sun et al., 2021). Un nombre croissant d'études se penche sur l'effet de l'association des composés phénoliques et des antibiotiques (NCCLS, 2012; Haghjoo et al., 2013; Tomás-Menor et al., 2015; Gallique et al., 2021), étant donné que ces combinaisons peuvent montrer un effet synergique et entraîner l'administration d'une dose plus faible des antibiotiques commerciaux, ce qui pourrait réduire la toxicité des médicaments et améliorer l'efficacité (Lin et al., 2008).

Notre laboratoire est réputé pour son travail continu depuis plus de trois décennies sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires (Remmal et al., 1993; Rhayour et al., 2003). Ces travaux ont mené au développement d'un médicament nommé OLIPEN dont le principe actif est une synergie entre l'AMC (amoxicilline + acide clavulanique) et le cinéol. Par conséquent, nous avons choisi d'étudier l'activité antibactérienne de l'extrait de peau d'amande seul et en combinaison avec le thymol et l'eugénol, composés majoritaires d'huiles essentielles connus pour leur effet antimicrobien sans risque de développer des résistances. Une autre partie de ce travail est dédiée à l'action de l'extrait en combinaison avec l'AMC pour lutter contre la résistance des souches de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

# II- Matériels et méthodes

Le test *in vitro* a pour objectif d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait de peau d'amande sur quatre souches différentes.

- *Escherichia coli* ATCC 25922 ;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ;
- *Staphylococcus aureus* souche sensible, isolée du milieu hospitalier ;
- *Staphylococcus aureus* MRSA (staphylocoque doré méthicilline résistant ; Methicillin-resistant Staphylococcus aureus).

## 1- Milieux de culture

La gélose Muller-Hinton (MHA, Biokar ®) a été employée pour conserver les souches bactériennes. Le bouillon Muller-Hinton (MHB, Biokar ®) a été utilisé pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode de micro-dilution.

## 2- Agents utilisés

L'extrait de peau d'amande a été obtenu selon la méthode décrite dans le chapitre III, section II-3.

Le thymol est le composé majoritaire des huiles essentielles de thym et de l'origan. Il se présente sous forme de cristaux, et se liquéfie dans un bain marie à 50 °C ou dans l'étuve à 40 °C.

L'eugénol est le composé majoritaire de l'huile essentielle de clou de girofle. Il se présente sous forme liquide.

Les deux composés ont été fournis par Sigma-Aldrich (France). Ils ont été mis en émulsion par dispersion dans une solution d'agar-agar à 0,2 % (Remmal et al., 1993).

L'amoxicilline (antibiotique utilisé pour traiter un certain nombre d'infections bactériennes) associé à l'acide clavulanique (inhibiteur des bétalactamases) (AMC) est commercialisée sous le nom Maxiclav 1 g/125 mg sous forme de poudre stérile pour préparation injectable et est fournie par STERIPHARMA (Maroc). L'AMC a été dispersé dans de l'eau distillée stérile jusqu'à obtention de la concentration souhaitée.

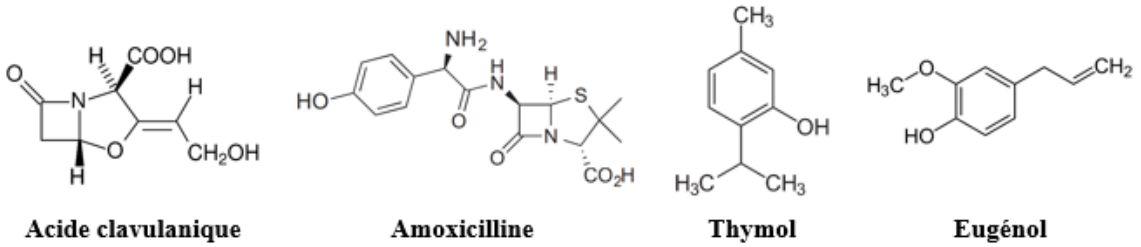



**Figure 66.** Structures chimiques des composés à tester

## 3- Souches bactériennes

Les souches bactériennes préalablement citées ont été généreusement fournies par le laboratoire de microbiologie de la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, Maroc. Elles ont été conservées à +4 °C dans un milieu MHA.

## 4- Préparation de l'inoculum

L'inoculum bactérien a été préparé en prélevant 2 à 3 colonies à l'aide d'un encemenseur à partir de la culture d'une nuit sur gélose MHA. Ces colonies sont ensuite mises en suspension dans un volume de sérum physiologique stérile (NaCl 0,9%). L'absorbance est ajustée à une densité optique entre 0,08 à 0,013 mesurée à 625 nm et correspond à 0,5 MacFarland (5 x $10^5$ UFC/ml) (Dimitrijevi et al., 2012; Hriouech, 2019).

## 5- Détermination des CMI des composés

La détermination de la CMI de l'extrait de peau d'amande, de l'AMC, du thymol et de l'eugénol a été effectuée par des tests de micro-dilution sur des plaques à 96 puits selon les normes NCCLS, (2012). Pour ce faire, dix concentrations des quatre composés ont été préparées (tableau 22).

- Pour l'extrait, des solutions filles ont été préparées à partir de deux solutions mères de 40 mg/mL et 5 mg/mL ;
- Pour l'AMC, la poudre initiale stérile a été dissoute dans un volume d'eau distillée stérile pour atteindre une concentration de 50 mg/ml. Ensuite, des dilutions successives de moitié qui vont de 32 µg/ml à 0,062 µg/ml ont été réalisées ;

- Pour le thymol, trois concentrations mères de 20 mg/ml, 5 mg/ml et 0,25 mg/ml ont été préparées. Les solutions filles sont des dilutions successives de moitié qui vont de 2 mg/ml à 0,0035 mg/ml ;
- Pour l'eugénol, trois solutions mères 40 mg/ml, 2,5 mg/ml et 0,25 mg/ml ont été diluées pour avoir les 10 concentrations allant de 4 mg/ml à 0,062 mg/ml.

La dispersion des composés majoritaires a été effectuée dans l'agar à 0,2 %. C'est une technique mise au point par notre laboratoire (Remmal et al., 1993) et confirmée par (Griffin et al., 2000). Elle permet de substituer les autres agents dispersants tels que le Tween 80 ou l'éthanol qui diminuent leur effet antimicrobien.

Les solutions filles ont été diluées par le milieu de culture MHB et ajustées à un volume de 170 µl. Enfin, 10 µl de l'inoculum préalablement préparé ont été rajoutés dans chaque puit.

Les puits de la première colonne constituent les témoins négatifs et contiennent 180 µl du milieu MHB uniquement. Les puits de la 12$^{ème}$ colonne ont été inoculés par la souche bactérienne et constituent les témoins positifs.

**Tableau 22.** Concentrations finales des composés dans les puits

| Composé | Concentration |
|---|---|
| Extrait de peau d'amande | 30, 20, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.25, 0,062 mg/ml |
| AMC | 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 µg/ml |
| Thymol | 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.0078, 0.0035 mg/ml |
| Eugénol | 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.0078 mg/ml |

Les plaques sont agitées pendant 10 minutes dans un agitateur IKA® MS 3 digital (Chine) puis incubées à 37 °C pendant 18 à 20 heures. La lecture des données a été effectuée après ajout de 15 µL de résazurine, un indicateur coloré de la croissance bactérienne qui est réduit par le NADPH ou le NADH au sein des mitochondries.

Après 30 minutes d'incubation. Les CMI correspondent à la concentration la plus faible n'ayant pas produit de couleur rose.

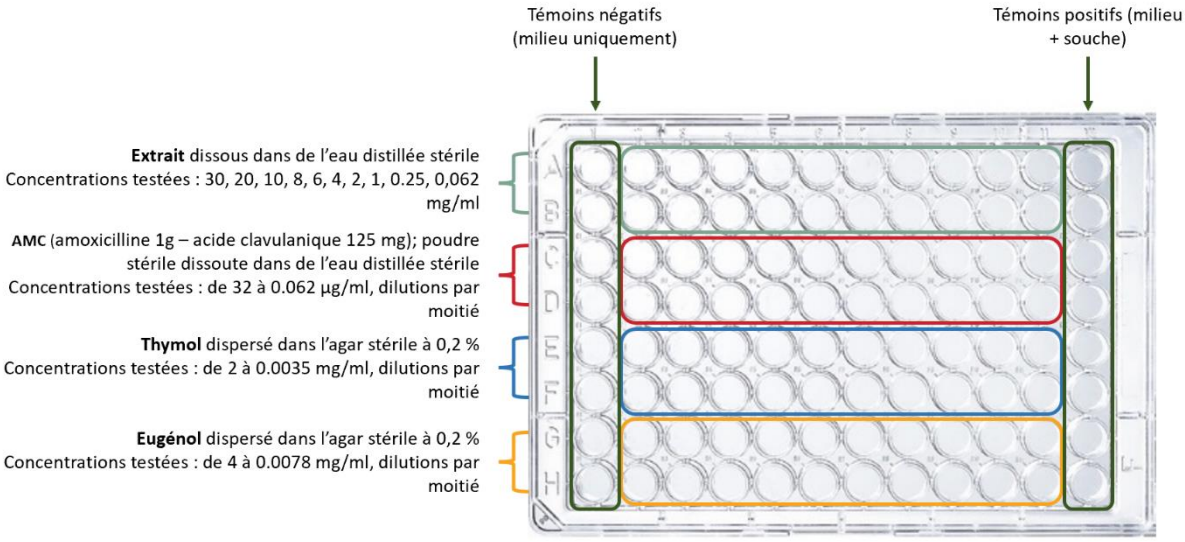



**Figure 67.** Modèle de microplaque pour la détermination des CMI

## 6- Tests d'association de l'extrait avec des composés majoritaires et l'antibiotique

L'évaluation de l'interaction de l'extrait de peau d'amande avec les deux composés majoritaires des huiles essentielles et avec l'AMC a été réalisée selon la méthode décrite par Mulyaningsih et al. (2010). Pour cela, des concentrations de chaque composé ont été préparées dans des tubes Eppendorf stériles par demi-dilutions. Pour l'extrait de peau d'amande, les concentrations ont été introduites horizontalement de manière décroissante, allant de CMIx2 à CMI/256. Pour les autres composés, ils ont été introduits verticalement de manière décroissante de CMIx2 à CMI/64 (voir exemple tableau 23). Pour chaque combinaison, le test a été effectué en duplicate.

L'effet de la combinaison des deux composés a été évalué en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnelle (CIF) à l'aide de la formule suivante.

$$\sum \text{CFI} = \text{CFI (A)} + \text{CFI (B)} \quad (1)$$

$$\text{Où CFI (A)} = \frac{\text{CMI (A) en combinaison}}{\text{CMI (A) seul}} \quad (2)$$

$$\text{Et où CFI } (B) = \frac{\text{CMI (B) en combinaison}}{\text{CMI (B) seul}} \quad (3)$$

Où (A) représente l'extrait et (B) représente le composé majoritaire ou l'antibiotique à tester.

La signification des CFI est déterminée comme suit :

- $CFI \leq 0.5$ : synergie
- $0.5 < CFI \leq 0.75$ : synergie partielle
- $0.76 \leq CFI \leq 1$ : effet additif
- $1 < CFI \leq 4$ : pas d'interaction
- $CFI > 4$ : antagonisme.

