

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA

RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAID – TLEMCEN

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses

-COSNA-

***ETUDE EXPLORATOIRE DES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS DES
AIGUILLES DE PIN***

Mémoire présenté par

Abdelhamid KADARI

En vue de l'obtention du diplôme de master de chimie

Spécialité : chimie bio-organique et thérapeutique

Soutenue publiquement le : 25 juin 2012 devant le jury composé de :

Mr .J. Kajima Mulengi

Mr. H. Allali

président de jury

Mr. A. Atmani

Mr. M. A. Dib

Mr. B. Benabadji

Mr. D. Bendiabdellah

Mr. Z. Arrar

Mme. W. Drici

Encadreur

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A

Mon très cher père et ma très chère mère
En témoignage de ma reconnaissance envers le soutien, les sacrifices
et tous les efforts qu'ils ont fait pour mon éducation ainsi que ma
formation.

MES chers frères, et mes chères sœurs
Pour leur affection, compréhension et patience.

Mes oncles, tantes, cousins et cousines
Vous avez de près ou de loin contribué à ma formation.

Tous mes enseignants qui ils sont fait l'honneur de cette
formation.

Tous ceux qui ont une relation de proche ou de loin avec la
réalisation du présent rapport.

REMERCIEMENT

En premier lieu, on tient à remercier mon Dieu ALLAH qui à donner la force à achever ce projet.

Je tiens à remercier monsieur Pr. J. Kjima Mulengi directeur de laboratoire de Chimie Organique Substance Natural et Analyse (COSNA) pour son aide et sa disponibilité durant toute notre recherche.

Je m'adresse tous mes remerciements et ma sincère reconnaissance à mon encadreur Madame Dr Drici Wassila, docteur en chimie organique appliquée à la faculté des sciences qui a bien prodigué ses précieux conseils et de son aide et pour m'avoir soutenue tout au long de cette tâche. Je tiens à le remercier de la qualité de son suivi et de la confiance qu'il a bien voulu m'accorder.

Je remercie aussi, mon Co encadreur Mme Dr Bouazzaoui Naima, pour son aide et le suivre durant tout la période de ma recherche.

Je remercie vivement, nos enseignants qui ont contribués énergiquement à notre formation pendant toutes ces années.

Mes remerciements vont également au Président de Jury Monsieur Pr. J. Kajima Mulengi, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Monsieur H. Allali, Monsieur Med Amine Dib, Monsieur A. Atmani, Monsieur Benabadji, Monsieur A. Bendiabdalah et Monsieur Z. Arrar sont vivement remerciés d'avoir examiné ce travail et font partir de ce jury de mémoire de Maste et enrichi le débat scientifique.

J'exprime, aussi, mes sincères remerciements aux enseignants de La Faculté de des sciences et technologies de l'université de Tlemcen et de Tiaret.

J'exprime mes plus vifs remerciements à ma famille.

Que mes amis et tous qui ont l'amabilité de m'aider lors de la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui auront contribué de près et de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

Sommaire

Introduction générale

I. Introduction	01
II. Références	03

Chapitre I : recherche bibliographique

I. Description physique du pin.....	04
II. Pin halepensis.....	05
II.1- Appellations.....	05
II.2- Origines	05
II.3- Description botanique	05
II.4-Répartition géographique	05
III- L'huile de Pin.....	06
III.1- Composition chimique	06
III.2- Intérêt thérapeutique.....	08
a). Affection gastro-intestinale.....	08
b). Suppression de l'appétit.....	08
c). Maladies cardio-vasculaires.....	08
d). Activité antioxydante.....	09
e). Activité antibactérienne.....	09
f). Activité anti-inflammatoire.....	10
III.3- Intérêt nutritionnel et organoleptique	10
Références.....	11

Chapitre II : travaux réalisés

I. Introduction	12
1- Extraction par solvant.....	12
2- Extraction par soxhlet	13
3- Hydro distillation.....	13
4- Entraînement à la vapeur.....	14
II. Travaux effectués.....	14

1- Analyse chimique des aiguilles de pin.....	15
a. L'huile obtenue à partir des aiguilles fraîches	16
b. L'huile obtenue à partir des aiguilles sèches.....	16
2- Extraction des acides gras.....	17
a. Les acides gras polyinsaturés.....	17
b. Rôle et intérêt des AGPIs.....	17
3- Caractérisation chimique et physique de l'huile.....	19
a. Indice d'acide.....	19
b. Indice de saponification	19
c. Indice de peroxyde.....	20
d. Indice d'iode.....	20
e. Indice de réfraction	20
f. Densité.....	21
4- Teste de l'activité antioxydante.....	21
Références.....	23
Conclusion générale.....	24
Partie expérimentale.....	25

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I- Introduction

Depuis les temps les plus anciens, l'utilisation des plantes dans le domaine de la santé est toujours d'actualité ⁽¹⁾, dans la mesure où elle représente une alternative sérieuse ou tout au moins un complément appréciable à la pharmacie classique issue de la chimie moderne. En effet, plus de 25 % des médicaments prescrits dans le monde entier dérivent directement ou indirectement des plantes ⁽²⁾. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous plusieurs études, surtout dans le domaine de la microbiologie médicale ⁽³⁾, ce qui ouvre un champ très vaste et varié pour les recherches scientifiques.

Par ailleurs, les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans les applications visant l'élaboration de nombreux produits de consommation. Ce qui nécessite un grand besoin dans la production des substances bioactives isolées et purifiées, afin d'avoir une meilleure utilisation dans de nombreuses applications : cosmétiques, pharmaceutiques, et comme additifs nutritionnels...⁽⁴⁾. Donc, les plantes représentent une grande source de principes actifs inépuisables et renouvelables.

Pour toutes recherches basées sur les substances naturelles, la forêt représente une ressource reconductible dont l'exploitation a une grande importance tant au niveau économique que social. Les produits forestiers non ligneux (PFNL) sont définis comme étant des produits d'origine biologique autres que le bois et provenant des forêts ou d'autres terrains boisés⁽⁵⁾. Il y a quatre principaux types de PFNL : les produits de l'alimentation (fruits sauvages, champignons, produits de l'érable, etc.), les produits ornementaux (arbres de Noël), les produits pharmaceutiques et nutraceutiques (extraits de *Taxus canadensis*, *Panax ginseng*, etc.) ainsi que les produits manufacturés et les matériaux (huiles essentielles, résines, etc.).

L'une des voies de développement la plus intéressante des PFNL est l'utilisation du potentiel biopharmaceutique de la forêt pour la création de médicaments. L'exemple du paclitaxel démontre bien le potentiel de ce genre de valorisation des produits non ligneux. Cet alcaloïde diterpénique, illustré à la **figure 1**, est également connu sous le nom de Taxol® (nom de la formulation). Cette molécule est utilisée pour traiter les cancers du sein, des ovaires et du poumon, est devenue l'anticancéreux le plus vendu au monde ⁽⁶⁾.

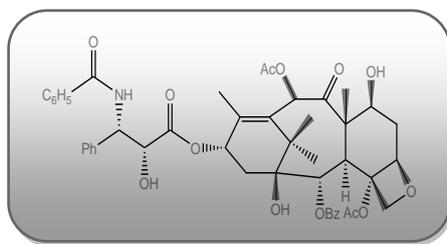


Figure 1 : Structure du Paclitaxel.

Le paclitaxel ne représente pas un cas d'exception. De nombreux médicaments actuellement utilisés en clinique sont des produits naturels ou des dérivés. De plus, la proportion des espèces végétales sur terre ayant été étudiées pour leurs activités biologiques est évaluée à moins de 10 %⁽⁷⁾, donc la forêt fait partie de cette richesse encore inexploitée.

La nécessité de trouver des nouveaux composés d'intérêt pour le traitement des maladies et notamment le cancer, combinée au potentiel qu'offre la forêt, ainsi qu'aux bienfaits économiques, ont mené les chercheurs à l'élaboration de plusieurs projets de recherche sur l'évaluation du potentiel d'utilisation du pin (bois, aiguilles, fruits,...) dans la lutte contre les différentes maladies du siècle.

Compte tenu de toutes ces données bibliographiques ainsi de la richesse du pin comme sources naturelles de beaucoup de produits d'intérêt majeurs, nous nous sommes intéressés à l'extraction et la caractérisation de l'huile de *Pin halepensis* de la région ouest-nord de l'Algérie, qui se trouve sur la côte méditerranéenne, en utilisant uniquement ses aiguilles.

