

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université 8 Mai 1945 Guelma



Faculté : Sciences et Technologies

Département : Génie des procédés

Laboratoire de domiciliation : Laboratoire des Silicates, Polymères et Nanocomposites

**THÈSE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTORAT**

**Domaine** : Sciences et Technologies      **Filière** : Génie des procédés

**Spécialité** : Génie des procédés

Présentée par

**KOUADRI Imane**

*Intitulée*

**RECHERCHE DE POLYSACCHARIDE VALORISABLE DANS LA BIOMASSE  
VEGETALE : OPTIMISATION DES PROCEDES D'EXTRACTION ET  
CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE**

Soutenue le : 20/12/2018

Devant le Jury composé de :

| Nom et Prénom         | Grade      |                 |             |
|-----------------------|------------|-----------------|-------------|
| Mr. BENACHOUR Djafer  | Professeur | Univ. de Sétif  | Président   |
| Mr. SATHA Hamid       | Professeur | Univ. de Guelma | Encadreur   |
| Mme. BENHAMIDA Aïda   | Professeur | Univ. de Guelma | Examinateur |
| Mr. BOUKERROU Amar    | Professeur | Univ. de Béjaïa | Examinateur |
| Mr. DJIJELLI Hocine   | Professeur | Univ. de Béjaïa | Examinateur |
| Mme. LAHIOUEL Yasmina | Professeur | Univ. de Guelma | Examinateur |

Année Universitaire : 2018/2019

## Remerciements

Dès le début de la rédaction de ma thèse, je rêvais toujours de l'instant où je serais en train d'écrire mes remerciements, pour rendre hommage à tous ceux ou celles, de près ou de loin, d'une manière ou d'une autre, qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire des silicates, polymères et nano composites (*LSPN*) à la Faculté des Sciences de la Technologie, Université 8 mai 1945 Guelma, Algérie, en collaboration avec le laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères (*IMP*) de l'Université Claude Bernard Lyon 1, France.

Les résultats des recherches présentés dans ce manuscrit, sont les fruits obtenus durant ces années de thèse grâce à des contributions techniques et scientifiques précieuses de la part de plusieurs personnes. Je voudrais leur témoigner toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Avant tout, je remercie *ALLAH* tout puissant de m'avoir donnée le courage, la force, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à mon encadreur *Monsieur SATHA Hamid*, professeur au département de génie des procédés à la faculté des sciences et de la technologie de l'université 8 mai 1945, Guelma et Directeur du laboratoire *LSPN*. Je tiens à le remercier très vivement de m'avoir encadrée, aidée et apporté son soutien à accomplir cette étude tout en ayant bénéficié d'une partie de son savoir-faire, de son expérience et précieux conseils sans lesquels je n'aurais pas pu terminer ce travail. Ses connaissances constamment ont été extrêmement constructives tout le long de ma recherche. Je lui en suis infiniment reconnaissante.

Je remercie *Monsieur TROMPOTTO Stéphane* et *Monsieur DAVID Laurent* professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, France, pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe et permis de réaliser mes études.

J'adresse ma reconnaissance à tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à évaluer mon travail et toutes les remarques intéressantes qu'ils ont pu faire lors de la soutenance.

Je tiens à remercier *Monsieur BENACHOUR Djaffer* Professeur à l'université Ferhat ABBAS Sétif 1 pour l'honneur qu'il me fait de présider le Jury de ma thèse de doctorat.

Je tiens à remercier *Monsieur DJJELLI Hocine* et le *Monsieur BOUKERROU Amar* Professeurs à l'université Abderrahmane MIRA à Béjaïa, *Madame BENHAMIDA Aïda* et *Madame LAHIOUEL Yasmina* Professeurs à l'université 8 mai 1945 à Guelma, d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également au *Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique* pour m'avoir offert une bourse pour finaliser mes travaux en France (*programme national exceptionnel, PNE*).

Là c'est le tour de tous mes collègues du LSPN, avec qui j'ai passé des moments agréables durant tout au long de cette période, Merci à *LAYACHI Abdelhak*, *TAIBI Ahmed*, *LOUAER Ali*, *HASSAINIA Abdelghani*, *ROUBEHIE FISSA Mohamed*, *KHLALFA Assia*, *BOUDAUD Naila*, *BOURAGHDA Yahya*, *GHARSELLAH Azzedine*, *BENGHOURNA Nadjatte* et *MAKHLOUF Azzedine* pour leurs encouragements. Je souhaite bon courage et bonne chance à tous les doctorants de *LSPN* pour la finalisation de leurs thèses, et je remercie de manière générale tous ces membres.

Je remercie également tous mes amis hors LSPN surtout *Wafa HAMAIDIA* pour tout leur soutien, leur amitié et les moments inoubliables passés ensemble.

Un gros merci, tout spécial, s'adresse à mes chères amis *Mohamed BRAIEK* et sa femme *Nahla GAFSIA*, pour leur accueil cordial et l'aide qu'ils m'ont apporté à mon arrivée en France.

Je saisi aussi cette occasion pour remercier monsieur *BOUKHEDENNA Hocine* pour son aide pour la fourniture des échantillons de la plante de *Citrullus Colocynthis* dans la wilaya de Ouargla, Je lui en suis infiniment reconnaissante.

Finalement mes vifs remerciements vont à *ma mère*, je te remercie beaucoup *Mama* du fond du mon cœur et tout ça grâce à ton éducation et ton amour, Sans ton aide et ton encouragement je ne serai jamais là, et j'adresse un grand merci aussi à toute *ma belle famille* pour m'avoir toujours soutenue, aidée et encouragée durant toutes ces années d'études et ainsi que l'intérêt qu'elle a porté à mon travail. Je leur dédie ce travail en étant certaine qu'il ne sera pas suffisant pour les remercier.

**Merci à tous**

---

# Sommaire

---

# SOMMAIRE

Remerciements

Liste des Figures

Liste des Tableaux

INTRODUCTION GENERALE ..... 1

## Partie théorique

### Chapitre I: Etude bibliographique

|  |    |
|--|----|
| <b>1. LA BIOMASSE</b> .....                          | 6  |
| <b>2. LES BIOMATERIAUX</b> .....                     | 8  |
| <b>2.1. Généralités</b> .....                        | 8  |
| <b>2.2. Biomatériaux polymères</b> .....             | 9  |
| 2.2.1. Biomatériaux pétrochimiques .....             | 9  |
| 2.2.2. Biomatériaux biosourcés .....                 | 10 |
| <b>3. GENERALITES SUR LES POLYSACCHARIDES</b> .....  | 12 |
| <b>3.1. Classification des polysaccharides</b> ..... | 12 |
| <b>3.1.1. Les polysaccharides fixant l'eau</b> ..... | 13 |
| 3.1.1.1. <i>Les dextranes</i> .....                  | 13 |
| 3.1.1.2. <i>L'agarose et la carraghénane</i> .....   | 13 |
| 3.1.1.3. <i>L'acide hyaluronique</i> .....           | 13 |
| <b>3.1.2. Les polysaccharides cycliques</b> .....    | 14 |
| <b>3.1.3. Les polysaccharides bactériens</b> .....   | 14 |
| 3.1.3.1. <i>Le xanthane</i> .....                    | 15 |
| 3.1.3.2. <i>Le gellane</i> .....                     | 15 |



|   |    |
|---|----|
| 3.1.3.3. <i>Le hyaluronane</i> .....                    | 15 |
| <b>3.1.4. Les polysaccharides de réserve</b> .....      | 16 |
| 3.1.4.1. <i>L'amidon</i> .....                          | 16 |
| 3.1.4.2. <i>Le glycogène</i> .....                      | 16 |
| <b>3.1.5. Les polysaccharides de structure</b> .....    | 17 |
| 3.1.5.1. <i>La chitine</i> .....                        | 17 |
| 3.1.5.2. <i>Les pectines</i> .....                      | 17 |
| 3.1.5.3. <i>La lignine</i> .....                        | 17 |
| 3.1.5.4. <i>Les hémicelluloses</i> .....                | 18 |
| 3.1.5.5. <i>La cellulose</i> .....                      | 21 |
| 3.1.5.5.1. <i>Obtention de la cellulose</i> .....       | 24 |
| 3.1.5.5.2. <i>La Nanocellulose</i> .....                | 26 |
| 3.1.5.5.3. <i>Applications des nanocelluloses</i> ..... | 30 |

## Chapitre II : Etude Botanique du Citrullus Colocynthis

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Présentation de la plante étudiée (Citrullus Colocynthis)</b> ..... | 42 |
| <b>2. Noms vernaculaires</b> .....  | 43 |
| <b>3. Taxonomie et position systematique</b> .....                        | 43 |
| <b>4. Description morphologique et botanique</b> .....                    | 43 |
| <b>5. Origine et répartition géographique</b> .....                       | 46 |
| <b>6. Actions et effets thérapeutiques</b> .....                          | 46 |
| <b>7. Composition chimique de la plante</b> .....                         | 49 |
| <b>8. Toxicité de la coloquinte</b> .....                                 | 49 |
| <b>9. Usages traditionnel et populaire</b> .....                          | 50 |



## Partie Expérimentale

### Chapitre III: Matériels, Méthodes et Techniques de Caractérisation

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. MATERIELS ET METHODES</b> .....   | <b>60</b> |
| <b>1.1. Matière végétale</b> .....  | <b>60</b> |
| <b>1.2. Préparation de la matière (Technique de séchage, broyage et conservation)</b> ..... | <b>60</b> |
| <b>1.3. Produits chimiques (solvants et réactifs) utilisés</b> .....                        | <b>61</b> |
| <b>1.4. Procédures d'extraction des polysaccharides de Citrullus colocynthis</b> .....      | <b>62</b> |
| 1.4.1. Méthode d'extraction de polysaccharide hydrosoluble .....                            | <b>62</b> |
| 1.4.2. Méthode d'extraction de polysaccharide non- hydrosoluble .....                       | <b>63</b> |
| <b>1.5. Hydrolyse acide des liaisons glycosidiques</b> .....                                | <b>64</b> |
| <b>2. LES TECHNIQUES DE CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUES</b> .....                         | <b>64</b> |
| 2.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR) .....                     | <b>64</b> |
| 2.2. Spectroscopie Raman-IR .....   | <b>65</b> |
| 2.3. Spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire RMN <sup>13</sup> C du solide .....     | <b>66</b> |
| 2.4. Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN- <sup>1</sup> H) .....                   | <b>66</b> |
| 2.5. Analyse thermogravimétrique (ATG) .....  | <b>66</b> |
| 2.6. Diffraction des rayons X (DRX) .....   | <b>67</b> |
| 2.7. Microscopie électronique à transmission (MET) .....                                    | <b>68</b> |

### Chapitre IV : Extraction et caractérisation de polysaccharide insoluble dans l'eau à partir des graines de Citrullus Colocynthis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. MATERIELS ET METHODES</b> .....                                     | <b>73</b> |
| 1.1. Matière première et produits chimiques .....                         | <b>73</b> |
| 1.2. Procédé d'extraction des polysaccharides insolubles dans l'eau ..... | <b>73</b> |
| <b>2. RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....                                   | <b>74</b> |



|   |    |
|---|----|
| <b>2.1. Extraction chimique des polysaccharides insolubles dans l'eau</b> ..... | 74 |
| <b>2.2. Identification des résidus insolubles</b> .....                         | 78 |
| <b>2.3. Impact et l'effet du blanchiment sur les résidus insolubles</b> .....   | 83 |
| 2.3.1. Diffraction des rayons X.....  | 85 |
| 2.3.2. Analyse par spectroscopie ATR-FTIR et IR-Raman.....                      | 86 |
| 2.3.3. Analyse par RMN <sup>13</sup> C du solide .....                          | 87 |
| 2.3.4. Analyse par RMN- <sup>1</sup> H .....                                    | 89 |
| 2.3.5. Analyse thermogravimétrique par ATG .....                                | 91 |
| <b>3. EXTRACTION DES NANOFIBRILLES DE CELLULOSE</b> .....                       | 94 |
| 3.1. Préparation des microfibrilles de cellulose (nanocristaux).....            | 94 |
| 3.2. Analyse par Microscopie Electronique à Transmission (MET) .....            | 94 |
| <b>4. CONCLUSIONS</b> .....   | 96 |

**Chapitre V : Optimisation du procédé d'extraction et caractérisation du polysaccharide hydrosoluble issu de la Coloquinte**

|  |     |
|--|-----|
| <b>1. MATÉRIAUX ET MÉTHODES</b> .....  | 104 |
| 1.1. Matière végétale .....  | 104 |
| 1.2. Procédure d'extraction.....   | 104 |
| <b>2. CONCEPTION EXPÉRIMENTALE ET ANALYSE STATISTIQUE</b> .....                | 105 |
| <b>3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....                                       | 106 |
| <b>3.1. Caractérisation des polysaccharides de Citrullus Colocynthis</b> ..... | 106 |
| 3.1.1. Analyse d'ATR-FTIR.....   | 107 |
| 3.1.2. Analyse d'IR-Raman .....  | 108 |
| 3.1.3. Analyse de DRX.....   | 110 |
| <b>3.2. Effet des facteurs sur la masse finale de polysaccharide</b> .....     | 111 |
| 3.2.1. Effet de différents temps sur la masse finale de polysaccharide.....    | 111 |





|   |            |
|---|------------|
| 3.2.2. Effet de différentes températures sur la masse finale de polysaccharide .....      | 112        |
| 3.2.3. Effet de différents rapports d'eau sur la masse finale de polysaccharide .....     | 113        |
| <b>3.3. Model fitting et analyse statistique.....</b>                                     | <b>114</b> |
| <b>3.4. Effet des paramètres d'extraction sur les facteurs de réponse de surface.....</b> | <b>116</b> |
| <b>3.5. Optimisation d'extraction de CCPs .....</b>                                       | <b>117</b> |
| <b>4. CONCLUSIONS.....</b>  | <b>119</b> |
| <b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>   | <b>127</b> |
| <b>ANNEXES.....</b>   | <b>131</b> |
| <b>RESUME</b>   |            |
| <b>ABSTRACT</b>   |            |



# Liste des Figures

## Partie Théorique

### Chapitre I: Etude bibliographique

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure I-1:</b> Utilisation de la biomasse pour la préparation de produits utilisables comme matériaux polymères. ....                             | 7  |
| <b>Figure I-2:</b> Cycle de vie des biopolymères. ....  | 8  |
| <b>Figure I-3:</b> Structure moléculaire du motif monomérique des dextrans. ....  | 13 |
| <b>Figure I-4:</b> Structure moléculaire du motif monomérique des l'agarose. ....   | 13 |
| <b>Figure I-5:</b> Structure moléculaire du motif monomérique de l'acide hyaluronique. ....   | 14 |
| <b>Figure I-6:</b> Les trois cyclodextrineles plus connus : l' $\alpha$ -cyclodextrine, la $\beta$ -cyclodextrine et la $\gamma$ -cyclodextrine. .... | 14 |
| <b>Figure I-7:</b> Structure chimique du Xanthane. ....   | 15 |
| <b>Figure I-8:</b> Structure chimique du Gellane. ....  | 15 |
| <b>Figure I-9:</b> Structure chimique du l'hyaluronane. ....  | 16 |
| <b>Figure I-10:</b> Structure moléculaire de l'amylose et l'amylopectine. ....  | 16 |
| <b>Figure I-11:</b> Structure moléculaire du motif monomérique de la chitine. ....  | 17 |
| <b>Figure I-12:</b> Structure moléculaire du motif monomérique des pectines. ....   | 17 |
| <b>Figure I-13:</b> Les trois monomères de la lignine : alcool coumarylique (I), alcool coniférylique (II), alcool sinapylique (III). ....            | 18 |
| <b>Figure I-14:</b> Liaisons des xyloglucanes et des fibrilles de cellulose présente dans la plupart des plantes. ....                                | 19 |
| <b>Figure I-15:</b> Structure moléculaire du Xyloglucane. ....  | 19 |
| <b>Figure I-16:</b> Structure moléculaire du Galactomannane. ....   | 20 |
| <b>Figure I-17:</b> Structure du cellobiose. ....   | 21 |
| <b>Figure I-18:</b> Représentation de la chaîne de cellulose. ....  | 22 |



|   |    |
|---|----|
| <b>Figure I-19:</b> Ponts hydrogène intramoléculaires et intermoléculaires entre deux macromolécules adjacentes de cellulose .....  | 23 |
| <b>Figure I-20:</b> La cellulose à différentes échelles. ....   | 23 |
| <b>Figure I-21:</b> Les régions cristallines et amorphes dans les microfibrilles de cellulose.....  | 24 |
| <b>Figure I-22:</b> Cliché d'Acetobacter Xylinum (obtenu par Microscopie Electronique à Balayage) produisant des nanofibres de cellulose.....                                     | 25 |
| <b>Figure I-23:</b> Les régions cristallines et amorphes dans les microfibrilles de cellulose.....  | 27 |
| <b>Figure I-24:</b> Micrographie TEM de différentes NCC isolés à partir de différentes sources : a) cellulose bactérienne ; b) sisal ; c) ramie; d) tunicier.....                 | 28 |
| <b>Figure I-25:</b> Mécanisme de l'hydrolyse acide de la cellulose.....   | 28 |
| <b>Figure I-26:</b> Évolution du degré de polymérisation et de la cristallinité des NCC obtenus par hydrolyse acide de la pâte de bois résineux à différentes concentrations..... | 29 |

## **Chapitre II : Etude Botanique du Citrullus Colocynthis**

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure II-1:</b> La plante de Citrullus colocynthis (Cucurbitaceae) dans le Sahara Algérien.....  | 42 |
| <b>Figure II-2:</b> La plante de Citrullus colocynthis (Cucurbitacées) avec ses différentes parties (Tige, Feuille, Fleurs et Fruit). ....         | 44 |
| <b>Figure II-3:</b> Les feuilles et les fleurs de la plante de Citrullus colocynthis (Cucurbitacées)..   | 44 |
| <b>Figure II-4:</b> Fruits de la plante de Citrullus colocynthis (Cucurbitacées) avant et après maturation.....                                    | 45 |
| <b>Figure II-5:</b> La pulpe de la plante de Citrullus colocynthis (Cucurbitacées) avant et après maturation.....                                  | 45 |
| <b>Figure II-6:</b> Les graines de la plante de Citrullus colocynthis (Cucurbitacées) ; a) graine complet, b) graine en section longitudinale..... | 46 |



## Partie Expérimentale

### Chapitre III: Matériels, Méthodes et Techniques de Caractérisation

**Figure III-1:** Photo représentant les graines de la Citrullus colocynthis (coloquinte).....60

**Figure III-2:** Les étapes de préparation de la matière première de la Citrullus colocynthis (coloquinte). ..... 61

### Chapitre IV : Extraction et caractérisation de polysaccharide insoluble dans l'eau à partir des graines de Citrullus Colocynthis

**Figure IV-1:** Le procédé d'extraction de polysaccharide insolubles dans l'eau à partir des graines de Citrullus Colocynthis selon la méthode A et B..... 74

**Figure IV-2:** (a); Spectres ATR-FTIR de la matière première non traitée (A0), les résidus insolubles selon la méthode A après les étapes A1, A2 et (b); selon la méthode B après les étapes B1, B2..... 76

**Figure IV-3:** Spectres ATR-FTIR des résidus selon les méthodes A et B après les étapes A2 et B2. .... 77

**Figure IV-4:** Spectres ATR-FTIR de la cellulose microcristalline commercial et les résidus insolubles à partir les méthodes d'extraction A et B (A2 et B2). .... 78

**Figure IV-5:** Comparaison des spectres IR-Raman de la cellulose commerciale et les résidus insolubles des graines de Cc à partir les méthodes d'extraction A et B avant blanchiment..... 79

**Figure IV-6:** Spectre RMN du carbone solide <sup>13</sup>C avec (CP/MAS) de la lignine, la cellulose microcristalline commerciale et les extraits insolubles de Cc avant blanchiment. .... 80

**Figure IV-7:** Thermogramme d'ATG des résidus insolubles A2 et B2 avant blanchiment de Cc de la température ambiante à 800°C avec un balayage à 10°C/min. .... 81

**Figure IV-8:** Comparaison des thermogrammes ATG des résidus insolubles A2 et B2 avant blanchiment de Cc. .... 82

**Figure IV-9:** La poudre des l'extraits insolubles des graines de Cc: (a); Avant traitement de blanchiment, (b); Après le traitement de blanchiment. .... 83



|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figure IV-10:</b> Les rendements massiques des extraits insolubles avant et après traitement du blanchiment pour les deux méthodes A et B.....  | <b>84</b> |
| <b>Figure IV-11:</b> Diffraction des rayons X de la cellulose microcristalline commerciale et les résidus insolubles de Cc après blanchiment.....  | <b>85</b> |
| <b>Figure IV-12:</b> Spectres ATR-FTIR de la cellulose microcristalline commerciale et les résidus insolubles de Cc pour les deux procédés A et B après blanchiment.....   | <b>86</b> |
| <b>Figure IV-13:</b> Spectres IR-Raman de la cellulose microcristalline et les résidus insolubles de Cc dans la gamme des nombres d'ondes 0-2500 $\text{cm}^{-1}$ .....  | <b>87</b> |
| <b>Figure IV-14:</b> Spectres RMN du carbone solide $^{13}\text{C}$ avec (CP/MAS) de la cellulose commerciale commerciale et l'extrait de Cc après blanchiment pour la méthode B. (CC: Cellulose Cristalline, TC: Cellulose Totale, AC: Cellulose Amorphe). .... | <b>88</b> |
| <b>Figure IV-15:</b> Spectres RMN $^1\text{H}$ du proton de la cellulose et glucose commerciale et l'extrait de Cc après blanchiment. ....   | <b>90</b> |
| <b>Figure IV-16:</b> Thermogramme d'ATG des résidus insolubles après blanchiment selon les deux méthodes A et B de Cc et ces dérivées de la température ambiante à $800^\circ\text{C}$ avec un balayage à $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . ....                   | <b>92</b> |
| <b>Figure IV-17:</b> Comparaison des thermogrammes ATG des résidus insolubles selon les deux méthodes A et B après blanchiment de Cc avec la cellulose microcristalline commercial. ....   | <b>93</b> |
| <b>Figure IV-18:</b> Microscopie électronique à transmission (MET) des nanofibrilles de cellulose obtenues à partir de graines de Citrullus colocynthis; (a): Préparées avec 30 min d'hydrolyse, (b): Préparées avec 4h d'hydrolyse.....                         | <b>95</b> |

## **Chapitre V : Optimisation du procédé d'extraction et caractérisation du polysaccharide hydrosoluble issu de la Coloquinte**

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figure V-1:</b> Représentation de Citrullus colocynthis avec ses fruits et ses graines.....                               | <b>104</b> |
| <b>Figure V-2:</b> Différentes étapes d'extraction des polysaccharides hydrosolubles. ....                                   | <b>105</b> |
| <b>Figure V-3:</b> Spectres ATR-FTIR ; (A) le matériau extrait de Citrullus colocynthis, (B) galactomannane commercial. .... | <b>107</b> |
| <b>Figure V-4:</b> Spectres IR-Raman ; (A) le matériau extrait de Citrullus colocynthis, (B) galactomannane commercial. .... | <b>109</b> |



|  |            |
|--|------------|
| <b><u>Figure V-5:</u></b> Diffraction des rayons X du polysaccharide (A) obtenu à partir des graines de Citrullus colocynthis et (B) du galactomannane commercial. ....                    | <b>110</b> |
| <b><u>Figure V-6:</u></b> Effets de différents temps sur la masse finale des CCPs.....   | <b>111</b> |
| <b><u>Figure V-7:</u></b> Effets de différentes températures sur la masse finale des CCPs.....   | <b>112</b> |
| <b><u>Figure V-8:</u></b> Effets de différents rapports d'eau sur la masse finale des CCPs. ....   | <b>113</b> |
| <b><u>Figure V-9:</u></b> Comparaison des résultats prédits et expérimentaux de la masse finale de polysaccharides hydrosolubles de Citrullus colocynthis.....                             | <b>116</b> |
| <b><u>Figure V-10:</u></b> Les courbes de la surface de réponse (3D) et (2D) montrant les effets du temps d'extraction et de la température d'extraction sur la masse finale des CCPs..... | <b>117</b> |
| <b><u>Figure V-11:</u></b> Courbe de contour de la condition optimale d'extraction pour les CCPs.....  | <b>118</b> |
| <b><u>Figure V-12:</u></b> Courbe de contour de la désirabilité pour les CCPs.....   | <b>119</b> |



## Liste des Tableaux

### Partie Théorique

#### Chapitre I: Etude bibliographique

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>Tableau I-1:</u></b> Structures chimiques des biomatériaux pétrochimiques.....                       | <b>10</b> |
| <b><u>Tableau I-2:</u></b> Applications médicales de quelques biomatériaux cellulosiques .....             | <b>11</b> |
| <b><u>Tableau I-3:</u></b> Degré de Polymérisation de la cellulose selon l'espèce végétale considérée. ... | <b>21</b> |
| <b><u>Tableau I-4:</u></b> Types et caractéristiques de nanocelluloses selon l'origine.....                | <b>30</b> |
| <b><u>Tableau I-5:</u></b> Propriétés de cellulose nanocristalline avec une pâte kraft de résineux.....    | <b>31</b> |

#### Chapitre II: Etude Botanique du Citrullus Colocynthis

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>Tableau II-1:</u></b> Quelques études sur les effets thérapeutiques de la coloquinte (Citrullus colocynthis) à travers le monde..... | <b>48</b> |
|--|-----------|

### Partie Expérimentale

#### Chapitre III: Matériels, Méthodes et Techniques de Caractérisation

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>Tableau III-1:</u></b> Produits chimiques, solvants et réactifs..... | <b>62</b> |
|--|-----------|

#### Chapitre IV : Extraction et caractérisation de polysaccharide insoluble dans l'eau à partir des graines de Citrullus Colocynthis

|   |           |
|---|-----------|
| <b><u>Tableau IV-1:</u></b> Données d'analyse thermogravimétrique avant traitement du blanchiment. .. | <b>82</b> |
| <b><u>Tableau IV-2:</u></b> Données d'analyse thermogravimétrique après traitement du blanchiment. .. | <b>92</b> |



**Chapitre V : Optimisation du procédé d'extraction et caractérisation du polysaccharide hydrosoluble issu de la Coloquinte**

**Tableau V-1:** Variables indépendantes et leurs niveaux utilisés dans la surface de réponse **106**

**Tableau V-2:** Données expérimentales des CCPs avec les variables indépendantes..... **114**

**Tableau V-3:** Résultat d'ANOVA pour les données expérimentales. .... **115**

**Tableau V-4:** Optimisation de la réponse pour les paramètres CCPs..... **118**





---

# Introduction générale

---

# Introduction générale

La biomasse, au sens de l'ensemble des matières organiques d'origine végétale, animale ou fongique, possède un potentiel reconnu en ce qui concerne le développement de nouvelles ressources d'énergie mais aussi de nouveaux matériaux. Parmi les trois précitées, la matière végétale constitue la première source de biomasse.

L'idée de fabriquer des matériaux à partir de ressources végétales date des années 1930, mais le développement de ces matériaux biosourcés a été mis en veilleuse car les polymères d'origine fossile, moins onéreux, se sont développés. Ces matériaux «pétrochimiques» sont maintenant incontournables dans tous les domaines (emballages, applications médicales, génie civil.....). Cependant, l'épuisement probable à court terme des ressources fossiles, exploitées à la fois comme matière première de la chimie du carbone, et pour produire de l'énergie, conduit à rechercher activement des produits de substitution répondant aux mêmes besoins d'utilisation.

Ces préoccupations croissantes ont ainsi favorisé le développement de nouveaux polymères biosourcés. L'emploi de ressources naturelles est motivé par leur caractère renouvelable. A titre d'exemple, la cellulose, polymère naturel le plus abondant sur notre planète, ou encore l'amidon, s'avèrent d'un grand intérêt industriel. Les macromolécules naturelles peuvent aussi présenter des structures et des originalités que la ressource pétrochimique est incapable de reproduire, comme les doubles liaisons contenues dans certains acides gras des huiles végétales.

Dans ce cadre, les biopolymères, et en particulier les polysaccharides, se présentent comme une source d'innovation à fort potentiel. En effet, en plus de l'intérêt traditionnel des fibres et polymères naturels dans les industries alimentaires, textiles ou papetières, les nanoparticules de polysaccharides sont devenues des briques de base particulièrement attractives pour la conception de nanomatériaux à haute performance et à forte valeur ajoutée.

Les nanomatériaux cellulosiques peuvent être grossièrement divisés en trois groupes suivants : nano-/microfibrille de cellulose (NFC / MFC), qui sont produits principalement par la désintégration mécanique de fibres cellulosiques prétraitées ; nanocristaux de cellulose (NCC), qui sont produits par l'hydrolyse acide ; et la cellulose bactérienne (BC), qui est secrétée par des bactéries. Comme son nom l'indique, c'est la cellulose qui est l'unité



fondamentale de ces nanoparticules, mais elles diffèrent beaucoup dans leurs caractéristiques structurales, ce qui engendre des applications différentes.

Donc la plante est un composite végétal constitué majoritairement de trois macromolécules : la cellulose, la lignine et l'hémicellulose. La manipulation du génome de certaines espèces végétales, permet d'identifier les gènes responsables de la synthèse des polymères constitutifs et de modifier leur teneur respective par rapport à l'état natif.

C'est dans ce contexte, nous sommes intéressés à trouver ou bien valoriser d'une nouvelle source végétale pour l'extraction des biomatériaux ou bien des biopolymères végétale, particulièrement dans la plante « *Citrullus colocynthis* » (la coloquinte) de la famille de "Cucurbitacée".

Cette thèse présente les travaux réalisés et comporte cinq chapitres :

Le premier chapitre **(I)** « Généralités » présente une revue de la littérature sur la description de la biomasse végétale et les biomatériaux par leurs utilisations et leurs intérêts par des scientifiques et industriels, dans le développement de nouvelles ressources d'énergie et aussi de nouveaux matériaux. Il porte aussi une étude bibliographique concernant les polysaccharides avec leurs types et leurs applications dans des différents domaines.

Le deuxième chapitre **(II)** est consacré à l'étude botanique de la plante étudiée "*Citrullus colocynthis*" (Cucurbitacée) avec la description de leur noms vernaculaires, taxonomie et position systématique, les différentes parties de la plante, origine et répartition géographique, actions et effets thérapeutiques, leur composition chimique, leur toxicité et à la fin leur usages traditionnelle et populaire.

Le troisième chapitre **(III)** intitulé 'Matériels, Méthodes et Techniques de Caractérisation' présente le matériel, les méthodes, les protocoles expérimentaux utilisés dans ce travail pour l'extraction et les procédés de caractérisation des polysaccharides avec une étude comparative des produits finaux avec d'autres types des polysaccharides commerciaux.

Le quatrième chapitre **(IV)** intitulé 'Extraction et caractérisation de polysaccharide insolubles dans l'eau (la cellulose) à partir des graines de *Citrullus Colocynthis*' qui rassemble aussi tous les résultats expérimentaux et leurs discussions.



Le cinquième chapitre (V) rassemble tous les résultats expérimentaux et leurs discussions concernant l'optimisation du procédé d'extraction et de caractérisation du polysaccharide hydrosoluble (le galactomannane) issu de la plante « Citrullus colocynthis » (la coloquinte) de la famille de "Cucurbitacée".

Enfin, ce travail se termine par une conclusion générale et des perspectives.



---

# Partie Théorique

---

# Chapitre I

---

## Etude bibliographique

---

## Introduction

Dans ce premier chapitre nous présenterons une revue de la littérature sur la description de la biomasse végétale et les biomatériaux par leurs utilisations et leurs intérêts par des scientifiques et industriels dans le développement de nouvelles ressources d'énergie et aussi de nouveaux matériaux. Il porte aussi une étude bibliographique concernant les polysaccharides avec leurs types et leurs applications dans des différents domaines.

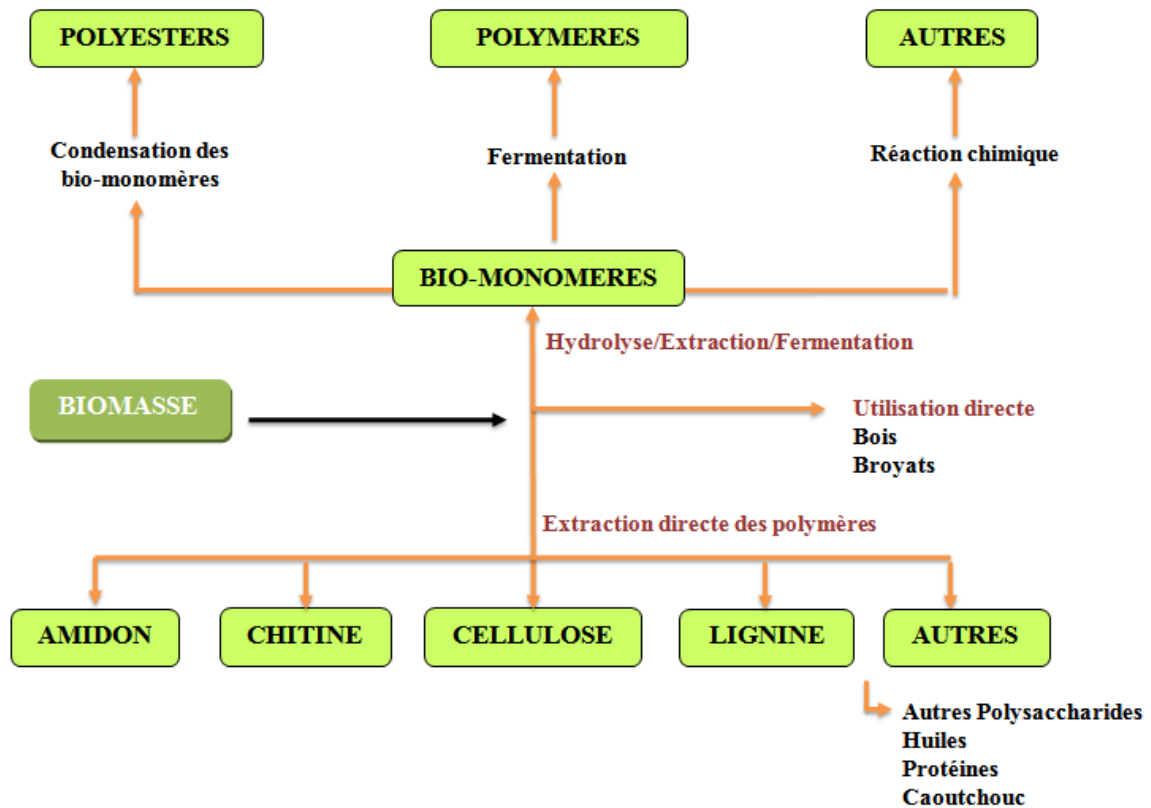
### 1. LA BIOMASSE

La biomasse est l'ensemble de la matière vivante c'est-à-dire d'origine biologique, à l'exception des matières géologiques ou fossiles, ce qui s'applique à une large variété de produits organiques. Elle est essentiellement composée de carbone (~50%), d'oxygène (~40%), d'hydrogène (~6%), d'une faible part d'azote (de 0,4 à 1,2%) et de matières minérales (calcium, silicium, potassium) [1].