**Tableau 23.** Modèle de microplaque de combinaison de l'extrait avec l'un des composés majoritaires / AMC

| Puit | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | Témoin négatif | **CMI x 2** (Extrait) **CMI x 2** (Composé) | **CMI x 1** (Extrait) **CMI x 2** (Composé) | **CMI** / 2 (Extrait) **CMI** x 2 (Composé) | **CMI** / 4 (Extrait) **CMI** x 2 (Composé) | **CMI** / 8 (Extrait) **CMI** x 2 (Composé) | **CMI** / 16 (Extrait) **CMI** x 2 (Composé) | **CMI** / 32 (Extrait) **CMI** x 2 (Composé) | **CMI** / 64 (Extrait) **CMI** x 2 (Composé) | **CMI** / 128 (Extrait) **CMI** x 2 (Composé) | **CMI** / 256 (Extrait) **CMI** x 2 (Composé) | Témoin positif |
| **B** | | **CMI** x 2 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | **CMI** x 1 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | **CMI** / 2 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | **CMI** / 4 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | **CMI** / 8 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | **CMI** / 16 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | **CMI** / 32 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | **CMI** / 64 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | **CMI** / 128 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | **CMI** / 256 (Extrait) **CMI** x 1 (Composé) | |
| **C** | | **CMI** x 2 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | **CMI** x 1 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | **CMI** / 2 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | **CMI** / 4 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | **CMI** / 8 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | **CMI** / 16 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | **CMI** / 32 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | **CMI** / 64 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | **CMI** / 128 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | **CMI** / 256 (Extrait) **CMI** / 2 (Composé) | |
| **D** | | **CMI** x 2 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | **CMI** x 1 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | **CMI** / 2 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | **CMI** / 4 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | **CMI** / 8 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | **CMI** / 16 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | **CMI** / 32 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | **CMI** / 64 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | **CMI** / 128 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | **CMI** / 256 (Extrait) **CMI** / 4 (Composé) | |
| **E** | | **CMI** x 2 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | **CMI** x 1 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | **CMI** / 2 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | **CMI** / 4 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | **CMI** / 8 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | **CMI** / 16 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | **CMI** / 32 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | **CMI** / 64 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | **CMI** / 128 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | **CMI** / 256 (Extrait) **CMI** / 8 (Composé) | |
| **F** | | **CMI** x 2 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | **CMI** x 1 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | **CMI** / 2 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | **CMI** / 4 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | **CMI** / 8 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | **CMI** / 16 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | **CMI** / 32 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | **CMI** / 64 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | **CMI** / 128 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | **CMI** / 256 (Extrait) **CMI** / 16 (Composé) | |
| **G** | | **CMI** x 2 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | **CMI** x 1 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | **CMI** / 2 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | **CMI** / 4 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | **CMI** / 8 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | **CMI** / 16 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | **CMI** / 32 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | **CMI** / 64 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | **CMI** / 128 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | **CMI** / 256 (Extrait) **CMI** / 32 (Composé) | |
| **H** | | **CMI** x 2 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | **CMI** x 1 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | **CMI** / 2 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | **CMI** / 4 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | **CMI** / 8 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | **CMI** / 16 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | **CMI** / 32 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | **CMI** / 64 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | **CMI** / 128 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | **CMI** / 256 (Extrait) **CMI** / 64 (Composé) | |

# III- Résultats et discussion

## 1- Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)

**Tableau 24.** Valeurs des CMI obtenues par la méthode de micro-dilution

| Composé | Souche bactérienne | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *S. aureus* ATCC 29213 | *S. aureus* Sensible | *S. aureus* MRSA | *E. coli* ATCC 25922 |
| **Extrait** | 2 mg/ml | 2 mg/ml | > 30 mg/ml | > 30 mg/ml |
| **AMC** | 1 µg/ml | 0,25 µg/ml | 4 µg/ml | 4 µg/ml |
| **Thymol** | 0,5 mg/ml | 0,5 mg/ml | 1 mg/ml | 0,25 mg/ml |
| **Eugénol** | 1 mg/ml | 2 mg/ml | 2 mg/ml | 0,5 mg/ml |

Les valeurs des CMI de l'extrait, de l'AMC, du thymol et de l'eugénol ont été présentées dans le tableau 24.

L'extrait a inhibé la croissance des souches de *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* sensible, mais aucun effet significatif sur la croissance de la souche *S. aureus* MRSA et sur *E. coli* ATCC 25922 n'a été observé. L'AMC, le thymol et l'eugénol ont été ainsi testés. Les valeurs de CMI obtenues avec ces composés avec les différentes souches testées corroborent celles décrites par Hriouech, (2019).

Une étude menée par Li et al., (2017) s'est intéressée aux procyanidines de l'écorce de mélèze et leur effet sur la perméabilité de la paroi cellulaire de *S. aureus*. Pour ce faire, l'activité ATPase extracellulaire après le traitement de *S. aureus* a été évaluée. Ces auteurs ont démontré que l'activité extracellulaire de l'ATPase augmentait continuellement et était significativement plus élevée que celle du groupe témoin. Après 6 heures, la teneur en ATPase extracellulaire de *S. aureus* traité avec 1/2 CMI et la CMI de procyanidines a augmenté de 1,8 fois et 3,1 fois, respectivement, par rapport au groupe témoin. La libération importante d'ATP montre que les parois et les membranes cellulaires bactériennes ont été détruites.

La résistance des deux souches *S. aureus* MRSA et *E. coli* ATCC 25922 au traitement par l'extrait de peau d'amande peut être expliquée par l'imperméabilité de leur enveloppe cellulaire (paroi + membrane cellulaire) aux polyphénols de l'extrait, compte tenu de sa

composition en molécules de haut poids moléculaire (plus de 89 % de procyanidines de poids moléculaire supérieur à 578 g/mol).

- L'action de l'extrait sur la souche *E. coli* ATCC 25922 peut s'expliquer dans l'étude de Singh et al., (2017). De nombreux agents qui inhibent la croissance des bactéries Gram + présentent une activité faible ou nulle contre les souches bactériennes Gram - en raison de la barrière de la membrane externe ou de l'action des pompes d'efflux. Si la membrane externe est rompue ou si l'efflux est inactivé, ces composés acquièrent une activité Gram -. De plus, la membrane externe est constituée d'une bicouche asymétrique qui comprend une couche externe de lipopolysaccharides (LPS) et une couche interne de phospholipides – l'ensemble rendant la membrane externe relativement imperméable aux composés hydrophobes et hydrophiles (figure 69) (Silver, 2016). Pour permettre le passage des nutriments nécessaires, la membrane est traversée par des canaux remplis d'eau appelés porines, qui sont sélectifs pour les composés hydrophiles, chargés, et de taille limitée (Macielag, 2012). Dans ce cas, l'extrait, constitué principalement de composés hydrophiles dont des procyanidines de haut poids moléculaire, ne pénètre pas dans les bactéries Gram-.

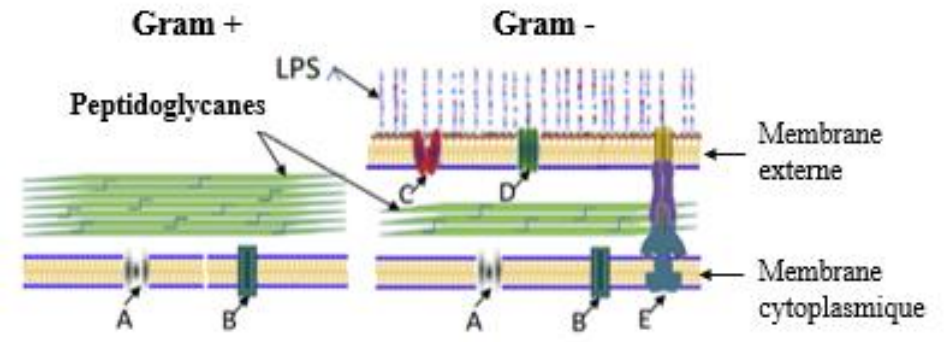



**Figure 68.** Différences entre les barrières de perméabilité des Gram-positifs et des Gram-négatifs. **A** = Transporteurs actifs ; **B** = Pompes d'efflux de la membrane unique ; **C** = Pore de diffusion de la membrane externe ; **D** = porine générale de la membrane externe ; **E** = Pompe d'efflux (Singh et al., 2017)

- L'effet de l'extrait sur la souche *S. aureus* MRSA à de fortes doses (> 30 mg/ml) est analogue à l'effet de l'épigallocatéchine sur la même souche (Hatano et al., 2005, 2003). Les différences des valeurs de CMI observées sont probablement dues à l'utilisation de techniques différentes. Hatano et al., (2005) ont utilisé une taille

d'inoculum plus basse ($10^4$ UFC/ml alors que nous avons utilisé une taille d'inoculum de 5 x $10^5$ UFC/ml).

En ce qui concerne les composés majoritaires, le thymol et l'eugénol ont montré des propriétés antibactériennes sur les quatre souches à des concentrations faibles (0,25 à 1 mg/ml et 0.5 à 2 mg/ml, respectivement). Michiels et al., (2007) et Oussalah et al., (2007) ont confirmé ces résultats, ce qui prouve l'activité antimicrobienne de ces deux composés majoritaires.

L'antibiotique AMC, d'autre part, a été efficace sur la croissance les deux souches de *S. aureus* (ATCC et sensible). Les CMI obtenues pour les souches *S. aureus* MRSA et *E. coli* ATCC 25922 ont présenté une résistance à l'AMC qui a montré une inhibition de croissance à 4 µg/ml. Ces résultats sont conformes aux recommandations d'EUCAST, (2018) qui stipulent que les souches de *S. aureus* MRSA sont résistantes à l'AMC.

Une différence de CMI a été observée après comparaison avec les résultats de Hriouech, (2019). Cette souche est généralement utilisée pour les tests de sensibilité des antibiotiques.

## 2- Effet de l'association de l'extrait de la peau d'amande à l'un des composés majoritaires ou à l'antibiotique

Les tableaux suivants présentent les résultats de l'association de l'extrait avec le thymol, l'eugénol ou l'AMC sur les quatre souches bactériennes *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* Sensible, *S. aureus* MRSA et *E. coli* ATCC 25922. Ces combinaisons ont été évaluées par la méthode de Checkerboard en déterminant la concentration inhibitrice fractionnaire (CFI) qui permet de révéler les éventuelles synergies (Dimitrijevi et al., 2012).

- **Association de l'extrait à l'AMC**

**Tableau 25.** Effet de l'association de l'extrait avec l'AMC

| Souche | Extrait (A) | | | AMC (B) | | | ∑ CFI | Type d'interaction |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CMI seule (mg/ml) | CMI combinée à B (mg/ml) | CFI (A) | CMI seule (mg/ml) | CMI combinée à A (mg/ml) | CFI (B) | | |
| *S. aureus* ATCC 29213 | 2 | 0.062 | 0.031 | 1 | 0.25 | 0.25 | 0.281 | Synergie |
| *S. aureus* Sensible | 2 | 0.25 | 0.125 | 0.25 | 0.015 | 0.06 | 0.185 | Synergie |
| *S. aureus* MRSA | > 30 | 0.039 | ≈ 0.0013 | 4 | 4 | 1 | 1.0013 | Pas d'interaction |
| *E. coli* ATCC 25922 | > 30 | - | - | 4 | - | - | - | Antagonisme |

- **Association de l'extrait au thymol**

**Tableau 26.** Effet de l'association de l'extrait avec le thymol

| Souche bactérienne | Extrait (A) | | | Thymol (B) | | | ∑ CFI | Type d'interaction |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CMI seule (mg/ml) | CMI combinée à B (mg/ml) | CFI (A) | CMI seule (mg/ml) | CMI combinée à A (mg/ml) | CFI (B) | | |
| *S. aureus* ATCC 29213 | 2 | 0.125 | 0.0625 | 0.5 | 0.03125 | 0.0625 | 0.125 | Synergie |
| *S. aureus* Sensible | 2 | 0.0078 | 0.0039 | 0.5 | 0.0625 | 0.125 | 0.1289 | Synergie |
| *S. aureus* MRSA | > 30 | 0.039 | 0.013 | 1 | 0.0625 | 0.0625 | 0.0755 | Synergie |
| *E. coli* ATCC 25922 | > 30 | - | - | 0.25 | - | - | - | Antagonisme |

- **Association de l'extrait à l'eugénol**

**Tableau 27.** Effet de l'association de l'extrait avec l'eugénol

| Souche bactérienne | Extrait (A) | | | Eugénol (B) | | | ∑ CFI | Type d'interaction |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CMI seule (mg/ml) | CMI combinée à B (mg/ml) | CFI (A) | CMI seule (mg/ml) | CMI combinée à A (mg/ml) | CFI (B) | | |
| *S. aureus* ATCC 29213 | 2 | 0.25 | 0.125 | 1 | 0.0078 | 0.0078 | 0.1328 | Synergie |
| *S. aureus* Sensible | 2 | 0.0078 | 0.0039 | 2 | 0.5 | 0.25 | 0.2539 | Synergie |
| *S. aureus* MRSA | > 30 | 0.039 | 0.0013 | 2 | 0.5 | 0.25 | 0.2513 | Synergie |
| *E. coli* ATCC 25922 | > 30 | - | - | 0.5 | - | - | - | Antagonisme |

Parmi les douze combinaisons testées, huit ont montré un effet synergique (66.67%), une n'a montré aucune interaction (8,33 %), et quatre combinaisons ont montré un effet antagoniste (25%).

