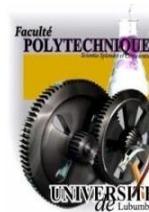


REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO
UNIVERSITE DE LUBUMBASHI
B.P.1825
LUBUMBASHI



FACULTE POLYTECHNIQUE
DEPARTEMENT DE CHIMIE INDUSTRIELLE

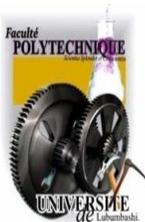


**OPTIMISATION DU RENDEMENT D'EXTRACTION DES
HUILES ESSENTIELLES D'EUCALYPTUS GLOBULUS, ET
CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE**

Présenter par MPIANA KIBWELA Nathan

Travail présenté et défendu en vue de l'obtention du grade
de Bachelier Ingénieur Civil en Chimie Industrielle

NOVEMBRE 2020



REPUBLIQUE DEMOCRATIQUE DU CONGO
UNIVERSITE DE LUBUMBASHI

B.P.1825
LUBUMBASHI



FACULTE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT DE CHIMIE INDUSTRIELLE



**OPTIMISATION DU RENDEMENT D'EXTRACTION DES
HUILES ESSENTIELLES D'EUCALYPTUS GLOBULUS, ET
CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE**

Présenter par MPIANA KIBWELA Nathan

Travail présenté et défendu en vue de l'obtention du grade
de Bachelier Ingénieur Civil en Chimie Industrielle

Dirigé par Prof Jean-Marie KANDA NTUMBA

NOVEMBRE 2020

EPIGRAPHE

« Le don d'une plante utile me paraît plus précieux que la découverte d'une mine d'or, et d'un monument plus durable qu'une pyramide »

BERNARDIN DE Saint-Pierre

Voyage de l'île de France, p. 58

RESUME

Ce travail présente les résultats d'une étude d'optimisation du rendement d'extraction par hydrodistillation, et de la caractérisation physico-chimique de ses huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*. L'objectif principal de ce travail était de trouver les meilleures conditions opératoires (temps d'extraction et ratio matière/solvant), pouvant nous permettre d'extraire la totalité des fractions des huiles essentielles contenus dans les feuilles d'Eucalyptus.

Pour ce faire, des essais d'hydrodistillation ont été effectués au laboratoire en variant le temps d'extraction et le ratio matière/solvant. Les résultats obtenus au cours des essais ont montré que le temps optimal de l'extraction des huiles essentielles est de 120 minutes, et dans cette condition le ratio optimal a été de 1 : 6,25 avec un rendement d'extraction de l'huile essentielle de l'ordre de 1,20 %.

Ensuite l'analyse organoleptique et physico-chimique, ont été effectuées pour le contrôle de la pureté de l'huile essentielle extraite. Les valeurs obtenues pour l'analyse organoleptique de l'huile essentielle, sont conforme aux normes de l'AFNOR NFT 7. En ce qui concerne les valeurs de l'analyse physico-chimique ; densité, indice de réfraction et indice d'acide, respectivement égale 0,876 ; 1,475 ; 1,316. Ces valeurs sont en accords avec les valeurs des indices physico-chimiques des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* rapportées dans la littérature et sont aussi en accords avec les valeurs de la norme AFNOR NFT 7. Ces valeurs Ont montrés la pureté et la stabilité de l'huile essentielle extraite des feuilles d'*Eucalyptus globulus*.

ABSTRACT

This work presents the results of a study to optimize the extraction yield by hydrodistillation, and the physicochemical characterization of its essential oils of *Eucalyptus globulus*. The main objective of This work was to find the best operating conditions (extraction time and material /solvent ratio), which could allow us to extract all the essential oil fractions contained in the leaves of *Eucalyptus*.

To do this, hydrodistillation tests were carried out in the laboratory by varying the extraction time and the material / solvent ratio. The results obtained during the tests showed that the optimal time for the extraction of essential oils is 120 minutes, and under this condition the optimal ratio was 1 : 6.25 with an oil extraction yield. Essential of the order of 1.20 %.

Then the organoleptic and physicochemical analysis were carried out to check the purity of the essential oil extracted. The values obtained for the organoleptic analysis of the essential oil comply with the standards of AFNOR NFT 7. With regard to the values of the physicochemical analysis; density, refractive index and acid index, respectively equal to 0.876 ; 1.475 ; 1.316. These values are in agreement with the values of the physicochemical indices of the essential oils of *Eucalyptus globulus* reported in the literature and are also in agreement with the values of the AFNOR NFT 7 standard. These values have shown the purity and the stability of the oil essential extracted from the leaves of *Eucalyptus globulus*.

DEDICACE

A mes parents ;

Pour vos mains qui ont tant travaillées, pour votre cœur qui m'a tant donné, pour votre sourire qui m'a tant réchauffé, pour vos yeux qui furent parfois mouillés, pour vous qui m'avez tant aimé, autant des phrases d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer mon affection, ma gratitude et ma reconnaissance que j'éprouve pour vous. Que ce modeste travail soit un prélude de l'immense bonheur que je compte vous procurer ;

A mes frères et sœurs ;

A toute ma famille ;

A tous mes amis et connaissances ;

Je vous dédie ce travail, témoignage de ma profonde reconnaissance et mon plus grand attachement.

REMERCIEMENT

Nous exprimons nos sentiments de profonde gratitude à notre Dieu le maître de la vie, des temps et des circonstances, pour nous avoir alloué de sa grâce inestimable et de nous avoir donné la force, le courage et la patience pour mener à terme ce travail.

Nous exprimons nos sentiments de reconnaissance et de gratitude à l'égard du prof Jean-Marie KANDA, pour nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail, merci pour vos conseils et suggestions qui ces derniers ont été d'une importance capitale dans la réalisation de ce travail.

Nous sommes reconnaissant envers tout le corps professoral de notre faculté en général et plus particulièrement nos professeurs, chefs de travaux, et assistants du département de chimie industrielle pour le bagage intellectuel reçu.

Nous pensons à nos encadreurs l'Assistant Ir Civil Serge KATUFU et l'Ir Civil Jhon KASONGO pour leurs orientations et aides précieuses dans la réalisation de ce travail.

Nous sommes reconnaissant à l'égard du Chef de travaux au département de chimie à la faculté des sciences Etienne KAHUNGA pour nous avoir aidé à réaliser l'analyse phytochimique des feuilles d'Eucalyptus, merci pour votre aide et pour vos remarques constructives, nous profitons de l'occasion pour exprimer nos sentiments de reconnaissance à l'Assistant Frederick KAHENGA de la faculté des sciences département de chimie, qui malgré ses multiples occupations était toujours présent pour répondre à nos préoccupations, veuillez croire à notre haute considération.

Nos remerciements s'adressent également à nos parents Jacques KIBWELA MUKALAYI et Rebecca MUJINGA MPENGA, pour leur preuve d'abnégation à notre endroit. Nous remercions également notre famille KIBWELA pour leurs aides, prière et encouragement.

Nos remerciements les plus sympathiques à tous nos collègues de promotion pour les bons moments que nous avons passés ensemble.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----|
| EPIGRAPHE..... | I |
| RESUME..... | II |
| ABSTRACT | III |
| DEDICACE..... | IV |
| REMERCIEMENT | V |
| TABLE DES MATIERES | VI |
| LISTE DES FIGURES..... | X |
| LISTE DES TABLEAUX..... | XI |
| ABREVIATIONS, SYMBOLES ET SIGLES..... | XII |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LES PLANTES MEDICINALES ET LES HUILES ESSENTIELLES | 3 |
| 1.1. Plantes médicinales..... | 3 |
| 1.1.1 Définition | 3 |
| 1.1.2 Quelques principes actifs de plantes médicinales | 4 |
| 1.1.2.1 Les phénols..... | 4 |
| 1.1.2.2 Les flavonoïdes | 4 |
| 1.1.2.3 Les saponines | 5 |
| 1.1.2.4 Les alcaloïdes | 5 |
| 1.2 Plantes aromatiques | 6 |
| 1.3 <i>Eucalyptus</i> | 6 |
| 1.3.1 Description | 6 |
| 1.3.2 Types d' <i>Eucalyptus</i> | 6 |
| 1.3.3 Classification botanique de l' <i>Eucalyptus globulus</i> | 6 |

| | |
|--|----|
| 1.4 Propriétés et composition chimique de l' <i>Eucalyptus globulus</i> | 7 |
| 1.4.1 Propriétés thérapeutiques | 8 |
| 1.4.2 Composition chimique | 8 |
| 1.5 Huiles essentielles..... | 9 |
| 1.5.1 Définition des huiles essentielles | 9 |
| 1.5.2 Qualité des huiles essentielles..... | 9 |
| 1.5.3 Composition chimique des huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 10 |
| 1.5.3.1 Composés terpéniques..... | 10 |
| 1.5.3.2 Composés aromatiques..... | 12 |
| 1.5.4 Facteurs de la variabilité de la composition chimique et du rendement d'extraction des huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 12 |
| 1.5.4.1 Facteurs intrinsèques | 12 |
| 1.5.4.2 Facteurs extrinsèques | 12 |
| 1.6 Marché mondiale des huiles essentielles | 13 |
| 1.7 Domaines d'utilisation des huiles essentielles..... | 13 |
| 1.7.1 Industrie agroalimentaire | 13 |
| 1.7.2 Parfumerie et cosmétologie..... | 14 |
| 1.7.3 Pharmacie..... | 14 |
| 1.8 Procédés d'extraction de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 14 |
| 1.8.1 Distillation par entraînement à la vapeur d'eau | 14 |
| 1.8.2 Hydrodistillation | 15 |
| 1.8.3 Hydrodiffusion | 15 |
| 1.8.4 Expression à froid | 15 |
| 1.8.5 Autres méthodes..... | 16 |
| 1.8.5.1 Extraction par solvants | 16 |

| | |
|---|-----------|
| 1.8.5.2 Extraction par micro-ondes | 16 |
| 1.9 Facteurs de variabilité du rendement d'extraction des huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i> par hydrodistillation | 17 |
| 1.10 Méthodes de caractérisation de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 17 |
| 1.10.1 Caractéristiques organoleptiques | 18 |
| 1.10.2 Propriétés physico-chimiques | 18 |
| 1.10.3 Caractérisation chimique | 19 |
| 1.10.3.1 Méthodes de séparation | 19 |
| 1.10.3.2 Analyse spectrale..... | 21 |
| 1.10.3.3 Analyse par couplage CPG/SM..... | 21 |
| 1.11 Travaux antérieurs sur les huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 22 |
| CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES | 24 |
| 2.1 Matériel..... | 24 |
| 2.1.1 Echantillon et préparation de l'échantillon | 24 |
| 2.1.1.1 Identification botanique de l'échantillon d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 25 |
| 2.1.2 Matériel et Réactif utilisés pour la caractérisation des feuilles d' <i>Eucalyptus</i> | 26 |
| 2.1.2.1 Matériel | 26 |
| 2.1.2.2 Réactifs..... | 26 |
| 2.1.3 Matériels et réactifs pour l'extraction des huiles essentielles | 27 |
| 2.1.3.1 Matériel | 27 |
| 2.1.3.2 Réactif | 27 |
| 2.1.4 Matériel et réactifs pour la caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle | 27 |
| 2.1.4.1 Matériel | 27 |
| 2.1.4.2 Réactifs..... | 27 |
| 2.2 Méthodes | 28 |