Les polymères issus de la biomasse peuvent être regroupés en deux grandes familles, les polymères issus directement d'organismes vivants et les polymères synthétisés à partir de ressources renouvelables. On trouve dans la première catégorie, des polymères tels que les polysaccharides, les protéines ou la lignine.

La deuxième catégorie comprend des polymères formés à partir de la polymérisation de monomères d'origine naturelle, comme l'acide polylactique (PLA) obtenu à partir de glucose. Nous pouvons aussi placer dans cette deuxième catégorie certains polymères produits par des bactéries. La *Figure I-1* montre les différentes voies d'obtention des bio-polymères à partir de la biomasse.





**Figure I-1:** Utilisation de la biomasse pour la préparation de produits utilisables comme matériaux polymères [4].

Outre l'intérêt stratégique de l'utilisation de la biomasse en remplacement des matières fossiles, les analyses de cycle de vie montrent généralement que l'utilisation de ressources renouvelables permet de réduire l'émission de CO<sub>2</sub> de 30 à 75% par rapport à l'utilisation de polymères d'origine pétrolière. La consommation de CO<sub>2</sub>, nécessaire à la croissance de la plante, est égale au rejet de CO dans l'atmosphère lors du recyclage des matériaux en fin de vie [2, 3] (Figure I-2).







**Figure I-2 :** Cycle de vie des biopolymères [2].

Le marché des bioplastiques ne représentait en 2009, avec 500 000 tonnes, que 0,2% du marché globale des matières polymères. Les perspectives dans ce secteur prévoient une augmentation de la capacité de production des bioplastiques pour atteindre 4,5 millions de tonnes à l'horizon 2020 [5]. La biomasse végétale est principalement constituée de cellulose, hémicelluloses et lignine. Dans la suite de cette revue bibliographique nous allons principalement nous intéresser à ces composés.

## 2. LES BIOMATERIAUX

Il ne faut pas confondre le terme « biomatériau » avec celui de « bioplastique ». Ce dernier recouvre deux concepts : les plastiques issus de la biomasse et les plastiques biodégradables. Au-delà de toute définition formelle, le terme « biomatériau » concerne tout matériau destiné à être en contact avec les tissus vivants et/ou fluides biologiques pour évaluer, traiter ou remplacer tout tissu, organe ou fonction du corps [6].

### 2.1. Généralités

La conférence de Chester, en 1986, de la Société Européenne des Biomateriaux, dite conférence du consensus, a retenu la définition suivante pour le terme biomatériau: « matériau

non vivant utilisé dans un dispositif médical, destiné à interagir avec les systèmes biologiques» [7].

Un biomatériau se doit d'être biocompatible, c'est-à-dire démontrer une haute tolérance pour l'organisme receveur. Il doit être non toxique et, dans le cas d'une dégradation au sein de l'organisme, les produits issus de cette décomposition doivent être résorbables [8]. Enfin, le matériau ne doit pas être modifié par le milieu biologique et devenir inapte [9].

Les phénomènes affectant la biocompatibilité d'un biomatériau concernent essentiellement les réactions survenant entre le matériau et les fluides biologiques, et les réponses de l'organisme à ces réactions [6].

Une première génération de biomatériaux comprenait, jusqu'au milieu du XXème siècle, des métaux et alliages résistants à la corrosion utilisés en chirurgie dentaire et ultérieurement en chirurgie orthopédique. Puis, des céramiques et des polymères ont été développés et utilisés en tant que biomatériaux [10]. Lors de cette étude, nous nous sommes focalisés sur les biomatériaux de type polymère.

## 2.2. Biomatériaux polymères

Les polymères sont très fréquemment utilisés pour des applications médicales. Leurs propriétés de biocompatibilité associées à leur résistance mécanique sont très importantes pour assurer les fonctions attendues dans ce domaine [11, 12]. Les polymères utilisés en tant que biomatériaux peuvent être répartis en deux groupes selon leur origine pétrochimique ou biosourcée.

### 2.2.1. Biomatériaux pétrochimiques

Le polyéthylène (PE), le polyamide (PA), le polyéthylène téréphtalate (PET) et le polytétrafluoroéthylène (PTFE) sont des polymères synthétiques hydrophobes [13] et non biodégradables utilisés dans le domaine médical, pour leurs propriétés mécaniques adaptées à ce domaine [14, 15]. Leurs applications principales sont des sutures et des implants vasculaires. Parmi les biomatériaux pétrochimiques, il existe également des polymères pétrochimiques dégradables, comme par exemple le polycaprolactone (PCL) et le polydioxanone (PDS) [16]. L'ensemble des structures chimiques de ces différents biomatériaux pétrochimiques est repris dans le *Tableau I-1*.



**Tableau I-1:** Structures chimiques des biomatériaux pétrochimiques [8,17].

| Nom                                    | Structure | Applications   |
|--|-----------|--|
| <b>Polyamide (PA)</b>                  |           | Matériel de suture<br>Seringues<br>Membrane de dialyse |
| <b>Polycaprolactone (PCL)</b>          |           | Encapsulation  |
| <b>Polydioxanone (PDS)</b>             |           | Chirurgie maxillo-faciale                              |
| <b>Polyéthylène (PE)</b>               |           | Prothèses<br>Seringues<br>Emballages                   |
| <b>Polyéthylène téréphtalate (PET)</b> |           | Vaisseaux<br>Tendons<br>Matériel de suture             |
| <b>Polytétrafluoroéthylène (PTFE)</b>  |           | Implants de vaisseaux<br>Chirurgie maxillo-faciale     |

De nombreux biopolymères peuvent donc être obtenus à partir de ressources fossiles. Cependant, ils présentent parfois l'inconvénient de ne pas satisfaire aux besoins de certaines applications médicales, notamment à cause de leur rigidité [15]. C'est pourquoi des scientifiques tentent de trouver des alternatives parmi lesquelles l'utilisation de ressources dites renouvelables semble être l'une des voies les plus prometteuses [13].

### 2.2.2. Biomatériaux biosourcés

Depuis quelques années, les polymères d'origine pétrochimique sont de plus en plus souvent remplacés par des polymères d'origine naturelle, [18, 19] végétale ou animale. A titre d'exemple, la chitine, [20] la gélatine [21] ou le collagène [22] sont parfois utilisés en tant que

biomatériaux. Cependant, leurs applications restent limitées à cause des risques potentiels dus à leur origine, comme par exemple des risques viraux [23, 24]. Des traitements sont alors proposés pour éliminer ces risques, mais ils altèrent parfois ces matériaux d'origine naturelle et réduisent ainsi leur intérêt. C'est la raison pour laquelle un intérêt croissant s'est porté sur les polymères d'origine végétale. Des biomatériaux à base d'amidon [25] ou de cellulose [26] sont ainsi utilisés en tant qu'implants ou pour des traitements spécifiques (Tableau I-2).

**Tableau I-2:** Applications médicales de quelques biomatériaux cellulosiques [6].

| Biomatériau cellulosique  | Application                                |
|---|--|
| Cellulose bactérienne / microbienne                               | Dermatologie<br>Implants<br>Fils de suture |
| Membrane cellulosique (cellulose régénérée, acétate de cellulose) | Traitement rénal                           |
| Acétate, propanoate, acétate-butyrates de cellulose               | Membrane                                   |
| Acétate-butyrates de cellulose                                    | Encapsulation                              |

D'autres polymères obtenus à partir de la biomasse, tels que les polylactides (PLA), [9] les polyhydroxyalcanoates (PHA) [27] sont utilisés pour des implants médicaux [28, 29]. La majorité de ces matériaux sont hydrophiles. Cependant, cette propriété peut être un inconvénient pour l'utilisation d'un dispositif médical qui doit être retiré par la suite, puisqu'un biomatériau hydrophile a tendance à coller aux tissus [30].

De plus, le caractère hydrophile du biomatériau peut entraîner une dégradation rapide dans certains milieux ce qui n'est pas toujours la finalité recherchée, particulièrement lors du comblement permanent d'une cavité [31]. Par ailleurs, l'utilisation de certains biomatériaux, comme par exemple le PLA, est parfois problématique à cause de ses faibles propriétés mécaniques, et surtout des risques de réactions inflammatoires dues à la libération d'acides lors de la dégradation du polymère [32].

Les autres polymères biosourcés, comme la cellulose et ses dérivés, ne présentent pas ce relargage acide, et se révèlent par ailleurs être des biomatériaux compatibles avec les tissus durs ou mous [33]. Ce sont les raisons pour lesquelles nous avons choisi de tester l'un des plastiques cellulosiques synthétisés en vue d'éventuelles applications médicales.



### 3. GENERALITES SUR LES POLYSACCHARIDES

Les polysaccharides sont des polymères biologiques constitués d'un ou plusieurs types de molécules monosaccharidiques. Les polysaccharides constitués de mêmes types d'oses sont nommés les glycanes. Chaque polysaccharide est caractérisé par un degré de polymérisation bien déterminé et un type de liaison entre les monomères. Le glucose, le fructose, le galactose sont parmi les monomères constitutifs. Il existe aussi du mannose, de l'arabinose, de la xylose et du rhamnose [34].

Les polysaccharides sont classés en deux; homo-polysaccharides, qui sont des homoglycanes constitués d'un seul type de monosaccharide, par exemple, cellulose et glycogène qui sont des polymères de glucose; des hétéro-polysaccharides ou des hétéro-glycanes, constitués de plusieurs stéréo-isomères de monosaccharide [35].

#### 3.1. Classification des polysaccharides

Les polysaccharides sont présents chez tous les êtres vivants, dans les végétaux comme l'amidon, la cellulose, les hémicelluloses et les pectines; dans les animaux comme le glycogène et l'acide hyaluronique, la chitine existe aussi chez les insectes et les crustacés; et dans les microorganismes (bactéries, champignons, algues) comme le xanthane,  $\beta$ -glucanes, les carraghénanes [36].

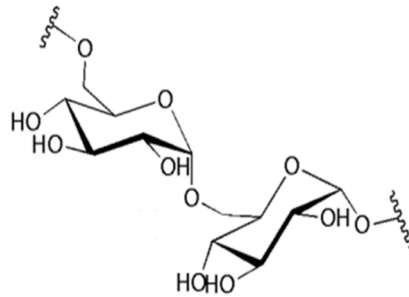
Les polysaccharides sont produits par une grande variété d'espèces qu'elles soient végétales, animales, bactériennes ou membres de la famille des champignons. Ces biopolymères adoptent une telle diversité de structure et de fonctions qu'il ne serait pas possible d'en faire un catalogue exhaustif.

Les polysaccharides sont ici divisés en cinq groupes selon leurs fonctions: Les polysaccharides de structure qui confèrent aux cellules, aux organes ou aux organismes une stabilité mécanique, les polysaccharides fixant l'eau qui empêchent le dessèchement des cellules et des tissus, les polysaccharides de réserve qui servent au stockage des sucres riches en énergie, les polysaccharides cycliques qui possède des propriétés structurales intéressantes et la possibilité de former des complexes avec les molécules organiques et les polysaccharides bactériennes.



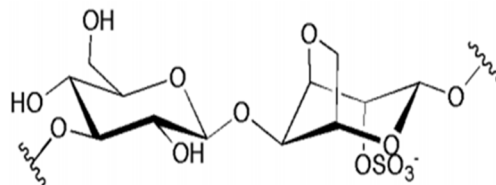
### 3.1.1. Les polysaccharides fixant l'eau

**3.1.1.1. Les dextranes** sont des polysaccharides formés par des résidus glucose liés en  $\alpha(1\rightarrow6)$  (Figure I-3). Le degré et l'emplacement des ramifications déterminent la structure tridimensionnelle de ces polymères. En présence d'eau, les dextranes forment des mucilages visqueux ou des gels qui après réticulation chimique sont utilisés pour la séparation des macromolécules [36].



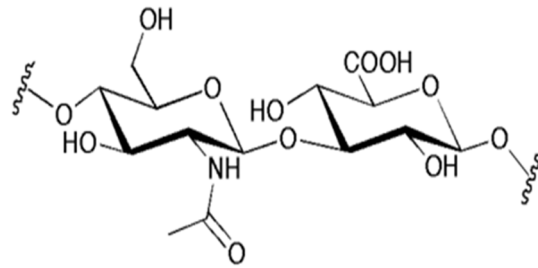
**Figure I-3:** Structure moléculaire du motif monomérique des dextranes.

**3.1.1.2. L'agarose et la carraghénane** sont extraits des algues et peuvent également être utilisés pour former des gels (l'agar agar est utilisé pour préparer les gels d'agarose pour la séparation de macromolécules en biologie moléculaire en particulier) (Figure I-4) [36].



**Figure I-4:** Structure moléculaire du motif monomérique des l'agarose.

**3.1.1.3. L'acide hyaluronique** est un composant important de la matrice extracellulaire. Il fait partie de la famille des glycosaminoglycanes dont l'élément de base est un sucre aminé ainsi que l'acide glucuronique ou l'acide iduronique. On trouve ces glycosaminoglycanes sous forme libre ou comme composant des proteoglycanes partout dans les organismes. L'acide hyaluronique se compose d'unités disaccharides dans lesquelles la N-acétylglucosamine et l'acide glucuronique sont enchaînés alternativement en  $\beta(1\rightarrow4)$  et  $\beta(1\rightarrow3)$  (Figure I-5) [37].

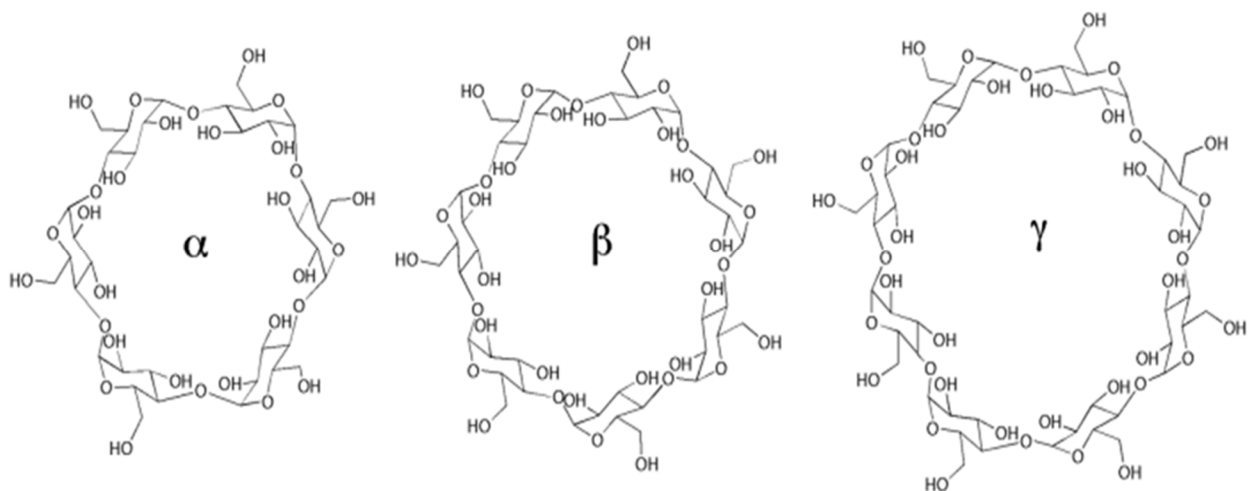


**Figure I-5 :** Structure moléculaire du motif monomérique de L'acide hyaluronique.

### 3.1.2. Les polysaccharides cycliques

Les cyclodextrines comme leur nom l'indique sont des oligosaccharides cycliques dérivés de l'amidon après traitement par une combinaison d'enzymes amylolytiques produites par des bactéries *Bacillus macerans*, des cyclodextrines glucotransférases (CGTases) et d'autres bactéries. Le mélange d'oligomères cycliques ainsi obtenu est ensuite purifié par des séparations chromatographiques ou des cristallisations fractionnées [38, 39].

Les 3 tailles de cycle les plus communément rencontrées sont des macrocycles à 6 (l' $\alpha$ -cyclodextrine), 7 (la  $\beta$ -cyclodextrine), et 8 (la  $\gamma$ -cyclodextrine) résidus (Figure I-6).



**Figure I-6:** Les trois cyclodextrineles plus connus : l' $\alpha$ -cyclodextrine, la  $\beta$ -cyclodextrine et la  $\gamma$ -cyclodextrine.

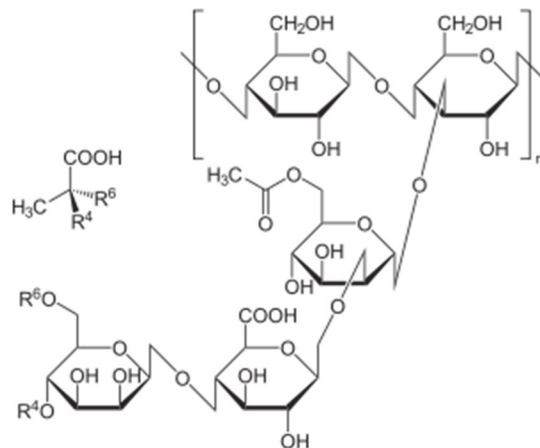
### 3.1.3. Les polysaccharides bactériens

Les polysaccharides bactériens sont biosynthétisés naturellement par de nombreuses bactéries. Ils sont sécrétés soit sous forme d'une capsule fixée à la cellule, soit sous la forme



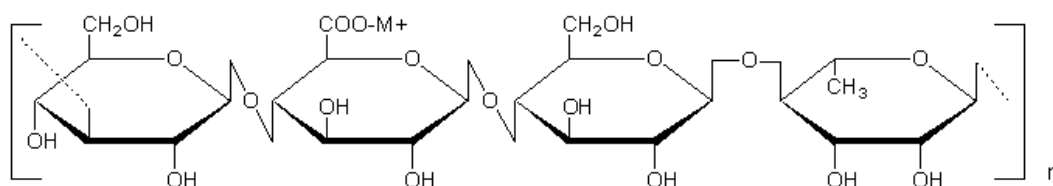
d'une gangue visqueuse en solution. Ce dernier cas est le plus intéressant car la récupération du polysaccharide en est facilitée [40, 41, 42].

**3.1.3.1. Le xanthane** C'est de loin le polysaccharide bactérien qui a connu le plus fort développement industriel, et cela depuis une trentaine d'années. Sa production à partir de la bactérie *Xantomonas campestris* est importante (de l'ordre de 50000 t/an). Sa structure chimique est donnée *figure I-7* [43].



**Figure I-7:** Structure chimique du Xanthane.

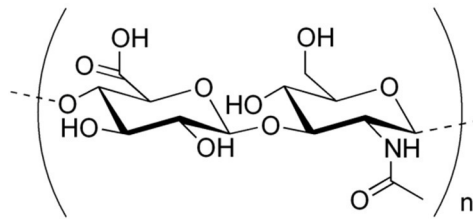
**3.1.3.2. Le gellane :** Produit par la bactérie *Pseudomonas elodea*, ce polysaccharide bactérien, après désacylation, forme un gel rigide en présence de faibles concentrations en cations divalents. Sa structure chimique est donnée *figure I-8* [44].



**Figure I-8:** Structure chimique du Gellane.

**3.1.3.3. Le hyaluronane :** Ce polysaccharide est présent dans une grande variété de tissus (liquide synovial, peau, cordon ombilical, crête de poulet) et est encore en partie extrait de ces tissus (*figure I-9*). Il est aussi excrété par certaines bactéries (streptocoques), ce qui permet actuellement, par cette voie, une production industrielle plus importante à des coûts moins élevés pour un produit de plus grande pureté [45].



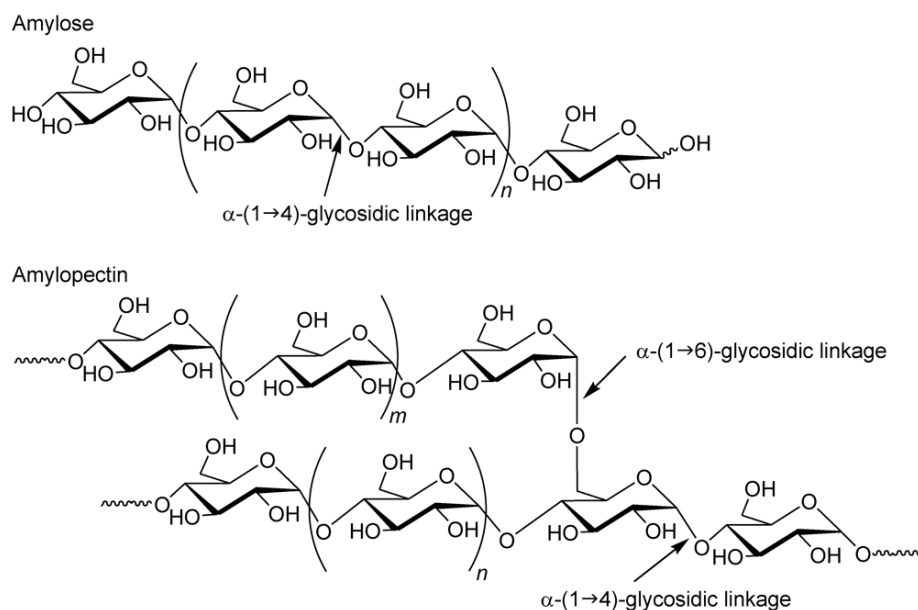


**Figure I-9:** Structure chimique du l'hyaluronane.

### 3.1.4. Les polysaccharides de réserve

En raison de leur nature polymérique, les sucres de réserve exercent une pression osmotique plus faible et peuvent être stockés en plus grande quantité que leurs constituants de base comme le glucose.

**3.1.4.1. L'amidon** produit par les plantes est une combinaison de deux polysaccharides appelés amylopectine et  $\alpha$ -amylose. L'amylopectine est un polymère ramifié, pratiquement insoluble dans l'eau, dont la chaîne principale, constituée de résidus glucose liés en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), porte des embranchements du type  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) tous les 24-30 résidus. L' $\alpha$ -amylose est composée de chaînes non ramifiées de 200 à 300 résidus glucose liés en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) (*Figure I-10*)



**Figure I-10:** Structure moléculaire de l'amylose et amylopectine.

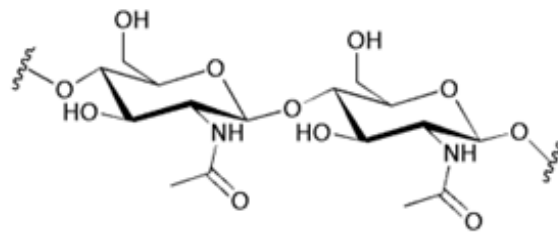
**3.1.4.2. Le glycogène** est l'équivalent de l'amidon chez les animaux. Il est présent dans toutes les cellules mais en plus grande proportion dans les cellules des muscles squelettiques et dans le foie où il joue son rôle de réserve énergétique sous la forme de granules cytoplasmiques.



Sa structure est semblable à celle de l'amylopectine à la différence que les embranchements sont plus nombreux et répétés tous des 8 à 12 résidus glucose le long de la chaîne principale en  $\alpha$ -(1→4) [46].

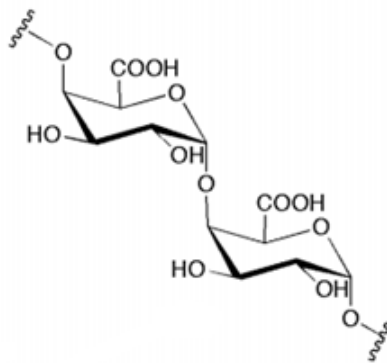
### 3.1.5. Les polysaccharides de structure

**3.1.5.1. La chitine** est un homopolymère de N-acétylglucosamines reliées en  $\beta$ (1→4) (Figure I-11). Ses propriétés sont similaires à celles de la cellulose. Elle constitue la trame des carapaces des insectes et des crustacés. On la retrouve également dans la paroi des champignons.



**Figure I-11:** Structure moléculaire du motif monomérique de la chitine.

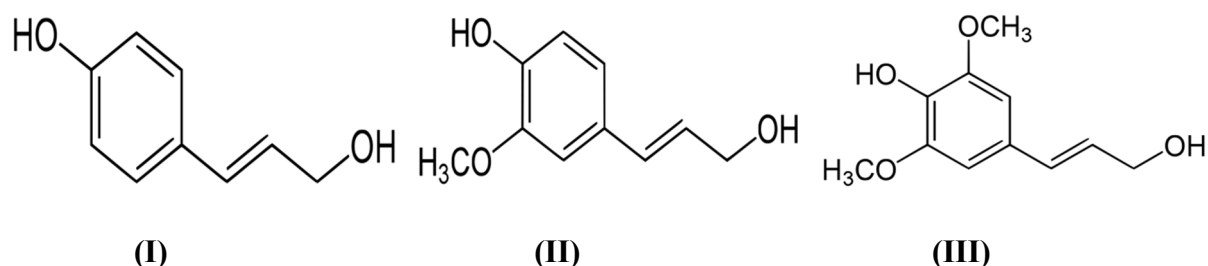
**3.1.5.2. Les pectines** sont composées d'enchaînement de résidus acide galactopyranosique liés en  $\alpha$  (1→4) (Figure I-12). La proportion de conversion des fonctions acides en esters et des fonctions alcools en groupement acétyle est variable. La pectine est le polysaccharide responsable de la texture des fruits par exemple.



**Figure I-12 :** Structure moléculaire du motif monomérique des pectines.

**3.1.5.3. La lignine :** Après la cellulose, la lignine est le second biopolymère organique majoritaire la plus abondante dans les plantes. Elle est chimiquement très différente de la cellulose et des hémicelluloses. C'est un polymère tridimensionnel, amorphe et de nature phénolique, qui assure la rigidité de la paroi cellulaire.

La lignine est un polymère naturel complexe irrégulier composé de motifs monomériques phénoliques plus ou moins méthoxylés. Les unités monomères phénoliques sont reliées entre elles par des liaisons éthers ou directement entre les atomes de carbone. Il est à noter que la lignine est facilement dépolymérisable par coupure des liaisons éthers alkylaryls [66]. De plus les trois monomères de la lignine (alcools phénoliques *Figure I-13*) peuvent s'assembler de multiples façons formant une structure tridimensionnelle très ramifiée.

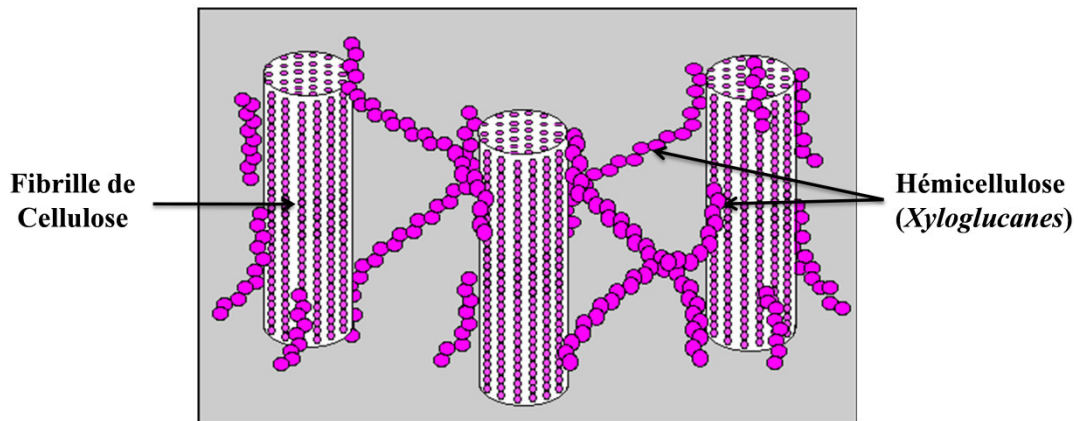


**Figure I-13 :** Les trois monomères de la lignine : alcool coumarylique (I), alcool coniférylique (II), alcool sinapylique (III) [67].

**3.1.5.4. Les hémicelluloses** sont une famille de composés hétéro polysaccharidiques, composées de plusieurs oses simples et de résidus glycosyl liés en  $\beta$  (1-4) [47]. Elles diffèrent de la cellulose par des chaînes moléculaires beaucoup plus courtes et par des ramifications sur la chaîne principale. La structure chimique exacte de la fraction hémicellulosique varie d'une espèce à une autre. Néanmoins, les hémicelluloses les plus courantes dans la biomasse lignocellulosiques sont issues de la famille des xylanes, des mannanes et des galactanes [48].

Pour la plupart des plantes l'hémicellulose la plus importante est un xyloglucane [47] (*Figure I-14*). Les autres hémicelluloses les plus connues sont les xylanes incluant l'arabinoxylane, le glucuronoxylane et le glucuronoarabinoxylane [49], ainsi que les mannoses contenant des hémicelluloses incluant le mannane, le galactomannane et le galactoglucomannane [50].

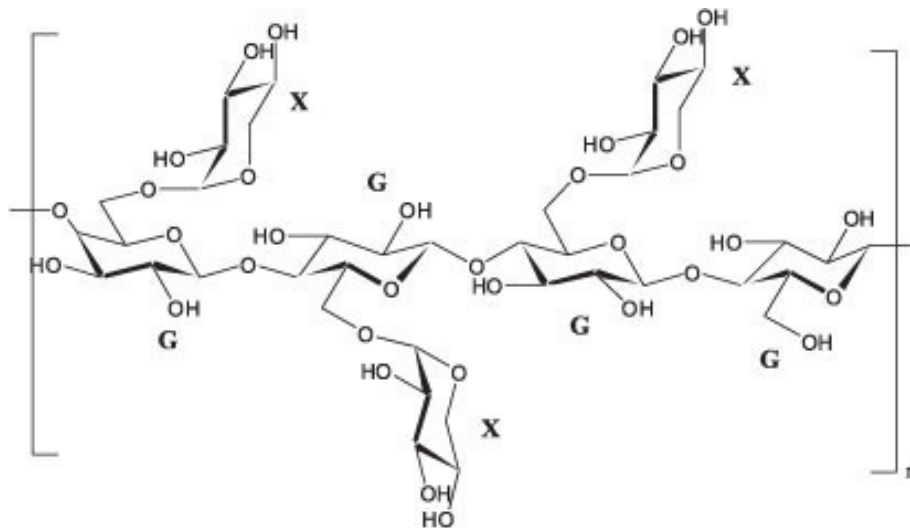
Les hémicelluloses ont comme caractéristique d'être facilement hydrolysables au contraire de la cellulose [51]. En général, les hémicelluloses ont une structure amorphe ; leur teneur et leur composition varient en fonction des essences [52].



**Figure I-14 :** Liaisons des xyloglucanes et des fibrilles de cellulose présentes dans la plupart des plantes.

### a) Xyloglucane

Les **xyloglucanes** qui ont un squelette de résidus glucose (Glc) sur lequel se greffent des résidus xylose (Xyl), galactose (Gal) et fucose (Fuc) ; on les trouve dans de nombreuses parois primaires. Les xyloglucanes (XyGs) ont été trouvés dans toutes les espèces de plantes terrestres, y compris les mousses, mais n'ont pas été trouvés dans les charophytes, qui sont, des algues vertes étroitement liées aux plantes terrestres [68, 69].



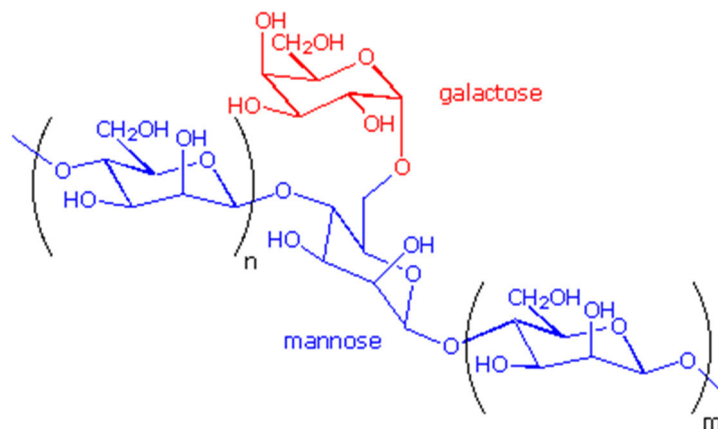
**Figure I-15 :** Structure moléculaire du Xyloglucane

### b) Galactomannane

**b-1) Définition :** Les galactomannanes ont la structure d'une chaîne polysaccharidique neutre, constituée d'un squelette linéaire composé d'unités de D-mannoses  $\beta$  (1-4) et de branchements latéraux courts formés d'unités de D-galactose  $\alpha$  (1-6) [70].



Ils se distinguent par leur teneur en unité galactose exprimée par le rapport mannose sur galactose (M/G), par la répartition des unités galactose le long de la chaîne de mannane et aussi par leur masse molaire. Cette différence dans la « microstructure » influence fortement les interactions moléculaires [71, 72] et les propriétés rhéologiques des solutions de galactomannanes. En outre, les galactomannanes sont des polysaccharides hydrosolubles et neutres [73].