L'objectif général de ce travail consiste à identifier les constituants de l'huile des aiguilles de pin et plus précisément les acides gras polyinsaturés qui peuvent être responsable de plusieurs activités biologiques de cette dernière. Comme objectif spécifique, et afin d'atteindre l'objectif général plusieurs étapes ont été mises en œuvre. Voici les objectifs spécifiques de ces étapes :

- Extraction de l'huile des aiguilles de *Pin halepensis* à l'aide d'un solvant organique.
- Détermination des propriétés physico-chimiques de cette huile.
- Evaluation de l'activité biologique.

L'ensemble de ce travail se présente de la manière suivante :

Une première partie est destinée à une recherche bibliographique sur le pin et plus précisément le *Pin halepensis* ainsi qu'aux résultats de l'activité biologique effectués sur les différentes parties de cette plante.

Une deuxième partie concerne l'exposition des résultats et discussions évalués sur cette huile (indices, densité,...) ainsi que les valeurs de l'activité antioxydante.

II. Références

- (1): A. Beloued. plante médicinale d'Algérie. **2001**.
- (2): D. J. Newman, G.M. Cragg; K. M. Snader. *Natural Prod.* **2000**, 17, 175-285.
- (3): G.C. Kirby; T. Roy. *Soc. Trop. Med. Hyg.* **1996**, 90, 605-609.
- (4): P. I. Penchev. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. *Thèse de Doctorat- Université de Toulouse.* **2010**.
- (5): L. C. Duchesne. Les Produits Forestiers Non Ligneux au Canada - Une Industrie en Développement. *Service canadien des forêts, Centre de foresterie des Grand Lacs.* **2003**, 28.
- (6): S. I. Cameron; R. F. Smith. Ramener Sur Terre la Biologie Fondamentale -Arrimer la recherche sur les produits naturels et la commercialisation. *Ressources naturelles.* **2002**.
- (7): A. Harvey. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today.***2000**, 5 (7), 294-300.

CHAPITRE I: RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I-Description physique du Pin

Les pins se sont des arbres de la famille des **pinacées** et du genre *Pinus*. Ils sont largement distribués dans les zones tempérées de l'hémisphère. Cette famille comprend plus de 110 espèces qui poussent dans des habitats très variés, du niveau de la mer à des altitudes de 4000m. On les distingue des autres membres de la famille par leurs feuilles, qui sont des aiguilles dont la longueur varie entre 4 et 20 cm, sont disposées en faisceaux. Chaque faisceau comprend un nombre d'aiguilles particulier d'après lequel on divise les espèces en deux groupes : les espèces dont les aiguilles sont groupées par deux ou rarement, par trois et les espèces dont les aiguilles sont groupées par cinq. Les fruits sont des cônes de longueur variable entre 3 et 21 cm ; ils constitués d'écailles à l'aisselle desquelles on trouve les graines, *figure 2*. Ces arbres, dont la hauteur peut attendre 40m, ont une longévité importante⁽¹⁾. La carte présentée à la *figure 3* illustre la distribution du pin sur la terre.

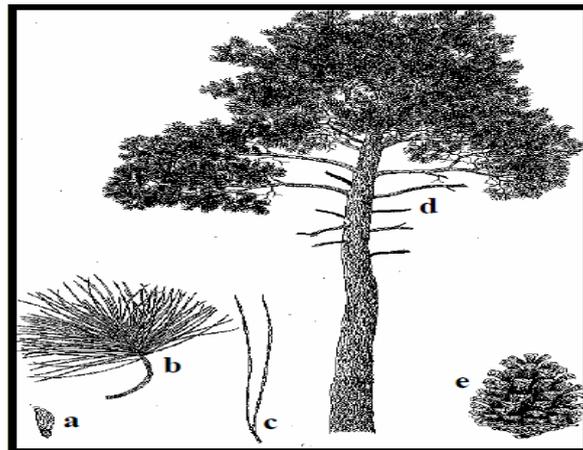


Figure2 : *a* : graine ; *b* : aiguilles ; *c* : fascicule ; *d* : tronc et branches ; *e* : cône.

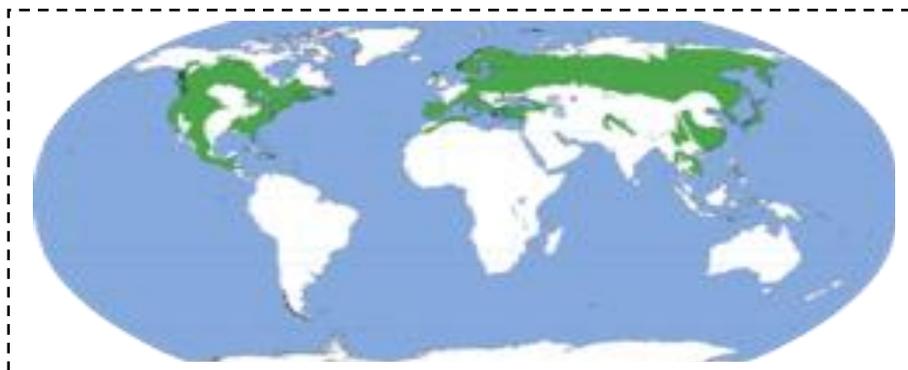


Figure 3 : Répartition géographique du Pin.

II-Pin halepensis

II.1-Appellations :

Le pin d'Alep (*Pinus halepensis*) est un arbre de la famille des pinacées. On l'appelle parfois *pin de Jérusalem* ou *pin blanc*. C'est un arbre de 5 à 20 m de hauteur qui vit souvent au voisinage du pin parasol et du pin pignon.



II.2-Origines :

Cet arbre est commun en Afrique du Nord, en Espagne, et en Italie. On le trouve aussi en Palestine, en Jordanie, au Liban, en Syrie, en Turquie, en Grèce et en France dans la région méditerranéenne.

II.3-Description botanique :

Le houppier de cette espèce est clair, souvent en forme de parasol. Son tronc est tortueux. Son écorce, de couleur gris argent, se fissure avec l'âge. Ses aiguilles mesurent de 6 à 10 cm de longueur et sont groupées par deux en pinceaux à l'extrémité des rameaux. Ses fleurs mâles et femelles sont séparées, mais sont situées sur le même sujet, toujours groupées en épis. Ses fruits sont des cônes pendants de 8 à 12 cm de longueur, persistant pendant plusieurs années sur les rameaux. Ses graines abondantes, d'environ 5 mm de longueur, possèdent une grande aile persistante qui permet une dissémination rapide et éloignée⁽¹⁾.

II.4-Répartition géographique :

D'après la carte géographique représentée à la **figure 4**, le pin *halepensis* est localisé sur pratiquement tout le bassin méditerranéen, on le retrouve surtout en Europe de sud et en nord-ouest d'Afrique.

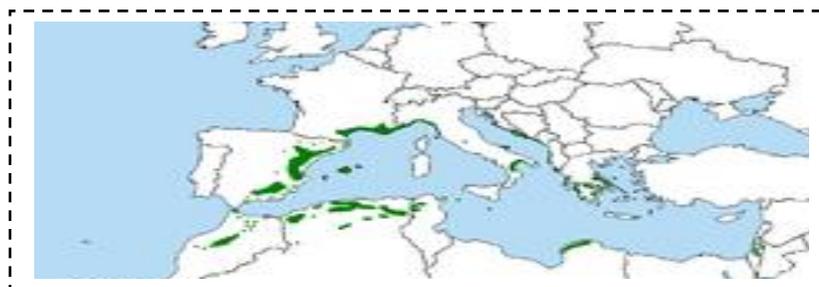


Figure 4 : Répartition géographique de *pin halepensis*.

II- L'huile de Pin

III.1-Composition chimique :

Parmi toutes les espèces de pins employées dans les recherches scientifiques, le pin *halepensis* occupe une place très importante dans les études récentes grâce à ses graines, qui sont caractérisés par leur richesse en huile. Ce résultat est illustré dans le tableau 1, représenté ci-dessous, dans le quel on peut remarquer que la teneur en huile dans les graines du genre *halepensis* montre le taux le plus élevé en huile par rapport aux autres espèces⁽²⁾. L'obtention d'une teneur similaire en huile ouvre un champ très vaste d'utilisation de cette dernière dans plusieurs domaines (pharmaceutique, cosmétique et alimentaire), vu qu'elle représente une matière naturelle, facilement accessible.

Tableau 1 : Teneur en huile pour différentes espèces de pin.