| | | |
|--|--|----|
| 2.2.1 | Caractérisation des feuilles d'Eucalyptus | 28 |
| 2.2.1.1 | Analyse phytochimique..... | 29 |
| 2.2.2 | Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation | 31 |
| 2.2.2.1 | Conditions opératoires..... | 32 |
| 2.2.3 | Caractérisation des huiles essentielles d'Eucalyptus | 33 |
| 2.2.3.1 | Caractérisation organoleptique..... | 33 |
| 2.2.3.2 | Caractérisation physico-chimique | 33 |
| CHAPITRE 3 : PRESENTATION DES RESULTATS ET DISCUSSION..... | | 38 |
| 3.1 | Résultats de la caractérisation des feuilles d'Eucalyptus | 38 |
| 3.2 | Extraction de l'huile essentielle..... | 39 |
| 3.2.1 | Influence du temps d'extraction sur le rendement de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus..... | 40 |
| 3.2.2 | Optimisation du rapport matière/solvant ou (ratio soluté/solvant) | 41 |
| 3.2.3 | Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus..... | 42 |
| 3.3 | Analyse organoleptique | 43 |
| 3.4 | Analyses physico-chimiques | 45 |
| CONCLUSION | | 47 |
| REFERENCES..... | | 49 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1: Squelette de base des flavonoïdes..... | 5 |
| Figure 2: Photographie des feuilles d'Eucalyptus globulus (Beyould, 2014) | 7 |
| Figure 3: Structure chimique de quelques constituants d'Eucalyptus a) 1,8 cinéole (Eucalyptol) ; b) Globulol..... | 9 |
| Figure 4: Structure chimique des quelques monoterpènes | 11 |
| Figure 5: Photographie des feuilles d'Eucalyptus préparées pour l'extraction des huiles essentielles et le broyat des feuilles d'Eucalyptus pour le test phytochimique..... | 25 |
| Figure 6: Photographie d'identification botanique des feuilles d'Eucalyptus globulus..... | 26 |
| Figure 7: Montage expérimentale de l'hydrodistillation des huiles essentielles d'Eucalyptus | 31 |
| Figure 8: Optimisation de la durée de distillation | 40 |
| Figure 9: Influence du ratio matière/solvant sur le rendement d'extraction des huiles essentielles d'Eucalyptus | 41 |
| Figure 10: Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus | 42 |
| Figure 11: Couleur de l'huile essentielle d'Eucalyptus obtenue après séparation des phases | 44 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1: Quelques familles des plantes médicinales (Rabiai, 2014) | 3 |
| Tableau 2: Qualité des indices physico-chimique de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus | 10 |
| Tableau 3: Propriétés organoleptiques des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus selon la norme AFNOR NFT 7 | 17 |
| Tableau 4: Paramètres étudiés et niveaux des variations | 32 |
| Tableau 5: Conditions opératoires de l'optimisation du temps d'extraction des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus | 32 |
| Tableau 6: Conditions opératoire de l'optimisation du ratio matière/solvant..... | 33 |
| Tableau 7: Résultats du taux d'humidité et de la teneur en cendre des feuilles d'Eucalyptus globulus | 38 |
| Tableau 8: Résultats de l'analyse phytochimique sur les feuilles d'Eucalyptus | 38 |
| Tableau 9: Résultats de l'optimisation du temps d'extraction des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus | 39 |
| Tableau 10: Résultats de l'optimisation du ratio matière/solvant..... | 41 |
| Tableau 11: Analyse organoleptique des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus | 44 |
| Tableau 12: Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus | 45 |

ABREVIATIONS, SYMBOLES ET SIGLES

AFNOR : Association française de normalisation

CCM : Chromatographie sur couche mince

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

°C : degré Celsius

FeCl₃ : Trichlorure de fer

g : gramme

HCl : Acide chlorhydrique

HEs : Huiles essentielles

Kg : Kilogramme

mm : millimètre

min : minutes

ml : millilitre

NaCl : chlorure de sodium

PAs : plantes aromatiques

Rdt : Rendement d'extraction

% : Pourcentage

v/v : volume/volume

INTRODUCTION

Depuis l'antiquité, les plantes permettent à l'homme non seulement de se nourrir, se loger, se chauffer, se parfumer, etc. Mais aussi de maintenir son équilibre, soulager ses souffrances, préserver et soigner les maladies qui nuisent à sa santé. Les plantes aromatiques et médicinales jouent un rôle économique considérable dans le secteur des industries de l'agroalimentaire, de la parfumerie, des cosmétiques, etc. En effet, ces plantes représentent une source inépuisable de remèdes efficaces grâce aux principes actifs qu'elles contiennent tels que les alcaloïdes, flavonoïdes, phénols, tanins, et huiles essentielles. Il faut dire que les huiles essentielles représentent l'un des principes actifs les plus importants en raison de leurs multiples et diverses applications grasses à potentiel thérapeutique de leurs constituants.

Les huiles essentielles ont toujours occupée une place de choix aussi bien dans l'industrie de parfums que dans le domaine pharmaceutique, culinaire, des conserves alimentaires, etc. (Balisa, 2002). La popularité dont jouissent depuis longtemps les huiles essentielles reste liée à leur propriété médicinale en l'occurrence les propriétés anti-inflammatoire, antiseptique, antivirale, bactéricide, antioxydant, antitoxique, etc. (Marwa, 2017). Leurs nombreux usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur le marché mondial (Tchamdja, 1995). L'utilisation de propriété odorante et thérapeutique des huiles essentielles passe par une étape d'extraction des essences végétales contenues dans les plantes aromatiques. Le rendement d'extraction dépend des plusieurs facteurs ; le temps d'extraction, le rapport matière/solvant, taux d'humidité, la zone de récolte de la plante, le stade végétatif de la plante, etc. (Kouamé et al., 2012)

L'objectif général de ce travail est d'optimiser le rendement d'extraction des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* par la méthode d'hydrodistillation. Il a pour objectif spécifique la caractérisation physico-chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*.

Ainsi pour atteindre les objectifs assignés, nous avons procédé par une caractérisation des feuilles d'*Eucalyptus* par une analyse phytochimique, ensuite des essais d'hydrodistillation pour extraire les huiles essentielles d'*Eucalyptus* suivis de leur caractérisation physico-chimique afin d'évaluer la pureté de ces dernières.

En ce qui concerne la subdivision du travail, ce travail comprend 3 chapitres ; le chapitre 1 comprend une revue bibliographique sur les plantes médicinales et les huiles essentielles, le

chapitre 2 expose le matériel et méthodes utilisés dans la partie expérimentale, enfin le chapitre 3 présente les résultats obtenus ainsi que leurs discussions. On Termine la présente étude, par une conclusion qui renferme des perspectives.

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LES PLANTES MEDICINALES ET LES HUILES ESSENTIELLES

Ce chapitre traite des plantes médicinales, des méthodes d'obtentions des essences végétales extraites de plantes aromatique, il parle également de la composition chimique, et de la caractérisation physico-chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus*.

1.1. Plantes médicinales

1.1.1 Définition

Les plantes médicinales sont des plantes qui renferment un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (Adoumou et al., 2012). Il faut dire que les plantes médicinales représentent une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires pour la synthèse des médicaments (Sofowora, 1993). Le tableau 1 reprend les grandes familles des plantes médicinales qu'on rencontre dans le règne végétal.

Tableau 1: Quelques familles des plantes médicinales (Rabiai, 2014)

| Familles | Espèces |
|---------------|----------------------------------|
| Liliacées | Tulipe, Ail, Poireau |
| Lamiacées | Basilic, Menthe, Origan, Lavande |
| Lauracées | Laurier |
| Lauranthacées | Gui |
| Polygonacées | Rhubarbe |
| Borraginacées | Bourrache, Consoude |
| Papavéracées | Pavot, Chélidoine |
| Ombellifères | Cerfeuil, Persil, Coriandre |
| Myrtaacées | Eucalyptus, Girofle |
| Chénoposacées | Arroche |
| Saxifragacées | Groseillier, Cassiser |

Il ressort du tableau 1 que l'*Eucalyptus* fait partie de la famille de Myrtaacées, ce sont des arbres et des arbustes, souvent producteurs d'huiles essentielles des zones tempérées, subtropicales à

tropicales, poussant principalement en Australie, en Amérique, dans la région méditerranéenne, en Afrique subsaharienne, Madagascar, et les îles du Pacifique.

1.1.2 Quelques principes actifs de plantes médicinales

Les principes actifs sont des molécules qui confèrent aux plantes médicinales une activité thérapeutique bien connue. Parmi ces molécules on retrouve : les phénols, les flavonoïdes, les saponines, et les alcaloïdes.

1.1.2.1 Les phénols

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols possèdent des propriétés ; anti-inflammatoires et antiseptiques (Nkili, 2009).

1.1.2.2 Les flavonoïdes

Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On distingue différents types de noyaux : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aures, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, coumestanes, roténoïdes etc. (Sarni et al., 2006).

Les flavonoïdes sont des dérivés du phénylpropane, possèdent tous un même squelette de base de quinze atomes de carbones constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃ (Figure 1). Les flavonoïdes sont de composés phénoliques dont beaucoup sont des pigments responsables de la coloration de nombreuses fleurs et de certains fruits (Bruneton, 199). Ils sont très présents dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs de plante, Il faut dire aussi que ces molécules possèdent de nombreuses propriétés thérapeutique ; anti-inflammatoire, antioxydant, antibactérienne, etc. (Hurabielle et al., 1989).

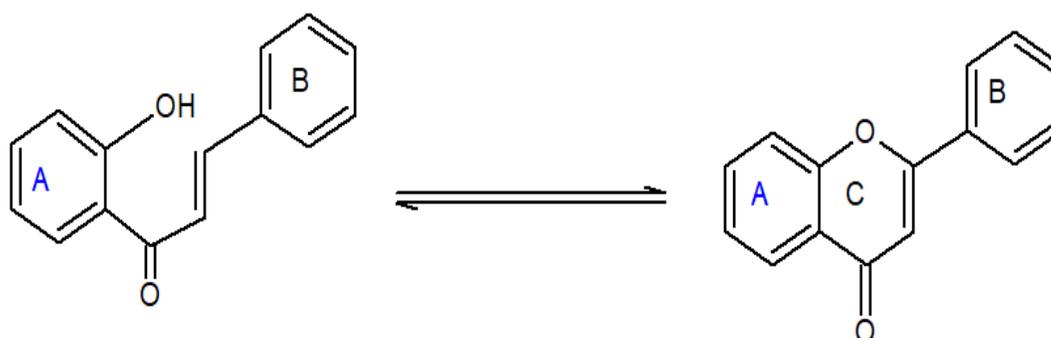


Figure 1: Squelette de base des flavonoïdes

1.1.2.3 Les saponines

On appelle saponines ou saponosides, une classe de substances naturelles dont la solution aqueuse forme par agitation une mousse plus abondante et plus persistante que celle produite par toute classe de produits naturels, dans les conditions similaires. Ce sont des hétérosides stéroïdiens à pouvoir moussant et hémolytique (Bruneton, 1999).

Ce sont des hétérosides qui sont formés par la combinaison de l'un des hydroxydes d'un mono ou d'un polysaccharide ou aglycone, suite de l'élimination d'une molécule d'eau. Certaines saponines libèrent également, outre les composés précités, un ou plusieurs acides organiques, acides cinnamiques, etc. (Bruneton, 1999).

1.1.2.4 Les alcaloïdes

Ce sont des composés organiques d'origine naturelle (les plus souvent végétales, azotés plus ou moins basiques distribution restreinte et donnés à faible dose des propriétés pharmacologiques. Du point de vue chimique, les alcaloïdes sont des composés soit tertiaires constituées de C, H et N qui sont généralement liquides et volatiles. La basicité des alcaloïdes est très variable cette propriété est fonction de la disponibilité du doublet libre de l'azote. Les alcaloïdes forment des sels d'acides minéraux ou organiques apolaires solubles dans les alcools (Bruneton, 1999).

Les alcaloïdes présentent des propriétés pharmacologiques assez importantes et variées dont les plus connues sont : Les propriétés analgésiques, et les propriétés cicatrisantes.

1.2 Plantes aromatiques

Les PAs sont, par définition, des plantes dont les tissus secrètent suffisamment d'essence végétale. Elles contiennent les molécules aromatiques ou odorantes dans un ou plusieurs de ses organes producteurs : feuille, fleurs, fruits, écorces, graines, racines, etc. Toute plante à odeur n'est pas toujours une plante aromatique, pour exemple le tilleul est un arbre odorant mais il n'existe pas d'huile essentielle de tilleul (Bechaalany, 2005).

1.3 *Eucalyptus*

1.3.1 Description

Les *Eucalyptus* sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur, originaire d'Australie, notamment de la province de Tasmanie ; l'*Eucalyptus* fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie et du bassin méditerranéen. Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît, l'*Eucalyptus* assèche rapidement les marais qu'il colonise. Il élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria, d'où le nom « d'arbre à la fièvre » (Rabiai et al., 2014).

La plupart des *Eucalyptus* ont des feuilles persistantes. Comme les autres membres de la famille des Myrtaceae, les feuilles d'*Eucalyptus* sont couvertes de glandes à huile. L'abondante production d'huile est une caractéristique importante de ce genre (Selma et al., 2018)

Les fleurs sont très variées, elles ont de très nombreuses étamines qui peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, rose ou rouge. Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs, et de couleur brune. Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol (Bruneton, 1999).

