



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Par :

M^{lle} ABOURA Amina

Sur le thème

Etude physico-chimique de l'huile de graines d'une variété de grenade

Soutenu publiquement le 26 juin 2019 à Tlemcen devant le jury composé de :

Mme BENYAROU Meriem	Professeur	Université de Tlemcen	Présidente
Mme DRICI Wassila	MCA	Université de Tlemcen	Encadrante
Mme BENDIABDELLAH Amel	MCB	Université de Tlemcen	Examinatrice

Laboratoire de Chimie Organique, Substance Naturelle et Analyse (COSNA)

13000 Tlemcen - Algérie

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier celui qui m'a créé, protégé, aidé et qui m'a donné entre bien d'autres, la patience et le courage pour accomplir mon mémoire de Master dans les meilleures conditions en disant « **Dieu Merci** ».

Je remercie Mr ARRAR Zoheir, le directeur du laboratoire de recherche Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses (COSNA), où j'ai réalisé mon travail. Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Mr KAJIMA MULENGI Joseph, le responsable de la formation master chimie pharmaceutique.

Je tiens à remercier M^{me} BENYAROU Meriem, pour l'honneur qu'elle me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail et M^{me} BENDIABDELLAH Amel, Pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Ce mémoire n'aurait jamais été entrepris ni achevé sans les savants conseils et orientations, les méticuleux contrôles et suivis, que m'a prodigué ma promotrice, M^{me} DRICI Wassila, je lui témoigne ici, toute ma gratitude et ma reconnaissance.

J'adresse mes remerciements à M^r BENDIBENABDELLAH Djamel, M^r KHALDI Boumediene, et M^r BOUSAID Abdelhak. Et aussi je remercie infiniment M^{me} BENZERDJEB Salima, et M^r MOSTEFA-KARA Bachir pour leurs aides, leurs conseils et pour le temps qu'ils ont bien voulu nous consacrer.

Je tiens à remercier la doctorante M^{lle} MAMI Imene. Pour ses conseils, et pour tous les moments agréables, de joie et de rigolade, que nous avons passée ensemble au laboratoire

Je remercie très chaleureusement ma famille qui m'a soutenue, durant toutes mes années d'études. Je les remercie infiniment pour leur encouragement et leur confiance. Sachez que je serai éternellement reconnaissante. Je remercie tous ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.

Que dieu vous bénisse...

Dédicaces

À mes parents

À mes sœurs et frères

À mon adorable neveu « Anis »

À tous ceux et celles qui me sont chers

À toutes les mains qui m'ont été tendues

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite

Je vous adore ...



Sommaire

Liste des Abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Introduction générale1

Chapitre 01 : Etude Bibliographique

I.	Classification Botanique	5
II.	Constituants du grenadier	6
	II.1. Les feuille	6
	II.2. Les fleurs	6
	II.3. Les fruits	7
	A. La peau	8
	B. Les arilles	9
	C. Le jus	10
III.	Huile de graines de grenade	10
	III.1. Méthodes d'extraction des huiles fixes	10
	A. Pressage à froid et à chaud	10
	B. Soxhlet	11
	C. Ultrasons	11
	D. Micro-onde	11
	E. CO ₂ supercritique	12
IV.	Composition chimique de graines de grenade	14
V.	Conclusion	16

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

I.	Matière végétale	16
II.	Taux d'humidité	17
III.	Extraction de l'huile de graines de grenade	17
	III.1. Extraction par pression	18
	III.2. Extraction par soxhlet	19

Sommaire

III.3. Extraction par Ultrasons	20
III.4. Extraction par Micro-onde	20
IV. Analyses physico-chimiques de l'huile de graines de grenade.....	20
IV.1. Densité relative à 20°C	20
IV.2. Indice de réfraction à 20°C	21
IV.3. Viscosité à 25°C	22
IV.4. Indice d'acide	23
IV.5. Indice de peroxyde	24
IV.6. Mesure de la teneur en insaponifiable	24
V. Analyse des esters méthyliques d'acide gras de l'huile de graines par CPG	24
V.1. Préparation de l'échantillon	25
V.2. Analyse CPG	27

Chapitre 03 : Résultats et discussion

I. Extraction de l'huile de graines de grenade	27
I.1. Extraction par presse mécanique	27
I.2. Extraction au Soxhlet	28
I.3. Extraction assistée par Ultrasons	28
I.4. Extraction Sous Micro-onde	29
II. Analyse physico-chimiques de l'huile de graines de grenade	29
II.1. Densité relative	30
II.2. Indice de réfraction	31
II.3. Viscosité	32
II.4. Indice d'acide et acidité Oléique.....	34
II.5. Indice de peroxyde	35
II.6. Mesure de la teneur en insaponifiable	36
III. Analyse des esters méthyliques d'acide gras par CPG	37
IV. Conclusion	38
<i>Conclusion générale</i>	40

Références bibliographiques

Liste des Abréviations

S/L	: Solide - Liquide
MW	: Micro-Onde
min	: Minute
T	: Température
°C	: Degré Celsius
UAE	: Extraction assistée par Ultrasons
MAE	: Extraction assistée par Micro-Onde
A.G	: Acide Gras
ADN	: Acide désoxyribonucléique
R ^{dt}	: Rendement
g	: Gramme
ml	: Millilitre
h	: Heure
(%)	: Pourcentage
IR	: Infrarouge
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
CCM	: Chromatographie sur couche mince
Insp	: Insaponifiable
IA	: Indice d'acide
IP	: Indice de peroxyde
IR _f	: Indice de réfraction
d	: Densité
mg	: Milligramme
N	: Normalité
S	: Seconde

Liste des Tableaux

Tableau 1	Classification Botanique du grenadier.	P.05
Tableau 2	Composition de l'huile des graines de grenades de 4 variétés.	P.13
Tableau 3	Teneur en acide gras de quelques huiles végétales.	P.14
Tableau 4	Rendement en huile par Soxhlet avec et sans prétraitement	P.28
Tableau 5	Rendement (%) en huile d'extraction assisté par Micro-Onde en fonction de temps, pour différents solvants d'extraction.	P.29
Tableau 6	Densité relative des huiles de graines de grenades.	P.29
Tableau 7	Densité relative à 20°C de quelques huiles végétales.	P.30
Tableau 8	Indice de réfraction Indices de réfractions des huiles extraites par différentes méthodes.	P.30
Tableau 9	Indices de réfractions de quelques huiles végétales	P.31
Tableau 10	viscosité cinématique et dynamique de l'huile de graines de grenade	P.32
Tableau 11	viscosité de l'huile d'olive et l'huile de graines de grenade	P.32
Tableau 12	I.A de l'huile de graines de grenade extraites par différentes méthodes.	P.33
Tableau 13	A.O de l'huile de graines de grenade extraites par différentes méthodes.	P.33
Tableau 14	I.A et A.O de quelques huiles végétales.	P.33
Tableau 15	I.P de l'huile de graines de grenade extraites par différentes méthodes.	P.34
Tableau 16	Teneurs en insaponifiable (%) des huiles de graines de grenade	P.35
Tableau 17	Teneurs en insaponifiables de différentes huiles végétales	P.35

Liste des Figures

Figure 1	: Culture du grenadier dans la zone méditerranéenne	P. 02
Figure 2	: Localisation du grenadier dans le monde	P. 05
Figure 3	: Le grenadier (<i>Punica granatum</i> L).	P. 05
Figure 4	: Feuilles de <i>Punica granatum</i> L	P. 06
Figure 5	: Fleurs du grenadier	P. 07
Figure 6	: Les différentes couleurs de la grenade	P. 07
Figure 7	: L'intérieur d'une grenade montrant la membrane, le mésocarpe et les arilles	P. 08
Figure 8	: Epiderme et Cloisonnement interne.	P. 08
Figure 9	: Les graines de grenade	P. 09
Figure 10	: Pressage à froid et à chaud	P. 10
Figure 11	: Extracteur de Soxhlet	P. 10
Figure 12	: Extraction avec Micro-Onde	P. 11
Figure 13	: Cuve à Ultrasons.	P. 11
Figure 14	: Appareil du CO ₂ Supercritique	P. 12
Figure 15	: Graines de grenades séchées et broyées	P. 16
Figure 16	: Presse mécanique.	P. 18
Figure 17	: Extracteur de Soxhlet	P. 18
Figure 18	: Evaporateur rotatif	P. 19
Figure 19	: Bain à Ultrasons	P. 19
Figure 20	: Micro-onde	P. 20
Figure 21	: Réfractomètre thermostatés	P. 21
Figure 22	: Viscosimètre thermostatés	P. 22
Figure 23	: Chromatogramme de l'huile de presse	P. 36
Figure 24	: Chromatogrammes des huiles obtenues par différentes méthodes	P. 37

Introduction générale

Malgré les améliorations, et les progrès réalisés en médecine, l'homme continue à avoir recours aux plantes pour se soigner. Les substances naturelles restent à ce jour l'une des meilleures alternatives peu coûteuses et efficaces. Les vertus thérapeutiques de ces substances sont dues à la présence de principes actifs qui agissent directement sur l'organisme.