Numéro	Espèce	Nom	Origine	Teneur en huile (%)
1	<i>P. banksiana</i>	Jack pine	USA	27
2	<i>P. contorta</i>	Shore pine	USA	29
3	<i>P. palustris</i>	Longleaf pine	USA	22
4	<i>P. elliotii</i>	Slash pine	USA	19
5	<i>P. caribaea</i>	—	Cuba	24
6	<i>P. echinata</i>	Shortleaf pine	USA	18
7	<i>P. occidentalis</i>	Cuban pine	Cuba	25
8	<i>P. attenuata</i>	Knobcone pine	USA	32
9	<i>P. muricata</i>	Bishop pine	USA	32
10	<i>P. radiata</i>	Monterey pine	USA	31
11	<i>P. taeda</i>	Loblolly pine	USA	13
12	<i>P. pinaster</i>	Maritime pine	France	16
13	<i>P. ponderosa</i>	Western yellow pine	USA	28
14	<i>P. michoacana</i>	Michoacán pine	Mexico	16
15	<i>P. jeffreyi</i>	Jeffrey pine	USA	29
16	<i>P. halepensis</i>	Aleppo pine	France	35
17	<i>P. brutia</i>	Calabrian pine	Greece	14
18	<i>P. eldarica</i>	Afgan pine	Caucasius	18

L'huile de pin est riche en vitamines essentielles ainsi en substances macroéléments qui ont un pouvoir nutritif. Comme vitamines on peut citer : **E** ; **F**, connues pour leur haut niveau physiologique et propriétés antiacides, **B1**; **B2** ; **B3**; vitamine pro **A** (*bêta-carotène*) et d'autre caroténoïdes ^(3, 4), **figure 5**.

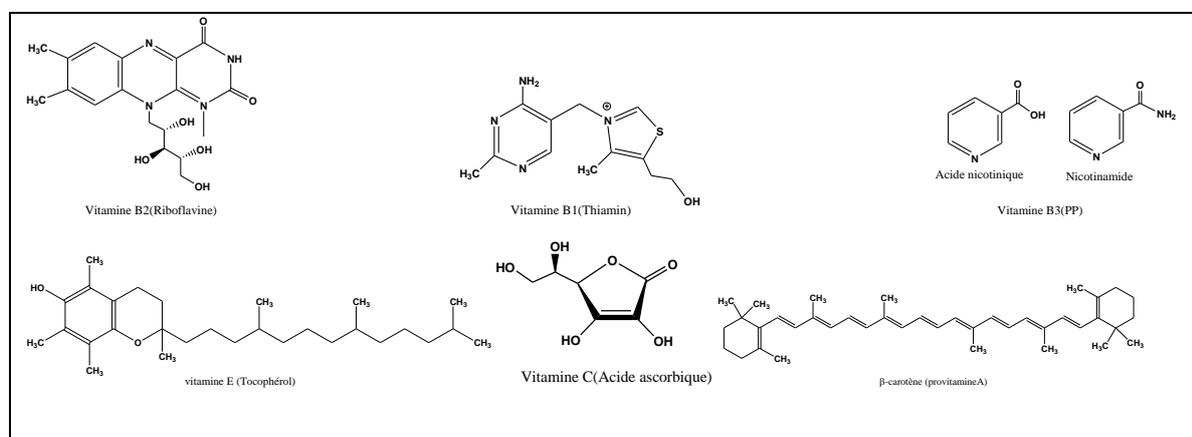


Figure 5 : Structure de quelques vitamines.

Dans cette huile il y a aussi des micros éléments comme le magnésium; zinc; fer; cuivre; iode; calcium; phosphore; manganèse; cobalt et une grande quantité des acides gras polyinsaturé. Ces éléments, qui ont un effet bénéfique pour la santé, sont fortement présents dans les graines du pin *halepensis*, comme le montre le tableau 2 ⁽⁵⁾. L'huile de pin contient également jusqu'à 5% de substances azotés, dont 90% sont les acides aminés, parmi lesquels 70% sont des amino acides essentiels ^(3, 4).

Tableau 2 : Teneur en minéraux des graines (mg/kg)

Elément	<i>P.halepensis</i>	<i>P.pinea</i> ¹	Deglet Nour ²
Potassium	6171±12.0	7130	2290
Magnésium	3303±9.8	3250	517
Calcium	1167±4.9	138	388
Phosphore	568±0.8	5120	683
Sodium	69.6±0.1	117	104
Fer	271±1.8	102	23
Cuivre	22.5±0.1	15	Nd
Zinc	134.9±0.4	64	Nd
Manganèse	51.3±0.1	69	Nd

Nd : non détecté, **(1)**: Nergiz et Dönmez (2004); **(2)** : Besbes et al (2004).

III.2-Intérêt thérapeutique :

Plusieurs études visant à évaluer le potentiel biopharmaceutique de différentes espèces de pins ont été rapportées dans la littérature. Ces travaux se penchent particulièrement sur le potentiel antioxydant, antibactérien et antifongique. Il existe aussi quelques études sur le potentiel anticancéreux des extraits de pins et de composés provenant du genre *Pinus* en particulier.

Par exemple, l'huile vierge de la noix de pin est une huile exquise d'une légère saveur de noisette, de couleur dorée. Elle est utilisée en aromathérapie dans les massages de la peau ; dans la cuisine (comme ingrédient pour les soupes, vinaigre,...), dans le soulagement de problèmes gastro-intestinaux. Cette huile se comporte également comme un inhibiteur de l'appétit, un stimulant de l'absorption des protéines, ainsi comme un produit naturel dans le traitement des maladies cardio-vasculaires. Aussi elle contient des antioxydants qui sont bénéfiques à l'organisme tout en entier^(3, 4).

a) Affection gastro-intestinale

Des recherches ont montrés que l'huile vierge du pin est efficace pour les maladies gastriques comme les ulcères de l'estomac et d'autres affections liées aux inflammations du revêtement gastro-intestinal.

b) Suppression de l'appétit

L'huile de pin fournit un moyen naturel pour diminuer la sensation de la faim. Ceci conduit à une réduction de la consommation calorique et à l'absorption de graisses^(6, 7). Donc elle peut être prescrit pour les personnes obèses sans avoir des effets secondaires, rencontrés avec la pris des produits chimiques.

c) Maladies cardio-vasculaires

L'huile contient de l'acide *pinolénique*, un acide gras polyinsaturé, isomère positionnel de l'acide gamma linoléinique (GLA), qui régule le taux des lipides totaux du sang, en réduisant la consolidation des plaquettes, ce qui aboutit à une diminution de la pression sanguine^(3, 4).

d) Activité antioxydante

La plupart des composés organiques, dans les corps vivants ou non, sont susceptibles de se dégrader à des températures plus ou moins élevées en présence de l'oxygène atmosphérique. Cette oxydation est à l'origine de la détérioration des propriétés mécaniques des polymères, du rancissement des corps gras alimentaires ou de diverses pathologies. Cela fait appelle à l'utilisation des antioxydants, qui sont capable à piéger les radicaux responsables de ces anomalies. L'activité antioxydante des extraits de *pinus* a été démontrée clairement au cours des dix dernières années. La présence de composés phénoliques explique en grande partie ce fort potentiel antioxydant ^(8, 9).

e) Activité Antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux des aiguilles de pin a été éprouvée sur déférentes souches bactériennes pathogènes, **le tableau 3** montre les déférentes concentrations inhibitrices et bactéricides minimales ⁽¹⁰⁾. Ces résultats suggèrent que les aiguilles de pin contiennent de substances antibactériennes efficaces. Par conséquent, elles possèdent le potentiel de devenir des produits antiseptiques naturels efficaces, comme elle peut être utilisée dans la conservation et la désinfection alimentaire.

Tableau 3 : Concentrations inhibitrices minimum (MIC) et concentrations bactéricides minimum (MBC) du PNAE sur les bactéries examinées

Souches bactériennes	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>B. subtilis</i>	3.8	7.5
<i>S. aureus</i>	15.00	30.0
<i>B. cereus</i>	7.5	15.0
<i>M. luteus</i>	7.5	15.0
<i>E. coli</i>	7.5	15.0
<i>P. vulgaris</i>	7.5	15.0

f) Activité anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire de l'huile des graines du *pinus sibirica* a été évalué et comparé à celle de la phénylbutazone. L'administration par voie orale de cette huile à une dose de 300 mg/kg a montré une activité anti-inflammatoire dans le cas d'un œdème induit chez les rats ⁽¹¹⁾.

En outre, cette même huile a montrée des propriétés analgésiques et d'antipyrétiques dans l'hyperthermie locale induite chez les rats. En conclusion, ces résultats fournissent en évidence l'utilité potentielle de l'extrait de l'huile de *P. sibirica*, qui contient des acides gras polyinsaturés à longue chaîne, stérols, tocophérols et polyphénols, dans les problèmes inflammatoires.

III-3. Intérêt nutritionnel et organoleptique :

En considérant l'apport énergétique provient essentiellement des protéines, il est maintenant admis, que les corps gras fournissent environ deux fois plus de calories que les glucides. Les corps gras, qu'ils soient d'origine végétale ou animale, restent des nutriments indispensables pour l'organisme. En plus de leur rôle nutritionnel, les corps gras ont un intérêt organoleptique non négligeable. En effet, ils contribuent par leur utilisation culinaire, à la sapidité des aliments ainsi qu'à leurs textures. Donc les corps gras rencontrés dans l'huile de pins peuvent fournir les mêmes effets dans le domaine agroalimentaire.

