



UNIVERSITE FRERES MENTOURI CONSTANTINE 1
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES
I.N.A.T.A.A.



N° d'ordre :.....

N° de série :.....

Thèse de Doctorat en Sciences
Spécialité : Sciences Alimentaires

Présentée par :

Louiza HIMED ép. MERNIZ

**Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles
du citron (*Citrus limon*): encapsulation et application
comme agent conservateur à la margarine allégée**

Soutenue le : 25 / 06 / 2018

Devant le Jury composé de :

Président :	NAMOUNE Hacène	Prof.	Université Frères Mentouri Constantine1
Rapporteur :	BARKAT Malika	Prof.	Université Frères Mentouri Constantine1
Examineurs :	MOUSSER Henia	Prof.	Ecole Nationale Supérieure, Constantine
	BEKHOUCHE Farida	Prof.	Université Frères Mentouri Constantine1
	ARHAB Rabah	Prof.	Université Oum El Bouaghi

Année universitaire 2017-2018

Remerciements

Je remercie en premier lieu le **Clément Miséricordieux** de m'avoir donnée le courage, la volonté et de m'avoir éclairée la voie pour aboutir à cette fin fructueuse.

Un grand merci à mes très chers **PARENTS** qui m'ont accompagnée le long de la réalisation de ce travail par leurs prières et leurs grands souhaits pour un bon et un joyeux couronnement. Permettez-moi de m'incliner devant vous pour exprimer mes profondes considérations.

Des remerciements distinctifs et particuliers s'adressent à mon très cher **EPOUX** et à mes très chers **FILS** qui ont bien su me supporter, me soutenir et m'aider jusqu'à la mise du point final. Trouvez ici mes sincères respects et ma profonde reconnaissance.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude et mes grands remerciements à ma Directrice de thèse, **Mme BARKAT Malika**, Professeur à l'INATAA, Université des frères Mentouri Constantine1, pour m'avoir dirigé tout au long de la réalisation de ce travail, pour son esprit scientifique, ses précieux conseils, son écoute et ses discussions qui m'ont fait avancer sur le plan professionnel. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait **M. NAMOUNE Hasen**, Professeur à L'INATAA en acceptant de participer à mon jury de thèse et d'en être le président.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à **Mme. BEKHOUCHE Farida**, Professeur à l'INATAA de m'avoir honorée par sa participation au jury et du temps qu'elle a bien voulu consacrer à l'analyse critique de ce travail

Je tiens à remercier vivement et à exprimer mon grand respect à **Mme MOUSSER Hénia**, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure, Constantine qui a honoré le jury par sa présence et qui a accepté de juger ce travail

Je remercie sincèrement **M. ARHAB Rabah**, Professeur à l'Université Oum El Bouaghi pour avoir accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères considérations

Mes vifs remerciements s'adressent à Monsieur **CORONAS J.** Professeur à l'INA (Institut de Nanoscience d'Aragon), et sa doctorante **Rébica** ainsi que toute l'équipe des laboratoires de chimie et technologie de l'INA université Zaragoza –Espagne, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, me permettant ainsi d'accéder aux moyens techniques et scientifiques nécessaires à ma recherche.

Mes chaleureux remerciements vont à toute ma famille, mes chères **SŒURS** et mes **FRERES** ainsi que leurs femmes. Enfin mes nièces et mes neveux.

Je tiens à exprimer mes remerciements à toute l'équipe de laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL)

Enfin, mes remerciements vont aussi à tous les enseignants et collègues de L'INATAA, au personnel technique et au personnel administratif pour leur participation de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Liste des abréviations

AAR : Activité Antioxydante Relative

ABTS⁺ : 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazole-6-sulphonate

AGI : Acide Gras Insaturé

AGMI : Acide Gras Monoinsaturé

AGPI : Acide Gras Polyinsaturé

AGS : Acide Gras Saturé

ATR : Réflexion Totale Atténuée

BET : Brunauer, Emmett et Teller

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPG : Chromatographie Phase Gazeuse

CUPRAC : Cupric ion-Reducing Antioxidant Capacity

DIC : Détente Instantanée Contrôlée

DIF : Détecteur A Ionisation De Flamme

DL₅₀ : Dose Létale médiane

DMSO : Diméthyle Sulfo-Oxyde

DPPH : 2,2'-diphenyle-1-picryl hydrazyl

EDTA : Acide Ethylène Diamine TetraAcétique

Fp : Facteur de protection

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

HEH: Huiles essentielles de la variété *Euréka* extraites par Hydrodislition

HEP: Huiles essentielles de la variété *Euréka* extraites par pression à froid

HLH : Huiles essentielles de la variété *Lisbon* extraites par Hydrodistillation

HLP : Huiles essentielles de la variété *Lisbon* extraites par pression à froid

IR : Indice de Rétenion

MEB : microscope électronique à balayage

MHA : Muller Hinton

MHE : MMargarine allégée à Huile essentielle Encapsulée

MHL : Margarine allégée à Huile essentielle Libre

MS : Spectrométrie De Masse

MT : Margarine allégée Témoin

PDA : Potato Dextrose Agar

PI : Période d'Induction

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SDA : Sabouraud Dextrose Agar

SFC : Solid Fat Content

TGA : Analyse Thermogravimétrique

TPTZ : 2,4,6-tri[2-pyridyl]-s-triazine

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1. Parties de plantes permettant la biosynthèse et la sécrétion des huiles essentielles.....	6
Figure 2. Principe de la chromatographie en phase gazeuse (a) et celui de la spectrométrie de masse (b)	11
Figure 3. Etapes de l'encapsulation par coacervation.....	19
Figure 4. Représentation schématique de la libération des huiles essentielles à travers l'enveloppe de capsule polymère	20
Figure 5. Principales étapes de fabrication de la margarine	23
Figure 6. Site de collecte des variétés de citron, région de Sidi-Aich.....	25
Figure 7. Récapitulation des principales analyses effectuées dans les volets étudiés.....	27
Figure 8. Principe du fonctionnement de la thermobalance d'analyse thermogravimétrique	39
Figure 9. Schéma du principe de fonctionnement d'un MEB.....	40
Figure 10. Représentation schématique de: a) une seule réflexion ATR; b) un système ATR à réflexion multiple.....	41
Figure 11. Représentation schématique de l'appareillage du test de Rancimat	48
Figure 12. Bulletin du test triangulaire.....	50
Figure 13. Bulletin de test de classement par rang.....	51
Figure 14. Bulletin pour le test hédonique avec un barème de notation allant de 1 à 10....	51
Figure 15. Rendement d'extraction en huiles essentielles.....	53
Figure 16. Répartition des différents groupes des constituants des huiles essentielles extraites.....	56
Figure 17. Activité antioxydante des huiles essentielles extraites déterminée par le test de blanchissement du β -carotène.....	57
Figure 18. Test qualitatif au β -carotène.....	58
Figure 19. Activité antiradicalaire des huiles essentielles extraites (a) test DPPH ; (b) test ABTS.....	59
Figure 20. Pouvoir réducteur des huiles extraites (a) Test CUPRAC ; (b) Test FRAP.....	60
Figure 21. Pouvoir chélateur du fer de l'EDTA et des huiles essentielles extraites.....	61
Figure 22. Courbe d'étalonnage de l'huile essentielle dans l'éthanol.....	72
Figure 23. Analyse thermogravimétrique de l'huile essentielle libre et encapsulée.....	73

Figure 24. Images au MEB (a) Silicates (b) Capsules d'huile essentielle de citron	74
Figure 25. Analyse par la réflexion atténuée de l'huile essentielle libre, encapsulée et de SiO ₂	75
Figure 26. Taux du solide des margarines élaborées	78
Figure 27. Test hédonique des margarines élaborées.....	84

Liste des tableaux

Tableau 1. Quelques exemples de composés encapsulés dans le domaine alimentaire.....	17
Tableau 2. Conditions opératoires des analyses en CG/SM.....	30
Tableau 3. Formule de la margarine allégée élaborée (Cévitral).....	43
Tableau 4. Composition chimique des huiles essentielles du citron extraites analysées GC/MS.....	55
Tableau 5. EC ₅₀ des huiles essentielles testées et des standards utilisés dans différents tests de l'activité antioxydante.....	62
Tableau 6. Matrice de corrélation entre le limonène et les EC ₅₀ des huiles essentielles testées par différentes méthodes.....	64
Tableau 7. Diamètres d'inhibition des huiles extraites vis-à-vis les souches bactériennes testées.....	66
Tableau 8. Diamètres d'inhibition des huiles extraites vis-à-vis les souches fongiques testées.....	67
Tableau 9. Concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles extraites	68
Tableau 10. Concentrations minimales fongicides (CMF) des huiles extraites.....	68
Tableau 11. EC ₅₀ des huiles essentielles libres et encapsulées.....	76
Tableau 12. Caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées.....	77
Tableau 13. Composition en acides gras des margarines élaborées.....	79
Tableau 14. Différentes classes d'acides gras des margarines élaborées.....	80
Tableau 15. Période d'induction et facteur de protection des margarines testées.....	81
Tableau 16. Test triangulaire.....	82
Tableau 17. Test du classement par rang.....	83

Table de matière

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1
Partie 1. Revue bibliographique	
1. Huiles essentielles des <i>Citrus</i>	4
1.1. Aperçu général sur le citron (<i>Citrus limon</i>)	4
1.2. Huiles essentielles du citron.....	5
1.2.1. Généralités sur les huiles essentielles.....	5
1.2. 2. Localisation et rôle physiologique	6
1.3. Méthodes d'extraction.....	8
1.4. Méthodes d'analyse chimique.....	10
1.5. Relation composition chimique – activité biologique.....	11
1.7. Toxicité et domaines d'application	13
1.6. Contraintes d'utilisation	14
1.7. Encapsulation.....	15
1.7.1. Concept d'encapsulation.....	15
1.7.2. Encapsulation dans le domaine alimentaire.....	16
1.7.3. Techniques et efficacité d'encapsulation.....	17
1.7.4. Mécanismes de libération contrôlée.....	19
2. Généralités et synthèse de travaux sur la margarine.....	21
2.1. Généralités sur la margarine	21
2.2. Types de margarines.....	21
2.3. Différentes étapes de fabrication.....	22
2.4. Facteurs de détérioration.....	22
2.5. Quelques travaux sur l'incorporation des extraits de végétaux à la margarine	24
Partie 2. Matériel et Méthodes	
1. Matériel végétal.....	25
1.1. Choix et principales caractéristiques des variétés sélectionnées.....	25
1.2. Origine des variétés.....	25
2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles.....	26
2.1. Extraction des huiles essentielles.....	28
2.1.1. Extraction par pression à froid.....	28
2.1.2. Extraction par hydrodistillation	28
2.2. Détermination du rendement en huiles essentielles.....	29
2.3. Caractérisation et identification des huiles essentielles par GC/MS.....	29

2.3.1. Conditions de la caractérisation par GC/MS.....	29
2.3.2. Identification des constituants	29
2.4. Détermination du pouvoir antioxydant des huiles essentielles.....	30
2.4.1. Inhibition de la peroxydation lipidique.....	31
2.4.1.1. Blanchissement du β -carotène	31
2.4.1.2. Test qualitatif au β -carotène.....	31
2.4.2. Piégeage des radicaux.....	32
2.4.2.1. Test DPPH.....	32
2.4.2.2. Test ABTS ⁺	32
2.4.3. Pouvoir réducteur.....	33
2.4.3.1. Test CUPRAC.....	33
2.4.3.2. Test FRAP.....	34
2.4.4. Pouvoir chélateur du fer.....	34
2.6. Détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	35
2.6.1. Choix et origine des souches.....	35
2.6.2. Mise en culture des souches et préparation des disques.....	35
2.6.3. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme).....	36
2.6.4. Méthode de dilution d'agar.....	37
3. Encapsulation de l'huile essentielle dans les silicates (SiO ₂).....	37
3.1. Méthode d'encapsulation.....	37
3.2. Pourcentage d'efficacité d'encapsulation.....	36
3.3. Caractérisation des capsules d'huiles essentielles.....	38
3.3.1. Analyse thermogravimétrique (TGA).....	38
3.3.2. Analyse par le microscope électronique à balayage (MEB)	40
3.3.3. Analyse par la réflexion totale atténuée (ATR).....	41
3.4. Activité antioxydante des huiles encapsulées	42
4. Application des huiles essentielles libres et encapsulées à la margarine allégée	42
4.1. Choix du type de margarine.....	42
4.2. Élaboration de la formule de la margarine allégée.....	42
4.3. Caractérisation physico-chimique de la margarine allégée.....	43
4.3.1. Détermination de la teneur en eau et des matières volatiles.....	43
4.3.2. Détermination du gras et du non gras.....	44
4.3.3. Teneur en sel.....	44
4.3.4. Détermination de la teneur en acides gras par CPG	45
4.3.5. Détermination du pH... ..	45
4.3.6. Détermination de l'indice de peroxyde.....	45
4.3.7. Détermination du point de fusion.....	46
4.3.8. Détermination du taux du solide SFC (Solid Fat Content)... ..	47
4.4. Évaluation de la résistance à l'oxydation forcée	47
4.5. Analyse sensorielle.....	48
4.5.1. Sujets dégustateurs.....	49
4.5.2. Déroulement de l'analyse.....	49
4.5.2.1. Test triangulaire	49
4.5.2.2. Test du classement par rang.....	50
4.5.2.3. Test hédonique... ..	51
5. Analyse statistique	52

Partie 3. Résultats et Discussion

1. Rendement, caractérisation, pouvoirs antioxydant et antimicrobien des huiles essentielles extraites.....	53
1.1. Rendement d'extraction en huiles essentielles.....	53
1.2. Caractérisation et identification des huiles essentielles par GC/MS.....	54
1.3. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles.....	57
1.3.1. Inhibition de la peroxydation lipidique.....	57
1.3.2. Piégeage des radicaux.....	59
1.3.3. Pouvoir réducteur.....	59
1.3.4. Pouvoir chélateur du fer.....	60
1.4. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.....	64
1.4.1. Pouvoir antibactérien.....	64
1.4.2. Pouvoir antifongique.....	65
1.4.3. Concentrations inhibitrices des huiles essentielles extraites.....	68
2. Encapsulation des huiles essentielles.....	71
2.1. Encapsulation des huiles essentielles dans les silicates (SiO ₂).....	71
2.1.1. Pourcentage d'efficacité d'encapsulation	71
2.1.2. Caractérisation des capsules des huiles essentielles extraites	72
2.1.2.1. Analyse thermogravimétrique (TGA)	72
2.1.2.2. Analyse par microscope électronique à balayage (MEB)	74
2.1.2.3. Analyse par la réflexion totale atténuée (ATR).....	74
2.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles encapsulées.....	75
3. Incorporation des huiles essentielles libres et encapsulées dans la margarine allégée	76
3.1. Formulation de la margarine allégée.....	76
3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées.....	76
3.1.2. Composition en acides gras des margarines élaborées... ..	79
3.1.3. Évaluation de la résistance à l'oxydation forcée	81
3.2. Analyse sensorielle des margarines élaborées... ..	81
3.2.1. Test triangulaire.....	82
3.2.2. Test de classement.....	83
3.2.3. Test hédonique	84
Conclusion générale et perspectives.....	85
Références bibliographiques.....	87

Annexes

Résumé

INTRODUCTION GENERALE

Parmi les métabolites secondaires des végétaux, les huiles essentielles sont les plus étudiées et ont suscité, ces dernières années, un intérêt croissant dans de nombreux domaines pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique, notamment par leurs propriétés antioxydante et antimicrobienne (Bakkali *et al.*, 2008). La dynamique de marché des huiles essentielles est soutenue par une demande sans cesse croissante en ingrédients naturels, ce qui a poussé les industriels des secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique davantage à les intégrer dans leurs formulations. La substitution d'un produit de synthèse par une huile essentielle permet d'accroître la valeur ajoutée (Kerdudo *et al.*, 2014).

En parallèle, l'application des huiles essentielles aux denrées alimentaires se confronte à plusieurs contraintes. D'une part, elle ne peut être envisagée que si la caractérisation de ces substances naturelles est réalisée. Celle-ci passe par la connaissance de la composition chimique, qui constitue un facteur déterminant en vue de leur utilisation ; et la mise en évidence des propriétés de ces substances naturelles qui nécessite la mise en œuvre de diverses techniques analytiques qui permettent d'apprécier leur qualité. D'autre part, l'utilisation industrielle des huiles essentielles doit faire face au problème de la variabilité de leur composition et leur instabilité au stockage ainsi que leur volatilité (Li *et al.*, 2014). Actuellement, on reconnaît que la maîtrise de la température, la lumière et la disponibilité en oxygène ont un impact prépondérant sur la préservation de l'intégrité des huiles essentielles (Turek *et al.*, 2013). Certaines techniques permettent de réduire l'effet de ces problèmes qui conditionnent l'utilisation industrielle de ces huiles, notamment l'encapsulation.

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

La margarine est une émulsion eau dans l'huile. Sous sa forme standard, elle est constituée de deux phases essentielles grasse et aqueuse et contient 2% d'additifs hydro et liposolubles (Karleskind, 1992). L'oxydation des lipides est une cause majeure de sa dégradation lors de sa fabrication et de sa conservation, elle affecte les acides gras insaturés présents. Les recommandations nutritionnelles conseillent d'augmenter la part relative des acides gras polyinsaturés (AGPI) dans la ration en raison notamment de leur rôle dans la prévention de

pathologies du système cardiovasculaire et de l'obésité (Martin, 2001). Or la présence dans la margarine de ces AGPI particulièrement sensibles à l'oxydation pose le problème de la maîtrise de la stabilité de tels systèmes (Villière et Genot, 2006). La conséquence la plus perceptible de l'oxydation des lipides est l'apparition d'odeurs et de saveurs désagréables. Ces odeurs conduisent souvent au rejet du produit par le consommateur (Prior, 2003).

Le dioxyde de silicium amorphe est un additif alimentaire naturel cité dans la liste des additifs du *Codex Alimentarius*. Il est utilisé dans les produits alimentaires comme un antiagglomérant sous le code E551. Pasetta *et al.* (2016) ont signalé sa bonne capacité à encapsuler les huiles essentielles, utilisées dans le traitement des eaux de piscine. Ce constat nous a laissé penser sur la possibilité de l'exploiter en industrie agroalimentaire et en particulier celle de la margarine. Dans ce contexte, le principal objectif ciblé dans ce travail est de tester les huiles essentielles encapsulées du citron dans le dioxyde de silicium amorphe afin de pallier au problème de leur instabilité, et les appliquer dans la margarine allégée.

Pour atteindre cet objectif, il nous a semblé nécessaire de procéder expérimentalement à :

- l'analyse de la composition chimique et l'évaluation des activités biologiques des huiles essentielles des variétés sélectionnées (*Euréka* et *Lisbon*) du citron ;
- l'encapsulation et la caractérisation des huiles ayant le meilleur pouvoir antioxydant ;
- l'application des huiles essentielles libres et encapsulées dans la margarine allégée ;
- le suivi de la stabilité oxydative et l'analyse des propriétés sensorielles de la margarine allégée élaborée.

De même, nous avons jugé utile de structurer le manuscrit, en plus de l'introduction et la conclusion générale et ses perspectives, en trois parties :

La première partie (*Revue bibliographique*) propose une mise au point bibliographique. Elle rassemble une synthèse de travaux sur les huiles essentielles de *Citrus*, une synthèse de travaux sur l'encapsulation de ces huiles et des généralités sur la margarine ainsi qu'une citation de quelques travaux sur l'incorporation des extraits de végétaux dans cette émulsion.

Dans la deuxième partie (*Matériel et Méthodes*), nous avons décrit en détail le matériel végétal, les procédés d'extraction des huiles essentielles (hydrodistillation et pression à froid), l'étude de leurs activités biologiques à savoir l'activité antioxydante (inhibition de la peroxydation lipidique, piégeage des radicaux libres, pouvoir réducteur et pouvoir chélateur), l'activité antimicrobienne (pouvoir antibactérien et pouvoir antifongique), l'encapsulation des huiles ayant le meilleur pouvoir antioxydant dans le dioxyde de silicium amorphe et leur caractérisation par

microscope électronique à balayage (MEB), analyse thermogravimétrique (TGA) et analyse par réflexion atténuée (ATR). Puis l'application des huiles essentielles libres et encapsulées à la margarine allégée et la caractérisation physico-chimique de celle-ci ainsi qu'un suivi de la stabilité oxydative par le test Rancimat et enfin une analyse sensorielle afin d'étudier l'acceptabilité de cette margarine par le consommateur par trois tests (classement par rang, triangulaire et hédonique).

La partie 3 (*Résultats et discussion*) est consacrée à la présentation des principaux résultats et leurs discussions.

Partie 1.
Revue bibliographique

1. Huiles essentielles des *Citrus*

1.1. Aperçu général sur le citron (*Citrus limon*)

Le citron est le fruit du citronnier (*Citrus limon*), c'est un agrume appartenant à la famille des *Rutaceae*. Ce dernier est un arbuste originaire du sud-est asiatique, cultivé sur le littoral de la Méditerranée et dans toutes les régions du globe à climat semi-tropical (Debuigine et Couplan, 2008). Le fruit est de forme ovale, avec un mamelon plus au moins apparent à son extrémité. La peau fine est colorée en jaune à maturité du fruit; elle est pourvue de nombreuses glandes oléifères renfermant des essences. La pulpe est généralement riche en acide citrique, ce qu'il lui donne sa saveur acide (Blancke, 2001). Le citron est un agrume plus vigoureux, son arbre est caractérisé par une croissance rapide. Il produit de nombreuses branches et fructifie abondamment, et la fructification de l'hiver est plus importante (de 60 à 70% de production annuelle de l'arbre) (Dubois, 2006). Les principales variétés méditerranéennes cultivées du citronnier sont : "Verna", "Euréka", "Lisbon", "Monachello", "Interdonato" et "Lunaris" (Blancke, 2001).

Parmi les raisons qui ont conféré au citron un poids économique sur la scène internationale figurent ses bienfaits sur la santé, attribués relativement à la présence de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques (Marchand, 2002), la vitamine C (Halliwell, 1996), et les caroténoïdes (Rao et Rao, 2007). Bien que le fruit est une source de composés aromatiques (Minh Tu *et al.*, 2002 ; Chutia *et al.*, 2009), de nombreux auteurs ont rapporté des propriétés antioxydantes attribuées aux huiles essentielles extraites de ses écorces (Sacchetti *et al.*, 2005).

La production et la consommation mondiale d'agrumes ont connu une période de forte croissance depuis le milieu des années 80. Les citrons sont généralement produits sous des climats plus froids, tels que l'ouest des États-Unis, l'Espagne, l'Italie et l'Argentine. Ils sont également adaptés à des climats secs (Egypte, Iran, Inde, etc.). Les grands pays producteurs sont le Mexique et le Brésil (Spreen *et al.*, 2010). La production mondiale de citrons et limes a atteint 10,6 millions de tonnes en 2010, soit une augmentation de 15 % par rapport au niveau de 1996-98. En Algérie, la culture des agrumes représente un segment stratégique. Selon les dernières statistiques (ONS 2011), l'agrumiculture couvre actuellement une superficie totale de 64 323 ha, soit environ 8 % de la superficie totale occupée par les cultures pérennes. La production totale avoisine les 1 100.000 tonnes. Le niveau de rendement moyen

national enregistré (2010 / 2011) est de l'ordre de 172 qx/ha, bien qu'ayant bénéficié d'une évolution régulière (augmentation de 60 qx/ha depuis l'indépendance).

1.2. Huiles essentielles du citron

1.2.1. Généralités sur les huiles essentielles

Depuis des siècles, l'homme a utilisé les plantes, et en particulier les plantes aromatiques, dans plusieurs domaines tels que la parfumerie, la pharmacologie et l'agroalimentaire, grâce à leurs propriétés découvertes par hasard. Les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires. Ces derniers constituent un ensemble de molécules qui ne sont pas strictement impliqués dans les grandes fonctions d'une plante (photosynthèse, respiration, etc.). Il s'agit majoritairement de molécules de taille et de masse faibles comparées aux molécules du métabolisme primaire (glucides, lipides et acides aminés). Elles sont majoritairement la source d'odeurs jouant le rôle à la fois de répulsif envers les prédateurs (concurrents écologiques) et d'attractif de pigments permettant de capter le rayonnement solaire mais aussi de protéger la plante contre ce rayonnement.

Parmi les métabolites secondaires, les huiles essentielles sont les plus étudiées et présentent une grande importance commerciale. Il s'agit de mélanges naturels généralement dominés par des composés mono- ou sesquiterpéniques, plus rarement diterpéniques, et parfois par des phénylpropanoïdes. Le nom *huile essentielle* a été inventé au 16ème siècle par le réformateur suisse de la médecine, Paracelsus von Hohenheim qui a appelé le composant efficace *essentia de Quinta* de drogue (Guenther, 1948).

Selon AFNOR NF T 75-006 (2000), une huile essentielle est définie comme un « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche ». L'huile essentielle est donc définie comme l'essence volatile extraite de plantes aromatiques par la distillation sèche, par entrainement à la vapeur ou par un procédé mécanique sans chauffage. Cette définition détermine les huiles essentielles au sens strict. Mais, de ce fait, elle écarte les produits obtenus, toujours à partir de matière première végétale, mais en employant d'autres procédés d'extraction, comme l'utilisation de solvants non aqueux ou l'enfleurage (Besombes, 2008).

Kalemba et Kunicka (2003) ont défini les huiles essentielles comme étant des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par expression mécanique. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits, mais également à partir de gommés qui s'écoulent du tronc des arbres (Burt, 2004).

D'après Naves (1976), aucune des définitions des huiles essentielles n'a le mérite d'être claire, ni précise. Les huiles essentielles sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. Cette définition peut être étendue aux huiles essentielles obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de *Citrus*, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères.

L'encyclopédie Funk et Wagnalls (2004) décrit les huiles essentielles comme les « liquides volatils, la plupart du temps insolubles dans l'eau, mais librement solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles végétales et minérales. Elles sont habituellement non huileuses au contact de la peau ».

Les huiles essentielles sont solubles dans l'alcool, l'éther et les huiles fixes, mais insolubles dans l'eau. Elles sont généralement liquides à température ambiante. Elles ont une densité inférieure à l'unité, à l'exception de quelques cas (cannelle, saffran et vétiver). Elles sont peu volatiles, et il convient de les conserver à l'abri de l'air et de la lumière (Durville, 1893 ; Durville, 1930).

1.2. 2. Localisation et rôle physiologique

Les huiles essentielles sont généralement répandues chez les végétaux supérieurs. Elles peuvent être stockées dans tous les organes : les fleurs, les feuilles, les rhizomes, les fruits, les écorces et les graines (Guignard, 2000). Leurs synthèse et accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (Figure 1) : les cellules aux huiles essentielles des Lauracées (*Camphora officinarum*) ou des Zingibéracées (*Zingiber officinale*), les poils sécréteurs des Lamiacées (*Mentha spicata*), les poches sécrétrices des Myrtacées (*Eucalyptus leucoxylon*) ou des Rutacées (*Citrus limon*), les canaux sécréteurs des Apiacées (*Daucus carota*) ou des Astéracées (*Anthemis tomentosa*) (Garnero, 1991).

Les *Citrus* élaborent et stockent les huiles essentielles dans des poches schizolysigènes localisées dans la partie externe du mésocarpe du fruit (flavedo). C'est cette localisation particulière qui permet de les récupérer directement par « expression » (Bruneton, 1999).

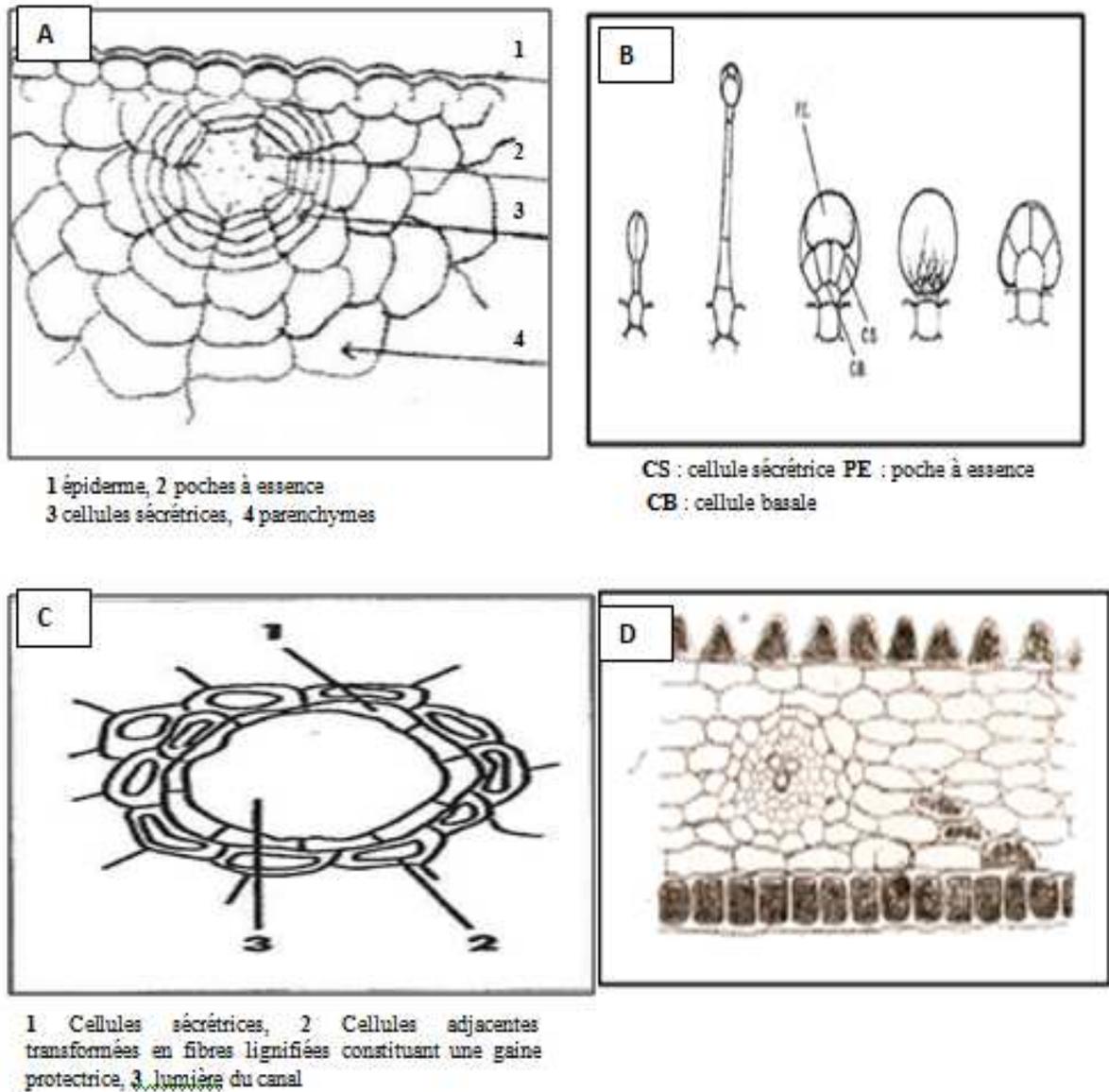


Figure 1. Parties de plantes permettant la biosynthèse et la sécrétion des huiles essentielles

- A. Poches à essences des *Citrus* (Ferhat *et al.*, 2010)
- B. Différents types de poils sécréteurs chez la sauge officinale (Boukhatem *et al.*, 2010)
- C. Coupe transversale d'un canal glandulaire schizogène de feuille de *Pinus pinaster* (Franchomme *et al.*, 1990)
- D. Cellules à huiles essentielles des Lauracées (Franchomme *et al.*, 1990)

Les huiles essentielles diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles (tous les rôles) soient encore mal connus. Il est cependant clair qu'elles interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que les prédateurs, mais aussi de la pollinisation et la dissémination (Bruneton, 1999). Les travaux de Croteau (1977) et ceux de Croteau et Hooper (1978) ont montré que les composants volatils ont un rôle mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique au profit de la plante. Certains terpènes jouent un rôle important et varié dans la relation des plantes avec leur environnement (Mahmoud, 1992). Ainsi le 1,8-cinéole et le camphre inhibent la germination des organes responsables de la prolifération des infections ou la croissance des agents pathogènes issus de ces organes (Razafindrakoto, 1988). Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes en tant que substances antibactérienne, antivirale, antifongique, insecticide et aussi contre les herbivores en réduisant leur appétit pour une telle plante. Elles peuvent attirer aussi les insectes en favorisant la dispersion de pollens et graines, ou au contraire repousser d'autres indésirables (Bakkali *et al.*, 2008).

1.3. Méthodes d'extraction

Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice. Plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point telles que les méthodes conventionnelles (distillation et pression à froid) et les méthodes d'innovation (extraction assistée par micro-ondes, flash-détente et détente instantanée contrôlée) (Mengal et Mompon, 1996). L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés d'extraction les plus anciens et l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un flux de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées avant d'être décantées et récupérées dans un essencier. En revanche, l'hydrodistillation consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique (eau + huiles essentielles) et l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par différence de densité (Peyron, 1992 ; Crouzet, 1996). Quant à l'expression à froid, c'est une extraction sans chauffage réservée aux agrumes. Le principe de ce procédé mécanique est fondé sur la rupture des péricarpes riches en huiles essentielles.

L'huile ainsi libérée est entraînée par un courant d'eau formant une émulsion. L'huile essentielle est alors isolée par décantation (Kimball, 1999 ; Dugo et Giacomo, 2002).

Parmi les procédés d'extraction assistés par micro-ondes, apparaît en premier lieu l'entraînement à l'air assisté par micro-ondes. C'est une technique qui a été proposée par Craveiro *et al.* (1989) comme la première technique d'extraction des huiles essentielles par chauffage micro-ondes. Cette technique repose sur le principe de l'entraînement à la vapeur et utilise de l'air comprimé à la place de la vapeur pour extraire des huiles essentielles. Elle consiste à injecter en continu de l'air comprimé dans le réacteur d'extraction où la matrice végétale est immergée dans de l'eau et chauffée sous micro-ondes. La vapeur d'eau saturée en molécules volatiles est ensuite entraînée vers un vase de récupération plongé dans un système de réfrigération et situé à l'extérieur du four à micro-ondes. L'eau ainsi que les molécules aromatiques constituant les huiles essentielles sont donc condensées et récupérées dans des proportions identiques à celles d'un procédé classique (Mengal et Mompon, 1996).

En deuxième lieu, le procédé de l'hydrodistillation par micro-onde sous vide pulsé a été élaboré et breveté, en 1994, par la société Archimex (Mengal et Mompon, 1994, Mengal et Mompon, 1996). Ce procédé est basé sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Ces micro-ondes ont pour effet d'accélérer le transfert des molécules vers le milieu extérieur. Le vide pulsé, quant à lui, permet de réaliser l'entraînement azéotrope de l'huile essentielle à une température inférieure à 100°C.

L'extraction par Détente Eclair (Flash-Détente), brevetée par l'INRA en 1993, est un procédé d'extraction innovant, multi-usages et multi-effets (Brat, 2001). Cette technique se réalise en deux étapes, la première consiste à étuver la matière végétale à 85 – 90°C par l'utilisation d'une vis à injection de vapeur. La seconde est une détente avec introduction brutale sous vide (environ 30 mbar) du matériel végétal. La température d'ébullition de l'eau dans ces conditions de vide se situe entre 27 et 30°C. Cette mise sous vide instantanée provoque donc l'évaporation brutale d'une partie de l'eau de constitution du matériel végétal étuvé et une chute brutale de la température du milieu. Les eaux d'évaporation riches en composés volatils sont récupérées séparément par condensation. En outre, la Détente Instantanée Contrôlée (DIC) est une méthode d'extraction née des études théoriques menées par Allaf (1989) sur l'expansion par extrusion et suivie de travaux expérimentaux. Le traitement par DIC est utilisé en vue d'extraire les arômes et les huiles essentielles à partir de végétaux adéquats naturels ou préalablement séchés. En effet, appliquée aux végétaux, la DIC permet la

modification de leur structure, provoquant ainsi leur texturation et facilitant alors les opérations de transfert de matière. L'auto-vaporisation qui accompagne la détente implique la séparation liquide-solide et permet donc l'extraction de composés spécifiques. Cette opération se distingue par un traitement thermique très localisé, durant un temps réduit (quelques dizaines de secondes) (Allaf et *al.*, 1994 ; Rezzoug et *al.*, 1998).

1.4. Méthodes d'analyse chimique

L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) (Salzer, 1977). La chromatographie en phase gazeuse (CPG) représente l'une des techniques clés de l'identification pour de nombreux composés volatils contenus dans les huiles essentielles. Son pouvoir de séparation élevé dans une combinaison avec une large gamme de détecteurs est un outil important dans la détermination des différents constituants des huiles essentielles. Le principe de la CPG (Figure 2a) est basé sur la répartition des constituants à séparer entre deux phases non miscibles : l'une des deux est une phase stationnaire tandis que l'autre est une phase mobile qui passe à travers la phase stationnaire. Dans l'analyse CPG, les composés à analyser sont vaporisés, ensuite élués par la phase mobile à travers la colonne. A la sortie de la colonne, les analytes sont séparés dans le temps en fonction de leurs pressions relatives de vapeur (volatilité) et de leurs affinités pour la phase stationnaire. Lorsque les analytes arrivent au niveau du détecteur (détecteur à ionisation de flamme DIF), un signal est enregistré générant un chromatogramme sous forme de pics qui sont caractérisés par un temps de rétention (Bouchonnet, 2009).

Etant donné que l'analyse CPG, utilisant un détecteur DIF, ne fournit pas d'informations structurales des molécules analysées, les indices de rétention plus précis sont utilisés comme le principal critère pour l'attribution des pics. Le système de l'indice de rétention est fondé sur le fait que chaque analyte est classé en fonction de sa position entre les deux n-paraffines. En outre, le calcul de l'indice est basé sur une interpolation linéaire de la longueur de la chaîne de carbone de ces paraffines. Ces indices calculés sont appelés dans la littérature indice de rétention (IR). Dans la caractérisation des composés volatils, la série de référence la plus communément appliquée est celle des n-alcanes (Tranchant, 2004).

La spectrométrie de masse (SM) permet l'identification des analytes. Elle peut être définie comme l'étude des systèmes par la formation d'ions gazeux, avec ou sans fragmentation, qui sont ensuite caractérisés par leur rapport masse sur charge et l'abondance relative (Figure 2b).

L'analyte peut être ionisé par voie thermique, par un champ électrique ou par un impact énergétique d'électrons, des ions ou des photons. En outre, le potentiel de la CPG couplée à la SM est bien connu pour la détermination des composés volatils contenus dans les huiles essentielles. Le procédé d'identification le plus fréquent en GC/MS consiste à comparer les spectres de masse inconnus avec ceux contenus dans la librairie SM de référence (Mc Nair et Miller, 1997).

Les indices de rétention en combinaison avec les informations structurales fournies par la GC/MS sont utilisés pour confirmer l'identité des composés.

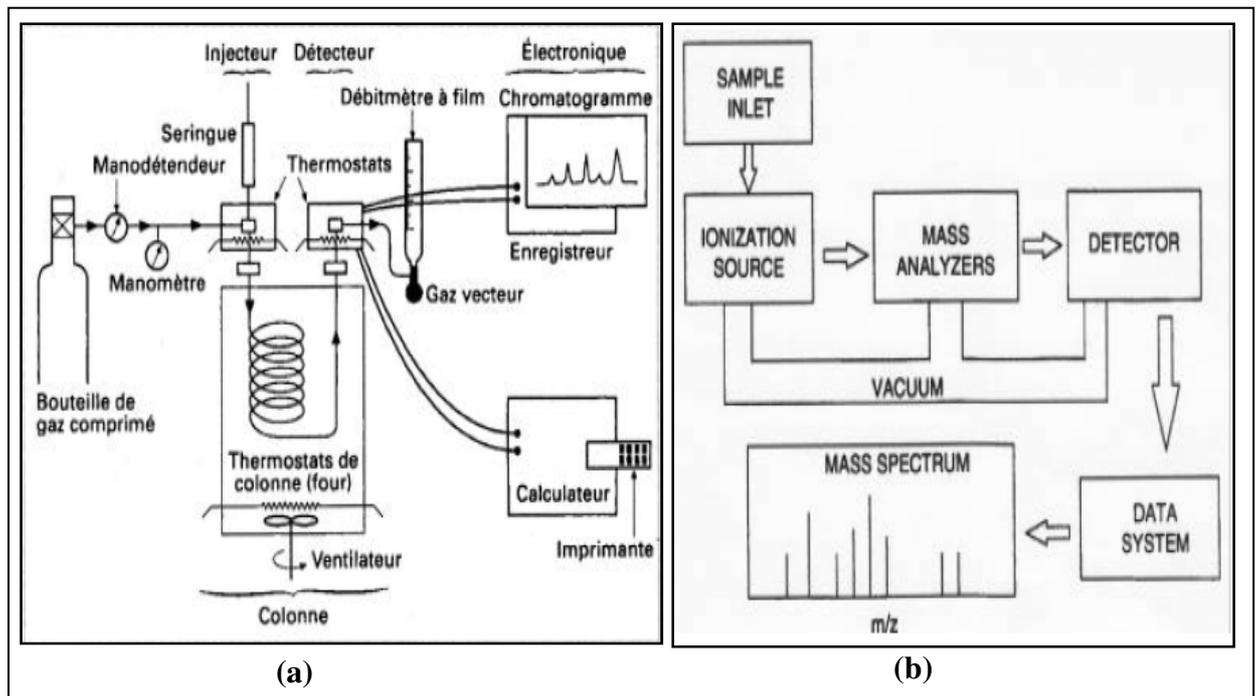


Figure 2. Principe de la chromatographie en phase gazeuse (a) et celui de la spectrométrie de masse (b) (Mc Nair et Miller, 1997 ; Tranchant, 2004).

1.5. Relation composition chimique – activité biologique

La composition chimique de nombreuses huiles essentielles a été décrite. Elle varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte (Delaquis *et al.*, 2002 ; Burt, 2004 ; Gonny *et al.*, 2003; Boti *et al.*, 2006, Oussou, 2009).

Au sein d'une même espèce, la composition chimique des huiles essentielles peut être différente: on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique : une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles

essentielles de compositions différentes (Bedi *et al.*, 2001, Nébié *et al.*, 2004 et Avlessi *et al.*, 2012). Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes (Buchanan *et al.*, 2000). La classe des terpénoïdes est la plus variée au niveau structural. Les terpénoïdes, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones (C₅), l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C₅), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes : les monoterpénoïdes (C₁₀) et les sesquiterpénoïdes (C₁₅). Les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers et des cétones. La classe des phénylpropanoïdes, ou composés phénoliques, est biosynthétisée à partir des acides aminés aromatiques (la phénylalanine et la tyrosine). Ces composés sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. La norme ISO : NF T 75-335 (1995) a donné la composition de l'huile essentielle extraite par expression de l'écorce du *Citrus limon* avec un rendement de 1,2 à 1,5%. Les principaux constituants sont le limonène (65 à 70%), le γ -terpinène (9 à 12%), le β -pinène (4 à 9%), le citral (1 à 5%), le linalol (1,5%), le cinéole, l'acétate de géranyle, le nonanal, le citronellal, l' α -terpinéol, le camphène et l' α -bisabolène.

Les études sur la composition chimique des huiles essentielles en relation avec le screening de leurs activités biologiques sont abondantes. Il est établi dans de nombreux travaux que l'activité des huiles essentielles est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre leurs constituants (Kalemba et Kunicka, 2003; Saint, 2003 ; Oussou, 2009; Oussou *et al.*, 2010). Selon Mau *et al.* (2003), la présence de l'unité isoprénique dans les constituants des huiles essentielles attribue à celles-ci une activité antioxydante. Smith *et al.*, (2001) ont attribué cette activité dans les huiles essentielles des oranges au pourcentage élevé (jusqu'à 97%) des monoterpènes et des sesquiterpènes. Moufida et Marzouk (2003) et Bakkali *et al.* (2008) ont confirmé pour ces huiles une activité importante en relation avec une teneur élevée en limonène (68 - 98%). Kelen et Tepe (2008) ont trouvé que l'activité antioxydante résulte de l'effet synergique entre les constituants des huiles. L'action des huiles essentielles sur les microorganismes est essentiellement due à l'interaction de leurs constituants avec la membrane des cellules microbiennes (Griffin *et al.*, 1999; Dorman et Deans, 2000; Bakkali *et al.*, 2008). Les huiles altèrent la perméabilité membranaire des germes en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la

production d'énergie (Sikkema *et al.*, 1995; Chami, 2005; Oussalah *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2006). L'activité antibactérienne des huiles essentielles est plus importante sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries Gram négatif (Burt, 2004). Selon Sleytr et Messner (1988), la résistance de ces dernières est due à la présence d'une couche cristalline entourant leur membrane. Cette couche est constituée essentiellement de lipopolysaccharides la rendant plus hydrophile, ce qui empêche l'action des terpènes qui sont hydrophobes. Des études *in vitro* ont également démontré que les huiles essentielles ont un effet très similaire sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, la seule différence importante étant le temps d'exposition nécessaire pour que l'effet se produise (Fisher et Phillips, 2008). De nombreux auteurs ont déduit que les huiles essentielles présentent une activité antimicrobienne supérieure à celle de leurs principaux composants lorsqu'ils sont isolés. Cela conduit à supposer que les composants mineurs ne possèdent pas cette activité où des effets synergiques peuvent se produire (Hili *et al.*, 1997, Burt, 2004, Droby *et al.*, 2008). Les principaux composants reflètent les propriétés biologiques des huiles essentielles, mais leur activité, par exemple leur pénétration cellulaire, l'hydrophobicité et la fixation sur les membranes, peuvent être modulées par les composants mineurs (Mizuki *et al.*, 1990 ; Bakkali *et al.*, 2008). En règle générale, les moisissures montrent plus de résistance aux huiles essentielles que les bactéries.

1.7. Toxicité et domaines d'application

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Il en existe quelques certains de leurs composés qui sont responsables du cancer (Guba, 2001). Les huiles essentielles possèdent une toxicité à une certaine dose (dose létale médiane); une DL₅₀ comprise entre 2 et 5g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées (anis, eucalyptus, girofle, etc.) ou le plus fréquemment supérieure à 5g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.). D'autres ont une DL₅₀ inférieure à 1g/kg. C'est le cas des huiles essentielles de boldo qui présentent une DL₅₀ de 0,13 g/kg avec apparition de convulsions dès 0,07g/kg; les essences de moutarde (0,34 g/kg); l'origan et la sarriette (1,37 g/kg); le basilic, l'estragon et l'hysopé (1,5 ml/kg). Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (Bruneton, 1999). L'utilisation des huiles essentielles extraites du citron, soit par hydrodistillation soit par expression à froid, ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (Robert et Lobstein, 2005).

L'application des huiles essentielles est depuis longtemps répandue en cuisine et en parfumerie où l'exploitation de leurs propriétés odorantes était plus qu'évidente (Penuelas *et al.*, 2014) . Aujourd'hui, les domaines d'application des huiles essentielles sont plus larges et

vont de l'agroalimentaire à la pharmacie en passant par la phythothérapie, l'aromathérapie et les bio-pesticides. Les huiles essentielles ont des propriétés antioxydantes et conservatrices dans les aliments (Tiwari *et al.*, 2009) ou même lorsqu'elles sont incorporées dans le matériel d'emballage alimentaire (Kuorwel *et al.*, 2011). Récemment, une approche prometteuse est rapportée dans le cadre de produits médicinales, contenant des huiles essentielles ou leurs composants, à usage humain ou vétérinaire (Buchbauer *et al.*, 2016). Les huiles essentielles représentent une alternative "verte" dans les domaines : nutritionnel, pharmaceutique et agricole en raison de leurs nombreuses propriétés intéressantes. Les composés volatils qu'elles contiennent ont été largement étudiés dans le domaine de la santé et de l'assainissement de l'air intérieur en raison de leurs propriétés bactéricides, bactériostatiques, virucides, fongicides et acaricides (Penuelas *et al.*, 2014). Certaines huiles essentielles ont également des propriétés nématocides et insecticides, ou même des activités stimulants le système nerveux (Morelli *et al.*, 2015). Dans le domaine de la parfumerie et des cosmétiques, les mono et les sesquiterpènes sont des composés volatils très utilisés en raison de leur odeurs agréables et leurs activités biologiques (Soualeh et Soulimani, 2016). A titre d'exemple le β -caryophyllène, qui est un sesquiterpène présent dans les huiles essentielles de clous de girofle, de cannelle ou encore de copayer, joue à la fois un rôle de remède naturel (anti-inflammatoire puissant et cicatrisant pour la peau) et comme note boisée et épicée en parfumerie (Sköld *et al.*, 2006). Hellal (2011) a démontré que l'application des huiles essentielles de *Citrus aurantium* a réduit de manière significative l'oxydation des lipides de la sardine. Des études de Caillet et Lacroix (2007) ont montré que l'incorporation des huiles essentielles ou l'application par vaporisation en surface des aliments, contribue à les préserver des phénomènes d'oxydation. Parmi ces huiles, les huiles essentielles des *Citrus*. Elles sont caractérisées par une teneur élevée en monoterpènes responsables de l'activité antioxydante (Girenavar *et al.*, 2007; Ao *et al.*, 2008 ; Buchbauer, 2010). Dans le domaine agroalimentaire, les huiles essentielles du citron sert à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (Iserin *et al.*, 1996, Robert et Lobstein, 2005).