**Figure I-16 :** Structure moléculaire du galactomannanes

### b-2) Propriété physique chimique

Les galactomannanes sont des épaississants purs comme les alginates. Ils forment des solutions dont la viscosité augmente avec la masse et la concentration moléculaire et diminue de façon réversible avec l'élévation de la température. Ces solutions ont un comportement pseudo-plastique : la solution paraît figée au repos mais devient souple avec agitation [74].

### b-3) Applications

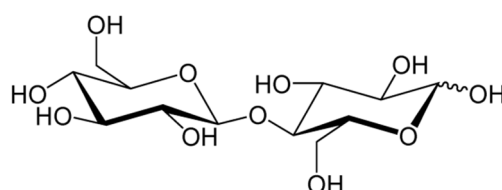
Comme ressources renouvelables, les hémicelluloses sont promises à un bel avenir industriel avec des produits comme des additifs alimentaires, des plastiques, des cosmétiques et des produits pharmaceutiques. Le plus grand marché pour les galactomannanes de guar est l'industrie alimentaire. Ils sont utilisés notamment comme agent épaississant dans l'industrie alimentaire (crèmes, glacées, mayonnaises, sauces, produits de boulangerie, les soupes et potages, produits laitiers, etc).

Les applications industrielles non alimentaires pour les galactomannanes de guar comprennent les industries du textile, du papier, des cosmétiques, des explosifs, peinture, encre, l'industrie pharmaceutique, le forage pétrolier et gazier, l'exploitation minière et

l'hydro ensemencement. Les galactomannanes de guar sont aussi connus pour leurs effets nutritionnels et médicaux [75].

### 3.1.5.5. La cellulose

**Structure chimique de la cellulose :** Du point de vue chimique, La cellulose est un homo-polysaccharide linéaire formée par la répétition d'unités D-anhydroglucopyranose (AGU) liées entre elles par des liaisons osidiques de type  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) [53, 54]. L'unité répétitive, composée de l'association de deux monomères de glucose (l'un droit, l'autre renversé), est appelée cellobiose (*Figure I-17*).



**Figure I-17 :** Structure de la cellobiose.

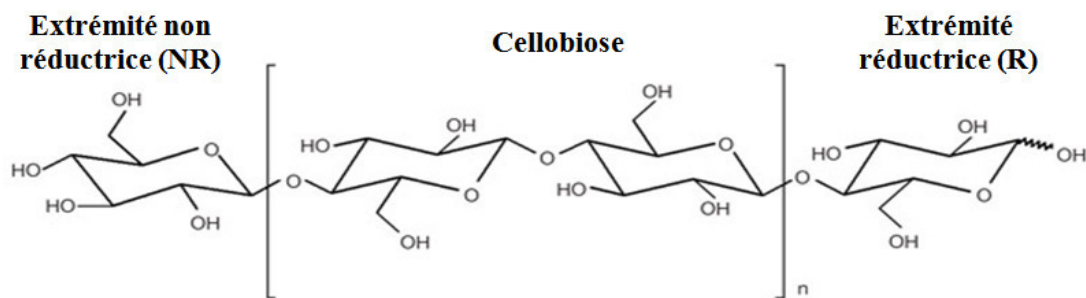
Le nombre d'unités glucose (n), ou degré de polymérisation (DP), détermine la longueur des chaînes, et varie selon l'origine végétale et pariétale (*Tableau I-3*). Il peut être compris entre 150 et 26500 [55, 56].

**Tableau I-3:** Degré de Polymérisation de la cellulose selon l'espèce végétale considérée.

| Espèce végétale            | DP          |
|----------------------------|-------------|
| Algue <i>Valonia</i>       | 26500       |
| Coton                      | 800 à 10000 |
| Cellulose bactérienne      | 800 à 10000 |
| Pulpe de bois              | 300 à 1700  |
| Cellulose microcristalline | 150 à 350   |

La masse molaire de la cellulose, ou directement son DP, peuvent être déterminés par diverses méthodes telles que : le viscosimètre, [57] la diffusion de la lumière, [58] ou la chromatographie d'exclusion stérique [59].

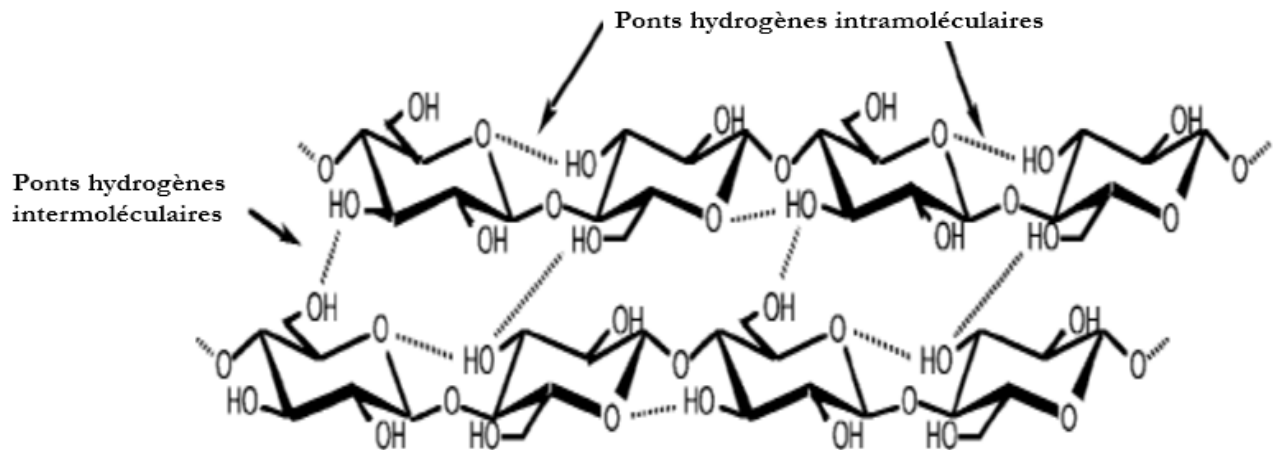
En raison de la structure orientée du polymère, les deux extrémités de la chaîne sont différentes et seule l'une d'elle présente un groupe hydroxyle hémiacétalique à propriété réductrice. L'extrémité réductrice (R) du polymère correspond à l'unité glucose dont l'hydroxyle en position anomérique est libre et donc en équilibre avec la forme aldéhyde, contrairement à l'extrémité opposée, dite non réductrice (NR), dans laquelle le groupement hydroxyle anomérique est engagé dans une liaison osidique (*Figure I-18*).



**Figure I-18 :** Représentation de la chaîne de cellulose.

Chaque unité anhydroglucose porte trois groupements hydroxyles libres: deux fonctions alcools secondaires sur les carbones -2 et -3 et un alcool primaire sur le carbone -6. Il existe donc trois sites de substitution possibles.

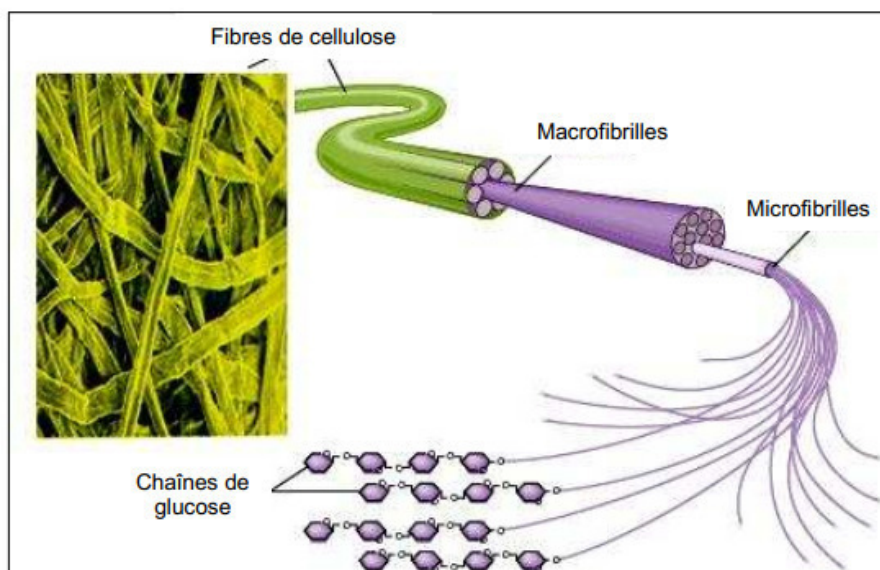
**Structure moléculaire de la cellulose :** Par liaisons hydrogène intramoléculaires entre deux résidus glucoses successifs, les chaînes de cellulose adoptent des structures linéaires dites « en ruban », très stables, qui s'associent entre elles *via* des liaisons hydrogènes intermoléculaires [60]. Ces liaisons hydrogène, intra- et intermoléculaires peuvent se former entre fonctions alcools ou entre fonction alcool et atome d'oxygène du cycle pyranose, créant ainsi un réseau tridimensionnel rigide de macromolécules de cellulose (*Figure I-19*).



**Figure I-19 :** Ponts hydrogènes intramoléculaires et intermoléculaires entre deux macromolécules adjacentes de cellulose [61].

Ces liaisons favorisent l'organisation des chaînes en domaines cristallins de taille importante et confèrent ainsi aux structures cellulosiques une rigidité et une résistance chimique exceptionnelles [62]. Dans la matière végétale, ces domaines, composés de plusieurs molécules de cellulose, s'associent en microfibrilles dans lesquelles les régions cristallines alternent avec des régions dites amorphes.

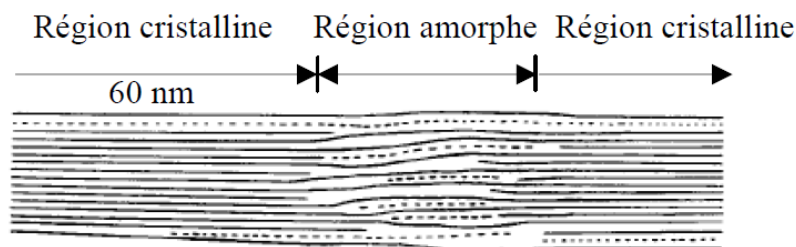
Ces dernières, moins ordonnées, sont plus fragiles et sensibles, notamment aux attaques enzymatiques. Finalement, les microfibrilles s'associent en macrofibrilles qui forment des unités constituantes de la fibre de cellulose (Figure I-20) [63, 64].



**Figure I-20 :** La cellulose à différentes échelles.



La structure de la cellulose a une grande influence sur le comportement chimique et les propriétés macroscopiques de celle-ci. Dans son état naturel, la cellulose est fibrillaire et partiellement cristalline: certaines régions sont hautement ordonnées (zones cristallines) et d'autres désordonnées (zones amorphes) [65].



**Figure I-21 :** Les régions cristallines et amorphes dans les microfibrilles de cellulose [61].

Ces deux dernières caractéristiques structurales ont pour conséquence immédiate de rendre la cellulose insoluble à la fois dans les solvants organiques classiques et dans l'eau. Cette insolubilité peut être un frein dans les méthodes d'obtention de la cellulose et de ses dérivés.

#### 3.1.5.5.1. Obtention de la cellulose

La cellulose est le constituant majeur des organismes photosynthétiques. Elle assure la protection et le soutien dans les composés végétaux. Elle se situe majoritairement dans la paroi des cellules végétales, avec une teneur variant de 15% à 99% selon l'espèce [77]. Il existe différentes méthodes pour obtenir de la cellulose comme par exemple l'extraction de la pulpe de bois (principale méthode), ou plus récemment la production de cellulose directement par des bactéries. Ces méthodes sont reprises succinctement ci-après.

##### a) Cellulose extraite de la pulpe de bois

La cellulose provenant du bois est la matière première la plus couramment employée pour l'obtention des dérivés cellulosiques. Cependant, ce polysaccharide est intimement lié aux autres polymères pariétaux (lignine, hémicelluloses) par des liaisons de type Van der Waals, mais aussi par des liaisons covalentes (esters ou éthers) [76].

L'extraction de la cellulose, appelée généralement « enrichissement en cellulose », se fait donc par désolidarisation de cette matrice polymérique. La teneur en cellulose du bois

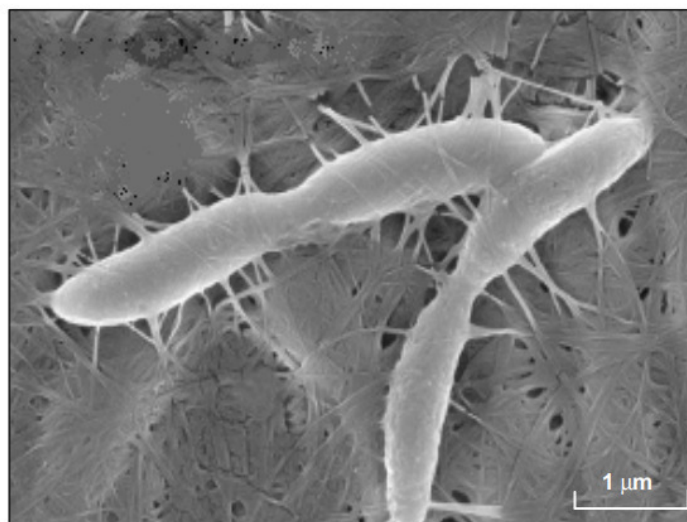
varie de 40 à 60%, et dépend de l'essence considérée, de la position dans le bois (écorces, bois jeune, bois vieux...), mais aussi des conditions climatiques et géographiques [78].

Cet enrichissement a lieu en général dans des conditions assez contraignantes (solvants organiques, températures élevées...) et entraîne la formation de déchets et des risques de pollution (ex : industrie papetière).

D'autres technologies, comme par exemple le vapocraquage, permettent une extraction moins polluante de la cellulose, mais restent cependant utilisées à l'échelle expérimentale [79].

### b) Cellulose bactérienne

La production de cellulose bactérienne a été mentionnée la première fois en 1886 par A.J. Brown [80]. Elle peut être synthétisée à partir de glucose, de glycérol et d'autres substrats organiques, par des bactéries de type *Acetobacter xylinum* (Figure I-22) [81].



**Figure I-22 :** Cliché d'*Acetobacter Xylinum* (obtenu par Microscopie Electronique à Balayage) produisant des nanofibres de cellulose [82].

La production de cellulose par des cultures en laboratoire est très intéressante pour avoir accès à de la cellulose pure en des temps très courts (1 à 4 jours) [83]. En effet, en définissant les conditions opératoires, il est possible de s'affranchir des variables (origine végétale, climat...), et ainsi obtenir une cellulose aux caractéristiques (DP, taux de cristallinité...) identiques et reproductibles [84].

### c) Cellulose microcristalline

La cellulose microcristalline est une cellulose purifiée et partiellement dépolymérisée [85]. Cette cellulose est obtenue par une hydrolyse contrôlée à 105°C avec des acides minéraux de l'alpha-cellulose provenant directement de fibres végétales. Plusieurs filtrations et lavages sont ensuite nécessaires pour purifier la suspension de cellulose.

La structure fibreuse est ainsi détruite pour redonner une structure particulière. Le changement de morphologie est induit par l'hydrolyse préférentielle des chaînes cellulosiques des zones amorphes. Ainsi, la cellulose microcristalline possède un haut degré de cristallinité (de 50 à 82%) et un DP plus faible compris entre 150 et 350 [86].

Les conditions d'obtention de la cellulose microcristalline, qui restent généralement confidentielles, influencent considérablement la pureté du produit final.

#### 3.1.5.5.2. Nanocelluloses

Les nouvelles technologies découlant de la nanocellulose permettent d'envisager le développement de nouveaux produits composites à base du bois [88, 89]. L'avantage de ces technologies est certainement la grande disponibilité de la matière première, la cellulose. Ce qui rend possible de fabriquer un produit à valeur ajoutée à partir d'une ressource renouvelable qui est grandement disponible et biodégradable.

Généralement, il existe 3 grandes méthodes pour préparer les nanocellulose. Le traitement mécanique, l'hydrolyse acide et le traitement alcalin.

#### a) Obtention des nanocelluloses par traitement mécanique

Les nanocelluloses qui obtenue par traitement mécanique appelées : nanofibre de cellulose ou nanofibrilles de cellulose ou cellulose nano-fibrillée (NFC/CNF) aussi appelée cellulose micro-fibrillée ou microfibrille de cellulose (CMF / MFC);

Pour fabriquer des nanocelluloses, Nakagaiton et Yano ont traité 30 fois une pâte kraft dans un raffineur et une fois dans un mélangeur sous haute pression pour obtenir une nanofibrillation de la pâte [90]. Avec ce procédé, les nanofibrilles produites demeurent attachées à la fibre. Une augmentation de la force a été observée, mais la grande consommation d'énergie est la principale limite de cette expérimentation [87].



Une autre méthode développée par Chakraborty et al. consiste à raffiner une pâte kraft sous haute intensité (125 000 rpm) pour ensuite appliquer une étape de «cryocrushing» [91].

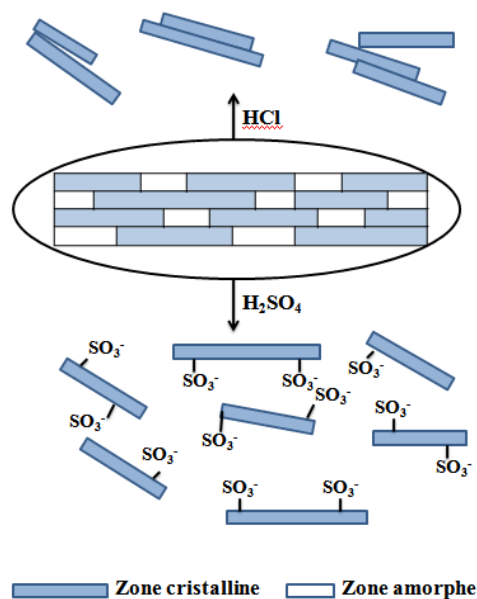
Le « cryocrushing » consiste à broyer une suspension de pâte qui a été préalablement congelée avec de l'azote liquide [91]. Dans leur cas, des nanocelluloses individuelles et attachées aux fibres ont été fabriquées. Cependant, tout comme dans le cas précédent, cette technique demande beaucoup d'énergie pour le raffinage ainsi que pour le «cryocrushing». Il est possible d'obtenir des nanocelluloses plus minces en utilisant l'homogénéisation sous haute pression combinée à d'autres procédés [87].

Cependant, ces techniques permettent rarement d'obtenir une aussi grande efficacité que les méthodes chimiques de fabrication de nanocelluloses.

### b) Obtention des nanocelluloses par hydrolyse acide

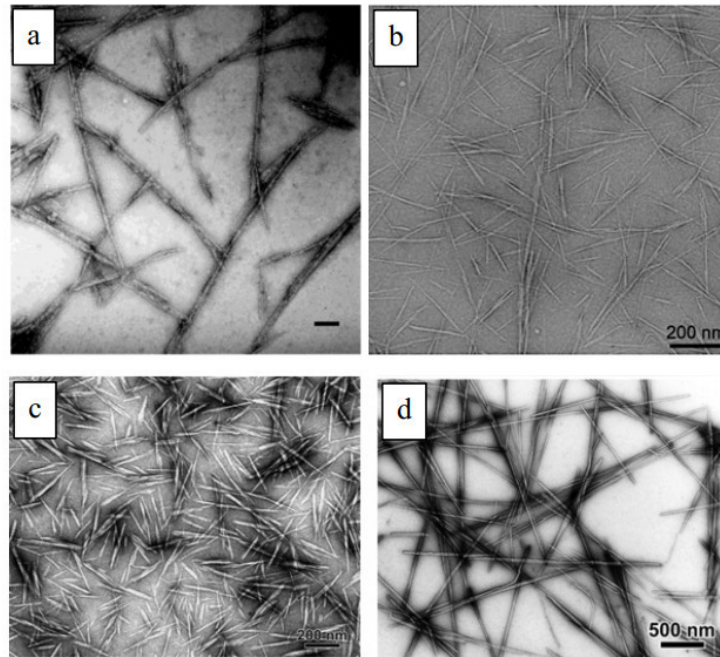
Les nanocelluloses qui obtenue par traitement mécanique appelées : nanocellulose cristalline ou nanocristaux de cellulose (NCC) aussi appelée cellulose nanocristalline (CNC) et encore nanocellulose whiskers ou nanowhiskers de cellulose (CNW / NCW).

L'hydrolyse chimique est certainement l'une des méthodes les plus utilisées pour la fabrication de nanocelluloses. En général, la technique consiste à dissoudre les zones amorphes de la cellulose afin de libérer uniquement les zones cristallines. La représentation de cette dissolution des zones amorphes est présentée à la *Figure I-23*.



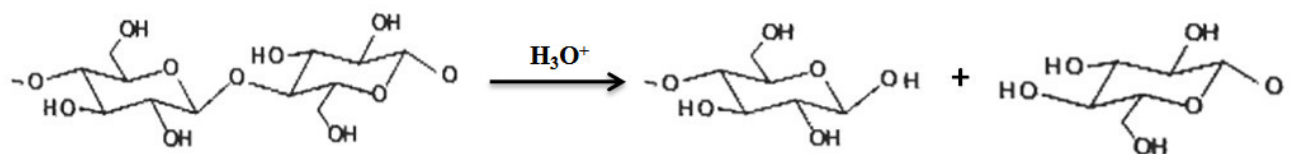
**Figure I-23 :** Hydrolyse acide de la cellulose

L'obtention de nanocellulose, de nanocelluloses et de whiskers de cellulose est reliée à la réactivité de la cellulose de sa liaison  $\beta$ -glycosidique et à la présence de ses trois groupes hydroxyles. Des micrographies de NCC obtenus à partir de différentes sources sont présentées *Figure I-24*. Les images ont été obtenues par microscopie électronique en transmission (MET).



**Figure I-24 :** Micrographie TEM de différentes NCC isolés à partir de différentes sources :  
*a) cellulose bactérienne [97] ; b) sisal [98] ; c) ramie [96] ; d) tunicier [95].*

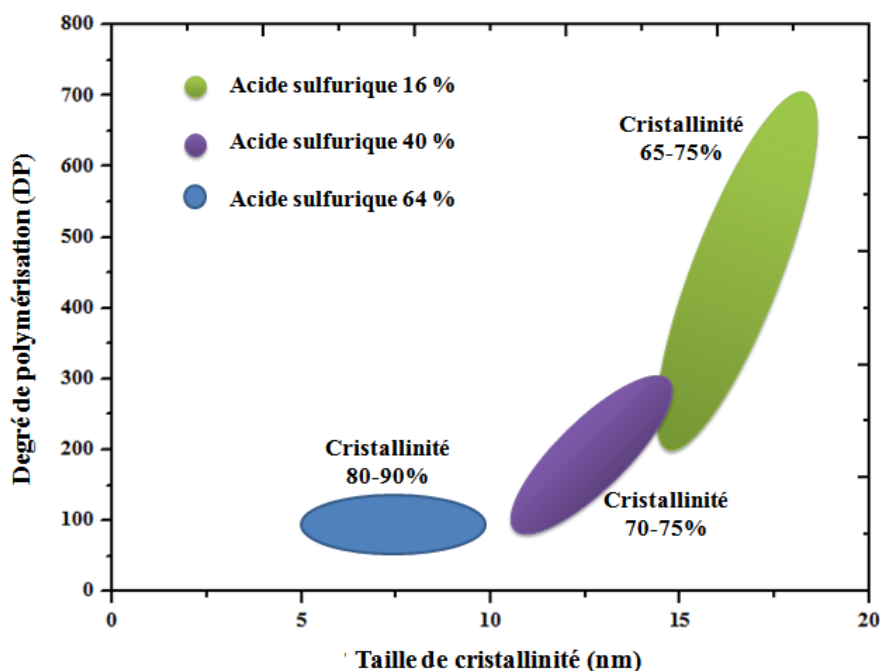
La liaison glycosidique est particulièrement sensible à une hydrolyse acide (sulfurique, chlorhydrique, phosphorique). L'importance de la dépolymérisation dépend de la force de l'acide, de sa concentration, de la température et de la durée de la réaction (*Figure I-25*)



**Figure I-25 :** Mécanisme de l'hydrolyse acide de la cellulose.

L'avantage de l'hydrolyse acide est la fabrication d'un matériel hautement cristallin. Les principales limites de cette méthode reposent sur la production de sous-produits sulfonés, l'utilisation d'acide sulfurique concentré, l'impact environnemental pour la disposition de l'acide résiduel et la faible teneur en matière sèche de la suspension aqueuse [92].

Suivant les conditions d'hydrolyse, on obtiendra des nanoparticules de taille et de cristallinité variable (*Figure I-26*). Plus le substrat est exposé à l'acide, plus l'hydrolyse de la phase amorphe est importante, accompagnée d'une perte en diamètre des cristaux.



**Figure I-26 ;** Évolution du degré de polymérisation et de la cristallinité des NCC obtenus par hydrolyse acide de la pâte de bois résineux à différentes concentrations, d'après [99].

### c) Obtention des nanocelluloses par oxydation alcaline

L'ionisation de la surface de microfibrilles de cellulose permet de les séparer en nanocelluloses. Lorsque les groupements ioniques sur la cellulose sont des groupements sulfoniques, ceux-ci pourraient améliorer la formation de nanocellulose. Il est également possible de préparer les nanocelluloses par une oxydation avec l'hypochlorite de sodium catalysée par le radical TEMPO (2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyle), pour introduire des groupements carboxyles à la surface afin de faciliter la dispersion et la stabilisation dans l'eau.

L'avantage de cette méthode réside dans le fait que la cellulose conserve ses régions amorphes, la nanocellulose de cellulose ainsi formée possède une polydispersité en longueur plus homogène et une réactivité plus importante que les monocristaux obtenus par hydrolyse acide puisque la cellulose conserve ses régions amorphes.

Le *Tableau I-4* présente les caractéristiques des nanocelluloses selon la méthode de fabrication et la source des fibres. Ces caractéristiques sont issues de plusieurs travaux [87, 93, 94].

**Tableau I-4 :** *Types et caractéristiques de nanocelluloses selon l'origine* [87, 93, 94].

| Méthode de fabrication | Type    | Source  | Longueur (nm) | Largeur (nm) |
|------------------------|---------|---|---------------|--------------|
| Mécanique              | NCC/NFC | Végétaux  | 200 à microns | 5-40         |
| Chimique               | NFC     | Végétaux  | 100-300       | 10-20        |
| Mécanique et Chimique  | NFC     | Invertébrés tuniciers (source animale), coton bactéries | 200 à microns | 5-20         |

### 3.1.5.5.3. Applications des nanocelluloses

Les applications de la nanocellulose sont nombreuses, elles peuvent être utilisées dans les situations suivantes :

- Application de ses propriétés optiques (transparence)
- Matériel conducteur
- Applications médicales
- Agent de force et de structure (nanocomposites)

Les nanocelluloses ont comme propriété optique d'être transparentes [103-105]. Ceci a d'ailleurs permis de mettre au point un système de visionnement organique (OLED) fabriqué à partir de nanocellulose [100, 108]. Le principal intérêt est d'obtenir des matériaux nanocomposites qui sont à la fois résistants et transparents.

Bien que les nanocelluloses ne puissent conduire directement le courant, certaines études ont démontré qu'il était possible d'obtenir un matériau conducteur à partir de nanocelluloses [106]. Ceci est particulièrement intéressant dans la fabrication de papiers électroniques [100].

Il a également été démontré que les nanocelluloses pourraient être utilisées dans le milieu médical. Dong et Roman ont démontré en 2007 la possibilité d'utiliser des agents fluorescents sur de la cellulose nanocristalline [107]. Cette application permettrait d'attacher des nanocelluloses fluorescentes sur des cellules cibles dans l'organisme afin de les identifier

[107]. La croissance de tissus serait également possible en utilisant des nanocelluloses comme points d'ancrage [100]. Une revue de la littérature de Liang et al. montre plusieurs utilisations de nanocelluloses modifiées sur lesquelles des cellules étaient greffées et bien ancrées [109].

L'application la plus étudiée des nanocelluloses reste leur utilisation comme agent de force dans des matériaux composites. En effet, les nanocelluloses possèdent des propriétés physiques très intéressantes lorsque comparées avec des fibres de pâte kraft (*Tableau I-5*) [110].

**Tableau I-5 :** *Propriétés de cellulose nanocristalline avec une pâte kraft de résineux*

| Propriétés                | Cellulose nanocristalline | Pâte kraft (résineux) |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Longueur (nm)             | 200                       | 1 500 000             |
| Diamètre (nm)             | 10                        | 30 000                |
| Surface spécifique        | 6000                      | 1                     |
| Force de rupture (MPa)    | 10 000                    | 700                   |
| Module d'élasticité (GPa) | 150                       | 20                    |

Une particule de cellulose nanocristalline possède une surface spécifique 6000 fois plus grande qu'une fibre de pâte kraft de résineux. De plus, la force de rupture est 14,3 fois plus élevée dans le cas de la cellulose nanocristalline, le module d'élasticité est également plus élevé (*Tableau I-5*).

Il existe plusieurs travaux sur l'application de nanocelluloses comme agent de force [100]. Seulement deux exemples sont présentés dans ce cas-ci. Premièrement, des nanocelluloses préparées par hydrolyse enzymatique sont utilisées dans un matériau nanocomposite contenant de la mélamine-formaldéhyde [101]. Comme autre application, des nanofibres préparées avec une oxydation au TEMPO sont utilisées conjointement avec du poly(amideamine) epichlorhydrine pour améliorer la force de papiers [102].





---

## Les références du chapitre I

---

- [1]: Thy, P., Jenkins, B. M., Grundvig, S., Shiraki, R., Lesher, C. E. (2006). High temperature elemental losses and mineralogical changes in common biomass ashes. *Fuel*, 85 (5-6), 783-795.
- [2]: Mohanty, A. K., Misra, M., Hinrichsen, G. (2000). Biofibers, biodegradable polymers and biocomposites: an overview. *Macromolecular materials and Engineering*, 276 (1), 1-24.
- [3]: Club Bio-plastiques. (2007). Les bio-plastiques d'origine végétale: des produits renouvelables et biodégradables. Note du Club Bio-plastiques.
- [4]: Jarroux, N. (2008). Les biopolymères: différentes familles, propriétés et applications. Ed. Techniques Ingénieur, AM, 1-16.
- [5]: [www.agrobiobase.com](http://www.agrobiobase.com). Site internet sur les produits biosourcés.
- [6]: Renaud, M., Barbie, C., Augagneur, C. (1995). Arthroplasty nowadays: use of biomaterial for a perfect implant [hip prosthesis, supporting materials, rubbing materials, covering materials, biological anchorage]. *Sciences Veterinaires Medecine Comparee (France)* 97, p 15-32.
- [7]: Williams, D. F. (Ed.). (1987). Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986 (Vol. 4). Elsevier Science Limited, p 72.
- [8]: Rabetafika, H. N., Paquot, M., Dubois, P. (2006). Les polymères issus du végétal: matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 10 (3), 185-196.
- [9]: Monchau-Godbille, F. (2001). Elaboration et caractérisations physico-chimiques et biologiques de biocéramiques utilisées comme substituts osseux, thèse de doctorat, Université de Lille 2, p 260.
- [10]: Anne-sophie, C. (2001). Contribution à l'étude des biomatériaux pour la réparation pariétale en chirurgie, thèse de doctorat, Université Claude-Bernard de Lyon, p 100.
- [11]: Martin, D. P., Williams, S. F. (2003). Medical applications of poly-4 hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical engineering journal*, 16 (2), 97-105.



- [12]: **Shih, L., Shen, M. H., Van, Y. T. (2006).** Microbial synthesis of poly ( $\epsilon$ -lysine) and its various applications. *Bioresource Technology*, 97 (9), 1148-1159.
- [13]: **Teixeira, P., Oliveira, R. (1999).** Influence of surface characteristics on the adhesion of *Alcaligenes denitrificans* to polymeric substrates. *Journal of adhesion science and technology*, 13 (11), 1287-1294.
- [14]: **Conort, P., Pariente, J. L. (2005).** Biomatériaux synthétiques et métaux: application aux prothèses urétrales. *Progrès en urologie*, 15, 925-941.
- [15]: **Chatal, V., (2006).** Biomatériaux, Dossier: Tout Savoir sur la Recherche, p 5.
- [16]: **Silva, G. A., Ducheyne, P., Reis, R. L. (2007).** Materials in particulate form for tissue engineering. 1. Basic concepts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1 (1), 4-24.
- [17]: **Schmidt, R. (1999).** Comportement des matériaux dans les milieux biologiques: applications en médecine et biotechnologie (Vol. 7), Presses Polytechniques et Universitaires, Paris, p 464.
- [18]: **Middleton, J. C., Tipton, A. J. (1998).** Materials: Synthetic biodegradable polymers as medical devices. *Medical Plastics and Biomaterials Magazine*, 30-39.
- [19]: **Liu, J. W., Zhao, Q., Wan, C. X. (2001).** Research progresses on degradation mechanism in vivo and medical applications of polylactic acid. *Hang tian yi xue yu yi xue gong cheng= Space medicine & medical engineering*, 14 (4), 308-312.
- [20]: **Yamaguchi, I., Itoh, S., Suzuki, M., Sakane, M., Osaka, A., Tanaka, J. (2003).** The chitosan prepared from crab tendon I: the characterization and the mechanical properties. *Biomaterials*, 24 (12), 2031-2036.
- [21]: **Ikada, Y., Tsuji, H. (2000).** Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular rapid communications*, 21 (3), 117-132.
- [22]: **Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D. L. (2003).** Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24 (3), 401-416.
- [23] : **Villars, F., Pariente, J. L., Conort, P. (2005).** Le Marquage CE pour les dispositifs médicaux. *Progrès en Urologie*, 15, 985-991.
- [24]: **Rocher, P. H., Veron, C., Vert, M., Chanavaz, M., Donazzan, M., Hildebrand, H. F. (1995).** Risques et réglementations relatifs aux matériaux utilisés en implantologie et



chirurgie maxillo-faciale. *Revue de stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale*, 96 (4), 281-292.

[25]: **Kaur, L., Singh, J., Liu, Q. (2007).** Starch—a potential biomaterial for biomedical applications. In *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications* (pp. 83-98). Springer, Dordrecht.