1.3.2 Types d'*Eucalyptus*

Il existe différentes variétés d'*Eucalyptus*, entre autre ; l'*Eucalyptus citonnella*, l'*Eucalyptus radiata*, *Eucalyptus* rostrata, *Eucalyptus globulus*, etc. la présente étude s'intéresse à l'*Eucalyptus globulus*.

1.3.3 Classification botanique de l'*Eucalyptus globulus*

La classification botanique d'*Eucalyptus globulus* selon (Ghedira, 2008), est la suivante :

Synonymes : Gommier bleu, *Eucalyptus* globuleux, Arbre à fièvre, *Eucalyptus* officinal

Règne : Plante

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida-Dicotylédones

Sous-classe : Rosidae

Famille : Myrtaceae

Genre : *Eucalyptus*

Nom botanique : *Eucalyptus globulus*, Labill.

Nom vernaculaire : localement cette plante est connue sous le nom de Kalafulu. La figure 2 présente une photographie des feuilles d'*Eucalyptus globulus*.



Figure 2: Photographie des feuilles d'*Eucalyptus globulus* (Beyould, 2014)

Hormis les multiples vertus thérapeutiques de cette plante, de nombreux *Eucalyptus* sont utilisés dans le monde pour produire du bois de service : poteaux, bois de mine, bois de feu, perches, bois de construction.

1.4 Propriétés et composition chimique de l'*Eucalyptus globulus*

L'*Eucalyptus globulus* possède des nombreuses propriétés thérapeutiques, et également une composition chimique très variée.

1.4.1 Propriétés thérapeutiques

On a introduit depuis les temps anciens dans la thérapeutique les feuilles d'*Eucalyptus*, qui ont les propriétés suivantes (Dellile et al., 2007) :

- Une propriété balsamique, ayant la fonction d'un baume adoucissant pour les muqueuses respiratoires,
- Propriété antiseptique des voies respiratoires, et à ce titre, il soigne les rhumes, gripes et maux de gorge,
- Une propriété fébrifuge,
- Une propriété vermifuge, et
- Une propriété antibactérienne.

1.4.2 Composition chimique

La constitution chimique de l'*Eucalyptus globulus*, est formée de :

- De l'huile essentielle dont les composant majoritaires de celle-ci sont (oxydes terpéniques : 1,8-cinéole (Eucalyptol) ; monoterpènes : alpha-pinène, limonène, gamma-terpinène, paracymène ; sesquiterpènes : aromadendrène ; sesquiterpénols : globulol, lédol),
- Flavonoïdes (des hétérosides de flavones avec aglycones suivant : quercétine, myricétine, etc.)
- Tanins. La figure 3 illustre la structure chimique des quelques constituants d'*Eucalyptus*

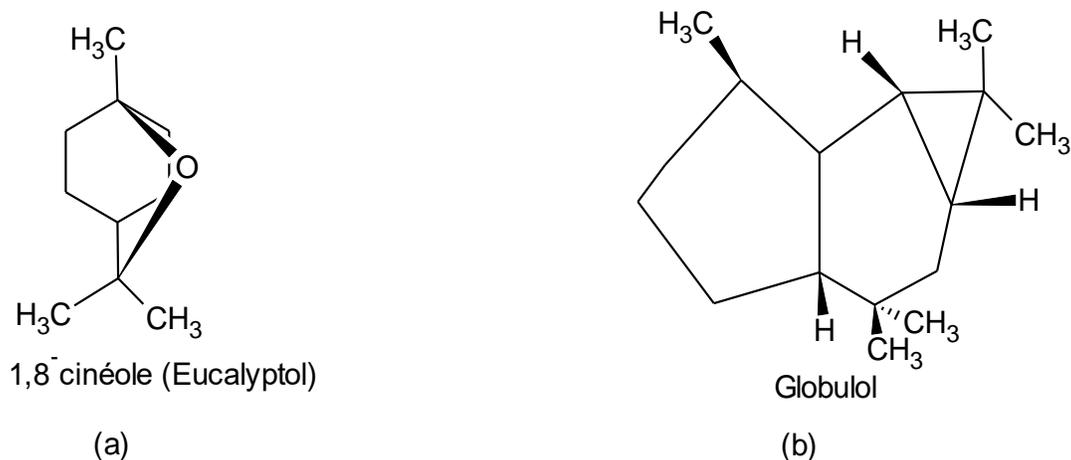


Figure 3: Structure chimique de quelques constituants d'*Eucalyptus* a) 1,8 cinéole (Eucalyptol) ;
b) Globulol

1.5 Huiles essentielles

1.5.1 Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont définies comme étant des extraits volatils et odorants, que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau, ou soit par expression mécanique. Il s'agit d'un mélange des composés lipophiles, volatils et souvent liquide, synthétisés et stockés dans certains tissus de végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels que l'Hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur ou l'expression à froid dans le cas des agrumes, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante (Piribi et al., 2007).

1.5.2 Qualité des huiles essentielles

La qualité est mesurée par sa conformité à des normes qui peuvent varier selon l'utilisation de l'HE, par exemple les normes AFNOR NFT 7 et ISO 9235 sont les barèmes utilisés pour juger la qualité des huiles essentielles dans les secteurs des parfums (AFNOR, 2000).

- En phytothérapie, leur qualité peut être assurée par la présence d'une certaine quantité de substances des parfums.
- En pratique, la qualité des huiles essentielles est évaluée de deux façons : premièrement par des analyses chimiques et physico-chimiques et deuxièmement par les analyses

organoleptiques de l'huile essentielle (Mohamdi, 2005). Le tableau 2 présente la qualité de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, selon la norme AFNOR.

Tableau 2: Qualité des indices physico-chimique de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus

| Propriété | Reference (AFNOR NFT7) |
|--------------------------|------------------------|
| Indice de réfraction | 1,460-1,476 |
| Indice d'acide | 0,84-3,74 |
| Indice de saponification | 17,53 |
| Indice d'ester | 13,79 |
| Densité | 0,905-0,21 |
| pH | 4-6 |

Le tableau 2 présente les barèmes qui permet de juger de la qualité des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, en ce qui concerne leurs propriétés physico-chimiques.

1.5.3 Composition chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et éminemment variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les composés terpéniques tels que les monoterpènes et sesquiterpéniques ; et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Les principaux constituants des huiles essentielles d'*Eucalyptus* sont : les composés terpéniques et les composés aromatiques (Ghedira, 2008).

1.5.3.1 Composés terpéniques

D'une manière générale, ces huiles essentielles ne contiennent que les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono- et sesquiterpènes. Ce sont des hydrocarbures ayant respectivement dix et quinze atomes de carbone. Ils peuvent être saturés ou insaturés, acycliques, monocycliques, bicycliques ou polycycliques. Ils peuvent également être accompagnés de leurs dérivés oxygénés : alcools, esters, éthers, aldéhydes, cétones, (Bruneton, 1999).

a) Les monoterpènes

Les composés monoterpéniques sont constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est $C_{10}H_{16}$ (Rahal, 2004). Ces composés peuvent être : monoterpènes acycliques (myrcène, ocimènes), monoterpènes monocycliques (α - et γ - terpinène, p-cymène) et monoterpènes bicycliques (pinènes, Δ^3 -carène, camphène, sabinène). La figure 4 présente la structure chimique des quelques monoterpènes

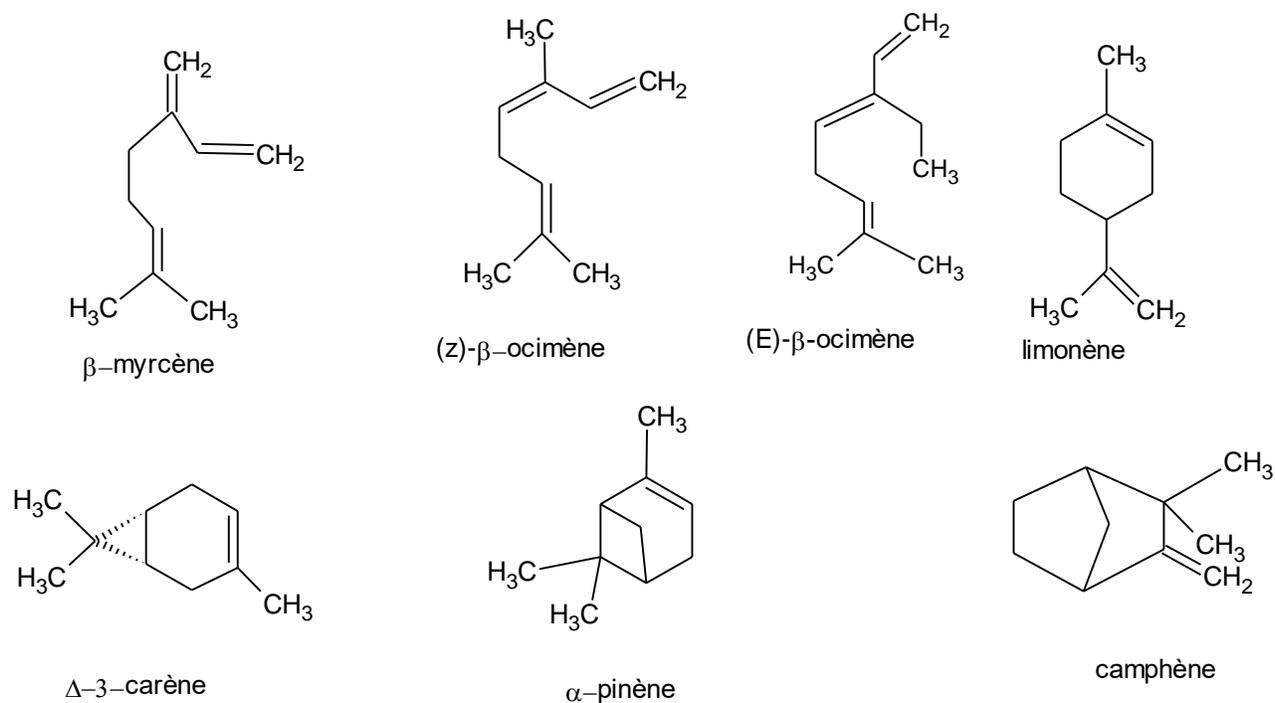


Figure 4: Structure chimique des quelques monoterpènes

b) Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont des dérivés d'hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes). Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones (Piribi, 2007).

1.5.3.2 Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivent du phénylpropane (C6-C3). Ils sont moins fréquents que les terpènes, cette classe comporte des composés odorants bien connus comme l'eucalyptol et bien d'autres ils sont responsables de l'odeur caractéristique d'*Eucalyptus* (Selma, 2018).

1.5.4 Facteurs de la variabilité de la composition chimique et du rendement d'extraction des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement d'extraction. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, qui peuvent être regroupé en deux catégories (Oussou, 2009 ; Kouamé, 2012) :

- Facteurs intrinsèques : le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol, la partie de la plante utilisée, le cycle végétatif de la plante, la période de récolte de la plante, la zone de récolte,
- Facteurs extrinsèques : en lien avec la méthode d'extraction.

1.5.4.1 Facteurs intrinsèques

Les cellules productrices d'huile essentielle peuvent se situer dans différents organes, il est possible d'obtenir différentes huiles selon les parties sélectionnées d'une même plante. Plusieurs études montrent des différences au niveau de la composition chimique des huiles essentielles en raison d'organes différents (feuilles, fleurs, tiges et racines) et de sous-espèces différentes (Oussou *et al.*, 2009).

Le stade végétatif au moment de la récolte est un facteur déterminant pour le rendement et la composition de l'huile essentielle des plantes (Vekiari *et al.* 2002).

1.5.4.2 Facteurs extrinsèques

Bechaalany *et al.*, (2005), ont montrés l'influence des méthodes d'extraction sur la composition chimique des huiles essentielles. Selon Himed *et al.*, (2011), le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition chimique et le rendement des huiles essentielles. Plusieurs études, ont mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière végétale (Helall, 2011).