1.6. Contraintes d'utilisation

La composition chimique des huiles essentielles n'est pas stable, plusieurs facteurs peuvent l'influencer. En dehors des conditions agro-climatiques (sol, ensoleillement, etc.), le stade de croissance de la plante et les conditions de stockage post-récolte qui par nature influencent la composition chimique d'une huile, d'autres facteurs liés à la manipulation ou au stockage

vont également entraîner la modification des composés contenus dans les huiles essentielles et donc leur dégradation (Figueiredo *et al.* 2008; Schmidt 2010). Ces processus de dégradation dépendent de plusieurs facteurs externes tels que la température, la lumière, la disponibilité en oxygène. En effet, ces facteurs sont considérés comme accélérateurs des processus d'auto-oxydation (Chloe et Min, 2006). Cependant, l'utilisation industrielle doit faire face à de nombreux problèmes à cause de leur variabilité de leur composition et leur instabilité au stockage. Une autre limite à l'utilisation des huiles essentielles est leur caractère volatil (Li *et al.*, 2014).

Certaines techniques permettent de réduire l'effet de ces problèmes qui conditionnent l'utilisation industrielle des huiles essentielles. L'encapsulation est l'une des techniques couramment utilisées (Kerdudo *et al.*, 2014).

1.7. Encapsulation

1.7.1. Concept d'encapsulation

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

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

protéger (contre la lumière, l'oxygène et la température) ainsi que de moduler leur libération en prolongeant leur profil cinétique. Aussi, dans une optique de réduction des coûts pour l'industriel, l'encapsulation d'actifs coûteux, comme les huiles essentielles, permet de diminuer les concentrations introduites sans affecter l'efficacité du produit fini (Choi *et al.*, 2009; Garg *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2011; Sajomsang *et al.*, 2012). L'encapsulation de l'eugénol (chénotype des huiles essentielles du clou du girofle) a montré une amélioration de sa solubilisation et une protection contre son oxydation et sa dégradation. Un profil de libération de celui-ci contrôlé et une amélioration de ses activités biologiques, notamment antibactérienne, acaricide et antifongique ont été également démontré (Sebaaly et Greige-gerges, 2016). Récemment, des études ont été menées sur l'utilisation d'un mélange de silice poreuse et de composés organo-métalliques auxquels ont été associés des molécules présentes dans différentes huiles essentielles pour traiter les eaux. Le geraniol a ainsi été encapsulé par la silice afin de parfumer les eaux et jouer un rôle insectifuge (Pasetta *et al.*, 2016).

1.7.2. Encapsulation dans le domaine alimentaire

L'encapsulation dans le domaine alimentaire est notamment utilisée afin d'enrichir des aliments en arômes, vitamines, minéraux, probiotiques, acides gras et antioxydants (Champagne et Fustier, 2007). Par exemple, les bactéries probiotiques sont encapsulées afin d'améliorer leur viabilité au cours des procédés de fabrication des produits alimentaires et aussi pour permettre une libération ciblée au niveau du tractus gastro-intestinal (Anal et Singh 2007, Annan *et al.* 2008). Les caroténoïdes (lutéine et lycopène) sont, quant à eux, encapsulés afin d'améliorer leur stabilité vis-à-vis de la lumière, de l'humidité et de la température (Qv *et al.*, 2011, Rocha *et al.* 2012), tandis que les huiles riches en acides gras polyinsaturés (Omégas 3), telles que les huiles de microalgue et les huiles de thon sont encapsulées afin d'augmenter la stabilité des acides gras vis-à-vis de l'oxydation (Zhang *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014). Le tableau 1 représente quelques exemples de composés encapsulés dans le domaine alimentaire ainsi que les finalités d'encapsulation.

Tableau 1. Quelques exemples de composés encapsulés dans le domaine alimentaire.

Composés encapsulés	Intérêts de l'encapsulation	Références
Acides gras – Oméga 3 <i>Acide eicosapentaénoïque,</i> <i>Huile de thon,</i> <i>Huile de poisson,</i> <i>Huile de microalgue</i>	- Masquer le goût - Améliorer la dispersion en milieu aqueux - Retarder et minimiser les dégradations oxydatives - Permettre une libération contrôlée	Lamprecht <i>et al.</i> 2001 Klinkesorn <i>et al.</i> , 2006 Anwar et Kunz 2011 Zhang <i>et al.</i> 2012 Wang <i>et al.</i> 2014
Antimicrobiens <i>Huile d'arbre à thé,</i> <i>Allyl isothiocyanate,</i> <i>Huile d'ail</i>	- Permettre une libération prolongée - Diminuer l'évaporation - Réduire l'oxydation - Masquer l'odeur	Zhang <i>et al.</i> , 2011 Siow et Ong, 2013 Pérez-Limiñana <i>et al.</i> , 2014
Antioxydants <i>Huile d'ail,</i> <i>Polyphénols de thym</i>	- Permettre une libération prolongée - Diminuer l'évaporation - Réduire l'oxydation - Masquer l'odeur	Siow et Ong, 2013 Comunian <i>et al.</i> , 2013 Trifkovic <i>et al.</i> , 2014
Arômes	-Transformer un liquide en solide - Protéger de l'oxydation et de l'évaporation - Permettre une libération contrôlée - Résister à la congélation	Weinbreck <i>et al.</i> , 2004 Yeo <i>et al.</i> , 2005 Leclercq <i>et al.</i> , 2009
Caroténoïdes	-Améliorer la stabilité envers l'oxygène, la lumière et la température - Permettre une dispersion en milieu aqueux	Qv <i>et al.</i> , 2011 Rocha <i>et al.</i> , 2012
Probiotiques	-Améliorer la viabilité au cours des procédés de fabrication des produits alimentaires -Améliorer la survie dans le tractus gastro-intestinal	Anal et Singh, 2007 Annan <i>et al.</i> , 2008

1.7.3. Techniques et efficacité d'encapsulation

Il n'existe pas de système universel d'encapsulation pour une substance active donnée. En effet, lorsque l'actif à protéger est un complexe de molécules, tels que les extraits naturels, les contraintes et les difficultés de développement sont importantes. Les différences entre les composés (hydrophilie/hydrophobicité, différences de masses moléculaires, fonctions chimiques diverses, etc.) vont conduire à des différences d'interaction avec le ou les matériaux de recouvrement, entraînant par exemple des rendements d'encapsulation variables (Kerdudo *et al.*, 2015).

De nombreuses méthodes d'encapsulation ont été développées afin de s'adapter à divers types de substances actives et matériaux enrobants. Ces différentes méthodes permettent d'obtenir des particules aux caractéristiques variées (taille, épaisseur de la paroi, perméabilité) permettant de moduler la libération de la substance active (Martins *et al.*, 2014).

Le séchage par pulvérisation est la technique la plus fréquemment utilisée pour encapsuler les arômes. C'est une méthode physico-mécanique développée dans les années 1930 (Desai et Park, 2005). Le séchage par pulvérisation peut être décrit comme un procédé simple, similaire à une opération de séchage, capable de produire une large gamme de capsules avec un bon rendement (Thies, 2000). De plus, le procédé est adaptable à une large gamme de spécifications de charges et de produits, c'est-à-dire qu'il peut être utilisé avec des solutions et des suspensions (Andrews, 2011). Au moyen d'un séchage par pulvérisation, des principes actifs ayant des propriétés de solubilité bien distinctes peuvent être encapsulés à l'aide de divers matériaux (Finch et Bodmeier, 2000). Néanmoins, le séchage par pulvérisation présente également certains inconvénients : l'équipement est très volumineux et coûteux (Andrews, 2011). L'encapsulation sol-gel est une alternative d'encapsulation des arômes avec des polymères organiques (Pagliaro, 2009). Cette technologie a été introduite au cours de la dernière décennie et permet un contrôle efficace de la libération des biomolécules, des médicaments et des huiles essentielles (Ciriminna et Pagliaro, 2013). Compte tenu des limites de certains procédés et des caractéristiques physico-chimiques des huiles essentielles, la coacervation pourrait constituer une technique intéressante pour leur encapsulation (Nguyen-Ngoc et Tran-Minh, 2007).

Les techniques de coacervation peuvent être divisées en deux groupes principaux: aqueux et organique. La coacervation en phase aqueuse ne peut être utilisée que pour encapsuler des matériaux insolubles dans l'eau (matériaux de noyau hydrophobes présentés à l'état solide ou liquide). La coacervation en phase organique permet l'encapsulation de matière hydrosoluble, mais nécessite l'utilisation de solvants organiques. Le schéma général du processus de coacervation consiste en trois étapes qui se produisent sous agitation continue (Figure 3). La première étape consiste en la formation d'une émulsion huile dans l'eau (dispersion de l'huile dans une solution aqueuse contenant un hydrocolloïde tensioactif), la seconde comprend la formation du revêtement (dépôt du revêtement polymère sur le matériau du noyau), et la dernière est la stabilisation du revêtement (durcissement du revêtement, en utilisant des techniques thermiques, de réticulation ou de désolvatation, pour former des microcapsules autosuffisantes) (Soest, 2007 ; Friedmann *et al.*, 2009). La formation de la coquille de coacervat est entraînée par la différence de tension de surface entre la phase de coacervat, l'eau et le matériau hydrophobe.

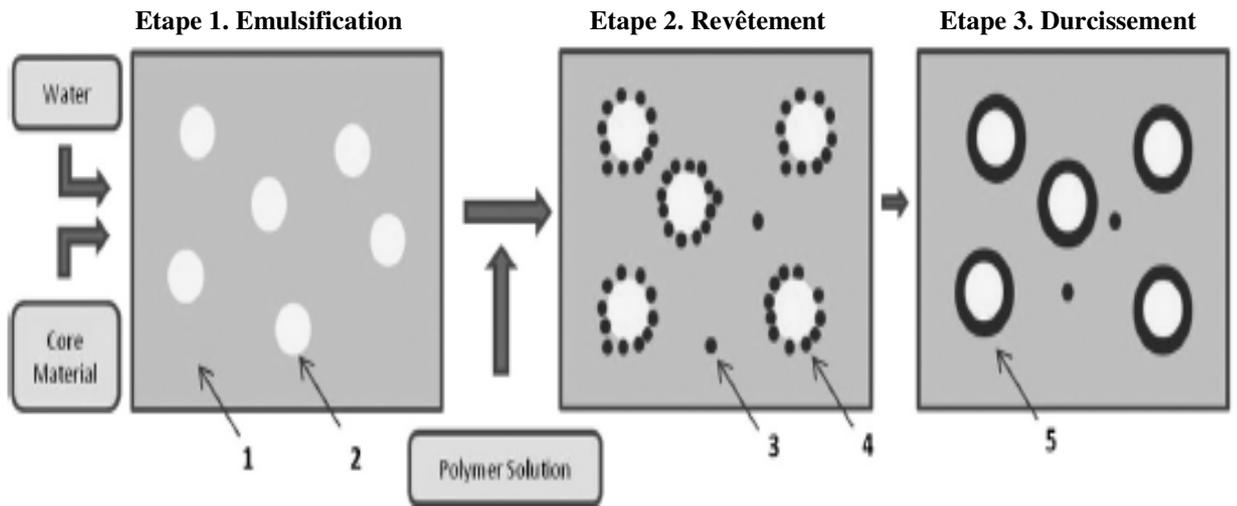


Figure 3. Etapes de l'encapsulation par coacervation

(1) eau, (2) matériau de base, (3) polymère, (4) dépôt de polymère de revêtement, (5) capsule
(Martins *et al.*, 2009)

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

1.7.4. Mécanismes de libération contrôlée

Le but principal de l'encapsulation est de piéger un matériau de noyau dans une matrice / enveloppe protectrice qui conférera des propriétés uniques en termes de libération contrôlée, de solubilité ou de résistance à l'humidité des capsules. La protection des huiles essentielles, des parfums, des déodorants, des agents hydratants et d'autres agents actifs dans des supports polymères en vue d'une libération contrôlée pendant une certaine période a fait l'objet de recherches considérables ces dernières années (Costa *et al.*, 2008, Gumi *et al.*, 2009). La

figure 4 montre la représentation schématique de la libération des huiles essentielles à travers l'enveloppe de capsule polymère. Les propriétés particulières du réseau polymère, telles que longueur de chaîne, flexibilité et mobilité, comportement d'absorption d'eau et de gonflement, étendue de plastification ou interactions potentielles entre le polymère et l'agent actif affecteront la vitesse de diffusion à travers la matrice polymérique et, par conséquent, la libération des huiles (Wischke et Schwendeman, 2008). D'après Del Valle *et al.* (2009), la diffusion des agents actifs se produit quand les huiles traversent le polymère qui forme le dispositif à libération contrôlée. Néanmoins, la libération de l'agent actif est en fonction d'autres mécanismes, tels que l'érosion (le produit se dissout progressivement dans la membrane), la diffusion (l'huile diffuse hors du système de distribution), l'extraction (forces mécaniques) et éclatement (un système de réservoir se rompt sous l'influence des forces mécaniques ou osmotiques) (Ubbink et Schoonman, 2001). Plusieurs modèles de diffusion ont été proposés dans la littérature pour décrire la libération d'un agent actif à partir des capsules. L'agent encapsulé peut être libéré par plusieurs mécanismes, par exemple, l'action mécanique, la chaleur, la diffusion, le pH, la biodégradation et la dissolution. Le choix de la technique et du matériau de l'enveloppe dépend de l'application finale du produit, compte tenu de la stabilité physique et chimique, de la concentration, de la taille des particules requises, du mécanisme de libération et des coûts de fabrication (Borgquist *et al.*, 2004 ; Marucci *et al.*, 2008 ; Gumi *et al.*, 2009).

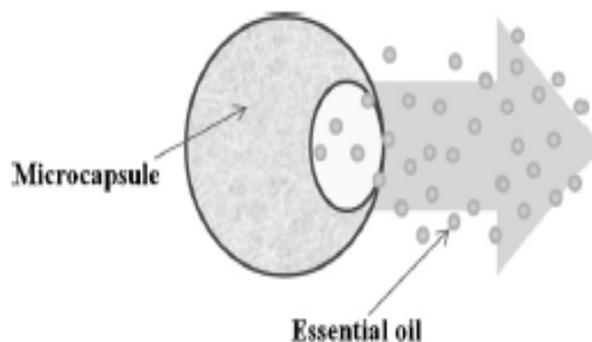


Figure 4. Représentation schématique de la libération d'huile essentielle à travers l'enveloppe de capsule polymère (Wischke et Schwendeman, 2008).

2. Généralités et synthèse de travaux sur la margarine

2.1. Généralités sur la margarine

L'histoire de la margarine remonte à 1869 après que l'empereur Napoléon III lance un concours pour inventer une nouvelle matière grasse moins chère que le beurre, destinée aux pauvres et aux armés. Des tentatives avaient été entreprises durant des années pour créer un substitut du beurre, mais un chimiste français a gagné le prix. Hippolyte Megè-Mouriès a obtenu le nombre de brevet français 86480 pour son développement, qu'il a appelé « oléomargarine » (O'Brien, 2009). La margarine, fabriquée au début à partir de graisse de bœuf est considérée comme un substitut bon marché du beurre (Chrysam, 1985). Dans les années 1950, l'industrie de la margarine modernise l'image du produit, fabriqué entre-temps à base d'huiles végétales (Chrysam, 1996), en s'appuyant sur les nouvelles préoccupations des consommateurs : la santé et la minceur (Roger, 1974). Avec l'appui des laboratoires pharmaceutiques, les partisans ont préféré favoriser des acides gras insaturés (Laia *et al.*, 2000), et réduire le cholestérol dans les aliments afin de réduire le nombre d'infarctus (Baljit *et al.*, 2002).

La margarine est une émulsion de type eau dans l'huile. Elle comprend deux phases essentielles : une phase continue (la phase grasse), et une phase dispersée (la phase aqueuse). Elle contient aussi des additifs (lécithine, monoglycérides, sel, colorant, antioxydants, conservateurs et vitamines) répartis, en partie, dans la phase grasse et en partie dans la phase aqueuse. La définition complète de la margarine est donc celle d'un système polydispersé de corps gras à l'état solide et à l'état liquide, d'eau et/ou lait, d'ingrédients et quelque fois de bulles de gaz (Karleskind, 1992). Pour Cossut *et al.* (2002), la dénomination "margarine" est réservée aux produits obtenus par mélange de matière grasse et d'eau ou de lait ou de dérivés de lait, se présentant sous la forme d'une émulsion renfermant au moins 82% de matière grasse.

Selon Vierling (1999), la composition globale générale de la margarine est représentée par 80 à 82% d'huiles (phase grasse), 16% à 18% d'eau et/ou du lait (phase aqueuse) et 2% d'additifs obligatoires (antioxydants, sel, etc.) ou facultatifs (amidon, sucre, etc.).

2.2. Types de margarines

Les margarines ont des teneurs en lipides différentes, et c'est la proportion de ces derniers qui va différencier une margarine d'une autre. Soit 82 à 84 % dans les margarines traditionnelles

d'aspect proche du beurre et 60 % seulement dans les margarines dites "allégées". Elles varient aussi en fonction de leur utilisation (O'Brien, 2009). Les margarines de tables sont destinées aux emplois ménagers et culinaires, dont la margarine de table tartinable. Celle-ci a un apport élevé en acides gras polyinsaturés (AGPI) avec une teneur de 20 à 30%, 25 à 40% d'acides gras monoinsaturés (AGMI) et 10 à 30% d'acides gras saturés (AGS). Le rapport AGI/AGS est de 0,3 à 0,7. La margarine de table végétale contient 6 à 12% d'AGPI, 20 à 55% d'AGMI et 35 à 75% d'AGS. Le rapport AGI/AGS est de 0,1 à 0,3. Quant à la margarine de table courante, elle est assez voisine des précédentes, mais s'en différencie par le fait qu'elle peut contenir une certaine proportion d'huiles et de graisses d'origine animale ou marine. La margarine douce battue est un autre type de margarine contenant jusqu'à 50% d'air injecté (Cossut *et al.*, 2002).

2.3. Différentes étapes de fabrication

La fabrication de tous les types de la margarine passe par les mêmes étapes (Figure 5). En premier lieu, il s'agit du dosage des deux phases grasse et aqueuse ainsi que leurs ingrédients. En second lieu, l'émulsion est préparée par le mélange des deux phases dans le bac de l'émulsion. Cette étape est suivie par le refroidissement, la cristallisation et enfin le malaxage de l'émulsion de manière à lui conférer les caractéristiques rhéologiques espérées et la stabilité désirée. L'émulsion ainsi préparée est conditionnée et emballée dans des emballages qui diffèrent selon le type de la margarine. Le stockage se fait à 4°C (Karleskind, 1992).

2.4. Facteurs de détérioration

L'altération physique de la margarine est due à la modification de sa consistance. Elle est due à son tour au phénomène de recristallisation. La formation de ces cristaux entraîne la réduction de la phase liquide par rapport à la phase solide et conduit en général à la perte de la texture, la flaveur et l'apparence recherchée (McClement *et al.*, 2000 ; Genot *et al.*, 2003).

La margarine, étant formée d'un pourcentage élevé de matières grasses. Elle est sensiblement exposée à l'oxydation qui est à l'origine de l'odeur de rance. Cette oxydation est liée aux degrés d'insaturation des acides gras contenant dans les huiles qui la constituent. Aussi la présence d'oxygène, de lumière et de température élevée peut affecter la qualité de la margarine (Vierling, 1999).

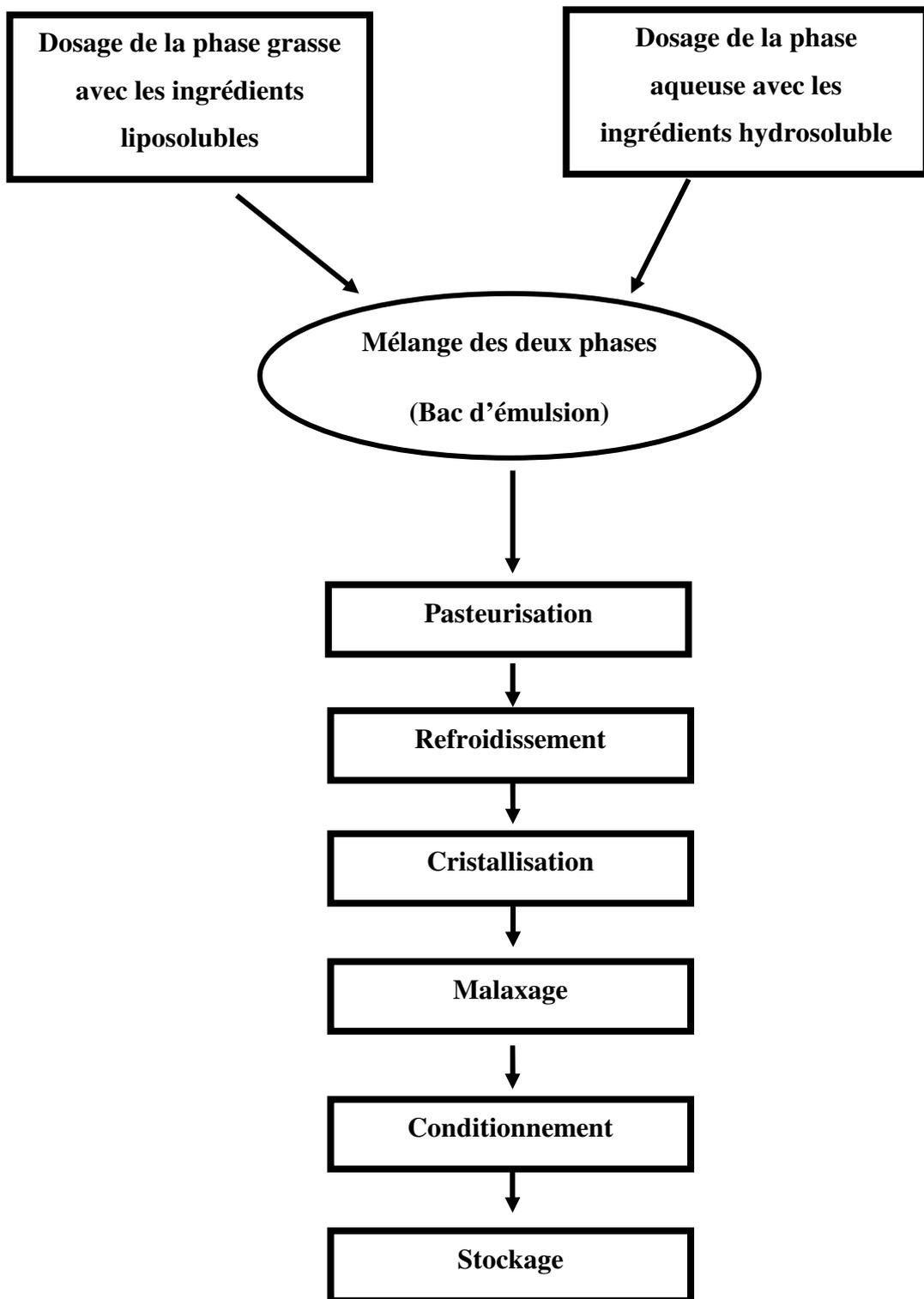


Figure 5. Principales étapes de fabrication de la margarine (Karleskind, 1992)

2.5. Quelques travaux sur l'incorporation des extraits de végétaux à la margarine

L'impact nutritionnel des margarines à toujours fait l'objet de plusieurs études, vu qu'elles constituent des sources énergétiques principales en alimentation humaine et aussi parce qu'elles sont d'excellentes sources de vitamines, d'acides gras essentiels et autres constituants mineurs bénéfiques pour la santé (Narce et Poisson, 2003).

Selon la bibliographie consultée, tous les extraits incorporés dans la margarine étaient sous forme libre et non encapsulée.

Dans le but de la valorisation des huiles essentielles de *Citrus limon*, extraites par pression à froid et par hydrodistillation, Himed et Barkat (2014) ont substitué le Tocoblend (antioxydant de synthèse) utilisé dans la formulation de la margarine de table par ces huiles à l'état libre. Les principaux résultats obtenus montrent que les margarines aux huiles essentielles de *Citrus limon* étaient plus résistantes que celle au Tocoblend et que la margarine élaborée avec les huiles essentielles extraites par pression à froid était la plus résistante vis-à-vis de l'oxydation forcée. De même, les margarines aux huiles essentielles obtenues étaient considérées comme étant homogènes, de couleur, de saveur et d'odeur acceptables et appréciées.

De même, dans le but de valoriser des sous produits issus de l'industrie de conserve de tomate et d'élaborer un produit alimentaire bio, Zidani (2009) a procédé à la formulation de la margarine de table enrichie en pelures de tomate sous leur forme libre en substitution aux additifs synthétiques (β -carotène et α -tocophérol) utilisés. La margarine de table obtenue a présenté une couleur acceptable, avec un aspect brillant et homogène, sa texture l'orienté vers les margarines faciles à tartiner. La margarine enrichie en lycopène, s'est avérée plus résistante à l'oxydation, que la margarine témoin.

Dans la même optique, Djouab (2007) a testé l'essai de la formulation d'une margarine *bio* allégée additionnée de l'extrait hydroalcolique non encapsulé de la datte. Les analyses de cet extrait ont révélé une teneur en polyphénol importante, par conséquent une activité antioxydante élevée. Le suivi de la stabilité oxydative par le test Swift s'est révélé non adapté pour la margarine à l'extrait de dattes.

Partie 2.

Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal

Le présent travail est focalisé sur la partie écorce (zeste) du *Citrus limon*, connue par sa richesse en huiles essentielles par rapport aux autres parties du fruit (Robert et Lobstein, 2005).

1.1. Choix et principales caractéristiques des variétés sélectionnées

Deux variétés de citron ont été choisies selon leur abondance en Algérie.

- *Euréka* est une variété caractérisée par un fruit de forme ovale avec un mamelon plus ou moins étendu, de couleur jaune verdâtre. L'écorce est molle, moyennement fine de $1,45 \pm 0,15$ mm d'épaisseur. Le poids moyen d'un fruit est de $202,33 \pm 0,52$ g et celui du zeste est de $30,67 \pm 0,51$ g.

- *Lisbon* est une variété caractérisée par un fruit de forme ovale avec un mamelon restreint, de couleur jaune verdâtre, son écorce est molle, moyennement fine de $1,12 \pm 0,07$ mm d'épaisseur. Le poids moyen d'un fruit est de $178,92 \pm 0,11$ g et celui du zeste est de $20,49 \pm 0,28$ g.

1.2. Origine des variétés

Les fruits du citron ont été récoltés le mois d'avril 2013 dans la région *Takaryet* de la ville de Sidi-Aich wilaya de Béjaïa (Figure 6). Les deux variétés ont été identifiées par le propriétaire de verger des agrumes.



Figure 6. Site de collecte des variétés de citron, région de Sidi-Aich

Le citron, ainsi utilisé pour l'extraction des huiles essentielles a été collecté fraîchement, puis il a subi un lavage, une élimination des taches et un essuyage.

La méthodologie du présent travail est subdivisée en trois principales parties (Figure 7) :

- La première partie est consacrée à l'extraction et la caractérisation des huiles essentielles du citron ainsi que l'évaluation de leurs activités biologiques. Cette partie a été effectuée au niveau du laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL) et des laboratoires pédagogiques de l'institut de Nutrition, d'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA) de l'Université Frères Mentouri Constantine1 (UFMC1) et au niveau du laboratoire de chimie organique de l'université d'Aveiro, Portugal ;

-La deuxième partie a concerné l'encapsulation des huiles essentielles, ayant une meilleure activité antioxydante par rapport aux autres huiles testées dans ce travail. Cette partie a été réalisée au niveau des laboratoires de chimie et technologie de l'INA (Institut de Nanoscience d'Aragon), université Zaragoza -Espagne;

-La troisième partie a porté sur l'application des huiles essentielles libres et encapsulées à la margarine allégée. Cette partie a été effectuée au niveau de la margarinerie *Cévital SPA-Béjaia*.

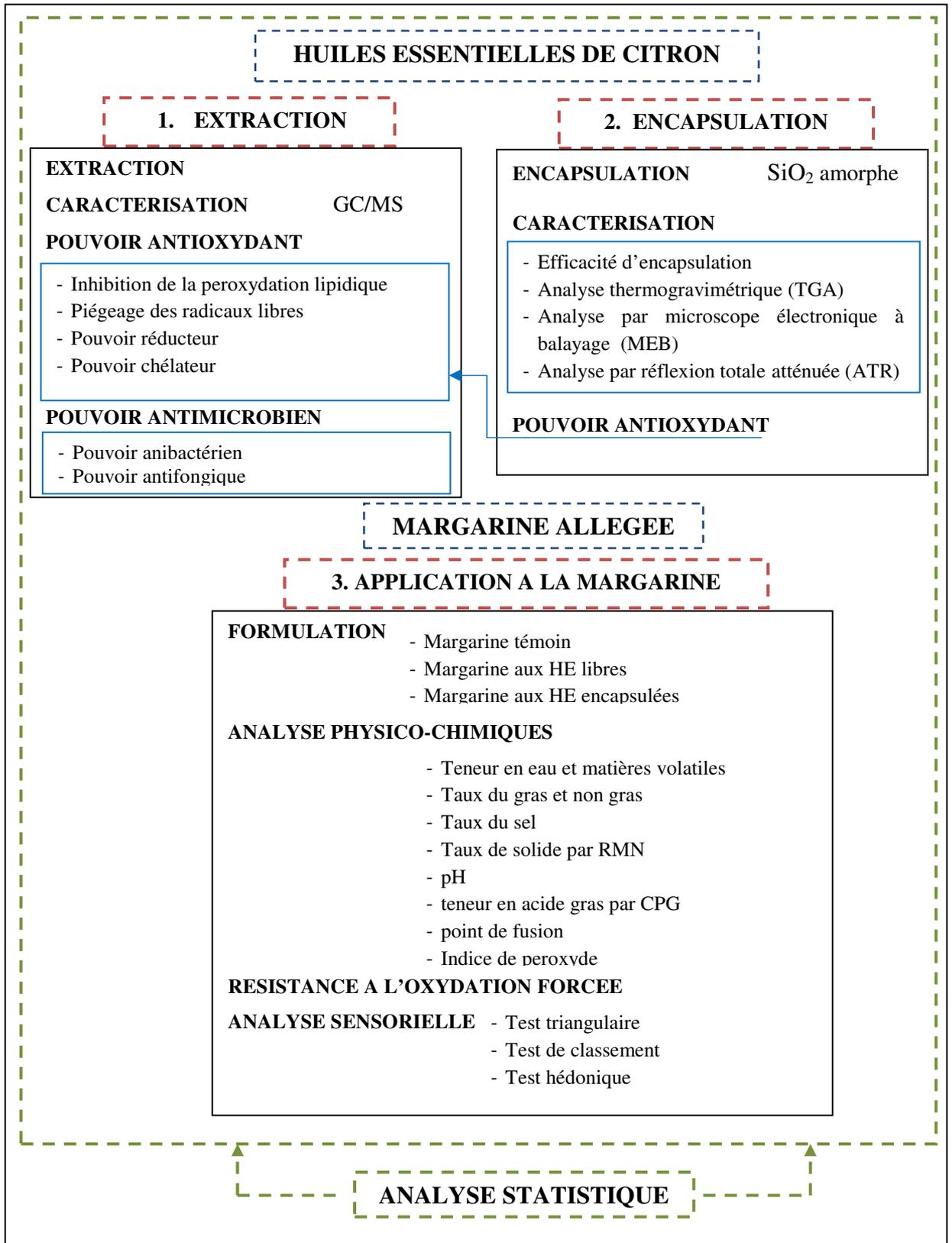


Figure 7. Récapitulation des principales analyses effectuées dans les volets étudiés

2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles

2.1. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles à partir du zeste frais de citron des variétés *Euréka* et *Lisbon* a été effectuée par deux procédés conventionnels : pression à froid et hydrodistillation. Selon Peyron (1992), les huiles essentielles des *Citrus* sont extraites par hydrodistillation pour leur volatilité et par pression à froid pour la forme et la taille des poches sécrétrices. Ces deux procédés sont classés parmi les principales opérations industrielles d'extraction.

2.1.1. Extraction par pression à froid

Les huiles essentielles ont été collectées à partir de 10 kg de chaque variété en utilisant une râpe sous un filet d'eau. Les écorces du citron lacérées vont inciter les huiles à sortir vers l'extérieur. La séparation des huiles essentielles de l'eau se fait par décantation; elles sont déshydratées ensuite par le sulfate de sodium anhydre et conservées à l'abri de la lumière à une température de 4°C jusqu'à ce qu'elles soient analysées.

Les huiles essentielles extraites par pression à froid de la variété *Euréka* sont codées HEP alors que celles de la variété *Lisbon* sont codées HLP.

2.1.2. Extraction par hydrodistillation

Une quantité de 100g du zeste frais du citron de chaque variété est introduite dans un ballon de 2 litres, et imprégnée d'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 2 h et 20min (d'après des essais préliminaires, c'est le temps nécessaire pour avoir un rendement maximal). Les vapeurs, entraînant avec elles des huiles essentielles, se condensent en traversant le réfrigérant et chutent dans une ampoule à décanter où s'effectue la séparation des deux phases non miscibles : phase aqueuse et phase organique. Cette dernière constitue les huiles essentielles qui sont déshydratées avec du sulfate de sodium anhydre et conservées à l'abri de la lumière à une température de 4°C jusqu'à ce qu'elles soient analysées.

Les huiles essentielles extraites par hydrodistillation de la variété *Euréka* sont codées HEH, alors que celles de la variété *Lisbon* sont codées HLH

2.2. Détermination du rendement en huiles essentielles

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

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

Où R% est le rendement des huiles essentielles en pourcentage ; M' est la masse des huiles essentielles obtenues en g ; M est la masse de zeste du citron en g.

2.3. Caractérisation et identification des huiles essentielles par GC/MS

Les huiles essentielles récupérées ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (appareil Hewlett Packard 5973A). Une colonne apolaire DB-5 a été utilisée.

2.3.1. Conditions de la caractérisation par GC/MS

Les conditions de l'analyse des huiles essentielles extraites par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sont résumées dans le Tableau 2.

La préparation de la table des n-alcanes pour la mesure des indices de Kovats des composés identifiés dans les huiles essentielles a été faite comme suite : solution des n-alcanes de C₈ à C₂₆ (origine: Aldrich et Fluka Chemicals) à 5% dans le pentane. Soit 0,1 g de chaque alcane dans 20 ml de pentane, conservé au réfrigérateur.

2.3.2. Identification des constituants

L'identification des constituants a été effectuée par comparaison des indices de rétention (indices de Kovats) et des spectres de masse (ions-fragments) obtenus expérimentalement par rapport à ceux cités dans la littérature (Adams, 1995) et/ou inventoriés dans les banques de bibliothèques spectrales (Wiley7 et Nist 2002).

Tableau 2. Conditions opératoires des analyses en CG/SM.

Paramètres	
Mode de détection : Impact électronique	
Courant d'ionisation	70 eV
Colonne capillaire	DB-5
Longueur	30m
Diamètre interne	0,25mm
Epaisseur de phase	0,25µm
Gaz vecteur	Hélium
Débit	3ml/min
Pression (source, analyseur)	10 ⁻⁷ mbar
Température d'interface	280°C
Température de l'injecteur	250°C
Programme du four	8 min à 60°C
	2°C/min de 60°C à 280°C
	15 min à 280°C
Concentration des échantillons	Pur
Quantité injectée	0,2µl
Mode d'injection	Split 1:20

2.4. Détermination du pouvoir antioxydant des huiles essentielles

Les méthodes, visant à évaluer le pouvoir antioxydant, sont : le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique évalué par le test de blanchissement du β -carotène et le test qualitatif au β -carotène. Le pouvoir de piégeage des radicaux libres est réalisé par le test de DPPH (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) et le test ABTS⁺ (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazole-6-sulphonate). Le pouvoir réducteur est réalisé par le test CUPRAC (Cupric ion-Reducing Antioxidant Capacity), le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) et le pouvoir chélateur du fer. Vu la complexité de l'action des antioxydants *in vivo*, il est préférable d'appliquer différentes méthodes *in vitro* pour estimer de manière efficace la capacité antioxydante (López-Alarcón et Denicola, 2013).

2.4.1. Inhibition de la peroxydation lipidique

L'inhibition de la peroxydation lipidique permet de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des huiles essentielles extraites par deux tests : test de blanchissement du β -carotène et test qualitatif au β -carotène. En effet, l'acide linoléique oxydé en radical peroxyde agit sur le β -carotène de couleur orange qui devient incolore. La présence d'antioxydant inhibe cette décoloration (Miller, 1971).

2.4.1.1. Blanchissement du β -carotène

Selon Barros *et al.* (2008), 2 mg de β -carotène sont dissouts dans 10 ml de chloroforme. 2ml de cette solution sont introduits dans un ballon contenant 40mg d'acide linoléique et 400mg de tween 20. Après évaporation du chloroforme par le rotavapeur à 40 °C pendant 5 min, 100ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés avec agitation. 4,8ml de cette nouvelle solution sont mélangés dans des tubes à essai avec 0,2ml des échantillons d'huiles essentielles pour différentes concentrations. Dans le contrôle positif, les huiles essentielles sont remplacées par l' α -tocophérol. Les tubes sont placés dans un bain marie à 50°C et l'oxydation de l'émulsion du β -carotène est suivie par spectrophotomètre à 470 nm.

L'activité antioxydante, exprimée en pourcentage, est calculée par la formule suivante :

$$AA (\%) = (A_{Et} / A_{E0}) \times 100$$

AA (%) : Activité antioxydante ; A_{Et} : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence des huiles essentielles ou de l' α -tocophérol mesurée à t=2h ; A_{E0} : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence des huiles essentielles ou de l' α -tocophérol mesurée à t=0 ;

Les EC_{50} sont déterminées graphiquement par la droite de régression linéaire dont l'abscisse représente la concentration des échantillons testés et l'ordonnée représente l'activité antioxydante en pourcentage (Prakash *et al.*, 2007).

2.4.1.2. Test qualitatif au β -carotène

Le test consiste en la préparation d'un milieu gélosé en dissolvant 75 % (masse/volume) d'agar dans l'eau distillée. Le mélange est chauffé, avec agitation, sur une plaque chauffante et est laissé refroidir jusqu'à environ 50°C. 7,5 ml de la solution de β -carotène (1 mg/ml) sont mélangés à 1,5ml de solution éthanolique d'acide linoléique (5 μ l/ml d'éthanol) puis coulés dans des boîtes pétri. Après solidification, creuser des puits et y verser 30 μ l de chaque échantillon des huiles essentielles puis incubé 3 à 4h à 45°C. Dans des boîtes témoins, les

échantillons sont remplacés par la quercétine comme témoin positif et par l'éthanol comme témoin négatif. Une zone de rétention de la couleur orange autour des puits indique l'activité antioxydante des échantillons testés (Belhattab, 2007).

2.4.2. Piégeage des radicaux libres

La capacité des huiles essentielles à capter les radicaux libres a été mesurée par le test de réduction de DPPH et par le test de réduction du radical- cation ABTS.

2.4.2.1. Test DPPH

La réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517 nm provoquée par les antioxydants (Molyneux, 2004).

La solution de DPPH est préparée selon le protocole décrit par Mansouri et *al.* (2005). Il consiste à solubiliser 2,4 mg de DPPH dans 100 ml du méthanol, 25 µl de chacune des solutions méthanoliques des huiles essentielles testées ou d'antioxydant de référence (α -tocopherol) sont ajoutés à 975 µl de la solution méthanolique de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif, contenant uniquement la solution de DPPH, est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante (Sanchez-Moreno, 2002) :

$$AA \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Où AA % : activité antiradicalaire exprimée en pourcentage ; A_C : valeur de l'absorbance du contrôle négatif à 517nm ; A_E : valeur de l'absorbance de l'échantillon à 517nm.

Les EC_{50} sont déterminées graphiquement par la droite de régression linéaire.

2.4.2.2. Test ABTS⁺

Une solution d'ABTS⁺ est préparée en mélangeant 10 ml d'une solution méthanolique ABTS⁺ à 14 mM, et 10 ml d'une solution méthanolique de persulfate d'ammonium à 4,9 mM. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 16 h à température ambiante. Une dilution de la solution d'ABTS⁺ est obtenue en ajoutant du méthanol à la solution d'ABTS⁺ précédemment préparée jusqu'à l'obtention d'une absorbance d'environ 1 à 734 nm. Une solution de Trolox à 98 % de pureté est préparée dans le méthanol (5 mM).

Le test est basé sur le protocole de Re *et al.* (1999), où 30 µl de l'échantillon à différentes concentrations (ou du méthanol) sont introduits dans des tubes à essai contenant 2970 µl de solution d'ABTS⁺. Les tubes sont maintenus une heure à l'obscurité et l'absorbance est mesurée à 734 nm. L'activité antioxydante est estimée en pourcentage d'inhibition ou pourcentage d'activité antioxydante, selon la formule suivante :

$$AA\% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Où : AA % : activité antiradicalaire exprimée en pourcentage ; A_E est l'absorbance de l'échantillon à 734 nm ; A_C est l'absorbance du contrôle négatif à 734 nm

Les EC₅₀ sont déterminées graphiquement par la droite de régression linéaire.

2.4.3. Pouvoir réducteur

Ce paramètre met en évidence la capacité d'une molécule à réduire un oxydant en lui cédant un électron (Jayaprakasha *et al.*, 2001). Le pouvoir réducteur est déterminé par le test CUPRAC et le test FRAP.

2.4.3.1. Test CUPRAC

Le test consiste à suivre la diminution de l'absorbance du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu²⁺) [Nc₂ - Cu²⁺] réduit par la présence d'un agent antioxydant.

D'après Apak *et al.* (2004), un mélange de solution est préparé par addition de 1 ml de la solution CuCl₂ (10 mM), 1 ml de la solution neocuproïne Nc (7,5 mM) et 1 ml de la solution tampon NH₄ acétate (1 M, pH=7) dans un tube à essai où 0,5 ml de différentes concentrations des huiles essentielles (ou de Trolox comme contrôle positif) sont ajoutés. Le volume de ce mélange est élevé à 4,1 ml avec l'eau distillée. L'absorbance contre le blanc est lue à 450 nm après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité.

Le pouvoir réducteur représenté en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\text{Pouvoir réducteur (\%)} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C : est l'absorbance du contrôle négatif ; A_E : est l'absorbance de l'échantillon.

Les valeurs d'EC₅₀ sont déterminées graphiquement par la droite de régression linéaire.

2.4.3.2. Test FRAP

Le test FRAP est basé sur l'aptitude des échantillons à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}). Le mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons caractéristique de l'action antioxydante (Yildirim *et al.*, 2001).

Le protocole suivi est celui de Pulido *et al.* (2000) qui consiste d'abord à préparer une solution tampon acide acétique / acétate de sodium (300 mM, pH = 3,6), puis le réactif TPTZ (2,4,6-tri[2-pyridyl]-s-triazine) (10 mM), dilué dans la solution HCl (40 mM, préparée extemporanément). Le deuxième réactif FeCl_3 (20 mM) est également préparé extemporanément. Finalement, la solution de travail FRAP est réalisée en mélangeant 2,5 ml de solution TPTZ, 2,5 ml de solution FeCl_3 et 25 ml de solution tampon. Cette solution doit être impérativement mise dans un bain mari à 37 °C.

Le test consiste à mélanger dans des tubes à essai 100 μl des échantillons (ou du méthanol) avec 300 μl d'eau distillée et 3000 μl de solution de travail FRAP maintenue à 37 °C à l'obscurité pendant 30 minutes. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 595nm. Le contrôle positif est représenté par un standard d'un antioxydant : le sulfate ferreux dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le pourcentage de pouvoir réducteur du fer est calculé par la réaction suivante (Ghaisas *et al.*, 2008) :

$$\text{Pouvoir réducteur de fer (\%)} = [(A_C - A_E / A_C)] \times 100$$

A_C : est l'absorbance du contrôle ; A_E : est l'absorbance de l'échantillon.

Les valeurs d' EC_{50} sont déterminées graphiquement par la droite de régression linéaire.

2.4.4. Pouvoir chélateur du fer

La capacité chélatrice est déterminée selon la méthode de Le *et al.* (2006). La méthode est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} (Benbrinis, 2012).

Une prise de 100 μl de l'échantillon ou de chélateur standard EDTA (Acide Ethylène Diamine TetraAcétique) est ajoutée à 50 μl de chlorure de fer (FeCl_2 , 2mM). Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 min, 100 μl de ferrozine (5mM) sont ajoutés, suivis de 2,75 ml d'eau distillée. Le mélange est laissé au repos pendant 10 min à température ambiante

permettant ainsi la complexation du fer résiduel et la formation du complexe ferrozine- Fe^{+2} . Un contrôle négatif (sans échantillon) est préparé dans les mêmes conditions et l'absorbance du complexe ferrozine- Fe^{+2} est mesurée à 562 nm. L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage selon l'équation suivante :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C : Absorbance du contrôle négatif ; A_E : Absorbance de l'échantillon testé ou de l'EDTA.

Les EC_{50} sont déterminées par la droite de régression linéaire.

2.6. Détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Le pouvoir antimicrobien a été déterminé par deux méthodes : la méthode d'aromatogramme pour tester la sensibilité des souches et la méthode de dilution d'agar pour déterminer les valeurs des paramètres antimicrobiens dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF).

2.6.1. Choix et origine des souches

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites a été évaluée sur 16 souches de contamination alimentaire, fournies par le laboratoire de génie microbiologique et applications de l'université Constantine 1. Les souches bactériennes sont au nombre de 9 dont 2 souches sont Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Bacillus cereus*) et 7 souches sont Gram négatif (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marescens*, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Proteus mirabilis*). Les souches fongiques sont au nombre de 6 (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium culmorum*).

2.6. 2. Mise en culture des souches et préparation des disques

Une pré-culture des souches microbiennes a été préparée dans le but d'obtenir une phase de croissance exponentielle. Pour cela, ces souches ont été transférées dans des tubes contenant le bouillant nutritif pour les souches bactériennes avec une incubation à 37°C pendant 24 h et le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) pour les souches fongiques avec une incubation à 30°C pendant 3 à 7 jours.

A partir de ces tubes, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0,9% de sel (NaCl). La suspension a été bien homogénéisée avec le vortex pendant quelques secondes, et la densité optique lue à 625 nm a été justifiée à 0,08 à 0,10. Selon Atwal (2003), cette densité optique est équivalente à 10^8 UFC/ml. L'inoculum a été ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.

Pour les moisissures, les suspensions ont été préparées à partir d'une culture de 7 jours ayant atteint le stade de sporulation sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et ajustées à 10^6 spores/ml.

Les disques, qui vont servir à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (CMB) et la concentration minimale fongique (CMF), ont été fabriqués à partir du papier Wattman N°40, avec un diamètre de 6 mm ($0,28 \text{ cm}^2$ de surface). Ces disques ont été mis dans un tube à essai hermétiquement fermé, stérilisés à l'autoclave, puis stockés à une température ambiante.