Par ailleurs, les différents problèmes (toxicité, surdosage, non connaissance) provoqués par la médication, par les plantes ont amené les scientifiques à entreprendre des recherches pouvant permettre la mise au point de méthodes d'extractions, de purifications et d'analyses de molécules cibles. Ainsi, de nouvelles voies, utilisant les végétaux comme source de nouveaux médicaments, ont pu être explorés. ^[1]

La phytothérapie, lorsqu'elle est utilisée correctement, offrent de nouvelles perspectives et des avantages dont les médicaments de synthèse sont parfois dépourvus.

La plante que nous avons choisie pour notre étude est en fait un fruit largement consommé en automne : **la grenade (*Punica granatum L.*)** qui est le fruit du grenadier ; elle appartient à la famille des *Lythracées*.

Le grenadier est l'un des espèces fruitières les plus anciennement cultivée dans le monde. Il a été utilisé par l'homme au cours des siècles, à des fins diverses. Aussi bien les fleurs que les fruits du grenadier sont utilisés depuis très longtemps pour leurs différentes applications thérapeutiques. ^[2]

Le grenadier est originaire d'Asie centrale, on le retrouve particulièrement en Iran et en Turquie. Il présente une vaste répartition géographique, reflétant son adaptation à un large éventail de conditions climatiques. L'une de ses régions de prédilection est le pourtour méditerranéen. ^[3]

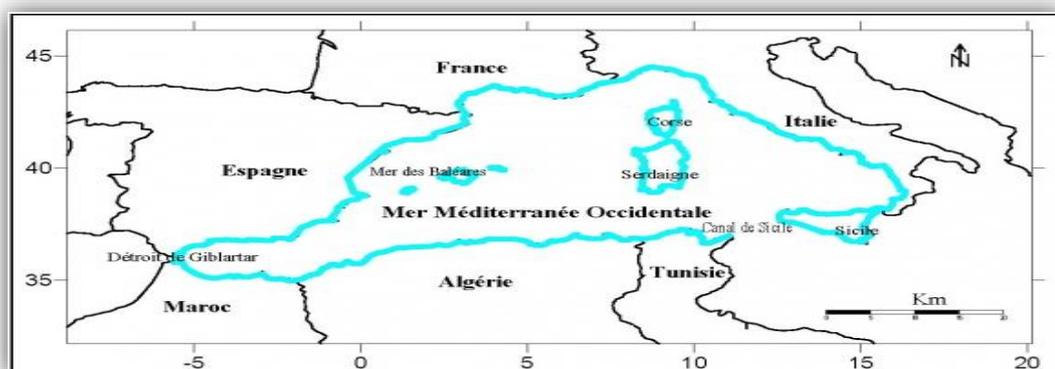


Figure 1 : Culture du grenadier dans la zone méditerranéenne.

Le grenadier est connu pour ses gros fruits ronds et savoureux, et pour ses très belles fleurs colorées. Le fruit est une baie complexe possédant une coque épaisse dont la couleur peut aller du jaune au rouge foncé. Le fruit est composé d'arilles séparés par des cloisons internes. Les arilles sont à leur tour formés essentiellement de jus et de graines. On peut classer les arilles comestibles d'après la variété de la grenade et en fonction de leurs qualités gustatives (acide, sucré-acide et sucré).^[3]

La grenade, à elle seule, est un cocktail d'éléments tels que : **les vitamines** (B1, B2, B6, B12, D), **les minéraux, les polyphénols,...**etc. qui augmentent son intérêt nutritionnel et thérapeutique.

Étant donné les vertus de la grenade, le présent travail se focalise sur l'étude d'une variété de grenade de la région de Tlemcen et plus particulièrement sur l'huile extraite des graines d'arilles. Différentes méthodes d'extraction ont été mises au point et une étude physico-chimique a été menée.

Ce mémoire comporte trois chapitres :

- ❖ **Le premier chapitre** : présente une étude bibliographique sur le grenadier, sur la grenade et surtout sur l'huile de graines de grenade.
- ❖ **Le deuxième chapitre** : résume les méthodes et décrit le matériel utilisé pour effectuer les extractions et l'identification de l'huile.
- ❖ **Le troisième chapitre** : expose les résultats et les discute.

Chapitre 01 : Etude Bibliographique

Le grenadier : l'arbre est l'une des espèces fruitières les plus anciennement cultivée dans le monde. Il est originaire d'Asie centrale, et plus précisément de certaines régions d'Iran, d'Afghanistan ou d'Inde ; sa culture s'est ensuite étendue au reste du monde. Il est actuellement très cultivé dans le bassin méditerranéen, en Chine, et en Amérique du nord. [1]

La grenade (fruit du grenadier) est consommée et appréciée depuis très longtemps par différentes civilisations, qui lui ont attribué plusieurs vertus. [4]

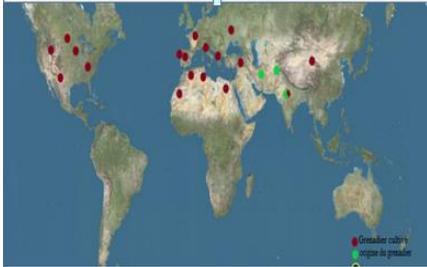


Figure 02: Localisation du grenadier dans le monde.

I. Classification Botanique

Le grenadier (*Punica granatum*. L) est un arbrisseau de grande taille, qui peut atteindre huit mètres de hauteur. Son nom scientifique est : *Punica granatum*. L, qui signifie : pomme à graines. [5]



Figure 03 : Le grenadier (*Punica granatum*. L). [A]

La classification du grenadier est dans le tableau ci-dessous : [3]

Famille	<i>Lythraceae</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Genre	<i>Punica</i>
Class	<i>Rosidées</i>
Espèce	<i>Punica granatum</i> . L

Tableau 01 : Classification Botanique du grenadier.

II. Constituants du Grenadier

Toutes les parties du grenadier ont fait l'objet de nombreuses études ^[6], car elles possèdent toutes des propriétés thérapeutiques intéressantes parmi lesquelles on peut citer les activités anti inflammatoires, antimicrobiennes, anti cancéreuse et anti oxydante. ^[6]

Les constituants du grenadier les plus utilisés pour leurs activités thérapeutiques sont :

II.1. Les Feuilles :

Les feuilles du grenadier sont caduques, étroites, luisantes et de forme oblongues, de trois à sept centimètres de long et de deux centimètres de large. Elles sont facilement reconnaissables par leur couleur : verte vive pour la face supérieure, et verte claire pour la face inférieure. ^[7]

Les feuilles ont des propriétés très bénéfiques pour la santé, car elles sont utilisées depuis l'antiquité pour soigner les inflammations, et pour lutter contre la diarrhée, et les vers intestinaux. Et aussi comme des remèdes de fièvres. ^[6]



Figure 04 : Feuilles de *Punica granatum* L. ^[A]

II.2. Les Fleurs :

Les fleurs peuvent apparaître solitaires, en paires ou en grappes. Leurs couleurs varient de l'orange au rouge pourpre ou même grenat. La fleur possède un diagramme floral constitué d'un calice, d'un ovaire, des étamines et des pétales. ^[8]

Les fleurs de la grenade ont été utilisées dans la médecine traditionnelle durant des siècles, pour traiter les saignements, les diarrhées chroniques en particulier chez les enfants, et aussi pour le traitement des blessures, et des cheveux grisonnants chez les jeunes hommes. ^[9]



Figure 05: *Fleurs du grenadier*^[B]

II.3. Les Fruits :

La grenade, est une baie globuleuse ou légèrement aplatis, de la taille d'une grosse pomme (2 à 12 centimètres de diamètres). Elle est protégée par un épicarpe épais, dur, et coriace, non comestible. Selon la variété et la maturité du fruit, l'écorce a une teinte allant du jaune au rouge foncé.^[8]



Figure 06: *Les différentes couleurs de la grenade*^[C]

Le mésocarpe (intérieur de la grenade) est divisé en plusieurs chambres par des cloisons. Chaque chambre est remplie de nombreux arilles. Ces derniers sont charnus, juteux, acidulés ou sucrés ; ils représentent la partie comestible du fruit. Il y a environ 400 arilles par grenade.^[10]

Les principales vertus de la grenade sont les propriétés antioxydantes, anti-immunitaires, anti cancéreuses, et antitumorales. Elle possède aussi de grandes quantités de composés phénoliques, qui sont très efficaces pour réduire les maladies cérébrovasculaire, et le cancer du : sein, poumon, colon, de la prostate, et de la peau.^[6]



Figure 07: *L'intérieur d'une grenade montrant la membrane, le mésocarpe et les arilles*

A. La Peau :

L'épicarpe de la grenade, appelé aussi *écorce* ou bien *malicorium*, représente la partie externe et dure du fruit. La couleur de cette dernière peut changer selon la maturité et la variété du fruit. Le *malicorium* et les cloisons internes renferment environ 36 % du poids total de la grenade. ^{[10], [8]}

L'écorce de la grenade (quel que soit la variété) a une saveur amère et astringente ; elle est non comestible ; elle renferme beaucoup de tannins. ^[8]

L'écorce sèche de la grenade est utilisée pour traiter la diarrhée, les vers intestinaux, les saignements de nez, et les ulcères. L'épicarpe a été également gargarisé sous forme liquide, pour libérer les maux de gorge. ^[6]

En dentisterie, il a été utilisé pour traiter le saignement des gencives. ^[6]

L'écorce des grenades, est très utilisée pour lutter contre les maladies induites par le stress oxydatif, comme la maladie d'Alzheimer et le Vieillessement. ^[6]