1.6 Marché mondiale des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont valorisées principalement sur les marchés de l'aromathérapie, de la parfumerie, du cosmétique, et de l'agroalimentaire. Elles peuvent, soit rentrer dans la composition de produits élaborés (savons, crèmes, parfums, bougies, agents de conserves...). Elles sont recherchées pour leurs propriétés odorantes ou thérapeutiques. Les principaux marchés de consommation sont les pays développés qui représentent 80 % des débouchés mondiaux (Europe 30 %, Japon et Amérique du Nord 50 %) (Kahina et al., 2016).

La production mondiale des huiles essentielles est estimée à environ 50 000 tonnes et le marché représente 700 millions de dollars (Verlet et al., 1997), il faut dire que les pays d'Amérique du Sud et d'Asie font partie des plus grands producteurs mondiaux d'huiles essentielles. Plus de 50 % des exportations des huiles essentielles du marché européen sont dominées par quelques pays : l'Allemagne constitue le plus grand marché (20 %), suivi par la France (18 %), le Royaume-Uni (16 %), l'Italie (14 %) et l'Espagne (10 %) qui disposent d'industries de parfumerie, de cosmétique et de détergence. Ce secteur connaît une croissance modérée de l'ordre de 3,5 % par an pour le marché européen (Kahina et al., 2016).

En Afrique, les quantités produites sont très faibles et les besoins sont compensés par des volumes importants importés à travers le monde, excepté l'Afrique du Nord où les pays du Maghreb (Maroc et Tunisie principalement) sont les leaders dans cette région. Les Comores et Madagascar font partie aussi des grands producteurs mondiaux qui exportent leur production (Verlet et al., 1997).

1.7 Domaines d'utilisation des huiles essentielles

En raison de leurs diverses propriétés, les HEs sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance (Rabiai, 2014). En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leurs pouvoirs ; antispasmodique, antidiabétique, analgésique, apéritif, antiseptique, etc. en alimentation par leur activité antioxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriété odoriférante.

1.7.1 Industrie agroalimentaire

Les HEs jouent un rôle capital dans l'aromatisation des aliments. En effet, elles donnent la saveur aux condiments (poivre, gingembre) et aux aromatisants (menthe, anis, oranger, thym, laurier). A faible dose, certaines huiles essentielles ont un effet favorable sur la digestion, ce qui explique leur

utilisation en liquoristerie (essence d'anis ou de badiane). Actuellement l'industrie agroalimentaire utilise les huiles essentielles dans les préparations surgelées non seulement pour rehausser le goût mais aussi pour empêcher les contaminations alimentaires qui se développent (effet antimicrobien) (Toure et al., 2015).

1.7.2 Parfumerie et cosmétologie

Les propriétés odoriférantes des huiles essentielles confèrent à ces dernières une consommation importante en parfumerie et en cosmétique. Elles présentent environ 60 % des matières premières de l'industrie des parfums, des savons et des cosmétiques. Il faut dire qu'en cosmétiques, les huiles essentielles sont aussi utilisées dans la formulation des shampoings et des laits de beauté (Bouamer et al, 2004 ; Bouanane, 2005).

1.7.3 Pharmacie

L'industrie pharmaceutique utilise les huiles essentielles dans le domaine des antiseptiques externes elle tire parti des propriétés bactériostatiques, bactéricides, antifongiques, protectrices, etc., des huiles essentielles. De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de spécialités pharmaceutiques : sirop, gélules et pommade (Bouamer et al., 2004).

1.8 Procédés d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

Dans cette section sera décrite les procédés d'extraction des huiles essentielles en générale, et en particulier ceux de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. En effet plusieurs méthodes sont connues pour extraire les essences aromatiques des végétaux. Le choix de la méthode la mieux adaptée à l'extraction des essences végétales se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire et de l'usage de l'extrait (Lucchesi, 2005), Ainsi différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales dont notamment la distillation par entraînement à la vapeur, l'hydrodistillation, expression à froid, etc.

1.8.1 Distillation par entraînement à la vapeur d'eau

Les méthodes d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînés par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition varie entre 160 à 240 °C et de leur caractère hydrophobe (Lucchesi, 2005).

Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans le vase d'entraînement, l'essence aromatique contenue dans la plante est chauffée, disloquée du tissu végétal et entraînée par la vapeur d'eau. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation. En fonction de sa densité, elle peut être recueillie à deux niveaux : au niveau supérieur du distillat, si elle est plus légère que l'eau, et au niveau inférieur du distillat, si elle est plus dense que l'eau (Neffati, 2010).

1.8.2 Hydrodistillation

L'hydrodistillation est méthode la plus simple et, la plus anciennement utilisée, le principe consiste à porter à ébullition dans un ballon un mélange d'eau et de la biomasse végétale dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient, puis séparées par différence de densité (Bruneton, 1999).

1.8.3 Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur, dans le cas de l'hydrodiffusion, le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau + huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (AFSSAPS, 2008).

1.8.4 Expression à froid

Le principe de l'extraction consiste à rompre les poches à essence par un moyen mécanique, pression, incision ou abrasion à froid. L'huile essentielle mélangée à l'eau cellulaire est séparée par décantation ou centrifugation.

Le procédé classique consiste à exercer sous un courant d'eau, une action abrasive sur la surface des péricarpes des fruits. Après élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau

(Bruneton,1999). L'extraction par expression est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles d'agrumes (citron, orange, bergamote, mandarine, etc.).

1.8.5 Autres méthodes

1.8.5.1 Extraction par solvants

L'extraction par solvant est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera séparé des extraits sur un évaporateur rotatif ou (rotavapeur).

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont : l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone (Kim et al., 2002). Le solvant choisi devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Il faut dire que ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, et bien d'autres substances (AFNOR, 2000). L'extraction par solvant, est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson.

1.8.5.2 Extraction par micro-ondes

Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques (AFSSAPS, 2008). Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale.

Le montage de cette technique se rapproche sensiblement d'un montage d'hydrodistillation classique le réacteur contenant seulement le matériel végétal est chauffé par les micro-ondes à l'intérieur du four, les vapeurs sont ensuite entraînées dans le col de cygne avant d'être condensées dans le réfrigérant puis recueillies dans un essencier. Les graines sont en permanence humides, ce qui ne laisse aucune chance à la réalisation d'éventuelles réactions secondaires, néfastes à la qualité du produit obtenu (Lucchesi, 2005).

1.9 Facteurs de variabilité du rendement d'extraction des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* par hydrodistillation

Comme nous l'avons signalé ci-haut, le rendement d'extraction des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* dépend de deux facteurs ; les facteurs intrinsèques et les facteurs extrinsèques qui sont en liens avec les méthodes d'extractions des huiles essentielles d'Eucalyptus. Et la variation du rendement d'extraction des huiles essentielles d'Eucalyptus par la méthode d'hydrodistillation, dépend des facteurs extrinsèques tels que :

- Le temps d'extraction
- Le ratio matière/solvant
- Le début de condensation
- La pression de travail
- La puissance d'échauffement, etc.

1.10 Méthodes de caractérisation de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

L'importance des huiles essentielles d'*Eucalyptus* dans divers domaines (pharmacie, cosmétique, parfumerie...) suscite l'intérêt de vérifier la qualité de ces derniers. La caractérisation d'une essence d'*Eucalyptus globulus* consiste à :

- Vérifier ses caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, odeur) ;
- Déterminer ses indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction, potentiel d'hydrogène, et indice d'acide) ; et
- Obtenir son profil chimique (composition chimique), et faire une quantification relative des différents constituants de cette essence.

Le tableau 3 présente les propriétés organoleptiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* selon la norme AFNOR NFT 7.

Tableau 3: Propriétés organoleptiques des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus selon la norme AFNOR NFT 7

| Norme AFNOR | Aspect | Couleur | Odeur |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| NFT7 | Liquide limpide, fluide et mobile | jaune très pâle à transparent | fraîche et camphrée |

Le tableau 3 présente l'aspect, la couleur et l'odeur que doit avoir les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*.

1.10.1 Caractéristiques organoleptiques

L'analyse organoleptique de l'huile essentielle d'Eucalyptus consiste à évaluer les propriétés tel que ; l'aspect, l'odeur et la couleur :

a) Odeur

L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habilité des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parviennent à doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'au dix millionnièmes de grammes par litre d'air.

b) Couleur

La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui intensifie la couleur d'une huile donnée.

c) Aspect

L'aspect d'un extrait dépend des produits qui la constituent, qui peuvent nous apparaître sous forme solide ou liquide.

1.10.2 Propriétés physico-chimiques

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) étaient autre fois les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises. (Mohamdi, 2005).

1. Densité

La densité ou la masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume, donc c'est le rapport du poids d'un certain volume d'un corps et le poids du même volume d'un corps de référence (eau).

2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante (AFNOR, 2000).

3. Potentiel d'hydrogène

Le pH mesure l'activité chimique des ions hydrogènes H^+ (appelés aussi protons) en solution, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre.

4. Indice d'acide

C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'huile essentielle. La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc de juger de l'état de détérioration d'une huile essentielle (Mohamdi et al., 2005), etc.

1.10.3 Caractérisation chimique

La caractérisation chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, fait appel à plusieurs méthodes d'analyses qui peuvent être quantitative et qualitative. Ces méthodes permettent de séparer, identifier et quantifier les constituants de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. Parmi ces méthodes on peut citer : les méthodes de séparation et d'identification des constituants.

1.10.3.1 Méthodes de séparation

Les méthodes physiques de séparation sont très nombreuses on peut les classer en deux grands groupes : Chromatographie et électrophorèse. Différentes méthodes chromatographiques sont mises en œuvre pour étudier la composition chimique des huiles essentielles, ce sont la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur colonne (CC), la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie liquide à haute performance (Franchome, 2001).

a) Chromatographie sur couche mince

La CCM est la plus simple des méthodes chromatographiques. La phase stationnaire est constituée d'un matériel absorbant (gel silice, gel de cellulose) étalé sur une plaque de verre, d'aluminium ou

support plastique. La phase mobile liquide nommée éluant est un solvant. Une petite quantité du mélange à séparer est déposée sur la phase stationnaire. Cette dernière est mise en contact avec la phase mobile. La séparation des constituants du mélange à analyser s'effectue grâce à l'ascension de la phase mobile le long de la phase stationnaire. La révélation des molécules est soit par exposition de la plaque sous une lampe UV ou par pulvérisation de divers révélateurs (Arkins et al., 2008).

La formule du rapport frontal est donné par l'équation 1.1 :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}} \quad (1.1)$$

b) Chromatographie sur colonne

C'est une chromatographie d'absorption (liquide-solide), la phase stationnaire est un adsorbant polaire. Elle est constituée de fines particules de silice SiO_2 ou d'alumine Al_2O_3 ces substances ne sont pas très réactives et leurs surfaces sont préparées spécialement pour augmenter leurs capacités d'absorption. La phase mobile est un solvant fluide (Hanaoka, 2000).

La colonne est saturée par les solvants et on verse à son sommet un petit volume de la solution qui contient les solutés. Dès que ce volume a été absorbé on rajoute du solvant. Les solutés descendent lentement dans la colonne et sont élués (en levée par fraction) au bas de la colonne. Au niveau de la phase mobile, les constituants moins polaires seront élués les premiers et les plus polaires les derniers (Arkins, 2008). La migration d'un composé est caractérisée par son volume d'élué dans les conditions précises, c'est-à-dire la quantité de phase mobile qu'il faut utiliser pour faire sortir le composé de la colonne.

c) Chromatographie liquide haut performance (CLHP)

La CLHP utilisée en routine depuis 1975 a réduit en moyenne de 10 fois le temps nécessaire à l'analyse de nombreux composés biochimique. La chromatographie liquide haut performance n'est pas un principe en soi, chaque type de support permet de réaliser une chromatographie dont le

principe est déjà connu et appliqué en pression ambiante. Dans cette technique la phase liquide est envoyée sous pression dans une longue colonne étroite, ce qui donne une excellente séparation en un temps relativement court.

d) Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilisables sans dégradation thermique. Son pouvoir de séparation dépasse celui de toutes les autres techniques, du moins pour les huiles essentielles (Arkins, 2008). La CPG est une technique très répandue. Elle possède plusieurs avantages : sensibilité, polyvalence, possibilité d'automatisation, qui augmente plus son intérêt (Rouessace et al., 2007).

La technique a été perfectionnée et permet maintenant de séparer les constituants des mélanges très complexes contenant jusqu'à 200 composés. Elle s'applique principalement aux composés gazeux, ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition.