### a- Combinaison de l'extrait avec l'amoxicilline – acide clavulanique

L'association de l'extrait avec l'amoxicilline/acide clavulanique a démontré un effet synergique pour les deux souches *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* Sensible, avec des réductions de la CMI de 32 fois et 4 fois pour l'extrait, et de 4 et 16 fois pour l'AMC, respectivement. Cette association n'a donné aucun effet sur *S. aureus* MRSA. Un effet antagoniste clair a été observé pour *E. coli* ATCC 25922 (tableau 25), où nous avons observé une croissance dans tous les puits de la microplaque.

Une étude très récente de Gallique et al., (2021) a décrit l'effet des procyanidines extraits de canneberges en association avec certains antibiotiques β-lactame sur des souches de *Staphylococcus* et *Escherichia coli*. Les résultats montrent un véritable potentiel de différents antibiotiques contre des souches d'*E. coli* produisant dans enzymes résistantes aux β-lactame. En outre, un effet potentiel de l'oxacilline et la carbénicilline contre les staphylocoques résistants à la méticilline a été observé, mais pas contre les staphylocoques sensibles à la méticilline. Ces résultats sont en totale contradiction avec les notre. Ceci peut être expliqué par la différence de composition des procyanidines de l'extrait de canneberges en comparaison avec l'extrait de peau d'amande. En effet, Les procyanidines

de la canneberge présentent des liaisons de type A par rapport aux liaisons de type B plus courantes que l'on trouve dans les procyanidines d'autres aliments riches en tanins (Howell et al., 2005). Ceci nous a poussé à émettre une hypothèse d'action de procyanidines de type B après dépolymérisation.

Des études antérieures ont discuté l'effet synergique de l'association des unités catéchine et des antibiotiques. Une étude de Singhal and Saxena, (2017) a démontré un effet synergique avec l'oxacilline et la pénicilline en combinaison avec la catéchine gallate sur la croissance de quelques souches de *Staphylococcus aureus*. Cette association a permis la réduction de la CMI de 4 à 8 fois des antibiotiques. Une autre étude s'est intéressée à l'effet des catéchines de l'extrait de thé vert en association avec la gentamicine sur la croissance de quelques souches de *S. aureus*. Cette combinaison a montré des activités antimicrobiennes suffisantes (Bazzaz et al., 2016). Une troisième étude plus récente de Sartini et al., (2020). qui s'intéresse aussi aux extraits phénoliques du thé vert a indiqué une synergie avec l'amoxicilline sur les souche de *Staphylococcus aureus* MRSA. Pour la croissance de *E. coli*, Passat, (2012) a démontré une synergie entre l'extrait de thé vert et des antibiotiques β-lactame.

Dans une tentative d'explication de l'hypothèse citée précédemment, nous pouvons constater une possibilité d'interaction entre l'AMC et la catéchine / l'épicatéchine après dépolymérisation des procyanidines de type B. Il est donc probable que leur effet en tant que tannins condensés ne soit pas aussi important que celui des flavanols individuels. En guise de perspective, d'autres tests peuvent être effectués afin de confirmer cette théorie.

### b- Combinaison de l'extrait avec le thymol et l'eugénol

Les associations de l'extrait avec le thymol ou avec l'eugénol ont induit des effets synergiques pour les trois souches de *S. aureus*, et un effet antagoniste pour *E. coli* ATCC 25922 (tableaux 25 et 26). Ainsi, le même résultat de croissance que la combinaison de l'extrait et l'AMC a été observé.

Pour la combinaison avec le thymol, les réductions de CMI ont atteint 16 fois et 256 fois pour l'extrait, puis 16 fois et 8 fois respectivement pour le thymol dans le cas des souches *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* Sensible. L'association de l'eugénol avec l'extrait a montré des réductions de CMI de 4 fois et 256 fois pour l'extrait et de 128 fois et 4 fois pour l'eugénol.

Pour les calculs de CFI, nous avons considéré que la CMI de l'extrait seul est égale à 30 mg/ml pour la souche *S. aureus* MRSA. Une dose infra-inhibitrice de 10 mg/ml a été utilisée pour les tests d'association.

Dans cette étude, des synergies exceptionnelles ont été observées. La CMI de l'extrait a été réduite de plus de 1024 fois, tandis que les CMI du thymol et de l'eugénol ont été réduites de 16 et 4 fois.

L'intérêt des essais de combinaison réside dans son importance dans la lutte contre la résistance bactérienne par l'utilisation d'extraits de plantes (Bazzaz et al., 2016). Cette approche est prometteuse et peut entraîner l'administration d'une dose plus faible d'antibiotiques commerciaux, ce qui pourrait réduire la toxicité des médicaments et améliorer leur efficacité (Lin et al., 2008), en plus de trouver un bon moyen de prévention des infections. La découverte de médicaments est une approche coûteuse et longue, c'est pourquoi des alternatives contingentes sont explorées pour combattre les bactéries résistantes aux médicaments qui causent des infections chroniques. Les agents modificateurs de résistance offrent des alternatives plausibles pour relancer les médicaments antimicrobiens actuels et les rendre efficaces pour une utilisation en milieu clinique.

A notre connaissance, nous rapportons pour la première fois l'association de composés majoritaires et d'extraits polyphénoliques pour tester l'inhibition de la croissance des souches de *S. aureus* et *E. coli*. Ces résultats remarquables nécessitent une étude approfondie pour la détermination des composés phénoliques responsables des effets obtenus, ainsi qu'une investigation de leur mécanisme d'action sur ces bactéries.

## IV- Conclusion

L'utilisation des polyphénols de la peau d'amande dans la lutte contre la résistance bactérienne est un thème de recherche prometteur. L'évaluation de l'effet de l'extrait de peau d'amande sur les souches *S. aureus* a montré une inhibition de croissance *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* Sensible, mais aucun effet sur la souche résistante à la méticilline. L'association de ce même extrait avec des composés majoritaires d'huiles essentielles a entrainé une diminution drastique de la concentration minimale inhibitrice de

l'extrait pour les trois souches testées. Cependant, aucune interaction n'a été observée après l'association de l'extrait et l'AMC pour la souche résistante (MRSA). Un effet antagoniste a été observé pour toutes les associations sur la croissance d'E. *coli* ATCC 25.

# *Conclusion générale & Perspectives*

L'extraction verte est partie intégrante du développement durable et de la stratégie industrielle. Les recherches actuelles portent notamment sur l'extraction inoffensive de métabolites secondaires précieux à partir de coproduits agricoles et d'autres biomasses de faible valeur.

L'objectif principal du présent travail a été de mettre au point des méthodes efficaces de valorisation de co-produits de l'industrie de transformation des amandes, principalement son eau de blanchiment pour répondre aux critères de la bioraffinerie. Afin de répondre à cette problématique, plusieurs démarches ont été envisagées.

- L'intégration de technique d'extraction verte telle que les ultrasons pour permettre l'émondage et l'intensification de l'extraction des composés phénoliques en une seule étape ;
- La valorisation de l'eau de blanchiment, considérée comme système dilué en polyphénols, en utilisant la technique d'adsorption sur résine macroporeuse ;
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait sur des souches Gram-positives et Gram-négatives, seul et en association avec des antibiotiques et des composés majoritaires d'huiles essentielles.

En premier lieu (chapitre I), un état de l'art sur l'éco-extraction. Cette partie a mis en évidence les problèmes soulevés par ses six principes, ainsi que quelques techniques utilisées détaillant leurs principes, leurs instrumentations et leurs domaines d'applications. La suite de cette étude bibliographique porte sur l'amande et ses polyphénols.

Le deuxième chapitre de ce manuscrit a été axé sur l'utilisation de l'extraction assistée par ultrasons (UAE) pour l'évaluation d'une possibilité d'obtention d'un processus rapide et respectueux de l'environnement impliquant l'émondage et la dégradation des cellules de la peau pour améliorer l'efficacité de l'extraction des composés intracellulaires. Cette étude a en effet montré le potentiel de l'utilisation de l'UAE qui a augmenté l'efficacité de l'extraction allant jusqu'à +258% par rapport à l'extraction silencieuse après la détermination des paramètres optimaux à l'aide d'un plan d'expérience. Une microscopie électronique à balayage a ainsi démontré l'effet des ultrasons sur les cellules de la peau. L'analyse par UPLC-MS a révélé la présence d'une grande sélection de polyphénols, majoritairement les procyanidines (87% en moyenne). Le faible impact des ultrasons sur les protéines et les lipides des amandes émondées appuie l'intérêt de l'utilisation de l'UAE dans l'industrie de transformation des amandes.

La deuxième partie des travaux a porté sur l'étude de concentration du contenu phénolique de l'eau de blanchiment par adsorption sur résine macroporeuse. Cette technique a mené à la concentration de cette eau jusqu'à 5 fois.

Après désorption par acétone et évaporation du solvant, nous avons testé les activités antioxydantes et antibactériennes de l'extrait obtenu. Ces études ont montré une activité inhibitrice de la croissance de la souche *Staphylococcus aureus*, mais aucun effet sur *Escherichia coli*. L'activité antioxydante avec la méthode DPPH présente un effet modéré dû à la présence de procyanidines (89 % de l'extrait). Des applications pour préserver ces extraits tels que le prilling et l'atomisation ont été ainsi proposées.

La troisième partie de ce travail s'est intéressée à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait seul et en association avec l'amoxicilline / acide clavulanique, le thymol et l'eugénol. Cet effet a été testé sur quatre souches bactériennes. *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* Sensible, *S. aureus* MRSA et *E. coli* ATCC 25922. Les résultats obtenus sont prometteurs, 66,67 % des essais ont montré un effet synergique, 8,33 % n'ont montré aucune interaction, et 25 % ont montré un effet antagoniste. Parmi les effets synergiques obtenus, l'association avec le thymol montre un renforcement de l'effet antimicrobien de la souche résistante de *S. aureus*. À notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude de l'association entre un polyphénol et un composé majoritaire d'HE a été réalisée.

Dans nos travaux réalisés sur la valorisation de l'eau de blanchiment des amandes, nous nous sommes limités à une étude préliminaire visant à proposer des solutions de recyclage de cette eau. Les résultats obtenus soulèvent plusieurs points qui pourraient faire l'objet de futures recherches.

- L'étude approfondie et la mise à l'échelle de l'extraction assistée par ultrasons. réalisation des essais pilotes et évaluation de l'impact technico-économique et environnemental de ce procédé ;
- La mise à l'échelle de l'adsorption. détermination de la « durée de vie » de la résine et évaluation de volumes plus importants d'eau de blanchiment ;
- Applications de l'extrait obtenu.
    - Dépolymérisation des procyanidines l'extrait avant ou après l'extraction ;
    - Encapsulation ou atomisation et incorporation dans des préparations alimentaires en tant qu'ingrédients intermédiaires dans le secteur

agroalimentaire ou en tant qu'agents à potentiel antioxydant dans le secteur cosmétique / pharmaceutique ;

- Substituts d'antibiotiques chez les ruminants. l'interdiction en Europe, le 1er janvier 2006, de tous les antibiotiques utilisés comme additifs dans l'alimentation animale a entraîné un intérêt renouvelé pour les substituts d'origine naturelle qui permettent la modification de l'orientation des fermentations des ruminants et l'amélioration de la nutrition animale. (Macheboeuf et al., 2006) ;
- Maîtrise de la résistance de *S. aureus* MRSA. Les associations proposées peuvent former des alternatives potentielles pour lutter contre cette résistance. Des tests in-vivo peuvent être envisageables.

# Références


Abbas, S., Da Wei, C., Hayat, K., Xiaoming, Z., 2012. Ascorbic acid: microencapsulation techniques and trends—a review. Food Reviews International 28, 343–374.

Abdal Dayem, A., Choi, H.Y., Yang, G.-M., Kim, K., Saha, S.K., Cho, S.-G., 2016. The anti-cancer effect of polyphenols against breast cancer and cancer stem cells: molecular mechanisms. Nutrients 8, 581.

Achat, S., 2013. Polyphénols de l'alimentation: extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques 261.

Adámez, J.D., Samino, E.G., Sánchez, E.V., González-Gómez, D., 2012. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (Vitis vinifera L.). Food Control 24, 136–141.

Agrimaroc, 2020. Amandes : le maroc se démarque avec une production de 120.075 tonnes.

Aguiar, J., Costa, R., Rocha, F., Estevinho, B.N., Santos, L., 2017. Design of microparticles containing natural antioxidants: Preparation, characterization and controlled release studies. Powder technology 313, 287–292.