Figure 08 : *Epiderme et Cloisonnement interne.*

B. Les arilles :

La grenade renferme de nombreux arilles, de couleur rouge foncé à rose claire, et qui éclatent à la moindre pression, contenues dans des loges, séparées par des membranes appelées « **cloisons** ». Ils représentent: *la partie comestible du fruit*. Ils sont composés de 80 % d'une partie charnue, et d'environ 20 % d'une partie ligneuse qui représente les pépins de grenade. ^{[7], [1]}



Figure 09 : *Les graines de grenade*

C. Le Jus :

Le jus, obtenu par pression des arilles, est un liquide non fermenté, mais fermentescible. Il a une couleur rouge qui peut être nuancée en fonction de la variété de grenade. Il se compose globalement de: sucres, de vitamines, d'acides organique et de composés phénoliques. ^[11]

Le jus de grenade est utilisé depuis longtemps en médecine traditionnelle, et comme complément nutritionnel. Parce qu'il a des effets intéressants et bénéfiques sur la santé humaine. ^[11]

Le jus de grenade sert pour le traitement de diverses maladies, telles que : le diabète, la diarrhée, les ulcères, les saignements, et les infections parasitaires. ^[11]

Ce jus a des propriétés anti radicalaires très importante pour la prévention du cancer, et pour empêcher l'oxydation de biomolécules, telles que : l'ADN, les protéines, les lipides, et d'autres composants cellulaires. ^[11]

III. Huile de Graines de Grenade

Les arilles représentent la partie comestible du fruit, qui comporte le jus et les graines. Une huile peut être extraite de ces graines. Ce qui nous amène à considérer différentes techniques d'extractions.

III.1. Méthodes d'extraction des huiles fixes

A. Pressage A froid et A chaud

Ces techniques sont anciennes et très simples à mettre en œuvre ; il suffit juste de soumettre la substance végétale à une forte pression sans solvant organique, à l'aide d'une presse mécanique^[12]. A fin d'augmenter les rendements, un chauffage de la presse est parfois utile.

Ces deux méthodes d'extraction permettent d'obtenir des huiles fixes pures et de bonne qualité sans utilisation d'aucun solvant.



Figure 10 : Pressage à froid et à chaud

B. Soxhlet

C'est une technique d'extraction à chaud S-L (solide- liquide) par l'extracteur de Soxhlet.

Les graines broyées sont introduites dans une cartouche à cellulose, remplie de solvant frais condensé, à partir d'un ballon à distiller. Quand le liquide atteint le niveau débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche. Le corps de l'appareil se remplit plusieurs fois, ce qui permet une extraction maximale.^[13]



Figure 11: Extracteur de Soxhlet

C. Micro-onde

Les micro-ondes (MW) sont généralement suggérés comme, des techniques de prétraitement pour l'augmentation de rendement en huile de graines. Qu'on les prétraite pendant 1 à 6 minutes sans l'utilisation des solvants, la température augmente à l'intérieur du MW, les structures des cellules végétales seront détruites, se qui facilite l'écoulement de l'huile. Cette nouvelle méthode permet d'obtenir un produit pur. ^[14]



Figure 12 : *Extraction avec Micro-Onde*

D. Ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons (UAE), est une technique d'extraction, qui peut avoir lieu dans un bain à ultrason, assistée par des ondes ultrasonores, qui se propagent à travers les milieux liquides. ^[15]

Cette méthode d'extraction permet d'obtenir un rendement très élevé en huile, à haute qualité, et dans une courte durée. ^[16]



Figure 13 : *Cuve à Ultrasons.*

E. CO₂ Supercritique

C'est une technique d'extraction solide-liquide récente, qui demande un appareil de CO₂. Il s'agit d'une extraction à froid en utilisant le gaz carbonique comme solvant. Ce dernier doit être utilisé sous pression, pour qu'il entre dans son état supercritique. ^[17]

Le CO₂ est un excellent solvant apolaire, parce qu'il revient à son état gazeux, et se sépare des autres substances facilement. ^[17]

Ce procédé est BIO, qui permet d'obtenir une huile très pure avec un rendement important et dans un temps faible.

Il est possible aussi de remplacer le gaz carbonique, par d'autres hydrocarbures, comme le butane ou le propane. En outre, cette technique d'extraction n'est pas du tout nocif pour l'environnement, pas de résidus toxiques. Elle est peu couteuse (coute moins de la moitié, du prix d'un équipement comparable d'extraction par CO₂ supercritique). ^{[18], [19]}



Figure 14 : Appareil du CO₂ Supercritique

IV. Composition chimique de graines de grenade

Les huiles extraites de graines de grenade sont très intéressantes de par leurs composition et de par leurs activité biologique. Elles sont très demandée dans le domaine de la cosmétologie mais aussi en pharmacie à cause de leur propriétés thérapeutique (activité anti-oxydante, activité anti diabétique,...etc.) ^[20].

D'un point de vue diététique les huiles de graines de grenade sont capables de surmonter certaines carences alimentaires ou des déséquilibres physiologiques légers. ^[21]

La composition chimique de l'huile de graines de grenade de différentes variétés ont été analysé par des méthodes physico-chimique ou plus particulièrement spectroscopiques (CPG, IR, CPG/SM, RMN).

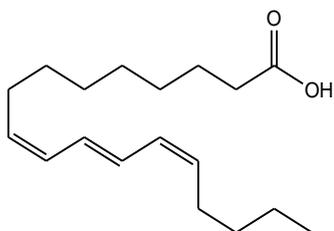
Nous regroupons dans un tableau récapitulatif la composition en acide gras (AG) d'huiles de graines de grenade de différentes variétés de divers pays : ^[21].

D'après le **Tableau 2**, on remarque que l'huile de graines de grenade, des quatre variétés décrites, présente un acide gras majoritaire qui est **l'Acide Punicoque**.

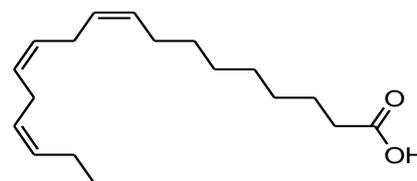
Acide Gras (%)					
A.G	Nom	Inde	Tunisie	Turquie	Etats-Unis
18 :3	A. Punicique	71,5± 17,9	36,98±10,12	74,11± 1,55	81,22± 2 ,15
18:1	A. Oléique ω-9	9,0 ± 5,6	7,86 ± 2,25	4,19 ± 0,61	5,68 ± 1,69
18:2	A.Linoléique ω-6	10,8 ± 6,9	8,38 ± 2,36	4,49 ± 0,49	4,08 ± 1,04
16:0	A.Palmatique	5,7 ± 4,1	5,07 ± 1,30	2,45 ± 0,19	4,00 ± 0,76
18:0	A. Stéarique	2,1 ± 3,1	4,20 ± 1,56	1,52 ± 0,26	2,92 ± 0,56
14:0	A.Myristique	0,7 ± 1,5	0,18 ± 0,21	0,35 ± 0,10
20:0	A. Arachidique	0,69 ± 0,14	0,39 ± 0,04	0,53 ± 0,18

Tableau 2 : Composition de l'huile des graines de grenades de 4 variétés.

L'acide Punicique est un Acide gras polyinsaturé et plus précisément un acide tri-insaturé ; les insaturations sont conjuguées. C'est un isomère de l'acide α-linolénique ; il tire son nom de la grenade «Punica granatum L».



Acide Punicique (18:3)



Acide α-linolénique (18:3) ω-3

L'acide Punicique est un puissant anti oxydant ; il possède une forte action préventive contre certaines maladies inflammatoires, comme l'arthrose, le rhumatisme; le cancer et le diabète. [21]

Dans un autre tableau (**Tableau 3**), nous présentons une comparaison de la composition de l'huile de graines de grenade par rapport à d'autres huiles (huile d'olive, huile de pépins de raisins et huile d'Argan) ayant des usages similaire. [22], [23], [24].

Acides gras (%)			
Nom	Olive	Argan	Graines de raisin
Acide Oléique ω -9	55 - 83	43 - 49	17,1 – 28,9
Acide palmitique	7,5 - 20	11,5-15	7,38 – 14,6
Acide stéarique	0.5 - 5	4 - 7	3 – 7,6
Acide α -linoléique ω -3	0,01-1,5	0,1	0,88 – 1,5
Acide linoléique ω -6	3,5-21	29-36	46,5 - 83
Acide myristique	0,1-0,2	0,1 – 0,29

Tableau 3 : Teneur en acide gras de quelques huiles végétales

V. Conclusion

A travers l'étude bibliographique que nous avons menée, nous remarquons que la grenade, cultivée un peu partout dans le monde, est un fruit chargé de bienfaits. La grenade à elle seule est une véritable pharmacopée.

Nous décrivons quelques méthodes d'extractions des huiles végétales en insistant sur les éco-extractions qui donnent de meilleures rendements ou des huiles de meilleure qualité.

La composition de l'huile de graines de grenade est originale par rapport aux autres huiles végétales, puisqu'elle contient un acide gras polyinsaturé rare qui est l'**Acide Punicique**.

En se basant sur ces données bibliographiques, notre travail a consisté en l'étude d'une huile de grenades d'une variété de grenade de la région de Tlemcen.