1.10.3.2 Analyse spectrale

La plupart des méthodes physiques d'analyse des substances organiques dépendent de l'interaction de la matière avec la lumière électromagnétique (Günther, 1994). Le spectre électromagnétique comme l'indique son nom a des composants électrique, magnétique et couvre une très grande plage d'énergie. Le spectre est généralement divisé en région, les limites entre ces régions ne sont pas précises.

On utilise les propriétés spectrales pour déterminer la structure des molécules et des ions, les techniques utilisées dans l'analyse spectrale sont : l'ultraviolet (UV), l'infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (SM) (Toure et al., 2015).

1.10.3.3 Analyse par couplage CPG/SM

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (SM) est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances (Claudeck, 2002). La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par le biais de la SM.

La combinaison de ces deux techniques d'analyses CPG/SM permet de séparer les composants de l'échantillon et d'identifier chaque composant, donc de faire une analyse complète aussi bien qualitative que quantitative du produit à analyser. Il s'agit de la technique la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielle en raison de la facilité de sa prise en main, de ces performances (Rabiai et al., 2014).

1.11 Travaux antérieurs sur les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*

Aihua et al, (2009) ont effectué une extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* de la Chine, ils ont obtenu un rendement de 0,18 % (Aihua et al., 2009). Bachir et Benali, (2012) ont extrait l'huile essentielle de l'*Eucalyptus globulus* d'Algérie, ils ont eu un rendement de 1,2 % (Bachir et al., 2012), les auteurs Kahima et Siham, (2016) ont travaillé sur l'*Eucalyptus globulus* de la région de Kabylie en Algérie, pour l'extraction de l'huile essentielle l'*Eucalyptus globulus*, ils ont obtenu un rendement de l'ordre de 5,57 % (Kahima et al., 2016).

Pour la présente étude, le rendement d'extraction de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus* a été de 1,20 %. Il faut dire que le rendement d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus*, varie selon de la méthode d'extraction, plus précisément des conditions opératoire (temps d'extraction, ratio matière/solvant, etc.), il est aussi fonction de la zone géographique de récolte, la composition du sol, la période de récolte de la plante, le stade végétatif de la plante, etc. pour la présente étude nous avons varié deux paramètres à savoir le temps d'extraction et le ratio matière/solvant.

Une étude sur la composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a été aussi réalisée par Aihua et al, (2009). Ces derniers ont utilisé l'analyse chromatographique en phase gazeuse pour la séparation des constituants, et l'analyse spectrale massique pour l'identification des divers composés séparés. Ils ont conclu que l'huile essentielle est composée principalement de 1,8-eucalyptol (72,71 %), d' α -pinène (9,22 %), de α -terpinéol (3,1 %), de globulol (2,77 %), d' α -terpinéol (2,54 %), d'acétate de géranyle (0,71 %), d'épiglobulol (0,44 %), de β -pinène (0,4 %), d' α -eudesmol (0,39 %), de L-pinocarveol (0,36 %), de terpinèn-4-ol (0,34 %), de β -sabinène (0,25 %), de linalol (0,24 %) et de terpinolène (0,19 %) (Aihua et al, 2009). Daroui et al., (2010), ont investigués la composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* de la région de Tlemence en Algérie, ils ont trouvé que celle-ci était composée majoritairement de 1,8-cinéole (48,6 %), α -pinène (9,7 %) globulol (10,9 %), transpinocarveol (10,7 %) et α -terpineol (6,6 %) (Daroui et al., 2010).

Dans le cadre de notre travail, nous utiliserons la méthode d'hydrodistillation pour extraire les huiles essentielles d'Eucalyptus. Et dans le but d'optimiser le rendement d'extraction des huiles essentielles d'Eucalyptus, nous allons varier le temps d'extraction et le ratio matière/solvant.

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel

2.1.1 Echantillon et préparation de l'échantillon

Le matériel végétal qui a fait l'objet de la présente étude était constitué des feuilles d'*Eucalyptus globulus* récoltées au mois de septembre 2020 dans une ferme se trouvant dans la commune Annexe précisément dans le quartier Naviundu. L'échantillon était constitué de 1,5 Kg des feuilles d'*Eucalyptus globulus*. Les matériels utilisés pour la récolte et la préparation de l'échantillon sont :

- Echafaudage maçon,
- Machette,
- Sac,
- Mortier, et
- Tamis de 1 mm.

Après récolté, l'échantillon a été préparé de la manière suivante :

- Mondation : cette opération a consisté à débarrasser l'échantillon des parties inutiles (feuilles mortes et feuilles sèche) afin de garder seulement des jeunes feuilles ou des feuilles âgées en maturité.
- Broyage : cette opération a été faite sur une partie de l'échantillon c'est-à-dire 500 g, afin de préparer ce dernier aux analyses phytochimique (criblage chimique).

La figure 5 illustre les échantillons d'Eucalyptus, un échantillon pour l'extraction des huiles essentielles et un autre pour le test phytochimique.



Figure 5: Photographie des feuilles d'*Eucalyptus* préparées pour l'extraction des huiles essentielles et le broyat des feuilles d'*Eucalyptus* pour le test phytochimique

2.1.1.1 Identification botanique de l'échantillon d'*Eucalyptus globulus*

L'identification botanique du matériel végétal a été faite avec logiciel de botanique Plantnet et confirmé par le moteur de recherche Google chrome. Avec le logiciel Plantnet, l'identification botanique a consisté à la reconnaissance de l'espèce grâce à une photographie de ces feuilles (Figure 6).

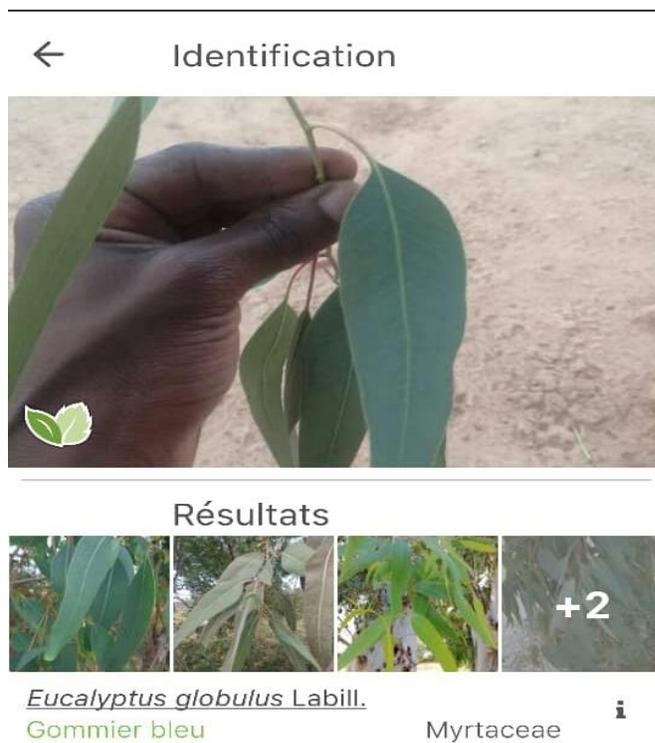


Figure 6: Photographie d'identification botanique des feuilles d'*Eucalyptus globulus*

2.1.2 Matériel et Réactif utilisés pour la caractérisation des feuilles d'*Eucalyptus*

2.1.2.1 Matériel

- Mortier,
- Tamis de 1 mm,
- Plaque chauffante,
- Réfrigèrent à boule,
- Four,
- Capsule en porcelaine,
- Dessiccateur,
- Tube à essai, et
- Papier filtre

2.1.2.2 Réactifs

- Ethanol,
- Méthanol,

- Acide chlorhydrique,
- Chloroforme anhydre,
- Copeau de magnésium.
- trichlorure de fer,
- Hydroxyde de sodium,
- Anhydre acétique
- Acide sulfurique, et
- di-iode ou lugol.

2.1.3 Matériels et réactifs pour l'extraction des huiles essentielles

2.1.3.1 Matériel

- Thermomètre,
- Colonne de distillation,
- Chauffe-ballon,
- Réfrigérant,
- Eprouvette gradué,
- Réservoir d'eau,
- Ballon monocol, et
- Réfrigérant.

2.1.3.2 Réactif

- Sulfate de sodium (Na_2SO_4)

2.1.4 Matériel et réactifs pour la caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle

2.1.4.1 Matériel

- pH-mètre,
- Balance analytique,
- Refractomètre,
- Burette graduée,
- Ballon de 250 ml,
- Réfrigérant, et
- Bain marie.

2.1.4.2 Réactifs

- Acide chlorhydrique,

- Ethanol à 99 %,
- Phénolphtaléine, et
- Potasse alcoolique.

2.2 Méthodes

2.2.1 Caractérisation des feuilles d'Eucalyptus

a) Taux d'humidité

La teneur en eau est déterminée par dessiccation d'un échantillon de 3 g à la température de 105 °C dans une étuve pendant 24 heures. Le taux d'humidité est défini comme étant la perte de poids subie lors de la dessiccation.

La détermination de la teneur en eau était faite par le calcul de la différence de poids avant et après la dessiccation selon l'équation 2.1 :

$$\% H = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} * 100 \quad (2.1)$$

Avec :

% H : Taux d'humidité,

M₀ : Poids de la capsule vide,

M₁ : Poids de la capsule + échantillon avant dessiccation, et

M₂ : Poids de la capsule + échantillon après dessiccation.

b) Teneur en cendre

Le principe a consisté en une minéralisation par calcination de l'échantillon à 600 °C dans un four à moufle pendant 5 heures. La perte de masse par combustion correspond à la quantité de la matière organique (Audige, 1978).

La détermination de la teneur en matière organique a été faite par le calcul de la différence de poids avant et après la carbonisation. La teneur en matière organique a été donnée par l'équation 2.2

$$\% \text{ Cendre} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \quad (2.2)$$

Avec :

% Cendre : Teneur en matière organique,

M₀ : Masse en gramme de la capsule vide,

M₁ : Poids de la capsule et de l'échantillon avant incinération, et

M₂ : Poids de la capsule et de l'échantillon après incinération.

2.2.1.1 Analyse phytochimique

Avant de mettre en évidence les principes actifs se trouvant au sein de la plante d'*Eucalyptus*, les extraits aqueux et Méthanolique ont été préparés pour les tests ultérieurs :

a) extrait aqueux : 50 g de matériel végétal ont été mis en contact avec 300 ml d'eau dans un ballon monocol surmonté d'un réfrigérant. L'ensemble a été porté à reflux pendant une heure. Le mélange a été filtré et l'extrait aqueux a été soumis aux différents tests.

b) extrait Méthanolique : La plante pulvérisée en poudre (50 g), a subi une macération dans un mélange des solvants : Méthanol / eau 80/20 (v/v) pendant 24 heures, puis on a filtré et ensuite on a recueilli le filtrat en suite on répète une seconde fois ce procédé. Les diverses fractions récupérées ont été réunies et évaporées sous pression réduite sur le rotavapeur à une température de 40 °C.

La mise en évidence des principes actifs, a consisté à la détection des flavonoïdes, tanins, stéroles, composés réducteurs, amidon, saponosides, au sein de l'échantillon d'*Eucalyptus*.

1. Flavonoïdes

La méthode de Utshudi et al., (2003) a été utilisée pour détecter les flavonoïdes présentes dans l'échantillon d'*Eucalyptus*. La réaction de détection des flavonoïdes a consisté à traiter 5 ml de l'extrait éthanolique avec 1 ml d'HCl concentré et 0,5 g de tournure (ou copeau) de magnésium. La présence des flavonoïdes a été mise en évidence avec l'apparition d'une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes.

Le changement de coloration :

- Virage au rouge (flavanones)
- Virage au rouge pourpre (flavonols)
- Rouge violacée (flavanones et flavonols)

2. Tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait éthanolique 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire (tanins galliques), vert ou bleu-verte (tanins catéchiques). (Karumi et coll, 2004).

Stérols et stéroïdes

On a évaporé 2,5 ml d'extrait alcoolique, puis traiter le résidu obtenu avec 2,5 ml de Chloroforme anhydre. Ensuite on a mélangé 1,25 ml de la solution chloroformique avec 1,25 ml d'anhydre acétique et on y a ajouté quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, ce mélange a été agité puis Laisser au repos, l'apparition d'une coloration violacée a été l'indicateur de la présence de stérols (Amini et al., 2010).