Ahmad, Z., 2010. The uses and properties of almond oil. Complementary Therapies in Clinical Practice 16, 10–12. https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2009.06.015

Ahrens, S., Venkatachalam, M., Mistry, A.M., Lapsley, K., Sathe, S.K., 2005. Almond (Prunus dulcis L.) Protein Quality. Plant Foods Hum Nutr 60, 123–128. https://doi.org/10.1007/s11130-005-6840-2

Alasalvar, C., Salvadó, J.-S., Ros, E., 2020. Bioactives and health benefits of nuts and dried fruits. Food Chemistry 314, 126192.

Alexandre, A., Serra, A.T., Matias, A.A., Duarte, C.M.M., Bronze, M.R., 2020. Supercritical fluid extraction of Arbutus unedo distillate residues–Impact of process conditions on antiproliferative response of extracts. Journal of CO2 Utilization 37, 29–38.

Alkhateeb, F.L., 2015. Novel Strategies for Rapid Analytical Preparation of Solid Samples.

Almajano, M.P., Carbo, R., Jiménez, J.A.L., Gordon, M.H., 2008. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. Food chemistry 108, 55–63.

Almond board of California, 2017. Science for Sustainable Orchad Systems - Waste Not.

Altemimi, A., Watson, D.G., Choudhary, R., Dasari, M.R., Lightfoot, D.A., 2016. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins. PLOS ONE 20.

Alupului, A., Calinescu, I., Lavric, V., 2012. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. UPB Science Bulletin, Series B 74, 129–142.

Alvarez, V.H., Cahyadi, J., Xu, D., Saldaña, M.D.A., 2014. Optimization of phytochemicals production from potato peel using subcritical water: Experimental and dynamic modeling. The Journal of Supercritical Fluids 90, 8–17. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.02.013

Amarowicz, R., TROSZYŃSKA, A., Shahidi, F., 2005. Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. Journal of food lipids 12, 344–358.

Aneklaphakij, C., Saigo, T., Watanabe, M., Naake, T., Fernie, A.R., Bunsupa, S., Satitpatipan, V., Tohge, T., 2021. Diversity of Chemical Structures and Biosynthesis of Polyphenols in Nut-Bearing Species. Frontiers in Plant Science 12, 440.

Arapitsas, P., Perenzoni, D., Guella, G., Mattivi, F., 2021. Improving the Phloroglucinolysis Protocol and Characterization of Sagrantino Wines Proanthocyanidins. Molecules 26, 1087.

Araus, K., Uquiche, E., del Valle, J.M., 2009. Matrix effects in supercritical CO2 extraction of essential oils from plant material. Journal of Food Engineering 92, 438–447.

Attard, T.M., Bukhanko, N., Eriksson, D., Arshadi, M., Geladi, P., Bergsten, U., Budarin, V.L., Clark, J.H., Hunt, A.J., 2018. Supercritical extraction of waxes and lipids from biomass: A valuable first step towards an integrated biorefinery. Journal of Cleaner Production 177, 684–698. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.155

Augst, A.D., Kong, H.J., Mooney, D.J., 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. Macromolecular bioscience 6, 623–633.

Baghdikian, B., Filly, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Petitcolas, E., Mabrouki, F., Chemat, F., Ollivier, É., 2016. Extraction by solvent using microwave and ultrasound-assisted techniques followed by HPLC analysis of Harpagoside from Harpagophytum procumbens and comparison with conventional solvent extraction methods. Comptes Rendus Chimie 19, 692–698. https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.02.020

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food chemistry 99, 191–203.

Baldea, M., 2014. Multum in parvo: a process intensification retrospective and outlook, in: Computer Aided Chemical Engineering. Elsevier, pp. 15–24.

Barba, F.J., Roselló-Soto, E., Marszałek, K., Kovačević, D.B., Jambrak, A.R., Lorenzo, J.M., Chemat, F., Putnik, P., 2019. Green food processing: Concepts, strategies, and tools, in: Green Food Processing Techniques. Elsevier, pp. 1–21.

Barral-Martinez, M., Fraga-Corral, M., Garcia-Perez, P., Simal-Gandara, J., Prieto, M.A., 2021. Almond By-Products: Valorization for Sustainability and Competitiveness of the Industry. Foods 10, 1793.

Bartolomé, B., Monagas, M., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., Martín-Álvarez, P.J., Lebrón-Aguilar, R., Urpí-Sardà, M., Llorach, R., Andrés-Lacueva, C., 2010. Almond (Prunus dulcis (Mill.) DA Webb) polyphenols: from chemical characterization to targeted analysis of phenolic metabolites in humans. Archives of biochemistry and biophysics 501, 124–133.

Bautista, S., Narvaez, P., Camargo, M., Chery, O., Morel, L., 2016. Biodiesel-TBL+: A new hierarchical sustainability assessment framework of PC&I for biodiesel production–Part I. Ecological indicators 60, 84–107.

Bazzaz, B.S.F., Sarabandi, S., Khameneh, B., Hosseinzadeh, H., 2016. Effect of catechins, green tea extract and methylxanthines in combination with gentamicin against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa:-combination therapy against resistant bacteria. Journal of pharmacopuncture 19, 312.

Belova, V.V., Voshkin, A.A., Kholkin, A.I., Payrtman, A.K., 2009. Solvent extraction of some lanthanides from chloride and nitrate solutions by binary extractants. Hydrometallurgy 97, 198–203.

Beltrán Sanahuja, A., Maestre Pérez, S.E., Grané Teruel, N., Valdés García, A., Prats Moya, M.S., 2021. Variability of Chemical Profile in Almonds (Prunus dulcis) of Different Cultivars and Origins. Foods 10, 153. https://doi.org/10.3390/foods10010153

Ben Salem, M., Affes, H., Athmouni, K., Ksouda, K., Dhouibi, R., Sahnoun, Z., Hammami, S., Zeghal, K.M., 2017. Chemicals compositions, antioxidant and anti-inflammatory activity of Cynara scolymus leaves extracts, and analysis of major bioactive polyphenols by HPLC. Evidence-based complementary and alternative medicine 2017.

Benoît, J.-P., Richard, J., Venier-Julienne, M.-C., 2013. Microencapsulation 28.

Berger, J., 1999. Procédé De Préparation D'un Lait D'amandes, Et Produits Obtenus. EP 0 776 165 B1.

Bhosle, D., Janghel, A., Deo, S., Raut, P., Verma, C., Kumar, S.S., Agrawal, M., Amit, N., Sharma, M., Giri, T., 2015. Emerging Ultrasound Assisted Extraction (UAE) Techniques as Innovative Green Technologies for the effective extraction of the active phytopharmaceuticals. Research Journal of Pharmacy and Technology 8, 963–970.

Billerach, G., Rouméas, L., Dubreucq, E., Fulcrand, H., 2020. Furanolysis with Menthofuran: A New Depolymerization Method for Analyzing Condensed Tannins. J. Agric. Food Chem. 68, 2917–2926. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00497

Birol, Fatih, 2019. The world needs a grand coalition to tackle climate change.

Boateng, J., Verghese, M., 2012. Protective effects of the phenolic extracts of fruits against oxidative stress in human lung cells. International Journal of Pharmacology 8, 152–160.

Bodeker, G., van 't Klooster, C., Weisbord, E., 2014. Prunus africana (Hook. f.) Kalkman: the overexploitation of a medicinal plant species and its legal context. The Journal of Alternative and Complementary Medicine 20, 810–822.

Bolling, B.W., 2017. Almond polyphenols: Methods of analysis, contribution to food quality, and health promotion. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 16, 346–368.

Borrajo, P., Pateiro, M., Barba, F.J., Mora, L., Franco, D., Toldrá, F., Lorenzo, J.M., 2019. Antioxidant and antimicrobial activity of peptides extracted from meat by-products: A review. Food Analytical Methods 12, 2401–2415.

Both, S., Strube, J., Cravatto, G., 2015. Mass transfer enhancement for solid–liquid extractions. Green Extraction of Natural Products 101–44.

Bottone, A., Montoro, P., Masullo, M., Pizza, C., Piacente, S., 2020. Metabolite profiling and antioxidant activity of the polar fraction of Italian almonds (Toritto and Avola): Analysis of seeds, skins, and blanching water. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 190, 113518.

Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., Oulahal, N., 2019. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. Journal of the Science of Food and Agriculture 99, 1457–1474.

Boukroufa, M., Sicaire, A.-G., Fine, F., Larré, C., Goff, A.L., Jamault, V.S., Rakotomanomana, N., Chemat, F., 2017. Green sonoextraction of protein from oleaginous press rapeseed cake. Molecules 22, 80.

Bouras, M., Chadni, M., Barba, F.J., Grimi, N., Bals, O., Vorobiev, E., 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Quercus bark. Industrial Crops and Products 77, 590–601. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.018

Boussetta, N., Turk, M., De Taeye, C., Larondelle, Y., Lanoisellé, J.-L., Vorobiev, E., 2013. Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. Industrial Crops and Products 49, 690–696.

Breil, C., Meullemiestre, A., Vian, M., Chemat, F., 2016. Bio-based solvents for green extraction of lipids from oleaginous yeast biomass for sustainable aviation biofuel. Molecules 21, 196.

Bridgwater, A., 2013. Fast pyrolysis of biomass for the production of liquids, in: Biomass Combustion Science, Technology and Engineering. Elsevier, pp. 130–171. https://doi.org/10.1533/9780857097439.2.130

Camelo, S.R.P., 2015. Encapsulation de molécules hydrophobes par des structures bi-gels générées par prilling: relation structure-propriétés. Ecole des Mines d'Albi-Carmaux.

Cao, L., Jin, Y., Wei, J., Chu, Q., Zhao, R., Wang, W., 2009. Comparison on agronomy and quality characters of selective strain of Schizonepeta tenuifolia. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica 34, 1075–1077.

Capsulæ, n.d. Encapsulation technologies: A general overview.

Cassel, E., Vargas, R.M.F., Martinez, N., Lorenzo, D., Dellacassa, E., 2009. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. Industrial crops and products 29, 171–176.

Castro-Muñoz, R., Ahmad, M.Z., Cassano, A., 2021. Pervaporation-aided Processes for the Selective Separation of Aromas, Fragrances and Essential (AFE) Solutes from Agro-food Products and Wastes. Food Reviews International 1–27.

Castro-Puyana, M., 2017. Water as green extraction solvent: Principles and reasons for its use. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry 6.

Chakraborty, S., Shaik, L., Gokhale, J.S., 2021. Subcritical Water: An Innovative Processing Technology, in: Innovative Food Processing Technologies. Elsevier, pp. 552–566. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22966-1

Chedea, V.S., Palade, L.M., Marin, D.E., Pelmus, R.S., Habeanu, M., Rotar, M.C., Gras, M.A., Pistol, G.C., Taranu, I., 2018. Intestinal absorption and antioxidant activity of grape pomace polyphenols. Nutrients 10, 588.

Chemat, Abert Vian, Ravi, Khadhraoui, Hilali, Perino, Tixier, 2019. Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. Molecules 24, 3007. https://doi.org/10.3390/molecules24163007

Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., Cravotto, G., 2019. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. TrAC Trends in Analytical Chemistry 118, 248–263. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.037

Chemat, F., Cravotto, G. (Eds.), 2013. Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds, Food Engineering Series. Springer US, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3

Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2018. Les six principes de l'éco-extraction du végétal. Techniques de l'Ingénieur 19.

Chemat, F., Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A., Allaf, T., Vorobiev, E., 2015. Solvent-free extraction of food and natural products. TrAC Trends in Analytical Chemistry 71, 157–168. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.021

Chemat, F., Lucchesi, M., Smadia, J., 2004. Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. Google Patents.

Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017a. Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. Innovative Food Science & Emerging Technologies 41, 357–377.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017b. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics sonochemistry 34, 540–560.

Chemat, F., Strube, J., 2015. Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice, Green chemistry. Wiley.

Chemat, F., Vian, M., Visinoni, F., 2008. Microwave Hydrodiffusion For Isolation Of Natural Products. WO 2008/089943 Al.

Chemat, F., Vian, M.A. (Eds.), 2014. Alternative Solvents for Natural Products Extraction, Green Chemistry and Sustainable Technology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43628-8

Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G., 2012. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. IJMS 13, 8615–8627. https://doi.org/10.3390/ijms13078615

Chemat, F., Vian, M.A., Fabiano-Tixier, A.-S., Nutrizio, M., Jambrak, A.R., Munekata, P.E., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Binello, A., Cravotto, G., 2020. A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. Green Chemistry 22, 2325–2353.