2.6.3. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme)

Le principe de la méthode d'aromatogramme repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Elle nous permet de mettre en évidence l'effet antimicrobien des huiles essentielles sur les souches microbiennes ainsi que la résistance ou la sensibilité de ces souches vis-à-vis les échantillons testés. La méthode de diffusion des disques appliquée est celle décrite par Gachkar *et al.* (2007).

Les milieux de culture recommandés sont la gélose de Muller Hinton (MHA) pour les bactéries et la gélose Sabouraud Dextrose (SDA) pour les moisissures, où 20 ml de chaque milieu ont été coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, 100 μl de la suspension microbienne ont été étalés en surface. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les disques ont été déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi à raison de trois disques par boîte, puis les imbibés par 5 μl de l'échantillon à tester. Les boîtes ont été maintenues à 4 °C pendant 1 h pour que l'échantillon puisse diffuser, puis elles ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30 °C pendant 3 à 7 jours pour les moisissures (Rožman et Jeršek, 2009).

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse y compris le diamètre de disque de 6 mm. D'après Ponce *et al.* (2003), la sensibilité est classée par le diamètre des halos d'inhibition : non sensible (-) pour les diamètres moins de 8 mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm.

Les souches montrant une sensibilité aux huiles essentielles ont été sélectionnées pour déterminer les valeurs des paramètres antimicrobiens par la méthode de dilution d'agar.

2.6.4. Méthode de dilution d'agar

Pour déterminer les CMI, CMB et CMF, nous avons employé la méthode de dilution d'agar rapportée par Hammer *et al.* (1999). Où un volume de 20 ml de la gélose fondue (Muller Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les moisissures) additionné de 0,5% (v/v) de tween 80 ont été mis dans des tubes à essai. Différentes concentrations d'huiles essentielles préparées dans le diméthyle sulfo-oxyde (DMSO, 50µl/ml - 1000µl/ml) ont été ajoutées aseptiquement et le mélange a été coulé dans des boîtes de Pétri. Après solidification de la gélose, 1µl (10^5 UFC) de souches microbiennes a été mis dans les boîtes contenant le milieu Mueller Hinton pour les bactéries et le milieu Sabouraud pour les moisissures. Les géloses avec 0,5% (v/v) de tween 80 et sans huiles essentielles, ont été utilisées comme contrôles positifs. Les boîtes de pétri ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 72 heures pour les moisissures.

3. Encapsulation des huiles essentielles dans les silicates (SiO₂)

Les huiles essentielles du citron ayant une meilleure activité antioxydante sont sélectionnées pour faire l'objet d'encapsulation dans un additif alimentaire (E551) le dioxyde de silicium amorphe (SiO₂) connu par sa porosité et son aptitude à encapsuler les huiles essentielles (Paseta *et al.*, 2016).

3.1. Méthode d'encapsulation

Le dioxyde de silicium amorphe utilisé pour l'encapsulation (IBERSIL® A-400) est fourni par la société IQE SA, Espagne. Cette silice a été caractérisée par Paseta *et al.*, (2016), elle a une surface spécifique Brunauer, Emmett et Teller (méthode BET) de 168 m²/g, un volume

poreux de 0,62 cm³/g et une taille moyenne des pores d'environ 14 nm. L'encapsulation est réalisée par l'addition de 1ml d'huiles essentielles à 500 mg de SiO₂ amorphe. L'ensemble est mélangé à main avec une spatule jusqu'à obtention d'un mélange homogène.

La quantité de SiO₂ (500 mg) mise en œuvre a été déterminée par des essais préliminaires. C'est la quantité qui a permis d'avoir une efficacité d'encapsulation maximale.

Les capsules d'huiles essentielles ainsi préparées ont fait l'objet de la détermination du pourcentage d'efficacité d'encapsulation et de la caractérisation par analyse thermogravimétrique (TGA), analyse par microscope électronique à balayage (MEB), analyse par la réflexion totale atténuée ATR et enfin la détermination de leur activité antioxydante.

3.2. Pourcentage d'efficacité d'encapsulation

Le pourcentage d'efficacité d'encapsulation est déterminé suivant le protocole décrit par Keawchaon et Yoksan (2011), où 10 mg des capsules d'huiles essentielles ont été mélangés avec 4 ml de la solution d'HCl (2M), puis incubés à 95°C pendant 30 min. Après refroidissement, 2 ml de l'éthanol ont été ajoutés au mélange. L'ensemble a été centrifugé à 9000 tr/min pendant 5 min à la température ambiante. Le surnageant est récupéré et la teneur en huiles essentielles encapsulées est mesurée dans un UV-Visible à 275 nm. La quantité des huiles essentielles est calculée par la courbe d'étalonnage établie avec les huiles essentielles libres dans l'éthanol.

Le pourcentage d'efficacité d'encapsulation est calculé par la formule suivante :

$$\text{Efficacité d'encapsulation (\%)} = \left(\frac{\text{quantité d'huiles encapsulées}}{\text{quantité initiale d'huiles essentielles}} \right) \times 100$$

3.3. Caractérisation des capsules d'huiles essentielles

3.3.1. Analyse thermogravimétrique (TGA)

L'analyse thermogravimétrique (TGA) permet de mesurer la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température du traitement thermique. Cette variation de masse peut être une perte de masse (telle que l'émission de vapeur) ou un gain de masse lors de la fixation de gaz. Cette analyse a pour but d'étudier la stabilité thermique des échantillons analysés, elle est assurée dans la présente étude par un thermogravimètre Mettler Toledo TGA/SDTA 851e. Cet instrument est une thermo balance qui sert à mesurer les variations de masse. Il comporte trois parties fondamentales : la balance proprement dite, qui assure la

pesée en continu de l'échantillon, le four avec sa régulation de température et le dispositif d'enregistrement. La figure 8 illustre le schéma d'un thermogravimètre (Baroghel-Bouny *et al.*, 2002).

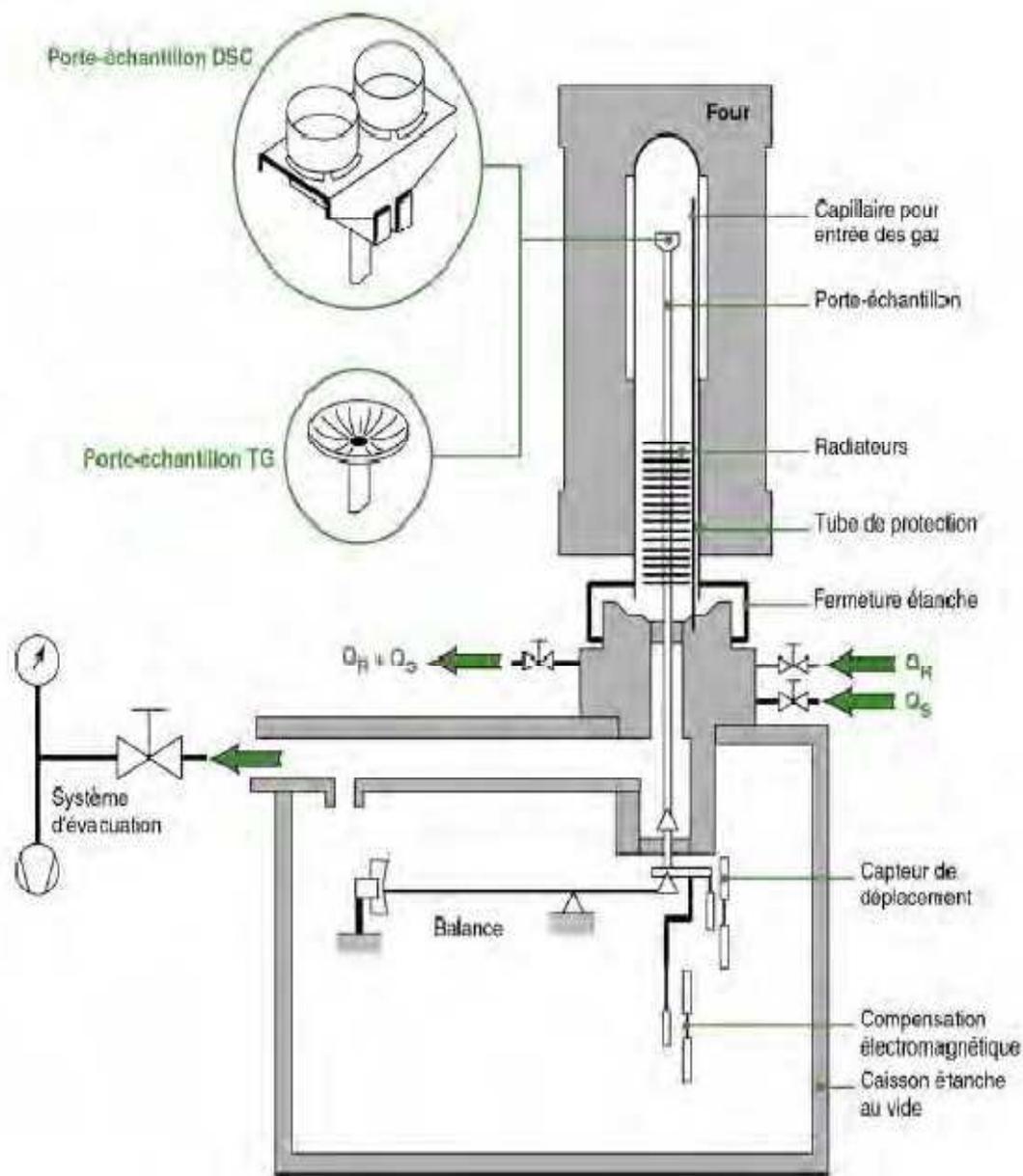


Figure 8. Principe du fonctionnement de la thermobalance d'analyse thermogravimétrique (Baroghel-Bouny *et al.*, 2002)

10 mg de l'échantillon sont placés dans le porte échantillon et chauffés jusqu'à 400°C avec une vitesse de 10°C/min. Le four est maintenu dans une atmosphère de gaz nitrogène ayant un débit de 15 ml/min. Avant le commencement des essais, le calibrage du dispositif est effectué et la perte de masse est enregistrée dans le dispositif d'enregistrement. Les courbes représentant les résultats de TGA sont tracées par OriginPro 8,5.

3.3.2. Analyse par le microscope électronique à balayage (MEB)

La Microscopie Electronique à Balayage (MEB) est fondée sur les interactions électrons-matière. Elle permet l'obtention d'images de hautes résolutions de la surface de l'échantillon avec des profondeurs de champs supérieures à la microscopie optique (Groupe et Brisset, 2008).

Les principaux éléments composant un Microscope Electronique à Balayage sont : une source d'électrons (canon) et un dispositif de haute tension, une colonne maintenue sous un vide secondaire, un ensemble de lentilles électroniques permettant l'obtention d'un fin faisceau, une platine permettant d'installer les échantillons, un détecteur d'électrons couplé à un amplificateur de signal et enfin un système de visualisation des images.

Le principe de fonctionnement du MEB est présenté dans la figure 9 (Rouessac et Rouessac 2004).

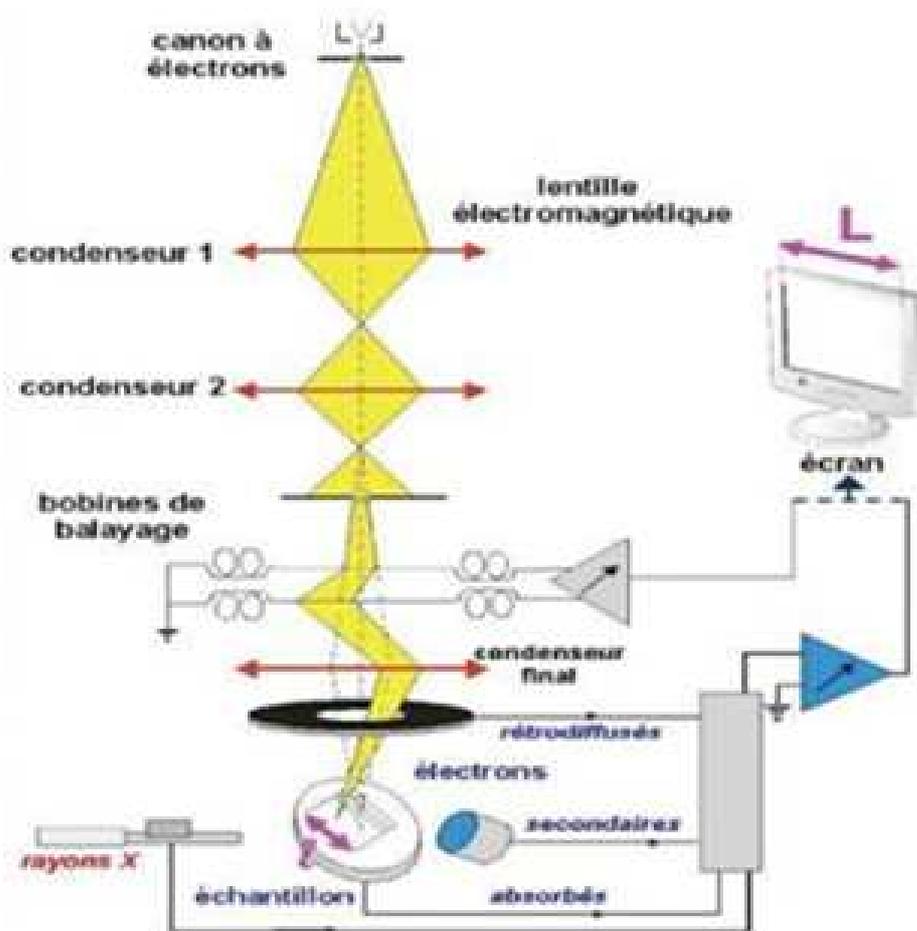


Figure 9. Schéma du principe de fonctionnement d'un MEB (Groupe et Brisset, 2008)

Les silicates et les capsules des huiles essentielles ont été fixés directement sur un ruban adhésif au carbone scellé sur une lame. Cette dernière a été posée sur la grille du microscope.

3.3.3. Analyse par la réflexion totale atténuée (ATR)

La spectroscopie par ATR est une technique d'analyse dite de surface. Elle mesure le changement qui se produit dans un faisceau infrarouge totalement réfléchi à l'intérieur lorsque le faisceau entre en contact avec l'échantillon. Les radiations infrarouges lumineuses pénètrent dans un cristal, en diamant, permettant ainsi une réflexion interne créant une onde évanescente à la surface de celui-ci (figure 10). Cette onde pénètre dans l'échantillon gardé en parfait contact avec le cristal. La réflexion interne (ou réflexion totale) a lieu quand l'angle d'incidence à l'interface entre l'échantillon et le cristal est plus grand que l'angle critique qui dépend de l'indice de réfraction des deux milieux. Il est nécessaire pour cela que le cristal soit plus réfringent que l'échantillon. Le faisceau pénètre une fraction de longueur d'onde au delà de la surface réfléchissante, et le matériau absorbant la radiation sélectionnée est en contact étroit avec la surface réfléchissante, le faisceau perd de l'énergie à la longueur d'onde où le matériau absorbe (Fahrenfort, 1961).

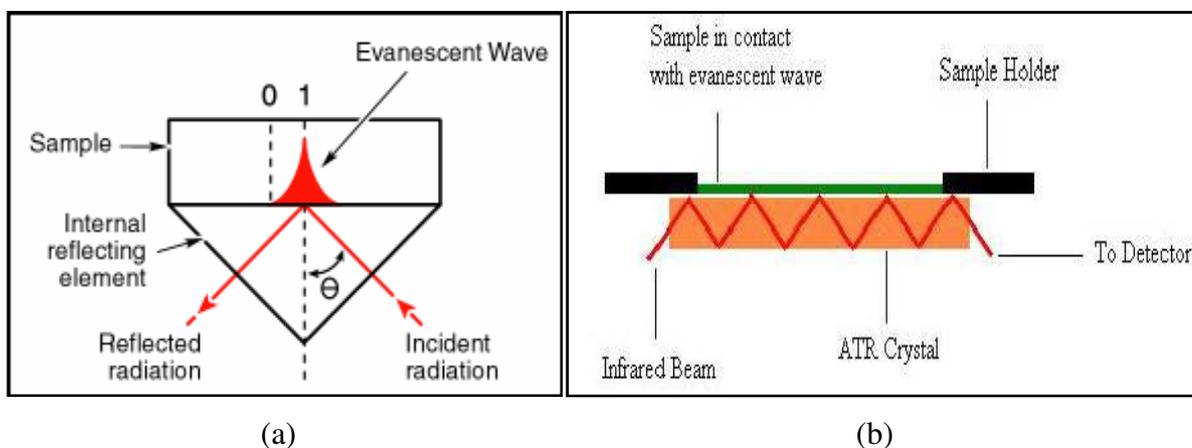


Figure 10. Représentation schématique de: a) une seule réflexion ATR; b) un système ATR à réflexion multiple (Barbeş *et al.* 2014).

Les échantillons (huiles essentielles libres, silicates et huiles essentielles encapsulées) ont été déposés directement sur le cristal de l'ATR. Pour assurer un bon contact échantillon – cristal, une pression modérée a été appliquée sur l'échantillon pendant la mesure.

Les spectres ont été enregistrés dans l'intervalle spectral $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ après accumulation des interférogrammes. Les spectres ATR ont été tracés par OriginPro 8.5.

3.4. Activité antioxydante des huiles encapsulées

L'activité antioxydante des huiles essentielles encapsulées a été déterminée par les tests d'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles libres, citée précédemment (test de blanchissement de β -carotène, test au DPPH, test ABTS⁺, test CUPRAC, test FRAP et test de mesure du pouvoir chélateur), en suivant les mêmes protocoles.

4. Application des huiles essentielles libres et encapsulées à la margarine allégée

4.1. Choix du type de margarine

La margarine allégée, appelée aussi margarine basse calorie, est une margarine diététique élaborée pour contribuer à la lutte contre l'obésité. Elle est composée de 60% de la phase grasse et 40% de la phase aqueuse (O'Brien, 2009). C'est cette composition importante en eau qui provoque son oxydation facilement. Habituellement, l'antioxydant utilisé dans l'industrie de la margarine est l' α -tocophérol. Nous avons pensé, dans cette partie du travail, à le remplacer par les huiles essentielles du citron (libres et encapsulées) et voir leur impact sur la stabilité et les caractéristiques organoleptique de cette margarine.

4.2 Élaboration de la formule de la margarine allégée

La formule de la margarine allégée élaborée est représentée dans le tableau 3.

La formule de la margarine allégée témoin et aux huiles essentielles (libres et encapsulées) est produite dans la chaine pilote (SPX Flow Technology Gerstenberg Schröder A/S, Allemagne) (Annexe 1) au niveau de l'entreprise Cévitall Food SPA de Béjaia.

Le mélange des deux phases ainsi que leurs ingrédients sont mis dans le bac d'émulsification où débute la formation de l'émulsion. Celle-ci va être pasteurisée (80 °C / 3 à 4 secondes) avant de passer à l'étape de cristallisation qui va aboutir à la formation de l'émulsion stable. L'émulsion cristallisée passe dans un malaxeur pour désaérer et malaxer le mélange en lui donnant consistance, souplesse et homogénéité.

Les margarines produites sont conditionnées dans des barquettes en plastique et stockées au réfrigérateur à une température de 4°C.

Une margarine sans α -tocophérol et sans huiles essentielles est élaborée en parallèle afin de servir de témoin négatif du test de résistance à l'oxydation forcée.

Les margarines élaborées ont fait l'objet d'une caractérisation physico-chimique et d'un test de Rancimat pour apprécier leur résistance à l'oxydation et enfin, d'un test sensoriel pour examiner l'acceptabilité de la margarine aux huiles essentielles (libres et encapsulées) proposée.

Tableau 3. Formule de la margarine allégée élaborée (Cévitall).

Matière première	Composition		
	Margarine témoin (α -tocophérol)	Margarine aux HE libres	Margarine aux HE encapsulées
Phase grasse	60%		
Huile de tournesol	X		
Huile de palme	Y		
Huile de palme hydrogénée	Z		
Huile de soja	Q		
Ingrédients liposolubles			
Lécithine	2g		
β -carotène	0,06g		
Arôme de beurre	1g		
α -tocophérol	100 ppm	0	0
Huiles essentielles libres	0	100 ppm	0
Huiles essentielles encapsulées	0	0	100 ppm
Phase aqueuse			
Eau	40%		
Ingrédients hydrosolubles			
Sel	0,3%		
Acide lactique	0,5g		
Sorbate de potassium	1 g		

X, Y, Z, Q sont les teneurs en% de l'huile de tournesol, l'huile de palme, l'huile de palme hydrogénée et de l'huile de soja respectivement propres au CEVITAL.

4.3. Caractérisation physico-chimique de la margarine allégée

4.3.1. Détermination des teneurs en eau et en matières volatiles

Le principe est basé sur la perte à l'étuve à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ de la margarine mélangée avec du sable. 5 g de margarine sont mis dans une capsule contenant 20 g de sable purifié ; celle-ci est introduite dans une étuve réglée à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 30 min. Après refroidissement, la capsule est pesée. L'opération (séchage, refroidissement et pesée) est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Wolff, 1968).

La teneur en eau et en matières volatiles est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Eau et matière volatiles (\%)} = (P_1 / P_2) \times 100$$

Soit P_1 : perte de poids en g ; P_2 : poids de la prise d'essai en g.

4.3.2. Détermination du gras et du non gras

Les deux parties grasses et non grasses sont séparées grâce à une extraction par solvant et leur poids est calculé après séchage à l'étuve réglée à 105°C. Une prise d'essai de 5g de margarine est pesée dans une capsule et portée dans une étuve réglée à 105 °C pendant 1 heure ; puis filtrée à travers un filtre préalablement séché et taré. Cette dernière est lavée avec une solution d'éther éthylique et portée dans une étuve à 105 °C pendant une demi-heure puis refroidie dans un dessiccateur avant de faire la pesée. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Wolff, 1968).

La teneur en non gras exprimée en % est donnée par la formule suivante:

$$\text{NG (\%)} = [(P_2 - P_1) / P] 100 + \% \text{ eau}$$

Où NG (%) : teneur de non gras en % ; P_1 : poids du filtre vide en g ; P_2 : poids du filtre avec le résidu en g ; P : masse de la prise d'essai en g.

La teneur en gras exprimée en % est donnée par la formule suivante :

$$\text{G\%} = 100 - \% \text{ NG}$$

Où NG (%) est la teneur de non gras en % et G (%) est la teneur de gras en %

4.3.3. Teneur en sel

La teneur en sel est la quantité centésimale de sel présent dans l'échantillon de margarine sous forme de chlorure de sodium. Le principe de la méthode repose sur le titrage des chlorures contenus dans la prise d'essai, par une solution de nitrates d'argent (AgNO_3) et en présence de chromate de potassium comme indicateur coloré (NE. 1. 2.429, 1989).

Un volume de 100 ml d'eau distillée est ajouté à une prise d'essai de 5g de margarine. L'ensemble est chauffé jusqu'à dissolution complète de l'échantillon. Après refroidissement, quelques gouttes de chromates de potassium sont ajoutées et le titrage se fait par la solution de nitrates d'argent jusqu'à obtention d'une couleur rouge brique qui persiste pendant 30 secondes.

Le taux du sel est déterminé par l'équation suivante :

$$Ts (\%) = [(N \times V \times Eq. g (NaCl) / 1000) / P] \times 100$$

Ts : taux ou teneur en sel exprimée en % ; N : Normalité d'AgNO₃ (0.1N) ; V (ml) : volume en ml d'AgNO₃ utilisé pour le titrage ; Eq.g (NaCl) : équivalent grammes de NaCl égal à 58,5; p: prise d'essai en g.

4.3.4. Détermination de la teneur en acides gras par CPG

La chromatographie directe des corps gras n'est pas toujours possible en raison de leurs températures d'ébullition trop élevées et leurs instabilités thermiques. La transformation chimique des acides gras constituant le corps gras en esters méthyliques permet d'abaisser leurs températures d'ébullition et d'obtenir des dérivés thermostables (NF EN ISO 5508, 1995).

Une prise d'essai de 0,5 g de corps gras est dissoute dans 5ml d'hexane puis ajoutée à 0,5ml de solution KOH méthanolique (1,3g dans 10ml de méthanol). Le mélange est agité 30 secondes et mis dans une centrifuge (3000 trs/min) pendant 5 minutes. 1 à 2 gouttes de surnageant sont ajoutées à 1ml d'hexane puis injectées dans les conditions suivantes : détecteur FID ; gaz vecteur ; N₂ avec un débit de 45ml/min ; température de l'injecteur : 250 °C ; débit de H₂: 40ml/mn et débit d'air : 450ml/min).

Les acides gras sont identifiés par leurs temps de rétention par rapport à un chromatogramme de référence d'un mélange standard d'esters méthyliques de composition et concentration connues.

4.3.5. Détermination du pH

Le pH est déterminé directement sur la phase aqueuse, après sa séparation du produit, à l'aide d'un pH-mètre (AFNOR, 1982).

4.3.6. Détermination de l'indice de peroxyde

L'indice de peroxyde est la quantité du produit présent dans l'échantillon exprimée en meq g d'O₂ actif par 1000g du corps gras dans les conditions opératoires décrites.

Le principe repose sur le traitement d'une prise d'essai en solution dans un mélange d'acide acétique et du chloroforme, par une solution d'iodure du potassium (KI). L'iode libéré est titré par la solution de thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃) en présence d'amidon comme indicateur de couleur (NE. 1. 2. 98, 1988).

Une prise d'essai de 3 g du corps gras est dissoute dans une fiole avec 10 ml d'alcool éthylique. 20 ml d'acide acétique et 1 ml de solution d'iodure de potassium sont ajoutés. La fiole est agitée énergiquement pendant 1 min et laissée à l'abri de la lumière pendant 5 min. La solution est titrée par le thiosulfate de sodium à 0,01N jusqu'à apparition d'une coloration jaune pâle. 1ml de solution d'amidon est ajouté et le titrage se poursuit jusqu'à décoloration totale. Un essai à blanc est parallèlement réalisé dans les mêmes conditions mais sans le corps gras.

L'indice de peroxyde exprimé, en milliéquivalent gramme d'O₂/kg, est calculé selon l'équation :

$$\text{Indice de peroxyde} = [(V - V_0) / P] \times 1000$$

Où : V : est le volume de thiosulfate de Na de l'échantillon ; V₀ : est le volume requis pour titrer le blanc et P : est la prise d'essai en grammes.

4.3.7. Détermination du point de fusion

Chaque substance, chimiquement pure, possède sa propre température de fusion. C'est une des plus importantes caractéristiques physiques permettant de juger la pureté de la substance envisagée, par la même, de l'identifier (Formo, 1979).

Un corps gras n'est pas une substance individuelle mais un mélange de plusieurs triglycérides dont les températures de fusion diffèrent. Outre cela, les triglycérides présentent le phénomène de polymorphisme ; la plupart d'entre eux peuvent, en effet, cristalliser sous différentes formes polymorphiques dont chacune possède sa propre température de fusion.

Par convention, la température de fusion d'un corps gras correspond à la température du début de la fusion de celui-ci (Soares *et al.*, 2009).

Le principe de la détermination du point de fusion repose sur le chauffage d'un tube capillaire contenant une prise d'essai de la margarine dans un bain marie et la notation de la température de fusion (ISO 6321, 2002).

Un tube capillaire propre est rempli de l'échantillon de margarine sur une hauteur de 2 cm, puis refroidis dans le congélateur pendant 20 min. Après le refroidissement, le tube est attaché à un thermomètre et l'ensemble est introduit dans un béccher contenant de l'eau ayant une température inférieure de 10 °C environ de la température de fusion présumée. Le béccher est chauffé de façon que la température s'élève d'environ 0,5 °C par minute, en notant la

température où le corps gras commence à monter dans le tube capillaire. Cette température correspond au point de fusion.

4.3.8. Détermination du taux du solide SFC (Solid Fat Content)

La teneur en matières grasses solides d'un mélange d'huiles végétales est responsable de nombreuses caractéristiques de matières grasses telles que les propriétés physiques, les propriétés organoleptiques, la tartinabilité et la plasticité du produit (Rao *et al.*, 2001).

Le taux du solide dans la margarine est déterminé à l'aide d'un spectromètre de résonance magnétique nucléaire (RMN) pulsée basse résolution. La méthode standard consiste à faire fondre la margarine à 70°C, la filtrer et la mettre dans des tubes à une hauteur de 3cm. Après, on procède à des incubations dans un bain marie: 15 min à 100°C, 5 min à 60°C, 60 min à 0°C, 30 min à 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 °C en faisant la lecture à chaque température.

4.4. Évaluation de la résistance à l'oxydation forcée

Pour évaluer la stabilité à l'oxydation accélérée, le test Rancimat donne la spécification TIR (temps d'induction Rancimat), exprimé en heures (h), correspondant au temps pendant lequel la matière grasse a résisté à un stress oxydatif.

Le principe de la méthode repose sur la dégradation thermique de l'échantillon par le passage d'un courant d'air purifié à une température spécifiée. Les produits d'oxydation sont entraînés par l'air et recueillis dans une fiole contenant de l'eau distillée dans laquelle est immergée une électrode de mesure de la conductivité. L'électrode est connectée à un dispositif de mesure de l'enregistrement (Figure 11). La fin de la période d'induction est indiquée lorsque la conductivité se met à augmenter rapidement. Cette augmentation accélérée est provoquée par l'accumulation d'acides gras volatils produits au cours de l'oxydation (ISO 6886, 2006).

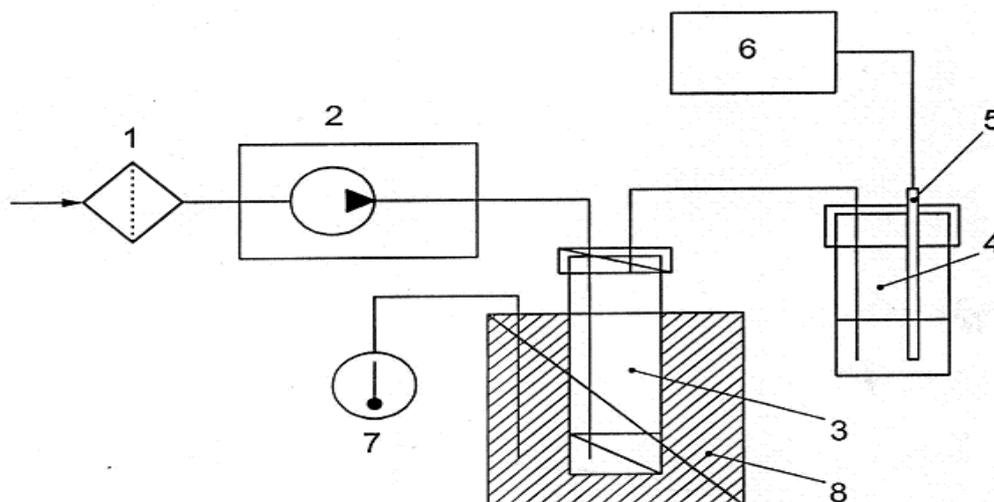


Figure 11. Représentation schématique de l'appareillage du test de Rancimat (ISO 6886, 2006)

1 Filtre à air ; 2 Pompe à membrane pour gaz ; 3 Flacon d'oxydation à l'air ; 4 Cellule de mesure ; 5 Electrode ; 6 Appareil de mesure et d'enregistrement ; 7 Thyristor et thermomètre à contact t ; 8 Bloc chauffant.

Après réglage du bloc chauffant à une température de 100 à 120°C, la cellule de mesure est remplie avec de l'eau distillée et la pompe à membrane pour gaz (débit de 20 l/h) est mise en marche. Une prise d'essai de 3g de l'échantillon est introduite dans le flacon d'oxydation à l'air muni de son bouchon hermétique dans le trou percé à cet effet dans le bloc chauffant. L'enregistreur automatique des données démarre immédiatement et la mesure est arrêtée au moment où le signal atteint 100% de l'échelle de l'enregistreur (200µs/cm).

Les résultats sont exprimés par la période d'induction et l'activité antioxydante relative.

La période d'induction est le temps écoulé entre le début de mesure et le moment où la formation de produits d'oxydation commence à augmenter rapidement.

L'activité antioxydante relative est exprimée par le facteur de protection (pf), qui est calculé en divisant la période d'induction (PI) de la margarine contenant les huiles essentielles étudiées par la période d'induction de la margarine sans huiles essentielles (Murcia *et al.*, 2002).

4.5. Analyse sensorielle

L'analyse sensorielle a pour but de mesurer, analyser et interpréter les caractéristiques d'un produit telles qu'elles sont perçues par les organes de sens. C'est une analyse à caractère

analytique. Il existe des tests à caractère hédonique dont le but est d'évaluer l'acceptabilité des produits et entourer les attentes des consommateurs (Meilgaard *et al.*, 1987).

4.5.1. Sujets dégustateurs

Un groupe de 9 personnes a pris part à ces analyses. Les sujets sont constitués par le personnel de la margarinerie. Il leur est montré la façon dont les bulletins seront remplis en expliquant la méthode et les protocoles d'analyses utilisées (cités par la suite).

Il a été recommandé aux dégustateurs d'éviter l'utilisation de produits à odeur prononcée, comme les savons, les lotions et les parfums avant de participer à un panel et d'éviter de manger, de boire ou de fumer au moins 30 minutes avant de procéder aux tests (Watts *et al.*, 1991).

4.5.2. Déroulement de l'analyse

L'analyse sensorielle a été réalisée par trois tests : test triangulaire, test de classement par rang et test de dégustation. Avant l'analyse, les échantillons de margarines à analyser sont, au préalable, découpés en échantillons cubiques de 10 g et équilibrés à la température de réfrigération. De même, cette analyse a été effectuée au sein du laboratoire de la margarinerie de l'entreprise Cévital Food SPA, à température de 20°C.

4.5.2.1. Test triangulaire

Le test triangulaire est un test de différence dont on se sert pour déterminer s'il y a des différences perceptibles entre deux échantillons (ISO 4120, 1983). Ce test s'utilise aussi pour déterminer l'aptitude des dégustateurs à distinguer entre des différences d'apparence, d'odeur, de saveur et de texture des aliments (Watts *et al.*, 1991).

Trois échantillons codés ont été présentés, deux identiques et un différent. La tâche des dégustateurs est d'identifier l'échantillon différent et de remplir la fiche donnée dans la figure 12.

Les deux échantillons distincts (A et B) sont présentés aux dégustateurs par groupe de trois, c'est-à-dire qu'ils reçoivent soit deux échantillons A et un B ou deux échantillons B et un A. Les trois échantillons sont présentés dans des contenants identiques codés avec des numéros aléatoires à 3 chiffres. Les trois numéros de codes des échantillons remis à chaque dégustateur doivent être différents, même si deux échantillons sont identiques.

FICHE DU TEST TRIANGULAIRE	
NOM :	
PRENOM :	
	DATE :
<u>Question</u> : Goutez les échantillons énumérés ci-dessous et notez l'échantillon parmi les trois que vous percevez différent ?	
Code	Classement
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Figure 12. Bulletin du test triangulaire

La signification des résultats est analysée à l'aide d'un test binomial à une queue. Le nombre de dégustateurs ayant identifié correctement l'échantillon différent a été totalisé et la signification du total était vérifiée en se servant du tableau de l'annexe 2.

4.5.2.2. Test du classement par rang

L'objectif du test de classement par rang est d'évaluer l'acceptation d'un produit qui indique en général la consommation réelle de ce produit (achat et consommation) (Watts *et al.*, 1991).

Les trois échantillons codés différemment ont fait l'objet d'un classement en fonction de l'acceptation, suivant le bulletin de la figure 13, en allant du moins acceptable au plus acceptable. En règle générale, on ne permet pas les égalités.

A la fin de l'analyse des données, la signification des différences est déterminée par comparaison des totaux des classements en se servant du test de Friedman. Les différences entre toutes les paires possibles des classements totalisés sont comparées à la valeur critique du tableau donné dans l'annexe 3, pour un niveau de signification de 5 %.

FICHE DE TEST DE CLASSEMENT	
NOM :	
PRENOM :	
DATE :	
<u>Question</u> : Veuillez classer les trois échantillons par ordre de préférence.	
Code	Classement
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Figure 13. Bulletin du test de classement par rang

4.5.2.3. Test hédonique

Dans ce test, une démarche de réalisation de l'analyse réelle des échantillons a été suivie sur la base de la liste des descripteurs de l'appréciation du goût, de l'odeur, de la tartinabilité selon la facilité de tartiner le produit sur le pain, de la couleur et de l'aspect fondant dans la bouche. La figure 14 donne un exemple du bulletin à remplir pour le test hédonique.

FICHE DU TEST HEDONIQUE			
NOM :			
PRENOM :			
DATE :			
<u>Question</u> : Veuillez examiner et goûter chaque échantillon de margarine, et donnez une note de 1 à 10 selon l'intensité du caractère.			
	A	B	C
Tartinabilité			
Aspect fondant			
Goût citron			
Couleur			
Odeur citron			

Figure 14. Bulletin pour le test hédonique avec un barème de notation allant de 1 à 10

5. Analyse statistique

Tous les essais ont été réalisés en triple et les résultats sont exprimés en valeurs moyennes avec leurs écart-types. Les résultats ont été comparés par l'analyse de la variance à un seul facteur (ANOVA) et le test Student avec un seuil de signification de 0,05, en utilisant XLSTAT 2009. La matrice de corrélation linéaire de Pearsan a été utilisée pour déterminer la corrélation entre l'activité antioxydante des huiles essentielles testées et la teneur de leur chimotype.

Pour les tests sensoriels, les résultats ont été traités par le logiciel statistique XLSTAT (2009). Les notations de chaque échantillon sont présentées sous forme de tableaux et analysées au moyen de l'analyse de variance (ANOVA) pour déterminer s'il y a des différences significatives ($p < 0,05$) dans les moyennes des degrés d'appréciation entre les échantillons.

Partie 3.

Résultats et Discussion

1. Rendement, caractérisation, pouvoirs antioxydant et antimicrobien des huiles essentielles extraites

1.1. Rendement d'extraction en huiles essentielles

Nous rappelons que pour tester la variété du citron et l'effet du mode d'extraction, les huiles essentielles ont été extraites à partir de deux variétés de citron (*Euréka* et *Lisbon*) par deux modes d'extraction (pression à froid et hydrodistillation). Selon la littérature consultée, notamment Laurent et Delerme (2008), le mode d'extraction peut influencer sur les caractéristiques quantitative et qualitative des huiles essentielles extraites à partir d'un même organe. Bakkali *et al.* (2008), signalent que le choix du mode d'extraction des huiles essentielles des *Citrus* dépend essentiellement de leur domaine d'application. Dans les domaines alimentaire et pharmaceutique, il est intéressant de procéder à l'extraction par pression à froid et par hydrodistillation.

Selon les résultats obtenus, quelque soit le mode d'extraction appliqué, les huiles essentielles extraites ont un aspect huileux et une odeur caractéristique du citron. Celles extraites par hydrodistillation sont de couleur jaune et celles extraites par pression à froid sont de couleur jaune verdâtre. Les rendements obtenus sont présentés dans la figure 15.

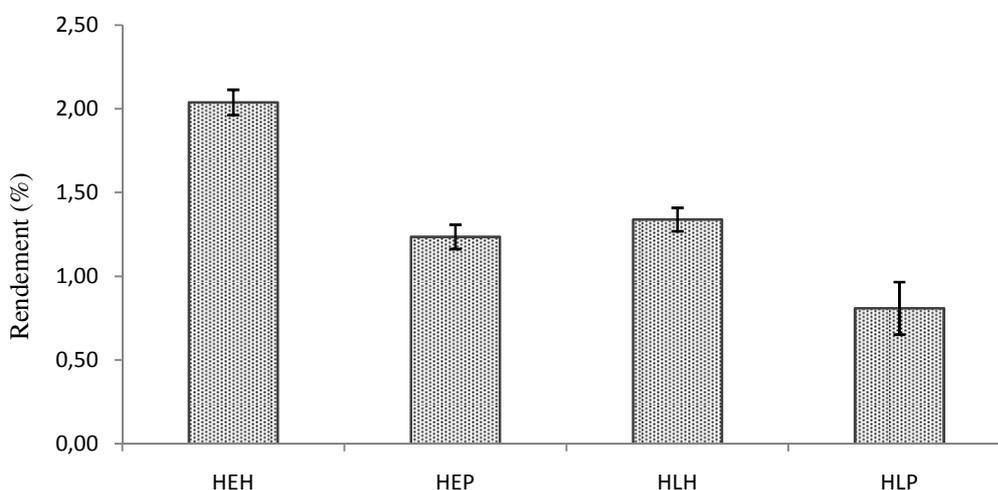


Figure 15. Rendement d'extraction en huiles essentielles

HEP: huiles essentielles de la variété *Euréka* extraites par pression à froid
 HLP : huiles essentielles de la variété *Lisbon* extraites par pression à froid
 HEH: huiles essentielles de la variété *Euréka* extraites par hydrodistillation
 HLH : huiles essentielles de la variété *Lisbon* extraites par hydrodistillation

Quantitativement, le rendement en huiles essentielles extraites par hydrodistillation est plus important que celui obtenu par pression à froid. Il est de $2,04 \pm 0,34\%$ et $1,34 \pm 0,01\%$

respectivement pour les huiles essentielles de la variété *Euréka* et *Lisbon* extraites par hydrodistillation (HEH et HLH). Concernant le rendement des huiles essentielles extraites par pression à froid, il est de $1,24 \pm 0,07\%$ et $0,81 \pm 0,09\%$ respectivement pour les variétés *Euréka* et *Lisbon*. L'augmentation du rendement obtenu par hydrodistillation peut s'expliquer par l'intervention de la chaleur qui a facilité l'éclatement des poches sécrétrices des huiles essentielles (Bachelot *et al.*, 2006). Le test ANOVA a montré que le mode d'extraction et la variété du citron ont un effet significatif ($p < 0,05$) sur le rendement d'extraction.

Dans le même contexte, Rega *et al.* (2003) ont signalé des rendements variant de 1 à 3% en huiles essentielles des *Citrus*. Cette différence pourrait s'expliquer selon Kelen et Tepe (2008) par d'autres facteurs notamment le choix de la période de récolte, le climat, la zone géographique, la génétique de la plante, l'organe de la plante utilisé, le degré de fraîcheur, la période de séchage, la méthode d'extraction employée, etc. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements en huiles essentielles.

Par comparaison à d'autres travaux ayant utilisé la même variété (*Euréka*), les rendements d'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles obtenus par Blanco Tirado *et al.* (1995), Hellal (2011) et Kehal (2013) sont de 0,19%, 0,70% et 0,89% respectivement. Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet de la période de récolte et les conditions environnementales (le climat, la zone géographique et le degré de fraîcheur) (Bourgou *et al.*, 2012).

1.2. Caractérisation et identification des huiles essentielles par GC/MS

Les huiles essentielles récupérées par les deux modes d'extraction ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) en utilisant la colonne capillaire apolaire DB-5. Les conditions opératoires ont été détaillées dans la partie "matériel et méthodes".

Le Tableau 4 regroupe la composition qualitative et quantitative des huiles essentielles extraites. Au total, 30 composés ont été identifiés. Le limonène apparaît comme le constituant majoritaire de toutes les huiles extraites (HEH, HEP, HLH et HLP). Il se présente avec un pourcentage de 61,26%, 67,08 %, 64,19 % et 66,75 % respectivement. En deuxième position, ils apparaissent le α -pinène suivi du α -Citral puis du γ -terpinène. Dans les huiles HEH, HEP, HLH et HLP, le α -pinène se trouve avec des pourcentages de 9,65%, 11,01%,

7,76 % et de 11,22% respectivement. Le α -citral se présente avec des pourcentages de 4,22%, 3,54%, 2,98% et de 3,12% respectivement. Dans les mêmes huiles, le γ -terpinène se trouve avec des pourcentages de 3,84%, 2,18%, 2,09% et de 2,34% respectivement.

Tableau 4. Composition chimique des huiles essentielles du citron extraites analysées par GC/MS

N°	Composés	IR	Teneurs (%)			
			HEH	HEP	HLH	HLP
Monoterpènes			78,98	83,31	78,72	83,84
1	α -thujène	931,196	0,24	0,33	0,31	0,33
2	α - pinène	938,610	9,65	11,01	7,76	11,22
3	β -pinène	981,766	1,47	1,60	1,52	2,15
4	β -myrcène	995,024	1,35	0,72	1,64	0,64
5	limonène	1045,348	61,26	67,08	64,19	66,75
6	β -ocimène	1056,486	0,13	0,09	0,11	0,07
7	γ -terpinène	1066,498	3,84	2,18	2,09	2,34
8	α -terpinolène	1108,546	0,19	0,19	0,45	0,15
9	cis α -bergamotène	1135,896	0,85	0,11	0,65	0,19
Monoterpènes oxygénés			11,04	10,17	10,28	10,06
10	linalool	1109,571	0,39	0,43	0,19	0,25
11	cis -limonène oxide	1138,187	0,13	0,79	0,66	0,81
12	cis-litronellol	1148,022	0,61	0,49	0,49	0,50
13	trans-citronellol	1149,254	0,78	0,73	0,13	0,86
14	camphor	1147,971	0,26	0,30	0,19	0,28
15	citronellal	1150,334	0,25	0,18	0,10	0,19
16	α -terpineol	1192	0,37	0,20	0,51	0,29
17	linalyl propionate	1199,414	1,07	0,12	0,98	0,08
18	trans-carveol	1231,182	0,20	0,24	0,12	0,26
19	cis-carveol	1244,105	0,20	0,11	0,17	0,19
20	cis-citral	1248,850	2,39	2,52	3,65	2,76
21	geranial	1279,198	0,17	0,52	0,11	0,47
22	α -citral	1248,850	4,22	3,54	2,98	3,12
Sesquiterpènes			3,76	1,21	2,71	1,86
23	β -élémane	1373,211	2,22	0,11	1,12	0,98
24	trans caryophyllène	1391,324	0,11	0,26	0,34	0,12
25	γ -cadinène	1501	1,21	0,68	1,04	0,22
26	germacrène	1477,154	0,22	0,16	0,21	0,54
Sesquiterpènes oxygénés			1,52	1,65	1,84	1,63
27	myristicine	1531,537	0,81	1,13	1,17	1,14
28	caryophyllène oxide	1584,603	0,71	0,52	0,67	0,49
Autres Composés oxygénés			2,51	1,08	1,61	1,58
29	neryl acétate	1361,966	1,40	0,11	1,04	0,90
30	piperitenone oxide	1363,013	1,11	0,97	0,57	0,68
TOTAL			97,81	97,42	95,16	98,97

IR : Indice de rétention des composés identifiés.

D'après la littérature consultée, le nombre et le pourcentage des composés identifiés dans les huiles essentielles extraites des *Citrus* varie d'une étude à l'autre. Comme la plupart des constituants des huiles essentielles qui sont volatils et instables, il se pourrait que ces fluctuations soient dues, en plus des facteurs génétiques, aux conditions d'extraction et de conservation. Selon Bakkali *et al.* (2008), la composition chimique des huiles de *Citrus* diffère même d'une variété à l'autre. Ces mêmes auteurs ont identifié 25 à 60 composés dont le limonène est le composé majoritaire. Moufida et Marzouk (2003) ont rapporté des teneurs en limonène de 45 à 75% des constituants détectés dans les huiles essentielles du citron. En effet, les propriétés chimique, physique et biologique de ces huiles essentielles sont fortement reliées à la teneur en ce composé.

Par rapport aux groupes de composés chimiques, l'analyse des huiles extraites a révélé une prédominance en monoterpènes, suivis des monoterpènes oxygénés puis les sesquiterpènes oxygénés et enfin les sesquiterpènes (Figure 16).