4. Composés réducteurs

Leur détection a consisté à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 10 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer le mélange. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (Dohou, 2015).

5. Amidon

On a Chauffé 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition ; on y ajouter le réactif d'amidon eau iodée ou lugol. L'apparition d'une coloration bleu violacée a été l'indicateur la présence de l'amidon (Senhaji et al., 2005).

6. Saponosides

Les saponosides sont caractérisés par un l'indice de mousse. Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, après l'agitation, le mélange est abandonné pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée (Bruneton, 2009) :

- Apparition de la mousse = test positif
- Pas de mousse = test négatif

2.2.2 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

Le principe a consisté à porter à ébullition dans un ballon un mélange d'eau et de la biomasse végétale dont on souhaitait extraire l'huile essentielle. Sous l'action de la température, les cellules végétales éclatent en libérant les molécules odorantes, lesquelles sont entraînées par la vapeur d'eau. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis récupérer dans un récipient, ensuite séparées par différence de densité. La figure 7 illustre le montage expérimental de l'hydrodistillation



Figure 7: Montage expérimentale de l'hydrodistillation des huiles essentielles d'Eucalyptus

La méthode de Yacouba et Tlidjane. (2018), a été utilisé avec une légère modification, pour extraire les huiles essentielles d'Eucalyptus. L'opération a consisté à introduire une masse végétale 80 g dans un ballon en verre de 500 ml, on y a ajouté une quantité suffisante d'eau, en suite le mélange

a été portée à l'ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. L'huile essentielle obtenue a été par la suite récupérée puis séchée par un déshydratant, le sulfate de sodium pour éliminer le peu d'eau susceptible d'être en trace au sein de celle-ci.

Pour extraire les huiles essentielles d'Eucalyptus, nous avons variés deux paramètres, à savoir le temps d'extraction et le ratio matière/solvant. Le tableau 4 présente les paramètres variés et les niveaux de variation pour chaque paramètre.

Tableau 4: Paramètres étudiés et niveaux des variations

| Paramètres | Niveau | | |
|------------------------------|-----------|----------|-------|
| Temps d'extraction (minutes) | 60 | 90 | 120 |
| Ratio matière/solvant | 1 : 3,125 | 1 : 3,75 | 4,375 |

2.2.2.1 Conditions opératoires

L'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* a été réalisée en variant le temps d'extraction et le ratio matière/solvant. Premièrement nous avons commencé par déterminer le temps optimal d'extraction de l'huile essentielle, ensuite à partir de ce temps, nous avons optimisé le ratio matière/solvant. C'est-à-dire que nous avons déterminé le ratio qui nous a donné le meilleur rendement d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. Le tableau 5 et le tableau 6 présentent les conditions opératoires des essais d'hydrodistillation.

Tableau 5: Conditions opératoires de l'optimisation du temps d'extraction des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*

| Essai | Temps d'extraction (min) | Ratio matière/solvant |
|-------|--------------------------|-----------------------|
| 1 | 60 | 1 : 3,125 |
| 2 | 60 | 1 : 3,75 |
| 3 | 60 | 1 : 4,375 |
| 4 | 90 | 1 : 3,125 |
| 5 | 90 | 1 : 3,75 |
| 6 | 90 | 1 : 4,375 |
| 7 | 120 | 1 : 3,125 |

| | | |
|----------|-----|-----------|
| 8 | 120 | 1 : 3,75 |
| 9 | 120 | 1 : 4,375 |

Comme nous l'avons signifié ci-haut, après avoir trouvé le temps optimal d'extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus, ceci nous a amené à déterminer le ratio matière/solvant permettant de récupérer la grande partie des fractions des huiles essentielles contenues dans les feuilles d'Eucalyptus. Le tableau 6 présente les conditions opératoires réalisées pour l'optimisation du ratio matière/solvant.

Tableau 6: Conditions opératoire de l'optimisation du ratio matière/solvant

| Essai | Temps d'extraction (min) | Ratio matière/solvant |
|--------------|---------------------------------|------------------------------|
| 1 | 120 | 1 : 5 |
| 2 | 120 | 1 : 5,625 |
| 3 | 120 | 1 : 6,25 |

Après avoir trouvé le temps optimal et le ratio optimal, nous sommes passé à la cinétique d'extraction, pour pouvoir confirmer le temps optimal d'extraction. Les résultats de la cinétique d'extraction seront décrits dans les lignes qui suivent.

2.2.3 Caractérisation des huiles essentielles d'Eucalyptus

2.2.3.1 Caractérisation organoleptique

La caractérisation organoleptique des huiles essentielles d'*Eucalyptus* a consisté à évaluer ; l'aspect, la couleur et l'odeur, en utilisant les sens.

3.2.3.2 Caractérisation physico-chimique

La caractérisation physico-chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus* a consisté à déterminer les indices physico-chimiques des huiles essentielles d'*Eucalyptus* :

1. Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une matière, est un nombre qui caractérise le pouvoir qu'à une matière, à ralentir ou à dévier la lumière. La détermination de l'indice de réfraction a été faite de la manière suivante :

Etalonner l'appareil à l'aide d'une substance (eau distillée) d'indice de réfraction connu 1,33 à la température fixée à 20°C, nettoyer les prismes et déposer quelques gouttes d'huile essentielles d'*Eucalyptus* entre les deux faces des prismes, Regarder dans l'oculaire et tourner le bouton de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule, noter la valeur de l'indice par l'échelle de lecture. (AFNOR, 2000). Etant donné que la détermination de l'indice de réfraction était faite à une température différente de 20 °C, on a effectué la correction par le biais de la formule 2.3 :

$$n^{20} = n^T + 0,00045 * (T - 20 \text{ }^\circ\text{C}) \quad (2.3)$$

Avec :

n^{20} : indice de réfraction à 20 °C

n^T : indice de réfraction à une température différente de 20 °C

T : température à l'instant de la mesure

0,00045 : constante d'indice de réfraction lorsque la température varie

2. Densité

La densité est une grandeur physique qui caractérise la masse d'une huile essentielle par unité de volume. La masse ainsi que le volume des huiles essentielles ont été déterminés par la pesée de 1 ml de l'huile essentielle à l'aide d'une balance analytique de précision à une température définit. Ainsi la densité était calculée selon l'équation 2.4 :

$$d^{20} = d\theta + 0,0006(\theta - 20 \text{ }^\circ\text{C}) \quad (2.4)$$

Avec :

d^{20} : densité relatif de l'huile essentielle (densité à 20 °C)

$d\theta$: densité à la température de la mesure

θ : température de mesure

0,00068 : constante de la variation de la densité quand la température varie de 1 °C

3. pH

Pour la mesure du pH on a utilisé le pH-mètre

4. Indice d'acide

L'indice d'acide est le nombre de milligramme de KOH nécessaire pour neutralisation les acides gras libres contenus dans un gramme d'huile essentielle (Rabiai et al., 2014). La détermination de l'indice d'acide se fait de la manière ci-dessous :

Introduire 0,2 g de l'huile essentielle d'Eucalyptus dans l'erenmeyer propre et sec, ajouter 5 ml d'éthanol mettre 3 gouttes de phénolphtaléine puis neutraliser la solution obtenue avec l'hydroxyde de potassium. Arrêter le titrage de que la couleur de la solution variée (change de coloration). A la fin de titrage, lire le volume de KOH consommé.

L'indice d'acide est calculé par l'équation 2.5 :

$$I_A = \frac{56,1 * N * V}{M} \quad (2.5)$$

Avec :

I_A : Indice d'acide

N : Normalité de de l'hydroxyde de potassium

V : Volume de l'hydroxyde de potassium consommé

M : Masse de l'huile essentielle utilisée

5. Indice de saponification

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH), nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et saponifier les acides gras combinés (esters) présents dans un gramme de l'huile essentielle. L'indice de saponification a été réalisé de la manière suivante :

Peser 2 g de l'huile essentielle à analyser que l'on introduit dans un ballon rond puis y ajouter 6 ml du mélange éthanol-éther de pétrole (1 :1), et 25 ml de la potasse alcoolique 0,5 N, porter le mélange à l'ébullition sur un bain marie pendant 1 heure. Titrer le mélange avec l'acide chlorhydrique 0,5 N, effectuer parallèlement l'essai à blanc.

L'Indice de Saponification est calculé selon l'équation 2 .6 :

$$I_S = \frac{(V_0 - V_1) * N * 56,1}{M} \quad (2.6)$$

Avec :

V_0 : Volume en ml de HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

V_1 : Volume en ml de HCl utilisé pour l'échantillon à analyser ;

N : la normalité de la solution d'acide chlorhydrique 0,5 N ; et

M : Masse de la prise d'essai en gramme.

6. Indice d'esther

L'indice d'esther est le nombre en mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérées par hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'huile essentielle.

L'indice d'esther est calculé par l'équation 2.7 :

$$I_E = I_S - I_A \quad (2.7)$$

Avec :

I_E : Indice d'esther,

I_S : Indice de saponification,

I_A : Indice d'acide.

7. Indice d'iode

L'indice d'iode d'un corps est la masse d'iode, exprimée en gramme, que l'on peut fixer par addition sur 100 grammes de l'huile essentielle. Il permet d'évaluer le degré d'insaturation des acides gras, contenus dans les huiles essentielles. L'indice d'iode a été déterminé de la manière suivante :

Peser 0,2 g de l'huile essentielle d'Eucalyptus, le mettre dans un erlenmeyer propre et sec, ajouter 15 ml de tétrachlorure de carbone et 15 ml de Monochlorure de carbone, agiter le mélange et laisser reposer pendant 1 heure. Ajouter 20 ml d'iodure de potassium à 10 % et 150 ml d'eau distillée, Titrer avec la solution de thiosulfate de sodium à 0,1 N jusqu'à ce que la couleur jaune due à d'iode ait presque disparu. Ajouter quelques gouttes d'empois d'amidon et poursuive le titrage jusqu'à la disparition de la couleur bleu violette, la solution devient alors transparente. Effectuer de la même façon un essai à blanc. L'indice d'iode est donné par l'équation 2.8 :

$$I_I = \frac{N * (V - V_0) * 12,69}{M} \quad (2.8)$$

Avec :

I_I : Indice d'iode

V : volume de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc en ml ;

V_0 : volume de thiosulfate de sodium utilisé pour titrer l'excès d'iode en ml ;

N : normalité de thiosulfate de sodium ;

12,69 : masse d'iode correspondant à 1ml de thiosulfate de sodium pour 100 g de l'huile essentielle ;

M : Masse de l'huile essentielle utilisé.

CHAPITRE 3 : PRESENTATION DES RESULTATS ET DISCUSSION

Les objectifs de ce travail étaient d'optimiser le rendement d'extraction des huiles essentielles d'Eucalyptus, caractériser les feuilles d'Eucalyptus et faire une caractérisation physico-chimique des huiles essentielles d'Eucalyptus. Dans ce chapitre nous présentons les résultats expérimentaux obtenus au cours des essais, l'interprétation et la discussion de ces résultats.

3.1 Résultats de la caractérisation des feuilles d'Eucalyptus

Les résultats du taux d'humidité et de la teneur en cendre sont présentés dans le tableau 7

Tableau 7: Résultats du taux d'humidité et de la teneur en cendre des feuilles d'Eucalyptus globulus

| Espèce végétale | Taux d'humidité (%) | Teneur en cendre (%) |
|---------------------|---------------------|----------------------|
| Eucalyptus globulus | 15 | 9,65 |

Il ressort du tableau 7 que le taux d'humidité des feuilles d'Eucalyptus a été de 15 % et la teneur en cendre 9,65 %. Ces résultats sont accords avec les données de la littérature et également en accords aux résultats rapportés par la pharmacopée européenne qui prévoit les valeurs du taux d'humidité comprises entre 12 à 15 %, et les valeurs de la teneur cendrent comprises entre 10 à 12 %.

Les résultats de l'analyse phytochimique effectuées sur la partie de l'échantillon séché et pulvérisé, sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8: Résultats de l'analyse phytochimique sur les feuilles d'Eucalyptus

| Espèce végétal | Flavonoïdes | Tanins | Stéroles et steroïdes | Composés réducteurs | Amidon | Saponosides |
|----------------|-------------|--------|-----------------------|---------------------|--------|-------------|
| Eucalyptus | + | + | + | - | + | - |

Légende : + : Présence de l'élément, - : Absence de l'élément

L'analyse des données du tableau 8 montre que l'échantillon d'*Eucalyptus*, contient : les flavonoïdes, les tanins, les stéroles, ne contient pas les composés réducteurs, contient également

l'amidon et les saponosides. Ces principes actifs mise en évidence, confèrent les propriétés thérapeutiques aux feuilles d'eucalyptus ainsi qu'aux extraits de ces derniers (Sofowora, 2010).