Références

- (1): Farjon, A. L. Brill, Pins. *Schémas et descriptions du genre pinus*. **2005**.
- (2): R. L. Wolff ; B. Comps ; L. G. Deluc. A. M. Marpeau. *JAOCs*, **1998**, 75, 45-50.
- (3): C. Stephen Woods Gastrointestinal Satiety Signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *American Journal of physiology*, **2004**, 286: G7-G13.
- (4): H. R. Kissileff, J. C. Carretta, A. Geliebter, and F. Xavier Pi-Sunyer. Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *American Journal of Physiology*, **2003**, 285: 998.
- (5): S. C. Rouhou, B. Hentati, S. Besbes, C. Blecker, C. Deroanne and H. Attia *Food Science and Technology International* **2006**, 12: 407.
- (6): W. J. Pasman, J. Heimerikx, C. M. Rubingh, R. Berg, M. O'Shea, L. Gambelli, H. FJ Hendriks, A. Einerhand, C. Scott, H.G. Keizer and L. I. Mennen. *Lipids in Health and Disease* **2008**, 7:10.
- (7): G. M. Hughes, E. J. Boyland, N. J. Williams, L. Mennen, C. Scott, T. C. Kirkham, J. A. Harrold, H. G. Keizer and J. Halford. *Lipids in Health and Disease* **2008**, 7:6.
- (8): Y. S. Park, M. HeeJeon, H. J. Hwang, M. Park, S. H. Lee, S. G. Kim and M. Kim. *Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract)* **2011**;5(4):281-287.
- (9): N. Y. Kim, M. K. Jang, D. G. Lee, K. H. Yu, H. Jang, M. Kim, S. Kim, B. H. Yoo and S. H. Lee. *Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract)* **2010**;4(1):16-22.
- (10): S. Feng, W. Zeng, F. Luo, J. Zhao, Z. Yang, and Q. Sun. *Food Sci. Biotechnol.* **2010**.19(1): 35-41,
- (11): A. N. Shikov, O. N. Pozharitskaya, V. G. Makarov, M. N. Makarova. *J Nat Med.* **2008**, 62:436–440:

CHAPITRE II : TRAVAUX REALISES

I-Introduction:

L'obtention des huiles à partir des substances naturelles se fait par différentes techniques d'extraction, qui consistent à retirer une ou plusieurs espèces chimiques d'un milieu solide ou liquide. Le procédé de l'extraction repose sur les différences de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant.

- Méthodes d'extractions :

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits présents dans les plantes à haute valeur. Ces techniques peuvent être conventionnelles ou nouvelles ⁽¹⁾. Parmi ces dernières on peut mentionner l'extraction par un solvant, L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur qui sont les plus utilisés.

1- Extraction par un solvant

L'extraction par un solvant consiste à faire passer la substance à extraire dans un solvant par solubilisation. Celui-ci peut être de l'eau, mais généralement il s'agit d'un solvant organique issu de la chimie du pétrole : cyclohexane, éther de pétrole, toluène ...

La solubilisation peut être effectuée par différentes méthodes :

- **Infusion:** consiste à verser de l'eau bouillante sur les feuilles ou les fleurs finement hachées de la plante.
- **Décoction :** la plante est mise dans l'eau froide. Porter à l'ébullition quelques temps. Cette méthode de transformation ne permet pas d'extraire autant de principes actifs que l'infusion, mais elle est adaptée aux racines, écorces pour lesquelles l'extraction est difficile.
- **Macération :** c'est l'action de laisser séjourner, à froid, dans un solvant organique une substance pour en extraire les constituants solubles.

2- Extraction par soxhlet

L'extraction par *Soxhlet* est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec un solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première ^(2, 3).

Le schéma d'un appareil *Soxhlet* est représenté sur la **figure 1**, Il est composé d'une colonne en verre, dans laquelle est placée une cartouche en papier-filtre épais, d'une matière pénétrable pour le solvant, d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le ballon est chauffé afin de pouvoir faire bouillir son contenu. La cartouche contenant le solide à extraire est insérée dans l'extracteur, au dessus duquel est placé un réfrigérant servant à liquéfier les vapeurs du solvant.

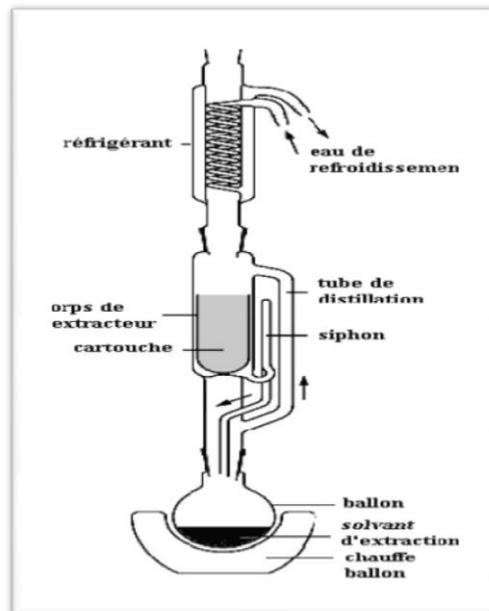


Figure1: *Extracteur de soxhlet*

La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide d'un *rotavapeur*. Pendant l'évaporation le ballon est mis en rotation afin d'accélérer l'opération.

3- Hydro distillation

Il s'agit d'une distillation simple d'un mélange composé de l'eau et le produit naturel. Pendant le chauffage du mélange, les arômes du produit naturel sont entraînés par la vapeur

d'eau. Il suffit alors de condenser les vapeurs qui se dégagent à l'aide d'un réfrigérant, afin de récupérer les arômes isolés.

Le mélange obtenu comporte deux phases : une première organique qui constitue l'huile essentielle, et une deuxième, représente la phase aqueuse. Cette opération est ensuite suivie par une extraction liquide-liquide pour récupérer l'huile essentielle.

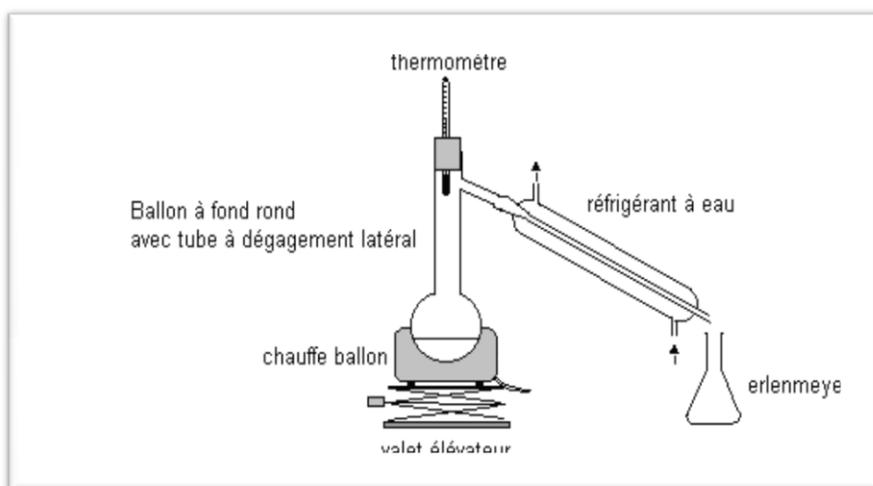


Figure 2: Montage de l'hydro distillation.

4- Entrainement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur est une technique largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles ⁽⁴⁾. L'avantage de cette technique réside dans l'abaissement de la température de distillation ; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition ⁽⁴⁾.

II –Travaux effectués

Le pin que nous avons utilisé dans cette étude est celui de la catégorie *Pinus halepensis*, qui appartient à la famille des pinacées de la région Nord-ouest de l'Afrique. Cette étude a été effectuée en utilisant uniquement les feuilles de cet arbre qui sont sous forme des aiguilles d'une longueur de 6 à 10 cm.

Pour réaliser ce travail, et afin d'atteindre l'objectif principale, nous avons commencés par l'extraction de l'huile des aiguilles de pin ramassées d'un jardin de la région de Berwana à la wilaya de Tlemcen.

Les aiguilles utilisées dans cette étude ont été sous forme de deux états : fraîches, récoltées de l'arbre directement, et sèches, tombées sur terre après une bonne période. Pour effectuer une extraction complète, et afin de récupérer une quantité importante d'huile, nous avons transformés cette substance naturelle en une poudre fine par broyage dans le but d'obtenir un bon rendement en matière grasse.