Chemat, F., Vorobiev, E. (Eds.), 2019. Green food processing techniques, 1st ed. Elsevier, Cambridge.

Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M.K., 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. Ultrasonics Sonochemistry 18, 813–835. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chen, C.-Y., Lapsley, K., Blumberg, J., 2006. A nutrition and health perspective on almonds. Journal of the Science of Food and Agriculture 86, 2245–2250.

Chen, P., Yanling, C., Shaobo, D., Xiangyang, L., Guangwei, H., Ruan, R., 2010. Utilization of almond residues. International Journal of Agricultural and Biological Engineering 3, 1–18.

Chew, K.W., Yap, J.Y., Show, P.L., Suan, N.H., Juan, J.C., Ling, T.C., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2017. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. Bioresource technology 229, 53–62.

Cheynier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. American Journal of Enology and Viticulture 57, 298–305.

Cheynier, V., Labarbe, B., Moutounet, M., 2001. Estimation of procyanidin chain length. Methods in enzymology 335, 82–94.

Chiou, T.-Y., Nomura, S., Konishi, M., Liao, C.-S., Shimotori, Y., Murata, M., Ohtsu, N., Kohari, Y., Lee, W.-J., Tsai, T.-Y., Nagata, Y., Saitoh, T., 2020. Conversion and Hydrothermal Decomposition of Major Components of Mint Essential Oil by Small-Scale Subcritical Water Treatment. Molecules 25, 1953. https://doi.org/10.3390/molecules25081953

Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C., Teissèdre, P.-L., 2008. Les polyphénols du raisin. Phytothérapie 6, 75–82.

Clementz, A., Torresi, P.A., Molli, J.S., Cardell, D., Mammarella, E., Yori, J.C., 2019. Novel method for valorization of by-products from carrot discards. LWT 100, 374–380.

Čolić, S., Zec, G., Natić, M., Fotirić-Akšić, M., 2019. Almond (Prunus dulcis) oil, in: Fruit Oils: Chemistry and Functionality. Springer, pp. 149–180.

Conde-Hernández, L.A., Espinosa-Victoria, J.R., Trejo, A., Guerrero-Beltrán, J.Á., 2017. CO2-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (Rosmarinus officinalis). Journal of Food Engineering 200, 81–86.

Crozier, A., 2003. Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. Plants: diet and health. The report of a British Nutrition Foundation Task Force 27–48.

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., Jokić, S., 2018. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. Food and Bioproducts Processing 109, 52–73. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.03.001

Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. Current opinion in biotechnology 23, 174–181.

Dangles, O., 2006. Propriétés chimiques des polyphénols. Les polyphénols en agroalimentaire. Paris: Lavoisier 29–54.

Dangles, Olivier, 2006. The physico-chemical properties of polyphenols. How do they relate to their roles in plants, foods and human health. Agro-food-Industry Hi Tech 17, 64–67.

Danielski, L., Ferreira, S.R., Hense, H., Martínez, J., Brunner, G., 2008. Deterpenation of Citrus peel oils with supercritical carbon dioxide–A review. Nitric oxide (NO) 93, 6.48.

de Araujo Padilha, C.E., da Costa Nogueira, C., Oliveira Filho, M.A., de Sousa Junior, F.C., de Assis, C.F., de Santana Souza, D.F., de Oliveira, J.A., dos Santos, E.S., 2019. Fractionation of green coconut fiber using sequential hydrothermal/alkaline pretreatments and Amberlite XAD-7HP resin. Journal of Environmental Chemical Engineering 7, 103474.

de Jong, E., Jungmeier, G., 2015. Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries, in: Industrial Biorefineries & White Biotechnology. Elsevier, pp. 3–33. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63453-5.00001-X

Desai, K.G.H., Jin Park, H., 2005. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. Drying Technology 23, 1361–1394. https://doi.org/10.1081/DRT-200063478

Dimitrijevi, D., Stankovi, M., Stojanovi-Radi, Z., Ranelovi, V., Lakuscaron, D., 2012. Antioxidant and antimicrobial activity of different extracts from leaves and roots of Jovibarba heuffelii (Schott.) A. Lve and D. Lve. Journal of Medicinal Plants Research 6, 4804–4810.

Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression de Fraudes (DGCCRF), 2009. Emploi des termes « naturel », « 100 % nature » et de toute autre expression équivalente sur l'étiquetage des denrées alimentaires.

Doméjean, H., 2014. Formation de capsules d'hydrogel à coeur aqueux par fragmentation d'un jet composé de fluides complexes 200.

Domínguez, R., Barba, F.J., Centeno, J.A., Putnik, P., Alpas, H., Lorenzo, J.M., 2018. Simple and rapid method for the simultaneous determination of cholesterol and retinol in meat using normal-phase HPLC technique. Food analytical methods 11, 319–326.

Đorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V., 2015. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. Food Eng Rev 7, 452–490. https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7

Duchêne-Massias, A., 2015. Valorisation fonctionnelle et antioxydante des épidermes de pommes Golden Delicious 265.

Dular, M., Bachert, B., Stoffel, B., Širok, B., 2004. Relationship between cavitation structures and cavitation damage. Wear 257, 1176–1184. https://doi.org/10.1016/j.wear.2004.08.004

Dular, M., Osterman, A., 2008. Pit clustering in cavitation erosion. Wear 265, 811–820. https://doi.org/10.1016/j.wear.2008.01.005

Dupent, P.S., 2019. Intérêt de la canneberge d'Amérique (Vaccinium macrocarpon) dans les infections urinaires 100.

Dybkowska, E., Sadowska, A., Rakowska, R., Debowska, M., Swiderski, F., Swiader, K., 2017. Assessing polyphenols content and antioxidant activity in coffee beans

according to origin and the degree of roasting. Roczniki Państwowego Zakładu Higieny 68.

Dziedziński, M., Kobus-Cisowska, J., Szymanowska-Powałowska, D., Stuper-Szablewska, K., Baranowska, M., 2020. Polyphenols composition, antioxidant and antimicrobial properties of Pinus sylvestris L. shoots extracts depending on different drying methods. Emirates Journal of Food and Agriculture 229–237.

EA, I., 2019. World Energy Outlook 2019. Paris.

Eisen, B., Ungar, Y., Shimoni, E., 2003. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. Journal of agricultural and food chemistry 51, 2212–2215.

El Gharras, H., 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications–a review. International journal of food science & technology 44, 2512–2518.

Esclapez, M.D., García-Pérez, J.V., Mulet, A., Cárcel, J.A., 2011. Ultrasound-assisted extraction of natural products. Food Engineering Reviews 3, 108.

Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C.G., Barbero, G.F., 2017. Optimization of the ultrasound-assisted extraction of anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (Morus nigra) pulp. Food chemistry 219, 23–32.

Esquivel-Hernández, D.A., Ibarra-Garza, I.P., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez, S.P., Rostro-Alanis, M. de J., Alemán-Nava, G.S., García-Pérez, J.S., Parra-Saldívar, R., 2017. Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. Biofuels, Bioproducts and Biorefining 11, 215–231.

Essien, S., Young, B., Baroutian, S., 2020. Subcritical water extraction for selective recovery of phenolic bioactives from kānuka leaves. The Journal of Supercritical Fluids 158, 104721. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104721

EUCAST, 2018. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters.

Fang, Z., Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols – a review. Trends in Food Science & Technology 21, 510–523. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003

Farag, R.S., El-Baroty, G.S., Basuny, A.M., 2003. The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. International journal of food science & technology 38, 81–87.

Flores-Mateo, G., Rojas-Rueda, D., Basora, J., Ros, E., Salas-Salvadó, J., 2013. Nut intake and adiposity: meta-analysis of clinical trials. The American journal of clinical nutrition 97, 1346–1355.

FoodData Central, 2019. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

Franco, D., Antequera, T., de Pinho, S.C., Jiménez, E., Pérez-Palacios, T., Fávaro-Trindade, C.S., Lorenzo, J.M., 2017. The use of microencapsulation by spray-drying and its aplication in meat products. Strategies for Obtaining Healthier Foods, Nova Science Publishers. New York.

Frohlich, P.C., Santos, K.A., Palu, F., Cardozo-Filho, L., da Silva, C., da Silva, E.A., 2019. Evaluation of the effects of temperature and pressure on the extraction of eugenol from clove (Syzygium aromaticum) leaves using supercritical CO2. The Journal of Supercritical Fluids 143, 313–320.

Gallique, M., Wei, K., Maisuria, V.B., Okshevsky, M., McKay, G., Nguyen, D., Tufenkji, N., 2021. Cranberry-Derived Proanthocyanidins Potentiate β-Lactam Antibiotics against Resistant Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 87, e00127-21.

Gandhi, K., Arora, S., Kumar, A., 2017. Industrial applications of supercritical fluid extraction: a review. Int. J. Chem. Stud 5, 336–340.

Ganzler, K., Salgó, A., Valkó, K., 1986. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. Journal of chromatography A 371, 299–306.

García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. Inflammation Research 58, 537–552.

Garcia-Perez, P., Xiao, J., Munekata, P.E., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Rajoka, M.S.R., Barros, L., Mascoloti Sprea, R., Amaral, J.S., Prieto, M.A., 2021. Revalorization of almond by-products for the design of novel functional foods: An updated review. Foods 10, 1823.

Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. Molecules 15, 8813–8826.

Garg, N., Kontogeorgis, G.M., Woodley, J.M., Gani, R., 2018. A Multi-stage and Multi-level Computer Aided Framework for Sustainable Process Intensification, in: Computer Aided Chemical Engineering. Elsevier, pp. 875–880.

Gbashi, S., Adebo, O.A., Piater, L., Madala, N.E., Njobeh, P.B., 2017. Subcritical water extraction of biological materials. Separation & Purification Reviews 46, 21–34.

Gerber, M., 1994. Olive oil and cancer. Epidemiology of diet and cancer. 263–275.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. Food Research International 40, 1107–1121. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004

Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Biochemical engineering journal 14, 217–225.

Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A., 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (Pistachia vera) hull extracts. Food chemistry 92, 521–525.

Gómez, B., Barba, F.J., Domínguez, R., Putnik, P., Kovačević, D.B., Pateiro, M., Toldrá, F., Lorenzo, J.M., 2018. Microencapsulation of antioxidant compounds through innovative technologies and its specific application in meat processing. Trends in Food Science & Technology 82, 135–147.

Gośliński, M., Nowak, D., Kłębukowska, L., 2020. Antioxidant properties and antimicrobial activity of manuka honey versus Polish honeys. Journal of food science and technology 57, 1269–1277.

Goula, A.M., Ververi, M., Adamopoulou, A., Kaderides, K., 2017. Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. Ultrasonics sonochemistry 34, 821–830.

Goupy, P.M., Varoquaux, P.J., Nicolas, J.J., Macheix, J.J., 1990. Identification and localization of hydroxycinnamoyl and flavonol derivatives from endive (Cichorium endivia L. cv. Geante Maraichere) leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38, 2116–2121.

Griffin, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N., 2000. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. Journal of Essential Oil Research 12, 249–255.

Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R.L., 2004. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. The Journal of nutrition 134, 613–617.

Guissart, E., Barragan-Montero, V., 2020. Matières Premières Cosmétiques : Actifs Naturels.

Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., Aboul-Enein, H.Y., 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. Arabian journal of chemistry 3, 43–53.

Gunathilake, K.D., Ranaweera, K.K.D., Rupasinghe, H.P., 2018. Effect of different cooking methods on polyphenols, carotenoids and antioxidant activities of selected edible leaves. Antioxidants 7, 117.

Haghjoo, B., Lee, L.H., Habiba, U., Tahir, H., Olabi, M., Chu, T.-C., 2013. The synergistic effects of green tea polyphenols and antibiotics against potential pathogens. Advances in Bioscience and Biotechnology 4, 959.

Harnafi, M., Touiss, I., Khatib, S., Bekkouch, O., Rouis, M., Ouguerram, K., Harnafi, H., Amrani, S., 2021. L'extrait phénolique de l'enveloppe charnue d'amande (Prunus amygdalus L.) restaure le métabolisme lipidique chez la souris hyperlipidémique et prévient l'oxydation des lipoprotéines plasmatiques. Phytothérapie 19, 163.