3.2 Extraction de l'huile essentielle

Comme nous l'avons signifié dans les lignes précédentes, pour la présente étude nous avons varié deux paramètres le temps d'extraction et le ratio matière/solvant. Le tableau 9 présente les résultats obtenus pour l'optimisation du temps d'extraction des huiles essentielles d'Eucalyptus.

Tableau 9: Résultats de l'optimisation du temps d'extraction des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*

| Essai | Temps d'extraction (min) | Ratio matière/solvant | Rendement d'extraction (%) |
|-------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | 60 | 1 : 3,125 | 0,42 |
| 2 | 60 | 1 : 3,75 | 0,53 |
| 3 | 60 | 1 : 4,375 | 0,57 |
| 4 | 90 | 1 : 3,125 | 0,50 |
| 5 | 90 | 1 : 3,75 | 0,68 |
| 6 | 90 | 1 : 4,375 | 0,97 |
| 7 | 120 | 1 : 3,125 | 1,10 |
| 8 | 120 | 1 : 3,75 | 1,12 |
| 9 | 120 | 1 : 4,375 | 1,14 |

- Expression du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus a été calculé à l'aide l'équation 3.1

$$Rdt = \frac{M_1}{M_0} * 100 \quad (3.1)$$

Avec :

Rdt : Rendement d'extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus ;

M₀ : Masse de la matière végétale utilisé (feuille d'Eucalyptus) ;

M₁ : Masse de l'huile essentielle obtenue.

3.2.1 Influence du temps d'extraction sur le rendement de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

Le temps d'extraction ou la durée d'extraction correspond au temps nécessaire au solvant pour pénétrer dans la matière végétale et extraire la totalité des huiles essentielles. Ce paramètre dépend donc de la matière végétale et ainsi que de sa structure.

Dans ce contexte, afin d'étudier l'influence de ce paramètre et d'optimiser le rendement d'extraction des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, trois séries des essais ont été réalisés pour trois durées différentes d'extraction (60 minutes, 90 minutes et 120 minutes), (Tableau 9). Ainsi nous avons retenus les meilleurs rendements pour chaque série d'essais. Les résultats sont présentés sur la figure 8

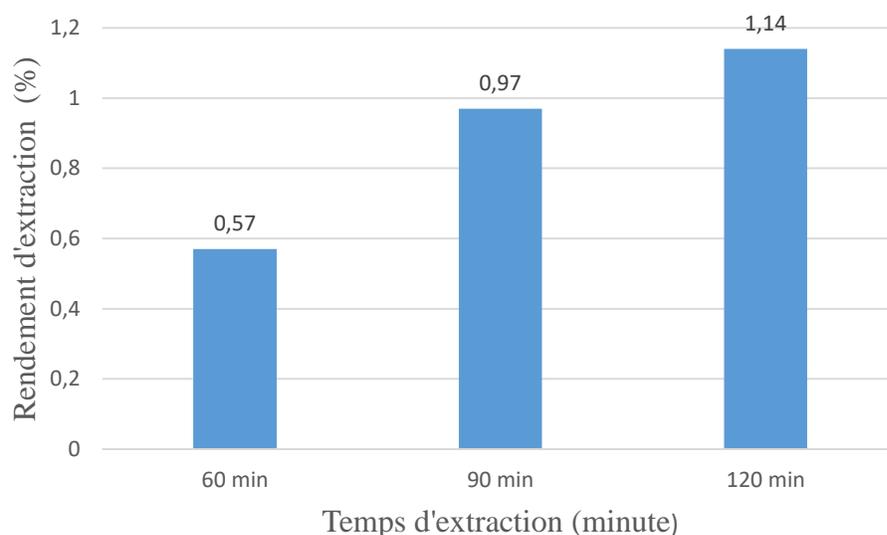


Figure 8: Optimisation de la durée de distillation

L'analyse de la figure 8 révèle que le rendement d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* est proportionnel à la durée de l'hydrodistillation, c'est-à-dire que quand la durée de distillation augmente, le rendement d'extraction de l'huile essentielle augmente également. Et pour la présente étude, le meilleur rendement a été obtenu à 120 minutes.

3.1.2 Optimisation du rapport matière/solvant ou (ratio soluté/solvant)

Le rapport matière/solvant ou ratio soluté/solvant, correspond à la quantité des feuilles d'Eucalyptus utilisées pour un volume donné de solvant (eau). Autrement dit ce rapport représente le volume de solvant par unité de masse des feuilles d'*Eucalyptus*. Le tableau 10 et la figure 9 présente les ratios matière/solvant obtenu pour la durée optimale de 120 minutes.

Tableau 10: Résultats de l'optimisation du ratio matière/solvant

| Essai | Temps d'extraction (minutes) | Ratio matière/solvant | Rendement d'extraction (%) |
|-------|-------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1 | 120 | 1 : 5 | 1,15 |
| 2 | 120 | 1 : 5,625 | 1,17 |
| 3 | 120 | 1 : 6,25 | 1,20 |

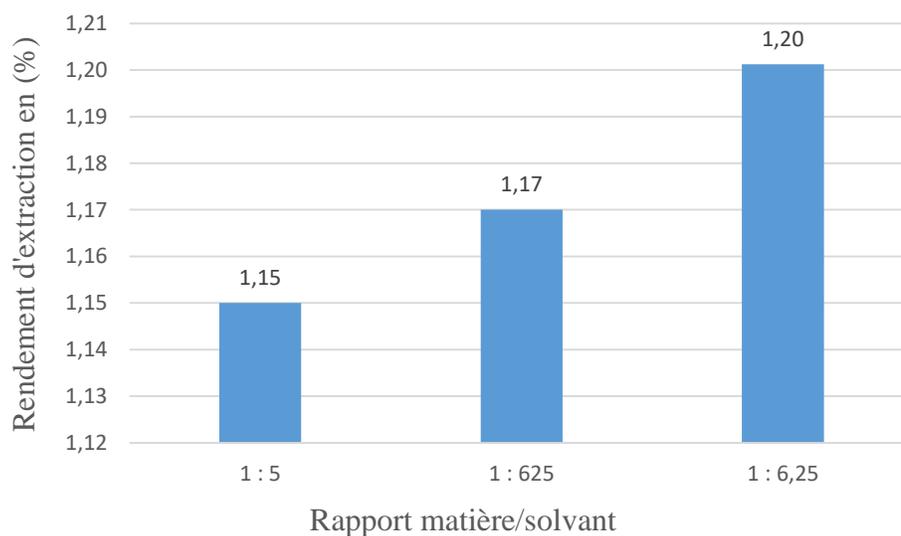


Figure 9: Influence du ratio matière/solvant sur le rendement d'extraction des huiles essentielles d'Eucalyptus

Le ratio matière/solvant influence le rendement d'extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus, le meilleur rendement d'extraction de l'huile essentielle d'eucalyptus 1,20 % a été obtenu avec le ratio 1 : 6,25.

3.2.3 Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus

Pour voir comment évolue la vitesse d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* au cours du temps, nous sommes passés à la cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* (figure 10), ceci nous a permis de voir suivre l'évolution de la masse d'huile extraite cumulée en fonction du temps.

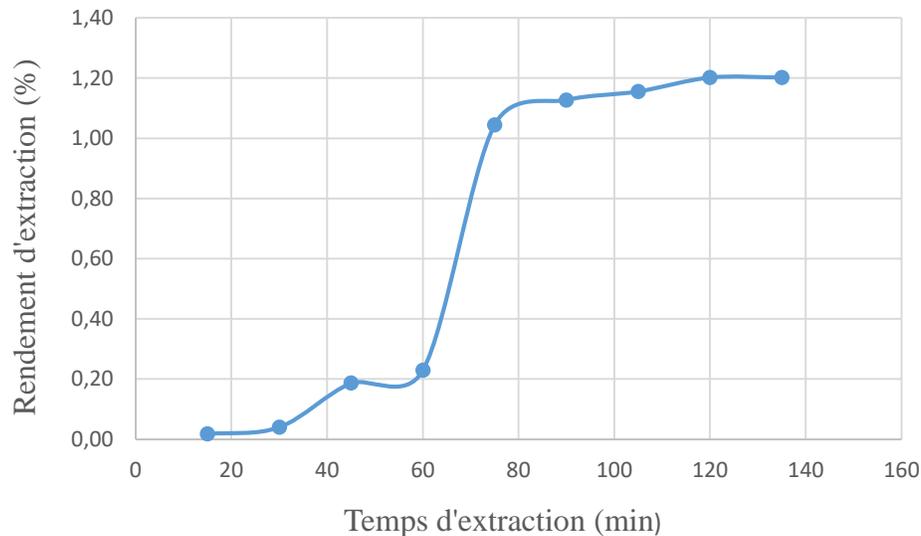


Figure 10: Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'Eucalyptus

La figure 10 représente la variation de la masse cumulée de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* en fonction du temps, d'après l'allure de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle, on peut distinguer trois différentes parties d'extraction :

- La première partie (de 0 jusqu'à 60 min) de l'extraction, c'est la phase de fluctuation de l'extraction, ici l'extraction se fait d'une manière plus lente et variable ;
- La deuxième partie (de 60 jusqu'à 105 min) de l'extraction, c'est la phase d'accélération où l'extraction est rapide et ici l'extraction est représentée par une courbe ;
- Et la dernière phase (105 jusqu'à 135 min), la courbe tend vers un palier qui correspond à l'épuisement de l'huile dans les feuilles et à la fin de l'extraction.

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* est trop variable, pour la présente étude, le meilleur rendement d'huile essence d'Eucalyptus a été de 1,20 % ce qui est supérieur au

rendement rapporté par Leila et *al.*, (2012) sur cette plante. Qui ces derniers ont trouvé un rendement de l'huile d'extraction égale à 0,11 %. Toujours sur cette même plante, Les auteurs Ghenaiet et *al.*, (2016), ont rapporté un rendement d'extraction de 2,08 %, ce dernier est de loin supérieur à celui obtenu par la présente étude. Par ailleurs Baid et *al.*, (2012) ont mentionné un rendement d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* 2,51 % supérieur à celui obtenu par la présente étude. L'*Eucalyptus* a été l'objet des investigations sur l'extraction de l'essence végétal contenu dans cette plante, les auteurs Foudil et Aoumeur (2016) ont signalés un rendement d'extraction de 0,33 %, qui ce dernier est inférieur au rendement d'extraction obtenu par la présente étude.

Dans ce travail, nous avons varié le temps d'extraction et le ratio matière/solvant, et le rendement obtenu a été de 1,20 %, un rendement moyen par rapport aux rendements rapportés dans la littérature. Il faut dire que d'une manière générale, les plantes aromatiques et en particulier l'*Eucalyptus globulus* ne contient pas beaucoup d'huile essentielle. Et la littérature nous renseigne que la quantité d'huile essentielle de l'*Eucalyptus globulus* dépend aussi de l'organe de la plante à laquelle on extrait l'huile (feuille, fleur, tige, racine, etc.).

Nous retenons que la variation du rendement d'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* dépend de plusieurs facteurs : la zone géographique de récolte, la composition du sol, la période de récolte, le stade végétatif de la plante, la méthode d'extraction de l'essence végétale. (Toure et al, 2015) et pour la présente étude, l'hydrodistillation dépend de facteurs tels que : le temps d'extraction, le ratio matière/solvant, le début de condensation, etc.

3.3 Analyse organoleptique

Selon (AFNOR, 2000), les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencient des huiles dites fixes (huile végétales). Il faut dire que les huiles essentielles sont plus au moins colorées et leur densité est inférieure à celle de l'eau.

Les paramètres organoleptiques de notre huile essentielle d'*Eucalyptus*, aspect, couleur, odeur sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11: Analyse organoleptique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*

| | Aspect | Couleur | Odeur |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Norme AFNOR NFT 7 | Liquide limpide, fluide et mobile | jaune très pâle à transparent | fraîche et camphrée |
| Huile essentielle d'<i>Eucalyptus</i> | Liquide limpide | Jaune Claire | Forte et camphrée |

L'huile essentielle produite est conforme à la norme AFNOR NFT 7, la figure 11 illustre la couleur de l'huile essentielle obtenu après séparation de la phase aqueuse et la phase organique.