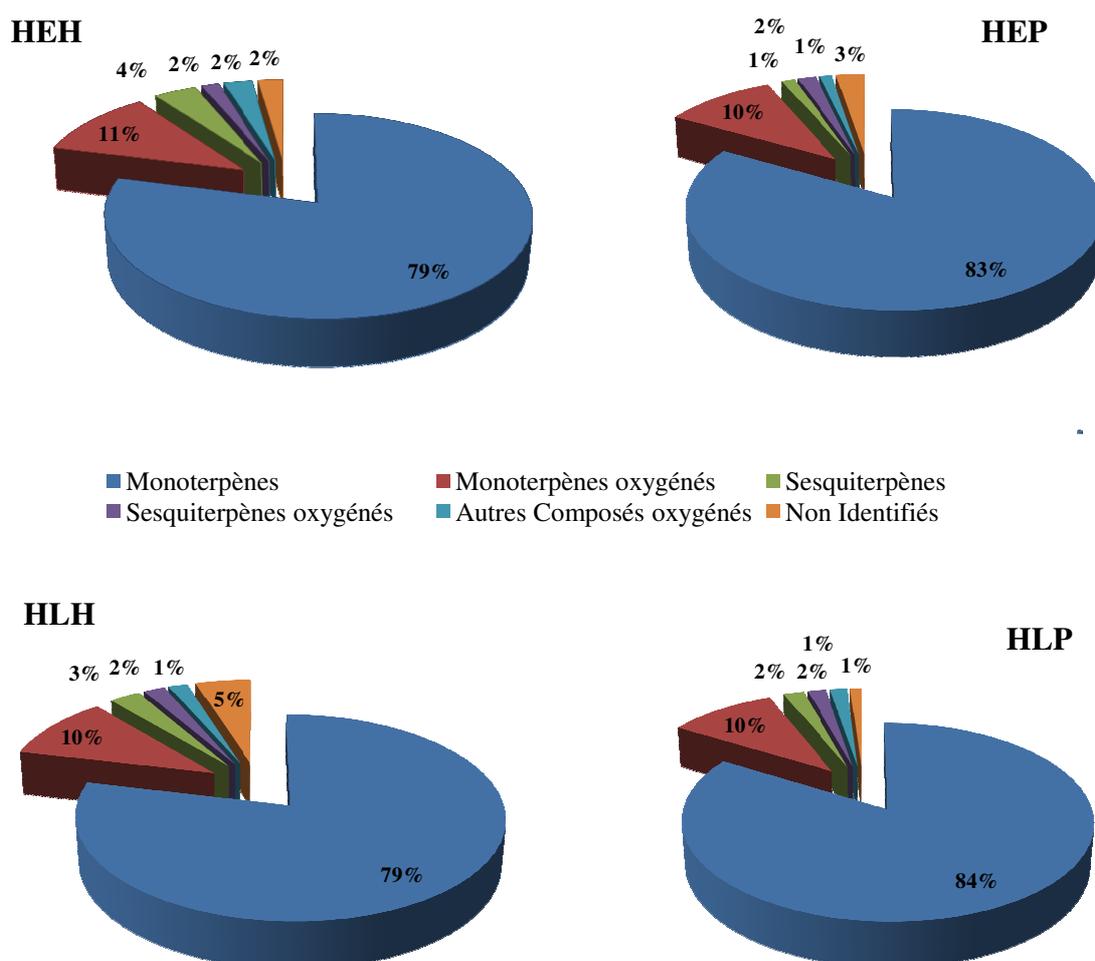


Figure 16. Répartition des différents groupes des constituants des huiles essentielles extraites.

En se référant à la littérature, Smith *et al.* (2001), Moufida et Marzouk (2003) et Fisher et Phillips (2008) ont signalé que les huiles essentielles des *Citrus* sont constituées par des monoterpènes comme composés dominants, ce qui concorde avec les résultats trouvés dans le présent travail.

1.3. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles

De même, nous rappelons que le pouvoir antioxydant a été évalué par le test de blanchissement du β -carotène, le test qualitatif au β -carotène, le test DPPH, le test ABTS⁺, le test CUPRAC, le test FRAP et par le test du pouvoir chélateur du fer.

1.3.1. Inhibition de la peroxydation lipidique

La technique de décoloration du β -carotène/acide linoléique permet d'évaluer l'activité antioxydante par inhibition de la peroxydation des lipides. Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes qui vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé, entraînant ainsi la disparition de sa couleur orange. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation du β -carotène.

La figure 17 illustre les résultats de l'activité antioxydante obtenus par le test du blanchissement du β -carotène.

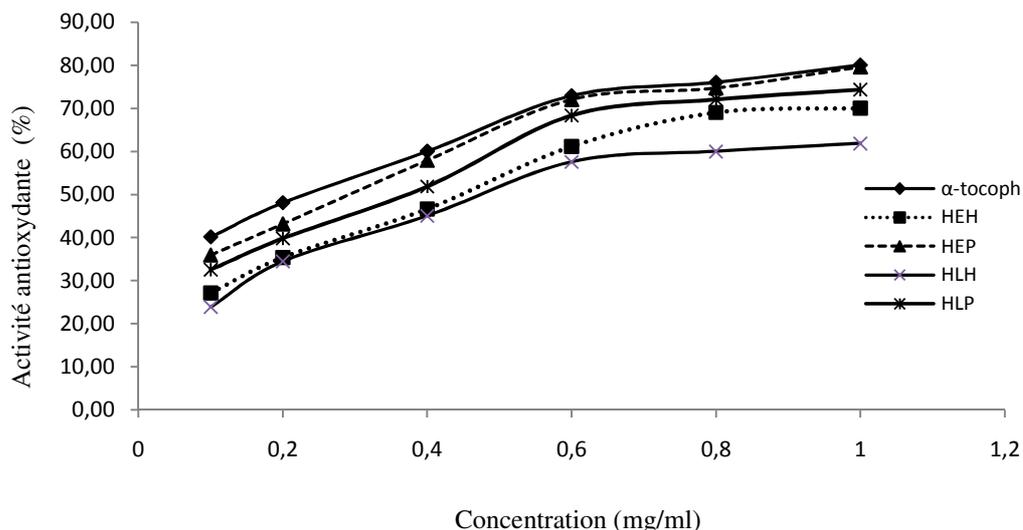


Figure 17. Activité antioxydante des huiles essentielles extraites déterminée par le test de blanchissement du β -carotène.

Les huiles essentielles extraites par pression à froid des variétés *Euréka* et *Lisbon* (HEP et HLP) ont un pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique plus important que celui

des huiles essentielles extraites par hydrodistillation et cela pour les deux variétés (HEH et HLH). L'activité antioxydante des huiles HEP est presque identique à celle de l' α -tocophérol (antioxydant de référence). Ces résultats ont été confirmés par le test qualitatif au β -carotène (Figure 18), où les halos de rétention de la couleur orange du β -carotène sont plus importants pour les huiles extraites par pression à froid par comparaison aux huiles extraites par hydrodistillation. Selon Ferreira *et al.*(2006), les huiles essentielles, qui peuvent inhiber la peroxydation lipidique, sont considérées comme étant des antioxydants primaires.

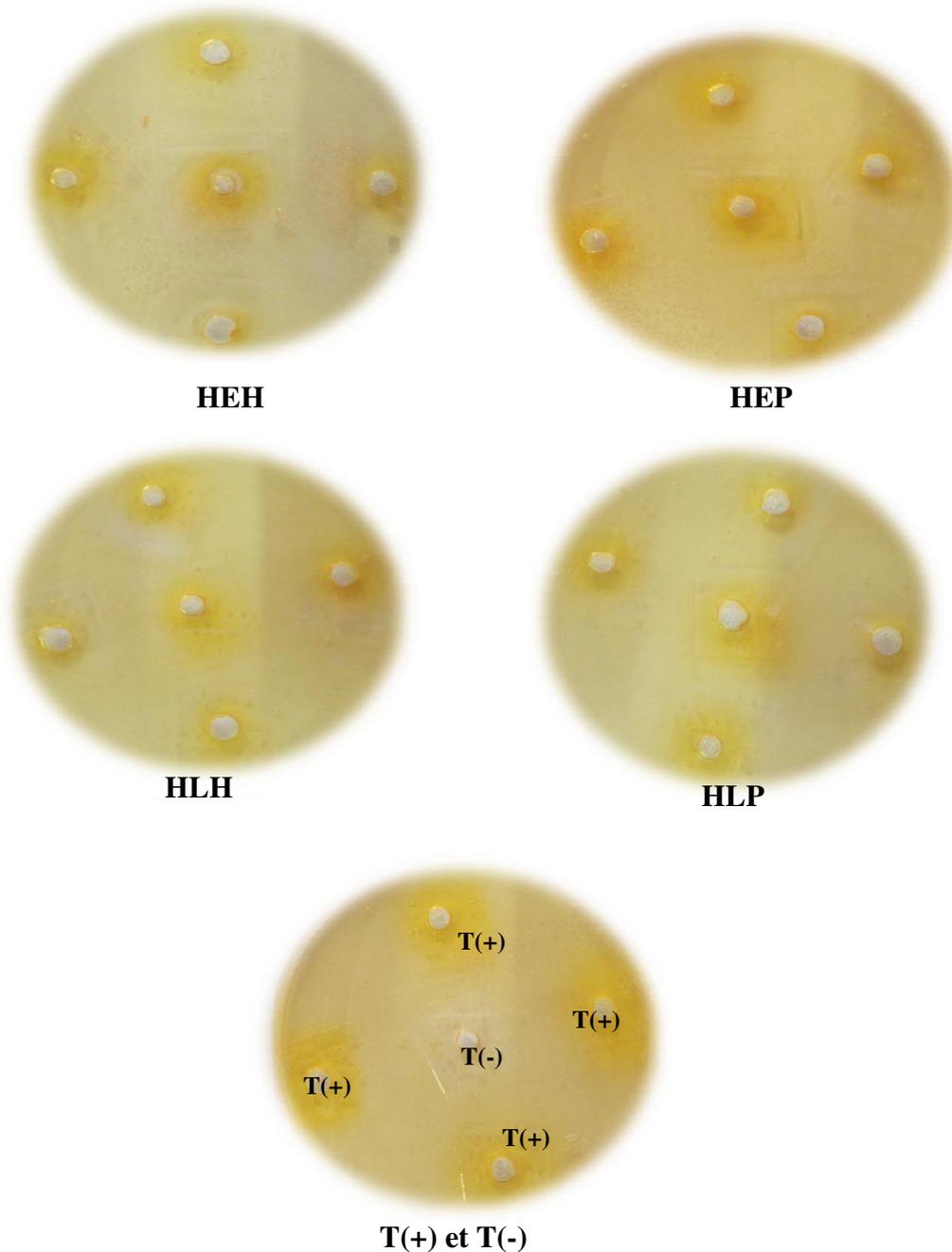


Figure 18. Test qualitatif au β -carotène

T(+) correspond à la quercétine comme témoin positif et *T(-)* correspond à l'éthanol comme témoin négatif.

1.3.2. Piégeage des radicaux

L'activité antiradicalaire a été évaluée par deux tests : le test au DPPH et le test ABTS⁺. Ces deux radicaux sont stables et la capacité des antioxydants à donner un atome d'hydrogène est suivie par leur décoloration.

Les résultats de l'activité antiradicalaire des huiles essentielles testées sont présentés dans la figure 19.

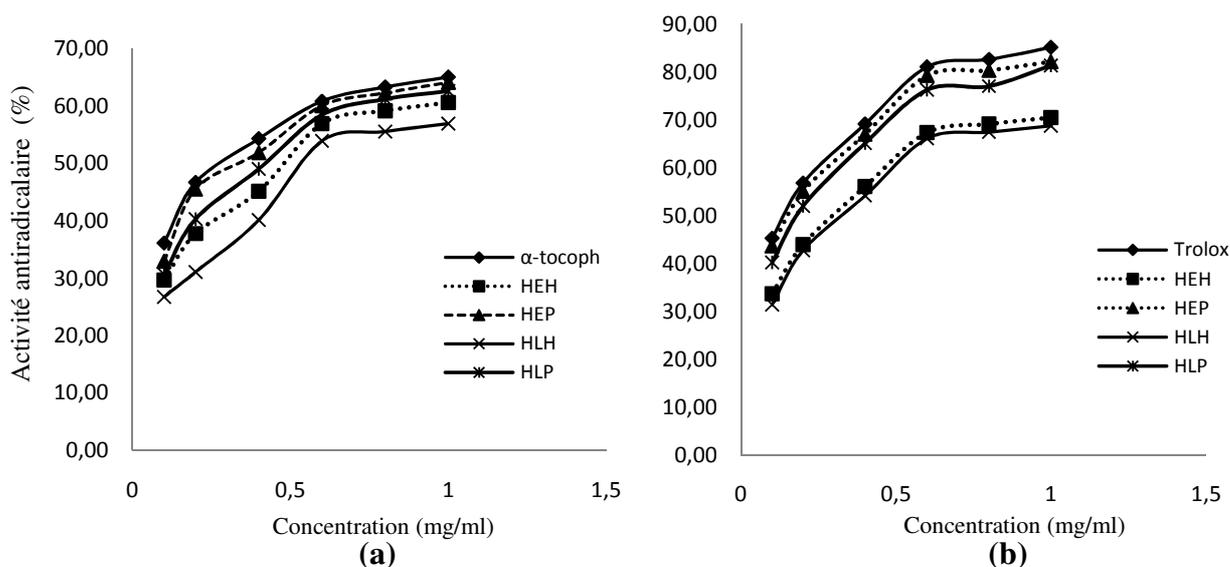


Figure 19. Activité antiradicalaire des huiles essentielles extraites
(a) test DPPH ; (b) test ABTS

L'activité antiradicalaire des huiles essentielles extraites par pression à froid des variétés *Euréka* et *Lisbon* (HEP et HLP) est plus importante que celle des huiles essentielles extraites par hydrodistillation des mêmes variétés (HEH et HLH). De même, les huiles extraites par pression à froid ont un pouvoir antiradicalaire comparable à celui des standards (α -tocophérol et trolox). Ces résultats nous permettent de déduire que les échantillons d'huiles essentielles testés ont la capacité de neutraliser les radicaux libres en leur donnant un atome d'hydrogène. Selon Leong et Shui (2002), tout composé ayant la capacité de neutraliser les radicaux libres DPPH et ABTS, est considéré comme étant un excellent antioxydant.

1.3.3. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est déterminé par deux tests (CUPRAC et FRAP). Ces tests permettent d'évaluer la capacité des échantillons d'huiles essentielles testées à réduire les ions de

néocuproïne et du fer respectivement. Les résultats du pourcentage du pouvoir réducteur sont présentés dans la figure 20.

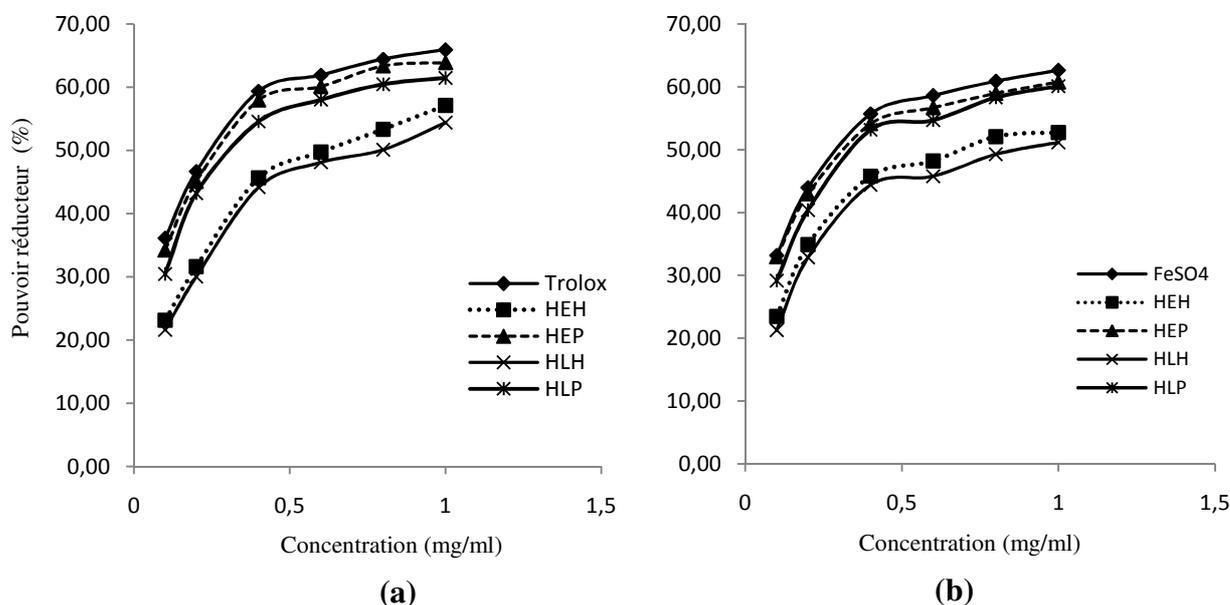


Figure 20. Pouvoir réducteur des huiles extraites
(a) Test CUPRAC ; (b) Test FRAP

A la lumière des résultats obtenus, il semble que les huiles essentielles extraites par pression à froid des deux variétés *Euréka* et *Lisbon* (HEP et HLP) ont un pouvoir réducteur proche de celui des standards (trolox et FeSO_4). Ces huiles essentielles (HEP et HLP) ont un pouvoir réducteur plus important que celui des huiles essentielles extraites par hydrodistillation (HEH et HLH). Le pouvoir réducteur intéressant des huiles essentielles HEP et HLP est lié à leur composition importante, en particulier en monoterpènes (limonène). Amarowicz *et al.* (2004) et Berker *et al.* (2007), ont signalé que les huiles essentielles des *Citrus* possèdent un pouvoir réducteur non négligeable.

1.3.4. Pouvoir chélateur du fer

Le pouvoir chélateur du fer nous renseigne sur la capacité des huiles essentielles à piéger le fer du complexe ferrozine-fer.

Les résultats de l'activité antioxydante mesurée par le pouvoir chélateur sont présentés dans la figure 21.

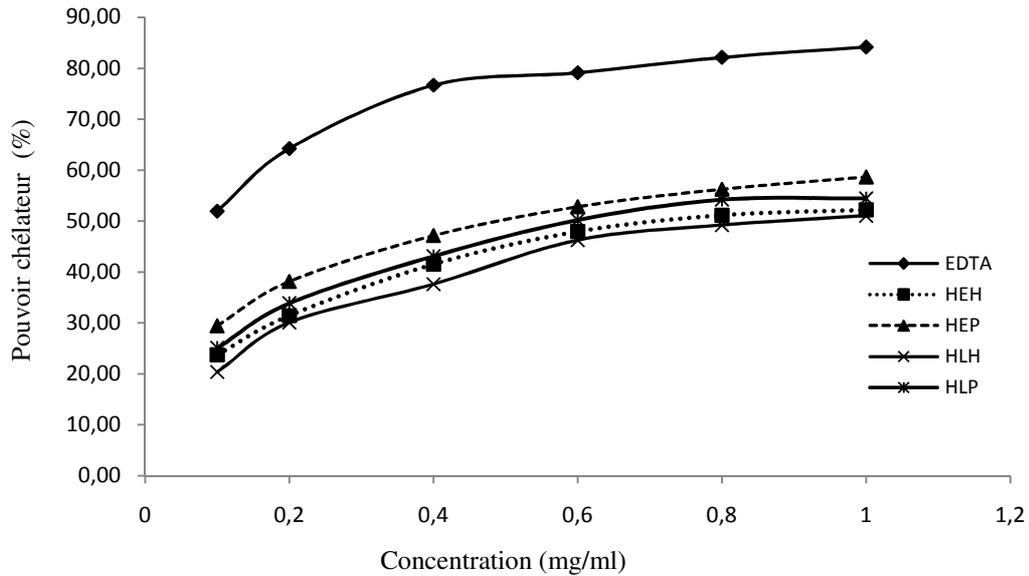


Figure 21. Pouvoir chélateur du fer de l'EDTA et des huiles essentielles extraites

Le pouvoir chélateur des huiles essentielles testées est beaucoup moins important que le standard (EDTA). Cela est peut être lié à la composition chimique des échantillons testés. Par comparaison à d'autres études sur le pouvoir chélateur des huiles essentielles, Amarti *et al.* (2011) ont montré que les huiles essentielles de *Capitatus* sont des composés monohydroxylés et ne sont pas capables de former un complexe avec Fe^{2+} justifiant les résultats obtenus. Jirovetz *et al.* (2006) et Aidi Wannan *et al.* (2010) ont démontré la capacité chélatrice des huiles essentielles qui est liée à leur richesse en composé dihydroxylés. Ces composés se trouvent avec une faible teneur dans les huiles essentielles extraites.

Les résultats de l'activité antioxydante déterminée par différents tests nous ont permis de calculer les valeurs des EC_{50} par la droite de la régression linéaire. Les résultats de cette dernière et du test statistique ANOVA ($p < 0,05$) sont présentés dans le tableau 5.

Nous constatons qu'il n'y a pas de différence significative ($p < 0,05$) entre les EC_{50} des huiles HEP et les standards (α -tocophérol, trolox et $FeSO_4$) pour le test de l'inhibition de la peroxydation lipidique, le test du piégeage des radicaux libres et le test du pouvoir réducteur. En revanche et pour les mêmes tests, il ya une différence significative ($p < 0,05$) entre les EC_{50} des standards et des huiles HEH, HLH et HLP. Nous remarquons aussi qu'il ya une différence significative ($p < 0,05$) entre les huiles essentielles HEP et HLP et entre les huiles essentielles HEH et HLH et cela pour tout les tests.

Tableau 5. EC₅₀ des huiles essentielles testées et des standards utilisés dans différents tests de l'activité antioxydante

Test	EC ₅₀ (mg/ml)				
	Standards	HEH	HEP	HLH	HLP
Blanchiment β-carotène	0,53± 0,01(c)	0,84± 0,03(ab)	0,55±0,04 (c)	0,91± 0,03(a)	0,80 ± 0,03(b)
DPPH	0,63±0,04 (d)	0,81±0,03(a)	0,66±0,03 (d)	0,94±0,02(b)	0,77±0,07 (c)
ABTS	0,41±0,02 (d)	0,68±0,03(a)	0,46±0,02 (d)	0,75±0,03(b)	0,57±0,04 (c)
CUPRAC	0,52±0,02 (d)	0,77±0,02 (a)	0,55±0,04 (d)	0,87±0,03(b)	0,66±0,04 (c)
FRAP	0,42±0,03 (d)	0,85±0,03 (a)	0,48±0,04 (d)	0,92±0,02(b)	0,58±0,04 (c)
Chélation	0,37±0,05 (d)	0,88±0,03 (a)	0,73±0,02 (c)	0,91±0,03(a)	0,98±0,01(b)

Pour le même test, la même lettre signifie l'absence de différence significative au seuil $p < 0,05$

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que la variété et le mode d'extraction ont une influence sur l'activité antioxydante. Cette constatation concorde avec les données de la littérature, où Kalemba et Kunicka (2003), Saint (2003), Bakkali *et al.* (2008), Oussou *et al.* (2009) et Bourgou *et al.* (2012) ont signalé que les activités biologiques des huiles essentielles sont reliées à leur composition chimique, par conséquent, aux facteurs de variabilité de celle-ci (la variété, le climat, la zone géographique, le degré de fraîcheur et le mode d'extraction).

Concernant le pouvoir chélateur, une différence significative ($p < 0,05$) a été observée entre l'EDTA et les huiles extraites, ces dernières n'ont pas révélé une capacité chélatrice importante. Ce constat pourrait être attribué au limonène, constituant majeur de ces huiles, qui n'est pas capable de former un complexe avec Fe^{2+} . Des résultats similaires ont été signalés par Bounatirou *et al.* (2007) qui ont mentionné l'absence de l'activité chélatrice des huiles essentielles de *Thymus capitatus*, et qui ont expliqué ce résultat par l'incapacité du carvacrol, constituant principal de ces huiles essentielles, à se complexer avec Fe^{2+} car c'est un composé monohydroxylé. Cependant, Jirovetz *et al.* (2006) ont démontré que l'eugénol, principal composé dihydroxylé de l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllus*, a un effet chélateur plus fort que l'EDTA. De même, Aidi Wannes *et al.* (2010) ont signalé que les composés dihydroxylés ont la capacité de former un complexe avec Fe^{2+} .

Les huiles essentielles testées sont riches en composés monohydroxylés. Ces composés sont incapables de chélater les ions ferreux. Les pourcentages en monoterpènes oxygénés de ces huiles (HEH, HEP, HLH et HLP) sont de : 11,04%, 10,17%, 10,28% et 10,06%

respectivement ; et les sesquiterpènes oxygénés sont de : 1,52%, 1,65%, 1,84% et 1,63% respectivement. En revanche, les composés dihydroxylés, responsables du pouvoir chélateur de ces mêmes huiles, sont présents mais avec des pourcentages négligeables (2,51%, 1,08%, 1,61% et 1,58% respectivement).

L'activité antioxydante des huiles extraites, déduite des résultats de la combinaison entre différents tests par comparaison aux différents standards, est reliée à la composition chimique de ces huiles. Les études sur la composition chimique des huiles essentielles en relation avec le screening de leurs activités biologiques sont abondantes. Il est établi dans de nombreux travaux que l'activité des huiles essentielles est en rapport avec les composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre leurs constituants (Kalemba et Kunicka, 2003, Saint, 2003, Oussou *et al.*, 2009 et Oussou *et al.*, 2010).

Wei et Shibamoto (2007) ont enregistré une activité antioxydante importante des huiles essentielles riches en monoterpènes (limonène et α -pinène). D'après Benov (1994), les huiles essentielles riches en composés oxygénés présentent généralement une activité anti radicalaire très importante. De même, Gauthier *et al.* (1988) ont révélé une corrélation positive entre l'activité antioxydante et le taux en α -pinène. Mimica-Dukic *et al.* (2004) ont signalé que les monoterpènes (limonène) et les sesquiterpènes (caryophyllène) sont responsables de la neutralisation du radical DPPH. Mohammedi et Atik (2011) ont rapporté que l'activité antioxydante des huiles essentielles est due aux sesquiterpènes oxygénés.

En revanche, Kelen et Tepe (2008) ont révélé que les monoterpènes (limonène, α -pinène et β -pinène) testés individuellement n'ont pas une activité antioxydante importante par rapport à l'ensemble des constituants, c'est-à-dire ; il ya un effet synergique entre ces composés. Ruberto *et al.* (2000) ont rapporté que l' α -terpinène est responsable de l'activité antioxydante.

D'après la matrice de corrélation (tableau 6), quelque soit le test employé (test de blanchissement du β -carotène, test au DPPH, test ABTS, test CUPRAC et test FRAP), le taux du limonène est fortement corrélé, mais négativement, aux valeurs de l' EC_{50} . Cela signifie que plus le taux du limonène dans l'huile essentielle est important moins l' EC_{50} est importante et plus l'activité antioxydante est plus intéressante. De même, le taux du limonène est faiblement corrélé (négativement) (-0,371) avec l' EC_{50} de l'activité chélatrice. En effet, nous rappelons que nous n'avons pas trouvé une activité importante des échantillons d'huiles par rapport au standard (EDTA).

Tableau 6. Matrice de corrélation entre la teneur en limonène et les EC₅₀ des huiles essentielles testées par différentes méthodes

Variables	β-carotène	DPPH	ABTS	CUPRAC	FRAP	Chélation	Teneur en limonène
β-carotène	1	0,925	0,940	0,927	0,840	0,813	-0,766
DPPH	0,925	1	0,966	0,980	0,903	0,605	-0,685
ABTS	0,940	0,966	1	0,997	0,972	0,567	-0,850
CUPRAC	0,927	0,980	0,997	1	0,968	0,546	-0,814
FRAP	0,840	0,903	0,972	0,968	1	0,369	-0,897
Chélation	0,813	0,605	0,567	0,546	0,369	1	-0,371
Teneur en limonène	-0,766	-0,685	-0,850	-0,814	-0,897	-0,371	1

1.4. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

Nous rappelons que le pouvoir antimicrobien des échantillons des huiles essentielles extraites a été déterminé par la méthode de diffusion des disques sur des milieux gélosés solides : Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les moisissures. L'activité antimicrobienne a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les échantillons d'huiles à tester vis-à-vis de 15 souches de contamination alimentaires, dont 9 souches bactériennes et 6 souches fongiques.

1.4.1. Pouvoir antibactérien

Les résultats des diamètres d'inhibition et ceux de la concentration minimale inhibitrice des souches bactériennes dites sensibles sont représentés dans le tableau 7. Nous remarquons que toutes les souches bactériennes testées ont révélé une sensibilité vis-à-vis des huiles essentielles extraites (HEH, HEP, HLH et HLP). La sensibilité des souches bactériennes est plus importante pour les bactéries Gram positif que pour les bactéries Gram négatif.

Plusieurs hypothèses ont expliqué cette différence de sensibilité. D'après Nikaido (2003), ces résultats pourraient être dus à la composition de la membrane des bactéries Gram négatif. En effet, ces dernières possèdent une membrane qui présente une perméabilité sélective; la surface des lipopolysaccharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire (Garrett et Grisham, 2000). A titre d'exemple, *Pseudomonas aeruginosa* contient dans sa membrane des porines de faibles perméabilités. Contrairement aux Gram négatif, les bactéries à Gram positif se sont montrées plus sensibles.

Sleytr et Messner (1988) attribue la résistance de ces dernières à la présence d'une couche cristalline entourant leur membrane.

Les diamètres d'inhibition sont plus importants pour les souches testées avec les huiles essentielles extraites par pression à froid des variétés *Euréka* et *Lisbon* (HEP et HLP) par comparaison à ceux des souches testées avec les huiles extraites par hydrodistillation des mêmes variétés (HEH et HLH). Les diamètres d'inhibition des huiles essentielles extraites de la variété *Euréka* sont plus importants que ceux des huiles de la variété *Lisbon*. Les CMI enregistrés pour les huiles essentielles extraites par pression à froid sont moins intéressants que celles des huiles essentielles extraites par hydrodistillation. Cela signifie que l'activité antibactérienne des huiles extraites par pression à froid (HEP et HLP) est plus importante que celle des huiles extraites par hydrodistillation (HEH et HLH). Quelque soit le même mode d'extraction, les CMI des huiles de la variété *Euréka* sont moins intéressants que celles de la variété *Lisbon*. Par conséquent, les huiles de la variété *Euréka* possèdent une activité meilleure par comparaison à celle des huiles de la variété *Lisbon*. Ces résultats confirment les données de la littérature, où la variété et le mode d'extraction des huiles essentielles influent leur composition, autant que, leurs activités biologiques (Burt, 2004, Bakkali *et al.*, 2008, Espina *et al.*, 2011 et Ait Ouazzou *et al.*, 2012).

1.4.2. Pouvoir antifongique

Les résultats des diamètres d'inhibition et ceux de la concentration minimale inhibitrice des souches fongiques dites sensibles sont représentés dans le tableau 8. D'après ces diamètres, toutes les souches fongiques testées sont sensibles vis-à-vis les huiles essentielles extraites (HEH, HEP, HLH et HLP). Par comparaison aux résultats des diamètres d'inhibition et des CMI des souches bactériennes, les souches fongiques sont plus résistantes que les souches bactériennes. En outre, Castilho *et al.* (2007), Bakkali *et al.* (2008) et Cávar *et al.* (2008) ont signalé que les moisissures montrent plus de résistance aux huiles essentielles que les bactéries. Les mêmes constatations sont observées concernant les diamètres d'inhibition qui sont plus importants pour les souches testées par les huiles essentielles extraites par pression à froid par comparaison aux huiles essentielles extraites par hydrodistillation. Aussi les souches testées par les huiles essentielles extraites de la variété *Euréka* s'avèrent plus sensibles que celles testées par les huiles essentielles extraites de la variété *Lisbon*. Les CMI des huiles HEP et HLP sont moins importantes que celles des huiles HEH et HLH. Cela signifie une activité antifongique plus intéressante.

Tableau 7. Diamètres d'inhibition des huiles extraites vis-à-vis les souches bactériennes testées

Souches testées	DI (mm)				CMI ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)			
	HEH	HEP	HLH	HLP	HEH	HEP	HLH	HLP
<i>Bacillus cereus</i>	14,5±0,710(a)	16,3±0,01(b)	15 ±1,41 (c)	15,3±0,08 (d)	210	200	300	280
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	16 ±0,130 (a)	16,6±0,23 (b)	13,3±1,52(c)	14,1 ± 1,12 (d)	180	150	240	210
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,1 ±0,217(a)	10,4±0,04 (b)	9,5 ± 0,10 (c)	9,8 ± 1,03 (d)	760	450	500	490
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8,9 ±0,801(a)	9,6 ± 0,13 (b)	8,8 ± 0,26 (c)	9,2 ± 1,11 (d)	790	470	500	490
<i>Salmonella enterica</i>	12,7±0,112(a)	13,2±0,20 (b)	8,1 ± 0,32 (c)	13,2 ± 0,04 (d)	410	380	910	500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,1±0,621(a)	12,1±1,10 (b)	10,3 ± 0,36 (c)	10,9 ± 0,04 (d)	620	600	650	610
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10,7±0,171(a)	11,2±0,03 (b)	9,2 ± 0,2 (c)	11 ± 0,24 (d)	580	360	400	390
<i>Serratia marcescens</i>	11,2±0,431(a)	13 ± 0,09 (b)	11,4 ± 0,26 (c)	12,3 ± 1,12 (d)	500	470	700	550
<i>Proteus mirabilis</i>	9,8± 0,278 (a)	10,7 ± 0,34 (b)	9,8 ± 0,52 (c)	10 ± 0,01 (d)	700	530	640	600

DI : diamètre d'inhibition en mm, CMI : concentration minimale inhibitrice en $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Tableau 8. Diamètres d'inhibition des huiles extraites vis-à-vis les souches fongiques testées

Souches testées	DI (mm)				CMI ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)			
	HEH	HEP	HLH	HLP	HEH	HEP	HLH	HLP
<i>Aspergillus terreus</i>	11 \pm 0,09 (a)	12,8 \pm 0,03 (b)	10,6 \pm 0,06 (c)	11,9 \pm 0,09 (d)	640	500	700	630
<i>Aspergillus niger</i>	12,4 \pm 0,43 (a)	14,2 \pm 1,41(b)	11,1 \pm 0,06 (c)	13,1 \pm 0,02 (d)	550	340	600	590
<i>Aspergillus flavus</i>	12,1 \pm 0,02 (a)	13,4 \pm 1,12 (b)	11,7 \pm 1,11 (c)	12,8 \pm 1,11 (d)	600	370	750	550
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	11,9 \pm 0,09 (a)	13,6 \pm 0,21(b)	10,7 \pm 0,09 (c)	12,3 \pm 0,62 (d)	610	480	900	600
<i>Fusarium oxysporum</i>	13,8 \pm 0,06 (a)	17,8 \pm 0,03 (b)	12,2 \pm 1,23 (c)	14,4 \pm 1,21 (d)	350	180	450	310
<i>Fusarium culmorum</i>	13,6 \pm 0,32 (a)	16,7 \pm 0,03 (b)	12,5 \pm 0,08 (c)	14,3 \pm 0,73 (d)	380	250	500	350

DI : diamètre d'inhibition en mm, CMI : concentration minimale inhibitrice en $\mu\text{g.ml}^{-1}$

1.4.3. Concentrations inhibitrices des huiles essentielles extraites

D'autres paramètres microbiologiques ont été déterminés, à savoir les CMBs pour les souches bactériennes et les CMFs pour les souches fongiques. Et cela dans le but de savoir si l'effet des huiles est inhibiteur ou létal. Les résultats de ces paramètres sont représentés dans les tableaux 9 et 10 successivement.

Tableau 9. Concentrations minimales bactéricides (CMB) des huiles extraites

Souches bactériennes testées	CMB ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)			
	HEH	HEP	HLH	HLP
<i>Bacillus cereus</i>	260	250	300	280
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	180	150	300	360
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	/	580	700	600
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	/	600	500	690
<i>Salmonella enterica</i>	500	400	1000	950
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	620	/	650	1000
<i>Enterobacter aerogenes</i>	700	500	900	500
<i>Serratia marcescens</i>	640	700	900	900
<i>Proteus mirabilis</i>	/	900	800	/

CMB : concentration minimale bactéricide en $\mu\text{g.ml}^{-1}$. / : concentration non déterminée ($>1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

Tableau 10. Concentrations minimales fongicides (CMF) des huiles extraites

Souches bactériennes testées	CMF ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)			
	HEH	HEP	HLH	HLP
<i>Aspergillus terreus</i>	/	700	/	970
<i>Aspergillus niger</i>	850	600	900	850
<i>Aspergillus flavus</i>	900	630	1000	700
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	1000	750	/	930
<i>Fusarium oxysporum</i>	550	200	450	390
<i>Fusarium culmorum</i>	700	250	600	400

CMF : concentration minimale fongicide en $\mu\text{g.ml}^{-1}$. / : Concentration non déterminée ($>1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

D'après le tableau 9, les huiles essentielles extraites ont manifesté un effet bactéricide vis-à-vis des souches bactériennes testées à l'exception des huiles essentielles extraites par hydrodistillation de la variété *Euréka* (HEH) vis-à-vis de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *P. mirabilis* ; les huiles essentielles extraites par pression à froid de la même variété (HEP) vis-à-vis de *K. pneumoniae* et les huiles essentielles extraites par pression à froid de la variété *Lisbon* (HLP) vis-à-vis de *P. mirabilis*. Ces huiles essentielles peuvent probablement avoir un effet bactéricide mais pour des concentrations élevées ($>1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

Les résultats des CMFs (tableau 10) montrent aussi que toutes les huiles essentielles extraites ont un effet fongicide à l'exception des huiles essentielles extraites par hydrodistillation de la variété *Euréka* (HEH) vis-à-vis de *A. terreus* et les huiles essentielles extraites par hydrodistillation de la variété *Lisbon* (HLH) vis-à-vis de *A. terreus* et *T. longibrachiatum*. Ces huiles essentielles peuvent avoir un effet fongicide mais probablement pour des concentrations plus importantes ($> 1000 \mu\text{g.ml}^{-1}$).

D'après les résultats des tableaux 7, 8, 9 et 10, les huiles essentielles testées ont révélé une activité antimicrobienne importante. Cette activité est liée sans doute à l'ensemble de leurs constituants. Mizuki *et al.* (1990) ont signalé que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est reliée essentiellement à ses composés majoritaires, mais sans négliger l'effet synergique des constituants mineurs. Tajkarimi *et al.* (2010) ont attribué cette activité aux monoterpènes et sesquiterpènes. Selon Griffin *et al.* (1999), l'activité antimicrobienne des terpènes est due essentiellement à leur interaction avec la membrane cellulaire.

Pour atteindre un microorganisme, un composé doit subir plusieurs phases. Premièrement, il doit être dissous dans le milieu aqueux entourant le micro-organisme. Les composés hydrophobes tels que les huiles essentielles ont une faible solubilité dans l'eau, et leur biodisponibilité est faible. Néanmoins, il a été démontré que le taux de dissolution de certains hydrocarbures est plus élevé en présence de bactéries (Thomas *et al.*, 1986). Et cela en raison des composés tensio-actifs produits par des micro-organismes qui provoquent une émulsification dans l'environnement cellulaire, augmentant les vitesses de dissolution et supprimant les limitations sur le transfert de masse (Sikkema *et al.*, 1995). Deuxièmement, l'hydrocarbure doit entrer dans l'enveloppe cellulaire. Cette étape diffère selon le type de micro-organisme, puisque l'enveloppe de la cellule est différente pour chaque type. Celle des micro-organismes consiste en une paroi cellulaire et une ou deux membranes lipidiques (Beveridge et Graham, 1991). De plus, les bactéries Gram négatif ont une couche de surface

crystalline entourant leur membrane (Sleytr et Messner, 1988), ce qui convient avec les résultats trouvés dans cette étude. C'est la raison pour laquelle les bactéries Gram-négatif peuvent tolérer des concentrations plus élevées de composés lipophiles que les bactéries Gram-positif (Sikkema *et al.*, 1995 ; Smith-Palmer *et al.*, 1998 ; Dorman et Deans, 2000 ; Burt, 2004 ; Fisher et Phillips, 2008). Ceci est dû à la paroi cellulaire externe autour de la membrane des bactéries à Gram négatif qui est hydrophile et qui repousse les composés lipophiles. Cependant, cette paroi n'est pas complètement imperméable aux composés lipophiles, et les petites molécules peuvent interagir avec l'eau par la formation de ponts hydrogène, puis traverser la paroi cellulaire par diffusion à travers la couche de lipopolysaccharides ou protéines et finalement interagissent avec la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique (Griffin *et al.*, 1999; Dorman et Deans, 2000). En revanche, des études *in vitro* ont également démontré que les huiles essentielles ont un effet très similaire sur les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, la seule différence importante étant le temps d'exposition nécessaire pour que l'effet se produise (Fisher et Phillips, 2008). Troisièmement, une fois que l'hydrocarbure a atteint la membrane cytoplasmique, il s'accumule sur celle-ci (Sikkema *et al.*, 1995 et Bakkali *et al.*, 2008). Ce qui engendre une modification de la structure de la membrane. Ils s'accumulent dans la partie centrale de la bicouche lipidique, soit dans la zone entre les monocouches opposées ou alignés avec les chaînes acyles des phospholipides. Le site d'accumulation dépend de la structure de l'hydrocarbure. Les hydrocarbures cycliques ont tendance à s'accumuler dans la partie interne de la bicouche, provoquant une augmentation de sa surface. La fluidité de la membrane change alors, ce qui peut provoquer un gonflement de la bicouche, modifiant la conformation des protéines incluses (Sikkema *et al.*, 1995 ; Griffin *et al.*, 1999 ; Fisher et Phillips, 2008). La structure des couches de polysaccharides, d'acides gras et de phospholipides est également modifiée et la membrane devient plus perméable (Bakkali *et al.*, 2008). Finalement, une fuite du contenu de la cellule se produit, une perte massive de cytoplasme ou de certaines molécules ou ions peut entraîner la mort cellulaire (Burt, 2004). Le cytoplasme se coagule et les lipides et les protéines sont endommagés. La perte de macromolécules et la lyse sont les dernières étapes du mécanisme (Bakkali *et al.*, 2008).

L'activité antimicrobienne est influencée par le type de groupe alkyle ; l'alcényle étant plus actif que l'alkyle. Ainsi, le limonène (avec un groupe alcényle) qui est le composé majoritaire

des huiles extraites est plus actif que le p-cymène (avec un groupe alkyle) contre les micro-organismes (Dorman et Deans, 2000).

Il a été démontré qu'en présence de limonène, certaines bactéries modifient leur profil lipidique. Les souches étudiées ont été exposées à leur concentration minimale inhibitrice, et leurs profils lipidiques ont été analysés après incubation. *Escherichia coli* (Gram négatif) diminue sa teneur en acide palmitique (C16) et augmente les proportions d'acide linoléique (C18:2), docosanoïque (C22) et eicosapentaénoïque (C20:5). *Brochothrix thermospacta* (Gram-positif) diminue également sa concentration en acide palmitique, tout en augmentant les acides pentadécanoïque insaturés (C15:1) et linoléique (C18:3). Cela signifie que l'application de limonène sur ces bactéries diminue les acides gras saturés et augmente les acides gras insaturés. Ce phénomène est lié à une augmentation de la fluidité membranaire (Di Pasqua *et al.*, 2006).

2. Encapsulation des huiles essentielles

2.1. Encapsulation des huiles essentielles dans les silicates (SiO₂)

D'après les résultats de l'activité antioxydante des huiles essentielles testées, les huiles essentielles de la variété *Euréka* extraites par pression à froid (HEP) s'avèrent les plus actives par comparaison aux autres huiles essentielles testées (HEH, HLH et HLP). Ces huiles ont fait l'objet d'encapsulation dans le dioxyde de silicium amorphe (SiO₂).

2.1.1. Pourcentage d'efficacité d'encapsulation

Le pourcentage d'efficacité d'encapsulation est calculé par la formule décrite dans la partie du "matériel et méthodes" en utilisant la courbe d'étalonnage des huiles essentielles libres (HEP) (Figure 22). Cette courbe nous a permis de déterminer la quantité des huiles essentielles encapsulées.

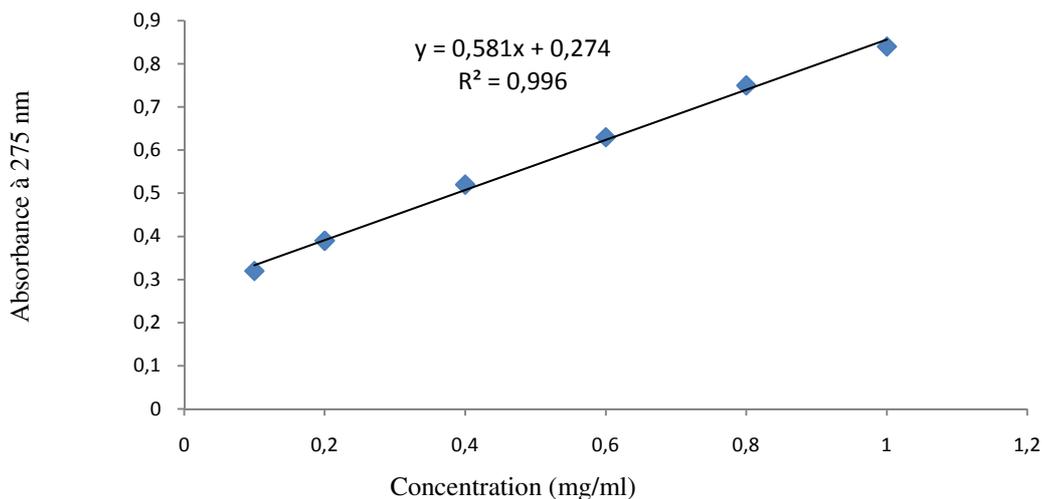


Figure 22. Courbe d'étalonnage des huiles essentielles libres

L'efficacité d'encapsulation calculée est de 95,87%. Liédana *et al.* (2013) ont signalé que l'encapsulation de la solution de caféine dans les silicates a donné un pourcentage qui ne dépasse pas 18%. Le résultat enregistré dans ce travail signifie qu'il ya une affinité d'encapsulation très intéressante entre les huiles essentielles et les silicates.

2.1.2. Caractérisation des capsules des huiles essentielles extraites

Les capsules des huiles essentielles ont été caractérisées par trois analyse : l'analyse thermogravimétrique (TGA) dans le but d'étudier la stabilité thermique des échantillons analysés, l'analyse par microscope électronique à balayage (MEB) pour l'obtention d'images de hautes résolutions et l'analyse par la réflexion totale atténuée (ATR) pour la mesure du changement qui se produit dans un faisceau infrarouge totalement réfléchi à l'intérieur lorsque le faisceau entre en contact avec l'échantillon.

2.1.2.1. Analyse thermogravimétrique (TGA)

L'analyse thermogravimétrique a été introduite dans un but d'une évaluation de la stabilité thermique des huiles essentielles libres et encapsulées. Les résultats de la TGA sont présentés dans la figure 23.

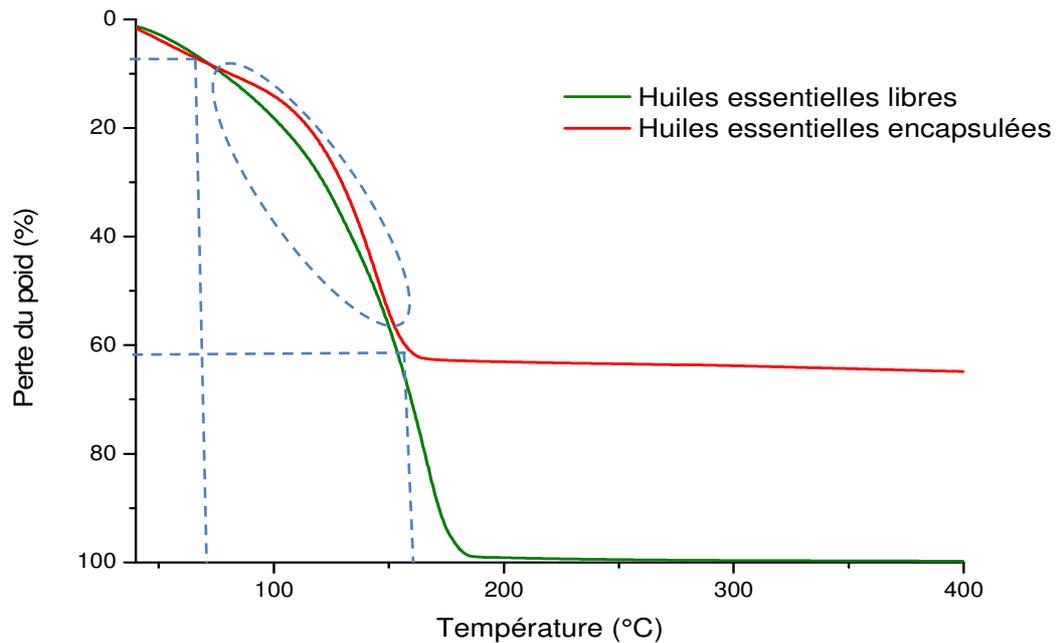


Figure 23. Analyse thermogravimétrique des huiles essentielles libres et encapsulées

D'après la figure 23, la perte du poids se produit à partir de la température de 86°C, et cela pour les huiles essentielles libres et encapsulées. Pour le même intervalle de température (entre 86°C et 170°C), la perte du poids est plus importante pour les huiles essentielles libres que pour les huiles essentielles encapsulées. Ces dernières ont un gain du poids entre 3 à 5% par rapport aux huiles essentielles libres. A partir de 187°C, la perte du poids atteint 100% pour les huiles essentielles libres. Pour la même température, la perte de masse des huiles essentielles encapsulées est de 63% ce qui correspond à une certaine résistance de ces dernières par rapport aux huiles essentielles libres. Paseta *et al.* (2016) ont constaté que la perte de poids des huiles essentielles encapsulées dans le SiO₂ amorphe est de 60% à la température de 200°C. L'étude de Liédana *et al.* (2013) a montré une résistance très importante de la solution de caféine encapsulée dans le dioxyde de silicium amorphe. A la température de 300°C, seulement une perte du poids de moins de 15% a été observée.