L'extraction que nous avons appliquée et celle avec *soxhlet*, en utilisant l'éther de pétrole comme solvant. Cette opération a été réalisée sur une masse bien déterminée de notre substance végétale pendant 6 de reflux, suivie par évaporation du solvant dans un *rotavapeur*.

1- Analyse chimique des aiguilles de pin :

- Humidité : C'est le pourcentage de l'eau qui se trouve dans la matière végétale d'une masse connue, le calcul de ce pourcentage s'effectue comme suit :

$$\% = \frac{[\text{masse}_{\text{initiale}} - \text{masse}_{\text{finale}}]}{\text{masse}_{\text{initiale}}} \times 100$$

- Lipides : C'est la quantité de la matière grasse extraite à partir des aiguilles du pin, et qui représente le rendement de l'extraction par rapport à une masse bien déterminée de la substance végétale.

$$R_{dt} = \frac{m_{\text{finale}}}{m_{\text{initiale}}} \times 100$$

- Cendres : C'est le pourcentage des matières inorganiques qui se trouve dans une masse connue de la matière végétale. Cette analyse a été effectuée à l'usine ALZINC à Ghazaouet. Cependant, la teneur en minéraux n'a pas pu être réalisée puisqu'il fallait prendre une grande quantité des aiguilles de pin afin d'avoir une masse suffisante des cendres.

a. l'huile obtenue à partir des aiguilles fraîches

L'huile que nous avons obtenue à partir des aiguilles fraîches est d'une couleur verte, à cause de la présence de la chlorophylle, qui nous a posée un problème de séparation au

départ. L'analyse chimique de la poudre des aiguilles fraîches, nous a donnée les résultats représentés dans le **tableau 1**, ci-contre :

Tableau 1 : Aiguilles fraîches

Humidité	Lipides	Cendres
14,35%	17,2%	3,36%

b. L'huile obtenue à partir des aiguilles sèches

L'huile obtenue à partir des aiguilles sèches est d'une couleur doré, comme elle ne contient pas de la chlorophylle, ce qui nous a facilité le travail avec cette matière grasse. Les résultats de l'analyse chimique de cette huile sont motionnés dans le **tableau 2**, représenté ci-dessous :

Tableau 2 : Aiguilles sèches

Humidité	Lipides	Cendres
11,09%	20,86%	n'ont pas été déterminés

Les valeurs obtenues pour les aiguilles de pin des deux états (**Tableau 1 et 2**) montrent que le pourcentage de l'humidité de la substance sèche est inférieur à celui déterminé pour la substance fraîche. Ce résultat est normal car le taux de l'eau diminue après le séchage à l'air. Par contre la teneur en lipides pour les aiguilles sèches est supérieur à celle des aiguilles fraîches, ce qui explique la combustion facile des aiguilles sèches dans les forêts, cause de plusieurs incendies.

2- Extraction des acides gras

a- Revue de la littérature

Les acides gras entrent dans la composition des lipides. On distingue 3 classes qui se différencient par leur degré d'insaturation : les acides gras saturés (AGS), mono insaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) ⁽⁵⁾ *figure 3*.

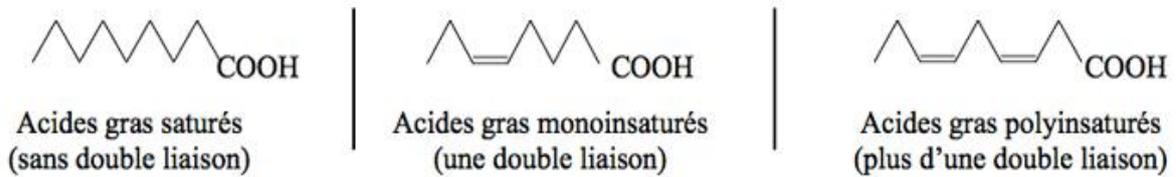


Figure 3 : *Acides gras*

a.1- Les acides gras polyinsaturés

Ce sont des acides qui contiennent plusieurs insaturations, et qui se distinguent les uns des autres par le nombre et la position de l'insaturation. Il existe deux familles d'acides gras polyinsaturés essentiels, nommés n-3 (ou *oméga-3*) et n-6 (ou *oméga-6*) par rapport à la position de la dernière double liaison et à C terminale.

Deux acides gras sont à l'origine de ces familles. Il s'agit de l'acide α -linoléique, le précurseur des *oméga-3*, et l'acide linoléique, qui est le précurseur de la famille des *oméga-6*. Ces deux acides gras sont indispensables car ils ne sont pas synthétisables par l'organisme. Seule l'alimentation peut nous les fournir.

Ces dernières années, l'acide α -linoléique ainsi que deux de ses dérivés, l'EPA (Acide Eicosapentaénoïque) et le DHA (Acide Docosahexaénoïque), ont particulièrement intéressé les nutritionnistes pour leur rôle important dans la prévention des maladies cardio-vasculaires.

a.2- Rôle et intérêt des AGPIs

Les acides gras polyinsaturés participent à un grand nombre de fonctions biologiques :

- Source d'énergie.
- Constituants fondamentaux des phospholipides des membranes cellulaires.
- Précurseurs de molécules régulant les fonctions cellulaires telles que :
 - Les prostaglandines et les fonctions reproductrices
 - Les thromboxanes et les fonctions plaquettaires

- Régulation de l'expression de gènes impliqués dans leur propre transport et leur métabolisme.

Les *oméga-3* ont de plus des fonctions spécifiques dans le développement et la physiologie de la rétine, du cerveau et du système nerveux. Ils semblent être protecteurs vis-à-vis des maladies cardio-vasculaires et ils permettraient de diminuer un certain nombre de facteurs de risques liés à ces maladies. Ainsi, l'acide α -linoléique inhiberait l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine. L'EPA et le DHA agiraient sur l'agrégation au collagène et diminueraient le taux de triglycérides sanguins. Les AGPI à longue chaîne semblent également protecteurs vis-à-vis de différents cancers. Ils sont considérés comme inhibiteurs de la croissance tumorale ^(6, 7).

b- Acides gras obtenus

L'extraction des acides gras a été effectuée par saponification de la matière grasse obtenue à partir des aiguilles fraîches, suivie d'une hydrolyse acide. La teneur obtenue est de **62,25%** à partir d'une masse initiale de 20,19g.

$$20,19\text{g} \longrightarrow 100\%$$

$$12,57\text{g} \longrightarrow x = ? \quad \Longrightarrow \quad x = \mathbf{62,25\%}$$

-propriétés des acides gras obtenus :

Indices	Peroxyde	Réfraction
AG barboté avec l'azote	30 meq d'O ₂ /kg	1,49079 à 22,5°C
AG sans barbotage de l'azote	47,5 meq d'O ₂ /kg.	1,50887 à 23°C

3- propriété chimique et physique de l'huile:

a- Indice d'acide

C'est la masse de potasse, exprimé en mg, nécessaire pour neutraliser l'acidité libre contenu dans un gramme de corps gras. Le calcul de cette valeur est comme suit :

$$IA = \frac{m_b}{m_h} \text{ avec } m_b = C_B \cdot V \cdot M$$

m_h : masse de l'huile ; m_b : masse du potasse

C_B : concentration du KOH ; V : volume de KOH ; M : masse molaire du KOH.

Les indices d'acides des deux extraits sont :

IA = 113,03 mg, pour l'huile des aiguilles fraîches.

IA = 93,39 mg, pour l'huile des aiguilles sèches.

Ce résultat montre que notre huile contient une bonne quantité d'acides libre si elle est extraite des aiguilles de pin fraîches, cette valeur diminue dans l'huile des aiguilles sèches.

b- Indice de saponification

Il correspond à la masse de potasse en mg nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et pour saponifier les acides gras combinés dans un gramme de corps gras.

$$IS = \frac{(V_T - V_E) \times C_{HCl} \times M_{KOH}}{m_h}$$

V_T : volume à blanc ; V_E : volume de l'échantillon ;

C_{HCl} : concentration de l'HCl ; M_{KOH} : masse molaire du KOH ; m_h : masse de l'huile.

La valeur obtenue est de : **IS = 100,11mg**, à partir des aiguilles de pin fraîches, cela montre que notre huile contient des acides gras à longueur de chaîne moyenne, ce qui donne à cette huile la capacité de devenir un lubrifiant (savon, détergent...). Dans le cas des aiguilles sèches l'indice est : **IS = 92,79 mg**, on constate une diminution de l'indice avec le séchage de la matière première.

c- Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde d'un corps gras est le nombre de milliéquivalent d'oxygène contenus dans un kilogramme de produit qui permettent d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode. Calculé comme suit :

$$I_p = 5(V_E - V_b)$$

V_E : volume de l'échantillon

V_b : volume à blanc.