[26]: **Hoenic, N. A. (2007).** Cellulose for medical applications: past, present, and future. *Bio Resources*, 1 (2), 270-280.

[27]: **Williams, S., Martin, D. (2002).** *Biopolymers. Vol. 4. Polyesters III - Applications and Commercial Products*, Wiley-VCH, Weinheim, p 127.

[28]: **Pillai, O., Panchagnula, R. (2001).** Polymers in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 5 (4), 447-451.

[29]: **Chen, G. Q., Wu, Q. (2005).** The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26 (33), 6565-6578.

[30]: **Wiseman, D.M., Saferstein, L. (1998).** Brevet: Bioabsorbable medical devices from oxidized polysaccharides.

[31]: **Chandra, R., Rustgi, R. (1998).** Biodegradable polymers. *Progress in polymer science*, 23 (7), 1273-1335.

[32]: **Edith, D., Six, J. L. (2006).** Surface characteristics of PLA and PLGA films. *Applied Surface Science*, 253 (5), 2758-2764.

[33]: **Miyamoto, T., Takahashi, S. I., Ito, H., Inagaki, H., Noishiki, Y. (1989).** Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 23 (1), 125-133.

[34]: **Ayala GG., Malinconico M., Laurienzo P., (2008).** Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification and uses. *Molecules*, vol.13: 2069-2106.

[35]: **Yang L., Zhang LM. (2009).** Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, Vol.76: 349-361.

[36] : **Ruff Y. (2008).** *Biopolymers dynamiques: oligo-et polysaccharides*. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, 308 p.



- [37]: Cohen, M., Josester, D., Geiger, B., Addadi, L. (2004). Spatial and Temporal Sequence of Events in Cell Adhesion: From Molecular Recognition to Focal Adhesion Assembly. *Chem Bio Chem*, 5, 1393-1399.
- [38]: Rekharsky, M.V., Inoue Y. (1998). Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chemical Reviews* 98, 1875-1917.
- [39]: A. R. Hedges. A.R. (1998). Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chemical Reviews* 98, 2035-2044.
- [40]: Characklis W.G., McFeters G.A., Marshall K.C. (1989). *Biofilms*, Wiley-Interscience, p. 195-341.
- [41]: Glazebrook, J., Reed, J. W., Reuber, T. L., Walker, G. C. (1990). Genetic analyses of *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides. *International journal of biological macromolecules*, 12 (2), 67-70.
- [42]: Sutherland, I. W. (1982). Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 23, pp. 79-150). Academic Press.
- [43]: Stephen, A. M. (Ed.). (1995). *Food polysaccharides and their applications* (Vol. 67). CRC press.
- [44]: Lapčik, L., Lapcik, L., De Smedt, S., Demeester, J., Chabreck, P. (1998). Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chemical reviews*, 98 (8), 2663-2684.
- [45]: Milas, M., Rinaudo, M., Roure, I., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Williams, P. A. (2001). Comparative rheological behavior of hyaluronan from bacterial and animal sources with cross-linked hyaluronan (hylan) in aqueous solution. *Biopolymers*, 59 (4), 191-204.
- [46]: K. Gessler, I. Uson, T. Takaha, N. Krauss, S. M. Smith, S. Okada, G. M. Sheldrich, W. Saenger. (1999). V-Amylose at Atomic Resolution: X-ray Structure of a Cycloamylose with 26 Glucose Residues (cyclomaltohexacosose). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 4246-4251.
- [47]: Reiter W.D, Chapple C, Somerville C.R, (1997). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered cell wall polysaccharide composition, *The Plant Journal*, 12, 335-345.
- [48]: Himmel, M. (2009). *Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*.



- [49]: Darvill J.E, McNeil M, Darvill A.G, Albersheim P, (1980). Structure of plant cell walls. XI. Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells, *Plant Physiology*, 66, 1135-1139.
- [50]: Stephen A.M, (1982). Other plant polysaccharides. In *The Polysaccharides*, Academic Press, New York, 2, 97-193.
- [51]: Dhepe.PL; Sahu.R. (2010). A Solid-Acid-Based Process for the Conversion of Hemicellulose. *Green Chemistry* 12, 2153–2156.
- [52]: Navi, P. Heger, F. (2005). “Comportement thermo-hydrromécanique du bois”, Presses polytechniques et universitaires romandes.
- [53]: J.L. Guignard, (2000). *Biochimie végétale - 2<sup>e</sup> édition*, Dunod, Paris, 274 p.
- [54]: B. Montiès, (1980). *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, Bordas, Paris, 345 p.
- [55]: E.S. Wilks, (2001). *Industrial Polymers Handbook*, Wiley-VCH, Weinheim, 2367 p.
- [56]: D. Klemm, B. Heublein, H.P. Fink, A. Bohn, (2005). *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 3358-3393.
- [57]: P.J. Flory, (1953). *Principles of polymer chemistry*, Cornell University Press, New York, chap.6, 605 p.
- [58]: Kasaai, M. R. (2002). Comparison of various solvents for determination of intrinsic viscosity and viscometric constants for cellulose. *Journal of applied polymer science*, 86 (9), 2189-2193.
- [59]: Röder, T., Morgenstern, B., Schelosky, N., Glatter, O. (2001). Solutions of cellulose in N, N-dimethylacetamide/lithium chloride studied by light scattering methods. *Polymer*, 42 (16), 6765-6773.
- [60]: French, A. D., Miller, D. P., Aabloo, A. (1993). Miniature crystal models of cellulose polymorphs and other carbohydrates. *International journal of biological Macromolecules*, 15 (1), 30-36.
- [61]: Jebrane, M. (2009). *Fonctionnalisation chimique du bois par transesterification des esters d'enol*. Thèse de doctorat université Bordeaux 1, p 17-18.
- [62]: Mansfield, S. D., Mooney, C., Saddler, J. N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology progress*, 15 (5), 804-816.



[63]: **Gandini, A., Belgacem, M.N. (2008).** Monomers, polymers and composites from renewable resources, Elsevier, Amsterdam, 560 p.

[64]:[http://www.cegestefoy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/fya/chimcell/notesmolecules/gluucides\\_3.htm](http://www.cegestefoy.qc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/fya/chimcell/notesmolecules/gluucides_3.htm), **2010**.

[65]: **O'sullivan, A. C. (1997).** Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4 (3), 173-207.

[66]: **Jia. S; Cox. BJ; Guo. X; Zhang. C; Ekerdt. JG. (2010).** cleaving the  $\beta$ O4 Bonds of Lignin Model Compounds in an Acidic Ionic Liquid, 1-H-3-Methylimidazolium Chloride: An Optional Strategy for the Degradation of Lignin. *Chem Sus Chem*, 3, 1078–1084.

[67]: **Fengel, D., Wegener, G. (1989).** “Wood: Chemistry, Ultrastructure, and Reactions”, Walter de Gruyter-Berlin, New York.

[68]: **Scheller, H. V., Ulvskov, P. (2010).** Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61; 263, 2010

[69]: **Popper, Z. A., Tuohy, M. G. (2010).** Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls. *Plant physiology*, 153 (2), 373-383.

[70] : **Buckeridge, M. S., dos Santos, H. P., Tiné, M. A. S. (2000).** Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (1-2), 141-156.

[71]: **Lopes da Silva, F. H., Witter, M. P., Boeijinga, P. H., Lohman, A. H. (1990).** Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiological reviews*, 70 (2), 453-511.

[72] : **Mao, D. W., Li, J. X., Hong, Y. (2006).** The duration and plantar pressure distribution during one-leg stance in Tai Chi exercise. *Clinical Biomechanics*, 21 (6), 640-645.

[75]: **Patmore, J. V., Goff, H. D., Fernandes, S. (2003).** Cryo-gelation of galactomannans in ice cream model systems. *Food Hydrocolloids*, 17 (2), 161-169.

[76] : **Monties, B. (1980).** Les polymères végétaux : Polymères pariétaux et alimentaires non azotés. Gauthier-Villard, Bordas, Paris, 1980, p 345.

[77]: **Saka, S. (2000).** Chemical composition and distribution. *Wood and cellulosic chemistry*, 2nd ed., DNS Hon, N. Shiraishi, 51-81.



- [78] : **Champetier, G., & Monnerie, L. (1969).** Introduction a la chimie macro-moleculaire, Masson et Cie editeurs, Paris, p 737.
- [79] : **Ibrahim, M., & Glasser, W. G. (1999).** Steam-assisted biomass fractionation. Part III: a quantitative evaluation of the “clean fractionation” concept. *Bioresource Technology*, 70 (2), 181-192.
- [80]: **Brown, A. J. (1886).** XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49, 432-439.
- [81]: **Jonas, R., & Farah, L. F. (1998).** Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, 59 (1-3), 101-106.
- [82]: <http://www.azonano.com/news.asp?newsID=8590>
- [83]: **Laboureur, P.F. (1989).** Brevet : Procédé de production de cellulose bactérienne à partir de matière d'origine végétale.
- [84]: **Berlioz, S. (2007).** Etude de l'estérification de la cellulose par une synthèse sans solvant. Application aux matériaux nanocomposites, thèse doctorat, Université Joseph-Fourier-Grenoble 1, p 293.
- [85]: **Egal, M. (2006).** Structure and properties of cellulose/NaOH aqueous solutions, gels and regenerated objects, thèse de doctorat, Ecole des mines de Paris, p 245.
- [86]: **Doelker, E., Gurny, R., Schurz, J., Janosi, A., & Matin, N. (1987).** Degrees of crystallinity and polymerization of modified cellulose powders for direct tableting. *Powder technology*, 52 (3), 207-213.
- [87]: **Hubbe, M. A., Rojas, O. J., Lucia, L. A., & Sain, M. (2008).** Cellulosic nanocomposites: a review. *BioResources*, 3 (3), 929-980.
- [88]: **Szwarc, M., (1956),** «Livingpolymers », *Nature* 178: 1168-1169.
- [89]: **Agarwal, M., Lvov, Y., & Varahramyan, K. (2006).** Conductive wood microfibrils for smart paper through layer-by-layer nanocoating. *Nanotechnology*, 17 (21): 5319-5325.
- [90]: **Nakagaito, A. N., & Yano, H. (2004).** The effect of morphological changes from pulp fiber towards nano-scale fibrillated cellulose on the mechanical properties of high-strength plant fiber based composites. *Applied Physics A*, 78 (4), 547-552.



- [91]: Chakraborty, A., Sain, M., & Kortschot, M. (2005). Cellulose microfibrils: a novel method of preparation using high shear refining and cryocrushing. *Holzforschung*, 59 (1), 102-107.
- [92]: Zhang, J., Elder, T. J., Pu, Y., & Ragauskas, A. J. (2007). Facile synthesis of spherical cellulose nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 69 (3), 607-611.
- [93]: Saito, T., Nishiyama, Y., Putaux, J. L., Vignon, M., & Isogai, A. (2006). Homogeneous suspensions of individualized microfibrils from TEMPO-catalyzed oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, 7 (6), 1687-1691.
- [94]: Henriksson, M., Henriksson, G., Berglund, L. A., & Lindström, T. (2007). An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *European Polymer Journal*, 43 (8), 3434-3441.
- [95]: Elazzouzi-Hafraoui, S., Nishiyama, Y., Putaux, J. L., Heux, L., Dubreuil, F., & Rochas, C. (2007). The shape and size distribution of crystalline nanoparticles prepared by acid hydrolysis of native cellulose. *Biomacromolecules*, 9 (1), 57-65.
- [96]: Habibi, Y., & Dufresne, A. (2008). Highly filled bionanocomposites from functionalized polysaccharide nanocrystals. *Biomacromolecules*, 9 (7), 1974-1980.
- [97]: Roman, M., & Winter, W. T. (2004). Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. *Biomacromolecules*, 5 (5), 1671-1677.
- [98]: De Rodriguez, N. L. G., Thielemans, W., & Dufresne, A. (2006). Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nanocomposites. *Cellulose*, 13 (3), 261-270.
- [99]: Börjesson, M., & Westman, G. (2015). Crystalline nanocellulose—preparation, modification, and properties. In *Cellulose-Fundamental Aspects and Current Trends*. InTech. 159– 191.
- [100]: Hubbe M.A., Rojas, Lucia, L.A. et Sain M. (2008). "Cellulosic nanocomposites: A review". *Bioresources*. Vol. 3, no. 3, p. 929-980.
- [101]: Henriksson, M., Berglund, L.A. (2007). "Structure and properties of cellulose nanocomposite films containing melamine formaldehyde". 1. *Appl. Polymer Sci.* Vol. 106, no.4, p.2817-2824.





- [102] : Ahola, S., Osterberg, M. et Laine I. (2008). "Cellulose nanofibrils - adsorption with poly(amideamine) epichlorhydrin studied by QCM-D and application as paper strength additive". Cellulose. Vol. 15, no. 2, p. 303-314.
- [103] : Iwamoto, S., Nakagaito, A.N., Yano, N. et Nogi, M. (2005). "Optically transparent composites reinforced with plant fiber-based nanofibers". Appl. Phys. A. Vol. 81, no. 6, p. 1109-1112.
- [104]: Yano, H., Sugiyama, J. , Nakagaito, A.N. , Nogi, M. , Matsuura, T. , Hikita, M. et Handa, K. (2005). "Optically transparent composites reinforced with network of bacterial nanofibers". Adv. Mater. Vol. 17, no. 2, p. 153-155.
- [105] : Fukuzumi, H., Saito, T., Iwata, T., Kumamoto, Y. et Isogai, A. (2009). "Transparent and High gas barrier films of cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation". Biomacromol. Vol. 10, no. 1, p. 163-165.
- [106] : Agarwal, M., Lvov, Y. et Varshney, K. (2006). "Conductive wood microfibrils for smart paper through layer-by-layer nanocoating". Nanotechnol. Vol. 17, no. 21, p. 5319-5325.
- [107] : Dong, S. et Roman, M. (2007). "Fluorescently Labeled Cellulose nanocrystals for bioimaging applications ". J. Amer. Chem. Soc. Vol. 129, no. 45, p. 13810-13811.
- [108] : Okahisa, Y., Yoshida, A., Miyaguchi, S. et Yano, H. (2009). "Optically transparent wood-cellulose nanocomposite as a base substrate for flexible organic light emitting diode displays". Composite Sci. Technol. Vol. 69, no. 11-12, p. 1958-1961.
- [109] : Liang, D., Hsiao, B.S. et Chu, B. (2007). "Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications". Advan. Drug.Delivery. Rev. Vol. 59, no. 14, p.1392-1414.
- [110]: Bouchard, I. (2007.) « Nanotechnologie et industrie forestière ». FPIInnovations, Paprican



## Chapitre II

---

### Etude Botanique du Citrullus Colocynthis

---

## Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude botanique de la plante "*Citrullus colocynthis*" (Cucurbitacée) avec la description des noms vernaculaires, taxonomie et position systématique, des différentes parties de la plante, origine et répartition géographique, actions et effets thérapeutiques, leur composition chimique, leur toxicité et à la fin leur usages traditionnel et populaire.

### 1. PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE (*CITRULLUS COLOCYNTHIS*)

Le Sahara, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde, possède dans sa partie Nord, le Sahara septentrional une végétation diffusée et clairsemée. La flore est variée dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts plateaux, la steppe et les oasis sahariennes, dont on trouve plus de 300 espèces végétales spontanées dans la région présaharienne. Une grande partie de ces ressources végétales sont rencontrées à l'état spontané [1].



**Figure II-1:** La plante de *Citrullus colocynthis* (Cucurbitaceae) dans le Sahara Algérien.

La famille des Cucurbitaceae est l'une des plus diverses parmi les plantes alimentaires [2], comportant les courges, les citrouilles, les melons, les concombres, les pastèques. Les plantes de cette famille sont généralement tolérantes à la sécheresse, mais sensibles au gel.

Notre étude s'est portée sur l'espèce *Citrillus colocynthis*, connue pour ses vertus dans la médecine traditionnelle.

## 2. NOMS VERNACULAIRES

La *Citrullus colocynthis* possède plusieurs noms vernaculaires comme : **Arabe:** Handal, Hadag, Handhal; Hantal, Hadjj. **Berber:** Taberka, Tefersite, Tadjellet [3]. **Français:** coloquinte, chicotin. **Anglais:** Colocynth, bitter apple, bitter gourd [2]. **Allemand:** Bitter zitrusse, Bitter apfel. **Inde:** Tumba ou Gartoomba. **Italien:** coloquintida, popone amaro coloquinte [4].

## 3. TAXONOMIE ET POSITION SYSTEMATIQUE

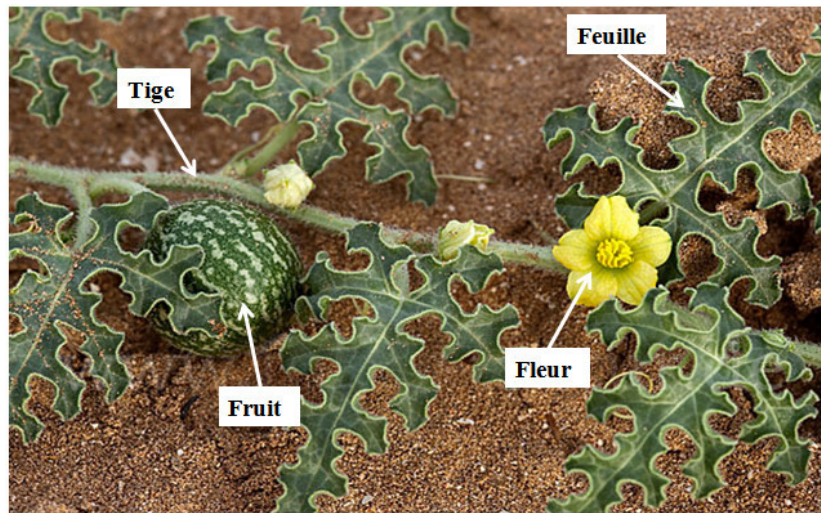
D'après Ozenda [5] et Zoro et al. [6], la position systématique de la *Citrullus colocynthis* (coloquinte) est donnée comme suite :

- **Super division :** Spermaphytes
- **Division :** Angiospermes
- **Classe :** Dicotylédones
- **Sous classe :** Dialypétales
- **Règne :** Végétal
- **Sous règne :** Plantes vasculaires
- **Ordre :** Violales
- **Famille :** Cucurbitacées
- **Genre :** *Citrullus*
- **Espèce (Nom binominal):** *Citrullus colocynthis* (L.) Schard

## 4. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE ET BOTANIQUE

*Citrullus colocynthis* est une plante rampante herbacée, annuelle ou vivace. Les tiges sont angulaires, rugueuses, rampantes ou migrantes et rudes, qui s'étalent sur le sol et pouvant dépasser 1m de long. C'est une plante hispide mais à poiles non piquantes [5]. Les différentes parties de la plante sont illustrées dans la *figure II-2*.





**Figure II-2:** La plante de *Citrullus colocynthis* (Cucurbitacées) avec ses différentes parties (Tige, Feuille, Fleurs et Fruit).

Les feuilles sont larges de 5 à 10 cm de longueur et découpées en 5 à 7 lobes, munies de fleurs jaunes verdâtres à sexes séparés, solidaires aux axilles des feuilles (*Figure II-3*), apparaissent l'été entre Mai et Août.



**Feuille**

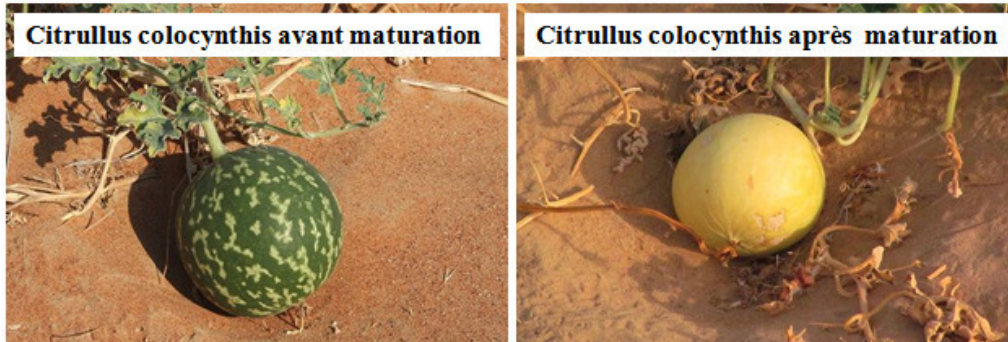
**Fleur**



**Feuille et Fleur**

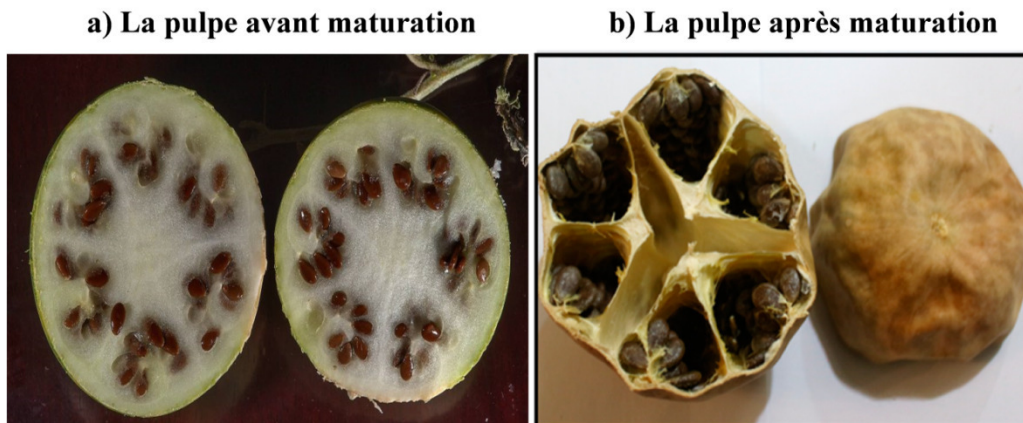
**Figure II-3:** Les feuilles et les fleurs de la plante de *Citrullus colocynthis* (Cucurbitacées).

Chaque plante produit 15-30 fruits appelés gourdes [3, 7]. Cette espèce se distingue par ses fruits sphériques ; de 7 à 10 cm de diamètre, ressemblant à une petite pastèque, d'une couleur verte panachée de jaune clair qui devient complètement jaune à maturité (*figure II-4*).

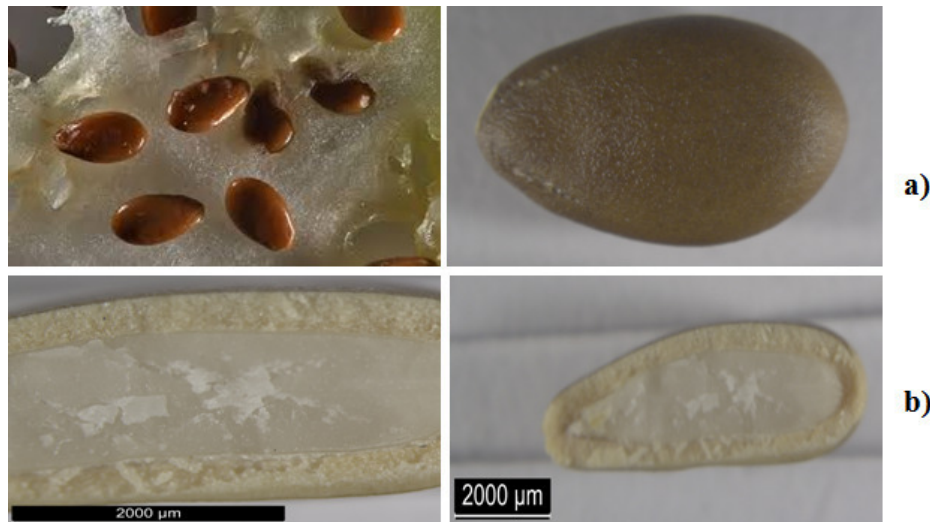


**Figure II-4:** Fruits de la plante de *Citrullus colocynthis* (Cucurbitacées) avant et après maturation.

La pulpe à l'intérieur légère, spongieuse et blanchâtre (*Figure II-5*) contient de très nombreuses graines brunes de petite taille (6mm de longueur), ovoïdes et aplaties, lisses, de couleur variant de l'orange au brun noirâtre et qui sont extrêmement amères (*Figure II-6*) [8].



**Figure II-5:** La pulpe de la plante de *Citrullus colocynthis* (Cucurbitacées) avant et après maturation.



**Figure II-6:** Les graines de la plante de *Citrullus colocynthis* (Cucurbitacées) ; **a)** graine complète, **b)** graine en section longitudinale.

## 5. ORIGINE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

La *Citrullus colocynthis* est originaire des sols arides. Cette plante est très fréquente et répandue dans les régions tropicales humides ou modérément sèches. Elle est peu présente dans les zones tempérées [9]. Elle occupe une région très vaste qui s'étend du Nord Africain, du Sahara, Egypte, Arabie Saoudite jusqu'en Inde, ainsi que la région méditerranéenne (sud européen) [2, 10, 11]. D'après Ozenda [5], la coloquinte est commune dans tout le Sahara, au niveau des terrains sablonneux et sablo-argileux.

Le fruit de cette espèce a été introduit par les Arabes au moyen âge en Espagne et à Chypre et aussi a été cultivée dans les pays tropicaux comme plante médicinale pour la pulpe de ses fruits [12, 13].

## 6. ACTIONS ET EFFETS THERAPEUTIQUES

*Citrullus colocynthis* a une riche histoire comme plante médicinale, car elle possède diverses propriétés thérapeutiques. Les différentes parties de cette espèce sont utilisées en médecine traditionnelle en fonction de leur mode de préparation (décoction, pulvérisation, macération).

Les graines de la coloquinte sont largement répandues dans la médecine traditionnelle, car elles possèdent diverses propriétés thérapeutiques : purgatives, anti-tumorale [14, 15], anti inflammatoire [10, 16], antirhumatismal [17], laxative [18], contre les troubles urogénitaux, la

leucémie, l'ictère, la fièvre, l'ascite, les désordres biliaires, les hémorroïdes [19] et constipation, l'œdème, les infections bactériennes et le cancer [20].

Les racines sont employées dans les traitements de l'ictère, les maladies urinaires et le rhumatisme, les douleurs de joint, l'inflammation et extérieurement dans les maladies ophtalmiques. Les feuilles sont employées pour le traitement de l'ictère et l'asthme.

Plusieurs études ethnobotaniques et pharmacologiques ont rapporté l'utilisation de cette plante pour le traitement du diabète [21-23] et aussi une enquête effectuée par Benmehdi [24] sur 80 plantes traditionnellement, révèle que la coloquinte est la plante la plus utilisée après le fenugrec.

Selon Hartwel [25], cette plante est utilisée comme remède pour le cancer. Plusieurs effets thérapeutiques des différentes parties de la coloquinte ont été recherchés scientifiquement au laboratoire à travers le monde (*Tableau II-1*).





**Tableau II-1:** Quelques études sur les effets thérapeutiques de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*) à travers le monde [26].

| Région          | Métabolites / parties utilisées                         | Effets thérapeutiques  | Références |
|-----------------|---|--|------------|
| Iran            | Flavonoïdes (Fruits)                                    | Pouvoir antioxydant important  | [20]       |
|                 | Poudre (Fruits)   | Effets antidiabétique sur des patients diabétiques de type 2   | [22]       |
|                 | Extrait des graines et de pulpe                         | Effets hypoglycémiant chez les lapins normaux et rendus diabétiques par l'alloxane   | [27]       |
| Arabie Saoudite | Extrait éthanolique (pulpe)                             | Pouvoir antioxydant puissant contre le stress oxydatif chez les rats rendus diabétiques par l'alloxane.  | [28]       |
|                 | Glycoside triterpène Cucurbitacines E et I (Fruits)     | Pouvoir anticancéreux (Carcinome hépatocellulaire)   | [29]       |
| Inde            | Extrait méthanolique (Fruits)                           | Pouvoir antioxydant  | [30]       |
|                 | Extrait méthanolique (graines)                          | Antiulcéreux   | [31]       |
|                 | Extrait méthanolique (feuilles)                         | Activité anti-inflammatoire  | [32]       |
|                 | Extrait d'éther de pétrole (Fruits)                     | Effets anti diabétiques chez les rats rendus diabétiques par STZ   | [33]       |
|                 | Extrait aqueux, éthanolique et chloroformique (racines) | Effet hypoglycémiant sur des rats normaux et rendus diabétiques par l'alloxane   | [34]       |
| Soudan          | graines   | Activité cancérogène après administration épicutanée chronique aux Souris  | [35]       |
| Egypte          | Cucurbitacine E (Fruits)                                | Une activité antiallergique (un effet inhibiteur sur l'oreille : réactions passifs anaphylactiques cutanées comme un modèle de type I allergique chez la souris) | [36]       |
|                 | Extrait des graines                                     | Effets hypoglycémiant, hypolipémiant chez les rats normaux et rendus diabétiques par STZ   | [37]       |
| Tunisie         | Extrait aqueux et extrait acétone (différent parties)   | Effet antibactérien (sur <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ) et antifongique ( <i>Candida albicans</i> et <i>Candida glabrata</i> )       | [38,39]    |
|                 | Extrait aqueux (différent parties)                      | Propriété analgésiques et anti-inflammatoire   | [40]       |
|                 | Extrait aqueux (feuilles)                               | Effet anticoagulant et anti microbien  | [41]       |
| Pakistan        | Extrait méthanolique (fruits)                           | Anti hémorragique contre les morsures de serpents  | [42]       |
| Algérie         | Extrait aqueux (fruits)                                 | Activité immunostimulante.   | [14]       |
|                 | Huile fixe des graines                                  | Anti- hyperlipidémique chez les rats obèses  | [43]       |
| Iraq            | Extrait aqueux, Saponines, alcaloïdes et glycosides     | Effets hypoglycémiant et anti- hyperglycémiant chez les lapins normaux et rendus diabétiques par l'alloxane  | [12]       |
| Maroc           | $\beta$ -(Pyrazol-1-yl)- L-alanine (Graines)            | Activité insulino-stimulante   | [44 ,45]   |



## 7. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PLANTE

Sur le plan phytochimique, la coloquinte est une plante qui contient plusieurs substances chimiques telle que : des flavonoïdes, des tanins, des saponosides, des alcaloïdes, et des cucurbitacines [46-48].

Par exemple, les graines de coloquinte contiennent 26,6% d'huiles, 13,5% de protéines, 2,1% de cendres, 52,9% de fibres brutes, 4,9% d'azote libre et contient 322 mg/100g de potassium, 119 mg/100g de phosphore et 3,3 mg/100 g de fer [49]. Elles contiennent aussi les polysaccharides, glycosides, et des tanins, comme métabolites secondaires [50]. L'huile extraite des graines de cette plante contiendrait des acides gras saturés et aussi, des acides gras insaturés [51, 52]. Les racines contiennent de l' $\alpha$ -élatérine [53].

Dinan et al. [54] et Kemassi [55] signalent l'existence d'un composé appelé Cucurbitacine isolé des feuilles et des fruits de coloquinte et qui présente des effets anti appétant. Alors, chaque partie (fruits, racines, tiges, graines et feuilles) de cette plante contient des composants chimiques bien définis.

## 8. TOXICITE DE LA COLOQUINTE

Depuis les périodes, les fruits de la coloquinte sont considérés comme poison mortel [56]. La coloquinte est une plante irritante. Sa consommation à des doses plus ou moins importantes, produit abondamment des évacuations aqueuses, des inflammations de la membrane muqueuse des intestins, des vomissements, des diarrhées sanglantes, des douleurs abdominales, des douleurs rénales [1]. Les feuilles et les fruits sont particulièrement toxiques pour les moutons.

Les études de la toxicité sur des petits ruminants suggèrent que les effets toxiques, après utilisation chronique de cette plante, provoquent une hypokaliémie, oligurie et les œdèmes, semblable à une néphrite aiguë et aussi endommage l'appareil gastro-intestinal [57].

- La dose de 0,25 à 10 g/kg provoque la mort des animaux en 4 à 5 jours avec des difficultés de respiration consécutive à une hémorragie pulmonaire, une entérite, une chute de poils et des diarrhées.



- Une quantité de 800 mg/kg de l'extrait éthanolique des feuilles de cette espèce est une dose toxique pour les rats et peut entraîner la mort de 60% de ces derniers après 24 heures [58, 59].

## 9. USAGES TRADITIONNEL ET POPULAIRE

Il y a plusieurs modes d'utilisation :

✓ *Citrullus colocynthis* est utilisée en dermatologie et contre la chute des cheveux et indiquée pour le traitement du rhumatisme et les piqûres de scorpions [24].

✓ Les feuilles sont utilisées contre l'hémorragie. Elles sont prescrites pour soulager les douleurs des membres inférieurs, le dos et les articulations [60].

✓ Concernant le traitement du diabète par la coloquinte, plusieurs modes d'utilisation ont été mentionnés:

✚ Mettre une graine sous la langue 2 à 3 fois par jour.

✚ Décoction de 30g des graines broyées dans 1 litre d'eau et à prendre oralement 3 x50ml, par jour [61].

✚ Fruits frais coupés en tranche utilisés sous les pieds.

✚ Préparation d'une poudre à partir de l'épicarpe séché et mélangé avec les aliments en petite quantité [62].

✓ *Citrullus colocynthis* est utilisée en tant qu'abortif et pour traiter les hémorroïdes soit seule, soit associée à des feuilles de tabac, les infections bactériennes et le cancer [30].

✓ La décoction de la coloquinte serait insecticide, elle est indiquée pour la destruction des puces.

✓ les graines de coloquinte sont utilisées comme aliment de bétail dans les régions Saharienne.

## Conclusion

La coloquinte « *Citrullus colocynthis* » est une plante de la famille des cucurbitacées. Elle est largement distribuée dans les zones désertiques du monde. La « *citrullus colocynthis* » est considérée comme une plante médicinale pour la pulpe de ses fruits, qui est amère et toxique et grâce à leurs propriétés thérapeutiques. Elle est utilisée comme médicament traditionnel pour certaines maladies comme le diabète et contre les hémorroïdes, aussi utilisée comme aliment de bétail dans les régions Sahariennes.