Chapitre 02 : Matériel et méthodes

Notre travail a été réalisé au sein du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses **COSNA** de l'Université de Tlemcen, dans le but d'extraire et de déterminer les caractéristiques physico-chimique d'une huile fixe obtenue à partir des graines de grenade. La variété de grenade que nous avons ciblée à travers notre étude est une variété de la région de Tlemcen.

I. Matière végétale

Notre étude est réalisée sur une variété de grenade, connue pour son jus acide et ses graines dures ; récoltée au mois de Novembre 2018 dans la région de Tlemcen.

Après épluchage des grenades pour enlever la peau externe, nous avons récupéré les arilles. Les arilles sont ensuite pressés pour récupérer d'une part le jus et d'autres par les graines qui sont lavées et séchées dans l'étuve à **40°C**, pendant une semaine. Les graines séchées sont ensuite broyées à l'aide d'un mortier, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine qui a servi pour la préparation des extraits.



Figure 15: Graines de grenades séchées puis broyées.

II. Taux d'humidité

Le taux d'humidité représente le rapport entre le poids perdu au cours du séchage, et le poids frais de l'échantillon, multiplié par cent. ^[25]

1300 g de graines ont été pesées, puis portées à **40°C**. Le poids des graines a été contrôlé jusqu'à l'obtention d'un poids constant de **600g**. Le rapport d'humidité (**H%**) est calculé par la formule suivante :

$$H(\%) = \frac{p}{p'} \times 100$$

Où : p = poids final des graines après séchage p' = poids initial des graines avant séchage.

III. Extraction de l'huile de graines de grenade

L'huile de graines de grenade a été extraite selon différents protocoles, et en utilisant différents solvants: l'éther de pétrole, le cyclohexane, et le 2-propanol.

Le rendement d'extraction de l'huile des graines de grenade est le rapport entre la masse d'extrait pur obtenue et la masse de la matière végétale sèche utilisée pour cette extraction, et est calculé par la relation suivante :

$$R^{dt}(\%) = \frac{m}{m'} \times 100$$

Où :

m : La masse en (g) de l'huile obtenue.

m' : La masse en (g) des graines de grenade broyées soumis à l'extraction.

III.1. Extraction par pression

L'huile de graines de grenades peut être obtenue par simple pression mécanique ; c'est un procédé simple et rapide, qui n'utilise pas de solvants organiques. Il suffit juste de soumettre les graines sèches à une forte pression, et à une température qui ne dépasse pas 60°C.

L'huile obtenue par pression de 391 g de graines de grenade est très pure, car aucun solvant n'est utilisé. Le résidu récupéré est nommé tourteaux.



Huile



Presse



Tourteau

Figure 16: Presse mécanique.

III.2. Extraction par Soxhlet

✓ **Méthode A** : [26]

Les graines de grenade broyées sont mises dans une cartouche, qui est placée directement dans un Soxhlet. Après 6h d'extraction, le solvant est évaporé et l'huile récupérée. Cette dernière est conservée au congélateur à -4°C , jusqu'à son analyse.

**Figure 17: Extracteur de Soxhlet**

✓ **Méthode B** :

Afin d'augmenter les rendements et raccourcir le temps d'extraction, nous avons fait refluer une masse de graines de grenade sèches et broyées dans un solvant organique, pendant 1h.

Le même solvant et la même cartouche, ont été placés dans un extracteur Soxhlet ; et le reflux est poursuivi. De la même manière que pour la méthode A, l'huile est récupérée en évaporant le solvant à l'évaporateur rotatif en ne dépassant pas la température du bain de 45°C. L'huile récupérée est pesée et le rendement est calculé.



Figure 18: *Evaporateur rotatif.*

III.3. Extraction assistée par Ultrasons

Des graines sèches et broyées ont été placées dans des béchers, qui sont plongés dans un bain à Ultrasons (HAVER & BOECKER, D-59302 OELDE- Made in Germany).

Les graines sont ensuite lavées 3 fois avec un solvant ; les extraits sont récupérés par filtration sur papier filtre. Les filtrats réunis sont évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 45°C. Les huiles obtenues ont été pesées, et les rendements calculés.



Figure 19: *Bain à Ultrasons*

III.4. Extraction sous Micro-Onde :

Un bécher, dans lequel on introduit 5 g de graines de grenade broyées est irradié dans un four Micro-ondes (MW) domestique (Condor, CMW-M2306W- Made in Algeria). On fait varier pour chaque expérience le temps de chauffage: **1min**, **3min**, et **6 min**.

Les graines sont lavées avec un solvant, et les extraits récupérés sont filtrés sur papier filtre. Les filtrats recueillis sont évaporé sous vide. L'huile obtenue est pesée, pour calculer le rendement.



Figure 20: Micro-Onde

IV. Analyses physico-chimiques de l'huile de graines de grenade

IV.1. Densité relative à 20°C :

La densité relative d'une huile à 20°C, est définie comme étant, le rapport de la masse volumique d'huile à 20°C, sur la masse volumique de l'eau distillée, à la même température.

La densité relative est mesurée à l'aide d'un pycnomètre sur lequel on effectue une suite de pesées en utilisant une balance analytique. La densité doit être toujours inférieure à 1.

La densité relative est déterminée par la formule suivante :

$$d = \frac{\rho}{\rho'}$$

Où : ρ =Masse volumique de l'huile exprimée en g/cm³.

ρ' =Masse volumique de l'eau distillée exprimée en g/cm³.

IV.2. Indice de réfraction à 20°C :

L'indice de réfraction est caractéristique d'une huile et varie en fonction du nombre d'insaturations des acides gras qui composent cette huile. ^[27]

Pour notre huile, l'indice de réfraction est mesuré à 20°C à l'aide d'un réfractomètre de type "Abbe" thermostatés.

Après avoir nettoyé le prisme du réfractomètre à l'éthanol puis essuyé délicatement, le réfractomètre avec du papier Joseph ; il est étalonné avec de l'eau distillée.

Une ou deux gouttes d'huile de graines de grenade sont déposées entre les prismes, et la valeur de l'indice de réfraction à la température en degré Celsius (20°C) est lue directement sur le réfractomètre.

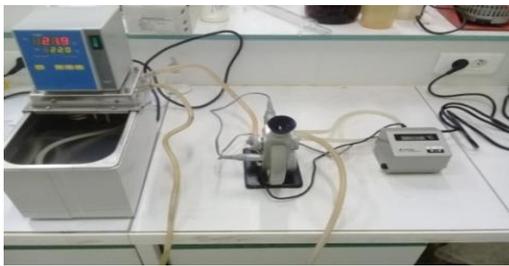


Figure 21: Réfractomètre thermostatés.

IV.3. Viscosité à 25°C :

La viscosité est une grandeur physique, mesurée par un viscosimètre (SCHOTT GERATE AVS 400) selon Ubbelohde de type capillaire et thermostaté à 25 ° C. Après avoir choisie le bon tube capillaire suite à plusieurs essais, la viscosité cinématique (ν) est déterminée par la formule ci-dessous en utilisant le temps mesuré par seconde de la fluidité de l'huile entre deux points A et B du viscosimètre. La viscosité dynamique (μ) est ensuite déduite de la viscosité cinématique en multipliant cette dernière par la densité de l'huile utilisée.

$$\nu = K \cdot t \quad (\text{mm}^2/\text{s})$$

$$\mu = \nu \cdot d \cdot 10^{-3} \quad (\text{Pa.s})$$

Où:

ν : viscosité cinématique.

K : constante du capillaire utilisé (0.9972).

t : temps d'écoulement de l'huile entre les points A et B.

d : densité de l'huile

μ : viscosité dynamique

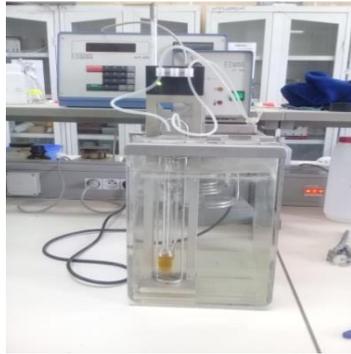


Figure 22: Viscosimètre thermostatés.

IV.4. Indice d'acide :

L'indice d'acide qu'on note (**IA**), correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium alcoolique, nécessaire pour la neutralisation des acides gras libres présents dans un gramme d'huile. [28].

L'acidité oléique d'une huile (que l'on note **Acidité (%)**), représente le pourcentage des acides gras libres, exprimé conventionnellement en acide oléique pour les huiles végétales [28].

On dissout une masse de matière grasse dans **50 mL** d'un mélange éthanol/ éther diéthylique (**25-25v/v**). Cette solution est titrée avec une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique, après avoir ajouté **2** gouttes de phénolphaléine, jusqu'à l'apparition d'une coloration rose persistante.

L'indice d'acide et l'acidité oléique sont calculés par les relations suivantes :

$$\mathbf{IA} = \frac{\mathbf{C} \times \mathbf{V} \times \mathbf{56.1}}{\mathbf{m}}$$

$$\mathbf{Acidité\ (\%)} = \frac{\mathbf{C} \times \mathbf{V} \times \mathbf{M}}{\mathbf{10} \times \mathbf{m}}$$

Où :

C : représente la concentration en mol/L de la solution de KOH éthanolique utilisé.

V : C'est le volume en millilitre de la solution de KOH utilisée au point d'équivalence.

56.1 : représente la masse molaire de KOH en grammes par mole (g/mole).

m : représente la masse de l'huile pesée en grammes.