Hatano, T., Kusuda, M., Hori, M., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., 2003. Theasinensin A, a tea polyphenol formed from (-)-epigallocatechin gallate, suppresses antibiotic resistance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Planta medica 69, 984–989.

Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T., Shiota, S., Tsuchiya, T., Yoshida, T., 2005. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Phytochemistry 66, 2047–2055.

Hellwig, V., Gasser, J., 2020. Polyphenols from waste streams of food industry: valorisation of blanch water from marzipan production. Phytochem Rev 19, 1539–1546. https://doi.org/10.1007/s11101-020-09663-y

Herrero, M., Ibañez, E., 2018. Green extraction processes, biorefineries and sustainability: Recovery of high added-value products from natural sources. The Journal of Supercritical Fluids 134, 252–259. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.002

Hilali, S., Fabiano-Tixier, A.-S., Elmaataoui, M., Petitcolas, E., Hejjaj, A., Aitnouh, F., Idlimam, A., Jacotet-Navarro, M., Bily, A., Mandi, L., 2018. Deodorization by solar steam distillation of rosemary leaves prior to solvent extraction of rosmarinic, carnosic, and ursolic acids. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 6, 10969–10979.

Hingsamer, M., Jungmeier, G., 2019. Biorefineries, in: The Role of Bioenergy in the Bioeconomy. Elsevier, pp. 179–222. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813056-8.00005-4

Hou, K., Wang, Z., 2021. Application of nanotechnology to enhance adsorption and bioavailability of procyanidins: A review. Food Reviews International 1–15.

Howell, A.B., Reed, J.D., Krueger, C.G., Winterbottom, R., Cunningham, D.G., Leahy, M., 2005. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. Phytochemistry 66, 2281–2291.

Hriouech, S., 2019. Mise au point d'alternatives naturelles innovantes pour la lutte contre la sélection de bactéries résistantes suite à un traitement antibiotique. Faculté des sciences Dhar Mahraz.

Hriouech, S., Akhmouch, A.A., Mzabi, A., Chefchaou, H., Tanghort, M., Oumokhtar, B., Chami, N., Remmal, A., 2020. The antistaphylococcal activity of amoxicillin/clavulanic acid, gentamicin, and 1, 8-cineole alone or in combination and their efficacy through a rabbit model of methicillin-resistant Staphylococcus aureus osteomyelitis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2020.

Hu, B., Li, C., Zhang, Z., Zhao, Q., Zhu, Y., Su, Z., Chen, Y., 2017. Microwave-assisted extraction of silkworm pupal oil and evaluation of its fatty acid composition, physicochemical properties and antioxidant activities. Food Chemistry 231, 348–355. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.152

Ilgin, M.A., Gupta, S.M., 2010. Environmentally conscious manufacturing and product recovery (ECMPRO): A review of the state of the art. Journal of environmental management 91, 563–591.

Itskos, G., Nikolopoulos, N., Kourkoumpas, D.-S., Koutsianos, A., Violidakis, I., Drosatos, P., Grammelis, P., 2016. Energy and the Environment, in: Environment and Development. Elsevier, pp. 363–452.

Ivanovs, K., Blumberga, D., 2017. Extraction of fish oil using green extraction methods: A short review. Energy Procedia 128, 477–483.

Jafari, S.M., Mahdavee Khazaei, K., Assadpour, E., 2019. Production of a natural color through microwave-assisted extraction of saffron tepal's anthocyanins. Food Sci Nutr 7, 1438–1445. https://doi.org/10.1002/fsn3.978

Janssen, R.H., Vincken, J.-P., van den Broek, L.A.M., Fogliano, V., Lakemond, C.M.M., 2017. Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Three Edible Insects: *Tenebrio molitor* , *Alphitobius diaperinus* , and *Hermetia illucens*. J. Agric. Food Chem. 65, 2275–2278. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00471

Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Marchie, A., Faulkner, D., Vidgen, E., Lapsley, K.G., Trautwein, E.A., Parker, T.L., Josse, R.G., Leiter, L.A., 2003. The effect of

combining plant sterols, soy protein, viscous fibers, and almonds in treating hypercholesterolemia. Metabolism 52, 1478–1483.

Jenkins, D.J., Kendall, C.W., Marchie, A., Parker, T.L., Connelly, P.W., Qian, W., Haight, J.S., Faulkner, D., Vidgen, E., Lapsley, K.G., 2002. Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors: blood lipids, oxidized low-density lipoproteins, lipoprotein (a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: a randomized, controlled, crossover trial. Circulation 106, 1327–1332.

Jokić, S., Gagić, T., Knez, Ž., Banožić, M., Škerget, M., 2019. Separation of active compounds from tobacco waste using subcritical water extraction. The Journal of Supercritical Fluids 153, 104593. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104593

Jouneghani, R.S., Castro, A.H.F., Panda, S.K., Swennen, R., Luyten, W., 2020. Antimicrobial activity of selected banana cultivars against important human pathogens, including candida biofilm. Foods 9, 435.

Kamm, B., Kamm, M., 2004. Principles of biorefineries. Applied Microbiology and Biotechnology 64, 137–145. https://doi.org/10.1007/s00253-003-1537-7

Kammerer, D.R., Carle, R., Stanley, R.A., Saleh, Z.S., 2010. Pilot-scale resin adsorption as a means to recover and fractionate apple polyphenols. Journal of agricultural and food chemistry 58, 6787–6796.

Kapsokefalou, M., Zhu, L., Miller, D.D., 2006. Adding iron to green tea may decrease its antioxidant capacity in rats after an oral dose of the mixture. Nutrition research 26, 480–485.

Kennedy, J.A., Jones, G.P., 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49, 1740–1746.

Keys, A., VAN BUCHEM, F., 1981. The diet and all-causes death rate in the Seven Countries Study.

Khadhraoui, B., Turk, M., Fabiano-Tixier, A.S., Petitcolas, E., Robinet, P., Imbert, R., El Maâtaoui, M., Chemat, F., 2018. Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy for studying spatial and temporal extraction of metabolites induced by ultrasound. Towards chain detexturation mechanism. Ultrasonics sonochemistry 42, 482–492.

Khan, M.K., Rakotomanomana, N., Dufour, C., Dangles, O., 2011. Binding of citrus flavanones and their glucuronides and chalcones to human serum albumin. Food Funct. 2, 617. https://doi.org/10.1039/c1fo10077g

Khattak, K.F., Rahman, T.U., 2017. Analysis of vegetable's peels as a natural source of vitamins and minerals. International Food Research Journal 24, 292.

Khaw, K.-Y., Parat, M.-O., Shaw, P.N., Falconer, J.R., 2017. Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review. Molecules 22, 1186. https://doi.org/10.3390/molecules22071186

Ko, M.-J., Nam, H.-H., Chung, M.-S., 2020. Subcritical water extraction of bioactive compounds from Orostachys japonicus A. Berger (Crassulaceae). Scientific Reports 10, 1–10.

Komakech, R., Kang, Y., Lee, J.-H., Omujal, F., 2017. A review of the potential of phytochemicals from Prunus africana (Hook f.) Kalkman stem bark for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2017.

Košir, I.J., Lapornik, B., Andrenšek, S., Wondra, A.G., Vrhovšek, U., Kidrič, J., 2004. Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. Analytica Chimica Acta 513, 277–282.

Kozlowska, J., Prus, W., Stachowiak, N., 2019. Microparticles based on natural and synthetic polymers for cosmetic applications. International journal of biological macromolecules 129, 952–956.

Kumar, K., Srivastav, S., Sharanagat, V.S., 2020. Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Bioactive Compounds from Fruit and Vegetable Processing By-Products: A Review. Ultrasonics Sonochemistry 105325.

Kwiatkowski, J.R., McAloon, A.J., Taylor, F., Johnston, D.B., 2006. Modeling the process and costs of fuel ethanol production by the corn dry-grind process. Industrial Crops and Products 23, 288–296. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.08.004

Lamy, E., Rawel, H., Schweigert, F.J., Capela e Silva, F., Ferreira, A., Costa, A.R., Antunes, C., Almeida, A.M., Coelho, A.V., Sales-Baptista, E., 2011. The effect of tannins on Mediterranean ruminant ingestive behavior: The role of the oral cavity. Molecules 16, 2766–2784.

Letellier, M., Budzinski, H., 1999. Microwave assisted extraction of organic compounds. Analusis 27, 259–270.

Li, A., Zhang, Q., Chen, J., Fei, Z., Long, C., Li, W., 2001. Adsorption of phenolic compounds on Amberlite XAD-4 and its acetylated derivative MX-4. Reactive and Functional Polymers 49, 225–233.

Li, X., He, C., Song, L., Li, T., Cui, S., Zhang, L., Jia, Y., 2017. Antimicrobial activity and mechanism of Larch bark procyanidins against Staphylococcus aureus. Acta biochimica et biophysica Sinica 49, 1058–1066.

Li, Y., Fabiano-Tixier, A.-S., Chemat, F., 2014. Essential oils: from conventional to green extraction, in: Essential Oils as Reagents in Green Chemistry. Springer, pp. 9–20.

Lin, R.-D., Chin, Y.-P., Hou, W.-C., Lee, M.-H., 2008. The effects of antibiotics combined with natural polyphenols against clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Planta medica 74, 840–846.

Liu, H., Zou, T., Gao, J., Gu, L., 2013. Depolymerization of cranberry procyanidins using (+)-catechin,(−)-epicatechin, and (−)-epigallocatechin gallate as chain breakers. Food chemistry 141, 488–494.

Liu, Z., Deng, B., Li, S., Zou, Z., 2018. Optimization of solvent-free microwave assisted extraction of essential oil from Cinnamomum camphora leaves. Industrial Crops and Products 124, 353–362. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.016

Long, H.S., Tilney, P.M., Van Wyk, B.-E., 2010. The ethnobotany and pharmacognosy of Olea europaea subsp. africana (Oleaceae). South African Journal of Botany 76, 324–331.

Macheboeuf, D., Papon, Y., Artuso-Schaan, M., Mousset, J.L., Cherel, R., 2006. Utilisation d'extraits végétaux (huiles essentielles et extrait de polyphénols) pour diminuer la dégradation ruminale des protéines-Étude in vitro. Rencontres Rech. Rumin 13, 69–72.

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.

Macielag, M.J., 2012. Chemical properties of antimicrobials and their uniqueness, in: Antibiotic Discovery and Development. Springer, pp. 793–820.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition 79, 727–747.

Manach, C., Scalbert, A., Remesy, C., Morand, C., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., 2006. Consommation et disponibilit. Des polyphenols. Les polyphénols en agroalimentaire. P. Sarni-Manchado and V. Cheynier. Paris, Lavoisier 361–380.

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.

Mandalari, G., Bisignano, C., D'Arrigo, M., Ginestra, G., Arena, A., Tomaino, A., Wickham, M.S.J., 2010a. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. Letters in applied microbiology 51, 83–89.

Mandalari, G., Tomaino, A., Arcoraci, T., Martorana, M., Turco, V.L., Cacciola, F., Rich, G.T., Bisignano, C., Saija, A., Dugo, P., 2010b. Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (Amygdalus communis L.). Journal of Food Composition and Analysis 23, 166–174.

Manjare, S.D., Dhingra, K., 2019. Supercritical fluids in separation and purification: A review. Materials Science for Energy Technologies 2, 463–484. https://doi.org/10.1016/j.mset.2019.04.005

Marranzano, M., Rosa, R.L., Malaguarnera, M., Palmeri, R., Tessitori, M., Barbera, A.C., 2018. Polyphenols: Plant sources and food industry applications. Current pharmaceutical design 24, 4125–4130.

Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., Delgado-Adámez, J., 2017. Application of phenolic compounds for food preservation: Food additive and active packaging. Phenolic compounds–Biological activity. London, UK: IntechOpen 39–58.

Martínez-Gómez, P., Sánchez-Pérez, R., Dicenta, F., Howad, W., Arús, P., Gradziel, T.M., 2007. Almond, in: Fruits and Nuts. Springer, pp. 229–242.

Masclef, A., 1890. Atlas des plantes de France.

Meeran, S.M., Katiyar, S.K., 2008. Cell cycle control as a basis for cancer chemoprevention through dietary agents. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library 13, 2191.

Michiels, J., Missotten, J., Fremaut, D., De Smet, S., Dierick, N., 2007. In vitro dose–response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. Livestock Science 109, 157–160.

Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Más, V., Pérez, L., Estepa, A., 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). Antiviral research 66, 129–136.