---

## Les références du chapitre II

---

- [1]: **Nahal Bouderberba, N. (2016).** Etude ethnobotanique, écologique et activités biologiques de la coloquinte (*Citrullus colocynthis*. L) et du contenu floristique de la région de Béchar. Thèse de doctorat. Université Mustapha Stambouli, Mascara. p 9.
- [2] : **Hussain, A. I., Rathore, H. A., Sattar, M. Z., Chatha, S. A., Sarker, S. D., Gilani, A. H. (2014).** *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): A review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential. *Journal of ethnopharmacology*, 155 (1), 54-66.
- [3]: **Chialir, M. (1973).** Contribution à la naissance de la pharmacopée traditionnelle algérienne ; thèse de doctorat d'état en pharmacie.
- [4]: **Sincich, F. (2002).** Bedouin traditional medicine in the Syrian steppe. Rome, FAO. pp. 114-115.
- [5]: **Ozanda, P. (1991).** Flore et végétation du Sahara;(3<sup>ème</sup> édition, augmentée). CNRS, Paris, vol. 662.
- [6]: **Zoro Bi, I. A., Koffi, K. K., Djè, Y. (2003).** Caractérisation botanique et agronomique de trois espèces de cucurbites consommées en sauce en Afrique de l'Ouest: *Citrullus* sp, *Cucumeropsis mannii* Naudin et *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 7 (3-4), 189-199.
- [7]: **Boullard, B. (2001).** Dictionnaire des plantes médicinales du monde et réalités. Edition. & Croyances. Estem, ed., Paris. p.660.
- [8]: **Duke, JA. (1978).** *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Handbook of Energy Crops*.
- [9]: **Bruneton, J. (1996).** Plante toxique : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 529.
- [10]: **Al-Ghaithi, F., El-Ridi, M. R., Adeghate, E., Amiri, M. H. (2004).** Biochemical effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 261 (1), 143-149.



- [11]: Marzouk, B., Marzouk, Z., Fenina, N., Bouraoui, A., Aouni, M. (2011). Anti-inflammatory and analgesic activities of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruit and seed organic extracts. *Eur Rev Medical Pharmacology Science*, 15 (6), 665-72.
- [12]: Abdel-Hassan, I. A., Abdel-Barry, J. A., Mohammeda, S. T. (2000). The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of ethnopharmacology*, 71 (1), 325-330.
- [13]: Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *Journal of ethnopharmacology*, 35 (2), 123-143.
- [14]: Bendjeddou, D., Lalaoui, K., Satta, D. (2003). Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galanga* and *Citrullus colocynthis*. *Journal of ethnopharmacology*, 88 (2), 155-160.
- [15]: Al-Yahya, M. A., Al-Farhan, A. H., Adam, S. E. I. (2000). Preliminary toxicity study on the individual and combined effects of *Citrullus colocynthis* and *Nerium oleander* in rats. *Fitoterapia*, 71 (4), 385-391.
- [16]: Barth, A., Müller, D., Dürrling, K. (2002). In vitro investigation of a standardized dried extract of *Citrullus colocynthis* on liver toxicity in adult rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 54 (3), 223-230.
- [17]: Adam, S. E. I., Al-Yahya, M. A., Al-Farhan, A. H. (2001). Response of Najdi sheep to oral administration of *Citrullus colocynthis* fruits, *Nerium oleander* leaves or their mixture. *Small Ruminant Research*, 40(3), 239-244.
- [18]: Al Faraj, S. (1995). Haemorrhagic colitis induced by *Citrullus colocynthis*. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 89 (6), 695-696.
- [19]: Ziyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., Benjelloun, W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of ethnopharmacology*, 58 (1), 45-54.
- [20]: Delazar, A., Gibbons, S., Kosari, A. R., Nazemiyeh, H., Modarresi, M., Nahar, L., Sarker, S. D. (2006). Flavone C-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *Daru Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 (3), 109-114.



- [21]: Benariba, N., Djaziri, R., Hupkens, E., Louchami, K., Malaisse, W. J., Sener, A. (2013b). Insulinotropic action of *Citrullus colocynthis* seed extracts in rat pancreatic islets. *Molecular medicine reports*, 7 (1), 233-236
- [22]: Huseini, H. F., Darvishzadeh, F., Heshmat, R., Jafariazar, Z., Raza, M., Larijani, B. (2009). The clinical investigation of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad fruit in treatment of Type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research*, 23 (8), 1186-1189.
- [23]: Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z. H., Lyoussi, B. (2007). Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of ethnopharmacology*, 110 (1), 105-117.
- [24]: Benmehdi, H. (2000). Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire de magistère en chimie organique appliquée. Université de Tlemcen. Algérie.
- [25]: Hartwell, L. H. (2002). Nobel lecture: Yeast and cancer. *Bioscience reports*, 22 (3), 373-394.
- [26]: Azzi, R. (2013). Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien: enquête ethnopharmacologique; Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. p 40-41.
- [27]: Dashti, N., Zamani, M., Mahdavi, R., Ostad Rahimi, A. (2012). The effect of *Citrullus colocynthis* on blood glucose profile level in diabetic rabbits. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences*, 9 (4), 27-32.
- [28]: Dallak, M., Bin-Jalial, I. (2010). Antioxidant activity of *Citrullus colocynthis* pulp extract in the RBC's of alloxan-induced diabetic rats. *Pak J Physiol*, 6 (1), 1-5.
- [29]: Ayyad, S. E. N., Abdel-Lateff, A., Alarif, W. M., Patacchioli, F. R., Badria, F. A., Ezmirly, S. T. (2012). In vitro and in vivo study of cucurbitacins-type triterpene glucoside from *Citrullus colocynthis* growing in Saudi Arabia against hepatocellular carcinoma. *Environmental toxicology and pharmacology*, 33 (2), 245-251.
- [30]: Kumar, S., Kumar, D., Jusha, M., Saroha, K., Singh, N., Vashishta, B. (2008). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmaceutica*, 58 (2), 215-220.



- [31]: Gill, N. S., Kaur, S., Arora, R., Bali, M. (2011). Screening of antioxidant and antiulcer potential of *Citrullus colocynthis* methanolic seed extract. *Research Journal of Phytochemistry*, 5 (2), 98-106.
- [32]: Rajamanickam, E., Gurudeeban, S., Ramanathan, T., Satyavani, K. (2010). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Citrullus colocynthis*. *International Journal of Current Research*, 2, 67-69.
- [33]: Jayaraman, R., Shivakumar, A., Anitha, T., Joshi, V. D., Palei, N. N. (2009). Antidiabetic effect of petroleum ether extract of *Citrullus colocynthis* fruits against streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *Romanian Journal of Biology Plant Biology* 4, 127-34.
- [34]: Agarwal, V. I. P. I. N., Sharma, A. K., Upadhyay, A. N. S. H. U., Singh, G. O. P. E. N. D. R. A., Gupta, R. A. J. I. V. (2012). Hypoglycemic effects of *Citrullus colocynthis* roots. *Acta Pol Pharm*, 69 (1), 75-9.
- [35]: Habs, M., Jahn, S. A. A., Schmähl, D. (1984). Carcinogenic activity of condensate from coloquint seeds (*Citrullus colocynthis*) after chronic epicutaneous administration to mice. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 108 (1), 154-156.
- [36]: Yoshikawa, M., Yoshizumi, S., Ueno, T., Matsuda, H., Murakami, T., Yamahara, J., Murakami, N. (1995). Medicinal foodstuffs. I. Hypoglycemic constituents from a garnish foodstuff " taranome," the young shoot of *Aralia elata* SEEM.: elatosides G, H, I, J, and K. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 43 (11), 1878-1882.
- [37]: Abdel-Baky, A., Abdulla, A., Abdel-Mawgoud, H., Abdel-Hay, E. (2009). Hypoglycemic and hypolipidemic action of bitter melon on normoglycemic and hyperglycemic diabetic rats. *Research Journal of Medical Science* 4, 519-525.
- [38]: Marzouk, B., Marzouk, Z., Décor, R., Edziri, H., Haloui, E., Fenina, N., Aouni, M. (2009). Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. *Journal of ethnopharmacology*, 125 (2), 344-349.
- [39]: Marzouk, B., Marzouk, Z., Décor, R., Mhadhebi, L., Fenina, N., Aouni, M. (2010a). Antibacterial and antifungal activities of several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruits and seeds. *Journal of Medical Mycology*, 20 (3), 179-184.



- [40]: Marzouk, B., Marzouk, Z., Haloui, E., Fenina, N., Bouraoui, A., Aouni, M. (2010b). Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *Journal of ethnopharmacology*, 128 (1), 15-19.
- [41]: Marzouk, B., Haloui, E., Akremi, N., Aouni, M., Marzouk, Z., Fenina, N. (2012). Antimicrobial and anticoagulant activities of *Citrullus colocynthis* Schrad. leaves from Tunisia (Medenine). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6 (26), 1982-1988.
- [42]: Asad, M. H. H. B., Razi, M. T., Murtaza, G., Azhar, S., Khan, S. A., Saqib, Q. N. U., Hussain, I. (2012). Antihaemorrhagic potential of *citrullus colocynthis* schrad (cucurbitaceae) against *Naja naja karachiensis* (Black Pakistan cobra) venom. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (18), 3455-3458.
- [43]: Meziane R.K, Khemmar L., Amamou F., Yazit M., Didi A., Chabane-Sari D. (2012). Anti-obesity and anti-hyperlipidemic effect of *Citrullus colocynthis* oil in the offspring of obese rats. *Annals of Biological Research*; 3 (5): 2486-2490.
- [44]: Nmila, R., Gross, R., Rchid, H., Roye, M., Manteghetti, M., Petit, P., Sauvaire, Y. (2000). Insulinotropic effect of *Citrullus colocynthis* fruit extracts. *Planta medica*, 66 (05), 418-423.
- [45]: Nmila, R., Rchid, H., Gross, R., Manteghetti, M., Ribes, G., PETIT P, T. M., Sauvaire, Y. (2002). Mise en évidence d'un effet insulino-stimulant de fractions de graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis* L. Schrader). *Biologie et Santé*, 2 (2), 88-99.
- [46]: Benariba, N., Djaziri, R., Bellakhdar, W., Belkacem, N., Kadiata, M., Malaisse, W. J., Sener, A. (2013a). Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3 (1) 35-40.
- [47]: Nayab, D., Ali, D., Arshad, N., Malik, A., Choudhary, M. I., Ahmed, Z. (2006). Cucurbitacin glucosides from *Citrullus colocynthis*. *Natural product research*, 20 (05), 409-413.
- [48]: Seger, C., Sturm, S., Mair, M. E., Ellmerer, E. P., Stuppner, H. (2005).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader and *Ecballium elaterium* L.(Cucurbitaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43 (6), 489-491.





- [49]: Sawaya, W. N., Dagher, N. J., Khalil, J. K. (1986). *Citrullus colocynthis* seeds as a potential source of protein for food and feed. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 34 (2), 285-288.
- [50]: Duke, J. A. (1983). The Quest for Tolerant Germplasm in: A SA Special Symposium 32, Crop Tolerance to Sub Optimal Land Conditions. Argon. Madison W, 1, 1-61.
- [51]: Nehdi, I. A., Sbihi, H., Tan, C. P., Al-Resayes, S. I. (2013). Evaluation and characterisation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad seed oil: Comparison with *Helianthus annuus* (sunflower) seed oil. *Food chemistry*, 136 (2), 348-353.
- [52]: Sebbagh, N., Cruciani-Guglielmacci, C., Ouali, F., Berthault, M. F., Rouch, C., Sari, D. C., Magnan, C. (2009). Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes & metabolism*, 35 (3), 178-184.
- [53]: Chopra, C., Abrol, B. K., Handa, K. L. (1960). Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique: 1<sup>ère</sup> partie. Recherche sur les zones arides XIII. Ed. Unesco, Rome, 97 p.
- [54]: Dinan, L., Harmatha, J., Lafont, R. (2001). Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of chromatography A*, 935 (1), 105-123.
- [55]: Kemassi, A. (2008). Toxicité comparée des extraits de quelques plantes acridifuges du Sahara septentrional Est algérien sur les larves du cinquième stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). Mémoire de magistère, Université Kasdi Merbah Ouargla, 160 p.
- [56]: Yaniv, Z., Shabelsky, E., Schafferman, D. (1999). Colocynth: Potential arid land oilseed from an ancient cucurbit. *Perspectives on new crops and new uses*, 257-261.
- [57]: Hammouda F.M., Ismail S.I., Abdel-Azim N.S., Shams K.A. (2005). *Citrullus colocynthis* L. A Guide to Medicinal Plants in North Africa: 87-89.
- [58]: Elawad, A. A., Abdel, B. E., Mahmoud, O. M., Adam, S. E. (1984). The effect of *Citrullus colocynthis* on sheep. *Veterinary and human toxicology*, 26 (6), 481-485.
- [59]: Wasfi, I. A. (1994). Some pharmacological studies on *Citrullus colocynthis*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 2 (2), 65-79.



**[60]: Banerjee, S. P., Dandiya, P. C. (1967).** Smooth muscle and cardiovascular pharmacology of  $\alpha$ -elaterin-2-D-glucopyranoside glycoside of *Citrullus colocynthis*. Journal of pharmaceutical sciences, 56 (12), 1665-1667.

**[61]: Said, O., Khalil, K., Fulder, S., Azaizeh, H. (2002).** Ethnopharmacological survey of medicinal herbs, the Golan Heights and the West Bank region. Journal of ethnopharmacology, 83 (3), 251-265.

**[62]: Merzouki, A., Ed-Derfoufi, F., Mesa, J. M. (2000).** Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district (NW Morocco). Fitoterapia 71 (3), 278-307.



---

# Partie Expérimentale

---

# Chapitre III

---

## Matériels, Méthodes et Techniques de Caractérisation

---

## Introduction

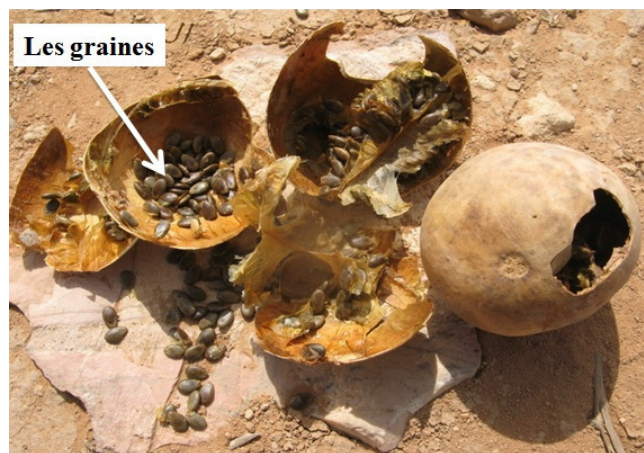
Ce chapitre sera composé de deux parties. Dans la première, nous décrivons la méthode d'extraction des polysaccharides soluble et insoluble dans l'eau, la méthode du blanchiment ainsi que la méthode de préparation des nanocristaux de cellulose que nous avons mises en œuvre. Dans la seconde partie, nous présenterons les différentes techniques utilisées pour caractériser nos échantillons finaux.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Matériel végétal

Tout au long de cette étude, nous avons travaillé sur les fruits de la *Citrullus colocynthis* (coloquinte) de la famille des cucurbitacées ; récoltés à maturité durant le mois de décembre dans la région d'Ouargla, Sud-est algérien.

Au laboratoire, les graines sont récupérées à partir des fruits et mises à sécher à l'abri de la lumière. Les graines séchées sont ensuite broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique.

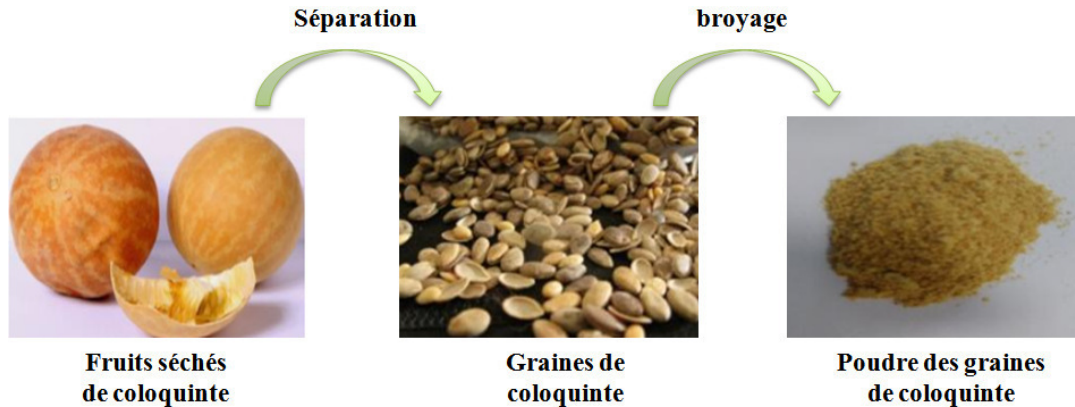


**Figure III-1:** Photo qui représente les graines de la *Citrullus colocynthis* (coloquinte).

### 1.2. Préparation de la matière (Technique de séchage, broyage et conservation)

Les graines, une fois séparées, sont séchées à l'abri de la lumière, sous ventilation à l'air libre et à température ambiante durant plusieurs semaines. Le broyage de la matière végétale sèche a été réalisé dans un broyeur électrique, il a permis d'obtenir des poudres utilisées pour l'extraction. Après séchage et broyage, la poudre a été conservée dans des

boîtes bien fermées afin de garder leur couleur, leur goût et principalement leurs propriétés. La boîte a été stockée soigneusement dans un endroit sec jusqu'à l'analyse de la poudre [1,2].



**Figure III-2:** Les étapes de préparation de la matière première de la *Citrullus colocynthis* (coloquinte).

### 1.3. Produits chimiques (solvants et réactifs) utilisés

L'ensemble des produits chimiques, solvants et réactifs utilisés dans le cadre de ces travaux sont stockés à l'abri de la lumière et en atmosphère inerte. L'origine et la pureté des réactifs et solvants utilisés au cours de ce travail sont décrites dans le [tableau III-1](#).

L'ensemble des produits chimiques, solvants et réactifs utilisés proviennent de Sigma Aldrich.

**Tableau III-1:** Produits chimiques, solvants et réactifs.

| Produits chimique, Réactifs et solvants          | Formule chimique  | N° CAS [Reg. Num] | Pureté | M (g/mol) |
|--|---|-------------------|--------|-----------|
| Hydroxyde de sodium                              | NaOH  | 215-185-5         | 97%    | 40        |
| Chloroforme                                      | CHCl <sub>3</sub>   | 67-66-3           | 99,9%  | 119.38    |
| Méthanol   | CH <sub>3</sub> OH  | 67-56-1           | 99,9%  | 32.04     |
| Ethanol  | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O                               |                   | 99,5%  | 46,07     |
| Acétone  | CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>                             | 67-64-1           | 99,8%  | 58.08     |
| Chlorite de sodium                               | NaClO <sub>2</sub>  | 7758-19-2         | 80%    | 90.44     |
| Acide sulfurique                                 | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                | 7664-93-9         | 96%    | 98.08     |
| Acide sulfurique-d <sub>2</sub>                  | (D <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /D <sub>2</sub> O)            | 13813-19-9        | 99,5%  | 100.09    |
| Isopropanol                                      | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O                               |                   | 99,5%  | 60,10     |
| Cellobiose                                       | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>               | 528-50-7          |        | 342.30    |
| Amylose du maïs                                  | (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> | 9005-82-7         |        |           |
| Amidon du blé, maïs, riz et de la pomme de terre | (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>n</sub> | 9005-25-8         |        |           |
| D-glucose  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                 | 50-99-7           |        | 180.16    |
| D-galactose                                      | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                 | 59-23-4           |        | 180.16    |
| D-mannose  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                 | 3458-28-4         | 99,5%  | 180.16    |
| D-arabinose                                      | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>                 | 10323-20-3        | 98%    | 150.13    |
| Cellulose Microcristalline                       |   | 9004-34-6         |        |           |
| Gomme de caroube                                 |   | 9000-40-2         |        |           |
| Lignin alcaline                                  |   | 8068-05-1         |        |           |
| Amylopectine de maïs                             |   | 9037-22-3         |        |           |
| Guar   |   | 9000-30-0         |        |           |
| Pectin   |   | 9000-69-5         |        |           |

## 1.4. Procédures d'extraction des polysaccharides de *Citrullus colocynthis*

### 1.4.1. Méthode d'extraction de polysaccharide hydrosoluble (Galactomannane)

• La première étape est consacrée à la poudre de graines de Cc (5g) est prétraité par l'éther de pétrole sous agitation douce à la température ambiante pendant 5h afin d'éliminer les composés lipidiques. Après une filtration, le résidu est séché à la température ambiante à l'abri de la lumière.



- Ensuite, le résidu a été ré-extrait avec de l'éthanol à 80% pendant 5h pour éliminer certains matériaux colorés, des oligosaccharides et certains autres composés de faible poids moléculaire [3-5]. Le résidu résultant a été séché encore une fois et utilisé pour l'extraction suivante [6, 7].

- Dans la deuxième étape après le séchage, le résidu séché est macéré dans l'eau distillée à bain-marie pour certaines durées différentes, des températures différentes et des rapports d'eau différents (30, 60 et 120 min), (50, 75 et 100 °C) et (30, 60 et 100 ml/g), respectivement. La macération est répétée trois fois. Ensuite, le mélange a été centrifugé (10000 rpm, 20 min) [8, 9].

- Les liquides surnageants ont été concentrés au 1/3 du volume à l'aide d'un évaporateur rotatif à 60 °C [10, 11].

- Les extraits sont précipités par trois volumes d'Isopropanol et maintenus dans un réfrigérateur à 4°C pendant 24 h [12]. Les culots obtenus, après une centrifugation à 10000 rpm pendant 20 min, sont lavés avec l'acétone trois fois [13, 14].

Après l'évaporation de l'acétone, les culots sont lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur de type ALPH1-2 LD, CHRIST [15].

- Les lyophilisats obtenus représentent les extraits bruts de polysaccharide hydrosoluble.

### 1.4.2. Méthode d'extraction de polysaccharide non- hydrosoluble

#### 1.4.2.1. Protocole A

##### a) 1<sup>ère</sup> étape : Déprotéinisation

Les graines broyées ont été mélangées avec une solution aqueuse de NaOH (1M) dans le rapport (poudre/solution) (1:30) (g/ml) dans un appareil de Soxhlet. Après 24h de réaction à 70°C, la partie insoluble a été séparée par centrifugation (10000 rpm, 20 min), suivie par un lavage plusieurs fois avec de l'eau purifiée jusqu'à l'obtention du pH neutre, puis lyophilisée.

##### b) 2<sup>ème</sup> étape : Extraction des lipides

Le matériau lyophilisé A1 a été mélangé avec une solution de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v) dans le rapport (poudre/solution) (1 :20) (g/ml). Après 4h d'agitation à température ambiante, la partie insoluble a été séparée par centrifugation (10000 rpm, 20 min), suivie par un lavage trois fois avec de l'acétone et finalement lyophilisée.





**c) 3<sup>ème</sup> étape : Traitement de blanchiment**

Pour la préparation de la solution de blanchiment, une solution aqueuse de chlorite (1,7% en poids de NaClO<sub>2</sub> dans l'eau) a été mélangée avec un tampon acétate de sodium de pH = 4,8 dans le rapport (solution de chlorite/tampon acétate) (1:1) (v/v).

La matière lyophilisée A2 a été agitée avec la solution de blanchiment, dans le rapport (poudre/solution) (1/30) (g/ml), pendant 6 h à 80°C.

La partie insoluble a ensuite été filtrée, lavée plusieurs fois avec de l'eau purifiée jusqu'à l'obtention du pH neutre et finalement lyophilisée pour obtenir une poudre blanche.

**1.4.2.2. Protocole B**

Le protocole B pour l'extraction de polysaccharide insoluble dans l'eau c'est la même chose que le protocole A, la seule différence entre des deux protocoles que dans le protocole B on a commencé par l'étape de l'extraction des lipides suivie par l'étape de déprotéinisation et du blanchiment.

**1.5. Hydrolyse acide des liaisons glycosidiques**

20 mg de l'extrait brut de polysaccharides lyophilisés de Cc sont hydrolysés par 1ml d'acide sulfurique-d<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/D<sub>2</sub>O) (50%), à température ambiante pendant 12h dans des tubes fermés. Une fois l'hydrolyse effectuée, les monosaccharides sont libérés.

**2. TECHNIQUES DE CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUES**

Cette partie est consacrée aux différentes méthodes de caractérisations physico-chimiques utilisées au cours de ce travail. Pour certaines d'entre elles, une description plus détaillée est donnée, pour faciliter la compréhension et les discussions ultérieures des résultats.

**2.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR)**

Cette technique nous permet d'accéder directement à l'information moléculaire, à la nature chimique et à l'organisation conformationnelle et structurale des matériaux analysés. Sous l'effet du rayonnement IR, les molécules de l'échantillon analysé vont subir des changements d'état vibrationnel, à des fréquences de vibration caractéristiques de chaque groupement moléculaire.



Les spectres Infrarouge à Transformée de Fourier (IR-TF) ont été enregistrés sur un Spectrophotomètre infrarouge Thermo Scientific Nicolet iS10 (Smart iTR), équipé d'un dispositif de réflexion totale atténuée (ATR ; Attenuated Total Reflection).

**Mode opératoire :** Les échantillons (sous forme solide ou liquide) sont directement déposés sur la cellule de diamant de l'accessoire ATR traversée par le faisceau infrarouge qui se réfléchit sur la surface de l'échantillon avec un angle de 45° pour ensuite traverser à nouveau le cristal vers le détecteur.

Les nombres d'onde sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$ . Les spectres sont tous enregistrés en réalisant 32 acquisitions entre 500 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$  (64 scans). Les positions des pics ont été déterminées par le logiciel OMNIC. De plus, c'est une méthode rapide et peu gourmande en quantité d'échantillon (1mg). Les bandes caractéristiques de tous les échantillons étudiés sont décrites dans le chapitre suivant.

## 2.2. Spectroscopie Raman-IR

La spectroscopie Raman nous permet de déterminer la structure chimique d'un échantillon et d'identifier les composés présents en mesurant les vibrations, de manière similaire à l'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Cette technique est complémentaire à la spectroscopie infrarouge. Les deux permettent d'étudier les modes vibrationnels d'une molécule, mais les règles de sélection pour les deux spectroscopies peuvent être différentes selon la symétrie moléculaire.

Toutefois, la méthode utilisée par l'analyse Raman produit une meilleure résolution spatiale et permet d'analyser des échantillons plus petits.

**Mode opératoire :** Les spectres Raman-IR ont été obtenus en utilisant un spectromètre infrarouge Raman (Ramspec 1064 de Bayspec / Photon Lines).

Le faisceau incident laser ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ) a été focalisé sur un diamètre d'environ 1mm sur l'échantillon. La puissance incidente a été ajustée entre 10 mW et 450 mW pour éviter la dégradation des échantillons.

Le temps d'exposition typique était de 30s; chaque spectre était une moyenne de 4 balayages. Les mesures ont été recueillies sur la plage de nombre d'ondes de 200 à 3000  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution spectrale de 4  $\text{cm}^{-1}$ .



### 2.3. Spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire RMN $^{13}\text{C}$ du solide (CP-MAS)

La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil de caractérisation complémentaire à la spectroscopie IR-TF, qui permet d'avoir une information structurale au niveau moléculaire.

Les spectres du RMN  $^{13}\text{C}$  à l'état solide avec polarisation croisée (CP) et rotation à l'angle magique (MAS) ont été enregistrés à température ambiante (299K), sur un appareil Bruker Avance, fonctionnant à une fréquence de 75,48 MHz.

**Mode opératoire :** Les échantillons ont été placés dans un rotor MAS en zirconium de 4 mm de diamètre, tournant à une vitesse de 10 kHz. Les spectres ont été enregistrés avec un temps de contact de 1 ms. Les spectres ont été enregistrés avec un temps d'acquisition (AQ) de 15 ms et tous les spectres ont été obtenus avec un temps d'attente entre deux passages de 10 secondes. Les spectres de (CP/MAS) de RMN  $^{13}\text{C}$  ont été traités avec le logiciel TOPSPIN 3.2.

### 2.4. Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN- $^1\text{H}$ )

La spectroscopie du Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN- $^1\text{H}$ ) a été utilisée pour caractériser les biopolymères d'origine végétale, isolés ou en interaction avec d'autres macromolécules, au sein de complexes composites. L'objectif de cette étude est de déterminer la nature des atomes présents, leur nombre et leur enchaînement et ainsi de connaître la structure totale d'une molécule organique.

**Mode opératoire :** Les analyses RMN  $^1\text{H}$  du proton ont été réalisées avec un appareil Bruker DRX-300 (ULTRASHIELD). Les spectres sont enregistrés à une fréquence de 300 MHz et à température ambiante et correspondent à une accumulation d'au moins 1600 scans. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, et une solution d'acide sulfurique- $\text{d}_2$  ( $\text{D}_2\text{SO}_4/\text{D}_2\text{O}$ ) utilisé comme solvant.

### 2.5. Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique est une technique d'analyse thermique permettant de mesurer la quantité et la vitesse de variation de masse d'un échantillon en fonction de la température et du temps et sous atmosphère contrôlée. Elle permet d'évaluer toute perte de masse lorsque le matériau se décompose, se déshydrate ou s'oxyde. Cette méthode aussi nous



renseigne sur la stabilité thermique des matériaux. Elle permet de déterminer le pourcentage d'hydratation de l'échantillon.

Dans notre cas, l'ATG a été utilisée pour évaluer la teneur en eau des substrats celluloseux ainsi que la dégradation de ces derniers. L'appareil utilisé est une TGA modèle Q500 (TA Instruments).

**Mode opératoire :** Pour réaliser une expérience, un échantillon lyophilisé de masse comprise entre 5 et 10 mg est introduit dans l'appareil. L'échantillon à analyser est placé dans la nacelle d'une microbalance de précision (ou dans des creusets en aluminium). La nacelle est ensuite introduite dans un four qui permet de soumettre l'échantillon à un programme de température tout en mesurant en continu l'évolution de sa masse.

Les analyses s'effectuent soit sous flux d'azote soit sous flux d'air, à 60 mL/min pour le modèle Q500 (TA Instruments). L'évolution de la masse a été enregistrée dans la gamme 20-800 °C avec une cadence de chauffage de 10° C/min.

## 2.6. Diffraction des rayons X

Cette technique d'analyse est basée sur la capacité des solides à diffracter des rayons X (si ordre des atomes est suffisant), permettant l'identification structurale des phases formées. Les analyses de diffractions de rayons X ont été réalisées sur un diffractomètre Bruker D8 Advance avec une anti-cathode de cuivre fonctionnant à une tension 40kV et une intensité 40mA. Le détecteur utilisé était un détecteur linéaire (LYNXEYE XE) avec une ouverture angulaire de 3°.

**Mode opératoire :** La diffraction a été effectuée sur des échantillons répartis uniformément sur un porte échantillon de verre de quartz neutre. Les intensités diffusées ont été mesurées dans le domaine angulaire  $2\theta$  de 5° à 50°, pour un temps de mesure total de 58 minutes avec des fentes variables de 4 mm. Les analyses sont réalisées à température ambiante. L'indice de cristallinité a été calculé à partir des diagrammes de diffraction des rayons X selon l'équation suivante:

$$CrI = \left( \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) * 100$$

Où  $I_{002}$  et  $I_{am}$  sont les intensités des pics de diffraction à des valeurs de  $2\theta$  proches de 22° et 18° respectivement.



## 2.7. Microscopie électronique en transmission (MET)

Le MET est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre.

L'intérêt principal de ce microscope est de pouvoir combiner cette grande résolution avec les informations de l'espace de Fourier, c'est-à-dire la diffraction. Il est aussi possible d'étudier la composition chimique de l'échantillon en étudiant le rayonnement X provoqué par le faisceau électronique.

**Mode opératoire :** Pour l'imagerie, un microscope électronique à transmission Philips CM120 à une tension d'accélération de 120 kV a été utilisé.

Une gouttelette de 5  $\mu\text{l}$  de dispersion plus ou moins diluée de « nanofibres de cellulose » a été déposée sur un film mince de carbone revêtu sur une grille de cuivre.

Pour concentrer l'objet sur la grille, l'excès de solution n'a pas été effacé comme d'habitude, et seulement laissé sécher à l'air à température ambiante.



---

## Les références du chapitre III

---

- [1]: Diallo D., Sanogo R., Yasambou H., Traore A., Coulibaly K., Maiga A., (2004). Étude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam. (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali. C. R. Chimie, vol. 7: 1073–1080.
- [2]: Zhu Y., Li Q., Mao G., Zou Y., Feng W., Zheng D., Wang W., Zhou L., Zhang T., Yang J., Yang L., Wu X., (2014). Optimization of enzyme assisted extraction and characterization of polysaccharides from *Hericium erinaceus*. Carbohydrate Polymers, vol. 101: 606-613.
- [3]: Wu, Y., Cui, S.W., Tang, J., Wang, Q., Gu, X. (2007). Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds. Carbohydrate Polymers, vol. 70: 437-443.
- [4]: Wu, Y., Cui, S.W., Wu, J., Ai, L., Wang, Q., Tang, J. (2012). Structure characteristics and rheological properties of acidic polysaccharide from boat-fruited sterculia seeds. Carbohydrate Polymers 88 : 926-930.
- [5]: Di, T., Chen, G., Sun, Y., Ou, S., Zeng, X., Ye, H. (2017). Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. Journal of Function Food. 28: 64-75.
- [6]: Yuan, Q., Xie, Y., Wang, W., Yan, Y., Ye, H., Jabbar, S., Zeng, X. (2015a). Extraction optimization, characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves. Carbohydrate Polymers 128: 52-62.
- [7]: Yuan, Q., Zhao, L., Cha, Q., Sun, Y., Ye, H., Zeng, X. (2015b). Structural characterization and immunostimulatory activity of a homogeneous polysaccharide from *Sinonovacula constricta*. Journal of Agricultural Food Chemistry 63: 7986-7994.
- [8]: Zhao, S., Rong, C., Liu, Y., Xu, F., Wang, S., Duan, C., Chen, J., Wu, X. (2015). Extraction of a soluble polysaccharide from *Auricularia polytricha* and evaluation of its anti-hypercholesterolemic effect in rats. Carbohydrate Polymers 122: 39-45.