M : représente la masse molaire de l'acide oléique (282 g / mol).

IV.5. Indice de peroxyde :

Les corps gras peuvent s'oxyder en présence d'oxygène (air) et de certains facteurs favorisants (UV, eau, enzyme, ...etc.).^[27]

L'indice de peroxyde qu'on note (**IP**), ou bien l'indice de Léa est le nombre de milliéquivalents d'oxygène actif par kilogramme de corps gras (**meq d'O₂/Kg**). Cet indice est calculé à partir de la quantité d'iode libérée par l'iodure de potassium (KI), par titrage. ^[27]

Un tel indice est recherché pour évaluer l'état de conservation de l'huile végétale, au cours de son stockage.

Dans un erlenmeyer, une masse d'huile est dissoute dans : **15 mL** d'acide acétique, **10 mL** de chloroforme, et **1mL** d'une solution d'iodure de potassium saturé. L'erlenmeyer est ensuite fermé hermétiquement, et laissé pendant 5 minutes à l'abri de la lumière.

L'iode libéré est dosé avec une solution de thiosulfate de sodium à **0, 01 mol /l**, en utilisant l'empois d'amidon comme indicateur coloré.

Un essai à blanc est réalisé, sur un échantillon ne contenant pas d'huile, en suivant le même mode opératoire.

L'indice de peroxyde est calculé par la relation suivante :

$$\mathbf{IP = \frac{(V' - V'') \times C}{m} \times 100}$$

Où :

V' : C'est le volume en mL de thiosulfate de sodium nécessaire au point d'équivalence.

V'' : est le volume en mL de thiosulfate de sodium nécessaire pour l'essai à blanc

m : Représente la masse en (g) de l'huile.

C : Représente la concentration, en mol/L de la solution titrée de thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃).

IV.6. Mesure de la teneur en insaponifiable :

L'insaponifiable représente la partie non glycéridique de l'huile, tels que les : phytostérols, cholestérol, les pigments, les vitamines liposolubles, et des hydrocarbures, ...etc.

L'insaponifiable est constitué par l'ensemble des composés extractibles par des solvants organiques (hexane, éther éthylique), sa teneur est généralement faible. ^[29]

Il est obtenu directement après traitement du corps gras par la potasse alcoolique. ^[29]

Une solution de KOH éthanolique 2 N (100 ml) est nécessaire pour saponifier 5 g d'huile en chauffant au reflux durant une heure et trente minutes.

On ajoute 100 ml d'eau distillée et la solution est extraite avec 4x 50 ml d'éther diéthylique. On élimine à chaque extraction la couche hydroalcoolique. Les phases organiques ainsi récupérées sont lavées avec l'eau distillée jusqu'à pH neutre. Une fois la phase organique séchée sur sulfate de magnésium et filtrée, elle est évaporée à l'évaporateur rotatif.

La teneur en insaponifiable est calculée comme suit :

$$\text{Insp} = \frac{m'}{m} \times 100$$

Avec :

m' : représente la masse du résidu obtenu (en g).

m : représente la masse de la prise d'essai.

V. Analyse des esters méthyliques d'acide gras de l'huile de graines de Grenade par CPG :

V.1. Préparation de l'échantillon

Pour récupérer les acides gras, la solution savonneuse obtenue lors du premier lavage de l'insaponifiable (phase aqueuse) est acidifiée, avec une solution d'acide chlorhydrique

concentré (5 N), jusqu'à pH 2-3. Il y a formation d'un précipité blanc qui de nouveau dissous dans 2x 50ml d'éther diéthylique dans une ampoule à décanter^[30]

La fraction étherée récupérée, est séchée sur sulfate de magnésium (MgSO_4), filtrée puis évaporée.

Les acides gras sont transformés en leurs esters méthyliques par addition d'une solution méthanolique de BF_3 et les esters méthyliques obtenus sont extraits trois fois avec 50 ml d'hexane. La réaction d'estérification des acides gras a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques sur support plastique recouvert de gel de silice (Merck 60 F254, épaisseur : 0.2 mm). La révélation des CCM a été réalisée à l'aide d'une lampe UV.



Les esters obtenus ont été purifiés sur colonne chromatographique de 30mm de diamètre et sur gel de silice Merck 60 (0.063-0.200 mm). L'éluant utilisé pour cette purification est un mélange de chloroforme/éther diéthylique (V/V : 5/5).

V.2. Analyse CPG

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation et d'identification, qui est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie, et reste la méthode la plus utilisée pour l'analyse des huiles. Elle permet aussi de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe, de volatilité différente.^[31]

L'analyse qualitative des échantillons préparés sous forme esters méthylique et purifiés sur colonne chromatographique a été faite par chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (GC/FID). Les conditions opératoires ont été déterminées et fixées à fin d'avoir des chromatogrammes corrects avec une bonne résolution. Dans notre travail Cinq échantillons ont été purifiés et analysés afin de faire une étude comparative et qualitative de la composition des huiles obtenues par différentes méthodes et différents solvants.

Chapitre 03 : Résultats et discussion

La variété de grenade utilisée dans ce travail est une variété de la région de Tlemcen. Ce fruit n'est pas commercialisé à cause de son jus acide et de ses graines dures, difficiles à mâcher. Cependant, ce produit qui n'est quasiment pas récolté, a représenté pour nous, une matière première importante, riche en espèces actives.

Pour cette variété de grenade, la première quantification que l'on a faite est le pourcentage d'écorce (36%) par rapport aux arilles (64%). Les arilles représentent environ 2/3 du poids du fruit.

Par pressage mécanique des arilles, on récupère d'un côté un jus de couleur rouge vif, très acide, qui représente **56%** du poids du fruit et d'un autre côté les graines (ou pépins). Les graines sont lavées et mis à sécher dans l'étuve jusqu'au poids constant. Elles représentent à elles seules **6%** du poids total de la grenade.

I. Extractions de l'huile de graines de grenade

Les rendements obtenus par les différentes méthodes d'extraction sont présentés ci-dessous :

I.1. Extraction par presse mécanique:

Les graines de grenade (**391g**) ont été pressé dans une presse mécanique, après décantation et filtration des résidus en suspension, on a récupéré **31,5 g** d'huile, ce qui nous fait un rendement de :

$$R^{dt}(\%) = 8\%$$

I.2. Extraction au soxhlet

Nous avons extrait tout d'abord l'huile selon la méthode officielle (6 h de soxhlet), puis nous avons cherché à gagner du temps en mettant en œuvre une 2^{ème} méthode. Nous remarquons, d'après les résultats reportés sur le **tableau 4** ci-dessous qu'il n'y a pas de différence significative.

Extraction	Ether de pétrole	Cyclohexane	Isopropanol
	40°C – 65°C	80,7°C	83°C
Soxhlet	11,84%	13,05%	17,11%
	13,68%	14,89%	17,21%

Tableau 4: Rendement en huile par Soxhlet avec et sans prétraitement.

En comparant les solvants utilisés, d'après ces résultats, et quel que soit la méthode, nous remarquons que le meilleur solvant d'extraction est **l'isopropanol**. Cela serait due à sa polarité et sa température d'ébullition (la plus haute).

I.3. Extraction assistée par Ultrasons

L'extraction assistée par Ultrasons (UAE) de l'huile de graines de grenade, a été faite avec trois solvants : Ether de pétrole, Cyclohexane, et Isopropanol..^[15] Nous avons utilisé le rapport graines/solvant de **5g/50 mL**.

Les rendements varient de 8 % à 13%.. Une augmentation de la durée d'exposition peut induire des pertes en composés bioactifs d'origine végétales.

I.4. Extraction sous Micro-Onde:

L'extraction assistée par Micro-Onde (MAE) de l'huile de graines de grenade a été réalisé en utilisant un four à micro-onde domestique, de puissance 1250 W. Les graines sont irradiées pendant : **1 min**, **3 min**, et **6 min**, en utilisant les mêmes solvants d'extraction que précédemment : Ether de pétrole, Cyclohexane, et l'Isopropanol.

Les rendements en huile des graines de grenade obtenus par MW sont représentés dans le **tableau 5** suivant :

Temps	T (°C)	Ether de pétrole	Cyclohexane	Isopropanol
1 min	19,2 – 22,5	12,6 %	12 %	11 %
3 min	22,5 - 49,2	15 %	14,2 %	14 %
6 min	49,2 – 74,7	13,6 %	13,2 %	12,6 %

Tableau 5 : Rendement (%) en huile d'extraction assisté par Micro-Onde en fonction de temps, pour différents solvants d'extraction.

D'après les résultats, Les meilleurs rendements sont obtenus pour un temps d'extraction de trois minutes, avec l'Ether de pétrole, en suite avec Cyclohexane, et enfin avec l'Isopropanol.

II. Analyses physico-chimiques de l'huile de graines de grenade

II.1. La densité relative :

La densité relative est mesurée à une température de 20°C. Elle représente un paramètre qui nous renseigne sur la pureté de l'huile. Nous avons effectué plusieurs mesures sur les différents échantillons obtenus par les différentes méthodes.

Méthodes d'extraction	Densité relative
Presse	0,946
Soxhlet	0,937

Tableau 6 : Densité relative des huiles de graines de grenades.

Les densités mesurés pour les huiles des trois échantillons sont pratiquement les mêmes.