L'encapsulation des huiles essentielles du citron, dans le dioxyde de silicium amorphe, leur a donné une certaine résistance à la dégradation thermique.

2.1.2.2. Analyse par microscope électronique à balayage (MEB)

Les observations au MEB des échantillons de silicate et des huiles essentielles encapsulées dans les silicates sont présentées sur la figure 24 (a et b).

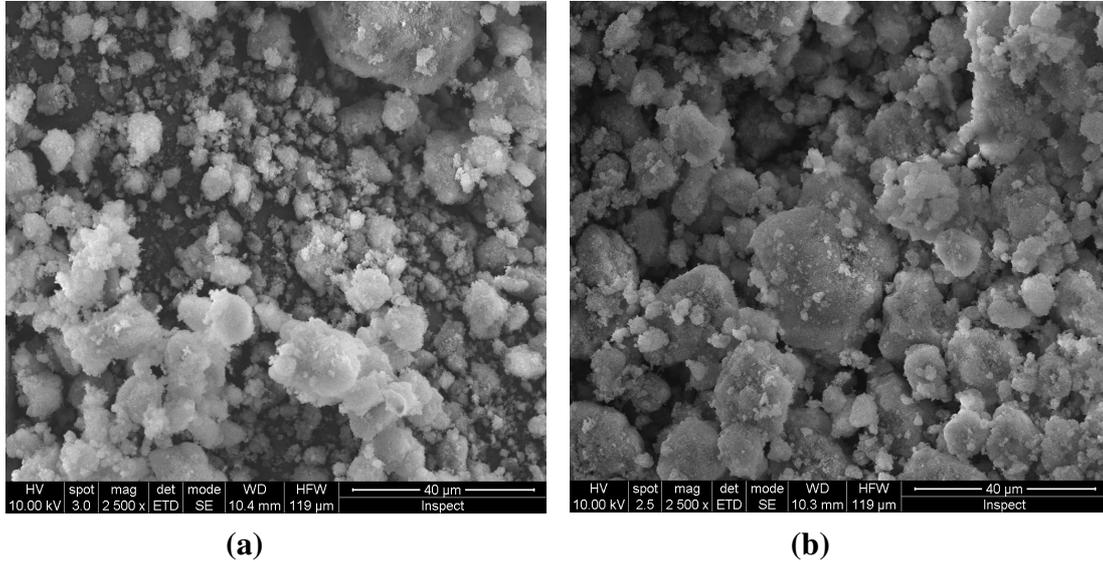


Figure 24. Images au MEB
(a) Silicates (b) Capsules des huiles essentielles de citron

Le traitement d'images a et b, réalisé par le logiciel Mesurim, a donné des dimensions moyennes de particules de $9,96 \pm 1,09 \mu\text{m}$ et $10,04 \pm 1,80 \mu\text{m}$ respectivement. Le test Student n'a révélé aucune différence significative ($p < 0,05$) entre les dimensions de particules des silicates avant et après l'encapsulation. Le balayage de faisceaux d'électrons du MEB à la surface des échantillons a donné des images identiques a et b. Ce qui signifie que les huiles essentielles encapsulées n'ont pas affecté la structure amorphe des silicates.

2.1.2.3. Analyse par la réflexion totale atténuée (ATR)

Les résultats de l'analyse des huiles essentielles libres, encapsulées et silicates par la réflexion totale atténuée sont présentés dans la figure 25.

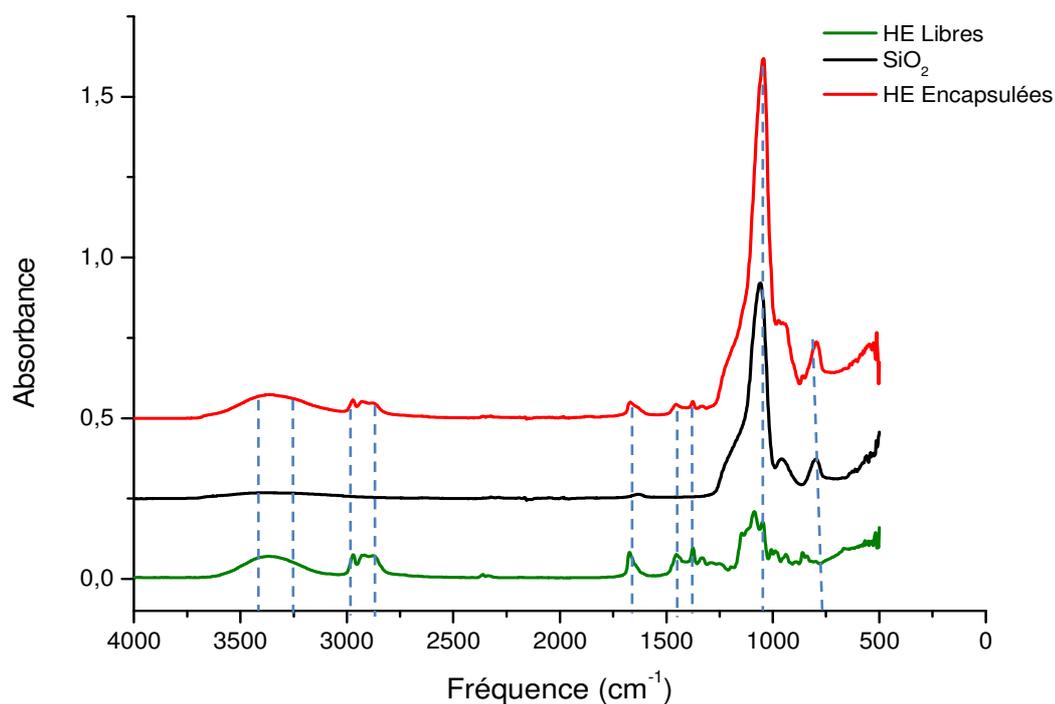


Figure 25. Analyse par la réflexion atténuée des huiles essentielles libres, encapsulées et des silicates

D'après les résultats de la figure 25, les silicates n'ont pas interagit avec les huiles essentielles, d'où l'obtention des pics bien distincts. Les pics des huiles essentielles encapsulées sont le résultat de l'effet d'addition entre les pics des huiles essentielles libres et ceux des silicates (SiO_2). Cela confirme les résultats précédents de l'analyse des échantillons par MEB.

L'absence d'interactions entre les huiles essentielles et les SiO_2 nous laisse supposer que les activités biologiques des huiles essentielles sont probablement préservées. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'application de ces huiles pour leur activité antioxydante dans la margarine allégée. Pour cela, l'activité antioxydante des huiles essentielles encapsulées a été évaluée et comparée à celle des huiles essentielles libres.

2.2. Pouvoir antioxydant des huiles essentielles encapsulées

L'activité antioxydante des huiles essentielles encapsulées a été déterminée par les mêmes tests que ceux de l'activité antioxydante des échantillons des huiles essentielles extraites (blanchissement du β -carotène, test au DPPH, test ABTS, test CUPRAC, test FRAP et test de

chélation du fer). Les résultats d'EC₅₀ des huiles encapsulées et des huiles essentielles libres sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11. EC₅₀ des huiles essentielles libres et encapsulées

Tests	EC ₅₀ (mg/ml)	
	HEP (Libres)	HEP (encapsulées)
Test β-carotène	0,55±0,04 (a)	0,54 ± 0,03 (a)
Test DPPH	0,66±0,03 (a)	0,67 ± 0,04 (a)
Test ABTS	0,46±0,02 (a)	0,47 ± 0,01(a)
Test CUPRAC	0,55±0,04 (a)	0,55 ± 0,02 (a)
Test FRAP	0,51±0,04 (a)	0,51 ± 0,02 (a)
Test de chélation	0,73±0,02 (a)	0,74 ± 0,01 (a)

La même lettre signifie l'absence de différence significative ($p < 0,05$) entre les huiles analysées pour le même test

A la lumière de ces résultats, le test Student n'a pas révélé de différence significative ($p < 0,05$) entre les EC₅₀ des huiles essentielles avant et après encapsulation. Ces résultats confirment ceux de la caractérisation par le MEB et l'ATR des huiles encapsulées, où il y a absence d'interactions entre les huiles essentielles et le dioxyde de silicium amorphe. Par conséquent, l'activité antioxydante des huiles essentielles a été préservée après l'encapsulation dans le dioxyde de silicium amorphe.

3. Incorporation des huiles essentielles libres et encapsulées dans la margarine allégée

3.1. Formulation de la margarine allégée

Une recette de margarine allégée a fait l'objet de trois formulations : la première est la margarine allégée témoin (MT), la deuxième est la margarine allégée aux huiles essentielles libres (MHL) et la troisième est la margarine allégée aux huiles essentielles encapsulées (MHE).

3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées

Les résultats de la caractérisation physico-chimique des margarines élaborées sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12. Caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées.

Paramètres	Teneurs		
	MT	MHL	MHE
Teneur en eau et en matières volatiles (%)	39,59 ± 0,06 (a)	39,63 ± 0,04(a)	39,59 ± 0,05(a)
Teneur en non gras (%)	40,74 ± 0,03(a)	40,78 ± 0,02(a)	40,77 ± 0,02(a)
Teneur en gras (%)	59,26 ± 0,03(a)	59,22 ± 0,02(a)	59,23 ± 0,02(a)
pH	4,7 ± 0,17(a)	4,6 ± 0,30(a)	4,8 ± 0,10(a)
Teneur en sel (%)	0,29 ± 0,01(a)	0,3 ± 0,01(a)	0,29 ± 0,01(a)
Indice de peroxyde (meq d'O₂/kg)	0,99 ± 0,02(a)	0,99 ± 0,02(a)	0,98 ± 0,03(a)
Point de fusion (°C)	36,50 ± 0,17(a)	36,77 ± 0,25(a)	37,03 ± 0,06(a)

La même lettre signifie absence de différence significative ($p < 0,05$) entre les trois margarines pour chaque paramètre physico-chimique.

La teneur en eau et en matières grasses des margarines élaborées correspondent aux teneurs fixées dans la formulation de la margarine allégée (Vierling, 2003). Le pH obtenu pour les trois margarines est un pH conforme à la recette préétablie. D'après Karleskind (1992), le pH de la phase aqueuse doit être contrôlé. Une valeur basse de ce dernier freine la croissance des microorganismes. Le pH est fixé entre 4,0 et 5,5. Dans certaines margarines de feuilletage, les valeurs de 3,0 à 3,5 sont acceptées. Ces faibles valeurs de pH, conduisent à une sensation acide qui peut ne pas plaire aux consommateurs.

La teneur en sel des échantillons de margarine est de 0,29 %. D'après Karleskind (1992), la teneur en sel est de l'ordre de 0,1 à 0,3 %, ce qui concorde avec nos résultats. Le sel joue un rôle très important dans la stabilisation de l'émulsion. D'après Frasch- Melnik *et al.* (2010), l'utilisation des cristaux de monoglycérides comme émulsifiant ou bien en combinaison avec les cristaux de triglycérides améliore la stabilité des émulsions eau dans l'huile par encapsulation du sel qui se fait grâce à la formation de coquilles solides autour des gouttelettes d'eau contenant le sel par les cristaux d'émulsifiants agglomérés.

L'indice de peroxyde calculé dans les trois margarines est de 0,99 meq d'O₂/kg. Cet indice est un critère très utile, d'une sensibilité satisfaisante pour apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative (Karleskind, 1992). Les valeurs de l'indice de peroxyde enregistrées sont nettement inférieures à la norme utilisée comme références par l'auteur (5 meq d'O₂/

Kg). Par conséquent, ces résultats reflètent la caractéristique de fraîcheur des margarines élaborées.

Les valeurs du point de fusion des margarines élaborées est de 37°C. Les points de fusion obtenus sont liés à la composition en acides gras des margarines. Selon Ghotra *et al.* (2002), les graisses et les huiles contenant des acides gras saturés à longues chaînes ont des points de fusion plus élevés que les acides gras polyinsaturés ou à courtes chaînes. En effet, le point de fusion de la margarine doit être fixé de manière à ce qu'elle soit fondante dans la bouche mais aussi plastique à température ambiante pour supporter le travail mécanique lors de la tartinabilité (Karabulut *et al.*, 2004).

Le test ANOVA a révélée une absence de différence significative ($p < 0,05$) entre les paramètres physico-chimiques des trois margarines élaborées. L'ajout des huiles essentielles (libres et encapsulées) n'a pas modifié les paramètres en question, cela est peut être dû à la quantité minime des huiles essentielles ajoutée (100ppm).

Concernant l'indice de solide (SFC), il se rapporte théoriquement au pourcentage de matières grasses qui sont solides à des températures différentes. Il est responsable de plusieurs caractéristiques du produit, y compris son aspect général et ses propriétés organoleptiques (Noor Lida *et al.*, 2002).

Expérimentalement, les résultats du taux du solide des margarines élaborées sont représentés dans la figure 26.

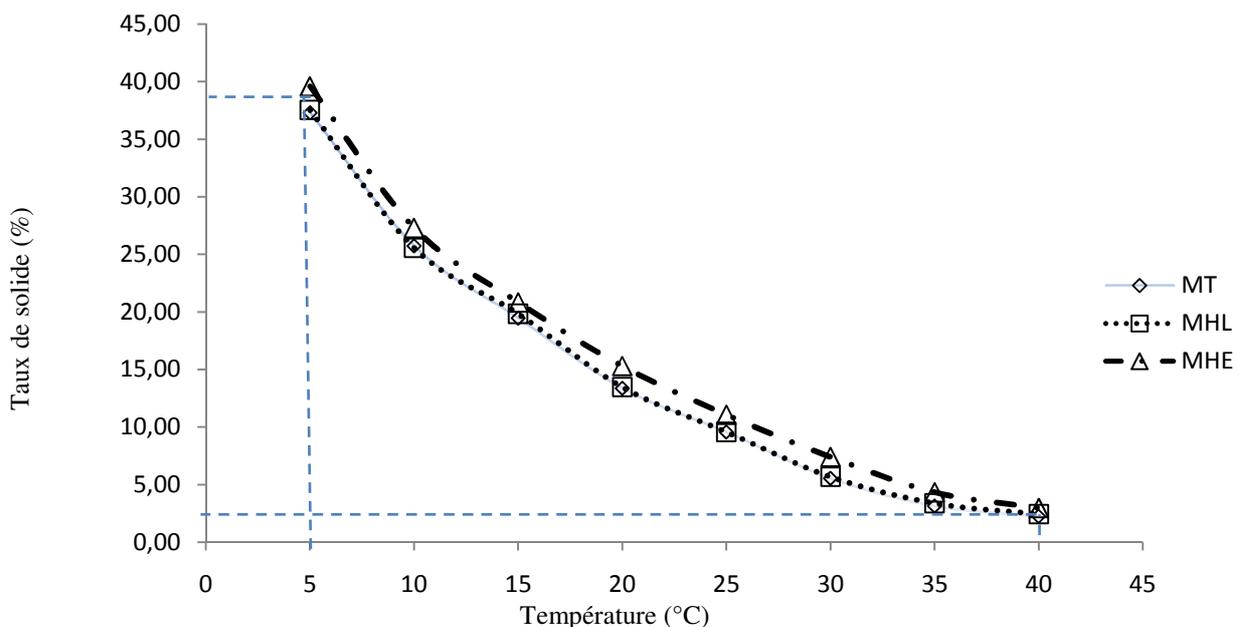


Figure 26. Taux du solide des margarines élaborées

Le taux de solide des margarines élaborées est de 37% à 5°C et 2% à 40°C. D'après De Greyt et Huyghebaert (1993), le taux du solide des margarines allégées tartinables ne doit pas dépasser 40% à 5°C et pas plus de 6% à 37°C. Selon Kok *et al.* (1999) et Karabulut *et al.* (2004), les margarines ne doivent pas manifester d'aspect collant sur la langue et doivent avoir des SFC $\leq 3,5\%$ à 37°C et fondre complètement à cette température. Cependant, en dessous de la température de l'organisme une certaine teneur en solide est requise afin de contribuer à la structure et à la texture de la margarine.

Le test ANOVA effectué sur les résultats SFC n'a révélé aucune différence significative entre les trois margarines et cela pour toutes les températures pour lesquelles elles sont testées.

3.1.2. Composition en acides gras des margarines élaborées

Quant à la teneur de la composition en acides gras des margarines élaborées, les résultats sont représentés dans le tableau 13.

Tableau 13. Composition en acides gras des margarines élaborées

Acides gras	Teneur en %		
	MT	MHL	MHE
Acide caprylique (C8 : 0)	1,11 ± 0,02 (a)	1,12 ± 0,02 (a)	1,11 ± 0,02 (a)
Acide caprique (C10 : 0)	2,64 ± 0,02 (a)	2,65 ± 0,02 (a)	2,64 ± 0,03 (a)
Acide laurique (C12 : 0)	12,53 ± 0,01(a)	12,53 ± 0,02 (a)	12,53 ± 0,02 (a)
Acide myristique (C14 : 0)	6,07 ± 0,02 (a)	6,08 ± 0,04 (a)	6,08 ± 0,03 (a)
Acide palmitique (C16 : 0)	15,32 ± 0,03(a)	15,32 ± 0,02 (a)	15,31 ± 0,02 (a)
Acide stéarique (C18 : 0)	7,03 ± 0,04 (a)	7,05 ± 0,04 (a)	7,09 ± 0,02 (a)
Acide palmitoléique (C16 : 1)	0,94 ± 0,03 (a)	0,94 ± 0,03 (a)	0,94 ± 0,01 (a)
Acide oléique (n 9) (C18 : 1)	29,44 ± 0,02(a)	29,42 ± 0,02 (a)	29,43 ± 0,02(a)
Acide oléique (n 7) (C18 : 1)	0,55 ± 0,02 (a)	0,55 ± 0,03 (a)	0,54 ± 0,02 (a)
Acide linoléique (C18 : 2)	18,78 ± 0,01(a)	18,75 ± 0,02 (a)	18,75 ± 0,01 (a)
Acide linoléique (C18 : 3)	2,14 ± 0,02 (a)	2,14 ± 0,01 (a)	2,14 ± 0,02 (a)

La même lettre signifie absence de différence significative ($p < 0,05$) de la composition en acides gras des trois margarines

La composition des margarines élaborées en acides gras est liée à la teneur en ceux-ci dans les huiles végétales utilisées dans la formulation (huile de tournesol, huile de palme, huile de palme hydrogénée et huile de soja). Les acides: caprylique, caprique, laurique et myristique

proviennent de l'huile de coprah. Les acides : palmitique, stéarique, oléique et linoléique proviennent de l'huile de palme. L'acide linoléique provient de l'huile de soja (Vierling, 2003).

L'analyse de la variance n'a pas révélé de différence significative ($p < 0,05$) entre la composition en acides gras des trois margarines formulées.

Kandhro *et al.* (2008) ont étudié la composition en acides gras par GC/MS de dix margarines. De leurs travaux, il en ressort que la majorité de celles-ci contiennent l'acide palmitique comme composé majoritaire provenant de l'huile de palme. Les acides laurique et myristique sont également présents dans les margarines étudiées. Elles contiennent des AGI et des AGPI comme le C18:1 et le C18:3. L'acide oléique étant le composé majoritaire, il est considéré comme bénéfique pour la santé, en raison de sa contribution à l'abaissement des niveaux de LDL (Low Density Lipoprotein). Les autres AGPI sont également bénéfiques et luttent contre les maladies chroniques et cardiovasculaires par régulation des niveaux des lipides sanguins et ont également des fonctions immunitaires.

La composition des différentes classes d'acides gras est résumée dans le tableau 14.

Tableau 14. Différentes classes d'acides gras des margarines élaborées.

Classe d'acides gras	Teneur en %		
	MT	MHL	MHE
AGS	44,7	44,75	44,76
AGMI	30,93	30,91	30,91
AGPI	20,92	20,89	20,89
AGI	51,85	51,80	51,80
AGI/AGS	1,15	1,15	1,15

D'après ce tableau, le rapport AGI/AGS est de 1,15, ce qui reflète la richesse des margarines élaborées en acides gras mono- et polyinsaturés par rapport aux acides gras saturés. Cela est dû à la composition du mélange des huiles utilisées dans la formulation. Cette valeur concorde avec les recommandations des nutritionnistes ($AGI/AGS > 0,8$) (Karleskind, 1992).

3.1.3. Évaluation de la résistance à l'oxydation forcée

Les résultats de la période d'induction (PI) et de l'activité antioxydante relative (AAR) ou facteur de protection (Fp) des trois margarines testées sont représentés dans le tableau 15. La période d'induction de la margarine sans α -tocophérol et sans huiles essentielles est de 3,1 h.

Tableau 15. Période d'induction et facteur de protection des margarines testées

Echantillons	PI (h)	Fp (AAR)
Margarine témoin	7,66 \pm 0,02 (a)	2,47 \pm 0,01(a)
Margarine à HE libre	6,32 \pm 0,02 (b)	2,04 \pm 0,01 (b)
Margarine à HE encapsulée	7,01 \pm 0,03 (a)	2,26 \pm 0, 01 (a)

La période d'induction est plus importante pour la margarine témoin (margarine à α -tocophérol), suivie de la période d'induction de la margarine aux huiles essentielles encapsulées et enfin celle de la margarine aux huiles essentielles libres. La même remarque a été enregistrée pour le facteur de protection (activité antioxydante relative). Le test ANOVA a révélé une différence significative, pour la période d'induction et le facteur de protection (AAR), entre la margarine témoin (MT) et la margarine aux huiles essentielles libres (MHL). En revanche, aucune différence significative n'a été signalée entre la margarine témoin (MT) et la margarine aux huiles essentielles encapsulées (MHE) pour les mêmes paramètres.

D'après les résultats obtenus et en s'appuyant sur les résultats concluants de Li *et al.* (2014), l'encapsulation des huiles essentielles par le SiO₂ amorphe permet d'immobiliser leurs composés volatils et de les protéger contre les conditions du test Rancimat (oxygène et température) ainsi de moduler leur libération en prolongeant leur profil cinétique.

3.2. Analyse sensorielle des margarines élaborées

L'analyse sensorielle a été effectuée par trois tests : un test triangulaire réalisé dans le but de déterminer s'il y a des différences perceptibles entre les échantillons de margarine élaborées ; un test de classement par rang, dont l'objectif est de classer et situer les échantillons de margarine aux huiles essentielles du citron (libres et encapsulées) par rapport à la margarine témoin (α -tocophérol), et enfin un test hédonique, pour évaluer l'acceptabilité des produits élaborés et pour entourer les attentes des consommateurs.

3.2.1. Test triangulaire

Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau 16 où les bonnes appréciations des dégustateurs sont indiquées par un (+) et les mauvaises appréciations par un (-) et cela pour les trois combinaisons.

Tableau 16. Test triangulaire.

Dégustateurs	Combinaisons		
	MT- MHL	MT - MHE	MHL - MHE
01	+	+	-
02	+	-	+
03	+	-	+
04	+	-	-
05	+	-	+
06	+	+	+
07	+	-	+
08	-	+	+
09	+	-	-
Total de bonnes appréciations	8	3	6

En se référant au tableau de l'annexe 2 :

Pour un ensemble de 9 dégustateurs et 8 bonnes appréciations, la probabilité est de 0,001. Cette valeur est inférieure au niveau de signification de 5 %, ce qui traduit une différence significative entre la margarine témoin (MT) et la margarine aux huiles essentielles libres (MHL) ;

Pour un ensemble de 9 dégustateurs et 3 bonnes appréciations, la probabilité est de 0,623. Cette valeur est supérieure au niveau de signification de 5 %, ce qui traduit une absence de différence significative entre la margarine témoin (MT) et la margarine aux huiles essentielles encapsulées (MHE) ;

Pour un ensemble de 9 dégustateurs et 6 bonnes appréciations, la probabilité est de 0,042. Cette valeur est inférieure au niveau de signification de 5 %, ce qui traduit une différence significative entre la margarine aux huiles essentielles libres (MHL) et la margarine aux huiles essentielles encapsulées (MHE).

3.2.2. Test de classement

Nous avons demandé aux dégustateurs de classer le goût des échantillons en termes d'acceptabilité sans mettre d'égalité, en donnant à chaque échantillon une cote différente même s'il semblait identique. Les classements donnés à chaque échantillon par les 09 dégustateurs sont regroupés dans le tableau 17.

Tableau 17. Test du classement par rang

Dégustateurs	Echantillons		
	MT	MHL	MHE
01	2	1	3
02	3	1	2
03	3	1	2
04	1	3	2
05	3	1	2
06	3	1	2
07	3	1	2
08	3	1	2
09	3	1	2
Total classement	24	11	19
Classement	3	1	2

Les différences entre les totaux de classement par paires sont :

$$MT - MHL = 24 - 11 = 13$$

$$MT - MHE = 24 - 19 = 5$$

$$MHE - MHL = 19 - 11 = 8$$

La valeur critique calculée est de 10 (09 dégustateurs et 03 échantillons, pour $p < 0,05$) (Tableau de l'annexe 3). Nous considérons que la différence est significative si l'effectif issu de la soustraction ou différence entre les totaux de classements par paires est supérieure à 10.

Les différences entre les totaux de classements par paires, montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre le goût des margarines témoin (MT) et aux huiles essentielles encapsulées (MHE) et celui des margarines aux huiles essentielles libres (MHL) et aux huiles essentielles encapsulées (MHE). En revanche, il ya une différence significative entre le goût de la margarine témoin (MT) et des margarines aux huiles essentielles libres (MHL).

Les dégustateurs ont classé le goût des margarines par ordre de préférence, en attribuant le premier rang pour la margarine aux huiles essentielles libres, suivie de la margarine aux huiles essentielles encapsulées en deuxième rang, et la margarine témoin en troisième rang.

3.2.3. Test hédonique

Les résultats du test hédonique sont représentés dans la figure 27 :

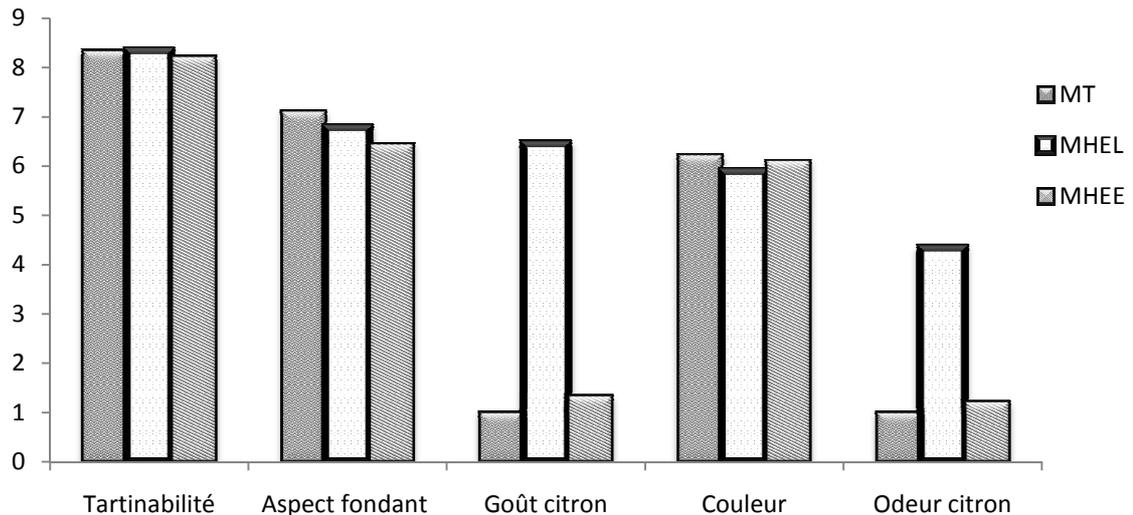


Figure 27. Test hédonique des margarines élaborées.

Le test ANOVA n'a révélée aucune différence significative entre les trois margarines pour la tartinabilité, l'aspect fondant et la couleur. Cependant, une différence significative a été signalée pour le goût et l'odeur du citron entre la margarine témoin (MT) et la margarine aux huiles essentielles encapsulées (MHE) et la margarine aux huiles essentielles libres (MHL).

A l'issu des résultats obtenus, nous pouvons résumer les caractéristiques des margarines formulées comme suite :

La margarine témoin et la margarine aux huiles essentielles encapsulées sont des margarines tartinables avec un aspect fondant et une couleur caractéristique de la margarine. Le goût et l'odeur du citron sont absents dans la margarine témoin et sont négligeables dans la margarine aux huiles essentielles encapsulées (MHE).

La margarine aux huiles essentielles libres (MHL) est comparable à la margarine témoin concernant la tartinabilité, l'aspect fondant et la couleur, avec présence du goût et d'odeur du citron.

**CONCLUSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Nous rappelons que les principaux objectifs visés de ce travail sont d'évaluer, dans un premier temps, le pouvoir antioxydant (inhibition de la peroxydation lipidique, piégeage des radicaux libres, réduction et chélation du fer) et le pouvoir antimicrobien (antibactérien et antifongique) des huiles essentielles du citron dans leur état libre. Dans un deuxième temps, évaluer le pourcentage d'encapsulation des huiles essentielles ayant donné le meilleur potentiel antioxydant dans la silice amorphe dont le but est de pallier au problème de leur instabilité. Dans un troisième temps, tester le pouvoir antioxydant des huiles essentielles dans leur état encapsulé avec les mêmes tests (cités ci-dessus). Dans un dernier temps, appliquer ces huiles encapsulées dans la margarine allégée et suivre sa stabilité oxydative. En parallèle, des margarines témoins ont été élaborées. Pour atteindre ces objectifs, plusieurs paramètres ont été testés notamment la variété, le mode d'extraction, le pouvoir antioxydant, le pouvoir antimicrobien, l'encapsulation, l'efficacité de l'encapsulation, la formulation de margarines, le test de stabilité de margarine et le test sensoriel.

Les principaux résultats obtenus montrent que l'hydrodistillation est le procédé ayant donné un meilleur rendement en huiles essentielles à partir du zeste de *Citrus limon* pour les deux variétés étudiées (*Eureuka* et *Lisbon*). Un effet marquant de la variété et du mode d'extraction a été enregistré sur la composition des huiles essentielles extraites, avec une dominance du limonène suivi de l' α -pinène, l' α -citral et le γ -terpinène.

L'activité antioxydante des huiles extraites a donné des résultats comparables à ceux des standards testés et cela pour le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique, le pouvoir de piégeage des radicaux libres et le pouvoir réducteur. L'activité chélatrice des huiles extraites n'est pas intéressante par comparaison au pouvoir chélateur de l'EDTA.

Concernant l'effet antimicrobien, toutes les souches microbiennes testées ont montré une sensibilité aux huiles essentielles testées. Les paramètres microbiologiques étudiés (CMI et CMB) ont donné des valeurs correspondantes à une activité antibactérienne plus intéressante pour les bactéries Gram positif que pour les bactéries Gram négatif. Les valeurs des CMI et CMF traduisent une activité antifongique non négligeable.

D'une manière générale, les huiles extraites par pression à froid ont révélé des activités biologiques (activité antioxydante et antimicrobienne) plus importantes que celles des huiles extraites par hydrodistillation, cela peut être attribué à la teneur élevée en limonène responsable de ces activités.

L'encapsulation des huiles essentielles extraites par pression à froid de la variété *Euréka* (ayant donné le meilleur pouvoir antioxydant par rapport aux autres huiles extraites) a montré une efficacité d'encapsulation importante, équivalente à 95,87%. Les résultats des analyses par MEB et ATR ont montré l'absence d'interaction entre les huiles essentielles et les silicates (SiO₂). L'analyse thermogravimétrique a révélé une résistance thermique importante des huiles encapsulées par rapport aux huiles essentielles libres. Les valeurs du pouvoir antioxydant des huiles encapsulées et libres sont similaires ($p < 0,05$).

L'application des huiles essentielles libres et encapsulées à la margarine allégée n'a pas modifié ses caractéristiques physico-chimiques par rapport à la margarine témoin (sans huiles essentielles). Les résultats de la résistance à l'oxydation forcée ont montré que les huiles essentielles encapsulées ont une résistance comparable à celle du témoin (margarine avec α -tocophérol). En revanche la margarine aux huiles essentielles libres a donné une période d'induction moins importante. Cela nous a permis de confirmer la résistance des huiles essentielles encapsulées aux conditions du test Rancimat par comparaison aux huiles libres.

L'analyse sensorielle a montré que les dégustateurs ont préféré la margarine aux huiles essentielles libres, vient en deuxième position la margarine aux huiles essentielles encapsulées et enfin la margarine témoin. Donc, il est intéressant de procéder à l'élaboration d'une margarine aux huiles essentielles du citron quelque soit leur état (libres ou encapsulées).

Concernant les différentes perspectives de ce travail, il serait intéressant d'exploiter les activités antibactériennes et antifongiques révélées de ces huiles essentielles dans le domaine de l'industrie agroalimentaire, d'étudier les interactions entre les composés des huiles essentielles et la matrice alimentaire, de faire une étude sur la libération contrôlée des huiles essentielles encapsulées et d'évaluer le coût pour une éventuelle application industrielle.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Adams R. P., 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
2. AFNOR, 1982. Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits. Ed. AFNOR, 325 p.
3. AFNOR. 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
4. Aidi Wannas W., Mhamdi B., Sriti J., Ben Jemia M., Ouchikh O., Hamdaoui G., Kchouk M.E., et Marzouk B., 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology* 48 : 1362–1370
5. Ait Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., & Conchello, P., 2012. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea* and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45, 313–319.
6. Akdim L., 2016. Comparaison de méthodes d'absorption et d'encapsulation de l'huile essentielle de *Copaifera Officinalis* L. en vue d'une application en cosmétique. Mémoire de master bioingénieur en sciences agronomiques, université Gembloux Agro-Bio Tech. 55p.
7. Allaf K., 1989 : Nouveau procédé de traitement par détente instantanée contrôlée de produits biologiques divers en vue de leur déshydratation. Recherche exploratoire. Abondement ANVAR – Gradient Publication de l'université de technologie de Compiègne N° SE/89/346. Rapport intermédiaire, décembre 1989.
8. Allaf K., Louka N., Bouvier J.M., Parent F. et Forget J.M., 1994. Procédé de traitement de produits biologiques en vue de la modification de leur texture, installations pour la mise en oeuvre d'un tel procédé et produits ainsi réalisés, French patent n° 93/09728, 1993, International extension PCT FR 94/00975, 1994.
9. Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., 2004. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species L(Famille des Lamiaceae). Thèse de Doctorat d'état, UFA-Sétif, Algérie
10. Amarti F. El, Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Farah A., Khia A., Guedira A., Rahouti M., Chaouch A., 2011. Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis* du Maroc, *Phytotherapie*, 9 : 149– 15

11. Anal A.K. et Singh H., 2007. Recent advances microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Food Science and Technology*, 18 :240-251.
12. Andrews N., 2011. Advantages & Disadvantages of Spray Drying.
13. Annan N.T., Borza A.D., Truelstrup et Hansen L., 2008. Encapsulation in alginate coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic bifidobacterium adolescentis 15703T during exposure to simulated gastro intestinal conditions. *Food Research International*, 41, 184-193.
14. Anwar S.H. et Kunz B., 2011. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. *Journal of Food Engineering*, 105 (2), 367-378.
15. Ao Y., Satoh K., Shibano K., Kawahito Y., Shioda S. 2008. Singlet oxygen scavenging activity and cytotoxicity of essential oils from rutaceae. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 43(1) pp. 6–12
16. Atwal JK, Singh KK, Tessier-Lavigne M, Miller FD, Kaplan DR., 2003. Semaphorin 3F antagonizes neurotrophin-induced phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase signaling: a mechanism for growth cone collapse. *J Neurosci.*, 23: 7602-7609.
17. Avlessi, F., Dangou, J., Wotto, V.D., Alitonou, G.A., Sohounhloue, D.K., and Menut, C. 2004. Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. *Comptes Rendus Chimie* 1057-1061
18. Bachelot C., Blaise A., Corbel T. et Le Guernic A., 2006. Les huiles essentielles : extraction et comparaison. *U.C.O Bretagne* : 1-18
19. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils- A review. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 446-475.
20. Baljit S.G., Sandra D. et Suresh S.N., 2002. Lipid shortenings. *Food Research International* (35) : 1015–1048.
21. Barbeş L., Rădulescu C. et Stih C., 2014. ATR-FTIR spectrometry characterisation of polymeric materials. *Romanian Reports in Physics*, 66 (3), 765–777.
22. Baroghel-Bouny V., Mounanga P., Loukili A., et Khelidj A., 2002. From chemical and microstructural evolution of cement pastes to the development of autogenous deformations. *ACI's Fall Convention 2002*. Phoenix, Arizona-USA

23. Barros L, Cruz T, Baptista P, Estevinho LM et .Ferreira I, 2008., Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*
24. Belhattab R., 2007. Composition chimique et activité antioxydante, antifongique et anti aflatoxinogène d'extraits de *Origanum glandulosum Desf.* et *Marrubium vulgare* L (famille des Lamiaceae). *Thèse de doctorat d'état Dépt Biologie, UFA Setif.*
25. Benbrinis, S., 2012. Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. Mémoire de Magister en biochimie. Université Ferhat Abbas Sétif. Algérie.
26. Benov L. &Georgeiv N., 1994. The antioxidant activity of Flavonoids Isolated from *Coryluscolurna*. *Phytotherapy Research*. 8(2): 92-94.
27. Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R., 2007. Comparative evaluation of Fe(III) antiaflatoxinogène d'extraits de *Origanum glandulosum Desf* et *Marrubium vulgare* Agric. Food Chem. 54, 6303–6307
28. Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. *These de doctorat*, université de La Rochelle. 289p.
29. Beveridge TJ et Graham LL, 1991. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (55) : 684-705
30. Blancke R., 2001. Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed : Eugen Ulmer, Paris. 288 p.
31. Blanco Tirado, C., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y., Martinez, J. R. 1995. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gaschromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.A* 697, pp. 501–513.
32. Borgquist P., Nevsten P., Nilsson B., Wallenberg L.R. et Axelsson A., 2004. Simulation of the release from a multiparticulate system validated by single pellet and dose release experiments, *J. Controlled Release* 97 : 453–465.
33. Bouchonnet S., 2009. La spectrométrie e masse en couplage avec la chromatographie en phase gazeuse. Ed Tec et Doc, Lavoisier, Parie, 194p.
34. Boukhatem, M.N., Hamaidi, M.S., Saidi, F., Hakim, Y. 2010. Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue Nature et Technologie*, 03: 37-45

35. Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M., Costa M.M, Figueiredo A.C., Barroso J.G et Pedro L.G, 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*. (105) : 146-155
36. Bourgou S., Rahali F. Z., Ourghemmi I., Saidani Tounsi M., 2012. Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. *The Scientific World Journal*, 10 p.
37. Boti J.B., Muselli A., Tomi F., Koukoua G., N'Guessan T.Y., Costa J., Casanova J. 2006. Combined analysis of *Cymbopogon giganteus* Chiov. leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR. *C. R. Chimie* 9:164–168.
38. Brat P., 2001. Application d'un nouveau procédé d'extraction (jus, pulpe, huile essentielle) : La flash-Détente. Journée professionnelle Cirad-flhor – Conservation et transformation du fruits : nouveaux enjeux, nouvelles techniques. Montpellier – France. URL : <http://technofruits2001.cirad.fr/fr/brat.htm>.
39. Bruneton J., 1999. Pharmacognosie- Phytochimie- Plantes médicinales. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120 p.
40. Buchbauer G., 2010. Biological Activities of Essential Oils, In Baser K.H.C. et Buchbauer G. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America, pp.235 – 280
41. Buchbauer G. & Wallner I.M., 2016. *Encyclopedia of Food and Health*, Encyclopedia of Food and Health, 558-562.
42. Buchanan BB, Gruissem W, Russel LJ., 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MA, USA: American Society of Plant Physiologists.
43. Burt S., 2004.- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food and Microbiology*. 94: 223-253.
44. Caillet S. et Lacroix M. 2007. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*). pp. 1-8
45. Castilho, P., Liu, K., Rodrigues, A. I., Feio, S., Tomi, F., & Casanova, J., 2007. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Clinopodium ascendens* (Jordan) Sampaio from Madeira. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 139–144.
46. Cávar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A., & Bešta, R., 2008. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chemistry*, 111, 648–653.

47. Chami F., 2005. Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo* application dans la prophylaxie et le traitement de la *Candidose Vaginale* sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. *Thèse de doctorat*, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266 p.
48. Champagne CP, Fustier P, 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. (18) : 184-190
49. Choi JW , Wicker R, Lee SH, Choi KH, Ha CS et Chung I., 2009. Fabrication of 3D biocompatible/biodegradable micro-scaffolds using dynamic mask projection microstereolithography. *Journal of Materials Processing Technology*. 5494-5503
50. Chrysam M.M., 1985. Table spreads and shortenings. In T. H. Applewhite (Ed.), *Bailey's industrial oil and fat products*, New York: John Wiley and Sons (3) : 41-125.
51. Chrysam, M. M., 1996. Margarines and spreads. In Hui, Y. H. *Bailey's industrial oil and fat products*, (4th ed.) John Wiley and Sons Inc.
52. Chutia M., Bhuyan D.P., Pathak M.G., Sarma T.C. et Boruah P., 2009 : Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT Vol. 42*, pp : 777-780.
53. Ciriminna R., Pagliaro M., 2013. Sol-gel microencapsulation of odorants and flavors: opening the route to sustainable fragrances and aromas, *Chem. Soc. Rev.* 42 : 9243-9250.
54. Ciriminna R., Pagliaro M., 2013. Sol-gel microencapsulation of odorants and flavors: opening the route to sustainable fragrances and aromas, *Chem. Soc. Rev.* 42 : 9243-9250.
55. Comunian T.A., Thomazini M., Gouvea Alves A.J., de Matos Junior F.E., de Carvalho Balieiro J.C., Favaro Trindade C.S., 2013. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Research International*, 52: 373-379.
56. Cossut J., Defrenne B., Desmedt C., Ferroul S., Garnet S., 2002. *Les corps gras : entre tradition et modernité*. Ed : iaal, IAE. Lille, 111 p.
57. Costa R., Moggridge G.D. et Saraiva P.M., 2006. Chemical product engineering: an emerging paradigm within chemical engineering, *AIChE J.* 52 : 1976-1986.
58. Costa R., Elliott P., Saraiva P.M., Aldridge D., Moggridge G.D., 2008. Development of sustainable solutions for zebra mussel control through chemical product engineering, *Chin. J. Chem. Eng.* 16 : 435-440.

59. Craveiro A.A., Matos F.J.A., Alencar J.W. et Plumel M.M., 1989. Microwave oven extraction of an essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 4, 43-44.
60. Croteau R., 1977. Site of monoterpene biosynthesis in *Majorana hortensis* leaves. *Plant Physiol* 59: 519-520.
61. Croteau R. et Hooper C.L., 1978. Metabolism of monoterpenes: Acetylation of (-)-menthol by a soluble enzyme preparation from peppermint (*Mentha piperita*) leaves. *Plant Physiol* 61: 737-742.
62. Crouzet J., 1996, *Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur*, F 4 100, Paris,.
63. De Greyt W. O. et Huyghebaert A., 1993. Food and nonfood applications of milk fat. *Lipid Technol.*, (5) : 138-140.
64. De Kruif CG, Weinbreck F, de Vries R, 2004. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 340-349.
65. Débuigine G. et Couplan F., 2008. *Petit Larousse des plantes qui guérissent*. Ed : Larousse, Paris. 895 p.
66. Del Valle E.M.M., Galán M.A., Carbonell R.G., 2009. Drug delivery technologies: the way forward in the new decade, *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 : 2475–2486.
67. Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G: Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Inter J Food Microbiol.* 2002, 74: 10-109.
68. Desai K.G.H. et Park H.J., 2005. Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Drying Technol.* 23 : 1361–1394.
69. Di Pasqua N Hoskins G Betts and Mauriello G, 2006. Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media. *J. Agric. Food Chem* (7) : 2745–2749
70. Djouab A., 2007. Préparation et incorporation dans la margarine d'un extrait de dattes des variétés sèches. Mémoire de magister, Université M'Hamad Bouguerra-Boumerdes.
71. Dorman H.J. Et Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 88, pp : 308-316.
72. Droby, S., Eick, A., Macarisin, D., Cohen, L., Rafael, G., Stange, R., McColum, G., Dudai, N., Nasser, A., Wisniewski, M., Shapira, R., 2008. Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 386–396.

73. Dubois C., 2006. Les arbres fruitiers. Ed : Rustica, Paris. 127 p.
74. Dugo G. et Di Giacomo A., 2002. Contaminants in citrus essential oils. Ed : London and New York: Taylor & Francis, pp. 518–531.
75. Durvelle J.P., 1893. Fabrication des essences et des parfums : Extraction des essences et des parfums par distillation, par expression et par les dissolvants. J. Fritsch, Paris, 918p.
76. Durvelle J.P., 1930. Fabrication des essences et des parfums : Chimie des parfums. Desforges, Girardrot et Cie, Paris, 808p.
77. Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, C., García, D., & Pagán, R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896–902.
78. Fahrenfort J. 1961. Attenuated total reflexion: a new principle for the production of useful infrared reflection spectra of organic compound. *Spectrochim. Acta*, 17, 698–709.
79. Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. 2010. *Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions* .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157p.
80. Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., & Araújo, M. E. M., 2006. The in vitro screening for acetyl cholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 31–37.
81. Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr J* 23:213–26.
82. Finch C.A., Bodmeier R., 2000. Microencapsulation, in: Ullmann's Encyclopedia of Encyclopedia of Chemical Technology, pp. 438–463.
83. Fisher K. et Phillips C. 2008. Potentiel antimicrobien des huiles essentielles dans les aliments : le citron est-il la réponse ? A review. *Trends in Food Science and Technology*, 19, pp.156–164.
84. Formo M.W. 1979. Physical properties of fats and fatty acids. In : Swern D. (Ed.), *Bailey's industrial oil and fat products*, volume 1. Fourth edition. Wiley-Interscience : New-York, , 177-232
85. Franchomme, P.; Pénéol, D. 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445p.