Figure 11: Couleur de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* obtenue après séparation des phases

3.4 Analyses physico-chimiques

Les propriétés organoleptiques et la caractérisation physico-chimique constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle. Les résultats des analyses physico-chimiques de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus sont consignés dans le tableau 12

Tableau 12: Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus

| Propriété | Valeur pratique | Référence (AFNOR) |
|--------------------------|-----------------|-------------------|
| Densité à 20 ° C | 0,876 | 0,905-0,921 |
| pH | 4,60 | 4-6 |
| Indice de réfraction | 1,475 | 1,460-1,476 |
| Indice d'acide | 1,316 | 0,84-3,74 |
| Indice de saponification | 8,051 | |
| Indice d'ester | 6,432 | |

D'après le résultat obtenu pour la caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus (tableau 12), nous pouvons dire ce qui suit :

- La densité relative (densité à 20 ° C) constitue un critère très important pour évaluer la qualité d'une huile essentielle dans différents domaines (cosmétique, pharmacie, agroalimentaire, etc.). Elle peut facilement donner un aperçu sur la naturalité des produits ainsi que l'altération de ces derniers. La valeur obtenue pour notre huile essentielle d'Eucalyptus est en accord aux normes AFNOR NFT 7, et également en accord à la valeur rapportée par les auteurs (Kahina et al., 2016).
- L'indice de réfraction est considéré comme l'un de critère de pureté d'huile essentielle (hellal, 2011), il varie en fonction de la température à laquelle l'analyse est faite. Il faut dire que dans les huiles essentielles l'indice de réfraction dépend aussi de la composition chimique de ces derniers, essentiellement de la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice de réfraction élevé. Plus l'indice de réfraction est faible, plus l'huile est pure, donc plus qu'il est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande (Kanko, 2014). Dans le cas de notre huile essentielle, la valeur de l'indice de réfraction est comprise dans la fourchette de valeur établit par la norme AFNOR.

- L'indice d'acide est un bon indicateur pour déterminer l'altération d'une huile essentielle, c'est-à-dire qu'il permet de vérifier la qualité d'une huile essentielle, notamment en ce qui concerne sa dégradation avec le temps durant son stockage (Rabiai, 2014). L'indice d'acide nous renseigne également sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations, notamment l'oxydation. Il faut dire que pour une huile essentielle, une faible valeur de l'indice d'acide caractérise la pureté et la stabilité de l'huile à température ambiante (Tchiégang et al., 2003). Notre huile essentielle renferme une faible valeur de l'indice d'acide, qui cette dernière est comprise dans la plage des valeurs de l'indice acide établit par l'AFNOR

CONCLUSION

Les objectifs de ce travail étaient d'optimiser le rendement d'extraction et de caractériser les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*. Pour ce faire, des essais d'extraction par hydrodistillation et de caractérisation physico-chimiques des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* ont été réalisés au laboratoire, précédé par une caractérisation phytochimique des feuilles d'*Eucalyptus*. Le temps d'extraction et le ratio matière/solvant ont été étudiés au cours de l'hydrodistillation,

La caractérisation phytochimique réalisée sur les extraits des feuilles d'*Eucalyptus*, nous a indiqué la richesse de cette plante en flavonoïdes, tanins, stéroles, etc. cette richesse en composés bioactifs confère à cette plante une activité thérapeutique. Le rendement optimal d'extraction de l'huile essentielle, a été de 1,20 % pour le ratio de 1 : 6,25 obtenu à 120 minutes.

La caractérisation organoleptique (aspect, couleur et odeur) de notre huile nous a conduit à des valeurs conformes à la norme AFNOR NFT 7 et ces valeurs sont en accord avec celles retrouvées dans la littérature. L'analyse physico-chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* a permis de mettre en évidence la qualité de celle-ci à partir des indices physico-chimiques de cette huile (indice de réfraction, densité, pH, indice d'acide, indice de saponification, indice d'ester et indice d'iode).

En effet, les valeurs de la densité, du pH et de l'indice de réfraction de notre huile, respectivement 0,876 ; 4,60 et 1,475 sont dans l'intervalle de la norme AFNOR NFT 7 certifiant la pureté des huiles essentielles d'*Eucalyptus*. En termes de la stabilité, l'huile essentielle obtenue présente un indice d'acide faible de l'ordre de 1,316 ce qui traduit la stabilité de cette huile sur la plan d'oxydation, donc on peut dire que l'huile essentielle obtenue est stable et d'une bonne qualité.

Afin de mettre en valeur l'exploitation de cette huile dans le domaine cosmétique, thérapeutique, et en parfumerie, ces résultats peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies envisagées par les perspectives proposées :

- Il sera mieux d'extraire de l'huile dans d'autres organes de cette plante (dans les écorcés, racines et fruit), afin de comparer le rendement d'extraction de l'huile essentielle dans ces organes ;
- Il est très intéressant de déterminer la composition chimique de cette huile, et d'évaluer l'activité antimicrobienne de celle-ci sur des souches microbiennes (bactérie, champignons

et virus), pour voir comment cette huile peut être utilisée à des fins pharmaceutiques et cosmétiques ;

- Il est souhaitable d'utiliser la méthode d'extraction par solvant pour extraire de l'huile essentielle des feuilles d'Eucalyptus, afin de comparer les rendements d'extraction entre l'hydrodistillation et l'extraction par solvant.

REFERENCES

Adoumou H., Yedomonham K., 2012. Etudes ethnobotanique des plantes médicinales vendues sur le marché d'Abomey-Calavi au Bénin, Mémoire de master, Université d'Abomey-Calavi, Benin.

AFNOR, 2000. Huiles essentielles : Monographies relatives aux huiles essentielles, Ed 6, Tome 2, Paris.

AFSSAPS, 2008. Recommandations relatives aux critères de la qualité des huiles essentielles. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Ed Saint-Denis, p.12

Amini R, 2010. Analyse chimique et activité bactérienne de trois plantes médicinales antituberculeuses à Kisangani ; Monographie inédite, faculté des sciences, Université de Kisangani, p.24-25.

Arkins. J, 2008. Principes de chimie, DEBOCK.

Audige C., Figarella J., Zonszain F., 1978. Manipulation d'analyse biochimique, Ed Doin, Paris, p.247.

Baliza, 2002. Caractérisation des huiles essentielles des trois plantes aromatiques : *Hiptys Spicegera*, *Pluchea Ovalis* et *Laggera Aurita*, Mémoire DES, p.13

Basma A., Asrar A., Bodoor M., 2013. Extraction of Oil from *Eucalyptus Camadulensis* Using Water Distillation Method. Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering Vol.1 4, n°2, p.7- 12

Bazizi M., 2017. Extraction d'huile essentielle de l'espèce végétale *salvia officinalis* L. par hydrodistillation : caractérisation physico-chimique et modélisation paramétrique, Mémoire de master, Université Badji Mokhtar –Annaba

Basma A., Asrar A., Bodoor M., 2013. Extraction of Oil from *Eucalyptus Camadulensis* Using Water Distillation Method. Iraqi Journal of Chemical and Petroleum Engineering Vol.1 4, n°2, p.7- 12

- Bechaalany P., 2005. L'utilisation des huiles essentielles dans les affections inflammatoires en complément du traitement ostéopathique. European School of Animal Osteopathy, p.10-11
- Bouamer A., Bellaghy M., 2004. Etude comparative entre l'huile essentielle de la menthe verte et la menthe poivrée de la région de Ouargla, Mémoire DES, Université Ouargla
- Bouanane N., Boussehel N., 2005. Contribution agroécologie aux essais d'introduction de la menthe poivrée (menthe piperata L) dans la région de Ouargla en vue de l'utilisation de ses huiles essentielles en thérapie, Mémoire de fin d'étude, Université Ouargla, p.22- 28
- Bruneton J., 2009. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales, Ed Lavoisier Technique & Documentation, p.1288
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales, Ed Lavoisier Technique & Documentation, Paris
- Claudek. W, Friedli K., 2002. Chimie générale pour ingénieur. Presse polytechniques Universitaires Romandes.
- Dellile L., 2007. Plantes médicinales d'Algérie, Ed Bertie, p.240
- Dohou N., 2015. Approche floristique, ethnobotanique, phytochimique et étude de l'activité biologique de thymelaelythroïdes, Thèse de doctorat, université Abou Baker belkaïd Tlemcen, p.59
- Encyclopedia, 1996. Medicinal Plants, Ed 2, Dorling Kindersiey Limited, Londres
- Ghedira K., 2008. Eucalyptus globulus Labill, Ed Springer, paris, vol n° 6
- Günther H., 1994. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie, Ed Masson, Paris
- Hanaoka, K., Sieffermann, Giampaoli, P., 2000. Effects of the sniffing port air makeup in gas chromatography-olfactometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2368-2371.

Harbone J., 1967. Comparative Biochemistry of the flavonoids. Academic Press, New York

Kahina K., Saidi S., 2016. Contribution à l'étude comparative du rendement et des composés chimiques de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus entre les feuilles âgées et les feuilles jeunes de la forêt de Harouza, Mémoire de Master, Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

Kouamé B., 2012. Valorisation des quatre plantes médicinales Ivoirienne : étude phytochimique, Thèse de doctorat, Université de Nantes, p.180

Kim N., Lee D., 2002. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from Lavandula species by gas chromatography mass spectrometry, Journal of Chromatography, p. 31-47

Lucchesi M., 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles, Thèse de Doctorat en Sciences, Université de Réunion

Leilan E., 1991. Eléments minéraux: Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Edition Lavoisier. Paris, p.78-98

Mohamdi Z., 2005. Etude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Thèse de doctorat, université Abou Baker belkaïd Tlemcen

Molkhan A., Seatar K., Hossan M., 2012. Characterization of the Eucalyptus (E. Globulus) leaves oil. Journal of Bangladesh Chemical Society, Vol. 25, n°2, p.97-100

Mokkadem D.H., 2012. Etude phytochimique et biologique des espèces Eucalyptus globulus, Smyrnum, Olasatrum, Asteriscum et Chrysanthemum, Thèse de doctorat en Biochimie appliquée, Université Badji Mokhtar-Annaba

Neffati A., 2010. Etude de la composition chimique et évaluation d'activités biologiques de l'huile essentielle d'une Apiaceae de Tunisie : Pituranthos chloranthus. Thèse de doctorat. Université Caen

Nkhili E., 2009. Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant, Thèse de doctorat, Université Cadi Ayyad – Marrakech

Oussou K.R., 2009. Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne, Thèse de Doctorat, Université de Cocody-Abidjan, p.241

Pibiri M., 2006, Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles, Thèse de Doctorat, Université de Lausanne, Canada, p.77

Rabiai M., 2014. Étude physicochimique et évaluation de l'activité biologique d'une huile essentielle et l'extrait aqueux d'Eucalyptus globulus de la région M'sila, Mémoire de Master, Université M'sila

Rabeony F., 2014. Contribution à l'étude des impacts des maladies de plante sur les huiles essentielles de deux espèces d'Eucalyptus dans la région Analamanga : « cas de l'Eucalyptus citriodora et Eucalyptus globulus », Mémoire de Master, Université d'Antananarivo, Ecole supérieur des sciences agronomiques, Madagascar

Rouessac F., Rouessac A., Brooks S., 2007. Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques, Ed. John Wiley and Sons, p.31.

Safowora A., 1993. Medicinal plants and traditional medicine in Africa, Spectrum Books Limited, Ibadan, Nigeria

Selma A., 2018. Effet insecticide des huiles essentielles de l'Eucalyptus globulus et Globularia alypum sur Tribolium castaneum, Mémoire de Master, Université de Master

Tchamdjaka K., 1995. Etude de performance d'un extracteur artisanal pour la production de l'essence de citronnelle, Mémoire de Master, ESTBA, p.45

Toure D., 2015. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de la côte d'ivoire, Thèse de doctorat en biochimie appliquée, Université Felix Houphouët-Boigny

Utshudi T, 2003. Screening chimique et isolement des tanins de la plante aphrodisiaque combretum smeath manu (combrétacée) utilisée dans la médecine traditionnelle à Kisangani. Monographie inédite, faculté des sciences, Université de Kisangani. p.26