- [9]: Yang, L., Zhao, T., Wei, H., Zhang, M., Zou, Y., Mao, G., Wu, X. (2011). Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules* 49: 1124-1130.
- [10]: Lai, F., Wen, Q., Li, L., Wu, H., Li, X. (2010). Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vignaradiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment. *Carbohydrate Polymers* 8: 323-329.
- [11]: Roy, P., Amdekar, S., Kumar, A., Singh, V. (2011). Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *BMC Complementar. Alter. Medical* 11: 69.
- [12]: Liu C., Liu Q., Sun J., Jiang B., Yan J. (2014). Extraction of water-soluble polysaccharide and the antioxidant activity from *Semen cassia*. *Journal of food and drug analysis*, 1-8.
- [13]: Zhang A. Q., Zhang Y., Yang J., Jiang J., Huang F. F., Sun P. L. (2013). Structural elucidation of a novel water-soluble fructan isolated from *Wedelia prostrate*. *Carbohydrate Research*, vol. 376: 24-28.
- [14]: Adeli M., Samavati V., (2015). Studies on the steady shear flow behavior and chemical properties of water-soluble polysaccharide from *Ziziphus lotus* fruit. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 72: 580-587.
- [15]: Valepyn E., Cabrera J. C., Richel A. And Paquot M. (2014). Water soluble exopolysaccharide from *Syncephalastrum racemosum*, a strong inducer of plant defence reactions. *Carbohydrate Polymers*, vol. 101: 941-946.



## Chapitre IV

---

Extraction et caractérisation de  
polysaccharide insoluble dans l'eau à  
partir des graines de Citrullus  
Colocynthis

---



## Introduction

L'extraction des polymères naturels valorisables de différentes parties des fruits et des légumes a été étudié pendant des décennies [1, 2].

Ces dernières années, les polysaccharides issus des fruits et des légumes ont attiré l'attention des chercheurs, car ces polysaccharides isolés jouent un rôle biomédical important en raison de leurs effets, utilisés également dans la préparation de nano composites, les appareils électriques, dans le domaine des matériaux, et aussi dans d'autres applications industrielles [3, 4].

Comme mentionné dans les chapitres précédents *Citrullus colocynthis* (Cc) est une plante herbacée vivace de la famille des cucurbitacées et largement diffusée dans la région saharo-arabe d'Afrique, dans le bassin méditerranéen et dans certaines parties de l'Asie tropicale [3, 4]. Leurs fruits sont communément appelés "Handhal", "Hdaj" et "Dellaa El-Wad" dans la région arabe et méditerranéenne [4-6]. Chaque plante Cc produit environ 15 à 30 fruits. Ces fruits sont lisses et presque sphériques avec un diamètre de 5 à 10 cm [7, 8]. Les fruits Cc contiennent environ 200-300 graines sous forme comprimée (~5 mm de long sur ~3 mm de large), lisses et brunâtres à maturité. Généralement, les graines représentent environ 75% en poids des fruits secs [8].

Les fruits de *Citrullus colocynthis* sont généralement reconnus pour leur large gamme d'utilisations en médecine traditionnelle, par exemple dans le traitement de diabète, l'asthme, les troubles gastro-intestinaux et différentes infections microbiennes [9,10].

D'après la littérature les graines de la *Citrullus colocynthis* contiennent des glycosides, des flavonoïdes, des alcaloïdes, des curcurbitacines, des acides gras et des huiles essentielles [4, 7, 16-20].

De récents travaux, menés sur les graines présentées dans les fruits de coloquintes, ont montré qu'elles sont constituées principalement de lipides, protéines et polysaccharides [19,21, 22]. Si les deux premières familles de ces composés ont bien été documentées, à notre connaissance, aucune étude n'a décrit la nature et la proportion des polysaccharides présents dans ces graines [2, 3, 6].

L'objectif de l'étude développée ici est donc d'identifier ces polysaccharides et de déterminer leurs compositions et d'autres composants tels que les protéines et les lipides. Pour

cela, un procédé d'extraction par voie chimique a été développé afin de pouvoir isoler, avec la plus grande pureté, les polysaccharides non hydrosolubles.

L'identification des polysaccharides insolubles dans l'eau a nécessité une étude précise d'analyse structurale et physico-chimique, en utilisant notamment un ensemble des techniques de caractérisation de polymères naturels comme la spectroscopie ATR-FTIR, l'IR-Raman, la résonance magnétique nucléaire (RMN  $H^1$  du liquide et RMN  $C^{13}$  du solide (CP/MAS)), la diffraction des rayons X, l'analyse thermique d'ATG et la MET.

## 1. MATERIELS ET METHODES

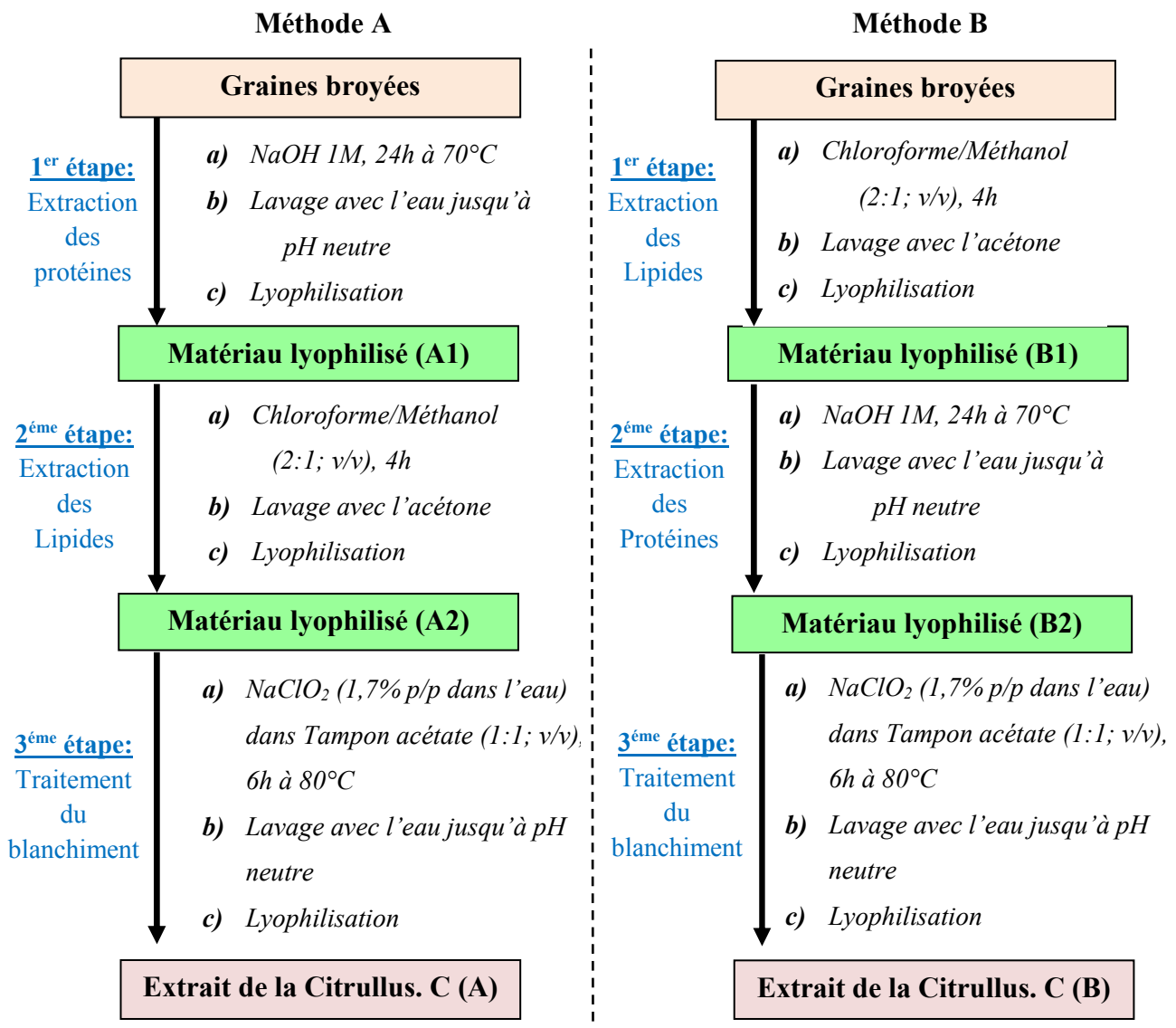
### 1.1. Matière première et produits chimiques

Comme déjà mentionnée la matière végétale première dans cette thèse est la *Citrullus colocynthis* (Cc) de la famille des cucurbitacées qui a été récoltées dans la région d'Ouargla dans le sud de l'Algérie (*Voir les chapitre II, III et V*). L'ensemble des produits chimiques, solvants et réactifs utilisés proviennent de Sigma Aldrich (*Voir tableau III-1*).

### 1.2. Procédé d'extraction des polysaccharides insolubles dans l'eau

Le procédé d'extraction de polysaccharide insoluble dans l'eau est décrit dans le chapitre (*Chapitre III*) avec plus de détails. La *figure IV-1* représente un schéma qui résume toutes les étapes d'extraction de ce polysaccharide non-hydrosoluble.





**Figure IV-1:** Le procédé d'extraction de polysaccharide insoluble dans l'eau à partir des graines de *Citrullus Colocynthis* selon les méthodes A et B.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Extraction chimique de polysaccharide insoluble dans l'eau

Dans cette étude, l'extraction de polysaccharide insoluble dans l'eau de graines de Cc a été réalisée grâce à deux procédés d'extraction chimique, comme illustré sur la *figure IV-1*.

Le premier procédé (Méthode A sur la *figure IV-1*) concerne la déprotéinisation des graines de Cc broyées dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 1M (1:30) à 70°C pendant 24h, suivie de l'extraction des lipides dans le mélange des solvants chloroforme/méthanol (2:1) à température ambiante pendant 4h.



Le deuxième procédé (Méthode B sur la *figure IV-1*) consiste à extraire le matériau lipidique avant l'étape de déprotéinisation en utilisant les mêmes conditions du procédé A.

Dans les deux procédés d'extraction, des polysaccharides insolubles dans l'eau ont été isolés avec un rendement en masse comparable (environ 54% p/p) à partir la poudre de départ et après les deux premières étapes d'extraction (*Voir figure IV-10*).

Cependant, selon les méthodes (A et B), des différentes valeurs de rendement massique ont été obtenues pour les premières étapes de déprotéinisation (pour la méthode A) et d'extraction des lipides (pour la méthode B). Ainsi, pour l'étape de déprotéinisation, le rendement massique est d'environ 55% (poids/poids) dans la méthode A comparé au rendement massique de 70% (poids/poids) dans la méthode B. En outre, pour l'étape d'extraction des lipides, le rendement massique est de 99% et de 77% (poids/poids) dans les méthodes A et B, respectivement (*Voir figure IV-10*).

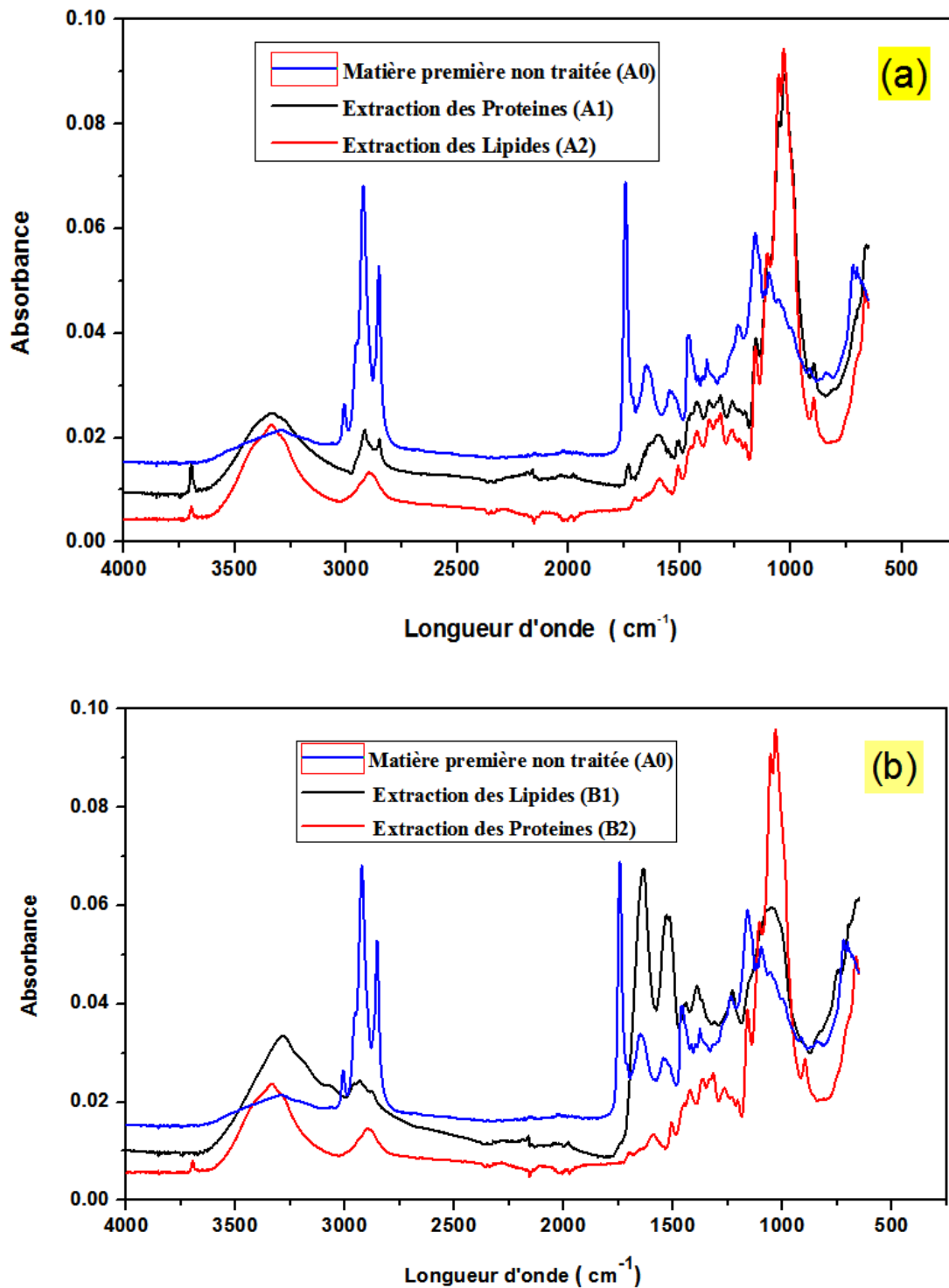
En fait, ces résultats montrent que les rendements massiques de déprotéinisation et d'extraction des lipides dépendent de l'ordre et la séquence de chaque étape du processus d'extraction.

Pour expliquer ces différences de rendement massique, on note qu'une proportion importante du matériau lipidique a également été éliminée lors de l'étape de déprotéinisation du procédé A, en raison de la formation d'un système triphasique (phase lipidique/phase aqueuse/phase insoluble dans l'eau) dans ces conditions d'extraction.

Par conséquent, seule la méthode B a permis une estimation précise des teneurs en lipides et protéines dans les graines de Cc autour de 23% (w/w) pour chacune, tel qu'on peut calculer les rendements massiques des étapes d'extraction des lipides et de déprotéinisation (*Voir figure IV-10*). Ces estimations sont en bon accord avec des données de la littérature, c'est-à-dire 14 à 28% (p/p) pour les protéines [13, 14, 15] et 23 à 27% (p/p) pour les lipides [4, 13, 15].

La spectroscopie ATR-FTIR a été utilisée pour analyser l'extrait obtenu après chaque étape d'extraction dans les méthodes A et B.

Ainsi, la *figure IV-2* montre l'évolution des spectres ATR-FTIR entre les graines de Cc broyées avant traitement et les extraits isolés après les étapes de déprotéinisation et d'extraction des lipides pour les deux méthodes A et B.



**Figure IV-2:** (a); Spectres ATR-FTIR de la matière première non traitée (A0), les résidus insolubles selon la méthode A après les étapes A1, A2 et (b); selon la méthode B après les étapes B1, B2.

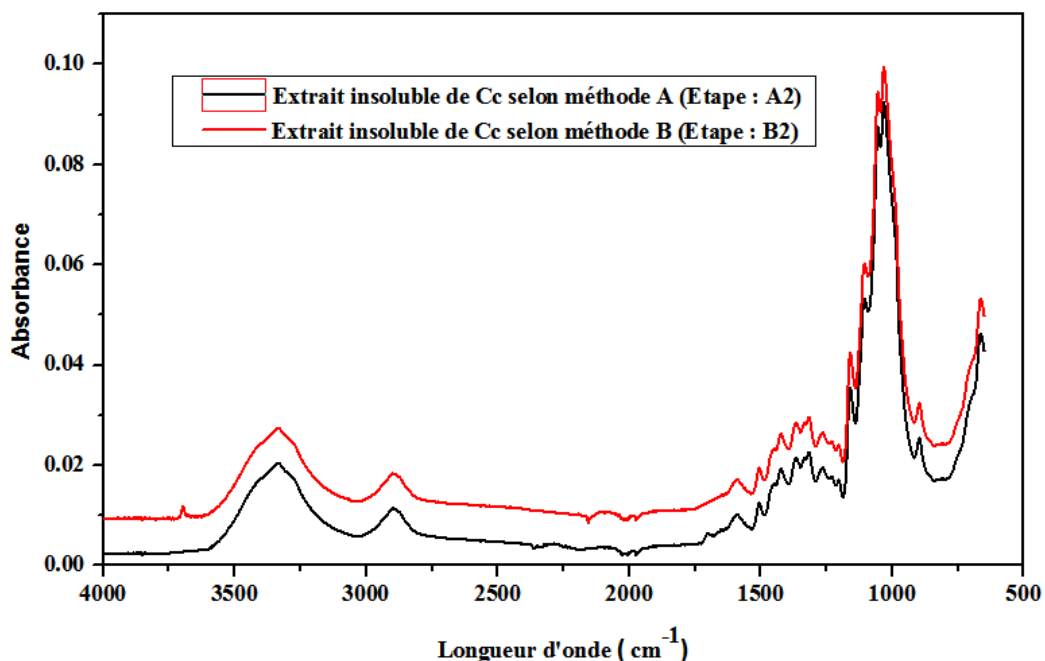
La *figure IV-2 (a)*, d'après la comparaison des spectres, montre clairement que les protéines et les lipides ont été éliminés pendant la première étape A1, puisque les spectres

ATR-FTIR des extraits A1 et A2 sont très similaires, caractérisés par l'absence de signaux typiques de lipides (Environ  $1741\text{ cm}^{-1}$ ) et des protéines (Environ  $1650\text{ cm}^{-1}$ ).

Au contraire, la *figure IV-2 (b)* fait ressortir que les matières lipidiques et les protéines ont été éliminées séparément pendant la méthode B. Comme prévu, les matières lipidiques et les protéines ont été complètement éliminées pendant la première et la deuxième étape B1 et B2 de la méthode B, respectivement.

Ainsi, le spectre ATR-FTIR de l'extrait B1 montre l'absence des signaux d'absorption lipidique (Environ  $1747\text{ cm}^{-1}$ ), mais la présence des signaux d'absorption des protéines (Environ  $1646\text{ cm}^{-1}$ ), qui disparaissent ensuite dans le spectre de l'extrait B2.

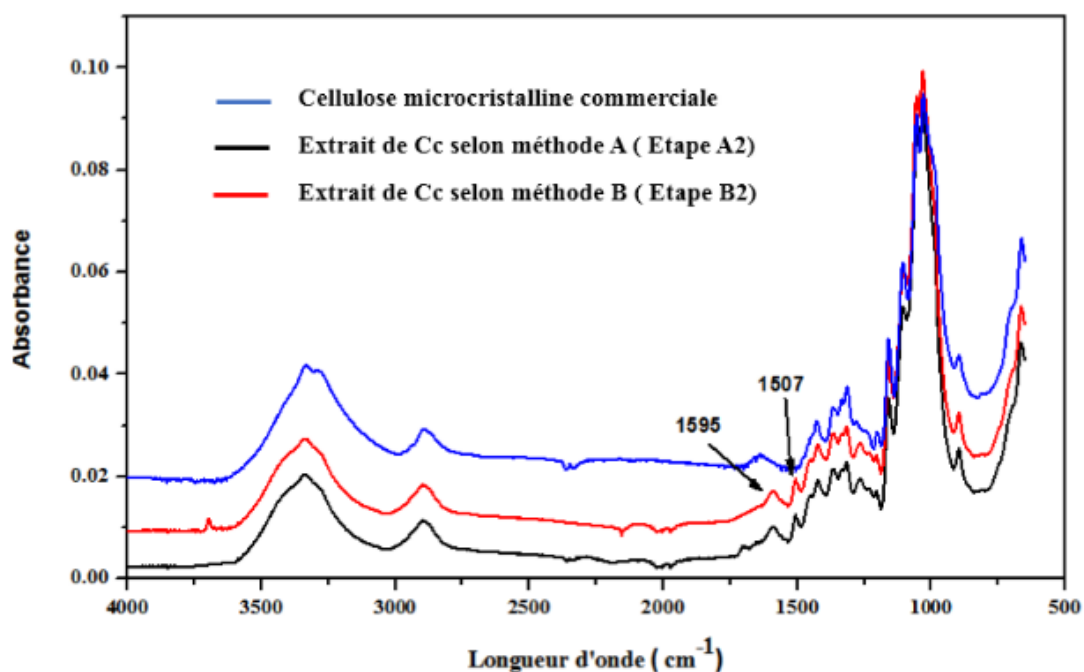
Finalement, comme illustré sur la *figure IV-3*, les spectres ATR-FTIR des extraits A2 et B2 sont complètement similaires, indiquant que la séquence et l'ordre des étapes de déprotéinisation et d'extraction lipidique n'a pas d'influence significative dans le processus d'extraction à la fois sur la composition des polysaccharides insolubles dans l'eau et sur leur rendement massique d'extraction. (*Voir les figures S1 et S2 dans l'annexe*).



**Figure IV-3:** Spectres ATR-FTIR des résidus selon les méthodes A et B après les étapes A2 et B2.

## 2.2. Identification des résidus insolubles

L'identification du polysaccharide des résidus insolubles de Cc a été réalisée par la comparaison avec les spectres ATR-FTIR d'autres polysaccharides commerciaux (*Voir l'annexe, les figures S3 à S6 et le tableau S1 pour les détails*). A partir de cette comparaison avec les polysaccharides commerciaux, on constate que le spectre ATR-FTIR de l'extrait final de plante Cc est similaire à la cellulose microcristalline par la présence de pics identiques dans les deux spectres. Ainsi, on peut dire que la cellulose microcristalline est le polysaccharide majeur dans les résidus insolubles des graines de Cc, comme indiqué sur la *figure IV-4*.

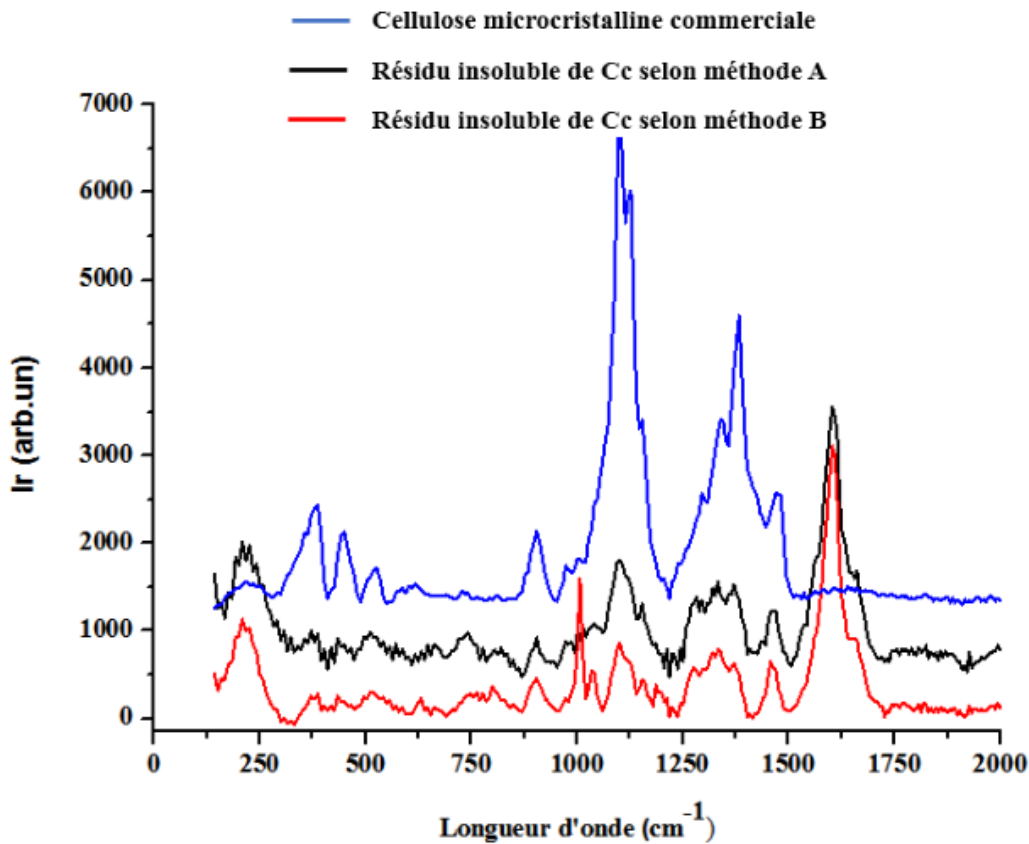


**Figure IV-4:** Spectres ATR-FTIR de la cellulose microcristalline commerciale et les résidus insolubles à partir des méthodes d'extraction A et B (A2 et B2).

Selon la *figure IV-4*, l'extrait de Cc présentait deux bandes d'absorption supplémentaires à 1507 et 1595  $\text{cm}^{-1}$  en comparaison avec le spectre de la cellulose microcristalline. Cela pourrait être dû à la présence de groupes phénoliques liés aux déformations axiales des cycles aromatiques de la lignine, comme le montre le spectre FTIR de la lignine pure [23].

Une analyse similaire pourrait être effectuée par IR-Raman. La *figure IV-5* affiche les spectres IR-Raman de la cellulose microcristalline commerciale et les résidus insolubles de

Cc avant blanchiment pour les deux méthodes A et B. Les spectres IR-Raman des polysaccharides commerciaux sont donnés dans *les figures S7 à S9 dans l'annexe*.



**Figure IV-5:** Comparaison des spectres IR-Raman de la cellulose commerciale et les résidus insolubles des graines de Cc à partir des méthodes d'extraction A et B avant blanchiment.

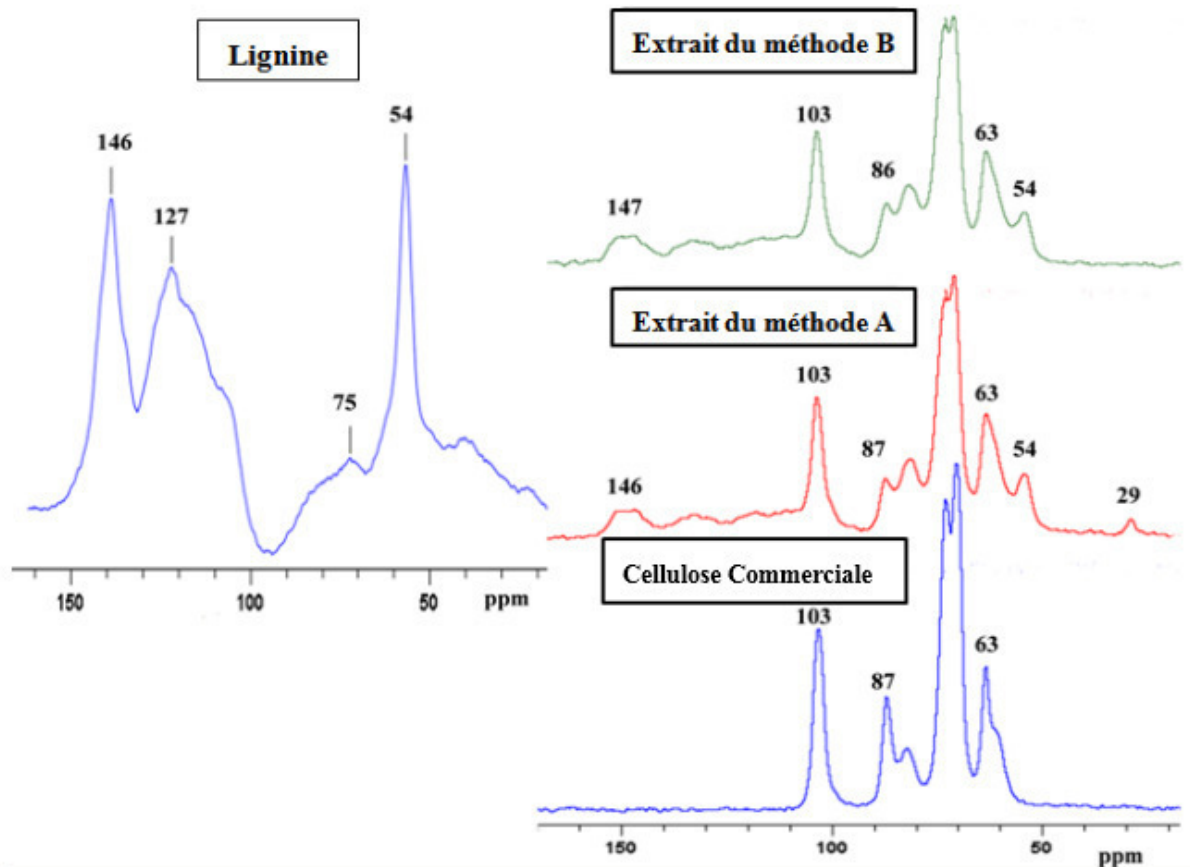
Comme représenté sur la *figure IV-5*, les spectres IR-Raman des résidus insolubles obtenus à partir des deux méthodes d'extraction A et B sont similaires mais il existe une petite différence par la présence d'un pic dans l'extrait de la méthode B à 1000 cm<sup>-1</sup> peut être due à la présence d'un autre type de polysaccharide mineur (éventuellement, l'hémicellulose).

Le spectre IR-Raman pour la cellulose microcristalline commerciale est également différent aux spectres pour les résidus insolubles pour les deux méthodes A et B par la présence d'un pic situé à 1600 cm<sup>-1</sup>; ce pic est attribué à des cycles aromatiques de lignine et aussi il est présent dans le spectre IR-Raman de la lignine [24]. (*Voir figure S9 dans l'annexe*).

Lorsque on compare ce résultat avec IR-Raman et FTIR-ATR de la lignine, nous trouvons que le même pic à 1600 cm<sup>-1</sup> et 1596 cm<sup>-1</sup> respectivement, dans ce cas, le pic à 1600 cm<sup>-1</sup> dans le résidu insoluble pour les deux méthodes A et B est pour la lignine.



La RMN  $^{13}\text{C}$  du solide a également été utilisée comme technique supplémentaire pour fournir des informations supplémentaires sur la structure moléculaire des extraits insolubles de Cc. La *figure IV-6* présente le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (CP/MAS) de la lignine, la cellulose microcristalline commerciale et les extraits insolubles de Cc pour les deux méthodes A et B.



**Figure IV-6:** Spectre RMN du carbone solide  $^{13}\text{C}$  avec (CP/MAS) de la lignine, la cellulose microcristalline commerciale et les extraits insolubles de Cc avant blanchiment.

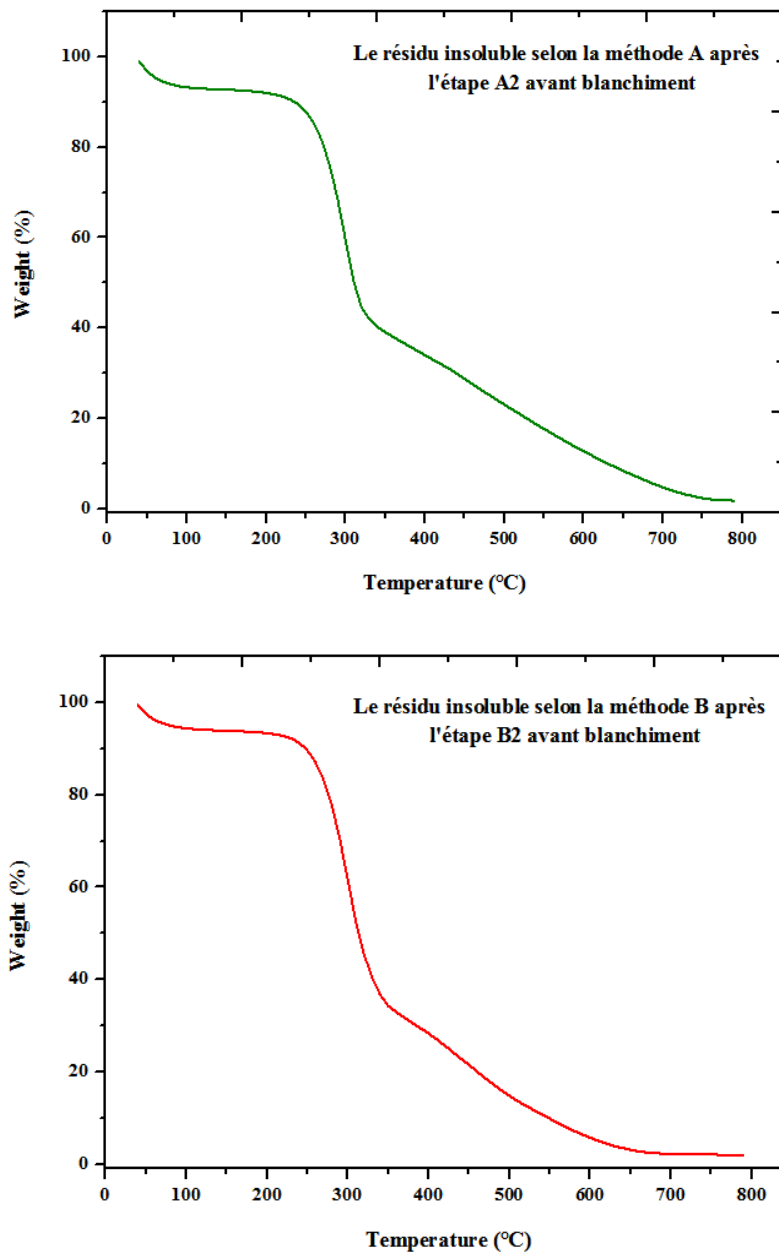
Encore une fois, sur la *figure IV-6*, nous avons observé que les spectres des extraits pour les deux méthodes A et B sont similaires avec la cellulose microcristalline commerciale avec des pics de résonance supplémentaires à 54 et 146 ppm de lignine.