Par comparaison, on remarque que la densité de l'huile de graines de grenade est supérieure à la densité d'autres huiles tel que l'huile de pépins de raisin, l'huile d'olive et l'huile d'argan, comme le montre le **tableau 7** ci-dessous :^{[29], [30]}

Huiles végétales	Densité relative
Olive	0,910 – 0,916
Argan	0,917
Pépins de raisin	0,910 – 0,930

Tableau 7 : Densité relative à 20°C de quelques huiles végétales.

II.2.Indice de réfraction:

L'indice de réfraction (IR_f) a été mesuré à une température de 20°C. C'est un paramètre qui nous renseigne sur la qualité de l'huile. L'indice de réfraction varie en fonction du degré d'insaturations des acides gras qui composent l'huile.^{[29], [27]}

Nous avons mesuré les indices de réfraction pour toutes les fractions d'huiles obtenus par les différentes méthodes (**Tableau 8**) :

IR_f Presse	Solvants	IR_f Soxhlet	IR_f Micro-onde de 1 min à 6 min
1,52059	Ether de pétrole	1,51905	1,50986 - 1,51990
	Cyclohexane	1,51905	1,51058 - 1,51990
	Isopropanol	1,52091	1,50786 - 1,51789

Tableau 8 : Indices de réfractions des huiles extraites par différentes méthodes.

Les indices de réfraction des huiles de différentes méthodes d'extractions sont globalement les mêmes, dans un intervalle de 1,50786-1,52059.

À titre comparatif, les IR_f de quelques huiles végétales, sont réunis dans le tableau suivant :

Huile végétale	IR_f à 20°C	Classification des huiles
Olive	1,466- 1,468	Huile riche en acide oléique $1,468 < IR_f < 1,472$
Argan	1,471	Huiles riches en acide linoléique $1,471 < IR_f < 1,477$
Pépins de raisin	1,4765	
Graines de grenade	1,5078- 1,5205	Huiles riches en acide linoléique $1,480 < IR_f < 1,523$

Tableau 9 : Indices de réfractions de quelques huiles végétales.

En comparant l' IR_f de huiles de graines de grenade avec les IR_f d'autres huiles végétales, on remarque que, l'indice de réfraction de l'huile de graines de grenade est le plus élevé. Ainsi on peut prédire que l'huile de graines de grenade d'après la littérature est riche en acide polyinsaturé. [27]

II.3. Viscosité :

La viscosité a été mesurée à 25 ° C avec un viscosimètre capillaire (Ubbelohde par SCHOTT GERATE AVS 400).

Pour la mesure de la viscosité, une quantité appréciable d'huile est requise. Dans notre cas, nous n'avons pu mesurer que la viscosité cinématique pour l'huile extraite par presse et par ultrasons. A partir de la viscosité cinématique, nous en avons déduit par calcul la viscosité dynamique.

Où : μ : viscosité dynamique

$$\mu = \nu \cdot d \cdot 10^{-3}$$

ν : viscosité cinématique

d : densité de l'huile

Les valeurs obtenues pour les deux huiles sont proches selon les résultats mentionnés sur le tableau ci-dessous.

Viscosité de l'huile de presse			
Température (°C)	25	25	25
Temps (s)	225,72	225,27	224,98
$v(mm^2/s)$	203,14	202,74	202,48
$\mu (Pa.s)$	0.213	0.212	0.212

Tableau 10 : viscosité cinématique et dynamique de l'huile de graines de grenade

Au cours des manipulations, l'huile de graines de grenade nous paraissait plus visqueuse que d'autres huiles végétales. Ceci est confirmé par comparaison avec des viscosités d'autres huiles. Les valeurs de viscosité dynamique obtenues de l'huile de graines de grenade sont supérieures à la viscosité dynamique de l'huile d'olive obtenue par le même appareil et à la même température de 25°C, d'après le **tableau 11** ci-dessous.

μ de l'huile de graines de grenade (Pa.s) par presse à 25°C	μ de l'huile d'olive (Pa.s) par presse à 25°C
0,212	0.063

Tableau11 : viscosité de l'huile d'olive et l'huile de graines de grenade

II.4. Indice d'acide et acidité Oléique :

L'indice d'acide (**I.A**), est une donnée qui permet de caractériser la qualité et la pureté des huiles à température ambiante. Elle est donnée par la mesure de la masse de potasse (en%) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres, (mg KOH/g). Les acides gras libres sont libérés par hydrolyse des triglycérides d'un du corps gras. Ils sont indicatifs de la fraîcheur et de la qualité d'une huile. [22]

L'acidité Oléique (**A.O**), est le pourcentage d'acides gras libres (FFA pour Free Fatty Acids) exprimé conventionnellement en acide oléique pour la majeure partie des corps gras. Pour que l'huile se conserve longtemps sans altération, une faible valeur d'indice d'acide et d'acidité confère une bonne stabilité à l'huile. [27]

Les valeurs des indices d'acides, et d'acidité Oléique de nos huiles, sont représentées dans les deux tableaux 12 et 13 ci-dessous :

I.A Presse	Solvants	I.A Soxhlet	I.A Micro-onde de 1 min à 6 min
1,12	Ether de pétrole	1,40	1,50 – 1,72
	Cyclohexane	2,24	2,24 – 2,58
	Isopropanol	1,95	3,37 – 4,49

Tableau 12 : I.A de l'huile de graines de grenade extraites par différentes méthodes.

A.O (%) Presse	Solvants	A.O Soxhlet	A.O Micro-onde de 1 min à 6 min
0,56	Ether de pétrole	0,39	0,75 – 0,86
	Cyclohexane	1,12	1,13 – 1,30
	Isopropanol	0,98	1,69 – 2,26

Tableau 13 : A.O de l'huile de graines de grenade extraites par différentes méthodes.

A la vue de ces résultats, on remarque que l'indice d'acide et donc l'acidité oléique sont élevés pour l'huile extraite à l'isopropanol, car le chauffage est plus intense, ce qui doit contribuer à la dégradation de l'huile.

À titre comparatif, les (I.A) et (A.O) de quelques huiles végétales sont réunis dans le tableau suivant : ^{[27], [29]}

Huiles végétales	I.A (mg KOH/g)	I.O (%)
Olive	1 – 3	0,5 – 1,5
Argan	0,98 – 2,6	0,49 – 1,3
Pépins de raisin	0,4 – 1,5	0,2 – 0,75
Graines de Grenades	1,12- 10,09	0,39- 5,08

Tableau 14 : I.A et A.O de quelques huiles végétales.

D'après le tableau ci-dessus, nous remarquons que l'indice d'acide et l'acidité oléique des huiles de graines de grenade, restent dans la gamme des indices de la majorité des autres huiles, sauf pour l'huile extraite par MW avec l'isopropanol comme solvant d'extraction, dans ces cas les IA et A.O sont élevés par rapport à d'autres huiles végétales.

II.5.Indice de peroxyde :

L'indice de peroxyde (**IP**), mesure le nombre d'O₂ actif consommé dans les chaînes organiques d'un corps gras. Il permet donc d'évaluer l'état de conservation, et le degré d'oxydation des acides gras insaturés présents dans l'huile végétale. Plus l'**IP** est élevée, plus la matière grasse est oxydée et donc l'huile s'en trouve altérée. ^{[27], [22]}

Si l'indice de peroxyde est inférieur à 10 meq d'O₂/kg, nous pouvons dire que l'huile est fraîche et de bonne qualité. Et si l'indice de peroxyde se trouve dans la plage de 20 à 40 meqO₂/kg, l'huile devient rance et altéré. ^[28]. Les indices de peroxydes de nos huiles sont représentés dans le tableau ci-dessous :

IP Presse	Solvants	IP Soxhlet	IP Micro-onde de 1min à 6 min
1,15	Ether de pétrole	0,75	1,88 – 3,53
	Cyclohexane	1	1,25 – 2,31
	Isopropanol	0,8	2 – 3,08

Tableau 15 : *IP de l'huile de graines de grenade extraites par différentes méthodes.*

Les valeurs des **IP** trouvées dans cette étude sont entre 0,75 et 4,16 meq d'O₂/ Kg, valeurs relativement moyennes. Ces valeurs sont largement inférieures à 10 meq O₂ / Kg, cela nous permet de conclure que les différentes méthodes d'extraction nous ont permis de récupérer des huiles fraîches, qui pourrait renferme des substances antioxydantes naturelles.

II.6. Teneur en insaponifiable :

L'insaponifiable d'une huile végétale, représente sa partie non glycérique ; il est généralement constitué de : cholestérol, phytostérols, ergostérol, pigments, vitamines liposolubles, ...etc.).^[27]

La majorité des huiles végétales, ont une teneur en insaponifiable très faible qui varie entre : 0,3% et 4%. Mais il y'a des exceptions de lipides d'origine végétale (huile de germe de blé), ou animale (huile de foie de morue), qui renferment des teneurs en insaponifiable plus élevées (20%) ^[29]. Nous avons extrait l'insaponifiables des différentes huiles extraites par les diverses méthodes. Les teneurs obtenues sont regroupés dans **le tableau 16** ci-dessous :

Huiles de graines de grenade	Teneurs en insaponifiable (%)
Presse	5
Soxhlet (solvant apolaire)	4,8
Soxhlet (Isopropanol)	4,2

Tableau 16: Teneurs en insaponifiable (%) des huiles de graines de grenade

Les teneurs en composés mineurs (%) de l'huile de graines de grenade des différentes méthodes d'extractions sont pratiquement les mêmes.