86. Friedmann T.E., Lumsdon S.O. et Green J.H., 2009. Encapsulation of oils by coacervation, United States Patent 20090189304.
87. Funk et Wagnalls, 2004 : Encyclopédie britannique Funk & Wagnalls.
88. Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *FoodChem.*,102, pp. 898-904
89. Garg R, Patel RK, Jhanwar S, Priya P, Bhattacharjee A, 2011. Gene discovery and tissue-specific transcriptome analysis in chickpea with massively parallel pyrosequencing and web resource development. *Plant Physiol* 156: 1661–1678.
90. Garnéro J., 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalization. Ed : Techniques- Encyclopédie des médecines naturelles, Paris p. 2- 20.
91. Garrett, R. H. et. Grisham C. M. 2000. Biochimie. 2ième édition. Édité par De Boeck et Larcier. ISBN 2-7445-0020-8.
92. Gauthier, R., Gourai, M., Bellakhdar, J., 1988. A propos de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. var. *italica* récolté au Maroc. I. Rendements et compositions durant un cycle végétatif annuel. *Rev. Mar. Pharm.* 4, 97–116.
93. Genot C., Meynier A. et Riaublanc A., 2003. Lipid oxidation in emulsions. In : Kamal-Eldin, ed. *Lipid oxidation pathways*. Champaign : AOCS Press, 190-234.
94. Ghaisas M. M., Navghare V. V, Takawale A. R., Zope V. S., Deshpande A. D., 2008. In-vitro antioxidant activity of *tectona grandis* linn. *Pharmacologyonline* 3: 296-305.
95. Ghotra, B.S.; Dyal, S.D.; Narine, S.S, 2002. Lipid shortenings: A review. *Food Res. Int.*, 35, 1015–1048.
96. Girenavar B., Jayaprakasha G.K., Jadegoud Y., Nagana Gowda G.A., Patil B.S. 2007. Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. *Bioorg Med Chem.* 15(11) pp. 3684–91.
97. Gonny, M., Bradesi, P. & Casanova, J. 2003. Identification of the components of the essential oil from wild Corsian *Daucus carota* L. using ¹³C-NMR spectroscopy. *Flavour and Fragrance Journal* 19, 424–433
98. Griffin, S.G., Wyllie, S.G., Markham, J.L., Leach, D.N., 1999. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Frag. J.* 14, 322–332.
99. Groupe G.-M. et Brisset F., 2008. *Microscopie électronique à balayage et Microanalyses* EDP Sciences, Paris.

100. Guba, M. *et al.* A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 61, 5575–5579 (2001).
101. Guenther E., 1948. *The Essential Oils* -: D. Van Nostrand Co., New York, N.Y., 456p.
102. Guignard J.L., 2000. *Biochimie végétale*. 2ème Ed. De l'abrégé Dunod, Paris, pp.177-185.
103. Gumi T., Gascon S., Torras C., Garcia-Valls R., 2009. Vanillin release from macrocapsules, *Desalination* 245 : 769–775.
104. Halliwell B., 1996 : Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.*, Vol. 16, pp : 33–50.
105. Hammer K. A., Carson C. F., & Riley T. V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* Vol. 86, Issue 6: pp.985-990.
106. Hellal Z. 2011. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78 p.
107. Hili, P., Evans, C.S., Veness, R.G., 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, 269–275.
108. Himed L, Barkat M (2014). Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de Citrus limon. *Oilseeds Fats Crops Lipids* 21(1):A102
109. Iserin P., Masson M., Restellini J.P., Ybert E. et Moulard F., 1996. *Encyclopédie des plantes médicinales ; Identifications, Préparations, Soins*. Ed : Larousse-Bordas pour l'édition originale en langue française, France. 335 p.
110. ISO. 6886, 2006. Corps gras d'origines animale et végétale – Détermination de la stabilité à l'oxydation (essai d'oxydation accélérée). Deuxième édition : 1-14.
111. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK, 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, (73) : 285-290.
112. Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A., Schmidt, E., 2006. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *J.*

113. Kalembe D. et Kunicka A., 2003.- Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
114. Kandhro A., Sherazi S.T.H., Mahesar S.A., Bhangar M.I., Younis Talpur M. et Rauf A., 2008. GC-MS quantification of fatty acid profile including trans FA in the locally manufactured margarines of Pakistan. *Food Chemistry*. 109 : 207–211.
115. Karabulut I., Turan S. et Ergin G., 2004. Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. *Eur Food Res Technol*. 218:224-229.
116. Karleskind A., 1992. Manuel des Corps Gras. Ed.Tech & Doc,Paris, Tome 1 et Tome II.1579 p.
117. Keawchaon, L., & Yoksan, R., 2011. Preparation characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84, 163–171.
118. Kehal F., 2013. Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche. Mémoire de magister, INATAA, Université Constantine1.
119. Kelen, M. et Tepe, B., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Biores. Technol*. 99, 4096–4104.
120. Kerdudo A., Dingas A., Fernandez X. and Faure C., 2014. Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chemistry*. 12- 19.
121. Kimball D.A., 1999. Citrus processing: A complete guide, 2ème édition, p: 435.
122. Klinkesorn U., Sophanodora P., Chinachoti P., Decker E.A., McClements D.J., 2006. Characterization of spray dried tuna oil emulsified in two layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer by layer deposition. *Food Research International*, 39: 449-457.
123. Kok L.L., Fehr W.R., Hammond E.G. et White P.J., 1999. *Trans*-Free Margarine from Highly Saturated Soybean Oil. *JAOCS*. 76 (10) : 1175-1181.
124. Kolhe P., Misra E., Kannan R.M., Kannan S. & Lieh-Lai M., 2003. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int. J. Pharm*. 259(1-2), 143-160.

125. Kuorwel K.K., Cran M.J., Sonneveld K., Miltz J. & Bigger S.W., 2011. Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films. *J. Food Sci.* 76(9).
126. Laia O.M., Ghazalia H.M., France C. et Chong C.L., 2000. Physical and textural properties of an experimental table margarine prepared from lipase-catalysed transesterified palm stearin: palm kernel olein mixture during storage. *Food Chemistry* (71) : 173-179.
127. Lamprecht A., Schäfer U. et Lehr C.M., 2001 Influences of process parameters on preparation of Microparticle used as a carrier system for 3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in Supplementary nutrition. *Journal of Microencapsulation*, 18 (3): 347-357.
128. Leclercq S., Milo C., Reineccius G.A., 2009. Effects of cross linking, capsule wall thickness, and compound hydrophobicity on aroma release from complex coacervate microcapsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1426-1432.
129. Lee J., Koo N. & Min D.B. 2006.- Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 1: 21-33.
130. Leong, L.P., Shui, G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 76, 69–75.
131. Li Y., Fabiano-Tixier A.-S. et Chemat F., 2014. Essential Oils: From Conventional to Green Extraction. *In: Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. 9-21.
132. Liédana N., Marín E., Téllez C. and Coronas J., 2013. One-step encapsulation of caffeine in SBA-15 type and non-ordered silicas. *Chemical engineering journal* 223 :714-721.
133. López-Alarcón, C.; Denicola, A., 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta*, 76, 1–10.
134. Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. et Kefalas P., 2005. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*. (89) : 411-420.
135. Marchand L., 2002 : Cancer preventive effects of flavonoids – a review. *Biomed.Pharmacother.* Vol. 56, pp : 296–301.

136. Martin A., 2001. Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Paris : Tec & Doc, Lavoisier.
137. Martins I.M., Rodrigues S.N., Barreiro F. et Rodrigues A.E., 2009. Microencapsulation of thyme oil by coacervation, *J. Microencapsul.* 26 : 667–675.
138. Martins I.M., Rodrigues S.N., Barreiro M.F., Rodrigues A.R.E., 2010. Polylactide-based thyme oil microcapsules production: evaluation of surfactants, *Ind. Eng. Chem. Res.* 50 : 898–904.
139. Martins M.I., Barreiro M.F., Coelho M. et Rodrigues A.E., 2014. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. A review, *Chemical Engineering Journal* 245 : 191–200
140. Marucci M., Ragnarsson G., Nyman U., Axelsson A., 2008. Mechanistic model for drug release during the lag phase from pellets coated with a semi-permeable membrane, *J. Controlled Release* 127 : 31–40.
141. Mau, J.L., Ko, P.T., Chyau, C.C., 2003. Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Res. Int.* 36, 97–104.
142. Mayachiew P. et Devahastin S., 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology*, 41, pp. 1153-1159.
143. Mc. Nair H.M and Miller J. M., 1997. *Basic Gas Chromatography – Techniques in Analytical Chemistry*. A Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons, INC,.
144. McClements D. J. et Decker E. A., 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8) : 1270–1281.
145. Meilgaard M., Civille G.V. et Carr B.T., 1987. *Sensory Evaluation Techniques*. *Compte Rendu Chimie*..
146. Mengal P. et B. Mompon, 1994. Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. Brevet international, WO 94/26853.
147. Mengal P. et Mompon B., 1996. Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. Brevet Européen, EP 698 076 B1.
148. Michael H., 2009. Chemical product engineering-the third paradigm, *Comput. Chem. Eng.* 33 : 947–953.
149. Miller SP, Ramaswamy V, Michelson D, 2005. Patterns of brain injury in term neonatal encephalopathy. *J Pediatr* ;146: 453–60

150. Miller, H. E., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. Journal of American Oil Chemists' Society, 48, 91–97.
151. Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N., 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. J. Agric. Food Chem. 54, 5313–5322.
152. Minh Tu N.T., Thanh L.X., Une A., Ukeda H. et Sawamura M., 2002 : Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. Flavour Fragrance J. Vol. 17, pp : 169 – 174.
153. Mizuki, E., Akao, T., Saruwatari, T., 1990. Inhibitory effect of Citrus unshu peel on anaerobic digestion. Biol. Wastes 33, 161–168.
154. Mohammedi, Z. and Atik, F., 2011. Impact of Solvent Extraction Type on Total Polyphenols Content and Biological Activity from *Tamarixaphylla* (L.) Karst. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2, 609-615.
155. Molyneux P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH°) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin ; Journal of Sciences and Technologies, 26 (2): 211-219.
156. Morelli C.L., Mahrous M., Belgacem M.N., Branciforti M.C., Bretas R.E.S. & Bras J., 2015. Natural copaiba oil as antibacterial agent for bio-based active packaging. *Ind. Crops Prod.* 70, 134-141.
157. Moufida, S., Marzouk, B., 2003. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochem.* 62, 1283–1289.
158. Murcia M. A., Martinez-Tome M., Jiménez A. M., Vera A., Honrubia M. et Parras P., 2002. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *Journal of Food Protection*, (65) : 1614–1622.
159. Narce M, Poisson J-P, 2003. Novel PPAR γ -dependent and independent effects for thiazolidinediones. *Curr Opin Lipidol* 14:651–652
160. Naves Y.R., 1976 : *Parfums, Cosmétiques, savons*, Vol. 58, p. 105
161. Nébié RHC, Yaméogo RT, Bélanger A, Sib FS: Salicylate de méthyle, constituant unique de l'huile essentielle de l'écorce des racines de *Securidaca longepedunculata* du Burkina Faso. *C R Chimie.* 2004, 7: 1003-1006
162. Nguyen-Ngoc H. et Tran-Minh C., 2007. Sol-gel process for vegetal cell encapsulation, *Mater. Sci. Eng C – Biomimetic Supramol. Syst.* 27 : 607–611.

- 163.** Nikaido H, 2003. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*.
- 164.** Noor Lida H.M.D., Sundram K., Siew W.L., Aminah A. et Mamot S., 2002. TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* (79): 1137-1144.
- 165.** O'Brien R.D., 2009. *Fats and oils: formulating and processing for applications*. Ed: CRC Press, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York, 744p.
- 166.** Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (5), pp. 1046-1055
- 167.** Oussou K.R., 2009. Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.
- 168.** Oussou K.R., Youlou S., Kanko C., Tue Bi B., Kanko C., Boti J.B., Ahibo C. & Casanova J., 2010. Etude chimique bio-guidée de l'huile essentielle de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *European Journal of Scientific Research*. 1:50-59.
- 169.** Pagliaro M., 2009. *Silica-Based Materials for Advanced Chemical Applications*, RSC Publishing, Cambridge.
- 170.** Pasetta L., Simón-Gaudó E., Gracia-Gorría F. and Coronas J., 2016. Encapsulation of essential oils in porous silica and MOFs for trichloroisocyanuric acid tablets used for water treatment in swimming pools. *Chemical Engineering Journal* 292 : 28-34.
- 171.** Penuelas J., Asensio D., Tholl D., Wenke K., Rosenkranz M., Piechulla B. & Schnitzler J.P., 2014. Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant, Cell Environ.* 37(8), 1866-1891.
- 172.** Peppas N.A., Am Ende D.J., Controlled release of perfumes from polymers. II. Incorporation and release of essential oils from glassy polymers, *J. Appl. Polym. Sci.* 66 (1997) 509–513.
- 173.** Pérez-Limiñana M.A., Paya Nohales F.J., Aran Ais F., Orgilés Barcelo C., 2014. Effect of the shell forming polymer ratio on the encapsulation of tea tree oil by

- complex coacervation as a natural biocide. *Journal of Microencapsulation*, 31 (2): 176-183.
- 174.** Peyron L. et Richard H., 1992. Extraction des épices et herbes aromatiques et différents types d'extraits. *Epices et aromates*. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris. 108p.
- 175.** Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. & Roura S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*36, pp.679-684.
- 176.** Prakash M, Gershenfeld N, 2007. Microfluidic Bubble Logic. *Science (315)* : 832-835.
- 177.** Prior E., 2003. Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. In : Graille J, ed. *Lipides et corps gras alimentaires* : 87-147.
- 178.** Pulido, L Bravo, Saura-Calixto F, 2000. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J. Agric. Food Chem.*, (48) : 3396–3402
- 179.** Qv X.Y., Zeng Z.P. et Jiang J.G., 2011. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation methode and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*, 25 :1596-1603R
- 180.** Rao A.V. et Rao L.G., 2007 : Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.* Vol. 55, pp : 207 – 216.
- 181.** Rao, R., Sankar, K.U., Sambaiah, K., Lokesh, B.R., 2001. Differential scanning calorimetric studies on structured lipids from coconut oil triglycerides containing stearic acid. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 334–343
- 182.** Razafindrakoto, 1988. Teneurs en isotopes stables des précipitations et des eaux souterraines et leurs variations en France. Thèse de doctorat en Géologie appliquée. Hydrogéologie, Avignon
- 183.** Re R , Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A Yang M et Rice-Evans C, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine.* (26) : 1231-1237
- 184.** Rezzoug S.A., Louka N., Maache-Rezzoug Z., Nouviaire A. et Allaf K., 1998. Présentation du séchage couple à la texturation par détente instantanée contrôlée. Application aux produits agro-alimentaires en morceaux 10ème, pp : 319 – 324. rencontres scientifiques et technologiques des industries alimentaires, AGORAL, Ed. Lavoisier.

- 185.** Robert A. et Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- 186.** Rocha G.A., Favaro-Trindade C.S. et Grosso C.R.F., 2012. Microencapsulation of lycopene by spray drying : characterization, stability and application of microcapsules. *Food and Bioprocess Technology*, 90 (1) : 37-42.
- 187.** Roger F., 1974. Les industries des cors gras. Ed : Lavoisier. Paris, 283-291.
- 188.** Rouessac, F.; Rouessac, A.; Cruché, D.; Duverger-Arfulo, C.; Martel, A. 2009. *Analyse Chimique: Méthodes et Techniques Instrumentales*, 7th ed.; Dunod: Paris, France,
- 189.** Rožman T., Jeršek B., 2009. Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 93(1), pp.51-58
- 190.** Ruberto, G., Baratta, M.T., 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69, 167–174.
- 191.** Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S. et Radice M., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.* 91, 621–632.
- 192.** Saint Laumer D.J.Y., Frérot E. & Herrmann A., 2003. Controlled release of perfumery alcohols by neighboring-group participation. Comparison of the rate constants for the alkaline hydrolysis of 2-acyl-, 2-(hydroxymethyl)-, and 2-carbamoylbenzoates; *Helvetica Chimica Acta* 86: 2871-2899.
- 193.** Sajomsang, W.; Gonil, P.; Saesoo, S.; Ovatlarnporn, C. 2012. Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. *Int. J. Biol. Macromol* 50 : 263–269.
- 194.** Sanchez-Moreno C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. (8) : 121-137.
- 195.** Schmidt E., 2010. Production of essential oils. *Science, Technology, and Applications*. CRC Press: Boca Raton, FL, pp. 83–120.
- 196.** Sebaaly C , Greige-Gerges H, Stainmesse S, Fessi H et Charcosset C., 2016. Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method. *Food Bioscience*, (15)1-10.
- 197.** Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59, pp. 201–22.

- 198.** Silva C., Ribeiro A., Ferreira D., Veiga F., 2003. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 39 : 1–20.
- 199.** Siow L.F. et Ong C.S., 2013. Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation. *Food Processing & Technology*, 4 (1).
- 200.** Skold M, Karlberg AT, Matura M, Borje A., 2006. The fragrance chemical beta-caryophyllene-air oxidation and skin sensitization. *Food Chem Toxicol* 44: 538–545.
- 201.** Sleytr, U.B., Messner, P., 1988. Crystalline surface layers in prokaryotes. from the Canadian prairies. *Food Chem.* 84, 551–562.
- 202.** Smith, D.C., Forland, S., Bachanos, E., Matejka, M., Barrett, V., 2001. Qualitative analysis of citrus fruits extracts by GC/MS: an undergraduate experiment. *Chem. Educ.* 6, 28–31.
- 203.** Smith-Palmer A. , Stewart J., Fyfe L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogen . *Letters in applied Microbiology* (26) : 118-122
- 204.** Soares P. , Ermini L. , Thomson N., Mormina M. , Rito T. , Röhl A., Salas A. , Oppenheimer S., Macaulay V. et Richards M.B., 2009. Correcting for purifying selection: An improved human mitochondrial molecular clock *Am. J. Hum. Genet.*, (84) :740-759
- 205.** Soest J.J.G., 2007. Encapsulation of fragrances and flavours: a way to control odour and aroma in consumer products, in: R.G. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, Springer, Germany, p. 439.
- 206.** Soualeh N. et Soulimani R., 2016. Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 14:44-57
- 207.** Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M. and Lima E.O. 2006. Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, 87 (1), pp. 22-25.
- 208.** Spreen T., Dwivedi P, et Goodrich-Schneider R., 2010. Estimating the Carbon Footprint of Florida Orange Juice. *International European Forum*, February 8-12, 2010, Innsbruck-Igls, Austria100461, *International European Forum on Innovation and System Dynamics in Food Networks*.
- 209.** Svoboda K.P. et Hampson J.B. (1999) Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other

- related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.
- 210.** Tajkarimi M. M., Ibrahim S. A., et Cliver D. O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199–1218.
- 211.** Thies C., 2000. Microencapsulation, in: Inc John Wiley & Sons (Ed.) *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, , pp. 438–463.
- 212.** Thomas AP et RM Denton, 1986. Use of toluene-permeabilized mitochondria to study the regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase in situ. Further evidence that insulin acts through stimulation of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J.* (1): 93–101.
- 213.** Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., et CULLEN D. P. J., 2009. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 5987–6000
- 214.** Tranchant J., 2004. *Chromatographie en phase gazeuse. Techniques de l'Ingénieur*, PE 1485,.
- 215.** Trifkovic K.T., Milasinovic N.Z., Djordjevic V.B., Kalagasidis Krusic M.T., Knezevic Jugovic Z.D., Nedovic V.A., Bugarski B.M., 2014. Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) polyphenols. *Carbohydrate Polymers*, 111: 901-907.
- 216.** Turek C. et Stintzing F.C., 2013. Stability of essential oils: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12(1), 40-53.
- 217.** Ubbink J., Schoonman A., 2001. Flavor delivery systems, *Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol.* 11 : 527–563.
- 218.** Vierling E. 1999. *Aliments et boissons : Filières et produits*. Ed. Doin, France, 270 p.
- 219.** Wang B., Adhikari B. et Barrow C.J., 2014. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin sodium hexametaphosphate using complex coacervation. *Food Chemistry*, 158 : 358-365.
- 220.** Watts B.M., Ylimaki G.L., Jeffery L.E., Elias L.G., 1991. *Méthodes de base pour l'évaluation sensorielle des aliments*. Ed. Centre de recherches pour le développement, 143 p.
- 221.** Wei, A., Shibamoto, T., 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 54, 1737–1742.

- 222.** Weinbreck F., Wientjes R.H.W., Nieuwenhuijse H., Roijn G.W., de Kruif C.G. 2004. Rheological Properties of whey protein/gum Arabic coacervates. *Journal of Rheology*, 48 (6): 1215-1228.
- 223.** Wischke C., Schwendeman S.P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles, *Int. J. Pharm.* 364 : 298–327.
- 224.** Wolff, J.P., 1968. Manuel d'analyse des corps gras. Ed : Azoulay, Paris. 524p.
- 225.** Yeo Y., Bellas E., Firestone W., Langer R., Kohane D.S., 2005. Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 7518-7525.
- 226.** Yildirim A, Mavi A, Kara AA, 2001. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (8) : 4083–4089
- 227.** Zhang J. , Khvorostov I., Hong J.S. , Oktay Y., Vergnes L., Nuebel E. , Wahjudi P.N, Setoguchi K., Wang G. , Do A., 2011. UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells *EMBO J.*, 30 : 4860-4873
- 228.** Zhang K., Zhang H., Hu X., Bao S. et Huang H., 2012. Synthesis and release studies of microalgal oil containing microcapsules prepared by complex coacervation. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 89 : 61-66.
- 229.** Zidani S., 2009. Valorisation des pelures de tomates séchées en vue de leur incorporation dans la margarine. Mémoire de magister, Université M'Hamad Bouguerra- Boumerdes.

ANNEXES

Annexe 1

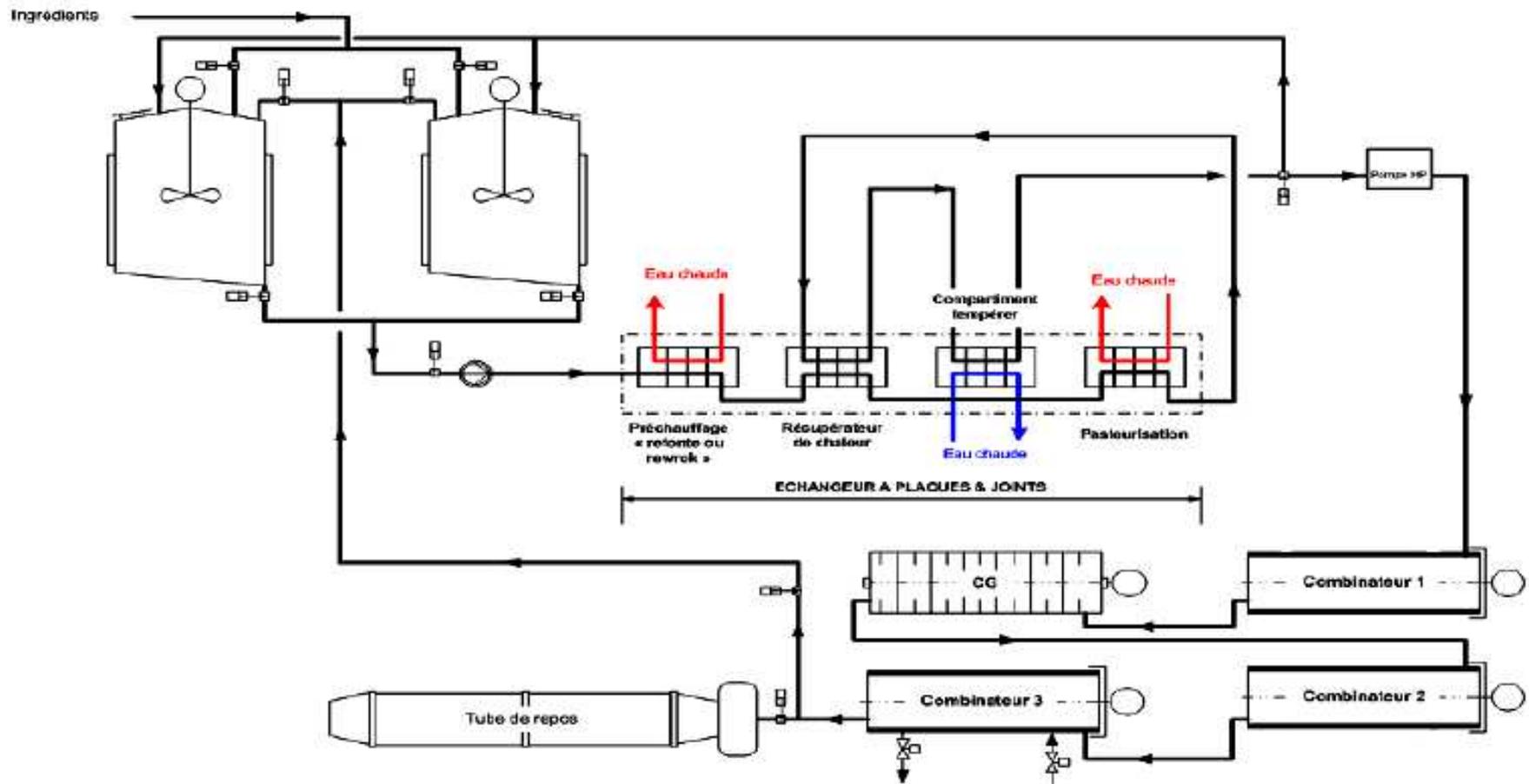


Schéma de e la chaîne pilote (schéma interne de l'entreprise Cevital Food SPA de Béjaia).

Annexe 2

Test binomial à une queue

n	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
5	0,000	0,031	0,298	0,656	0,964																								
6	0,000	0,049	0,279	0,600	0,818	0,001																							
7	0,000	0,071	0,273	0,479	0,333	0,045	0,001																						
8	0,000	0,095	0,232	0,258	0,088	0,020	0,003																						
9	0,000	0,124	0,157	0,113	0,040	0,014	0,005	0,001																					
10	0,000	0,158	0,166	0,101	0,041	0,013	0,005	0,002	0,001																				
11	0,000	0,195	0,174	0,104	0,043	0,015	0,006	0,003	0,002	0,001																			
12	0,000	0,234	0,189	0,107	0,046	0,016	0,007	0,004	0,002	0,001																			
13	0,000	0,274	0,201	0,110	0,049	0,017	0,008	0,005	0,003	0,002	0,001																		
14	0,000	0,314	0,218	0,115	0,052	0,018	0,009	0,006	0,004	0,002	0,001																		
15	0,000	0,354	0,234	0,119	0,055	0,019	0,010	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001																	
16	0,000	0,394	0,244	0,122	0,058	0,020	0,011	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001																	
17	0,000	0,434	0,244	0,125	0,061	0,021	0,012	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001																
18	0,000	0,474	0,244	0,128	0,064	0,022	0,013	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001																
19	0,000	0,514	0,244	0,131	0,067	0,023	0,014	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001															
20	0,000	0,554	0,244	0,134	0,070	0,024	0,015	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001															
21	0,000	0,594	0,244	0,137	0,073	0,025	0,016	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001														
22	0,000	0,634	0,244	0,140	0,076	0,026	0,017	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001														
23	0,000	0,674	0,244	0,143	0,079	0,027	0,018	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001													
24	0,000	0,714	0,244	0,146	0,082	0,028	0,019	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001													
25	0,000	0,754	0,244	0,149	0,085	0,029	0,020	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001												
26	0,000	0,794	0,244	0,152	0,088	0,030	0,021	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001												
27	0,000	0,834	0,244	0,155	0,091	0,031	0,022	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001											
28	0,000	0,874	0,244	0,158	0,094	0,032	0,023	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001											
29	0,000	0,914	0,244	0,161	0,097	0,033	0,024	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001										
30	0,000	0,954	0,244	0,164	0,100	0,034	0,025	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001										
31	0,000	0,994	0,244	0,167	0,103	0,035	0,026	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001									
32	0,000	1,000	0,244	0,170	0,106	0,036	0,027	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001									
33	0,000	1,000	0,244	0,173	0,109	0,037	0,028	0,025	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001								
34	0,000	1,000	0,244	0,176	0,112	0,038	0,029	0,026	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001								
35	0,000	1,000	0,244	0,179	0,115	0,039	0,030	0,027	0,025	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001							
36	0,000	1,000	0,244	0,182	0,118	0,040	0,031	0,028	0,026	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001							
37	0,000	1,000	0,244	0,185	0,121	0,041	0,032	0,029	0,027	0,025	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001						
38	0,000	1,000	0,244	0,188	0,124	0,042	0,033	0,030	0,028	0,026	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001						
39	0,000	1,000	0,244	0,191	0,127	0,043	0,034	0,031	0,029	0,027	0,025	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001					
40	0,000	1,000	0,244	0,194	0,130	0,044	0,035	0,032	0,030	0,028	0,026	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001					
41	0,000	1,000	0,244	0,197	0,133	0,045	0,036	0,033	0,031	0,029	0,027	0,025	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001				
42	0,000	1,000	0,244	0,200	0,136	0,046	0,037	0,034	0,032	0,030	0,028	0,026	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001				
43	0,000	1,000	0,244	0,203	0,139	0,047	0,038	0,035	0,033	0,031	0,029	0,027	0,025	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001			
44	0,000	1,000	0,244	0,206	0,142	0,048	0,039	0,036	0,034	0,032	0,030	0,028	0,026	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001			
45	0,000	1,000	0,244	0,209	0,145	0,049	0,040	0,037	0,035	0,033	0,031	0,029	0,027	0,025	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001		
46	0,000	1,000	0,244	0,212	0,148	0,050	0,041	0,038	0,036	0,034	0,032	0,030	0,028	0,026	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001		
47	0,000	1,000	0,244	0,215	0,151	0,051	0,042	0,039	0,037	0,035	0,033	0,031	0,029	0,027	0,025	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001	
48	0,000	1,000	0,244	0,218	0,154	0,052	0,043	0,040	0,038	0,036	0,034	0,032	0,030	0,028	0,026	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001	
49	0,000	1,000	0,244	0,221	0,157	0,053	0,044	0,041	0,039	0,037	0,035	0,033	0,031	0,029	0,027	0,025	0,023	0,021	0,019	0,017	0,015	0,013	0,011	0,009	0,007	0,005	0,003	0,002	0,001
50	0,000	1,000	0,244	0,224	0,160	0,054	0,045	0,042	0,040	0,038	0,036	0,034	0,032	0,030	0,028	0,026	0,024	0,022	0,020	0,018	0,016	0,014	0,012	0,010	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001

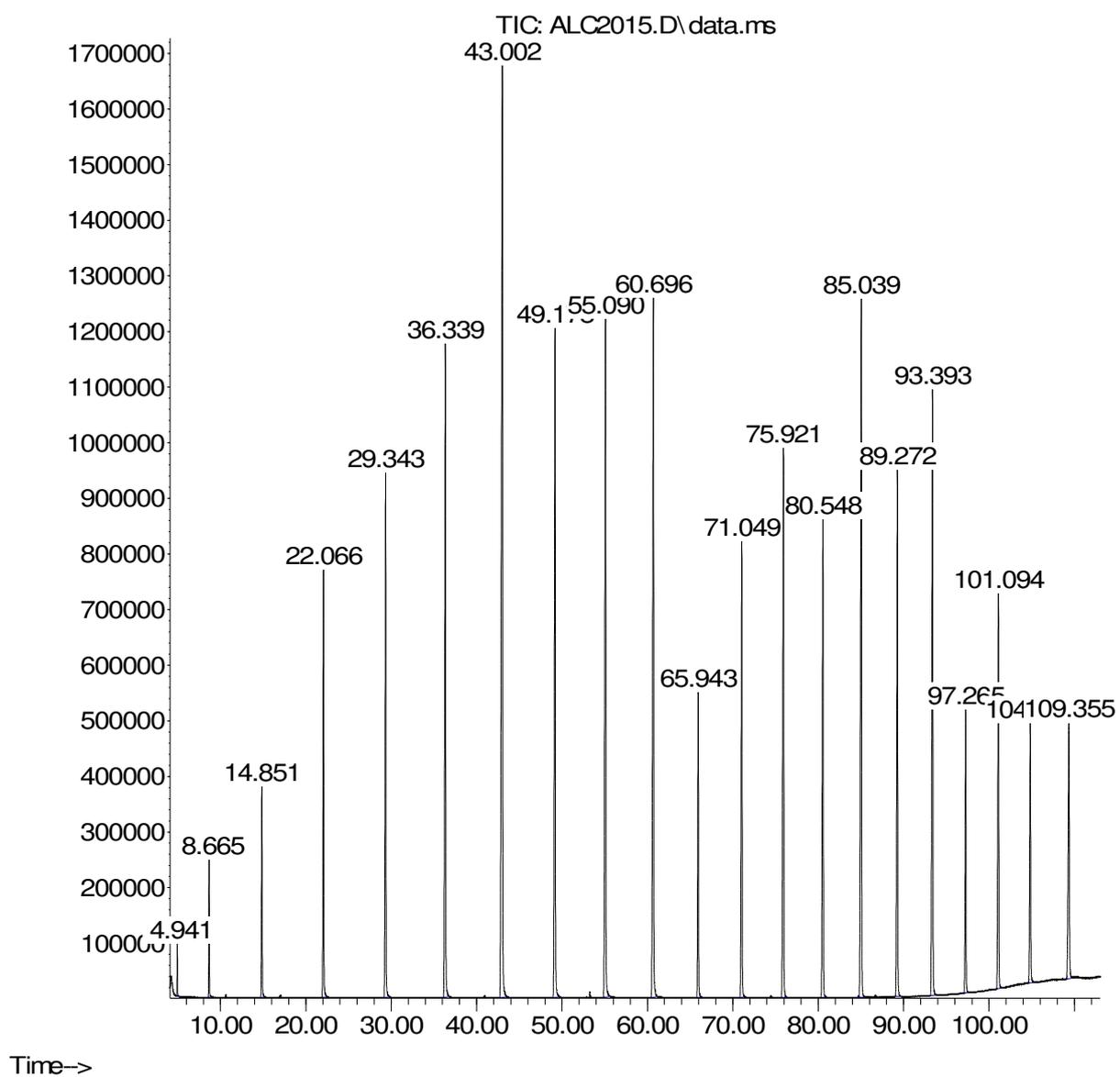
Annexe 3

Différences des sommes de classement par rang absolu critiques pour les comparaisons de
«tous les traitements» à un seuil de signification de 5 %

Dégustateurs (j)	Nombre d'échantillons									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
3	6	8	11	13	15	18	20	23	25	28
4	7	10	13	15	18	21	24	27	30	33
5	8	11	14	17	21	24	27	30	34	37
6	9	12	15	19	22	26	30	34	37	42
7	10	13	17	20	24	28	32	36	40	44
8	10	14	18	22	26	30	34	39	43	47
9	10	15	19	23	27	32	36	41	46	50
10	11	15	20	24	29	34	38	43	48	53
11	11	16	21	26	30	35	40	45	51	56
12	12	17	22	27	32	37	42	48	53	58
13	12	18	23	28	33	39	44	50	55	61
14	13	18	24	29	34	40	46	52	57	63
15	13	19	24	30	36	42	47	53	59	66
16	14	19	25	31	37	42	49	55	61	67
17	14	20	26	32	38	44	50	56	63	69
18	15	20	26	32	39	45	51	58	65	71
19	15	21	27	33	40	46	53	60	68	73
20	15	21	28	34	41	47	54	61	69	75
21	16	22	28	35	42	49	56	63	70	77
22	16	22	29	36	43	50	57	64	71	79
23	16	23	30	37	44	51	58	65	73	80
24	17	23	30	37	45	52	59	67	74	82
25	17	24	31	38	46	53	61	68	76	84
26	17	24	32	39	46	54	62	70	77	85
27	18	25	32	40	47	55	63	71	79	87
28	18	25	33	40	48	56	64	72	80	89
29	18	26	33	41	49	57	65	73	82	90
30	19	26	34	42	50	58	66	75	83	92
31	19	27	34	42	51	59	67	76	85	93
32	19	27	35	43	51	60	68	77	86	95
33	20	27	36	44	52	61	70	78	87	96
34	20	28	36	44	53	62	71	79	89	98
35	20	28	37	45	54	63	72	81	90	99
36	20	29	37	46	55	63	73	82	91	100
37	21	29	38	46	56	64	74	83	92	102
38	21	29	38	47	56	65	75	84	94	103
39	21	30	39	48	57	66	76	85	95	105
40	21	30	39	48	57	67	76	86	96	106
41	22	31	40	49	58	68	77	87	97	107
42	22	31	40	49	59	69	78	88	98	109
43	22	31	41	50	60	69	79	89	99	110
44	22	32	41	51	60	70	80	90	101	111
45	23	32	41	51	61	71	81	91	102	112
46	23	32	42	52	62	72	82	92	103	114
47	23	33	42	52	62	73	83	93	104	115
48	23	33	43	53	63	73	84	94	105	116
49	24	33	43	53	64	74	85	95	106	117
50	24	34	44	54	64	75	85	96	107	118
55	25	35	46	56	67	78	90	101	112	124
60	26	37	48	59	70	82	94	105	117	130
65	27	38	50	61	73	85	97	110	122	135
70	28	40	52	64	76	88	101	114	127	140
75	29	41	53	66	79	91	105	118	131	145
80	30	42	55	68	81	94	108	122	136	150
85	31	44	57	70	84	97	111	125	140	154
90	32	45	58	72	86	100	114	129	144	159
95	33	46	60	74	88	103	118	133	148	163
100	34	47	61	76	91	105	121	136	151	167

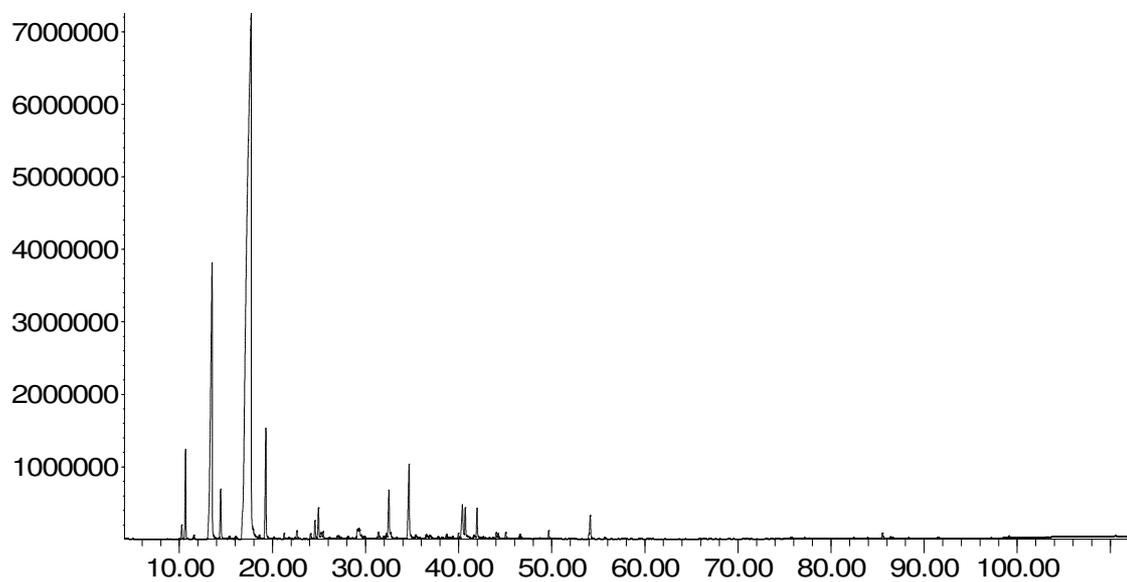
Annexe 4

Abundance



Spectre de la série des alcanes

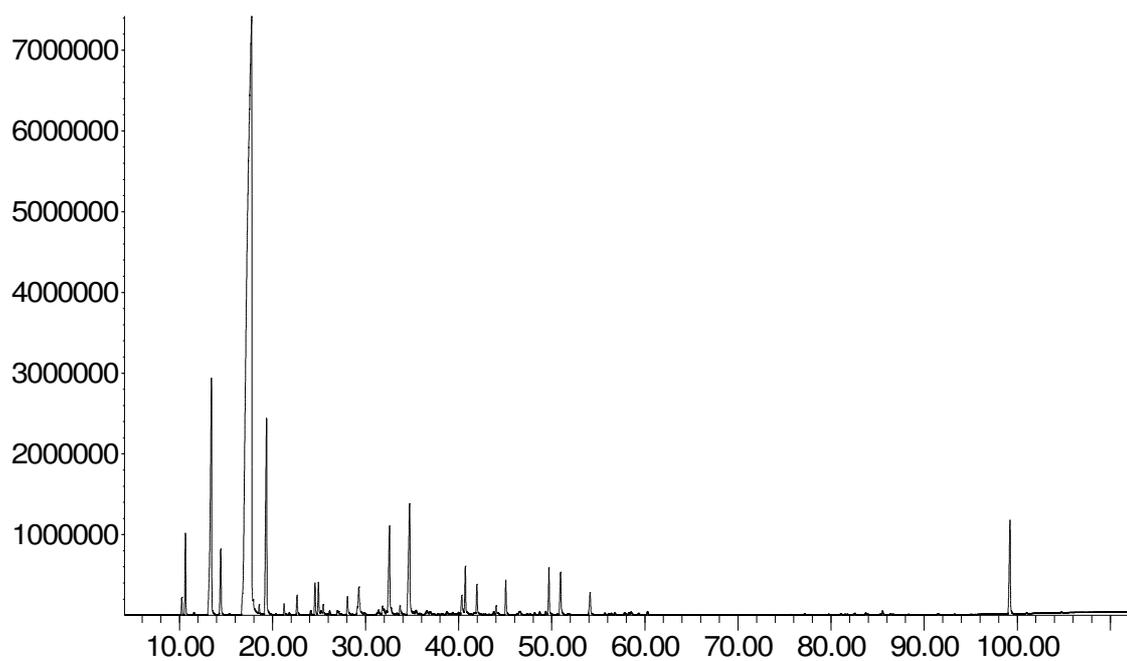
Abundance



Time-->

Spectre de l'huile essentielle de la variété *Eureka* extraite par hydrodistillation (HEH)

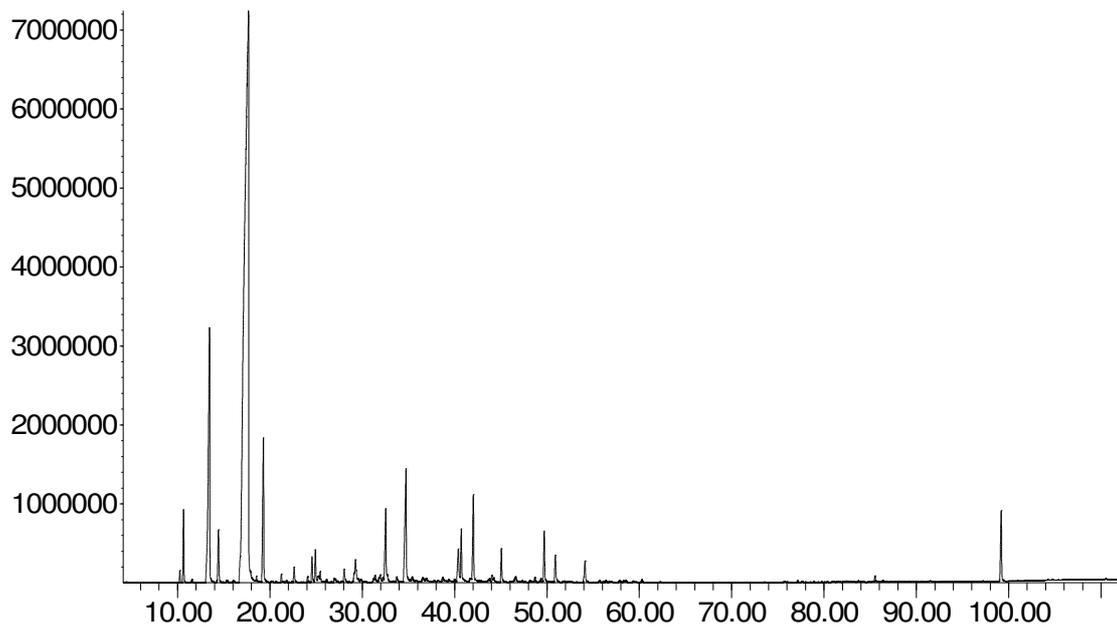
Abundance



Time-->

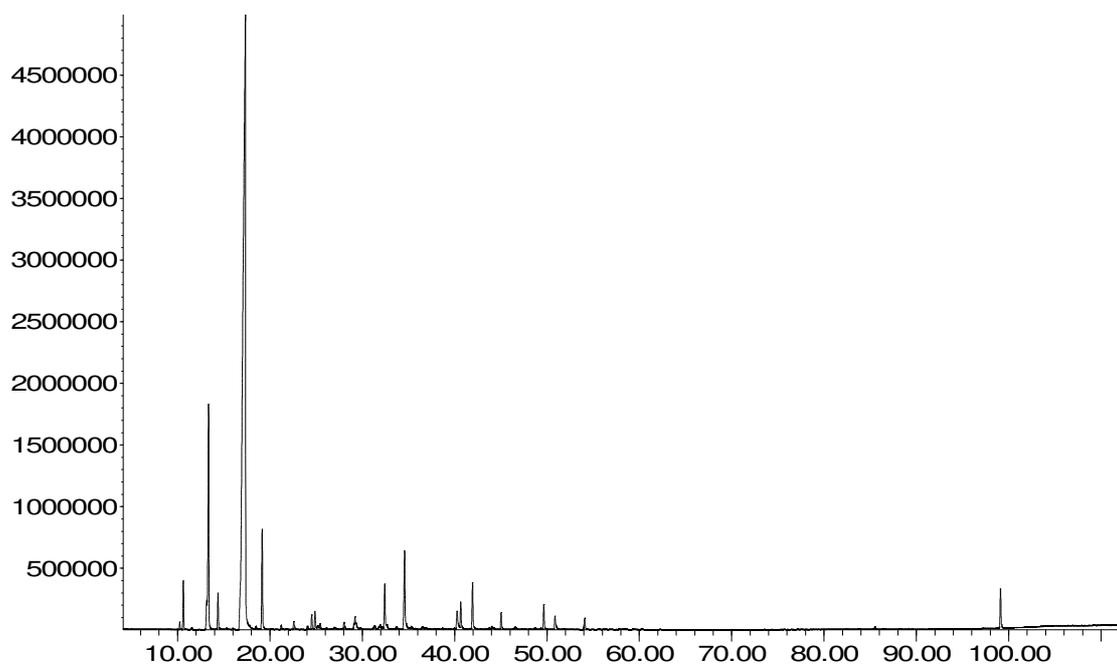
Spectre de l'huile essentielle de la variété *Eureka* extraite par pression à froid (HEP)

Abundance



Spectre de l'huile essentielle de la variété *Lisbon* extraite par hydrodistillation (HLH)

Abundance



Spectre de l'huile essentielle de la variété *Lisbon* extraite par pression à froid (HLP)

Full Length Research Paper

Chemical composition of *Citrus limon* (Eureka variety) essential oil and evaluation of its antioxidant and antibacterial activities

Himed Louiza^{1*}, Merniz Salah² and Barkat Malika¹

¹Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), INATAA, Université Constantine. 25000 Constantine, Algérie.

²Laboratoire de Physicochimie Analytique et Cristallographie de Matériaux Organométalliques et Biomoléculaires, Université des Frères Mentouri Constantine, 25000 Constantine, Algérie.

Received 22 September, 2016; Accepted 23 December, 2016

The study evaluates the chemical composition, antioxidant and antimicrobial effects properties of essential oil of *Citrus limon* (Eureka) extracted by hydrodistillation. The composition of this oil was analysed by GC/MS for 30 constituents, which accounted for 97.8% of total oil. The main components were limonene (61.3%) followed by β -pinene (9.7%), α -citral (4.2%) and α -terpinene (3.8%). Antioxidant activity of the *C. limon* essential oil was evaluated by using DPPH radical scavenging and β -carotene-linoleic acid bleaching. In both tests, the oil showed antioxidant property close to that of positive control (α -tocopherol). The essential oil was tested against nine bacteria (two Gram+: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and seven Gram-: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marescens*, *Proteus mirabilis*) by using disc diffusion and microdilution methods. *C. limon* essential oil showed antimicrobial effect against all microorganisms tested. Maximum activity (MIC = 180 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) was observed against *Staphylococcus aureus*.

Key words: Chemical composition, diffusion technique, microdilution technique, hydrodistillation, percentage of inhibition.

INTRODUCTION

Citrus is produced in abundance in several areas worldwide (Thomas and Spreen, 2010). The amount of residue obtained from *Citrus* fruits account for 50% of the original amount of the whole fruits (Chon and Chon, 1997). Essential oils have diverse and high biological

applications. For instance, they are used in the medical field like biocidal activities (bactericidal, virucidal and fungicidal) and medicinal properties (Mayaud et al., 2008). The use of essential oils as food preservatives has been described (Burt, 2004; Tiwari et al., 2009). Because

*Corresponding author. E-mail: himed.louiza@hotmail.fr. Tel: + 213 31 66 18 83.

of their complex chemical composition which composed of more than 100 different terpenic compounds, essential oils have a broad biological and antimicrobial activity spectrum (antibacterial, antifungal, antimoulds, antiviral, pest control, insect repellents).