Pour notre huile l'indice de peroxyde est de : **I.P = 6,75 meq d'O₂/kg**, dans le cas des aiguilles fraîches, cette valeur montre que notre huile est relativement stable vis-à-vis de l'oxydation. Mais dans le cas des aiguilles sèches cet indice augmente, il est de : **I.P = 16,24 meq d'O₂/kg**, cela veut dire que l'huile commence à perdre sa stabilité.

d- Indice d'iode

L'indice d'iode est la masse de diiode (I₂) exprimée en gramme capable de se fixer sur les insaturations des acides gras de 100g de matière grasse, en utilisant la méthode de **Wijis**.

$$I_I = \frac{C_{so4} \times (V_{E1} - V_{E2}) \times M_{I2}}{2}$$

C_{so4} : concentration de thiosulfate ; V_{E1} : volume à blanc ;

V_{E2} : volume de l'échantillon ; M_{I2} : masse molaire d'I₂.

Pour l'huile des aiguilles de pin fraîches cet indice n'a pas été réalisé. Par contre, il est de : **I.I = 86,71 g I₂/100 g**, pour le deuxième extrait des aiguilles sèches, cette valeur montre que l'huile contient des acides gras insaturés.

e- Indice de réfraction

La mesure de l'indice de réfraction a été faite à une température de 22°C avec un réfractomètre par lecture directe, et la valeur lue pour l'huile obtenue à partir des aiguilles sèches est la suivante :

$$n_D = 1,48276 \text{ à } 22^\circ\text{C}$$

f- Densité :

C'est le rapport entre la masse et le volume de notre huile, elle se mesure par rapporte à l'eau ou l'air. Sa mesure a été effectuée dans notre laboratoire à l'aide d'un pycnomètre. La valeur obtenue pour l'huiles des aiguilles sèche est de :

$$d = 0,906$$

4- Test de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à piéger les radicaux libres. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent est de combiner les résultats de différents tests pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester ^(8, 9, 10).

Dans notre travail, le test antioxydant a été évalué sur l'huile obtenue avec la méthode de DPPH. De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH• est recommandé pour des composés contenant SH⁻, NH⁻ et OH⁻ groupes ⁽¹¹⁾. Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles de l'échantillon. Le test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles en provenance de thé vert, des jus de fruits et de raisins, pépins et pulpes, très riches en composés phénoliques ^(12, 13).

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques ^(14, 15). Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères, DPPH• reste dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH•, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.

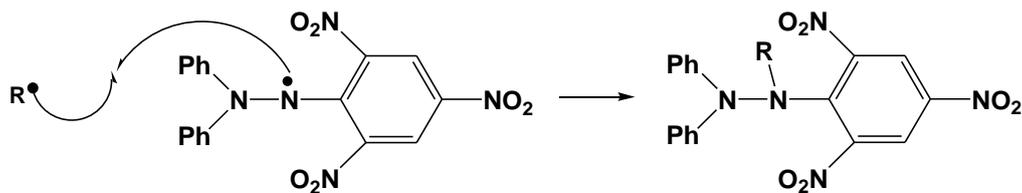


Figure 4 : le radical DPPH

$$\%DPPH = [\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}} / \text{Abs}_{\text{contrôle}}] \times 100$$

Les résultats des pourcentages du DPPH réduit en fonction de la concentration de l'huile sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 3 : %DPPH réduit / C (g/l) de l'huile

C (g/l)	2,6	2,01	1,34	1,005	0,67	0,134	0,0134
%DPPH	71,29	66,51	62,36	60,06	58,27	53,54	49,63

D'après les résultats du **tableau 3** ; on remarque que le pourcentage du DPPH réduit par notre huile augmente avec l'augmentation de la concentration de cette dernière. Cela prouve que notre huile contient des composés à pouvoir antioxydant.

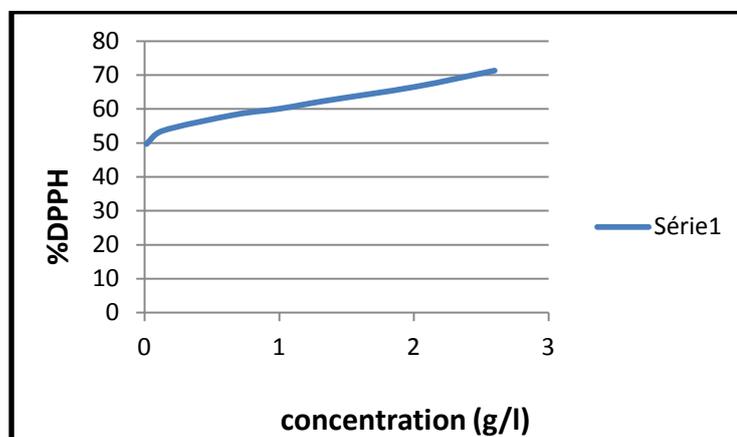


Figure 5 : %DPPH réduit / C (g/l) de l'huile

La valeur du IC_{50} a été déterminée graphiquement et elle est égale à : **0,026g/l**.

Donc pour réduire 50% du DPPH il ne faut uniquement 26 mg d'huile, avec une activité antiradicalaire de 0,038 calculée selon la relation suivante :

$$AAR = \frac{1}{IC_{50}}$$

Références:

- (1): M.D. Castro, L.E. Garcia-Ayuso, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Analytica Chimica Acta*, **1998**, 369, 1-10.
- (2): D. Grigonis, P.R. Venskutonis, B. Sivik, M. Sandahl, C.S. Eskilsson, Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*), *The Journal of Supercritical Fluids*, **2005**, 33 (3), 223-233.
- (3): L. Wang, C. L. Waller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, **2006**, 17, 300 – 312.
- (4): A. P. Carnat, A. Carnat, D. Fraisse, L. Ricoux, J. L. Lamaison, The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *Officinalis*) tea, *Pharmaceutica Acta Helveticae*, **1998**, 72 (5), 301-305.
- (5): Apports nutritionnels conseillés dans la population française, 3ème édition, *CNERNA- CNRS*, **2001**.
- (6): S. Vancassel ; P. Guesnet. AGPI et physiologie du système nerveux central. **2001**
- (7): Nutrient and energy intakes for the European Community, *Report of the Scientific Committee on Food*, **1992**.
- (8): J.Tabart , C. Kevers, J. Pincemail, J.Defraigne, J. Dommes. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* **2009**, 113, 1226-1233.
- (9): C. Saint-Cricq, N. N .Vivas. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, 47, 425-431.
- (10): H. Li, X. Wang, P. Li, Y. Li, H. Wang. Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* **2008**, 16 (6), 67-73.
- (11): N.Salah, N.J. Miller, G. Paganga, L.Tijburg, G.P. Bolwell, C.A Rice-Evans. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1995**, 339-346.
- (12): C. Yi-Zhong, M. Sun, J. Xing, Q. Luo, H. Corke. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences* **2006**, 78(25), 2872-2888.
- (13): E.F. Hatzidimitriou., N.Nenadis, M.Z. Tsimidou. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity conditions. *Food Chemistry* **2007**, 105, 1504-1511.
- (14): M.S Blois. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature* **1958**, 181, 1199-1200.
- (15): W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier., C.Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie* **1995**, 28, 25-30.

CONCLUSION GENERALE

Le travail qui fait l'objet de ce mémoire est consacré à l'extraction et à la caractérisation physico-chimique de l'huile des aiguilles de pin de la catégorie *halepensis*, qui se trouve à la région de Tlemcen.

L'efficacité de l'extraction de l'huile dépend de plusieurs facteurs et plus précisément le traitement de la matière végétale. Le choix de la méthode de l'extraction et du solvant reste aussi primordial. En effet, l'extraction de l'huile à partir des aiguilles de pin broyées et sèches, par l'éther de pétrole permet de donner le meilleur rendement.

L'huile de pin qui présente un taux d'acidité et de peroxyde élevé reste toujours exposée aux altérations. En effet, il est indispensable de respecter les conditions de conservation de l'huile (conservation à l'abri de l'air, dans un endroit opaque et loin de la chaleur,...).

La richesse de l'huile en corps gras, donne une très grande importance à cette dernière ainsi ouvre plusieurs domaines de recherches en tant que matière première naturelle. En plus, elle peut être utilisée comme un produit alimentaire, pharmaceutique ou cosmétique si elle respecte les critères de bonne valeur nutritive.

Le travail réalisé représente une initiation à la recherche des huiles naturelles à intérêt biologique et avec un large domaine d'utilisation. Pour cela, cette étude nécessite d'être accomplie et approfondie par séparation et analyses spectroscopiques des extraits obtenus, afin de connaître la composition exacte de cette huile. En plus, faire les autres tests biologiques, notamment l'activité antibactérienne et antifongique pour comparer et prouver l'importance de l'huile de pin de notre région par rapport à l'huile des autres espèces de la même famille.