À titre comparatif, la teneur en insaponifiable de quelques huiles végétales sont réunis dans le tableau suivant :

Huiles végétales	Teneurs en insaponifiable
Olive	1,5 %
Argan	0,4 – 1,4 %
Graines de grenade	4,2 – 5 %

Tableau 17: Teneurs en insaponifiables de différentes huiles végétales

Les teneurs en composés mineurs (%) de l'huile de graines de grenade, sont élevés par rapport à celles d'autres huiles végétales, (**Tableau17**) ; ce qui confirme bien que l'huile de graines de grenade possède des constituants qui pourraient lui donner des vertus intéressantes.

III. Analyse des esters méthyliques d'acide gras par CPG :

Pour réaliser une analyse CPG, nous avons d'abord transformé les acides gras libres en esters méthyliques correspondants. En suite les échantillons obtenus ont été purifiés sur colonne chromatographique. Après, nous avons procédé à une analyse Infrarouge (IR), pour s'assurer de la présence des esters méthyliques d'acides gras, qui ont été présents sur le spectre IR par la présence de la bande intense et caractéristique des esters à 1741 cm^{-1} . Cinq échantillons ont été purifiés et analysés afin de faire une étude comparative et qualitative de la composition des huiles obtenues par différentes méthodes et différents solvants.

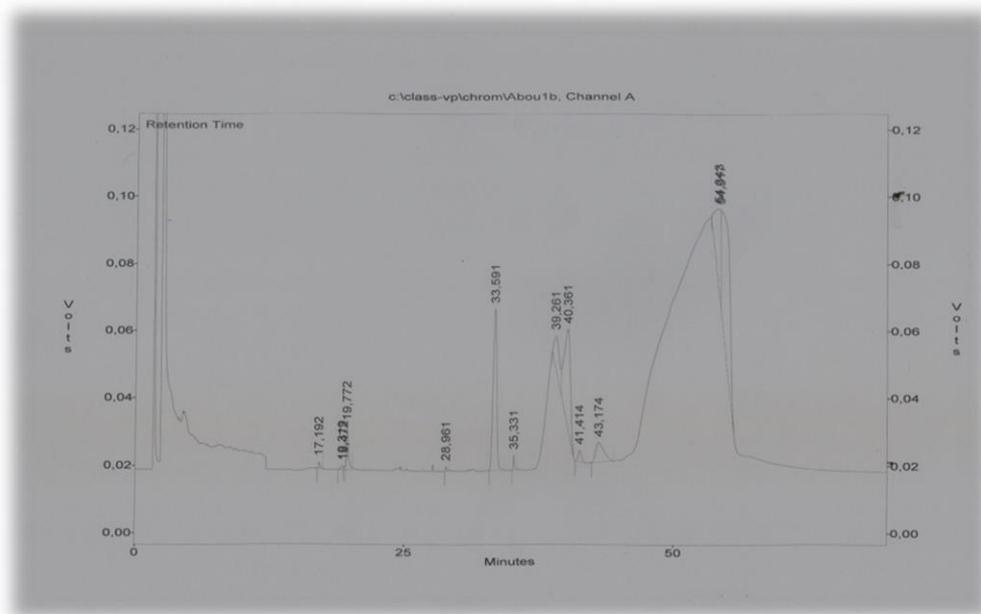


Figure 23: Chromatogramme de l'huile de presse.

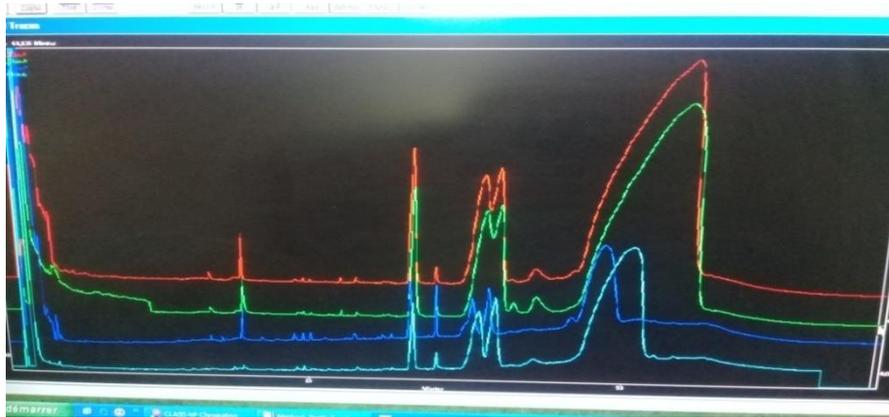


Figure24 : *Chromatogrammes des huiles obtenues par différentes méthodes*

D'après les chromatogrammes obtenus nous pouvons conclure, que les huiles extraites de graines de grenade par différentes méthodes et différents solvants ont les mêmes profils, et par conséquent la même composition en acide gras. Ces chromatogrammes montrent la présence d'un acide gras majoritaire, sous forme d'un pic large et intense sortant entre 48 et 54 minutes.

D'après la littérature, l'acide gras majoritaire dans l'huile de graines de grenade est **l'acide Punicoïque** qui est un acide gras polyinsaturé. Cet acide ne se retrouve que dans les graines de grenade ce qui donne à l'huile des propriétés intéressante ^[22]. L'identification des différents acides gras de notre huile demande plus de temps et la présence des différents étalons d'acides gras nécessaires à cette analyse.

VI. Conclusion :

Ce chapitre s'est intéressé aux résultats des extractions, les analyses physico-chimiques et chromatographiques, des huiles de graines de grenades obtenues par différentes méthodes.

A travers ce chapitre, nous remarquons que le rendement en huile de graines de grenade soit par Soxhlet, ultrasons, ou bien MW avec les trois solvants (Ether de pétrole, cyclohexane et Isopropanol), est meilleur que celui obtenu avec la presse mécanique, ces rendements sont entre 8 et 20.2% selon la technique utilisée. L'analyse des différents

paramètres : indice d'acide, indice de peroxyde, indice de réfraction et viscosité, a confirmé que l'huile obtenue est de bonne qualité en comparant avec d'autres huiles végétales.

Par ailleurs, l'analyse qualitative par chromatographie en phase gazeuse (CPG), nous a montré que tous les chromatogrammes ont les mêmes profils en acides gras, pour les différentes méthodes et les différents solvants utilisés. Entre autre ces chromatogrammes ont montré la présence d'un acide gras majoritaire, et qui représente le produit le plus polaire.

Conclusion et Perspectives

L'espèce végétale, que nous avons choisie dans cette étude, est en fait un fruit largement consommé et apprécié: **la grenade** (*Punica granatum*. L), nous avons sélectionné une variété de la région de Tlemcen, a fin d'extraire et d'étudier l'huile de ses graines.

L'extraction de l'huile de graines de grenade a été réalisée par différentes méthodes: soxhlet, ultrasons, et micro-onde, en utilisant trois solvants (Ether de pétrole, cyclohexane et isopropanol) et avec une presse mécanique. Les rendements en huile obtenus varient entre 8 et 20.2% selon la technique utilisée.

L'analyse physico-chimique : indice d'acide, indice de peroxyde, indice de réfraction, densité et viscosité, a montré que l'huile obtenue est de bonne qualité en comparant avec d'autres huiles végétales. En plus, la teneur en insaponifiable de l'huile est très élevée, elle varie entre 4.2 et 5 %, ce qui montre la valeur nutritive de cette huile. Ces résultats offrent plusieurs utilisations de l'huile de graines de grenade dans divers domaines : cosmétique, pharmaceutique, et agroalimentaire. .

Une analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été menée, Cinq échantillons ont été purifiés et analysés afin de faire une étude comparative et qualitative de la composition des huiles obtenues. Les chromatogrammes de différentes huiles ont montré les mêmes profils, et par conséquent la même composition en acides gras.

Entre autre ces chromatogrammes ont montré la présence d'un acide gras majoritaire, qui est d'après la littérature, un acide gras unique que l'on ne retrouve que dans la grenade ce qui donne à l'huile des propriétés intéressante. Ce dernier est l'**acide Punicique**, c'est un acide gras polyinsaturé qui a plusieurs effets bénéfiques pour la santé humaine, comme par exemple: il possède une activité anticancéreuse et antibactérienne.

Cette huile gagnerait à être étudiée d'avantages pour une identification précise des acides gras, une analyse et caractérisation des composés constituants de la partie insaponifiable, et à la fin une évaluation de l'activité biologique.