Mais les extraits pour les méthodes A et B ne sont pas les mêmes; puisque l'extrait de la méthode A présente un pic supplémentaire à 29 ppm, ce pic dû à la présence d'hémicellulose [33]. A partir de là, la méthode B est la meilleure méthode d'extraction car elle donne une cellulose plus pure.

Les résultats de ATR-FTIR, IR-Raman et RMN  $^{13}\text{C}$  à l'état solide (CP/MAS) montrent que les résidus insolubles de Cc pour les deux méthodes d'extraction A et B, présentent des

fortes analogies structurales avec la cellulose en présence d'autres polysaccharides mineurs sont ; la lignine et l'hémicellulose.

La stabilité thermique des résidus insolubles selon les deux méthodes d'extraction A et B avant blanchiment de Cc, a été étudiée par l'analyse thermogravimétrique avec une vitesse de perte de masse de 10°C/min. L'évolution du pourcentage des masses d'échantillons ainsi que ses dérivées par rapport à la température, sont représentées en fonction de la température de 25°C jusqu'à 800°C (Figure IV-7).



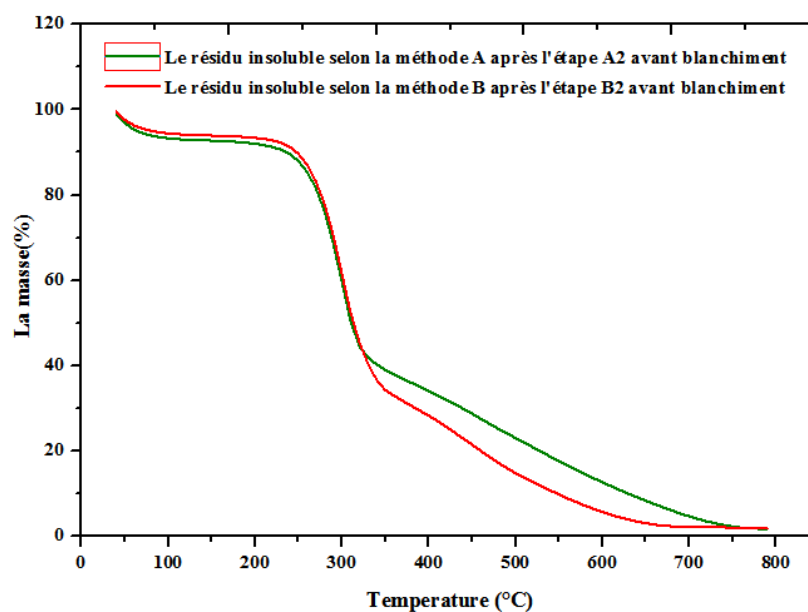
**Figure IV-7:** Thermogrammes ATG des résidus insolubles A2 et B2 avant blanchiment de Cc

Ces thermogrammes mettent en évidence deux pertes de masse principales. La première de l'ordre de 5 à 6% débute à la température ambiante jusqu'à 100°C pour les deux résidus insolubles A2 et B2 et la seconde d'environ 93% de 100°C à 700°C. Cette dernière s'étend sur un large domaine et sa dérivée par rapport à la température montre qu'il s'agit d'un événement complexe en plusieurs étapes.

Sur les signaux dérivés nous observons plusieurs épaulements avec un pic principal à 301°C et 300°C pour le résidu insoluble A2 et B2 respectivement. La première perte de masse est un départ d'eau et la seconde est caractéristique de la dégradation d'un matériau « composite » végétal. Au-delà de 700°C, les résidus représentent environ 2% pour les deux échantillons A2 et B2. Le *tableau IV-1* présente l'analyse statistique des deux pertes de masses ainsi que les positions en température des deux principaux pics. (*Voir la figure S10 dans annexe*).

**Tableau IV-1:** Données d'analyse thermogravimétrique avant traitement du blanchiment.

|                        | 1 <sup>ère</sup> perte de masse (%) | La dégradation (°C) | 2 <sup>ème</sup> perte de masse (%) | Résidus (%) |
|------------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------|
| Le résidu insoluble A2 | 6,74                                | 301                 | 91,15                               | 1,71        |
| Le résidu insoluble B2 | 5,58                                | 300                 | 92,19                               | 1.87        |



**Figure IV-8:** Comparaison des thermogrammes ATG des résidus insolubles A2 et B2 avant blanchiment de Cc.



Les résultats expérimentaux d'analyse thermogravimétrique permettent d'observer un comportement commun à la dégradation entre les résidus insolubles A2 et B2 selon les deux méthodes A et B, avant blanchiment de la plante *Citrullus colocynthis*.

Dans cette étude, afin d'étudier l'influence des différentes étapes d'extraction sur les modifications structurales des résidus insolubles avant traitement du blanchiment de la plante de *Citrullus colocynthis* sont comparées à celles des résidus insolubles après traitement du blanchiment. (Voir la figure S11 dans annexe).

### 2.3. Impact et effet du blanchiment sur les résidus insolubles

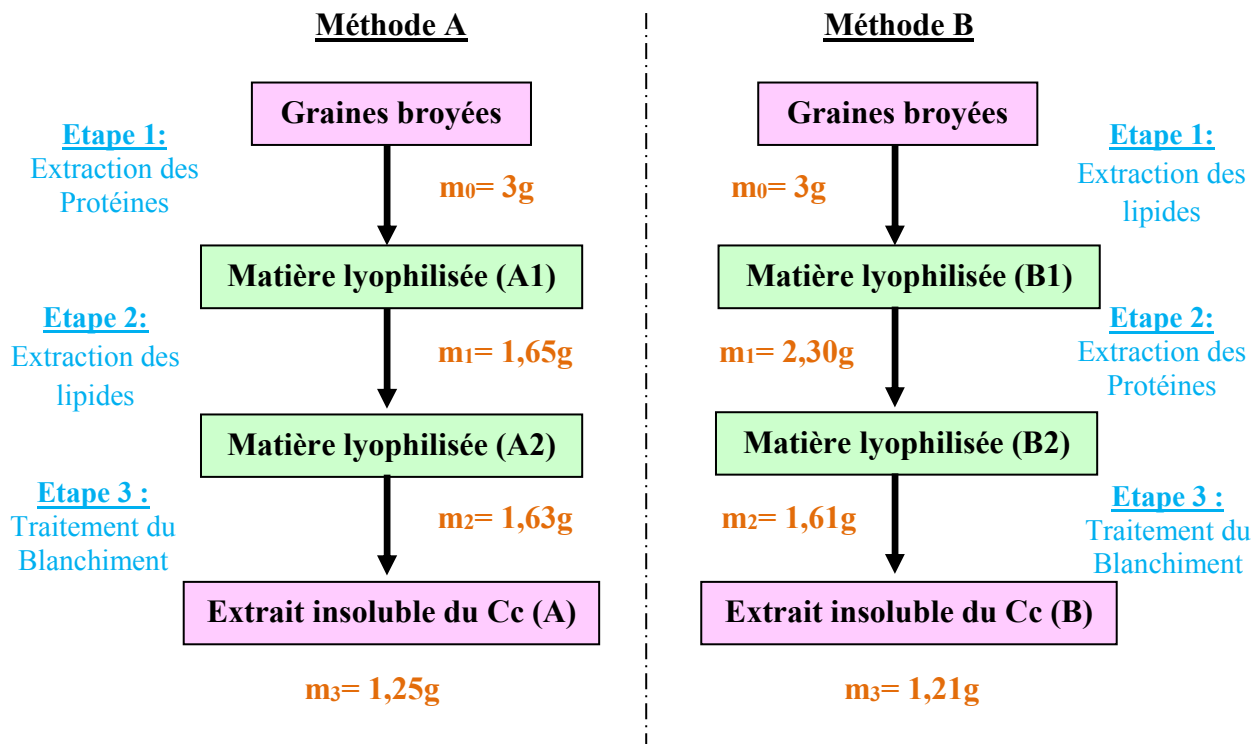
Comme les résidus insolubles de Cc pour les deux méthodes A et B montrent à la contribution de la lignine et l'hémicellulose, nous avons effectué un traitement de blanchiment dans le but de purifier la cellulose et d'éliminer la lignine et l'hémicellulose [16].



**Figure IV-9:** Poudre d'extraits insolubles des graines de Cc: (a); Avant traitement de blanchiment, (b); Après le traitement de blanchiment.

Nous avons observé un changement de couleur pour les extraits insolubles de la couleur marron clair à la couleur blanche.

Les rendements massiques pour les extraits finaux de Cc après le traitement du blanchiment pour les deux méthodes A et B sont présentés à la figure IV-10.



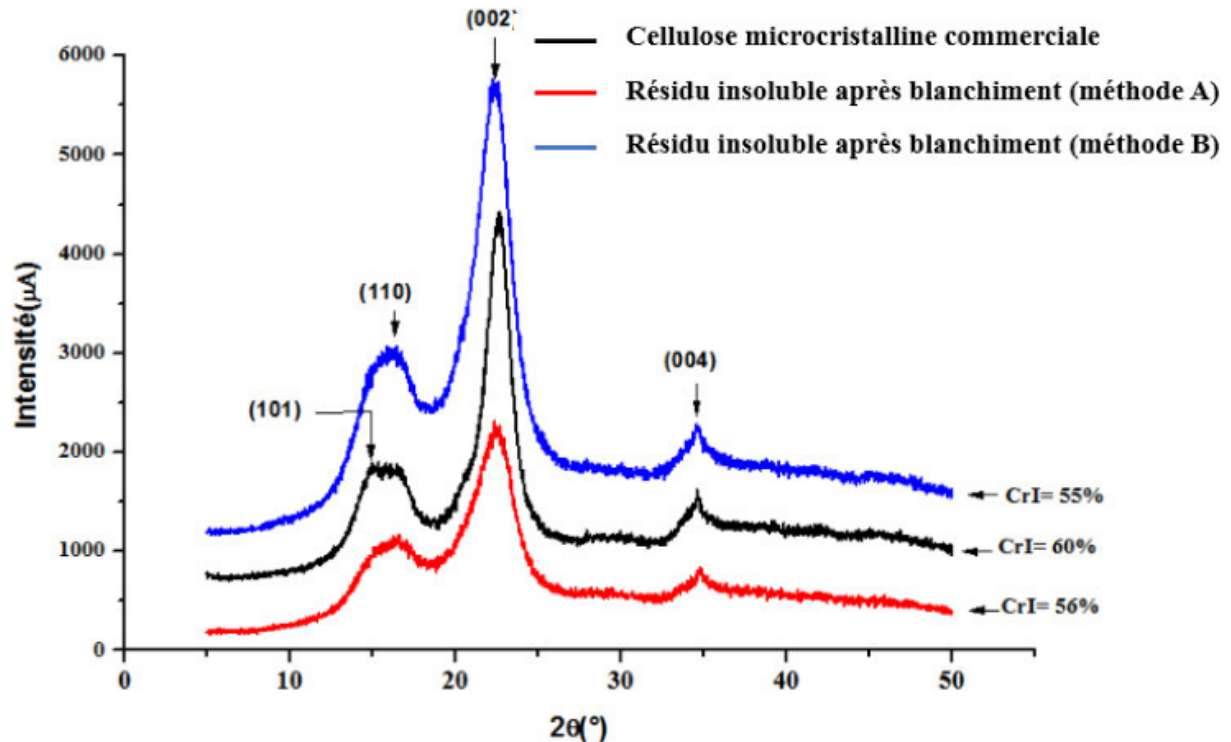
**Figure IV-10:** Rendements massiques des extraits insolubles avant et après traitement du blanchiment pour les deux méthodes A et B.

Premièrement, nous commençons par la première méthode A ; on peut voir que lors de l'étape A1 il y a une grande perte de poids, ça commence au départ avec  $m_0 = 3\text{g}$  et on obtient après  $m_1 = 1,65\text{g}$ , mais à la seconde étape A2 la masse reste presque la même (perte de masse négligeable), elle devient  $m_2 = 1,63\text{g}$  et après le traitement de blanchiment la masse devient  $m_3 = 1,25\text{g}$ . Le pourcentage de protéines et de lipides trouvés selon la méthode A est de 45% et le pourcentage d'extrait insoluble et de la lignine est respectivement de 42% et 13% respectivement.

Dans la suite, nous allons maintenant passer à la méthode B, l'étape B1 ne présente pas une grande perte de poids, la masse de départ  $m_0 = 3\text{g}$  elle devient  $m_1 = 2,3\text{g}$ , alors nous avons extrait seulement des lipides, mais lorsque on passe à l'étape B2 la masse est encore changée car elle devient  $m_2 = 1,61\text{g}$  et après le traitement du blanchiment la masse devient encore  $m_3 = 1,21\text{g}$ . Donc, Le pourcentage des lipides et des protéines selon la deuxième méthode B est égal à 23% et 23%, respectivement, et le pourcentage du matériau insoluble et de la lignine est 40% et 13% respectivement.

### 2.3.1. Diffraction des rayons X

Les diffractogrammes des rayons X de la cellulose microcristalline commerciale et les échantillons étudiés sont présentés sur la *figure IV-11*.



**Figure IV-11:** Diffraction des rayons X de la cellulose microcristalline commerciale et les résidus insolubles de Cc après blanchiment.

On peut voir à partir des courbes, les quatre pics autour de  $2\theta = 14^\circ$ ,  $2\theta = 16^\circ$ ,  $2\theta = 22^\circ$ , et  $2\theta = 34^\circ$  correspondent respectivement à des plans (110), (1-10), (200) et (004) de la cellulose I [25-27].

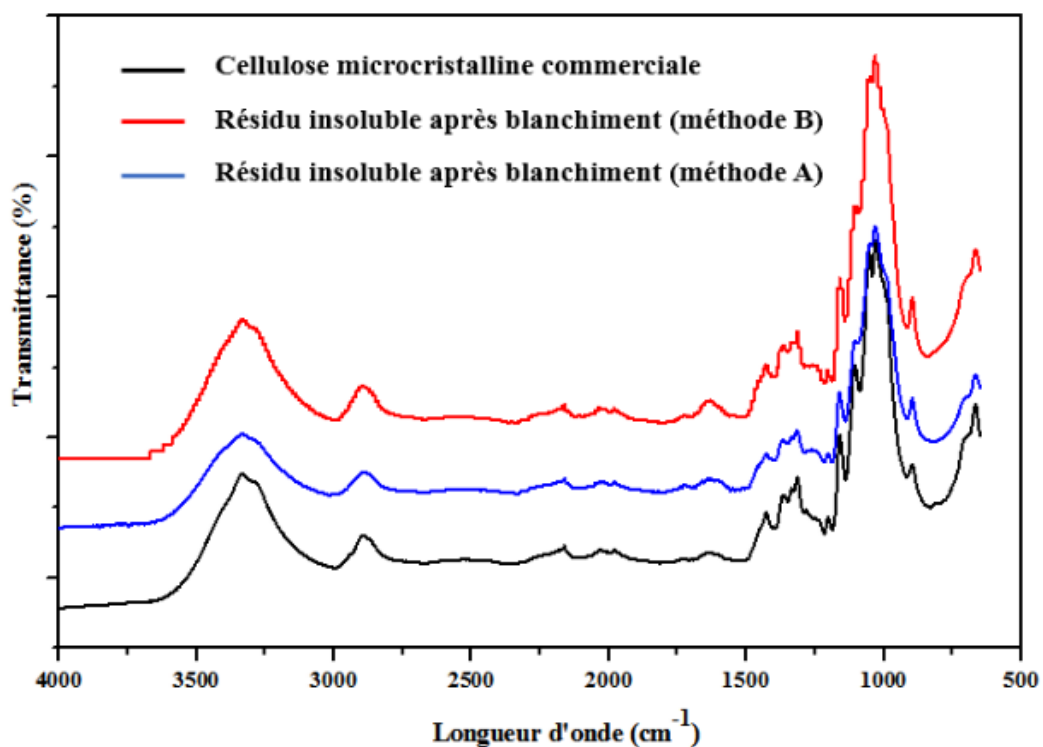
L'indice de cristallinité de la cellulose microcristalline commerciale et les extraits insolubles pour les deux méthodes A et B a été calculé. Il est égal à 60%, 56% et 55% respectivement. Selon ces valeurs, nous remarquons que la cellulose microcristalline commerciale a l'indice de cristallinité le plus fort par rapport aux autres échantillons de Cc.

Selon la *figure S12 dans SI*, des informations supplémentaires sur le degré de cristallinité avant et après le traitement de blanchiment, de sorte que le taux de cristallinité est augmenté avec le traitement du blanchiment par l'augmentation de la phase cristalline et détériore la phase amorphe et la lignine tels que le degré de cristallinité avant blanchiment pour la cellulose microcristalline commerciale et les extraits insolubles pour les deux

méthodes A et B est 60%, 50% et 49%, respectivement. Ceci confirme également la perte de masse avant et après traitement de blanchiment pour les deux méthodes A et B. (*Voir les figures S13 à S17 dans l'annexe pour plus d'information*)

### 2.3.2. Analyse par spectroscopie ATR-FTIR et IR-Raman

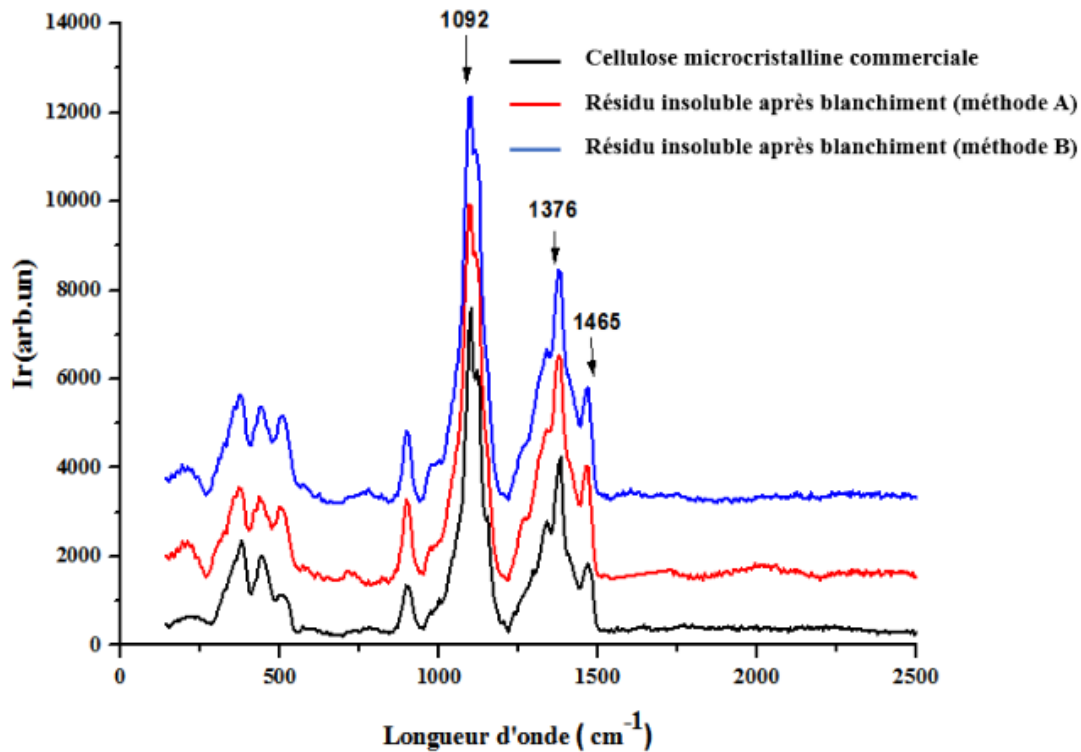
La *figure IV-12* montre l'identification structurale par ATR-FTIR de la cellulose microcristalline commerciale et les échantillons insolubles obtenus par isolement à partir de Cc pour les deux méthodes A et B après les traitements de blanchiment dans la gamme de 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figure IV-12:** Spectres ATR-FTIR de la cellulose microcristalline commerciale et les résidus insolubles de Cc pour les deux procédés A et B après blanchiment.

Le *tableau S1* et la *figure S18* dans l'annexe déterminent et expliquent l'interprétation des spectres de chaque échantillon.

Une analyse spectroscopique a été effectuée sur IR-Raman pour quantifier les bandes Raman obtenues dans la gamme spectrale 200-2500  $\text{cm}^{-1}$ . Les spectres IR-Raman sont montrés sur la *figure IV-13*.



**Figure IV-13:** Spectres IR-Raman de la cellulose microcristalline et les résidus insolubles de *Cc* dans la gamme des nombres d'ondes 200-2500  $\text{cm}^{-1}$ .

Un signal caractéristique était présenté à  $1092 \text{ cm}^{-1}$ , ce qui est attribué au groupement C-H et C-H<sub>2</sub> et aussi à la vibration asymétrique de la liaison glycosidique C-O-C [28]. Cependant, les pics à  $1465 \text{ cm}^{-1}$  indiquent le groupement H-C-H et le pic caractéristique à  $1376 \text{ cm}^{-1}$  représente le groupement H-O-C [24].

Selon les résultats d'ATR-FTIR et IR-Raman, il n'y a pas des différences entre les spectres de cellulose microcristalline commerciale et les résidus insolubles de *Cc* après les traitements de blanchiment. L'absence des pics à  $1507$  et  $1595 \text{ cm}^{-1}$  indique l'élimination de la lignine et l'efficacité des processus de blanchiment. Également avec les spectres IR-Raman l'absence du pic à  $1000 \text{ cm}^{-1}$  indique l'absence d'hémicellulose ; le spectre est similaire à la cellulose microcristalline commerciale.

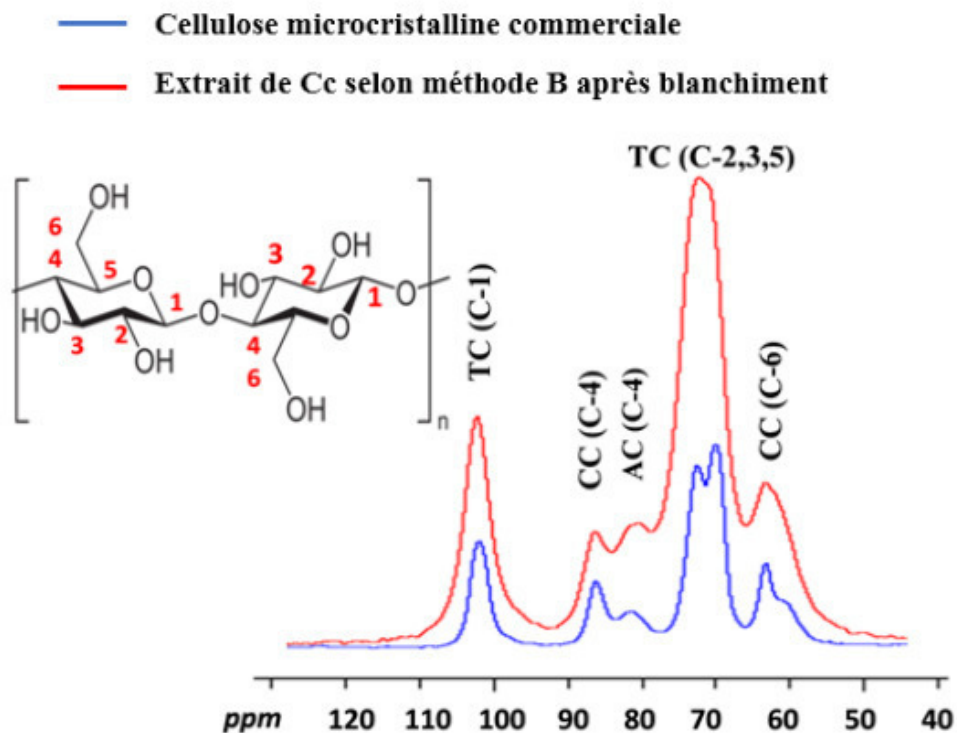
### 2.3.3. Analyse par RMN <sup>13</sup>C du solide

Comme déjà mentionné et selon les résultats précédents, l'extrait de *Cc* est une biomasse lignocellulosique, composée principalement de lignine et d'hémicellulose avant traitement de blanchiment.



Ainsi, la RMN  $^{13}\text{C}$  à l'état solide a été choisie comme technique complémentaire pour fournir des informations supplémentaires sur la structure moléculaire.

La *figure IV-14* présente les spectres RMN du carbone solide  $^{13}\text{C}$  (CP/MAS) de cellulose microcristalline commerciale et l'extrait de Cc après traitement de blanchiment pour la méthode B.



**Figure IV-14:** Spectres RMN du carbone solide  $^{13}\text{C}$  avec (CP/MAS) de la cellulose commerciale et l'extrait de Cc après blanchiment pour la méthode B. (CC: Cellulose Cristalline, TC: Cellulose Totale, AC: Cellulose Amorphe).

Les signaux entre 54 et 63 ppm sont attribués à C6. De plus, la région de 71 ppm est attribuée à C2, C3 et C5 de la cellulose [29, 30]. Évidemment, les signaux à 81 et 87 ppm sont affectés au carbone C4. Finalement, le signal à 103 ppm est affecté à C1 [31].

Les pics à 81 et 54 ppm sont dus à la région amorphe, où les signaux à 87 et 63 ppm sont dus à C4 et C6 de la région cristalline [32]. D'autre part, les pics de RMN à 87 et 63 ppm sont de la cellulose cristalline (CC) et les pics à 103 et 70 ppm sont de la cellulose totale (TC). Alors que le pic de 81 ppm est la cellulose amorphe (AC), qui semble être inchangée dans les échantillons de Cc [33].

A partir de la *figure IV-14*, il existe une forte similitude entre la cellulose microcristalline commerciale et l'extrait final de Cc après le traitement de blanchiment. Mais il y a une différence presque négligeable entre les deux en raison de la cristallinité de chaque matériau, de sorte que la cellulose commerciale microcristalline est plus cristalline que l'extrait de Cc parce que l'intensité de cellulose microcristalline commerciale est plus forte que l'extrait de Cc comme indiqué sur la *figure IV-14* et les résultats de DRX.

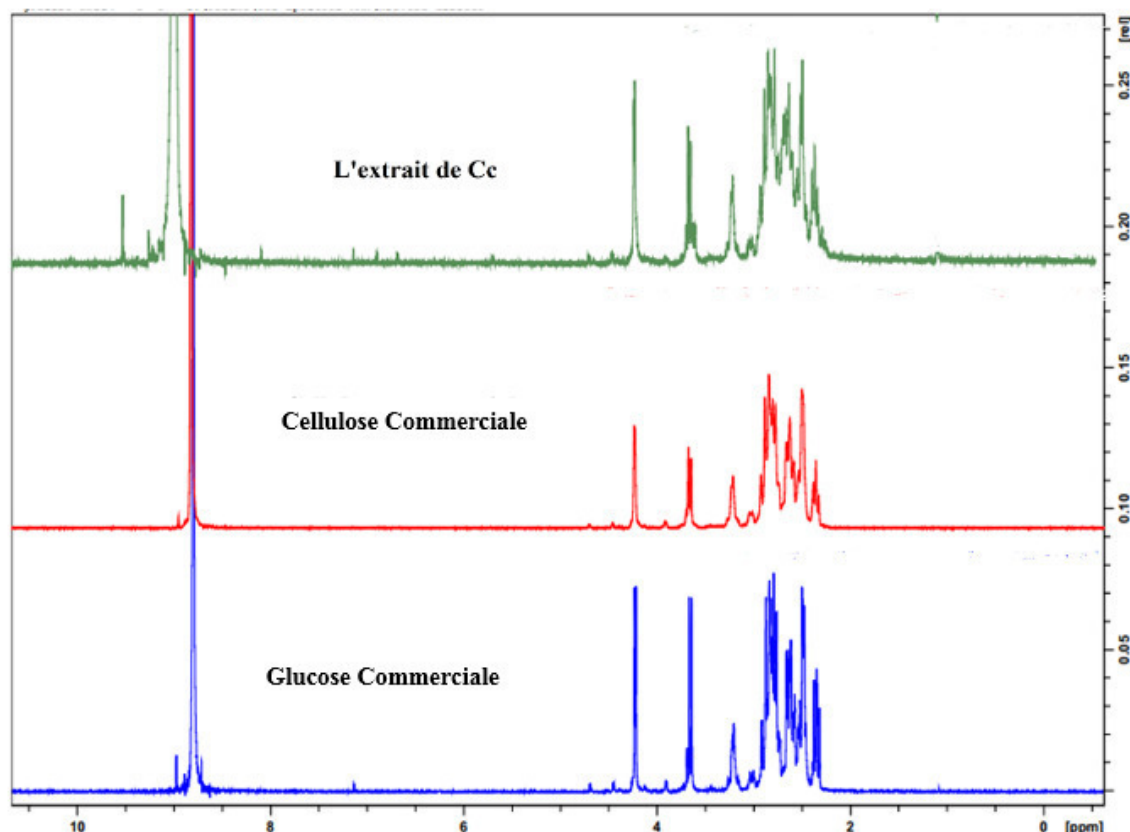
Selon la *figure S19 en SI* et lorsqu'on compare la cristallinité avant et après le traitement de blanchiment, il y a une augmentation car pendant le traitement de blanchiment la région amorphe a été dégradée.

La cellulose commerciale microcristalline et l'extrait de Cc après le traitement de blanchiment, n'ont montré aucun signal dans la région aromatique en 54 et 146 ppm et le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  d'un échantillon de Cc montre des caractéristiques typiques de la cellulose microcristalline commerciale. Ainsi, la RMN  $^{13}\text{C}$  à l'état solide assure une bonne élimination de la lignine après le traitement de blanchiment.

#### 2.3.4. Analyse par RMN- $^1\text{H}$ du proton

La *figure IV-15* présente les spectres RMN du proton liquide  $^1\text{H}$  de cellulose microcristalline commerciale, du glucose et de les extraits de Cc après traitement de blanchiment pour les deux méthodes A et B.





**Figure IV-15:** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du proton de la cellulose et du glucose commerciale et d'extrait de Cc après blanchiment.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du proton cellulose microcristalline commerciale a été réalisé dans le solvant de  $\text{D}_2\text{SO}_4$  à (50%) (Figure IV-15). Le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'extrait insoluble de Cc a également été réalisé dans les mêmes conditions afin d'établir des comparaisons.

Quel que soit le spectre considéré de la cellulose commerciale et de glucose commerciale, ils montreront des pics très similaires avec le même déplacement chimique. En comparaison avec l'extrait insoluble de Cc, le spectre présente aussi des signaux caractéristiques permettant de distinguer nettement la cellulose et le glucose.

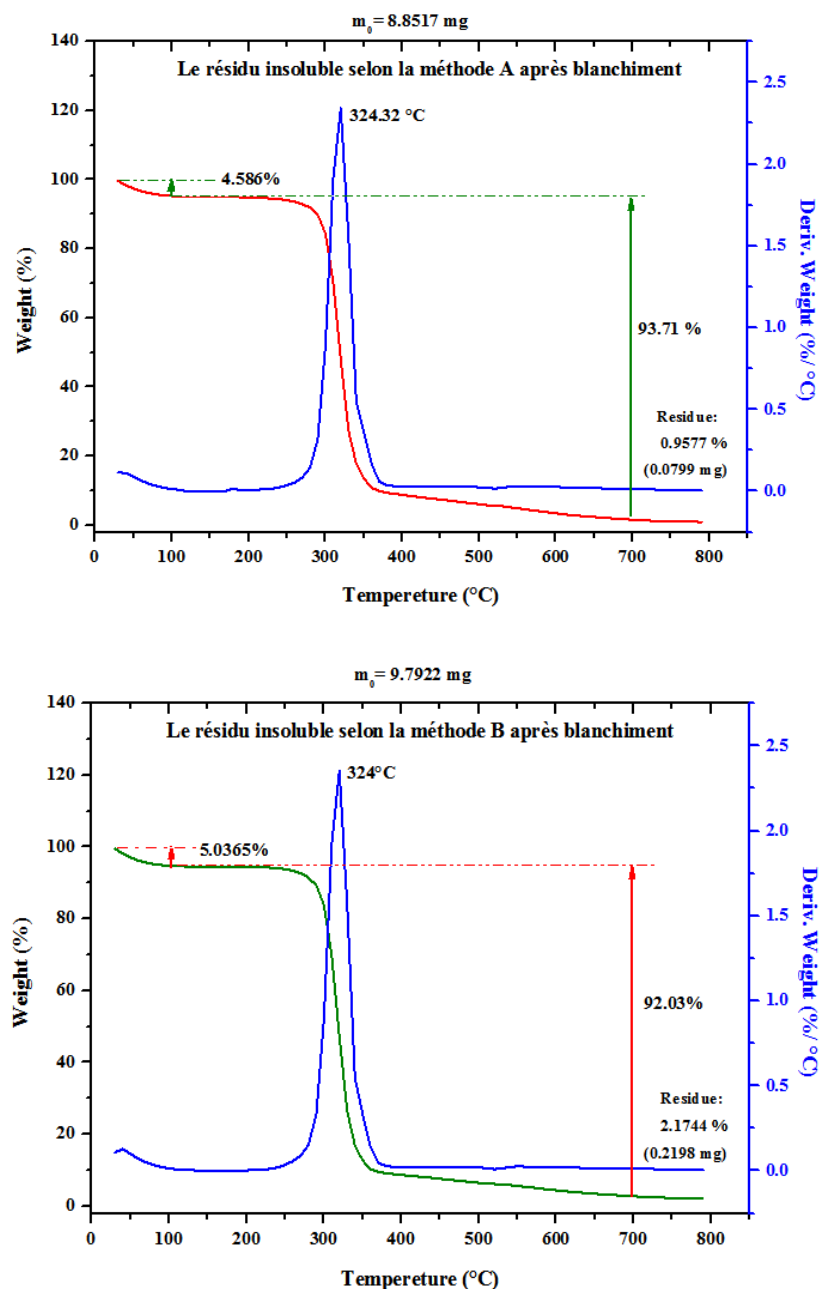
Alors, les spectres sont identiques, mais il apparaît des petits pics sont presque négligeables peut être dus à des impuretés dans l'extrait ou bien dans le solvant.