PARTIE EXPERIMENTALE

Ces travaux ont été réalisés dans le laboratoire de Chimie Organique Substance Natural et Analyse (COSNA) sous la direction du Pr. Kajima Mulengi.

I. Extraction de l'huile :

Protocole

Dans un dispositif d'extraction avec *Soxhlet*, **88,7g** des aiguilles de pin broyées sont placées dans une cartouche poreuse dans l'extracteur soxhlet. Ce dernier est fixé avec un ballon qui contient 550 ml de l'éther de pétrole et quelques pierres ponce. Le tout est surmonté d'un réfrigérant pour condenser les vapeurs. Le solvant de l'extraction est ensuite chauffé entre 40 et 60°C pendant 6 heures. A la fin le mélange récupéré est évaporé à l'aide d'un rotavapeur, afin de séparer le solvant. L'huile est obtenue avec une masse de **15,26g**.

$$m_{\text{finale}} = 15,26\text{g}$$

Rendement de l'extraction :

$$R_{dt} = \frac{m_{\text{finale}}}{m_{\text{initiale}}} = \frac{15,26}{88,7} \times 100 = 17,2\% \quad R_{dt} = 17,2\%$$

II- Caractérisation de l'huile :

- Détermination de l'humidité :

Une masse de 1,6842 g d'huile est placée dans une étuve toute une nuit réglée à une température supérieure à 100°C. La nouvelle masse obtenue est de : **m=1,4425g**

$$\text{Donc : } m_{\text{H}_2\text{O}} = 1,6842 - 1,4425 = 0,2417\text{g}$$

$$\text{On à : } 1,6842\text{g} \longrightarrow 100\%$$

$$0,2417\text{g} \longrightarrow X \quad \text{donc : } X = 14,3\%$$

- Détermination de la teneur des cendres :

Ce travail a été réalisé à l'usine ALZINC à Ghazaouate, en utilisant un four à moufle à une température de 550°C. A la fin, la matière organique est brûlée complètement laissant uniquement les cendres avec un pourcentage de : **3,36%** pour les aiguilles fraîches. Pour les aiguilles sèches cette analyse n'a pas été réalisée.

-Détermination des indices :

a -Indice de peroxyde :

Pour la mesure de l'indice de peroxyde, on doit préparer les solutions suivantes :

- Solution aqueuse saturée d'iodure de potassium (KI) : Dans un bécher on met l'eau distillée, puis on ajoute la poudre de KI jusqu'à la saturation (au moment où KI devient insoluble dans l'eau). On laisse la solution reposer, puis on filtre le mélange pour éliminer l'excès de KI.
- Solution aqueuse N/100 de thiosulfate de sodium : On a : $n = 0,01 \text{ mol/l}$

$$1000 \text{ ml} \longrightarrow 0,01 \text{ mol}$$

$$500 \text{ ml} \longrightarrow n = \frac{500 \times 0,01}{1000} = 0,005 \text{ mol}$$

$$n = \frac{m}{M} \iff m = n \times M = 0,005 \times 158,11 = 0,8 \text{ g}$$

Dans une fiole jaugée de 500ml, on introduit 0,8g de thiosulfate de sodium avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

- Solution de 15ml d'acide acétique et 10ml de chloroforme sous courant d'azote
- Solution d'empois d'amidon (indicateur d'iode): on porte 1g d'empois d'amidon avec 10ml d'eau distillée à l'ébullition pour 4 à 5min.

Mode opératoire

Dans un ballon et sous courant d'azote avec agitation, on mélange 2g d'huile, obtenue à partir des aiguilles de pin, avec 25ml de la solution d'acide acétique et du chloroforme. Ensuite 1ml de la solution de KI est ajouté. Après 5 min dans l'obscurité, on ajoute rapidement 75ml d'eau distillée, pour arrêter la réaction, avec quelques gouttes d'indicateur, ce qui donne à la solution une couleur violette. En fin le mélange obtenu est titré avec une solution de thiosulfate de sodium de 0,01 M, jusqu'à la disparition de la couleur violette. Trois essais ont été réalisés, dont un à blanc (en absence d'huile) :

$$V' = V_0 = 0 \text{ ml (sans huile)} ; V_1 = 1,3 \text{ ml} ; V_2 = 1,4 \text{ ml}$$

$$\text{Indice de peroxyde (meq d'O}_2\text{/Kg)} = (V-V') \times 5 \quad \text{donc : } I_p = 6,75 \text{ meq d'O}_2\text{/Kg}$$

b- Indice d'acide

Mode opératoire

Dans un erlenmeyer et sous agitation magnétique, on mélange une masse d'huile avec 10ml d'éther de pétrole et 10ml d'éthanol. Cette solution est ensuite titrée en présence de deux gouttes de phénolphthaléine avec une autre solution de KOH 0,1 M, jusqu'à l'apparition d'une coloration rouge persistante. Deux essais ont été effectués et les résultats sont comme suit.

Essai	V _{KOH} (ml)	m _{huile} (g)	m _b (g)	IA (mgKOH/g)
1	10,2	0,5086	5,73.10 ⁻³	112,72
2	10,5	0,5207	5,902.10 ⁻³	113,34

C_B : concentration du KOH= 0,100185 M

$$m_b = C_B \cdot V \cdot M : \text{masse du KOH donc } m_b = 0,100185 \times 10,2 \cdot 10^{-3} \times 56,11 = 5,73 \cdot 10^{-2} \text{ g}$$

Il nous faut 57,33mg de potasse pour doser 0,5086g d'huile, donc pour doser 1g d'huile il faudra :

$$IA_1 = \frac{57,33}{0,5086} = 112,72 \text{ mg KOH/g}$$

$$\text{Donc: } IA = 113,03 \text{ mg KOH/g}$$

c- Indice de saponification

Mode opératoire

Dans un erlenmeyer, on introduit 4,0631g d'huile avec 50ml d'éther de pétrole et 50ml d'éthanol. Après dissolution complète, on prélève 10ml de cette solution et on la verse dans un ballon avec 25 ml de KOH 0,5 M, Le mélange obtenu est ensuite porté à reflux avec agitation pendant une heure. Laisser refroidir et ajouter deux gouttes de la phénolphthaléine, une solution violette est obtenue. A la fin, cette dernière est dosée avec une solution de HCl à 0,5M jusqu'à la disparition de la couleur violette.

$$I_s = \frac{(VT - VE) \times CHCl \times MKOH}{mh}$$

V_T : volume à blanc=18,5ml

Essai	$V_{HCl}(ml)$	Is(mg)
1	17,1	96,66
2	17	103,57

Is=100,11mg

III-Extraction des acides gras :

Mode opératoire

Dans un ballon, on place une masse de 20,19g d'huile, obtenue à partir des aiguilles de pin fraîches, avec 344ml de KOH 1M, ce mélange est ensuite porté à reflux pendant une heure. Une fois le reflux est terminé on ajoute l'eau distillée et l'éther de pétrole successivement, deux phases sont obtenues, organique et aqueuse, les quelles sont séparer à l'aide d'une ampoule à décanter. Après séchage de la phase organique avec le sulfate de magnésium on évapore le solvant. Un liquide de couleur orange est obtenu avec une masse de 5,52g, qui représente la partie insaponifiable.

En parallèle la phase aqueuse est acidifiée avec une solution de HCl 6M, deux phases sont obtenues, aqueuse et organique, où cette dernière correspond aux acides gras purs hydrolysés après saponification. La séparation des deux phases est ensuite effectuée avec extraction par l'éther de pétrole, en lavant trois fois la phase aqueuse. Après évaporation du solvant on obtient 12,57g d'acides gras purs, avec un pourcentage de 62,25%

20,19g \longrightarrow 100%

12,57g \longrightarrow x = ? \Longrightarrow x=62,25%

Le mélange des acides obtenu est engagé ensuite dans une étude chimique, portant sur la détermination de l'indice de peroxyde, en utilisant le même protocole décrit précédemment. Les résultats sont comme suit :

- Les acides gras sans courant d'azote ont la valeur: **Ip=47,5 meq d'O₂/kg.**
- Les acides gras sous courant d'azote ont la valeur de :**Ip=30 meq d'O₂/kg.**

-Indice de réfraction des acides gras :

Mode opératoire

La mesure de l'indice de réfraction a été réalisée à l'aide d'un réfractomètre T1/T4. Premièrement, on commence par l'étalonnage du réfractomètre avec de l'eau distillée, on met une goutte d'eau sur le premier prisme et on ferme avec le deuxième prisme. Tout en observant par l'oculaire, on tourne le knop de mesure pour obtenir la balance d'indice de réfraction pour indiquer approximativement 1,3330 à 20°C, puis on regarde le champ de la vue de réfraction, on observe la ligne colorée de frontière près de l'intersection des poils en travers. On tourne le knop de compensateur de couleur pour achromatiser la ligne de frontière, et on cesse la rotation quand la ligne de frontière ne devient ni rougeâtre ni bleuâtre. On tourne le knop de mesure encore de sorte que la balance lise 1,3330. Par la suite, on place deux gouttes de notre huile sur le prisme de l'échantillon et on suit les mêmes étapes, les résultats obtenus sont les suivants :

L'huile sous courant d'azote à : $n_D=1,49079$ à $22,5^\circ\text{C}$.