Références Bibliographiques

-
- [1] P. Fournier. Plantes médicinales et vénéneuses de France. *Editeur Paul Lechevalier Tome II. 1948.*
- [2] Y. Shulman ; L. Fainberstein; S. Lavee. Pomegranate fruit development and maturation. *Horti. Sci.* **2015**. 59. 265-274.
- [3] V. Eyreinoff. Contribution à l'étude du Grenadier. *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée.* **1957**. 4. 126.
- [4] M. Karimi; R. Sadeghi; J. Kokini. Review: Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology.* **2017**. 107. 323.
- [5] P. Cauchard. La grenade : Organisation de la filière, opportunités et contraintes pour son développement. Mémoire de Fin d'Études. *Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage.* **2013.**
- [6] D.Wang; C. Ozen ; I. Abu-Rachid; All. Effets vasculoprotecteurs de la grenade (*Punica granatum* L.). *Frontiers in pharmacology.* **2018**. 9. 3-5.
- [7] I. Hmid. Contribution A La Valorisation Alimentaire De La Grenade Marocaine (*Punica Granatum* L.) : Caractérisations Physico-chimiques, Biochimique Et Stabilité De Leur Jus Frais. Thèse de doctorat. *Université d'Angers.* **2013.**
- [8] S. Teixeira; R. Tikam Singh; N. Diganta; V. Nidhi; M. Deodas Tarachand; R. Shirish. Review: Pomegranate biology and biotechnology. *Scientia Horticulturae.* **2013**. 160. 85-90.
- [9] L. Zhang ; Q. Fu ; Y. Zhang. Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. *Food Chemistry.* **2011**. 127. 1446.
- [10] E. Wald. Le grenadier (*punica granatum* L) : plante historique-révolution thérapeutique récente. Diplôme d'état de docteur en pharmacie. *Universite Henri Poincare Nancy 1.* **2009.**
- [11] F. Les ; J. Prieto ; J. Miguel ; M. Valero ; V. Lopez. Bioactive properties of commercialised pomegranate (*Punica granatum*) juice: 2 antioxidant, antiproliferative and enzyme inhibiting activities. *Food & Function* . **2013**. 1. 25.
- [12] A.M.M. Costa; L.O. Silva; A.G. Torres. Chemical composition of commercial cold-pressed pomegranate (*Punica granatum*) seed oil from Turkey and Israel, and the use of bioactive compounds for samples' origin preliminary discrimination. *Journal of Food Composition and Analysis.* **2019**. 75.8-16.
- [13] J. Luque-Garcia ; M. D. Luque de Castro. Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment-Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography.* **2004**. 20. 202-208.

- [14] J. Smadja. Les Huiles Essentielle. Mémoire de master .*Université de La Réunion*.**2009**.
- [15] M. A. Goula; M. Athanasia ; All . Ultrasound-Assisted Aqueous Enzymatic Extraction of Oil from Pomegranate Seeds. *Waste and Biomass Valorization*. 2018, 9.7.
- [16] T.Yuting; X. Zhenbo; Y.Martin Lo. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) seed oil. *Ultrasonics sonochemistry*. **2013**, 20. 205.
- [17] H. Abbasi; K. Razaee; L. Rashidi. Extraction of Essential Oils From the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2008**. 85. 83-89.
- [18] B. Ahangari; J. Sargolzaei. Extraction of pomegranate seed oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide. *Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. **2012**. 46. 258-265.
- [19] L.D.S. Freitas; J. De Oliveira; V. Dariva. Extraction of Grape Seed Oil Using Compressed Carbon Dioxide and Propane: Extraction Yields and Characterization of Free Glycerol Compounds. *J. Agric. Food Chem*. **2008**. 56. 64.
- [20] K.Savikina; J. Zivkovic; A. Alimvic et all. Activity guided fractionation of pomegranate extract and its antioxidant, antidiabetic and antineurodegenerative properties. *Industrial Crops & Products*. **2018**. 12. 345.
- [21] J. Carvalho Filho; Pomegranate seed oil (*Punicagranatum L.*): A source of punicic acid (conjugated α -linolenic acid). *Human Nutrition & Food Science*. **2014**. 2. 1024.
- [22] M. Durante; A. Montefusco; P. Marrese ; M. Soccuo ; et All. Seeds of pomegranate, tomato and grapes: An underestimated source of natural bioactive molecules and antioxidants from agri-food by-products. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2017**. 63. 65-72.
- [23] J. Bedjaoui ; K. Bensalem . Caractérisation physico-chimique de l'huile d'olive de deux variétés étrangères : Picholine marocaine et Maurino. Mémoire de Master. *Université Abderrahmane Mira de Bejaia*.**2012**.
- [24] R. El Kebbj ; M.M. El Khair; M.M. Ennaji; R.A. Mhand ; M. Attaleb. Base moléculaire des effets de l'huile d'Argan sur le métabolisme mitochondrial et peroxysomal des acides gras et sur l'inflammation. *Université de Bourgogne*. **2012**.
- [25] N. Boussalah. Propriétés anti oxydantes de deux variétés de grenade de la région de Bejaia. Mémoire de Magister. *Université Abderahmane Mira Bejaia*. **2010**.
- [26] A.O. Haidara. . Valorisation d'une huile de végétale tropicale : L'Huile de Pourghère.Mémoire, Sherbrooke, Canada.**1996**.
- [27] M. OLLÉ. Analyse des corps gras. Bases documentaires: Techniques de l'ingénieur, Analyse et caractérisation. **2002**.
- [28] N. Onyeike; N. Acheru; Chemical composition of selected Nigerian oil seeds and physicochemical properties of the oil extracts. *Food Chemistry*. **2002**. 83.330-338.

- [29] I. Mostefa-Kara. Contribution à l'étude de l'analyse de l'huile de *Citrullus colocynthis* (Coloquinte) et de son pouvoir antimicrobien. Mémoire de magister. *Université Abu-Bakr Belkaid, Tlemcen*. **2011**.
- [30] V. Kesari; A. Das; L. Rangan. Physico-chemical characterization and antimicrobial activity from seed oil of *Pongamia pinnata*, a potential biofuel crop. *Biomass And Bioenergy*. **2010**. *107*. 320-325.
- [31] C. Selles. Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M. Thèse de doctorat. *Universite Abou Bekr Belkaid*. **2012**.
- [A] http://fr.wikipedia.org/wiki/Punica_granatum.
- [B] <http://zaatar.fr/statics/les-fleurs/fleurs-de-grenadier>.
- [C] <http://sante-healthpeople.blogspot.com/p/le-fruit-de-la-grenade-douce.html>.

Annexes

Résumé

Cette étude s'intéresse à l'extraction et l'analyse physico-chimique de l'huile de graines d'une variété de grenade (*Punica granatum*. L) de la région de Tlemcen (Ouest Algérie). L'extraction de l'huile de graines de grenade a été réalisée avec les méthodes : Soxhlet, ultrasons et micro-onde en utilisant trois solvants (Ether de pétrole, cyclohexane et isopropanol) et avec une presse mécanique. Les rendements en huile obtenus sont entre 8 et 20,2% selon la technique utilisée.

L'analyse des différents paramètres : indice d'acide, indice de peroxyde, indice de réfraction et viscosité, a montré que l'huile obtenue est de bonne qualité en comparant avec d'autres huiles végétales. La teneur en insaponifiable de l'huile est très élevée, elle varie entre 4,2 et 5 %, ce qui montre la valeur nutritive de cette huile.

Une analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) a été menée, afin de déterminer qualitativement la composition en acides gras des huiles obtenues. Les chromatogrammes de différentes huiles ont montré les mêmes profils.

Mots clés : Grenade, graines de grenade, techniques d'extraction, huile, indices, insaponifiable, analyse CPG.

Abstract

This study focuses on the extraction and physicochemical analysis of the seeds oil of a pomegranate variety (*Punica granatum* L.), of Tlemcen (West Algeria). The extraction of pomegranate seeds oil was carried out with the methods: Soxhlet, ultrasound and microwave using three solvents (petroleum ether, cyclohexene and isopropanol) also with a mechanical press. The oil yields obtained are between 8 and 20,2% depending on the technique used.

The analysis of the different parameters: acidity index, peroxide value, refractive-index and viscosity has shown that the oil obtained is a good quality by comparing with other vegetable oils. The unsaponifiable content of the oil is very high; it varies between 4, 2 and 5 %, which shows the nutritional value of this oil.

An analysis by gas chromatography (GC) was conducted in order to determine qualitatively the fatty acids composition of oils obtained. The chromatograms of different oils showed the same profiles.

Keywords : Pomegranate, pomegranate seeds, extraction techniques, oil, index, unsaponifiable, GC analysis.

ملخص

تعتمد هذه الدراسة على الاستخراج والتحليل الفيزيائي الكيميائي لزيت بذور من صنف معين من الرمان (*Punica granatum* L.) من منطقة تلمسان (غرب الجزائر). تم إجراء استخراج زيت بذور الرمان باستخدام الطرق التالية: جهاز سوكسلي، حمام موجات صوتية والميكروويف باستخدام ثلاثة مذيبات (أثير بترول، سيكلوهكسان وإيزوبروبانول) وطريقة أخرى تعتمد على الضغط الميكانيكي. تتراوح عائدات الزيت التي تم الحصول عليها بين 8 و 20,2% وتختلف باختلاف التقنية المستخدمة.

أظهر تحليل بعض الخواص الفيزيائية والكيميائية مثل: رقم الحمض، مؤشر البيروكسيد، معامل الانكسار واللزوجة، أن الزيت الذي تم الحصول عليها ذو نوعية جيدة من خلال المقارنة مع الزيوت النباتية الأخرى. قيمة الانسaponifiable في الزيت المدروسة مرتفع، وتتراوح بين 4.2 و 5 %، مما يدل على القيمة الغذائية لهذا الزيت.

تم التعرف على تركيبة الزيت من الأحماض الدهنية بواسطة جهاز CPG الذي أعطى نفس الكروماتوغرام لمختلف الزيوت المتحصل عليها.

الكلمات المفتاحية : الرمان، بذور الرمان، تقنيات الاستخلاص، الزيت، المؤشرات، الانسaponifiable، تحليل GPC.