Recently, the essential oils and various extracts of plants have been of great interest as they have been important sources of natural products. In order to prolong the storage stability of foods in industrial processing, synthetic antioxidants and antibacterials are used. Otherwise, side effects of some synthetic conservatives used in food processing have been documented (Ames, 1983; Baardseth, 1989). For this reason, governmental authorities and consumers are concerned about the safety of the food and potential effects of synthetic additives on human health (Reische et al., 1998).

Despite their wide uses and fragrances, essential oil constitutes an effective alternate to synthetic compounds produced by chemical industry without having any side effects (Faixova and Faix, 2008). The objective in this present study is to evaluate the antioxidant and antibacterial properties of essential oil of *Citrus limon* (Eureka variety) extracted by hydrodistillation.

MATERIALS AND METHODS

Essential oil

Process of extraction

The essential oil of *C. limon* (Eureka) peel is extracted by steam distillation for 2 h and 30 min using a Clevenger-type apparatus. The supernatant was separated by decantation after addition of 50 % NaCl. The essential oil was collected, dried over anhydrous sodium sulfate, and stored in glass vials covered with aluminum foil at 4°C until used.

Gas chromatography-mass spectrometry

The essential oils were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) (using a DB-5 fused-silica-capillary column polar (30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness). The oven temperature program was 60°C and held for 8 min, then increased from 45 to 250°C at a rate of 2°C/min which was held at 250°C for 20 min. Helium gas was used as the carrier gas at a constant flow rate of 3 ml/min. Injector and MS transfer line temperatures were set at 250°C and 280°C, respectively. The temperature of electronic impact at 70 eV source was 230°C. Samples (0.2 µl) were injected at 250°C at a split ratio 50:1. Identification of the components was made by determination of their retention indices (KI) relative to homologous series of n-alkanes (C₈-C₂₈) (Fluka, Buchs SG, Switzerland) by matching recorded mass spectra with those stored in spectrometer database (NIST MS Library v. 2.0) and bibliography (Adams, 2001). Component relative percentages were calculated based on GC peak areas.

Evaluation of the antioxidant and antiradical activities

Scavenger effect on DPPH

The ability of the essential oil to donate hydrogen atom or electron

and scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical was determined by slightly modified method of Brand (Brand-Williams et al., 1995). The concentrations of the tested essential oil ranged from 2 to 0.05 mg/ml. A portion of sample solution (200 µl) was mixed with 3 ml of 5.25 × 10⁻⁵ mol/l DPPH in absolute ethanol. The decreasing absorbance of the tested mixtures was monitored every 1 min for 30 min at 515 nm using ultraviolet and visible (UV-Vis) spectrometer.

Absolute ethanol was used to zero the spectrophotometer. The DPPH solution was used as a blank sample and α-tocopherol was used as a positive probe. The radical scavenging activity of the tested essential oil, expressed as percentage inhibition of DPPH, was calculated according to the following formula:

$$IC (\%) = [(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$$

Where, A_t is the absorbance value of the tested sample and A₀ is the absorbance value of the blank sample, in a particular time (t). The percentage of inhibition was plotted after 30 min against concentration, and the equation for the line was used to obtain the IC₅₀ value.

B-carotene bleaching assay

Antioxidant capacity is determined by measuring the inhibition of the volatile organic compounds and the conjugated diene hydroperoxides arising from linoleic acid oxidation (Dapkevicius et al., 1998). A mixture of 2 mg β-carotene and 25 µl linoleic acid was prepared in 10 ml of chloroform and 200 mg Tween 40. The chloroform evaporated completely at 40°C under vacuum. 50 ml of oxygenated distilled water was subsequently added to the residue and mixed gently to form a yellowish emulsion. The essential oil and α-tocopherol (positive control) were individually dissolved in methanol (2 mg/ml), 350 µl volumes of each were added to 5 ml of the above emulsion in test tubes and mixed thoroughly. The test tubes were incubated in a water bath at 50°C for 2 h together with a negative control (blank) which contained the same volume of methanol instead of the essential oil. The absorbance values were measured at 470 nm on an ultraviolet and visible (UV-Vis) spectrometer. The antioxidant activities (inhibitions percentage, I%) of the samples were calculated using the following equation :

$$A_{\beta\text{-carotene after 2h assay}} / A_{\text{initial } \beta\text{-carotene}} \times 100$$

Where, A_{β-carotene after 2 h assay} is the absorbance value of β-carotene after 2 h assay remaining in the sample and A_{initial β-carotene} is the absorbance value of β-carotene at the beginning of the experiments.

Antimicrobial activity

Bacterial strains

The essential oil was tested against nine strains of food borne pathogenic bacteria: two Gram+: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and seven Gram-: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis*. Bacterial strains were cultured overnight at 37°C on Mueller Hinton broth and adjusted to a final density of 10⁶ CFU/ml, used as an inoculum.

Diffusion assay

In vitro, antibacterial activity of the essential oil was evaluated against the nine bacterial strains by the disk diffusion method (Rota

et al., 2004). The test was performed in sterile Petri dishes containing solid and sterile Mueller-Hinton agar medium. The essential oil (5 μ l) absorbed on sterile paper discs (Whatman disc of 6 mm diameter), were placed on the surface of the media previously inoculated with 100 μ l of microbial suspension (10^6 CFU/ml), then the Petri dishes were incubated at 37°C for 24 h after staying at 4°C for 2 h. The inhibition zone diameters around each of the disks (diameter of inhibition zone including the disc diameter) were measured in millimeters.

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)

The minimal inhibition concentration (MIC) values were studied for the bacterial strains which were sensitive to essential oil in disc diffusion assay. Minimal inhibition concentration (MIC) values were determined by broth micro dilution method (Carson and Riley, 1995). The test was performed in Mueller Hinton broth (MHB) supplemented with Tween 80 (concentration of 0.5% (v/v) and 1 ml of different concentrations of essential oil (1000 to 10 μ g/ml with a range of 10 μ g/ml) diluted in DMSO).

Bacterial strains were cultured overnight at 37°C in Mueller Hinton Agar (MHA). Test strains were suspended in MHB to give a final density of 10^5 CFU/ml. The mixture (various dilutions of the essential oil + MHB + Tween 80) was placed in Petri dishes, after solidification bacterial strains are inoculated (1 μ l containing 10^5 CFU/ml) and the negative control was set up with it.

The MIC is defined as the lowest concentration of the essential oil at which the microorganism tested, does not demonstrate visible growth in the broth after 24 h of incubation at 37°C (Bassole et al., 2003). The MBC is the lowest concentration of essential oil inhibiting any growth visible to the naked eye after 5 days of incubation at 37°C (Mayachiew and Devahastin, 2008). The tests were performed in duplicate and were repeated twice.

Statistical analysis

The obtained yield, antioxidant and antibacterial results were stated in mean \pm standard deviation. Significant differences means were determined by Student t-test. Probability values lower than 5% were regarded as significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical composition of the essential oil

The oil extracted (2.04 \pm 0.34 %) is yellowish in color and has an aromatic odor characteristic of lemon. The yield cited by Himed and Barkat (2014) of the Eureka variety, extracted by cold pressure is 1.02 \pm 0.04%. The two yields represent a significant difference; this means that the method of extraction affects the yield.

Regarding the chemical composition of the essential oil tested, this was shown to be a complex mixture of many components. Table 1 show the identified 30 compounds which accounted for 97.8% of the total oil. The essential oil was dominated by limonene (61.3%) followed by β -pinene (9.7%), α -citral (4.2%) and α -terpinene (3.8%). Limonene concentration is an essential oil which may vary between 32 and 98%, and that depend on: 32 to 45% in bergamot, 45 to 76% in lemon and 68 to 98% in sweet orange (Moufida and Marzouk, 2003).

Antioxidant property

As shown in the Table 2, the free radical scavenging activity measured by DPPH assay of the essential oil tested is inferior to α -tocopherol with IC_{50} (1.01 \pm 0.420 and 0.78 \pm 0.130 mg/ml respectively). Oxidation of linoleic acid, in β -carotene/linoleic acid system, is effectively inhibited by the essential oil of *C. limon* with a value close to α -tocopherol (72.2 \pm 0.014% and 72.8 \pm 0.079% respectively). No significant differences were reported, it means that *C. limon* essential oil has significant antioxidant property close to that of α -tocopherol.

Wei and Shibamoto (2007) showed the presence of a significant antioxidant potential of essential oils rich in hydrocarbon monoterpenes (limonene and β -pinene). Ruberto and Baratta (2000) reported that γ -terpinene could also be taken into account for the antioxidative activity observed, which is for 3.8% oil studied. This activity can also be attributed to the presence of oxygenated sesquiterpenes (Cherrat et al., 2014). Aoyama et al. (1988) reported that terpenes showed a synergistic effect in antioxidant with other antioxidants.

Therefore, by inference the higher antioxidant activity in the essential oils might be due to their higher contents of terpenes (with basic structure of isoprene) (Mau et al., 2003). The aldehyde monoterpenes (citral) and hydrocarbon sesquiterpenes (trans-caryophyllene) were responsible for DPPH neutralization (Mimica-Dukic et al., 2004).

Antimicrobial property

The disc diameters of zone of inhibition (DIs), minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of *C. limon* essential oil for the bacteria tested are shown in Table 3. The correlation between the two different screening methods was examined, and generally have larger zones of inhibition correlated with lower MIC and MBC values.

The essential oil of *C. limon* showed inhibition zones against all microorganisms tested. This was confirmed by both MICs and MBCs data, where the essential oil exhibited significant antibacterial activity against the microorganisms tested, particularly against gram-positive bacteria (*S. aureus* and *B. cereus*) which have the lowest MIC (240 and 300 μ g.ml⁻¹ respectively). As cited by Burt (2004) and Hussain et al. (2010), the test Gram-positive bacteria were found to be more susceptible to antimicrobial agents than Gram-negative bacteria. The weaker antimicrobial activity against Gram-negative compared to Gram-positive bacteria is ascribed to the structure of their cellular walls mainly with regard to the presence of lipoproteins and lipopolysaccharides in Gram-negative bacteria that form a barrier to hydrophobic compounds (Inouye et al., 2001). It is well known that the composition, structure, as well as functional groups of

Table 1. Chemical composition of *Citrus limon* (Eureka variety) essential oil obtained by hydrodistillation.

N°	RT min	Compound	Area percentage (%)	I
1	10.243	α -Thujene	0.24	931.196
2	10.645	α - Pinene	1.47	938.523
3	13.452	β -Pinene	9.65	981.960
4	14.420	β -Myrcene	1.35	994.856
5	17.666	Limonene	61.26	1044.186
6	18.542	β -Ocimene	0.13	1056.486
7	19.292	γ -Terpinene	3.84	1066.498
8	21.232	α -Terpinolene	0.19	1090.692
9	22.621	Linalool	0.39	1108.870
10	24.073	Trans -Limonene oxide	0.15	1131.072
11	24.555	Cis-Citronellol	0.61	1138.016
12	24.926	Trans-Citronellol	0.78	1143.268
13	25.263	Camphor	0.26	1147.971
14	25.434	Citronellal	0.25	1150.334
15	28.039	α -Terpineol	0.37	1184.485
16	29.260	Linalyl propionate	1.07	1199.414
17	31.355	Trans-carveol	0.20	1231.182
18	31.940	Cis-Carveol	0.20	1240.145
19	32.541	Cis-Citral	2.39	1248.850
20	33.700	Geranial	0.17	1265.193
21	34.732	α -Citral	4.22	1279.279
22	40.394	Piperitenone oxide	1.11	1363.013
23	40.721	Neryl acetate	1.40	1368.244
24	42.023	β -Elemene	2.22	1386.968
25	44.021	Trans-caryophyllen	0.11	1417.241
26	45.063	Trans- α -bergamotene	0.85	1435.896
27	46.571	Germacrene	0.22	1460.544
28	49.705	γ -Cadinene	1.21	1501
29	50.906	Myristicine	0.81	1531.537
30	54.111	Caryophyllene oxide	0.71	1584.571

Table 2. Effects of *Citrus limon* essential oil and positive control (α -tocopherol) on DPPH and β -carotene/linoleic acid systems.

Parameters	Essential oil	α -tocopherol
DPPH assay (IC ₅₀ , mg/ml)	1.01 \pm 0.420	0.78 \pm 0.130
β -carotene – linoleic acid assay (I %)	72.81 \pm 0.014	73.18 \pm 0.079

essential oil play an important role in determining their antimicrobial activity. It has been demonstrated that, essential oils exercise their antimicrobial activity by causing structural and functional damages to the microbial cell membrane (Goni et al., 2009).

Limonene was present at a very high concentration in the *Citrus* essential oil. According to Espina et al. (2011), the greater antimicrobial activity of essential oil might not be attributed to limonene, but should be related to the

presence of other essential oil constituents; unlike Ruiz and Flotats (2014) who reported that, the documented antimicrobial effect of *Citrus* essential oil can be attributed to the essential oil or limonene as well, as its main component.

The strong antimicrobial activity of the essential oil against the susceptible microorganisms can be attributed to the presence of high concentration of monoterpenes (Reza et al., 2014), where 78.1% are monoterpenes in

Table 3. Antibacterial property of *Citrus limon* (Eureka) essential oil.

Bacteria tested	DI (mm)	MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	MIC/MBC
<i>Bacillus cereus</i>	14.5 \pm 0.710	210	260	1.23
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	16 \pm 0.130	180	180	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9.1 \pm 0.217	760	/	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8.9 \pm 0.801	790	/	/
<i>Salmonella enterica</i>	12.7 \pm 0.112	410	500	1.21
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10.1 \pm 0.621	620	620	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10.7 \pm 0.171	580	700	1.20
<i>Serratia marcescens</i>	11.2 \pm 0.431	500	640	1.28
<i>Proteus mirabilis</i>	9.8 \pm 0.278	700	/	/

DI (mm), Diameter of inhibition zones of essential oil including diameter of disc 6 mm; MIC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), minimum inhibitory concentration; MBC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$), minimum bactericidal concentration.

the essential oil of *C. limon* tested. Moreover, oxygenated monoterpenes might be involved in higher antimicrobial activity of studied essential oil. Some authors (Carson and Riley, 1995; Burt, 2004) have demonstrated that oxygenated monoterpenes had an important antimicrobial activity. Nevertheless, the antimicrobial activity of essential oil might also be due to the synergistic interaction of other constituents present in smaller amounts.

Conclusion

In conclusion, essential oil of *C. limon* (variety Eureka) is a rich source of antioxidant which can be used as powerful herbal antioxidant and the antibacterial property can be considered as an additional health promoting factor. Antioxidant and antibacterial properties are directly related to its chemical composition which is rich in monoterpenes.

Finally, this essential oil could play a beneficial role as a natural preservative ingredient in food and pharmaceutical industries.

Conflict of Interests

The authors have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Adams RP (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Illinois. Allured Publishing Corporation.
- Ames BM (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens: Oxygen radical and degenerative diseases. *Science* 221:1256-1263.
- Aoyama M, Maruyama T, Kanematsu H, Niiya, I, Tsukamoto M, Tokairin S, Matsumoto T (1988). Studies on the improvement of antioxidant effect of tocopherols. XVI. Synergistic effect of several spicy compounds. *Yukagaku* 37:356-359.
- Baardseth P (1989). Effect of selected antioxidants on the stability of dehydrated mashed potatoes. *Food Addit. Contam.* 6:201-207.
- Bassole IHN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traore SA (2003). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry* 62:209-212.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* 28:25-30.
- Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94:223-253.
- Carson CF, Riley TV (1995). Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* 78(3):264-269.
- Cherrat L, Espina L, Bakkali M, Pagán B, Laglaoui A (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 22:221-229.
- Chon R, Chon AL (1997). In: P. R. Ashurst (Ed.), *Subproductos del Procesado de frutas*. Acribia, Zaragoza. Pp. 213-228.
- Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linsse PH (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J. Sci. Food Agric.* 77:140-146.
- Espina L, Somolinos M, Lorán S, Conchello P, García D, Pagán R (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control* 22:896-902.
- Faixova Z, Faix SS (2008). Biological effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L. essential oil (A Review). *Univ. Vet. Med. Komenskho* 73:41-81.
- Goni P, Lopez P, Sanchez C, Gomez-Lus R, Becerril R, Nerin C (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 116(4):982-989.
- Himed L, Barkat M (2014). Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de *Citrus limon*. *Oilseeds Fats Crops Lipids* 21(1):A102.
- Hussain S, Jamil M, Ullah F, Khan A, Ullah F, Arfan M, Ahmad S, Khatoun L (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of the plant *Heliotropium strigo-sum*. *Afr. J. Biotechnol.* 9 (45):7738-7743.
- Inouye S, Yamaguchi H, Takizawa T (2001). Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J. Infect. Chemother.* 7(4):251-254.
- Mau JL, Ko PT, Chyau CC (2003). Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves. *Food Res. Int.* 36:97-104.
- Mayachiew P, Devahastin S (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Sci. Technol.* 41:1153-1159.

- Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G (2008). Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 47:1670-173.
- Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 54:5313-5322.
- Moufida S, Marzouk B (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry* 62(8):1283-1289.
- Reische DW, Lillard DA, Eitenmiller RR (1998). Antioxidants in food lipids. In: CC, Ahoh and DB Min (Eds.), *Chemistry, nutrition and biotechnology*. New York: Marcel Dekker. pp. 423-448.
- Reza S, Bahram D, Saeed G, Marzieh R, Gholam HV, Javad GY (2014). Chemical composition, antioxidant activity and antibacterial effect of essential oil of the aerial parts of *Salvia sclareoides*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7(Suppl 1):491-496
- Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *J. Food Prot.* 67:1252-1256.
- Ruberto G, Baratta MT (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69:167-174.
- Ruiz B, Flotats X (2014). *Citrus* essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. *Waste Manage.* 34:2063-2079.
- Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnell CP, Muthukumarappan K., Bourke P, Cullen PJ (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57:5987-6000.
- Wei A, Shibamoto T (2007). Antioxidant activities and volatile constituents of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 54:1737-1742.



Type of the Paper (Article)

Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation

Louiza HIMED^{1,*}, Salah MERNIZ^{2,3}, Malika BARKAT¹

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), INATAA, Université des frères Mentouri Constantine. 25000 Constantine, Algérie

² Centre de Recherches Scientifiques et Techniques en Analyses Physico-chimiques (CRAPC), BP 248, Alger RP 16004, Alger, Algeria.

³ Laboratoire de Physicochimie Analytique et Cristallographie de Matériaux Organométalliques et Biomoléculaires, Université des frères Mentouri Constantine, 25000 Constantine, Algérie

* E-Mail: himed.louiza@hotmail.fr ;

Tel.: + 213 31 66 18 83 ; Fax: +213 31 66 18 84

Received: 16/01/2016

/Accepted: 02/03/2016

Abstract: La présente étude porte sur l'évaluation des propriétés antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (Lisbon) extraite par hydrodistillation et analysée par GC-MS. Le pouvoir antioxydant est évalué par le test au DPPH et le test de blanchissement du β -carotène. L'activité antibactérienne vis-à-vis de neuf souches bactériennes (deux à Gram positif et sept à Gram négatif) est évaluée par la méthode des aromatogrammes et la méthode de dilution d'agar pour déterminer les CMI. L'extraction a donné un rendement moyen de $1,34 \pm 0,012\%$. Cette huile essentielle a montré des propriétés antioxydante et antibactérienne importantes. La concentration efficace qui réduit 50 % du DPPH en solution est de $0,09 \pm 0,001 \mu\text{g/ml}$ qui exprime une activité antioxydante plus importante que celle de α -tocopherol, ce résultat a été confirmé par le test de blanchissement du β -carotène. Les bactéries testées ont montré une sensibilité à l'huile essentielle. Ces activités sont liées à la richesse de l'huile essentielle en monoterpènes (81,01%).

Keywords: huile essentielle, *Citrus limon*, variété Lisbon, activité antioxydante, activité antibactérienne

I. Introduction

Au cours de ces dernières années, l'augmentation de la demande du consommateur pour des produits naturels sans conservateurs a conduit l'industrie agroalimentaire à envisager l'incorporation de substances naturelles.

Ainsi, les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. Elles font l'objet d'étude pour leur éventuelle utilisation comme antioxydants, antimicrobiens et donc comme conservateur naturel qui préserve l'aliment des différentes altérations oxydatives ou microbiennes [1].

Le citron est parmi les fruits les plus connus, cultivé aujourd'hui dans toutes les régions méditerranéennes. En industrie alimentaire, le citron est utilisé pour plusieurs applications ; dans la fabrication de son jus par exemple, l'écorce est éliminée complètement en constituant les déchets, en effet ces derniers peuvent être considérés comme un sous-produit qui est caractérisé par sa richesse en huile essentielle [2].

L'huile essentielle du citron sert à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraîchissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries [2].

C'est dans cette optique que se situe notre étude, qui se focalise sur la valorisation des sous-produits (zestes) d'agrumes par extraction de leurs huiles essentielles et l'évaluation de leurs activités antioxydante et antibactérienne.

II. Experimental Section

II.1.Extraction de l'huile essentielle

L'extraction d l'huile essentielle à partir du zeste frais de citron de la variété Lisbon (récolté le mois de mai 2014 dans la region de Takariet wilaya de béjaia) est effectuée par hydrodistillation (qui donne un rendement meilleur par rapport à l'extraction par pression à froid [3]). L'huile ainsi extraite est conservé dans des flacons opaques à 4°C.

II.2.Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

L'huile essentielle de *Citrus limon* a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse de type Hewlett-Packard GC-MS System (GC : 6800, MSD : 5973) en utilisant une colonne de silice capillaire fondue avec différentes phases stationnaires ; HP5MS (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm d'épaisseur de film). Les spectres GC-MS ont été obtenus en utilisant les conditions suivantes: gaz vecteur Hélium avec un débit de 0,5 ml/min; mode d'injection split; volume d'injection est de 0,2 µl; température d'injection est de 250°C; un programme de température du four est de 60°C pendant 8 min puis augmentée de 2°C /min jusqu'à 250°C et maintenu à 250°C pendant 10 min; le mode d'ionisation utilisé a été l'impact électronique à 70 eV.

La plupart des constituants ont été provisoirement identifiés par comparaison de leurs indices de rétention GC Kovats (I), déterminés en référence à une série homologue de C₅-C₂₈ n-alcanes. L'identification a été confirmée lorsque cela est possible par comparaison de leurs spectres avec ceux de la base de données MS (Wiley 2007) et avec les données de la littérature [4, 5].

II.3.Test de mesure du pouvoir antioxydant

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle extraite a été réalisée par deux tests chimiques : la mesure du pouvoir réducteur par le radical libre DPPH (2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl) et la dégradation du β-carotène en présence de l'acide linoléique.

II.3.1.Test au DPPH

L'activité antioxydante a été mesurée par la méthode DPPH (1,1-diphényle-2- picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par Archana *et al.* (2005) [6]. 100µl de l'échantillon à tester a été ajouté à 2,9ml de solution méthanolique DPPH (4 v/v). Après agitation par un vortex, le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 30 min et la densité optique a été mesurée avec un spectrophotometer UV-VIS (JENWAY 7305 Spectrophotometer: 42722) à 517 nm. Le contrôle négatif contient uniquement la solution de DPPH et le contrôle positif est représenté par des solutions d'antioxydant de référence ; α-tocophérol dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test. L'activité antioxydante est estimée en pourcentage d'inhibition ou pourcentage d'activité antioxydante, selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'activité antioxydante} = [(\text{Abs}_{\text{control négatif}} - \text{Abs}_{\text{test}}) / (\text{Abs}_{\text{control négatif}})] \times 100$$

Où Abs est l'absorbance à la longueur d'onde de 517 nm. Pour obtenir la concentration efficace (CE); différentes concentrations de l'échantillon à tester et de l'antioxydant de référence (0–1000 mg/ml) ont été préparées.

II.3.2.Test de blanchissement du β-carotène

Selon Kartal *et al.* (2007) [7], 0,5 mg de β-carotène sont dissous dans 1ml de chloroforme et additionnés à 200 mg de Tween 40 et 25 µl d'acide linoléique. Cette solution est évaporée jusqu'à disparition de l'odeur du chloroforme, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont

ajoutés et l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. 350µl de l'huile essentielle ou de l'antioxydant de référence (α-tocophérol) solubilisée dans du méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente. La décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350µl de méthanol) est mesurée à 490 nm par spectrophotométrie après 48 heures. Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = (\text{Abs}_{t=48h} / \text{Abs}_{t=0}) \times 100$$

Où $\text{Abs}_{t=0}$: absorbance initiale lue à 490nm de l'échantillon.

$\text{Abs}_{t=48h}$: absorbance lue à 490nm après 48h de l'échantillon.

II.4. Test de mesure du pouvoir antibactérien

II.4.1. Origine et choix des souches bactériennes

Les souches bactériennes choisies sont impliquées fréquemment dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires, nous avons sélectionné deux groupes de bactéries :

- Bactéries à Gram négatif (-) : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, et *Proteus mirabilis*.
- Bactéries à Gram positif (+) : (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213)

Ces souches nous ont été fournies par le service de Microbiologie du centre hospitalo universitaire de Constantine.

II.4.2. Test de l'activité antibactérienne par la méthode des aromatogrammes

La méthode de diffusion des disques appliquée sur milieu gélosé est celle décrite par Mayachiew et Devahastin (2008) [8]. Le principe de la méthode repose sur l'inhibition de la croissance microbienne dans la boîte de Pétri après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. En surfusion, 20ml de l'agar de Muller Hinton sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, 100µl de la suspension bactérienne à tester (10^8 CFU.ml⁻¹) sont étalés en surface. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Wattman №40 (6mm de diamètre) sont déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi, puis les imbibés par 5µl d'huile essentielle à tester. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1h pour que l'huile essentielle puisse diffuser puis incubées à 37°C pendant 24h.

L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de résistante (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm.

II.4.3. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB)

L'utilisation des huiles essentielles dans les produits alimentaires est souvent limitée par leurs effets indésirables (odeur forte, changement de goût) qu'elles peuvent engendrer dans l'aliment. Pour cette raison, il est nécessaire de déterminer la CMI (la concentration minimale inhibitrice) de l'huile essentielle capable d'inhiber la croissance de bactéries sans altérer les caractéristiques organoleptiques de l'aliment [9].

Les concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) sont estimées par la méthode de dilution d'agar. Cette méthode nous permet également de connaître la nature de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle (bactériostatique ou bactéricide).

Pour pouvoir obtenir différentes concentrations de l'huile essentielle (1000 µl/mg à 10µl/mg avec une marge de 10µl/mg), nous l'avons diluée dans le DMSO (diméthylsulfoxyde). Le DMSO est le solvant qui n'a prouvé aucun pouvoir antibactérien puissant [10].

Un volume de 19ml d'AMH fondus, additionnés de 0.5% (v/v) tween 80, ont été mis dans un tube à essai en lui rajoutant, aseptiquement, 1ml de chaque concentration d'huile essentielle.

Le mélange (différentes concentrations de l'huile essentielle+AMH+tween 80) est immédiatement coulé dans des boîtes de Pétri. Après solidification de la gélose, les boîtes de Pétri sont partagées en neuf parties dans les quelles sont mises les neuf souches bactériennes, sous forme de dépôts de 1µl contenant 10^{+5} UFC. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

Des témoins sont réalisés pour chaque souche. Le DMSO a été utilisé comme contrôle négatif.

La CMI représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'oeil nu après 24 heures d'incubation à 37°C [11]. Par ailleurs, la CMB représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'oeil nu après 5jours d'incubation à 37°C [8].

Le rapport CMB/CMI nous a permis de déterminer les pouvoirs bactéricide et bactériostatique de l'huile essentielle étudiée. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'huile essentielle a un pouvoir bactériostatique, et bactéricide quand il est inférieur ou égal à 4 [12].

II.5. Etude statistique

Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm l'écart type. L'étude statistique a été réalisée par le logiciel statistique XLSTAT V.7.1. en utilisant le test de Student et l'analyse de la variance (ANOVA) a un seule facteur. Les différences ont été considérées significatives au seuil de probabilité de 5 % ($p < 0,05$). La détermination de la concentration efficace (CE_{50}) a été effectuée en traçant la courbe du pourcentage de l'inhibition en fonction des concentrations.

III. Results and Discussion

III.1. Rendement d'extraction en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle de *Citrus limon* de la variété Lisbon, extraite par hydrodistillation est de 1, 34 \pm 0,012%. Jeannot et al. et Fuselli et al. [13, 14] ont observé des rendements allant de 0,7 à 0,9 % pour l'huile essentielle du citron. Cependant, Rega et al. [15] ont rapporté que les rendements en huile essentielle chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce et contre toute attente ont signalé des rendements de 1 à 3%. Himed et Barkat [3] ont observé un rendement de 2,18 \pm 0,04% pour l'huile essentielle de *Citrus limon* de la variété Euréka extraite par le même procédé, dans la même region et récoltée dans la même période. A 0,05 nous avons remarqué une différence significative entre les deux rendements. On peut en déduire que la variété a une influence sur le rendement.

III.2. Analyse de l'huile essentielle

La caractérisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) a été réalisée par GC-MS, 21 composants ont été séparés et identifiés (Tableau 1).

L'identification des composants a montré que l'huile essentielle de *Citrus limon* (Lisbon) a un taux élevé en Limonène (64,19%) suivi par β -Pinene (7,76%), α -Terpinene (5,45%) et Geranial (3,65%). Le composé majoritaire est le limonène, selon [16], sa concentration dans les huiles essentielles des *Citrus* varie de 32- 98% en dependant de la variété : 32-45% dans les bergamots, 45-76% dans le citron et 68-98% dans les oranges.

Tableau1. Composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation

N°	temps de retention (min)	Composés	Surface %	I
1	10,247	α -Thujene	0,31	931,196
2	10,650	α - Pinene	1,52	938,610
3	13,438	β -Pinene	7,76	981,766
4	14,433	β -Myrcene	1,64	995,024
5	17,742	Limonène	64,19	1045,348
6	19,359	α -Terpinene	5,45	1067,373
7	22,638	α -Terpinolene	0,45	1109,546
8	24,567	Cis -Limonene oxide	0,66	1138,187
9	24,929	Trans -Limonene oxide	0,63	1143,310
10	29,272	α -Terpineol	1,01	1199,558
11	32,570	Cis-Citral	2,69	1249,266
12	34,726	Geranial	3,65	1279,198
13	40,330	Piperitenone oxide	0,57	1361,643
14	40,711	Neryl Acetate	1,04	1361,966
15	41,955	β -Elemene	0,69	1386,005
16	44,018	Trans-Caryophyllen	0,15	1419,302
17	45,061	Trans - α - Bergamotene	0,74	1434,482
18	49,700	γ -Cadinene	1,04	1510
19	50,938	Myristicine	1,17	1532,083
20	54,113	Caryophyllene oxide	0,67	1584,603
21	99,222	Citronellyl Acetate	2,48	2552,941

III.3. Activité antioxydante et antiradicalaire

Le tableau 2 présente les concentrations efficaces de l'huile essentielle et d' α -tocophérol qui causent la réduction de 50% du DPPH°, ainsi que le pourcentage de l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique (%).

Comme figurant dans le tableau 2, l'huile essentielle extraite possède une capacité de neutralisation de DPPH° puissante en comparaison avec celle de l' α -tocophérol, qui sont respectivement $0,09 \pm 0,001 \mu\text{g/ml}$ et $0,138 \pm 0,002 \mu\text{g/ml}$.

Tableau 2. Activité antioxydante de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon)

	Huile essentielle	α -tocopherol
CE₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	$0,09 \pm 0,001$	$0,138 \pm 0,002$
Inhibition-de l'oxydation de l'acide linoléique (%)	$55,338 \pm 0,002$	$26,94 \pm 0,004$

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire [17]. Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques [18]. Les résultats signalés dans le tableau 2 confirment les résultats précédents du test de neutralisation de DPPH° concernant l'activité antioxydante de l'huile essentielle extraite qui est importante par rapport à celle de l' α -tocophérol.

Cette activité qui est attribuée à l'huile essentielle extraite de *Citrus limon*, semble être liée à sa composition. Wei et Shibamoto [19] ont remarqué une activité antioxydante importante des huiles essentielles riche en monoterpènes (71,95%) (limonene α - et β -pinene) et en sesquiterpène (2,57%) (trans-caryophyllene, β -Elemene, Caryophyllene oxide et γ -Cadinene).

III.4. Activité antibactérienne

III.4.1. Test de sensibilité

La méthode de diffusion en disques (Aromatogramme) sur milieu gelosé, nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *Citrus limon* (Lisbon) vis-à-vis des souches bactériennes testées, la sensibilité des souches est classée selon l'échelle de Ponce et *al.*, [20] et les diamètres des zones d'inhibition (y compris le diamètre des disques) sont indiquées dans le tableau 3.

Tableau 3. Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon)

Souches testées	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Sensibilité (Ponce et <i>al.</i> , [20])
<i>Bacillus cereus</i>	15 ± 1,41	Très sensible
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	13,33 ± 1,52	Sensible
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	9,5 ± 0,1	Sensible
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	8,8 ± 0,26	Sensible
<i>Salmonella enterica</i>	8,13 ± 0,32	Sensible
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,3 ± 0,36	Sensible
<i>Enterobacter aerogenes</i>	9,2 ± 0,2	Sensible
<i>Serratia marcescens</i>	11,4 ± 0,26	Sensible
<i>Proteus mirabilis</i>	9,8 ± 0,52	Sensible

D'après le tableau 3, nous constatons que les souches bactériennes testées sont sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle étudiée, nous constatons aussi que les souches Gram positif (*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) sont les souches les plus sensibles par rapport aux souches Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* et *Proteus mirabilis*). Cela est dû à la structure des bactéries Gram- qui comporte une membrane lipopolysaccharidique qui est considérée comme une barrière aux composés hydrophobe [21].

III.4.2. Evaluation des concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)

Avant d'utiliser une molécule antibactérienne comme conservateur dans un aliment, la concentration minimale inhibitrice (CMI) doit être estimée. Il est intolérable quand les doses antibactériennes efficaces dépassent les niveaux acceptables organoleptiques. Par conséquent, ces concentrations sont déterminées dans le but de définir les frontières de l'acceptabilité sensorielle et l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles [22].

La CMI représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 24 heures d'incubation à 37°C [11, 23]. Par ailleurs, la CMB représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 5 jours d'incubation à 37°C [8].

Le rapport CMB/CMI nous a permis de déterminer les pouvoirs bactéricide et bactériostatique de l'huile essentielle étudiée. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'huile essentielle a un pouvoir bactériostatique, et bactéricide quand il est inférieur ou égal à 4 [12].

Les valeurs de CMI, de CMB de l'huile essentielle extraite de zeste du *Citrus limon* (variété Lisbon) et le rapport CMB/CMI sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4. Concentrations minimales inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon)

Souches testées	CMI ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$)	CMB ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$)	CMB / CMI
<i>Bacillus cereus</i>	300	300	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	240	300	1,25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	500	700	1,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	500	500	1
<i>Salmonella enterica</i>	910	1000	1,09
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	650	650	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	400	900	2,25
<i>Serratia marcescens</i>	700	900	1,28
<i>Proteus mirabilis</i>	640	800	1,25

En se référant au tableau 4, nous constatons que toutes les souches ont été inhibées totalement à $1\ 000\ \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* sont les souches ayant une grande résistance par rapport aux autres souches testées (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213). Nous constatons aussi que les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Bacillus cereus*) sont les plus sensibles à l'huile essentielle étudiée par rapport aux bactéries Gram négatif avec des CMI de $240\ \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et $300\ \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ respectivement.

Après 5 jours d'incubation, quelques souches ont repris la croissance. C'est le cas d'*Enterobacter aerogenes* et de *Serratia marcescens*, qui ont été inhibées aux concentrations 400 et $700\ \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ respectivement après 24 heures d'incubation, et ont résisté à ces concentrations après 5 jours d'incubation.

D'après nos résultats, le rapport CMB/CMI est inférieur à 4, donc, en se référant à Canillac et Mourey [12], l'huile essentielle étudiée a un pouvoir bactéricide vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Il est bien connu que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est attribuée généralement aux monoterpènes ([24, 25]) qui sont présents dans l'huile de *Citrus limon* testée avec un taux majoritaire (81,01%).

IV. Conclusion

Ce travail s'est concentré sur la valorisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon). Son extraction par hydrodistillation a donné un rendement moyen de $1,34 \pm 0,012\%$. Cette huile a fait l'objet de l'évaluation de son activité antioxydante et antibactérienne vis-à-vis de neuf souches bactériennes (deux souches Gram positif et sept souches Gram négatif) ainsi que de l'analyse de ses composants par GC-MS. Cette dernière, nous a permis d'identifier 21 composants qui sont représentés par les monoterpènes (81,01%) et les sesquiterpènes (1,73%).

L'huile essentielle extraite a montré une bonne activité antioxydante par comparaison à celle du témoin positif (α -tocopherol) et une bonne activité antibactérienne vis-à-vis des neuf souches testées.

Remerciements

Nous remercions le staff du laboratoire BIOQUAL de l'INATAA de l'université de Constantine.

V. References

- [1] Dung N.T., Kim J.M. et Kang S.C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology* 46: (2008).3632-3639.
- [2] Robert A. et Lobstein A. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, (2005) 522 p.
- [3] Himed L. et Barkat M.. Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de *Citrus limon*. Oilseeds Fats Crops and Lipids (OCL). (2014) A102
- [4] Adams, R.P. Comparisons of the leaf essential oils of *Juniperus phoenicea*, *J. phoenicea* subsp. *eu-meditarrena* Lebr.& Thiv. and *J. phoenicea* var. *turbinata* (Guss.) Parl. *Journal of Essential Oil Research*, 8 (1996) 367–371.
- [5] AFNOR. Huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. Tome 2. 6^{ième} édition. AFNOR, Paris.Arctander, (2000) 1994
- [6] Archana B., Dasgupta N. and De B., 2005. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem.* 90, pp. 727-733.
- [7] Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M. et Sokmen A. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*.100 (2007) 584–589.
- [8] Mayachiew P. et Devahastin S. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 41 (2008) 1153-1159.
- [9] Caillet S. et Lacroix M. Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (RESALA). (2007) 1-8.
- [10] Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102: pp.898-904.
- [11] Bassole H.N., Kabore Z. and Traore A.S., 2002. Étude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm. Med.trad.afr*, Vol.11, pp. 113-122.
- [12] Canillac N. et Mourey A.,. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol.* 18 (2001) 261-268.
- [13] Jeannot V., Chahbol N, J., Russell D. et Baret, P. Quantification and determination of chemical composition of essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium*). *International Journal of Aromatherapy*, 15 (2), (2005) 94-97.
- [14] Fuselli R., Susana B., Garcia D.L.R., Martin J. et Rosalia F. Chemical composition and antimicrobial activity of citrus essences on honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 (2008) 2067-2072.
- [15] Rega B., Fournier N., Guichard E. et Russell R. Citrus flavor *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 117-133.
- [16] Moufida, S., et Marzouk, B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, 62(8), 1283e1289.
- [17] Liyana-Pathirana C.M. et Shahidi F. Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 (2006) 477-485.
- [18] Ferreria A., Proenca C., Serralheiro M.L.M. et Araujo M.E.M. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*. 108 (2006) 31-37.
- [19] Wei A., Shibamoto T. Antioxidant activities and volatile constituents of essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2007) 1737–1742.
- [20] Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. et Roura S.I. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*36 (2003)679-684.
- [21] Inouye, S., Yamaguchi, H., Takizawa, T., 2001. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J. Infect. Chemother.* 7 (4), 251–254.
- [22] Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P. et Cullen P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 5987–6000.
- [23] De Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P. et Marquier P. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Revue hygiène*. Edition ??,3 (2002) 248-254.
- [24] Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), (2004). 223–253.
- [25] Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., et Cliver, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21 (2010) 1199–1218.

Please cite this Article as:

Louiza HIMED, Salah MERNIZ, Malika BARKAT, Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation, **Algerian J. Nat. Products**, 4:1 (2016) 252-260.

www.univ-bejaia.dz/ajnp

Online ISSN: 2353-0391

Editor in chief: Prof. Kamel BELHAMEL

Access this article online	
Website: www.univ-bejaia.dz/ajnp	Quick Response Code
DOI:10.5122.ajnp/2016.03.02	



Type of the Paper (Article)

Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil and its application in margarine preservation

HIMED Louiza ^{1,*}, MERNIZ Salah ² and BARKAT Malika ¹

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), INATAA, Université Constantine. 25000 Constantine, Algérie

² Laboratoire de Physicochimie Analytique et Cristallographie de Matériaux Organométalliques et Biomoléculaires, Université des frères Mentouri Constantine, 25000 Constantine, Algérie

* E-Mail: himed.louiza@hotmail.fr ;
Tel.: + 213 31 66 18 83 ; Fax: +.213 31 66 18 84

Received: 05/06/2016

/Accepted: 07/08/2016

Abstract: Essential oils are aromatic oil liquids obtained from various plant parts. The growing interest in the substitution of synthetic antioxidant agents by natural ones has fostered research on vegetable sources and the screening of plant materials in order to identify new compounds. The study aims to evaluate the use of essential oil extract by cold pression of *Citrus limon* (Lisbon variety) as a substitute of Tocoblend (mixture of α , β , γ and δ -tocopherol) used as antioxidant in margarine preservation. The major constituents of the essential oil extract identified were Limonene (66.75%) followed by β -Pinene (13.92%) and γ -Terpinene (3.10%). In both DPPH scavenging and bleaching of β -carotene in linoleic acid system assays, the essential oil extract exhibited the highest activity compared to the Tocoblend. Tests conducted at pilot scale showed that the margarine elaborated with essential oil extract was more resistant to oxidation than the margarine reference with Tocoblend. In addition, the physicochemical properties were not modified.

Keywords: *Citrus limon*, essential oil, antioxidant activity, chemical composition, margarine.

I. Introduction

Nowadays, the interest in naturally occurring antioxidants has considerably increased for use in food, cosmetic and pharmaceutical products to replace synthetic antioxidants which are being restricted due to their carcinogenicity [1, 2]. *Citrus* is the most abundant crop in the world, with about 64 million tons of orange and 13 million tons of lemon products produced during 2004 [3]. The amount of residue obtained from *Citrus* fruit account for 50% of the original amount of whole fruit [4]. *Citrus* peel of fruit processing which provides a great potential for further commercial use. During the process of juice extraction oil sacs break and release volatile oils which are in pockets localized in the external part of the mesocarpe of fruit (flavedo). These oils are used in food and pharmaceutical industries, but can also provide flavouring ingredients to drinks, ice creams and other food products [5]. Essential oils are complex mixtures comprising many single compounds. Chemically they are derived from terpenes and their oxygenated compounds. Each of these constituents contributes to the beneficial or adverse effects [6]. The main goal of the present study is to examine the chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Citrus limon* (Lisbon variety) extracted by cold pression oil and his incorporation at margarine of table.

II. Experimental Section

II.1. Essential oil

II.1.1. Process of extraction

The essential oil of peels *Citrus limon* is manually extracted by cold pression. The epidermis and oil glands were lacerated. The oil is carried down to a decantation vessel in a stream of water, the emulsion being collected and then separated by centrifugation.

The obtained essential oil is dried over anhydrous sodium sulfate and stored in sealed brown vials at 4°C.

II.1.2. Gas chromatography-mass spectrometry

The essential oils were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) (Hewlett-Packard computerized system comprising a 6800 gas chromatograph coupled to a MSD 5973 mass spectrometer) using two fused-silica-capillary columns with different stationary phases. The non-polar column was HP5MS (30 m×0.25mm, 0.25 µm film thickness) and the polar one was a Stabilwax consisting of Carbowax-PEG (60 m× 0.2 mm, 0.25 mm film thickness). GC-MS spectra were obtained using the following conditions: carrier gas He ; flow rate 0.5 mL·min⁻¹ ; split-less mode ; injection volume 0.2 µL ; injection temperature 250 °C ; the oven temperature program was 60 °C for 8 min increased at 2°C·min⁻¹ to 250 °C and held at 250 °C for 10 min ; the ionization mode used was electronic impact at 70 eV. The relative percentage of the components was calculated from gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). Most constituents were tentatively identified by comparison of their GC Kovats retention indices (I), determined with reference to an homologous series of C₅-C₂₈ n-alkanes and with those of authentic standards available in the authors laboratory. Identification was confirmed when possible by comparison of their mass spectral fragmentation patterns with those stored in the MS database (National Institute of Standards and Technology and Wiley libraries) and with mass spectra literature data [7-10].

II.1.3. Evaluation of the antioxidant and antiradical activities

II.1.3.1. Scavenger effect on DPPH

The electron donation ability of the samples (essential oil and Tocoblend) was measured by bleaching of the purple-colored solution of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) according to the methode of Archana et al. (2005). DPPH radicals have an absorption maximum at 517 nm, which disappears with reduction by an antioxidant compound. A DPPH' solution in absolute methanol (60 µM) was prepared, and 3 mL of this solution were mixed with 100µl of the samples at different concentrations. These solution mixtures were kept in the dark for 30 min and optical density was measured at 517 nm using spectrophotometer against methanol. The antioxidant capacity was expressed as percentage of inhibition of DPPH radical (%DPPH inhibition) calculated according to the following equation.

$$\%DPPH \text{ inhibition} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}} / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100.$$

Where Abs_{control} is the absorbance of DPPH radical + methanol ; Abs_{sample} is the absorbance of DPPH radical + sample extract. From data elaboration (% inhibition plotted versus samples concentration), the concentration of samples required to reach 50% radical inhibition (IC₅₀) was calculated.

II.1.3.2. Bleachability of β-carotene in linoleic acid system

The antioxidant activity of the examined essential oils was evaluated using a β-carotene-linoleate model system following the method described by [11]. A solution of β-carotene was prepared by dissolving 2.0 mg of β-carotene in 10 ml of chloroform. One millilitre of this solution was pipetted into a round-bottom flask and 20ml of purified linoleic acid and 200 mg of tween 40 emulsifier were added. After the chloroform was rotary evaporated at 40 °C under vacuum, 50 ml of oxygenated water were added to the flask under vigorous shaking. Aliquots (5 ml) of this emulsion were transferred into a series of tubes containing 500 ml of essential oil (2 mg/ml) or 2 mg/ml of Tocoblend for comparative

purposes. As soon as the emulsion was added to each tube, the zero time absorbance was read at 470 nm. Subsequent absorbance readings were recorded at 120 min by keeping the sample in a water bath at 50 °C until the visual color of β -carotene in the control sample disappeared. Antioxidant activities (Inhibition %) of the samples were calculated using the following equation:

$$\text{Inhibition \%} = \left(\frac{A_{\beta\text{-carotene after 2h assay}}}{A_{\text{initial } \beta\text{-carotene}}} \right) \times 100$$

Where $A_{\beta\text{-carotene after 2h assay}}$ is the absorbance of β -carotene after 2h assay remaining in the samples and $A_{\text{initial } \beta\text{-carotene}}$ is the absorbance of β -carotene at the beginning of the experiments.

II.2. Margarine

II.2.1. Pilot production of margarines

Margarines were produced at pilot scale. Fats (82%) and liquid (18%) phases were prepared. The lipid phase contained palm oil, sunflower oil, coprah oil hydrogenated, palm oil hydrogenated and Tocoblend or essential oil (100ppm) and the liquid phase contained water (16%), β -carotene (7ppm), aroma (diacetyl: 0.8g/kg), salt (0.3%), lactic acid (0.5 g/kg) and potassium sorbate (1.3g/kg).

Fats were first melted at 70°C in a mixing tank with agitator. Emulsifier was dissolved in a small amount of melted fat, then added to the fat phase in the mixing tank. The aqueous phase and its ingredients were prepared in a separate tank before being added to the fat phase.

Agitation was then set for at least 10 min in order to allow the formation of a good pre-emulsion.

Margarine was processed in a simplified perfector pilot plant made of one cooler tube followed by a resting tube (2.3 l). The modified parameters were the water bath temperature running in the tube exchanger of the second small tank and in the double envelope tube (45°C or 55°C), the pump rate of the emulsion (400 or 500 rpm), the blades rotational speed (400 or 500 rpm), the scraped surface heat exchanger temperature (15°C or 20°C) and the temperature of the water bath running in the double envelop of the resting tube (15°C or 20°C).

The produced margarines were collected in plastic containers (250g) at the end of the processing line after stabilization of the temperatures. Samples were then stored at 4°C before analysis.