L'huile sans courant d'azote à : $n_D=1,50887$ à 23°C .

IV- L'huile obtenue à partir des aiguilles sèches :

L'extraction de l'huile des aiguilles sèches a été effectuée selon le même protocole signalé plus haut, le rendement de cette huile est de **20,86%**.

-Détermination de l'humidité : même protocole précédent

$$m_{\text{H}_2\text{O}}=1,2093-1,0752=0,1341\text{ g}$$

$$1,2093\text{ g} \longrightarrow 100\%$$

$$0,1341\text{ g} \longrightarrow x \iff x=11,09\%$$

-Détermination de densité

Dans un pycnomètre de volume connu ($V=5,263\text{ml}$), on place la quantité nécessaire de notre huile, puis on pèse l'ensemble : $m=4,7681\text{g}$.

La densité des liquides est le rapport de la masse volumique de la substance sur la masse volumique de l'eau. Avec celle de l'eau égale à 1g/ml .

$$d = \frac{m}{v} = \frac{4,7681}{5,263} = 0,906 \quad \Longrightarrow \quad \mathbf{d=0,906}$$

-Détermination des indices

a- Indice de saponification

Mode opératoire : même protocole précédent

$$V_1=2,8\text{ml} \quad V_2=3,2\text{ml}$$

Pour l'essai à blanc $V=6\text{ml}$; $V_{\text{HCl}}=6-2,8=3,2\text{ml}$

$$C_1V_1=C_2V_2 \quad \Longrightarrow \quad V_2 = \frac{C_1V_1}{C_2} \quad \Longrightarrow \quad V_{\text{KOH}} = \frac{0,25 \times 3,2}{0,2} = 4\text{ml}$$

$$C = \frac{n}{V} \quad \Longrightarrow \quad n.c = \frac{m}{MV} \quad \Longrightarrow \quad m = C.M.V$$

$$m = 0,2 \times 56,11 \times 4 \cdot 10^{-3} = 44,80\text{mg}$$

$$44,80 \longrightarrow 0,453\text{g}$$

$$I_s \longrightarrow 1\text{g} \quad \Longrightarrow \quad I_{s1}=98,89\text{mg}; I_{s2}=86,70\text{mg}, \text{ donc : } \mathbf{I_s=92,79\text{mg}}$$

a- Indice d'iode

Mode opératoire

Pour déterminer l'indice d'iode on commence par la préparation des solutions suivantes :

- Solution d'iodure de potassium : 10g de KI dans 100ml d'eau distillée
- Solution du chlorure d'iode (réactif de Wijis, ICl) : $C=10^{-1}\text{M}$
- Solution de thiosulfate de sodium $C=10^{-1}\text{M}$

Dans un erlenmeyer, on introduit 25ml de cyclohexane et 10ml de réactif de Wijis et on agite, puis on traite ce mélange avec 100ml d'eau et 15ml de la solution du KI, on obtient

deux phases. On titre la solution obtenue avec du thiosulfate jusqu'à la disparition de la couleur de la phase aqueuse, puis on ajoute 1ml d'empois d'amidon et on continue le titrage jusqu'à la décoloration totale des deux phases, on obtient $V_{E1}=19,2\text{ml}$.

Après, une masse de notre huile est mélangée avec 25ml de cyclohexane et 10ml de réactif de Wiggins sous agitation et à l'obscurité pendant 45min. Ensuite, on traite le mélange avec 100ml d'eau et 15ml de la solution KI, on obtient deux phases. On titre avec la solution de thiosulfate jusqu'à la disparition de la couleur de la phase aqueuse, puis on ajoute 1ml d'empois d'amidon et on continue le titrage jusqu'à la décoloration totale des deux phases, on obtient : $V_{E2}=8,9\text{ml}$. On réalise un deuxième essai en suivant les mêmes étapes on trouve : $V_{E3}=9\text{ml}$.

$$I_1 = \frac{C_{\text{SO}_4} \times (E_1 - E_2) \times M_{I_2}}{2}$$

$$I_{11}=87,13$$

$$I_{12}=86,28 \rightleftharpoons I_1=86,71$$

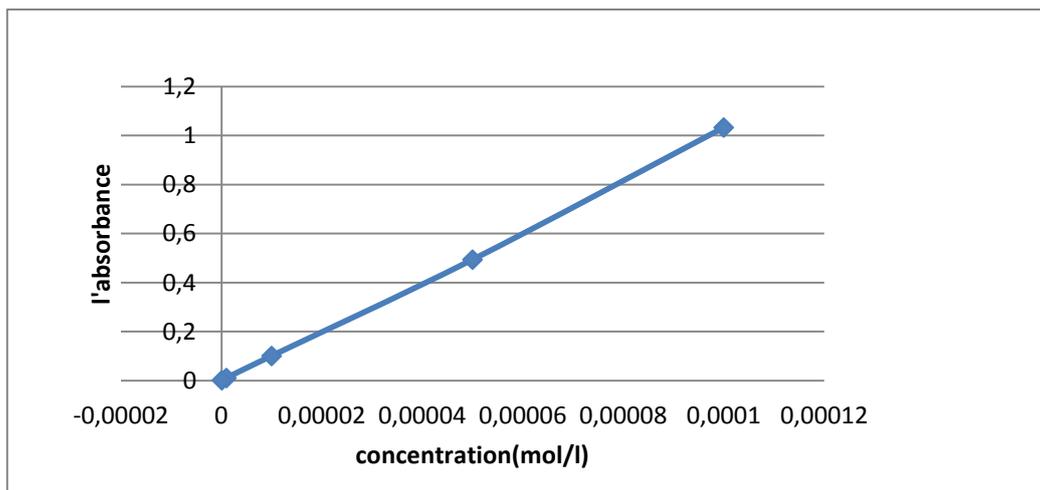
V- Test de l'activité antioxydante :

Mode opératoire

Dans un premier temps, on prépare la solution du DPPH. On pèse à l'aide d'une balance analytique une masse de 32mg et on la solubilise dans 50ml du méthanol 90% (la solution est de couleur bleu-violet). Puis on prépare des solutions de notre huile à différentes concentrations. En parallèle, des solutions à différentes concentrations en DPPH sont préparées à partir de la solution mère pour réaliser la courbe d'étalonnage.

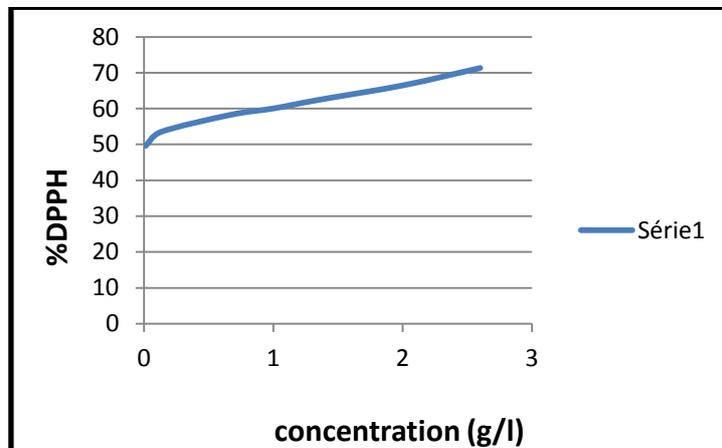
Après avoir préparé toutes les solutions, on étalonne l'appareil de l'UV avec le méthanol, on met le zéro, puis on mesure l'absorbance de chaque concentration du DPPH ce qui donne les résultats suivants :

Concentration (mol/l)	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Absorbance	1,033	0,494	0,101	0,011	0,002



Par la suite, on mélange 2ml de chaque solution de l'huile avec 2ml de la solution du DPPH. On laisse 30min et on mesure l'absorbance du mélange. Les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau ci-contre :

C (g/l)	2,6	2,01	1,34	1,005	0,67	0,134	0,0134
%DPPH	71,29	66,51	62,36	60,06	58,27	53,54	49,63



D'après le graphe la valeur de L' IC₅₀ est de 26mg/l.