Milani, G., Vian, M., Cavalluzzi, M.M., Franchini, C., Corbo, F., Lentini, G., Chemat, F., 2020. Ultrasound and deep eutectic solvents: An efficient combination to tune the mechanism of steviol glycosides extraction. Ultrasonics Sonochemistry 69, 105255. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105255

Milbury, P.E., Chen, C.-Y., Dolnikowski, G.G., Blumberg, J.B., 2006. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. Journal of agricultural and food chemistry 54, 5027–5033.

Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N., 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of Melissa officinalis L.(Lamiaceae) essential oil. Journal of agricultural and food chemistry 52, 2485–2489.

Mohan, S.V., Nikhil, G.N., Chiranjeevi, P., Reddy, C.N., Rohit, M.V., Kumar, A.N., Sarkar, O., 2016. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: critical review and future perspectives. Bioresource technology 215, 2–12.

Molino, A., 2020. Recent developments in supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae_ Role of key parameters, technological achievements and challenges 14.

Monagas, M., Garrido, I., Lebrón-Aguilar, R., Bartolome, B., Gómez-Cordovés, C., 2007. Almond (Prunus dulcis (Mill.) DA Webb) skins as a potential source of bioactive polyphenols. Journal of agricultural and food chemistry 55, 8498–8507.

Moreno, A.D., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2020. Biorefineries for the valorization of food processing waste, in: The Interaction of Food Industry and Environment. Elsevier, pp. 155–190.

Moschona, A., Liakopoulou-Kyriakides, M., 2018. Encapsulation of biological active phenolic compounds extracted from wine wastes in alginate-chitosan microbeads. Journal of Microencapsulation 35, 229–240.

Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology spectrum 4, 4.2. 15.

Musa-Veloso, K., Paulionis, L., Poon, T., Lee, H.Y., 2016. The effects of almond consumption on fasting blood lipid levels: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. Journal of nutritional science 5.

Musina, O., Putnik, P., Koubaa, M., Barba, F.J., Greiner, R., Granato, D., Roohinejad, S., 2017. Application of modern computer algebra systems in food formulations and development: a case study. Trends in food science & technology 64, 48–59.

Naczk, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis 41, 1523–1542.

Naczk, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of chromatography A 1054, 95–111.

NCCLS, 2012. Catechin gallate a promising resistance modifying candidate to potentiate β-lactam antibiotics to overcome resistance in Staphylococcus aureus.

Oetjen, G.-W., Haseley, P., 2004. Freeze-drying. John Wiley & Sons.

Oroian, M., Escriche, I., 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. Food Research International 74, 10–36.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M., 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157: H7, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food control 18, 414–420.

Özcan, M.M., Ünver, A., Erkan, E., Arslan, D., 2011. Characteristics of some almond kernel and oils. Scientia Horticulturae 127, 330–333. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.10.027

Pacheco-Fernández, I., Pino, V., 2020. Extraction With Ionic Liquids-Organic Compounds, in: Liquid-Phase Extraction. Elsevier, pp. 499–537. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00017-7

Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an overview. Journal of nutritional science 5.

Passat, D.N., 2012. Interactions of black and green tea water extracts with antibiotics activity in local urinary isolated Escherichia coli. Al-Nahrain Journal of Science 15, 134–142.

Patel, A.S., Kar, A., Dash, S., Dash, S.K., 2019. Supercritical fluid extraction of β-carotene from ripe bitter melon pericarp. Scientific Reports 9, 1–10.

Pérez, A.T.E., Camargo, M., Rincón, P.C.N., Marchant, M.A., 2017. Key challenges and requirements for sustainable and industrialized biorefinery supply chain design and management: a bibliographic analysis. Renewable and Sustainable Energy Reviews 69, 350–359.

Pérez-Larrán, P., Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Alonso, J.L., Domínguez, H., 2018. Adsorption technologies to recover and concentrate food polyphenols. Current Opinion in Food Science 23, 165–172.

Périno-Issartier, S., Abert-Vian, M., Chemat, F., 2011. Solvent free microwave-assisted extraction of antioxidants from sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) food by-products. Food and Bioprocess Technology 4, 1020–1028.

Petruzzello, M., 2021. Almond. Encyclopedia Britannica.

Phenol Explorer, 2016. Phenol Explorer.

Pimentel-Moral, S., Borrás-Linares, I., Lozano-Sánchez, J., Arráez-Román, D., Martínez-Férez, A., Segura-Carretero, A., 2019. Supercritical CO2 extraction of bioactive compounds from Hibiscus sabdariffa. The Journal of Supercritical Fluids 147, 213–221.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F., 2012. Accelerated Methods for Sample Preparation in Food, in: Comprehensive Sampling and Sample Preparation. Elsevier, pp. 441–455. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00143-5

Pironon, J., Burnol, A., Rohmer, J., Pichery, T., Fillacier, S., Lagneau, V., 2007. Géocarbone intégrité volet 6, intégrité des puits.

Planetoscope, 2016. Production mondiale des amandes.

Poncelet, D., Dreffier, C., 2007. Les méthodes de microencapsulation de A à Z (ou presque). Microencapsulation des Sicences Aux Technologies. Paris: Lavoisier 23–34.

Prgomet, I., Gonçalves, B., Domínguez-Perles, R., Pascual-Seva, N., Barros, A.I., 2017. Valorization challenges to almond residues: Phytochemical composition and functional application. Molecules 22, 1774.

Prgomet, I., Gonçalves, B., Domínguez-Perles, R., Santos, R., Saavedra, M.J., Aires, A., Pascual-Seva, N., Barros, A., 2019. Irrigation deficit turns almond by-products into a valuable source of antimicrobial (poly) phenols. Industrial Crops and Products 132, 186–196.

Putnik, P., Kovačević, D.B., Herceg, K., Roohinejad, S., Greiner, R., Bekhit, A.E.-D.A., Levaj, B., 2017. Modelling the shelf-life of minimally-processed fresh-cut apples packaged in a modified atmosphere using food quality parameters. Food Control 81, 55–64.

Putnik, P., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Roohinejad, S., Režek Jambrak, A., Granato, D., Montesano, D., Bursać Kovačević, D., 2018. Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. Foods 7, 106.

Qureshi, M.I., Qayyum, S., Nassani, A.A., Aldakhil, A.M., Abro, M.M.Q., Zaman, K., 2019. Management of various socio-economic factors under the United Nations sustainable development agenda. Resources Policy 64, 101515.

Rajaram, S., Connell, K.M., Sabaté, J., 2010. Effect of almond-enriched high-monounsaturated fat diet on selected markers of inflammation: a randomised, controlled, crossover study. British journal of nutrition 103, 907–912.

Rausch, K.D., Hummel, D., Johnson, L.A., May, J.B., 2019. Wet milling: The basis for corn biorefineries, in: Corn. Elsevier, pp. 501–535.

Ravi, H.K., Vian, M.A., Tao, Y., Degrou, A., Costil, J., Trespeuch, C., Chemat, F., 2019a. Alternative solvents for lipid extraction and their effect on protein quality in black soldier fly (Hermetia illucens) larvae. Journal of Cleaner Production 238, 117861.

Ravi, H.K., Vian, M.A., Tao, Y., Degrou, A., Costil, J., Trespeuch, C., Chemat, F., 2019b. Alternative solvents for lipid extraction and their effect on protein quality in black soldier fly (Hermetia illucens) larvae. Journal of Cleaner Production 238, 117861.

Reay, D., Ramshaw, C., Harvey, A., 2013. Process Intensification: Engineering for efficiency, sustainability and flexibility. Butterworth-Heinemann.

Ref'at, A.A., Takruri, H.R., Al-Sayyed, H., 2008. Tannin contents of selected plants used in Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences 4, 265–274.

Remmal, A., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Ettayebi, M., 1993. Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. Journal de pharmacie de Belgique 48, 352–356.

Reynolds, A.G., 2015. Grapevine breeding programs for the wine industry. Elsevier.

Rezaire, A., 2012. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa) 215.

Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., Askari, G., 2020. Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. Drying Technology 38, 235–258.

Rhayour, K., Bouchikhi, T., Tantaoui-Elaraki, A., Sendide, K., Remmal, A., 2003. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on Escherichia coli and Bacillus subtilis. Journal of essential oil research 15, 356–362.

Richter, G., 1993. Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie.

Rochfort, S., Isbel, A., Ezernieks, V., Elkins, A., Vincent, D., Deseo, M.A., Spangenberg, G.C., 2020. Utilisation of Design of experiments Approach to optimise Supercritical fluid extraction of Medicinal cannabis. Scientific Reports 10, 1–7.

Rolland, L., 2013. Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à coeur liquide 211.

Rue, E.A., Rush, M.D., van Breemen, R.B., 2018. Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry. Phytochem Rev 17, 1–16. https://doi.org/10.1007/s11101-017-9507-3

Şahin, S., Samli, R., Tan, A.S.B., Barba, F.J., Chemat, F., Cravotto, G., Lorenzo, J.M., 2017. Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties. Molecules 22, 1056. https://doi.org/10.3390/molecules22071056

Salas-Salvadó, J., 2005. Frutos secos, salud y culturas mediterráneas. Editorial Glosa, SL.

Samborska, K., Boostani, S., Geranpour, M., Hosseini, H., Dima, C., Khoshnoudi-Nia, S., Rostamabadi, H., Falsafi, S.R., Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S., 2021. Green biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals. Trends in Food Science & Technology.

Sánchez-Alonso, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F., Borderías, A.J., 2007. Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: evaluation by different methodologies. Food chemistry 101, 372–378.

Sanchez-Siles, L.M., Michel, F., Román, S., Bernal, M.J., Philipsen, B., Haro, J.F., Bodenstab, S., Siegrist, M., 2019. The Food Naturalness Index (FNI): An integrative tool to measure the degree of food naturalness. Trends in Food Science & Technology 91, 681–690.

Santos, H.M., Lodeiro, C., Capelo-Martínez, J.-L., 2009. The power of ultrasound, in: Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications. Wiley Online Library, pp. 1–16.

Sapkale, G.N., Patil, S.M., Surwase, U.S., Bhatbhage, P.K., 2010. SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION 15.

Sartini, S., Djide, M.N., Amir, M.N., Permana, A.D., 2020. Phenolic-rich green tea extract increases the antibacterial activity of amoxicillin against Staphylococcus aureus by in vitro and ex vivo studies. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research 8, 491–500.

Sathe, S.K., Seeram, N.P., Kshirsagar, H.H., Heber, D., Lapsley, K.A., 2008. Fatty Acid Composition of California Grown Almonds. Journal of Food Science 73, C607–C614. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00936.x

Sathe, S.K., Sze, K.W.C., 1997. Thermal aggregation of almond protein isolate. Food Chemistry 59, 95–99. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00180-X

Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects–A review. Journal of functional foods 18, 820–897.

Shahidi, F., Naczk, M., 2003. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC press.

Shi, W., Healy, M.G., Ashekuzzaman, S.M., Daly, K., Leahy, J.J., Fenton, O., 2021. Dairy processing sludge and co-products: A review of present and future re-use pathways in agriculture. Journal of Cleaner Production 128035.

Shirsath, S.R., Sable, S.S., Gaikwad, S.G., Sonawane, S.H., Saini, D.R., Gogate, P.R., 2017. Intensification of extraction of curcumin from Curcuma amada using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. Ultrasonics sonochemistry 38, 437–445.

Shirsath, 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: Process Intensification 53, 10–23.

Sicaire, A.-G., Vian, M.A., Fine, F., Carré, P., Tostain, S., Chemat, F., 2016. Ultrasound induced green solvent extraction of oil from oleaginous seeds. Ultrasonics Sonochemistry 31, 319–329.

Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Bronze, M., Coelho, A.V., Boas, L.V., 2010. Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. Grasas y aceites 61, 157–164.

Silver, L.L., 2016. A Gestalt approach to Gram-negative entry. Bioorganic & medicinal chemistry 24, 6379–6389.

Singh, S.B., Young, K., Silver, L.L., 2017. What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. Biochemical pharmacology 133, 63–73.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in enzymology 299, 152–178.

Siriwardhana, S.S., Shahidi, F., 2002. Antiradical activity of extracts of almond and its by-products. Journal of the American Oil Chemists’ Society 79, 903–908.

Sisa, M., Bonnet, S.L., Ferreira, D., Van der Westhuizen, J.H., 2010. Photochemistry of flavonoids. Molecules 15, 5196–5245.

Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., Trombetta, D., 2017. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. British journal of pharmacology 174, 1244–1262.

Smith, R.M., 2006. Superheated water: the ultimate green solvent for separation science. Anal Bioanal Chem 385, 419–421. https://doi.org/10.1007/s00216-006-0437-y

Smullen, J., Koutsou, G.A., Foster, H.A., Zumbé, A., Storey, D.M., 2007. The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against Streptococcus mutans. Caries research 41, 342–349.

Soh, S.H., Agarwal, S., Jain, A., Lee, L.Y., Chin, S.K., Jayaraman, S., 2019. Mathematical modeling of mass transfer in supercritical fluid extraction of patchouli oil. Engineering Reports 1, e12051.

Soto, M.L., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2011. Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. Journal of Food Engineering 105, 1–27.

Spiller, G.A., Jenkins, D.A., Bosello, O., Gates, J.E., Cragen, L.N., Bruce, B., 1998. Nuts and plasma lipids: an almond-based diet lowers LDL-C while preserving HDL-C. Journal of the American college of nutrition 17, 285–290.

Standardization, I.O. for, 2006. Environmental Management: Life Cycle Assessment; Principles and Framework. ISO.

Sun, L., Guo, Y., Fu, C., Li, J., Li, Z., 2013. Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples. Food chemistry 136, 1022–1029.

Sun, S., Huang, S., Shi, Y., Shao, Y., Qiu, J., Sedjoah, R.-C.A.-A., Yan, Z., Ding, L., Zou, D., Xin, Z., 2021. Extraction, isolation, characterization and antimicrobial activities of non-extractable polyphenols from pomegranate peel. Food Chemistry 351, 129232.

Tabib, M., Tao, Y., Ginies, C., Bornard, I., Rakotomanomana, N., Remmal, A., Chemat, F., 2020. A One-Pot Ultrasound-Assisted Almond Skin Separation/Polyphenols Extraction and its Effects on Structure, Polyphenols, Lipids, and Proteins Quality. Applied Sciences 10, 3628. https://doi.org/10.3390/app10103628

Tamizifar, B., Vosoughi, A., Aminzadeh, A., Rismankarzadeh, M., RAFIEIAN, M., 2005. A low-dose almond-based diet decreases LDL-C while preserving HDL-C.

Tao, Y., Wang, Y., Pan, M., Zhong, S., Wu, Y., Yang, R., Han, Y., Zhou, J., 2017. Combined ANFIS and numerical methods to simulate ultrasound-assisted

extraction of phenolics from chokeberry cultivated in China and analysis of phenolic composition. Separation and Purification Technology 178, 178–188. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.012

Tao, Y., Wu, Y., Han, Y., Chemat, F., Li, D., Show, P.L., 2020. Insight into mass transfer during ultrasound-enhanced adsorption/desorption of blueberry anthocyanins on macroporous resins by numerical simulation considering ultrasonic influence on resin properties. Chemical Engineering Journal 380, 122530.

Tao, Y., Zhang, J., Jiang, S., Xu, Y., Show, P.-L., Han, Y., Ye, X., Ye, M., 2018. Contacting ultrasound enhanced hot-air convective drying of garlic slices: Mass transfer modeling and quality evaluation. Journal of Food Engineering 235, 79–88. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.04.028

Tatke, P., Jaiswal, Y., 2011. An overview of microwave assisted extraction and its applications in herbal drug research. Research journal of medicinal plant 5, 21–31.

Tekin, K., Hao, N., Karagoz, S., Ragauskas, A.J., 2018. Ethanol: A Promising Green Solvent for the Deconstruction of Lignocellulose. ChemSusChem 11, 3559–3575. https://doi.org/10.1002/cssc.201801291

Thi Le T, A.A., Framboisier, X., Ioannou, I., Kapel, R., 2020. Adsorption of phenolic compounds from an aqueous by-product of sunflower protein extraction/purification by macroporous resins. Journal of Chromatography & Separation Techniques 11, 435.

Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. TrAC Trends in Analytical Chemistry 71, 100–109.

Tomás-Menor, L., Barrajón-Catalán, E., Segura-Carretero, A., Martí, N., Saura, D., Menéndez, J.A., Joven, J., Micol, V., 2015. The promiscuous and synergic molecular interaction of polyphenols in bactericidal activity: An opportunity to improve the performance of antibiotics? Phytotherapy Research 29, 466–473.

Topitzhofer, E., Lucas, H., Chakrabarti, P., Breece, C., Bryant, V., Sagili, R.R., 2019. Assessment of pollen diversity available to honey bees (Hymenoptera: Apidae) in major cropping systems during pollination in the western United States. Journal of economic entomology 112, 2040–2048.

Tran, T.H., Nguyen, H.H.H., Nguyen, D.C., Nguyen, T.Q., Tan, H., Nhan, L.T.H., Nguyen, D.H., Tran, L.D., Do, S.T., Nguyen, T.D., 2018. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Essential Oil from Vietnamese Basil (Ocimum basilicum L.) Using Response Surface Methodology 12.

Uddin, Md.S., Sarker, Md.Z.I., Ferdosh, S., Akanda, Md.J.H., Easmin, Mst.S., Bt Shamsudin, S.H., Yunus, K.B., 2015. Phytosterols and their extraction from various plant matrices using supercritical carbon dioxide: a review. J. Sci. Food Agric. 95, 1385–1394. https://doi.org/10.1002/jsfa.6833

Ursache, F.M., Andronoiu, D.G., Ghinea, I.O., Barbu, V., Ioniţă, E., Cotârleţ, M., Dumitraşcu, L., Botez, E., Râpeanu, G., Stănciuc, N., 2018. Valorizations of carotenoids from sea buckthorn extract by microencapsulation and formulation of value-added food products. Journal of Food Engineering 219, 16–24.

U.S. Energy Information Administration, 2016. Industrial sector energy consumption 14.

Valadez-Carmona, L., Ortiz-Moreno, A., Ceballos-Reyes, G., Mendiola, J.A., Ibáñez, E., 2018. Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. The Journal of Supercritical Fluids 131, 99–105.

Valdés, L., Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., González, S., 2015. The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. Food & function 6, 2424–2439.

Van Eys, J.E., Offner, A., Bach, A., 2004. Manual of quality analyses for soybean products in the feed industry. American Soybean Association, Brussels, Belgium.

van Zanten, H.H., Mollenhorst, H., de Vries, J.W., van Middelaar, C.E., van Kernebeek, H.R., de Boer, I.J., 2014. Assessing environmental consequences of using co-products in animal feed. The International Journal of Life Cycle Assessment 19, 79–88.

Vaquero, M.J.R., Alberto, M.R., de Nadra, M.C.M., 2007. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of Listeria monocytogenes. Food Control 18, 587–593.

Vavouraki, A.I., Dareioti, M.A., Kornaros, M., 2021. Olive Mill Wastewater (OMW) polyphenols adsorption onto polymeric resins: part i—batch anaerobic digestion of OMW. Waste and Biomass Valorization 12, 2271–2281.

Veeriah, S., Kautenburger, T., Habermann, N., Sauer, J., Dietrich, H., Will, F., Pool-Zobel, B.L., 2006. Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics. Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center 45, 164–174.

Venkatachalam, M., Teuber, S.S., Roux, K.H., Sathe, S.K., 2002. Effects of Roasting, Blanching, Autoclaving, and Microwave Heating on Antigenicity of Almond (

*Prunus dulcis* L.) Proteins. J. Agric. Food Chem. 50, 3544–3548. https://doi.org/10.1021/jf020012z

Vernes, L., Abert-Vian, M., El Maâtaoui, M., Tao, Y., Bornard, I., Chemat, F., 2019. Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects. Ultrasonics sonochemistry 54, 48–60.

Vernès, L., Li, Y., Chemat, F., Abert-Vian, M., 2019. Biorefinery concept as a key for sustainable future to green chemistry—the case of microalgae, in: Plant Based "Green Chemistry 2.0." Springer, pp. 15–50.

Vernès, L., Vian, M., Chemat, F., 2020. Ultrasound and Microwave as Green Tools for Solid-Liquid Extraction, in: Liquid-Phase Extraction. Elsevier, pp. 355–374. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00012-8

Vian, M.A., Fernandez, X., Visinoni, F., Chemat, F., 2008. Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. Journal of chromatography a 1190, 14–17.

Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M., Popa, V., 2014. Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. Chemical Papers 68. https://doi.org/10.2478/s11696-013-0417-6

Wang, L., Boussetta, N., Lebovka, N., Vorobiev, E., 2019. Ultrasound assisted purification of polyphenols of apple skins by adsorption/desorption procedure. Ultrasonics sonochemistry 55, 18–24.

Wang, L., Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology 17, 300–312.

Wang, W., Xu, J., Fang, H., Li, Z., Li, M., 2020. Advances and challenges in medicinal plant breeding. Plant Science 110573.

Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C.S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., Luo, X., 2018. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops–A review. Ultrasonics sonochemistry 48, 538–549.

Wien, M., Bleich, D., Raghuwanshi, M., Gould-Forgerite, S., Gomes, J., Monahan-Couch, L., Oda, K., 2010. Almond consumption and cardiovascular risk factors in adults with prediabetes. Journal of the American College of Nutrition 29, 189–197.

Wiersum, K.F., Dold, A.P., Husselman, M., Cocks, M., 2006. Cultivation of medicinal plants as a tool for biodiversity conservation and poverty alleviation in the Amatola region, South Africa. Frontis 43–57.

Wood, J.E., Senthilmohan, S.T., Peskin, A.V., 2002. Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. Food chemistry 77, 155–161.

Woolley, E., Luo, Y., Simeone, A., 2018. Industrial waste heat recovery: A systematic approach. Sustainable Energy Technologies and Assessments 29, 50–59. https://doi.org/10.1016/j.seta.2018.07.001

Xie, Y., Chen, J., Xiao, A., Liu, L., 2017. Antibacterial activity of polyphenols: Structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition. Molecules 22, 1913.

Yamakoshi, J., Saito, M., Kataoka, S., Kikuchi, M., 2002. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. Food and chemical toxicology 40, 599–607.

Yang, Z., Uhler, B., Lipkie, T., 2019. Microwave-Assisted Subcritical Water Extraction of Steviol Glycosides From Stevia rebaudiana Leaves. Natural Product Communications 14, 1934578X19860003.

Yanık, D.K., 2017. Alternative to traditional olive pomace oil extraction systems: Microwave-assisted solvent extraction of oil from wet olive pomace. LWT 77, 45–51. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.020

You, S., Wang, X., 2019. On the Carbon Abatement Potential and Economic Viability of Biochar Production Systems: Cost-Benefit and Life Cycle Assessment, in: Biochar from Biomass and Waste. Elsevier, pp. 385–408.

Zainan, N.H., Thiruvenkadam, S., Danquah, M.K., Harun, R., 2020. Biochemical analysis and potential applications of aqueous and solid products generated from subcritical water extraction of microalgae Chlorella pyrenoidosa biomass. J Appl Phycol 32, 111–126. https://doi.org/10.1007/s10811-019-01960-0

Zaman, S.B., Hussain, M.A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K.T., Hossain, N., 2017. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. Cureus 9.

Zhang, J., Wen, C., Zhang, H., Duan, Y., Ma, H., 2020. Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. Trends in Food Science & Technology 95, 183–195. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.018

Zhang, L., Wang, Y., Li, D., Ho, C.-T., Li, J., Wan, X., 2016. The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. Food & function 7, 1273–1281.

Zhang, X., Janzen, E.C., Liu, J., 2020. Portable supercritical fluid extraction apparatus. Google Patents.

Zhang, Y., Zhang, J., Sheng, W., Wang, S., Fu, T.-J., 2016. Effects of heat and high-pressure treatments on the solubility and immunoreactivity of almond proteins. Food Chemistry 199, 856–861. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.063

Zhang, Yajie, Zhang, Yu, Taha, A.A., Ying, Y., Li, X., Chen, X., Ma, C., 2018. Subcritical water extraction of bioactive components from ginseng roots ( Panax ginseng C.A. Mey). Industrial Crops and Products 117, 118–127. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.079

Zhu, Z., Guan, Q., Koubaa, M., Barba, F.J., Roohinejad, S., Cravotto, G., Yang, X., Li, S., He, J., 2017. HPLC-DAD-ESI-MS2 analytical profile of extracts obtained from purple sweet potato after green ultrasound-assisted extraction. Food chemistry 215, 391–400.