II.2.2. Determination of physicochemical properties of the margarines developed

II.2.2.1. Moisture

The moisture content was determined on 3g of margarine brought to 100°C until constant weight [12].

II.2.2.2. pH

Margarine pH was determined directly on the aqueous phase.

II.2.2.3. Determination of the peroxide.

The peroxide index determination involves mixing 5g of melted margarine with 12 ml of chloroform, 18 ml of acetic acid and 0.5 ml of potassium iodide solution. After 1 min, 75 ml of distilled water and a few drops of starch (colour indicator) were added. The mixture was then titrated with sodium thiosulfate solution (0.01 N) until the colour changes to pale yellow. A blank was prepared in the same conditions [13].

The peroxide index is expressed in meq O_2 /kg calculated using the following equation:

$$PI = (V/M) \times 1000$$

Where V is the volume (ml) of sodium thiosulfate and M the sample mass (g).

II.2.2.4. Determination of melting point

The capillary tubes were placed in cold water then heated (0.5°C/min) until the level of the fat matter rises in the capillary tube. The melting temperature was noted [14].

II.2.2.5. Determination of solid content (solid fat content)

To determine the level of solids in the margarine, each sample was melted in an oven at 100°C and then filtered. The filtrate obtained was then poured into three tubes up to 2 cm.

The tubes were incubated separately at three different temperatures : 20°C/20 min, 30°C/20 min and 40°C/20min. Values were read using a nuclear magnetic resonance (NMR) apparatus (type minispec mq 20, Germany), processed and the final results were given in percentage of solids [15].

II.2.3. Determination of the oxidative stability of margarines (Rancimat test)

The Rancimat test is an accelerated technique most commonly used for assessment of the oxidative stability of edible fats, oils and fat-containing foods [16].

To determine the oxidative stability of the prepared margarines, 3g of sample were put in accelerated oxidation conditions : temperature set at 120°C and air flow to 10 l/h. As a result, volatile compounds are formed and trapped in the tube containing distilled water (60 ml) that induces the increase of its conductivity. The induction period and the oxidative stability of the samples are given in hours. It is determined from the inflection point of the curve of conductivity [17].

III. Results and Discussion

III.1. Essential oil

III.1.1. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

The average yield in essential oil was $0.81 \pm 0.092\%$. The output of the Eureka variety is $1.02\% \pm 0.04\%$ [18]. At 0.05, the two outputs present a significant difference, which implies that the variety has an impact on the output. Thus point of considering quantitative, it is interesting to carry out the lemon essential oil extraction of the Eureka variety.

The chemical composition of essential oil of *Citrus limon* (Lisbon variety) was characterized by 29 constituents which accounted for 99.82% of the total oil (table 1).

Table 1: Chemical composition of the essential oil of *Citrus limon* of the Lisbon variety

N°	RT min	Compound	Area %	I
1	10.250	α -Thujene	0.33	931.078
2	10.660	α - Pinene	2.15	938.46
3	13.503	β -Pinene	13.92	978.974
4	14.428	β -Myrcene	1.41	997.846
5	17.696	Limonène	66.75	1013.859
6	19.282	γ -Terpinene	3.10	1066.170
7	21.238	α -Terpinolene	0.15	1070.709
8	22.617	Linalool	0.25	1108.870
9	24.082	Trans -Limonene oxide	0.14	1131.203
10	24.554	Cis-Citronellol	0.50	1138.001
11	24.930	Trans-Citronellol	0.86	1143.324
12	25.171	Camphor	0.28	1146.693
13	25.436	Citronellal	0.19	1150.361
14	29.118	Myrtenol	0.21	1197.710
15	29.248	α -Terpineol	0.36	1199.271
16	31.350	Trans-Carveol	0.26	1231.182
17	32.212	Cis-Carveol	0.09	1244.105
18	32.506	Cis-Citral	1.27	1248.347

19	34.665	Geranial	2.76	1278.377
20	39.962	Citronellyl Acetate	0.12	1356.164
21	40.396	Piperitenone oxide	1.32	1363.477
22	40.704	Neryl Acetate	0.90	1367.996
23	41.967	β -Elemene	0.74	1386.175
24	44.015	Trans-Caryophyllen	0.16	1417.241
25	44.208	α -Humulene	0.17	1455321
26	45.037	Trans - α - Bergamotene	0.17	1435.464
27	46.565	Germacrene	0.19	1460.447
28	49.663	γ -Cadinene	0.23	1510
29	54.126	Caryophyllene oxide	0.84	1584.81

The oil was dominated by Limonene (66.75%) followed by β -Pinene (13.92%), γ -Terpinene (3.10%), Geranial (2.76%) and α -Pinene (2.15%).

The essential oil of *Citrus limon* (Lisbon variety) is strongly dominated by monoterpene hydrocarbons (89.17%). The oxygenated monoterpene and sesquiterpene compounds are scarcely represented in this oil (5.81% and 2.33% respectively).

III.1.2. Antioxidant and antiradical activities

As shown in Table 2, the essential oil has antioxidant ability for preventing the linoleic acid oxidation and to reduce DPPH radicals.

Table 2. Antioxidant capacity of essential oil of *Citrus limon* and Tocoblend

	Essential oil	Tocoblend
IC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	0.120 0.049	\pm 0.837 \pm 0.143
Inhibition in linoleic acid system (%)	88.47 \pm 0.026	39.75 \pm 0.015

Values are means \pm standard deviation of three separate experiments.

The DPPH assay has been widely used to evaluate the free radical scavenging effectiveness of various antioxidant substances. Lower IC₅₀ value indicated higher antioxidant activity. The essential oil of *Citrus limon* (0.120 \pm 0.049 $\mu\text{g/ml}$) showed higher scavenging ability on DPPH radicals when compared to Tocoblend (0837 \pm 0143 $\mu\text{g/ml}$).

The antioxidant activity of Tocoblend and essential oil of *Citrus limon* was also evaluated by the β -carotene-linoleate bleaching method. As for antiradical scavenging activity the essential oil extract showed higher ability to prevent the bleaching of β -carotene than that of Tocoblend.

The antioxidant activity of essential oil is mainly contributed by the active compounds of fraction present in them. Wei and Shibamoto (2007) showed the presence of a significant antioxidant potential of essential oils rich in hydrocarbon monoterpenes (82.82%) (limonene α - and β -pinene) and hydrocarbon sesquiterpenes (2.33%) (trans-caryophyllene, β -Elemene, α -Humulene, Caryophyllene oxide, γ -Cadinene and Germacrene) were responsible of the DPPH neutralization which is the case of *Citrus limon* [19].

III.2. Margarine

III.2.1. Physicochemical properties of margarines developed

The pH values of the aqueous phase and the moisture of the two margarines (margarine with Tocoblend and margarine with essential oil) were however within the standard range (table 3).

Table 3. Physico-chemical characteristics of elaborate margarines

Parameters	Margarine with Tocoblend	Margarine with essential oil
Moisture (%)	15.76 ± 0.003	15.50 ± 0.090
pH	4.0 ± 0.162	4.03 ± 0.132
Peroxide index (meq/kg)	1.97 ± 0.019	1.89 ± 1.123
Point melting (°C)	36 ± 0.011	35.43 ± 0.078

The two margarines exhibited a similar peroxide index (1.97 ± 0.019 Meq O₂/kg for margarine with Tocoblend and 1.89 ± 1.123 Meq O₂/kg for margarine with essential oil) far below the maximum values allowed by the international standards (5 Meq O₂/kg). The peroxide index is one of the most widely used tests for oxidative rancidity in oils fats. It is the amount of peroxide oxygen per 1 kg of product. It is a very useful test and a satisfactory sensitivity to appreciate the early stages of oxidative damage [20].

In addition to the physicochemical properties, two indicators of the organoleptic properties of the two margarines were measured i.e. the melting point and the Solid Fat Content (SFC).

The melting point gives an indication of the temperature at which the margarine should be smooth in the mouth. The melting point international standard range of margarine are between 28 and 34°C which implies that margarine can melt rapidly in the mouth and be firm at room temperature to resist to mechanical work during its spreadability. The melting points of the margarines developed were not significantly different and within this the international range since margarine with Tocoblend and margarine with essential oil fused at 36 ± 0.011 °C and 35.43 ± 0.078 °C respectively.

The SFC is the percentage of solidified triglycerides in oil at a given temperature. SFC is an important indicator of several characteristics of a product, including its appearance and organoleptic properties. It can be used as a measure of the degree of crystallisation of fats during treatment [21].

The SFC rates of the two samples varied with the temperature. Indeed, it decreases with increasing temperature. The values of SFC obtained for the margarine with Tocoblend and the margarine with essential oil are respectively $34.8 \pm 0.04\%$ and $34.3 \pm 0.01\%$ at 10°C, they are $4.4 \pm 0.17\%$ and $4.3 \pm 0.02\%$ at 35°C and they are $2 \pm 0.01\%$ and $2.2 \pm 0.14\%$ at 40°C.

These results were in agreement with those obtained by Karleskind [20]. At 37°C SFC must be less than 6%. In the present study, margarines had already a SFC lower than 6% at 35°C which indicates that these margarines melts easily in the mouth.

III.2.2. Oxidative stability of the margarine (Test of Rancimat)

The purpose of the test is to predict the oxidative stability of the fat matter. The Rancimat results are represented as a curve (conductivity as a function of time). The induction period is determined from the inflection point of the conductivity curve [22].

The induction time obtained for the margarines, were 5.34 ± 0.028 h (margarine with Tocoblend) and 9.02 ± 0.014 h (margarine with essential oil). It appears that the oxidation is decreased significantly ($P < 0.05$) in the margarines containing the essential oil by comparison to the one containing Tocoblend.

Compared to the margarine with Tocoblend, margarines developed with essential oil of *Citrus limon* showed clearly a longer induction time and therefore better resistance to oxidation.

IV. Conclusion

The present study was designed to replace the commonly used Tocoblend as an antioxidant in margarine preservation, by essential oil of *Citrus limon* (Lisbon variety). Essential oil extract presented significant percentage of Limonene compound (66.75%) that play an important role against oxidation as shown by scavenger effect on DPPH and bleachability of β-carotene in linoleic acid system.

The same concentration of essential oil extract, incorporated in margarine, showed higher performance than Tocoblend which usually used at 100 ppm.

V. References

- [1] Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.* 519, 103–109.
- [2] Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 97, 654–660.
- [3] Laufenberg, G., Kunz, B., & Nystroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87(2), 167–198.
- [4] Chon, R., and Chon, A. L. (1997). In P. R. Ashurst (Ed.), *Subproductos del Procesado de frutas*. Acribia, Zaragoza (pp. 213–228).
- [5] Raeissi, S., Diaz, S., Espinosa, S., Peters, C. J., & Brignole, E. A. (2008). Ethane as an alternative solvent for supercritical extraction of orange peel oils. *Journal of Supercritical Fluids*, 45, 306–313.
- [6] Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC complement. Altern. Med.* 6, 39.
- [7] Arctander, S. (1994). *Perfume and flavor chemicals*. Carol Stream, IL: Allured Publ.
- [8] Adams, R. P. (1995). *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy*. Carol Stream, IL: Allured Publ.
- [9] AFNOR (2000a). *Monographie relative aux huiles essentielles*, Paris.
- [10] Sahraoui, N., Abert Vian, M., Bornard, I., Boutekedjiret, C., Chemat, F. (2008). Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils Comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A*, 1210, 229–233.
- [11] Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M., Sokmen A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L using has suitable extraction procedure. *Food Chemistry*.100: 584-589.
- [12] ISO International Standard. (1998a). Method 662. Animal and vegetable fats and oils. Determination of moisture content and volatile matter.
- [13] ISO International Standard. (1998b). Method 3960, Animal and vegetable fats and oils. Determination of peroxide index.
- [14] ISO International Standard. (2002a). Method 6321, Animal and vegetable fats and oils. Determination of melting point.
- [15] ISO International Standard. (1995). Method 8292 (F). Animal and vegetable fats and oils. Determination of the solids fat by the method of pulsed nuclear magnetic resonance (2nd ed.).
- [16] Farhoosh, R. (2007). The effect of operational parameters of the Rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelflife prediction of soybean oil. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 84, 205–209.
- [17] ISO International Standard. (2006). Method 6886. Animal and vegetable fats and oils. Determination of the oxidation stability (accelerated oxidation test) (2nd ed.) pp. 1–14.
- [18] Himed L. and Barkat M. (2014). Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de *Citrus limon*. *Oilseeds & fats Crops and Lipids*, A102.
- [19] Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N., 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5313–5322.
- [20] Karleskind A., 1992; *Manuel des Corps Gras*. Ed Tech& Doc, Paris. Tome 1 et Tome 2. 1579p.
- [21] Bongers, P., & Almeida-Rivera, C. (2011). Dynamic modelling of the margarine production proces s. *Computer Aided Chemical Engineering*, 29, 1301–1305.
- [22] Hidalgo, F. J., Leon, M. M., & Zamora, R. (2006). Antioxidative activity of amino phospholipids and phospholipid/amino acid mixtures in edible oils as determined by the Rancimat method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5461–5467.

Please cite this Article as:

HIMED Louiza, MERNIZ Salah and BARKAT Malika, Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of *Citrus limon* essential oil and its application in margarine preservation, ***Algerian J. Nat. Products*, 4:2 (2016) 316-322.**

www.univ-bejaia.dz/ajnp

Online ISSN: 2353-0391

Editor in chief: Prof. Kamel BELHAMEL

Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de *Citrus limon*

Louiza Himed¹ et Malika Barkat^{2,*}

¹ Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Department de Technologie alimentaire, INATAA, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie

² Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des Aliments (BIOQUAL), Department de Biotechnologie alimentaire, INATAA, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie

Reçu le 24 mai 2012 – Accepté le 23 octobre 2013

Résumé – Ce travail s'est concentré sur la valorisation des huiles essentielles de *Citrus limon*. Ces dernières ont été extraites par pression à froid et par hydrodistillation, les rendements obtenus sont équivalents, respectivement, à 1,02 % et 2,18 %. L'activité antioxydante des huiles extraites a été étudiée par le test de DPPH°, ce radical puissant a été efficacement réduit par l'HE₁, par l'HE₂ par comparaison au Tocoblend. Ces résultats ont été confirmés par le test de blanchissement du β -carotène. Les deux tests ont permis de classer les huiles essentielles de *Citrus limon* extraites parmi les antioxydants plus puissants par rapport au Tocoblend. L'essai de formulation des margarines de table additionnées d'huiles essentielles de *Citrus limon* a été expérimenté, en vue de les exploiter et de substituer un additif synthétique (le Tocoblend). Les caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées (gras, non gras et point de fusion) s'avèrent conformes à la recette préétablie. En outre, l'indice de peroxyde est conforme aux normes. L'analyse des acides gras a été faite par CPG, elle a montré la richesse de nos margarines en acides gras essentiels avec un rapport AGPI/AGS de 0,85. L'évaluation de la stabilité oxydative est réalisée par les tests de Rancimat et Schaal, les résultats obtenus ont montré que les margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* étaient plus résistantes que celle au Tocoblend et que la margarine à l'HE₁ était la plus résistante vis-à-vis de l'oxydation forcée. La métrologie sensorielle a été faite par les assesseurs de la margarinerie de CEVITAL et indique que les margarines aux huiles essentielles obtenues sont considérées comme étant homogènes, de couleur, de saveur et d'odeur acceptables et appréciées.

Mots clés : Huile essentielle / *Citrus limon* / pression par froid / hydrodistillation / Tocoblend / Margarine

Abstract – Development of a new margarine added essential oils of *Citrus limon*. This work concentrated on the valorization of essential oils of *Citrus limon*. These last were extracted by cold pression (HE₁) and by hydrodistillation (HE₂), the results gave outputs of 1.02% and 2.18%, respectively. The antioxidant activity of extracted oils was studied by the test of DPPH, this powerful radical was effectively reduced by the HE₁, the HE₂ that by Tocoblend. These results were confirmed by the test of whitening of β -carotene. The two tests have enable to us to classify essential oils extracted among antioxidants powerful compared to Tocoblend. The test of formulation of the margarines of table added with essential oils of *Citrus limon* was tested, in order to exploit them and to substitute a synthetic additive (Tocoblend). The physicochemical characteristics of the elaborate margarines prove to be in conformity with the preestablished receipt. Moreover, the peroxide index is in conformity with the standards. The analysis of fatty acids was made by CPG; it showed the richness of our margarines in essential fatty acids with a ratio AGI/AGS of 0.85. The evaluation of oxidative stability is carried out by the tests of Rancimat and Schaal, the results obtained reported that the margarines with essential oils were more resistant than that to Tocoblend and than that with the HE₁ was most resistant opposite forced oxidation. Sensory metrology was made by the assessors of the margarinerie of CEVITAL, margarines are considered as homogeneous and their color, savour and odour are acceptable and appreciated.

Keywords: Essential oil / *Citrus limon* / cold pression / hydrodistillation / Tocoblend / margarine

* Correspondance : barkat.inataa@yahoo.fr

1 Introduction

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité, en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire. Parmi ces produits alimentaires, la margarine, émulsion plastique constituée essentiellement de deux phases grasse et aqueuse, contient en outre 2 % d'additifs hydro et liposolubles. Sa composition est représentée à 82 % par un mélange d'huiles : première cible de l'oxydation (Karleskind, 1992). L'oxydation des lipides est une cause majeure de dégradation de la margarine lors de sa fabrication et de sa conservation. La conséquence la plus perceptible de celle-ci est l'apparition d'odeurs désagréables. Ces odeurs conduisent souvent au rejet du produit par le consommateur (Prior, 2003). Ainsi, pour garantir une durée de conservation prolongée, les antioxydants sont-ils largement utilisés. Vu l'importante capacité de production et la diversification des produits alimentaires, l'utilisation des antioxydants ne cesse d'augmenter. Ainsi, les substances naturelles douées d'activité antioxydante présenteraient-elles un intérêt socioéconomique sans équivoque. La possibilité d'utilisation des huiles essentielles, en tant qu'antioxydants, dépend de la facilité de leur incorporation dans la matrice alimentaire et de leur efficacité à faible dose. Elles ne doivent pas être toxiques et n'entraîner ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirables. Elles doivent être résistantes aux processus technologiques et stables dans le produit fini. Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail dont les principaux objectifs sont de valoriser les écorces (zeste) du citron par l'utilisation de leurs huiles essentielles comme additif alimentaire naturel dans la margarine de table en substitution à l'additif synthétique (le Tocoblend), de diversifier les différents types de margarine de table existants sur le marché et d'utiliser un additif ou antioxydant alimentaire recherché par le consommateur d'une part et produit facilement et localement, donc moins coûteux d'autre part.

2 Matériel et méthodes

2.1 Huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles à partir du zeste de citron frais est effectuée par deux procédés : pression à froid et hydrodistillation, respectivement codées HE₁ et HE₂. La mise en évidence du pouvoir antioxydant des huiles essentielles extraites (HE₁ et HE₂) a été réalisée par deux tests chimiques : la mesure de l'activité de balayage d'un radical libre puissant DPPH° (2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl) (Mansouri *et al.*, 2005), et la dégradation du β-carotène en présence de l'acide linoléique (Kartal *et al.*, 2007).

L'activité antiradicalaire, réalisée par la méthode de DPPH, est estimée selon la formule suivante : $AAR\% = [(Abs_{517} \text{ contrôle négatif} - Abs_{517} \text{ échantillon}) / Abs_{517} \text{ contrôle négatif}] \times 100$ (AAR% : activité antiradicalaire ; Abs₅₁₇ : absorbance lue à 517 nm).

L'activité antioxydante relative des échantillons (AAR), déterminée par le test de blanchissement du β-carotène, est calculée selon l'équation suivante :

$$AAR = Abs_{t=48 \text{ h}}(\text{échantillon}) / Abs_{t=48 \text{ h}}(\text{Tocoblend})$$

(AAR : activité antioxydante relative ; Abs_{t=48 h} : absorbance lue à 490 nm après 48 h).

2.2 Formulation de la margarine

La fabrication des margarines est réalisée dans une chaîne pilote au niveau de la margarinerie CEVITAL située dans la région de Bejaïa, Algérie. Après dosage des deux phases et leurs ingrédients, des opérations d'émulsification, de cristallisation, de pasteurisation (chauffage à 80 °C pendant 3 à 4 s sous pression de vapeur de 3 bars) et de refroidissement (45 °C par la circulation d'eau afin d'éviter un choc thermique) sont réalisées. L'émulsion cristallisée est acheminée par la trémie jusqu'au malaxeur. Cet appareil va désaérer et malaxer le mélange en lui donnant consistance, souplesse et homogénéité. Les margarines ainsi produites ont une température de 20,8 °C et sont conditionnées dans des barquettes en plastique et stockées au réfrigérateur à une température de 4 °C.

2.3 Caractérisation physico-chimique des margarines élaborées

La teneur en eau et des matières volatiles est déterminée selon la méthode de Wolff (1968). Les deux parties, grasse et non grasse, sont séparées grâce à une extraction par solvants et leur masse est calculée après séchage à l'étuve réglée à 105 °C (Wolff, 1968). La teneur en acides gras a été déterminée par CPG (NF EN ISO 5508, 1995). Le pH est déterminé directement sur la phase aqueuse, après sa séparation du produit, à l'aide d'un pH-mètre (AFNOR, 1982). L'indice de peroxyde a été déterminé selon la méthode proposée par AOCS (1997). Le taux de solide SFC (*solid fat content*) est évalué par la méthode de Wolff (1968). Il est exprimé en pourcentage et constitue une caractéristique physique importante influençant beaucoup les propriétés technologiques et sensorielles des corps gras : la texture.

La stabilité oxydative de la margarine est évaluée par le test de Rancimat (ISO 6886, 2006) et le test de Schaal (méthode à l'étuve) (Anwar *et al.*, 2006).

3 Résultats et discussion

3.1 Rendement d'extraction en huiles essentielles

Le rendement moyen en HE₁ est moins important que le rendement moyen en HE₂. Ils équivalent respectivement à 1,02 % ± 0,04 % et 2,18 % ± 0,05 %. Au seuil α = 0,05, les deux rendements présentent une différence significative, ce qui implique que le mode d'extraction a un impact sur le rendement. Donc du point de vue quantitatif, il est intéressant de procéder à l'extraction des huiles essentielles de citron par hydrodistillation.

3.2 Effet Scavenger du radical DPPH°

Le Tableau 1 représente les concentrations efficaces du substrat qui causent la perte de 50 % de l'activité de DPPH°

Tableau 1. Concentration efficace (EC50) et puissance antiradicalaire (ARP) des huiles extraites (HE₁, HE₂) et du Tocoblend.

Echantillon	Test au DPPH°	Test de blanchissement du β -carotène		
	EC 50 (g/l)	ARP	EC 50 (g/l)	ARP
Tocoblend	0,0082 ± 0,0004	121,95 ± 0,80	0,0065 ± 0,0052	153,84 ± 0,09
HE ₁	0,0044 ± 0,0007	227,27 ± 1,73	0,0031 ± 0,0302	322,58 ± 0,02
HE ₂	0,0054 ± 0,0005	185,18 ± 0,75	0,0047 ± 0,0012	212,76 ± 0,00

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées.

Paramètres	Margarine au Tocoblend	Margarine à HE ₁	Margarine à HE ₂
Teneur en eau et en matières volatiles (%)	15,72 ± 0,15	15,98 ± 0,10	16,02 ± 0,10
Teneur en non gras (%)	21,83 ± 0,05	21,70 ± 0,13	22,09 ± 1,01
Teneur en gras (%)	78,17 ± 1,27	78,30 ± 0,06	77,91 ± 0,01
pH	4,70 ± 0,00	4,80 ± 0,00	5,00 ± 0,00
Indice de peroxyde (meq/kg)	1,97 ± 0,02	1,89 ± 1,12	1,92 ± 1,14
Point de fusion (°C)	37,00 ± 0,00	37,20 ± 0,00	37,00 ± 0,00

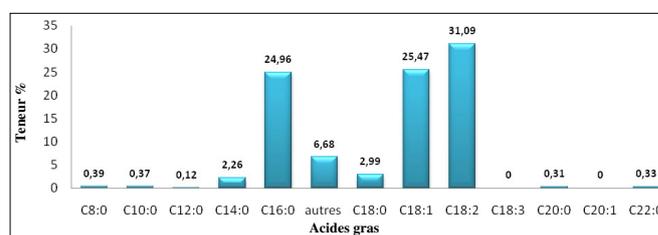
ainsi que l'activité antioxydante relative. Il démontre que les huiles essentielles obtenues sont des excellents antioxydants naturels. Elles possèdent des capacités de neutralisation de DPPH° puissantes à de faibles doses en les comparant à celle du Tocoblend. En suivant l'EC50, la capacité de balayage de radical libre DPPH° est classée dans l'ordre : HE₁ > HE₂ > Tocoblend.

3.3 Test de blanchissement du β -carotène

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana *et al.*, 2006). Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria *et al.*, 2006). Les résultats signalés dans le Tableau 1 confirment les résultats précédents du test de neutralisation de DPPH° concernant le classement de la capacité d'inhibition de l'oxydation (HE₁ > HE₂ > Tocoblend).

3.4 Caractéristiques physicochimiques des margarines élaborées

Les résultats de la caractérisation physico-chimique des margarines élaborées (margarine avec le Tocoblend et margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* HE₁ et HE₂) sont représentés dans le Tableau 2. La composition en matière grasse et en eau des margarines élaborées correspondent aux critères fixés en amont de leur fabrication, critères de type margarine à tartiner. L'indice de peroxyde rend compte de l'altération des corps gras par oxydation, inconvénient majeur touchant essentiellement les acides gras insaturés (AGI). Nos produits présentent un indice de peroxyde moyen de 1,90 ± 1,13 méqO₂/kg, valeur inférieure à 5 méq/kg, maximum requis par les normes (Karleskind, 1992). Le point de fusion moyen obtenu est de 37 °C, correspond à celui choisi

**Fig. 1.** Composition en acides gras de la margarine à l'HE₁.

pour la recette retenue. Il doit être fixé de manière à ce que la margarine soit fondante dans la bouche mais aussi plastique à température ambiante pour supporter le travail mécanique lors de la tartinabilité.

3.5 Composition en acides gras des margarines élaborées

La Figure 1 représente la composition en acides gras de l'une des trois margarines élaborées : la margarine à huile essentielle de *Citrus limon* extraite par expression à froid ; cela est justifié par l'absence de différence significative entre leurs compositions chimiques. La composition en acide gras reflète la teneur en acides gras des huiles végétales utilisées (huile de tournesol, huile de palme, huile de palme hydrogénée et huile de coprah hydrogénée). La présence des acides caprylique, caprique, laurique et myristique à des teneurs de 0,39, 0,37, 5,12 et 2,26 % respectivement proviennent de l'huile de coprah. L'acide palmitique présente une teneur de 24,96 %, celle-ci provient de l'huile de palme entrant dans la recette de notre margarine. L'huile de palme renferme des teneurs importantes en acides stéarique, oléique, linoléique, et des traces de l'acide linoléique. L'acide oléique s'avère avec une teneur importante (25,47 %) dans notre margarine. La margarine ainsi analysée (à HE₁) contient 56,57 % d'acides gras insaturés (AGI) dont 25,47 % sont des acides gras monoinsaturés (AGMI) et 31,10 % sont des acides gras polyinsaturés (AGPI). Cette composition apporte les acides gras essentiels (AGE). Le rapport AGI/AGPI de notre margarine est de 0,85,

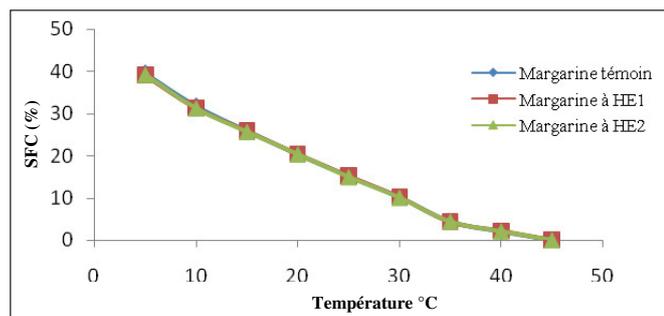


Fig. 2. Indice SFC de la margarine témoin et des margarines aux huiles essentielles de *Citrus limon* (HE₁, HE₂).

il est toutefois conforme aux recommandations des nutritionnistes qui est de l'ordre de 0,80 (Karleskind, 1992).

3.6 Analyse de la texture par RMN (SFC)

L'indice SFC se rapporte au pourcentage des matières grasses qui sont solides à des températures différentes. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 2. Le SFC est un facteur essentiel à déterminer, car il est responsable de plusieurs caractéristiques du produit, y compris son aspect général, l'exsudation d'huile et les propriétés organoleptiques (Noor Lida *et al.*, 2002). Pour les margarines à tartiner, le SFC ne doit pas dépasser 40 % à 5 °C et pas plus de 6 % à 37 °C (De Greyt et Huyghebaert, 1993) ou pas plus de 32 % à 10 °C (Charteris et Keogh, 1991). Les margarines élaborées sont plastiques et faciles à tartiner. À 37 °C, l'indice de SFC est inférieur à 6 % et donc les margarines fondent facilement dans la bouche. Aussi, il faut noter qu'à 95 % il n'y a aucune différence significative entre ces margarines concernant ce paramètre, indicateur de texture, et cela pour les différentes températures.

3.7 Stabilité oxydative de la margarine

Les courbes mentionnées dans la Figure 3 représentent les résultats de la stabilité à l'oxydation des margarines au Tocoblend, à l'huile essentielle de *Citrus limon* par le test de Rancimat. À partir des courbes de conductivité obtenues, le temps d'induction des margarines au Tocoblend, à l'HE₁ et à l'HE₂ est respectivement équivalent à 3,76 h, 6,42 h et 6,31 h. La margarine à l'HE₁ a présenté la meilleure résistance à l'oxydation forcée par rapport aux deux autres. La margarine à l'HE₂ a mieux résisté que celle au Tocoblend. Aussi, il faut noter qu'il y a une différence significative entre les temps d'induction des deux huiles et celui du Tocoblend. Par ailleurs, aucune différence significative entre les temps d'induction des deux huiles n'a été constatée. Le Tableau 3 représente le facteur de protection (Fp = activité antioxydante relative) du Tocoblend et des huiles essentielles HE₁ et HE₂ sachant que la période d'induction de la margarine sans Tocoblend et sans huiles essentielles est de 2,05 h. Par comparaison de l'efficacité de résistance à l'oxydation forcée et de l'activité antioxydante relative, nous pouvons mettre en ordre croissant l'effet antioxydant de nos huiles et du Tocoblend additionnés aux margarines comme suit : HE₁ > HE₂ > Tocoblend.

Tableau 3. Facteurs de protection (Fp) du Tocoblend et des huiles essentielles (HE₁ et HE₂).

Échantillon	PI (h)	Fp (AAR)
Tocoblend	3,76 ± 0,05	1,83 ± 0,03
HE ₁	6,42 ± 0,04	3,13 ± 0,02
HE ₂	6,31 ± 0,02	3,07 ± 0,01

La variation de l'indice de peroxyde en fonction de la durée de stockage obtenue par le test de Schaal, est illustrée par la Figure 4. L'indice de peroxyde a atteint son seuil limite d'altération (5 meq/kg) à partir de la 6^e semaine pour la margarine à huile essentielle extraite de *Citrus limon* par expression à froid, à partir de la 5^e semaine pour la margarine à l'huile essentielle extraite par hydrodistillation et seulement à partir de la 4^e semaine pour la margarine à Tocoblend. Aucune différence significative n'a été observée entre l'indice de peroxyde des trois margarines après la première semaine et entre les deux margarines à l'huile essentielle (HE₁, HE₂) après la 4^e semaine. Au-delà de ces périodes, une différence significative a été constatée. Une diminution de la teneur en peroxyde de la margarine au Tocoblend, à l'HE₂ et à l'HE₁ a été constatée respectivement à partir de la 6^e, la 8^e et la 9^e semaine. Cela peut être expliqué par la décomposition des peroxydes sous l'effet de la température en aldéhydes, cétones et acides gras à chaîne courte. Les margarines à l'huile essentielle ont mieux résisté à la peroxydation que celle au Tocoblend. La margarine à l'HE₁ est mieux protégée contre l'oxydation que celle à l'HE₂. Le classement en fonction de l'ordre d'efficacité antioxydante est comme suit : HE₁ > HE₂ > Tocoblend. Ces résultats concordent avec le classement constaté dans le test au DPPH°, dans le test de blanchissement de β -carotène et dans le test de Rancimat.

4 Conclusion

Le présent travail a pour objectif l'exploitation des écorces de *Citrus limon* (variété *Euréka*) et leur valorisation par l'utilisation de leurs huiles essentielles à travers leur activité antioxydante et leur prix moins coûteux en les comparant à un antioxydant artificiel importé (le Tocoblend) utilisé au niveau de la margarinerie de CEVITAL.

L'évaluation du rendement moyen en huiles essentielles de *Citrus limon* extraites par hydrodistillation est plus intéressante. L'activité antioxydante déterminée par le test de DPPH° et le test de blanchissement du β -carotène montre que les huiles essentielles extraites sont des excellents antioxydants naturels. L'essai de formulation des margarines de table additionnées d'huiles essentielles de *Citrus limon* a été expérimenté, en vue de substituer le Tocoblend. Les indices de caractérisation des margarines élaborées (gras, non gras et point de fusion) s'avèrent conformes à la recette préétablie. En outre, l'indice de degré d'altération par oxydation (indice de peroxyde) est conforme aux normes. L'analyse des acides gras par CPG a révélé la présence des acides gras essentiels avec un rapport AGI/AGPI de 0,85, il est toutefois conforme aux recommandations des nutritionnistes. Les résultats de l'évaluation de la stabilité oxydative par les tests de Rancimat et Schaal indiquent que les margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* sont

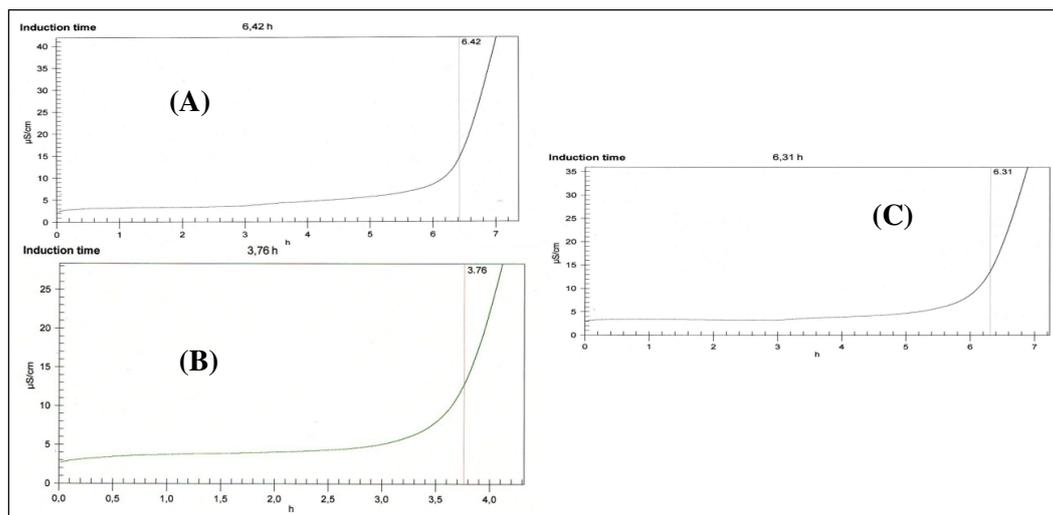


Fig. 3. Courbes de conductivité de la margarine au Tocoblend (A), à l'HE₁ (B) et à l'HE₂ (C).

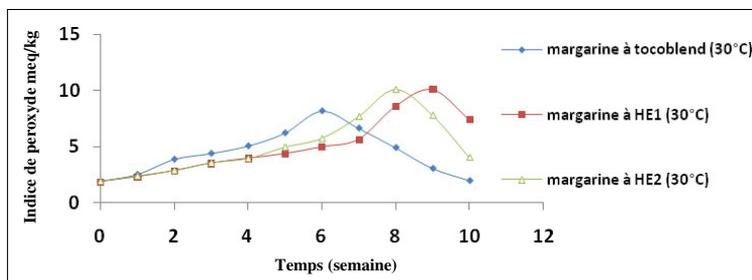


Fig. 4. Variation de l'indice de peroxyde en fonction du temps de stockage, des margarines au Tocoblend, à HE₁ et à HE₂.

plus résistantes que celle au Tocoblend ; la margarine à l'HE₁ est la plus résistante vis-à-vis l'oxydation forcée.

References

- AFNOR. 1982. Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits, ed. AFNOR.
- Anwar F, Jamil A, Iqbal M. 2006. Microwave roasting effects on the physicochemical composition and oxidative stability of sunflower seed oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83: 777–784.
- AOCS. 1997. Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society.
- Chateris W, Keogh K. 1991. Fats and oil in table spread. *Lipid Technol.* 3: 16–22.
- De Greyt WO, Huyghebaert A. 1993. Food and nonfood applications of milk fat. *Lipid Technol.* 5: 138–140.
- Ferreria A, Proenca C, Serralheiro MLM, Araujo MEM. 2006. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *J. Ethnopharmacol.* 108: 31–37.
- ISO 6886. 2006. Corps gras d'origines animale et végétale – Détermination de la stabilité à l'oxydation (essai d'oxydation accéléré, Les Normes internationales pour les entreprises les gouvernements et la société.
- Karleskind A. 1992. Manuel des Corps Gras. Paris: Tech & Doc, Tome 1 et Tome 2.
- Kartal N, Sokmen M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. 2007. Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chem.* 100: 584–589.
- Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* 89: 411–420.
- NF EN ISO 5508. 1995. Corps gras d'origines animale et végétale – Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras.
- Noor Lida HMD, Sundram K, Siew WL, Aminah A, Mamot S. 2002. TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 1137–1144.
- Peyron L, Richard H. 1992. Extraction des épices et herbes aromatiques et différents types d'extraits. In Richard H, ed. Épices et aromates, Paris: Tec et Doc - Lavoisier, APRIA.
- Prior E. Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. In: Graille J, ed. Lipides et corps gras alimentaires, 2003, 87–147.
- Wolff JP. 1968. Manuel d'analyse des corps gras, Paris: Azoulay.

The main objective of this work is to test the encapsulated essential oils in order to solve the problem of their instability, and apply them in light margarine in order to follow its oxidative stability and to evaluate its acceptability.

The essential oils were extracted by hydrodistillation and cold pressing from two varieties of *Citrus limon*: *Eureka* and *Lisbon*. Recovered oils were analyzed by GC/MS to identify their constituents. As main results obtained, the extraction yield was greater by hydrodistillation than by cold pressure. The composition of the oils extracted was different but it was characterized by a dominance of monoterpenes, followed by oxygenated monoterpenes and then sesquiterpenes and finally oxygenated sesquiterpenes. High levels of limonene were recorded (61% - 67%).

The antioxidant activity of the extracted oils was evaluated by several tests, namely the test for the inhibition of lipid peroxidation (β -carotene bleaching and the β -carotene qualitative test), the free radical scavenging test (DPPH and ABTS⁺), the test of the reducing power (CUPRAC and FRAP) and finally the test of the chelating power. The results obtained showed an interesting antioxidant power of *Eureka* oils extracted by cold pressure compared to other oils. On the other hand, the chelating power was less important for all oils compared with EDTA.

The antimicrobial power of the oils was evaluated by two tests to determine the susceptibility of the strains and the microbiological parameters CMI, CMB and CMF. The strains tested are of 15, including 9 bacterial strains (2 Gram positive and 7 Gram negative) and 6 fungal strains. The results showed that all strains are sensitive and the oils have interesting antimicrobial properties.

The essential oils of the *Eureka* variety extracted by cold pressing, having the best antioxidant power, were encapsulated in amorphous silica and then characterized by SEM, ATR and TGA and an evaluation of their antioxidant power. The results showed a significant encapsulation efficiency of 95.87%. No interaction between oils and SiO₂ has been reported. On the other hand, a thermogravimetric resistant of the encapsulated oils was noticed compared to the free oils. The antioxidant activity of essential oils was not changed after encapsulation.

Three formulas of light margarine were developed: control margarine (CM), free essential oil margarine (FOM) and encapsulated oils margarine (EOM). A physico-chemical characterization, a determination of the resistance to forced oxidation and sensory analysis were carried out. The results showed that the physico-chemical characteristics of margarines with essential oils are in accordance with the standards and the pre-established recipe and are not different from those of the control. The EOM showed resistance to forced oxidation comparable to that of the control (CM), however the resistance of the FOM is not interesting. The tasters of the three formulas showed a preference of the FOM, then of the EOM and finally of the CM. Therefore it would be interesting to proceed with the industrial formulation of a lemon essential oil margarine.

Key words: Essential oil, *Citrus limon*, Hydrodistillation, Cold pressure, Antioxidant power, Antimicrobial power, Encapsulation, Lightened margarine.

الهدف الرئيسي من هذا العمل هو اختبار الزيوت الأساسية المغلفة للتخفيف من مشكلة عدم استقرارها ، وتطبيقها في المارجرين الخفيف من أجل متابعة استقرارها التأكسدي ولتقييم مدى قبولها.

تم استخراج الزيوت الأساسية عن طريق hydrodistillation والضغط البارد من نوعين من *Citrus limon*: Euréka و Lisbon. تم تحليل الزيوت المستردة بواسطة GC/MS لتحديد مكوناتها. من بين النتائج الرئيسية التي تم الحصول عليها ، كان العائد المستخرج أكبر عن طريق hydrodistillation من الضغط البارد. كان تكوين الزيوت المستخلصة مختلفاً، لكن تميزت بهيمنة monoterpenes ، تليها monoterpenes الأوكسجين ومن ثم sesquiterpenes وأخيراً sesquiterpenes بالأوكسجين. تم تسجيل مستويات عالية من الليمونين (61% - 67%).

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للزيوت المستخرجة من خلال عدة اختبارات ، وهي اختبار تثبيط بيروكسيد الدهون (تبييض الكاروتين والاختبار الكيفي β -كاروتين) ، واختبار مسح الجذور الحرة (DPPH و $ABTS^+$) ، اختبار قوة خفض (CUPRAC و FRAP) ، وأخيراً اختبار قوة المخلب. وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها قوة مضادات الأكسدة مثيرة للاهتمام من زيوت Euréka المستخرج بواسطة الضغط البارد مقارنة بالزيوت الأخرى. من ناحية أخرى ، كانت قوة المخلب أقل أهمية لجميع الزيوت مقارنة مع EDTA.

تم تقييم القوة المضادة للميكروبات للزيوت من خلال اختبارين لتحديد مدى حساسية السلالات والمعلومات الميكروبيولوجية CMI و CMB و CMF. السلالات التي تم اختبارها هي 15، بما في ذلك 9 سلالات بكتيرية (2 Gram إيجابية و 7 Gram سالبة) و 6 سلالات فطرية. وأظهرت النتائج أن جميع السلالات حساسة والزيوت لها خصائص مضادة للميكروبات مثيرة للاهتمام.

تم تغليف الزيوت الأساسية من Euréka المستخرجة بالضغط البارد ، مع أفضل قوة مضادة للأكسدة ، في ثاني أكسيد السيليكون غير المتبلور ومن ثم دراسة خصائصها بـ MEB و ATR و TGA وتقييم قوتها المضادة للأكسدة. أظهرت النتائج كفاءة تغليف كبيرة بلغت 95.87%. لم يتم أي تفاعل بين الزيت و SiO_2 . من ناحية أخرى ، لوحظ وجود مقاومة حرارية مغلفة للزيوت المغلفة مقارنة بالزيوت الحرة. لم يتم تغيير النشاط المضاد للأكسدة من الزيوت الأساسية بعد التغليف.

تم تطوير ثلاثة صيغ من المارجرين الخفيف: المارجرين الشاهد (MT) ، ومارجرين الزيوت الأساسية الحرة (MHL) ومغلي الزيوت المغلف (MHE). تم إجراء توصيف فيزيائي كيميائي ، وتحديد مقاومة للأكسدة القسرية وتحليل حسي. وأظهرت النتائج أن الخصائص الفيزيائية - الكيميائية للمارجرين مع الزيوت الأساسية تتفق مع المعايير وصفة محددة مسبقاً وليست مختلفة عن تلك الخاصة بالشاهد. أظهر MHE مقاومة للأكسدة القسرية مقارنة مع عنصر الشاهد (MT) ، ولكن مقاومة MHL ليست مثيرة للاهتمام. أظهر المتذوقون للصيغ الثلاثة تفضيل MHL، ثم MHE وأخيراً من MT. لذلك سيكون من المثير للاهتمام المضي قدماً في الصيغة الصناعية للمارجرين زيت الليمون العطري.

الكلمات المفتاحية: زيت أساسي، Hydrodistillation، ضغط بارد ، قوة مضادة للأكسدة ، قوة مضادة للميكروبات ، تغليف ، المارجرين الخفيف.

Le principal objectif de ce travail est de tester les huiles essentielles encapsulées afin de pallier au problème de leur instabilité, et les appliquer dans la margarine allégée afin de suivre sa stabilité oxydative et d'évaluer son acceptabilité.

Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation et par pression à froid à partir de deux variétés de *Citrus limon* : *Euréka* et *Lisbon*. Les huiles récupérées ont été analysées par GC/MS afin d'identifier leurs constituants. Comme principaux résultats obtenus, le rendement d'extraction a été plus important par hydrodistillation que par pression à froid. La composition des huiles extraites a été différente mais elle s'est caractérisée par une dominance des monoterpènes, suivie des monoterpènes oxygénés puis des sesquiterpènes et enfin des sesquiterpènes oxygénés. Des teneurs élevées en limonène ont été enregistrées (61% - 67%).

L'activité antioxydante des huiles extraites a été évaluée par plusieurs tests à savoir le test de l'inhibition de la peroxydation lipidique (blanchiment de β -carotène le test qualitatif au β -carotène), le test du piégeage des radicaux libres (DPPH et ABTS⁺), le test du pouvoir réducteur (CUPRAC et FRAP) et enfin le test du pouvoir chélateur. Les résultats obtenus ont montré un pouvoir antioxydant intéressant des huiles de la variété *Euréka* extraites par pression à froid par rapport aux autres huiles. En revanche le pouvoir chélateur a été moins important pour toutes les huiles par rapport à l'EDTA.

Le pouvoir antimicrobien des huiles a été évalué par deux tests pour déterminer la sensibilité des souches et les paramètres microbiologiques CMI, CMB et CMF. Les souches testées sont de nombre de 15 dont 9 souches bactériennes (2 Gram positif et 7 Gram négatif) et 6 souches fongiques. Les résultats ont montré que toutes les souches sont sensibles et les huiles possèdent un pouvoir antimicrobien intéressant.

Les huiles essentielles de la variété *Euréka* extraites par pression à froid, ayant le meilleur pouvoir antioxydant, ont fait l'objet d'encapsulation dans le dioxyde de silicium amorphe puis une caractérisation par le MEB, l'ATR et la TGA et une évaluation de son pouvoir antioxydant. Les résultats ont montré une efficacité d'encapsulation importante de 95,87%. Aucune interaction entre l'huile et le SiO₂ n'a pas été signalée. En revanche une résistante thermogravimétrique des huiles encapsulées a été remarquée par rapport aux huiles libres. L'activité antioxydante des huiles essentielles n'a pas été modifiée après l'encapsulation.

Trois formules de la margarine allégée ont été élaborées : margarine témoin (MT), margarine aux huiles essentielles libres (MHL) et margarine aux huiles essentielles encapsulées (MHE). Une caractérisation physico-chimique, une détermination de la résistance à l'oxydation forcée et une analyse sensorielle ont été réalisées. Les résultats ont montré que les caractéristiques physico-chimiques des margarines aux huiles essentielles sont conformes aux normes et à la recette préétablie et ne sont pas différentes de celles du témoin. La MHE a montré une résistance à l'oxydation forcée comparable à celle du témoin (MT), par contre la résistance de la MHL n'est pas intéressante. Les dégustateurs des trois formules ont montré une préférence de la MHL, puis de la MHE et enfin de la MT. Par conséquent il serait intéressant de procéder à la formulation industrielle d'une margarine à huile essentielle de citron.

Mots clés : Huile essentielle, *Citrus limon*, Hydrodistillation, Pression à froid, Pouvoir antioxydant, Pouvoir antimicrobien, Encapsulation, Margarine allégée.