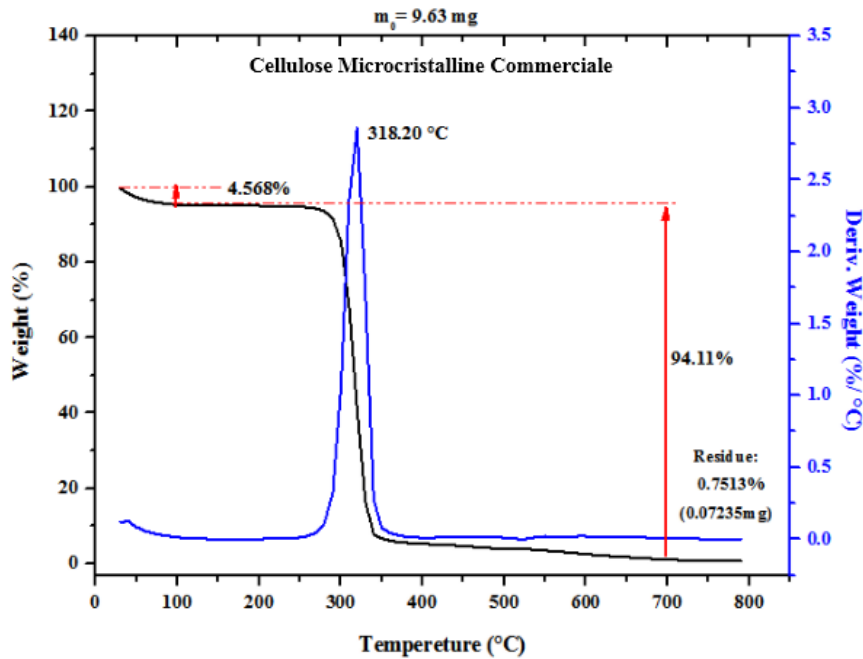
Donc, les résultats obtenus par RMN  $^1\text{H}$  du proton confirment que la structure d'extrait obtenu à partir de Cc après blanchiment est très similaire à la cellulose et glucose commerciaux, et confirment aussi l'efficacité de solubilité de cellulose avec ce procédé d'hydrolyse acide avec  $\text{D}_2\text{SO}_4$  de concentration 50%, à température ambiante pendant une nuitée.

Donc la conclusion finale à partir des résultats obtenus par RMN  $^1\text{H}$  du proton, est que l'extrait final insoluble de Cc après blanchiment est une cellulose.

### 2.3.5. Analyse thermogravimétrique ATG

La stabilité thermique des résidus insolubles selon les deux méthodes d'extraction A et B après traitement du blanchiment de Cc a été étudiée par analyse thermogravimétrique avec une rampe en température de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . L'évolution du pourcentage des masses d'échantillons ainsi que ses dérivées par rapport à la température sont représentées en fonction de la température de  $25^\circ\text{C}$  jusqu'à  $800^\circ\text{C}$  (Figure IV-16).





**Figure IV-16:** Thermogrammes ATG des résidus insolubles après blanchiment selon les deux méthodes A et B de Cc

Ces thermogrammes mettent en évidence deux pertes de masse principales. La première de l'ordre de 4 à 5% débute à la température ambiante jusqu'à 100°C pour les deux résidus insolubles A et B et la seconde d'environ 93% de 100°C à 700°C. Le maximum du pic de la dérivée à 320°C pour les deux résidus A et B ainsi que leurs forme étroite traduisent la dégradation d'un matériau pur. Au-delà de 700°C, les résidus représentent environ 1%.

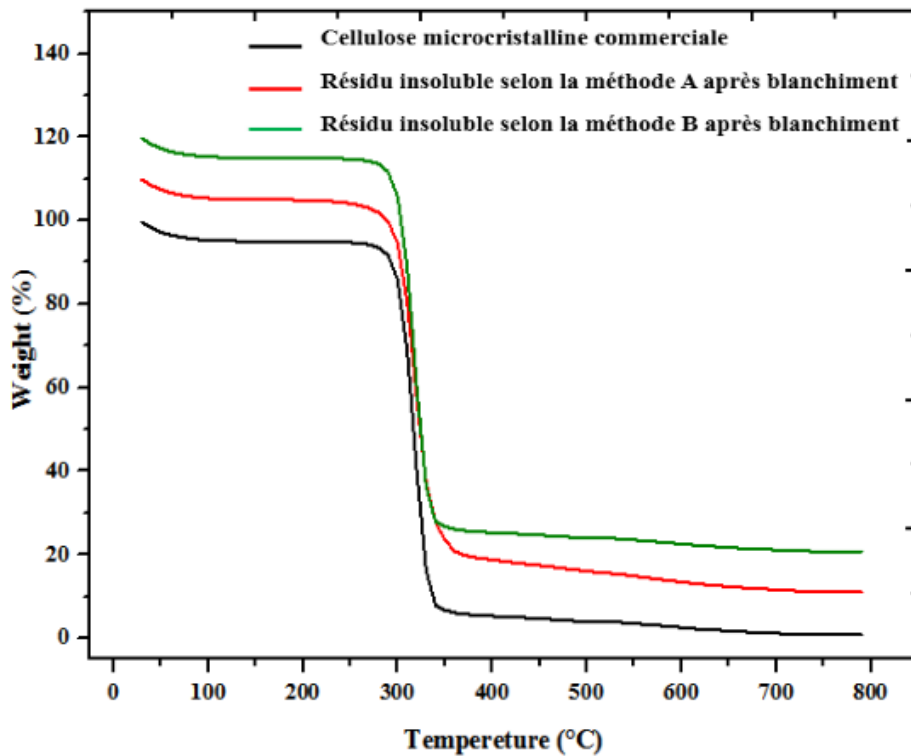
Le *tableau IV-2* présente l'analyse statistique des deux pertes de masses ainsi que les positions en température des deux principaux pics.

**Tableau IV-2:** Données d'analyse thermogravimétrique après traitement du blanchiment.

|                       | 1 <sup>ère</sup> perte de masse (%) | La dégradation (°C) | 2 <sup>ème</sup> perte de masse (%) | Résidus (%) |
|-----------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|-------------|
| Le résidu insoluble A | 4,6                                 | 320                 | 93,71                               | 0,95        |
| Le résidu insoluble B | 5,03                                | 320                 | 92,03                               | 2,17        |

D'après les analyses thermogravimétriques précédentes, les teneurs en eau des résidus insolubles selon les deux méthodes A et B avant et après traitement du blanchiment et stockés dans les mêmes conditions hygrométriques, varient de 4 à 5%. Par conséquent les différentes étapes d'extraction sur les modifications structurales n'influencent pas la prise en eau.





**Figure IV-17:** Comparaison des thermogrammes ATG des résidus insolubles selon les deux méthodes A et B après blanchiment de Cc avec la cellulose microcristalline commerciale.

Les résultats expérimentaux d'analyse thermogravimétrique permettent d'observer un comportement commun à la dégradation entre les résidus insolubles A et B selon les deux méthodes A et B après blanchiment de la plante *Citrullus colocynthis*.

Donc, il y a similitude entre la cellulose microcristalline commerciale et les résidus finaux de la plante de *Citrullus colocynthis* après traitement du blanchiment selon les deux méthodes A et B. Alors, l'extrait final c'est une cellulose.

La cellulose extraite est un matériau homogène. Ce résultat est vérifié par une autre étude, pour la cellulose la plus pure [34], une température de 318°C au maximum de la cinétique de dégradation. La pureté chimique augmente la stabilité thermique de la cellulose [34]. La lignine au contraire, de structure hétérogène, avec une stabilité moindre, commence à se dégrader vers 180°C. Hatakeyama associe le premier pic de dégradation de la lignine à la présence d'hémicellulose résiduelle et le pic de dégradation principal à un complexe lignine cellulose [35]. La polymérisation de la lignine avec ses trois monomères différents peut aussi expliquer la dégradation en plusieurs étapes. Le taux de résidu de la lignine est six fois supérieur à celui de la cellulose.

La stabilité thermique de la paroi végétale dépend de la structure chimique de ses constituants principaux ; plusieurs études [36-38] ont montré que la lignine est plus stable que la cellulose, cette dernière étant plus stable que l'hémicellulose. Une autre étude sur le bois et ses polymères pariétaux [39, 40] positionne la cellulose comme plus stable devant le bois, la lignine et l'hémicellulose. La stabilité thermique de la paroi végétale dépend essentiellement de la cellulose et la lignine.

### 3. EXTRACTION DES NANOFIBRILLES DE CELLULOSE

#### 3.1. Préparation des nanofibrilles de cellulose (nanocristaux)

150 mg d'extrait de Cc ont été agités mécaniquement dans 7,5 ml de solution aqueuse d'acide sulfurique à 40% (v/v) dans le rapport (poudre/solution) (20:1) (mg/ml), à température ambiante pendant 30 min et 4h.

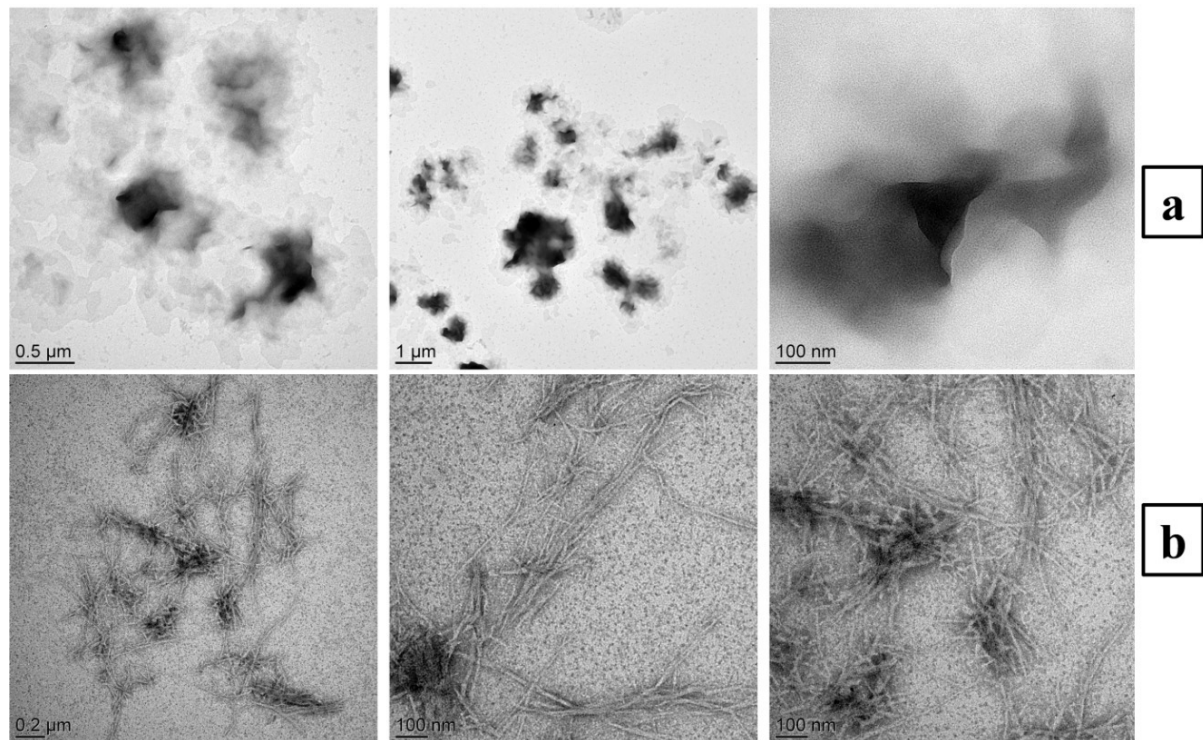
La suspension a été diluée avec de l'eau purifiée pour arrêter la réaction d'hydrolyse acide. La partie insoluble ensuite a été séparée par centrifugation (10000 rpm, 20 min, 10°C), suivie par un lavage avec l'eau purifiée jusqu'à l'obtention du pH neutre et finalement la lyophilisation.

Le lyophilisat a ensuite été remis en suspension dans de l'eau purifiée (20/1; p/v) (mg/ml), et traité par sonication (20 kHz) pendant 10 min, et enfin filtré sur une membrane en nylon hydrophile de 45 µm conduisant à des nanofibrilles de cellulose.

#### 3.2. Analyse par Microscopie Electronique à Transmission (MET)

La morphologie des nanofibrilles de la cellulose de Cc a été étudiée après la dégradation de la cellulose amorphe par hydrolyse acide en utilisant l'acide sulfurique à 40% pendant 30 min et 4h avec la sonication était nécessaire pour observer la morphologie fibrillaire des nanofibres [41], comme le montre la *figure IV-18*.





**Figure IV-18 :** Micrographes MET des nanofibrilles de cellulose obtenue à partir de graines de *Citrullus Colocynthis* ; **(a)** : Préparés avec 30 min d'hydrolyse, **(b)** : Préparés avec 4h d'hydrolyse.

Des différences significatives ont été observées dans la morphologie des extraits de Cc obtenus après 30 min et 4h d'hydrolyse.

Les nanofibrilles de cellulose de Cc dans la [figure IV-18 \(a\)](#) ont montré des grosses particules agglomérées, dans lequel la présence de fibrilles ne pouvait guère être mise en évidence. Ce résultat indique que 30 min d'hydrolyse acide ne suffit pas pour la dégradation de la phase amorphe de cellulose des graines de Cc.

Sur la [figure IV-18 \(b\)](#), les micrographies présentaient des fibrilles à l'échelle nanométrique (0,2µm et 100nm), la plupart d'entre elles étant encore agrégées pour former un réseau fibrillaire [42, 43].

Les caractéristiques géométriques des fibrilles ou des nanofibrilles de cellulose de Cc dépendent de l'origine de la cellulose et les conditions d'hydrolyse acide (c'est-à-dire la durée, la température et la pureté des matériaux) [41].



Ainsi, l'examen par microscopie électronique à transmission (*figure IV-18 (a,b)*) a révélé que la cellulose de Cc subit avec succès une hydrolyse acide pour produire des nanoparticules de cellulose poly dispersées et bien stabilisées ayant une structure d'aiguille.

#### 4. CONCLUSION

Ce travail rapporte deux méthodes pour l'extraction de polysaccharides insolubles dans l'eau à partir de graines Cc et ATR-FTIR, RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$ , diffraction des rayons X, IR-Raman, ATG et la microscopie électronique à transmission MET, ont été utilisées pour caractériser l'extrait de Cc avant et après traitement de blanchiment.

La dispersion de la lignine indique une plus grande efficacité des procédés de blanchiment. L'enlèvement de la lignine est confirmé par l'absence à  $1507$  et  $1595\text{ cm}^{-1}$  dans l'ATR-FTIR, et  $1600\text{ cm}^{-1}$  dans la spectroscopie IR-Raman.

Les indices de cristallinité déterminés pour la cellulose commerciale microcristalline 60% étaient plus élevés que la cellulose obtenue 56%. Selon l'analyse par diffraction des rayons X, nous notons que la cellulose microcristalline commerciale contient un indice de cristallinité plus fort par rapport aux autres échantillons de Cc.

A partir des résultats, on a trouvé que la cellulose isolée des graines Cc avait une analogie structurale forte comparable à la cellulose commerciale microcristalline car aucune différence significative n'a été observée dans la morphologie de la cellulose microcristalline commerciale avec la cellulose obtenue après traitement de blanchiment selon l'analyse des spectres RMN.

D'après les résultats de microscopie électronique à transmission MET, on peut confirmer qu'il est possible d'obtenir des nanofibrilles de cellulose à partir de fibres de *Citrullus colocynthis* par hydrolyse acide.



---

## Les références du chapitre IV

---

- [1]: Guo S., Mao W., Han Y., Zhang X., Yang C., Chen Y., Chen Y., Xu J., Li H., Qi X., Xu J. (2010). Structural characteristics and antioxidant activities of the extracellular polysaccharides produced by marine bacterium *Edwardsiella tarda*. *Bioresource Technology*, 101, 4729-4732.
- [2]: Sousa K. S., Silva Filho E. C., Airoidi C. (2009). Ethylene sulfide as a useful agent for incorporation into the biopolymer chitosan in a solvent-free reaction for use in cation removal. *Carbohydrate Research*, 344, 1716-1723.
- [3]: Benaoun F., Delattre C., Boual Z., Ursu A. V., Vial C., Gardarin C., Wadouachi A., Le Cerf D., Varacavoudin T., El-Hadj M.D.O., Pierre G., Michaud P. (2017). Structural characterization and rheological behavior of a heteroxylan extracted from *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) seeds. *Carbohydrate Polymers*, 175, 96-104.
- [4]: Zheng Y., Monty J., Linhardt R. J. (2015). Polysaccharide-based nanocomposites and their applications. *Carbohydrate Research*, 405, 23-32.
- [5]: B. Marzouk, Z. Marzouk, R. Décor, L. Mhadhebi, N. Fenina, M. Aouni, (2010). Antibacterial and anti-fungal activities of several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruits and seeds, *Journal de Mycologie Médicale* 20, 179-184.
- [6]: S. Eidi, H.G. Azad, N. Rahbar, H. Mehmannaavaz, (2015). Evaluation of antifungal activity of hydro alcoholic extracts of *Citrullus colocynthis* fruit, *Journal of Herbs Medical* 5, 36-40.
- [7]: D. Fenny, L. Jiarong, Z. Cankui, (2007). Phylogeography of the bitter apple, *Citrullus colocynthis*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54, 327-336
- [8]: S. Najafi, N. Sanadgol, B.S. Nejad, M.A. Beiragi, E. Sanadgol, (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*, *Journal of Medical Plant Reseach* 4.22, 2321-2325.



- [9]: A.I. Abdel-Hassan, J.A. Abdel-Barry, S. Tariq Mohammeda, (2000). The hypoglycemic and anti hyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxandiabetic rabbits, *Journal of Ethnopharmacology* 71, 325-330.
- [10]: M. Archana, S. Garima, K. Sumita, S. Meenakshi, S.L. Kothari, (2013). Anti mycobacterial activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Against drug sensitive and drugresistant *Mycobacterium tuberculosis* and MOTT clinical isolates, *Journal of Ethnopharmacology* 195–200.
- [11]: N. Lis Garcia de Rodriguez, W. Thielemans, A. Dufresne, (2006). Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nano composites, *Cellulose* 13, 261–270.
- [12]: P.L. Granja, L. Pouysegu, M. Petraud, B. Jeso, C. Baquey, M.A. Barbosa, (2001). Cellulose Phosphates as Biomaterials. I. Synthesis and Characterization of Highly Phosphorylated Cellulose Gels, *Journal of Applied Polymer Science* 82, 3341–3353.
- [13]: W. Sawaya, N. Dagher, K. Jehangir, (1989). *Citrullus colocynthis* seeds as a potential source of protein for food and feed, *Journal of Agric. Food Chemistry* 34, 285–288.
- [14]: F.O. Uruakpa, R.E. Aluko, (2004). Heat-induced gelation of whole egusi (*Colocynthis citrullus* L.) seeds, *Food Chemistry* 87, 349–354.
- [15]: A.N. Bhattacharya, (1990). *Citrullus colocynthis* Seed Meal as a Protein Supplement for Najdi Sheep in Northern Saudi Arabia, *Animal Feed Science and Technology* 29, 57-62.
- [16]: H. Natiq AR, DA. Whiting, NJ. Yousif, (1989). Cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*, *Phytochemistry* 28.4, 1268-1271.
- [17]: S. Gurudeeban, K. Satyavani, T. Ramanathan, (2010). Bitter apple (*Citrullus colocynthis*): an overview of chemical composition and biomedical potentials, *Asian Journal of Plant Science* 9, 394–401.
- [18]: S. Sonja, S. Hermann, (2000). Analysis of Cucurbitacins in medicinal plant by high-pressure liquid chromatography–mass spectrometry, *Phytochemical Analysis* 11, 121-127.
- [19]: H. Sadou, H. Sabo, M.M. Alma, M. Saadou, C.L. Leger, (2007). Chemical content of the seeds and physico-chemical characteristic of the seed oils from *Citrullus colocynthis*, *Cocciniagrandis*, *Cucumismetuliferus* and *Cucumisprophetarum* of Niger, *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia* 21, 323–330.



- [20]: N. Sebbagh, C. Cruciani-Guglielmacci, F. Ouali, M.F. Berthault, C. Rouch, D.C. Sari, C. Magnan, (2009). Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil enriched diet in strep tozotocin-induced diabetes in rats, *Diabetes and Metabolism* 35, 178–184.
- [21]: B. J. Akinyele, O. S. Oloruntoba, (2013). Comparative Studies on *Citrullus vulgaris*, *Citrullus colocynthis* and *Cucumeropsis mannii* for Ogiri Production, *British Microbiologic Research Journal* 3 (1), 1-18.
- [22]: H. Riaz, S.S. Chatha, A.I. Hussain, S.A. Bukhari, S.M. Hussain, K. Zafar, (2015). Physico-chemical characterization of bitter apple (*Citrullus Colocynthis*) seed oil and seed residue, *International Journal of Bioscience* 6, 283-292.
- [23]: V. Mauro, P.G. Idejan, M.O. Carmen, T.N. Alfredo, (2016). Isolation of whiskers from natural sources and their dispersed in a non-aqueous medium, *Polímeros*. 26, 327-335.
- [24]: Ö. Özgenç, S. Durmaz, I.H. Boyaci, H. Eksi-Kocak, (2017). Determination of chemical changes in heat-treated wood using ATR-FTIR and FT Raman spectrometry, *Spectroch. Acta Part A: Mole. Biom. Spectro.*171, 395–400.
- [25]: H. Sherif SZ, (2017). Differentiation and Synonyms Standardization of Amorphous and Crystalline Cellulosic Products, *Nanoscience and Nanotechnology* 4.3, 73-85.
- [26]: P. Maria-Cristina, P. Carmen-Mihaela, L. Gabriela, S. Yusaku, (2011). Evaluation of morphological and chemical aspects of different wood species by spectroscopy and thermal methods, *Journal of Molecular Structure* 988, 65-72.
- [27]: W. Masahisa, O. Takeshi, S. Junji, (2001). Allomorphs of native crystalline cellulose I evaluated by two equatorial d-spacings. *Journal of Wood Science* 47, 124-128.
- [28]: P.A. Ana Paula, P.Z.O.Luana, A.N.C. Aloísio, N. Reiner, F.C.O. Luiz, G.M.E. Howell, C.S. (2016). Antonio, the structure of different cellulosic fibres characterized by Raman spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy* 86, 324–330.
- [29]: S. Noppadon, Z. Zhiguang, W. Sungsool, Z. Percival, (2011). Cellulose Solvent-Based Biomass Pretreatment Breaks Highly Ordered Hydrogen Bonds in Cellulose Fibers of Switch grass, *Biotechnology and Bioengineering* 108, 521-529.



- [30]: S. Park, J.O. Baker, M.E. Himmel, P.A. Parilla, D.K. Johnson, (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulose performance, *Biotechnology Biofuels* 3-10.
- [31]: M.A. Martins, L.A. Forato, L.H. Mattoso, L.A. Colnago, (2006). A solid state  $^{13}\text{C}$  higher solution NMR study of raw and chemically treated sisal fibers, *Carbohydrate Polymers* 127-133.
- [32]: W. Hanne, L.M. Sirkka, (2004). Characterization of thermally modified hard- and softwoods by  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR, *Carbohydrate Polymers* 58, 461–466.
- [33]: H.G. Tai, G.C. Li, S.J. Huang, C.R. Jhu, J.H. Chung, B.Y. Wang, C.S. Hsu, B. Brandmair, D.T. Chung, H.M. Chen, J.C. Chung Chan, (2016). Chemical distinctions between Stradivari's maple and modern tone wood, *PNAS Early Edit.* 1-6.
- [34]: Sun J.X, Sun X.F, Zhao H, Sun R.C, (2004). Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse, *Polymer Degradation and Stability*, 84, 331-339.
- [35]: Hatakeyama H, Tsujimoto Y, Zarubin M. Ja, Krutov S. M, Hatakeyama T, (2010). Thermal decomposition and glass transition of industrial hydrolysis lignin, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 101, 289-295.
- [36]: Xiao B, Sun X.F, Sun R, (2001). Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw, *Polymer Degradation and Stability*, 74, 307–319.
- [37]: Franceschi F, Luciano G, Carosi F, Cornara L, Montanari C, (2004). Thermal and microscope analysis as a tool in the characterisation of ancient papyri, *Thermochimica Acta*, 418, 39-45.
- [38]: Khezami L, Chetouani A, Taouk B, Capart R, (2005). Production and characterisation of activated carbon from wood components in powder: cellulose, lignin, xylan, *Powder Technology*, 157, 48-56.
- [39]: Jafarpour Moghaddam G, (2007). Dynamique macromoléculaire dans la paroi végétale et ses polymères pariétaux, Thèse de l'Université de Toulouse.
- [40]: Jafarpour G, Dantras E, Boudet A, Lacabanne C, (2008). Molecular mobility of poplar cell wall polymers studied by dielectric techniques, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 354, 3207-3214.

**[41]: J.H. Nascimento, R. Luz, F.M. Galvão, J.D. Melo, F. Oliveira, L. Rasiah, A. Zille, (2015).** Extraction and Characterization of Cellulosic Nanowhisker obtained from Discarded Cotton Fibers, *Mater. Tod: Proceedings*. 2, 1–7.

**[42]: A.P. Gonçalves, A.M. Cruz, J.C. Sales, M. Souza, F.L. Silva, D. Guimarães, S. Mattedi, N. José, (2016).** Achievement and Characterization of Cellulose Nanowhiskers of Palm (*Elaeis Guineensis*) and Bromelia Fibers (*Neoglaziovia Variegata*), *Chemical Engineering Transactions* 50, 403-408.

**[43]: A. Hebeish, S. Farag, S. Sharaf, A.M. Rabie, T.I. Shaheen, (2013).** Modulation of the Nanostructural Characteristics of Cellulose Nanowhiskers via Sulfuric Acid Concentration, *Egyptian Journal of Chemistry* 56, 271–289.



# Chapitre V

---

Optimisation du procédé  
d'extraction et caractérisation du  
polysaccharide hydrosoluble issu de la  
Coloquinte

---

## Introduction

Les galactomannanes sont des polysaccharides neutres couramment extraits de l'endosperme de nombreuses graines de plantes en raison de leurs propriétés physico-chimiques spécifiques tels que la solubilité dans l'eau, peu coûteux, écologique et l'absence de toxicité, ensuite, ils sont utilisés dans diverses industries [1-4].

Les galactomannanes sont des polysaccharides de réserve dont la structure typique est un squelette  $\beta$ -(1-4)-D-mannane avec des ramifications uniques de D-galactose  $\alpha$ -(1-6). Leurs rapports mannose/galactose (M/G) diffèrent selon les espèces naturelles [5-8].

Ce travail vise à extraire ce polysaccharide à partir des graines de *Citrullus colocynthis* étant donné que c'est l'une des sources principales des galactomannanes. Dans les processus d'extraction des CCPs, plusieurs facteurs indépendants pourraient interagir avec la masse finale. Cependant, la méthodologie de surface de réponse (RSM) est une méthode d'optimisation qui permet de déterminer tous les facteurs ainsi que les interactions possibles entre différentes variables indépendantes, de sorte qu'un ensemble de conditions expérimentales peut être optimisé [9-11].

Dans cet essai, beaucoup des facteurs peuvent influencer sur le rendement d'extraction, la RSM est appliquée pour adapter et exploiter un modèle mathématique qui représente la relation entre les réponses (la masse finale) et les variables (c'est-à-dire la température, le temps et le rapport de l'eau) [12, 13].

Ce travail vise à optimiser le procédé d'extraction du polysaccharide hydrosoluble (galactomannane) du *Citrullus colocynthis*, en utilisant la RSM, par l'application des trois niveaux et trois variantes pour étudier les effets du temps d'extraction, de la température d'extraction et du rapport de l'eau sur la masse finale des polysaccharides brute de *Citrullus colocynthis* (CCPs).

L'identification de polysaccharide soluble dans l'eau est réalisée en appliquant un ensemble des techniques de caractérisation, tels que l'ATR-FTIR, la spectroscopie IR-Raman et la diffraction des rayons X.





## 1. MATÉRIAUX ET MÉTHODES

### 1.1. Matière végétale

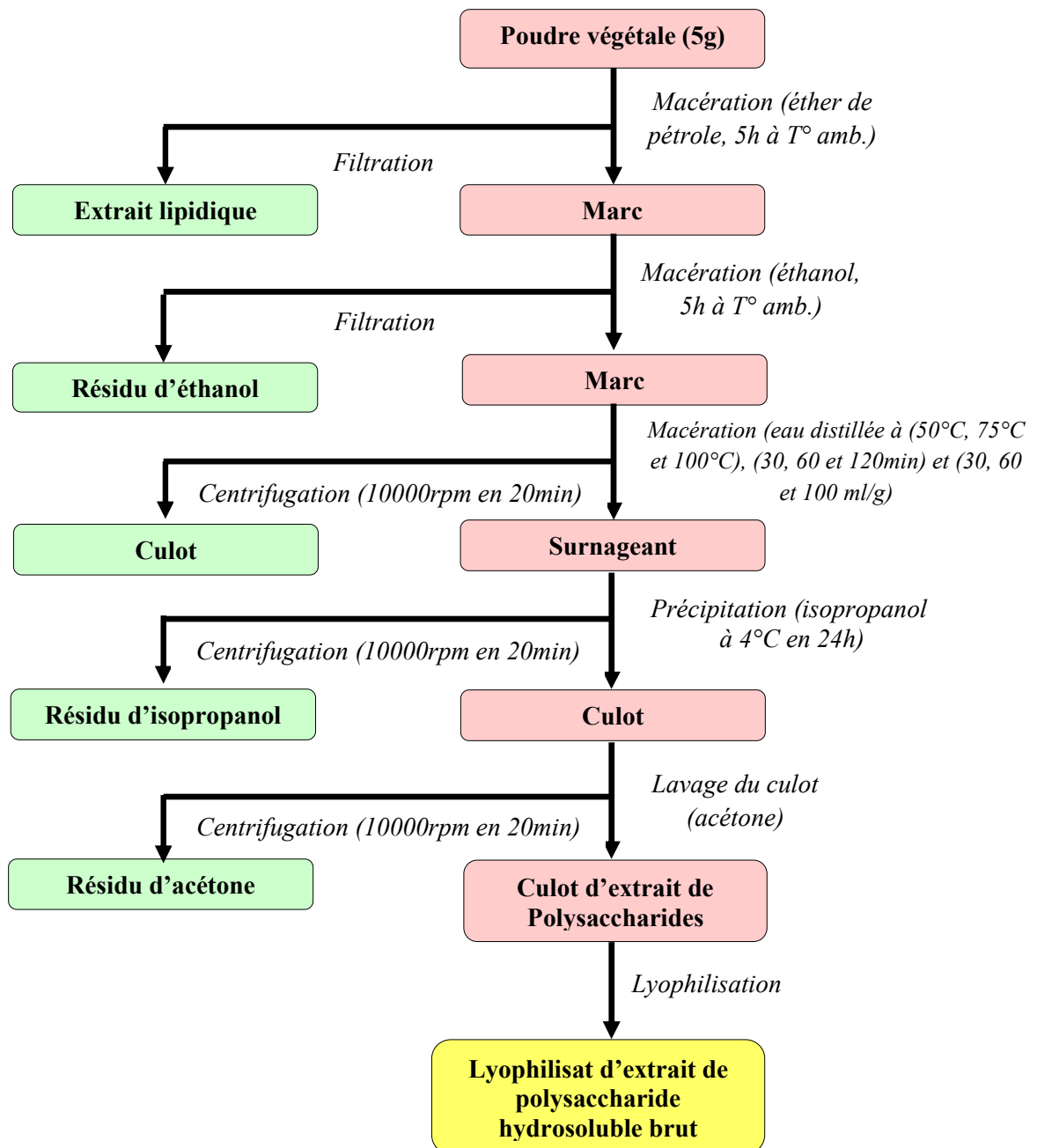
Tout au long de cette étude, nous avons travaillé sur les fruits de la *Citrullus colocynthis* (coloquinte) de la famille des cucurbitacées ; ils sont récoltés dans la région d'Ouargla, Sud-est algérien. Les graines des fruits ont été séparées manuellement, séchées à température ambiante pendant plusieurs jours, broyées et stockées dans un endroit sec jusqu'à leur analyse (*figure V-1*).



**Figure V-1:** Représentation de *Citrullus colocynthis* avec ses fruits et ses graines.

### 1.2. Procédure d'extraction

Le procédé d'extraction de polysaccharide soluble de galactomannane est décrit dans le chapitre précédent (*Chapitre III*) avec plus de détails. La *figure V-2* représente un schéma qui résume toutes les étapes d'extraction de ce polysaccharide hydrosoluble.



**Figure V-2:** Différentes étapes d'extraction de polysaccharides hydrosoluble.

## 2. CONCEPTION EXPÉRIMENTALE ET ANALYSE STATISTIQUE

La méthodologie de surface de réponse (RSM) a été utilisée pour estimer l'effet des paramètres d'extraction (**X1**: temps d'extraction, **X2**: température d'extraction et **X3**: rapport d'eau) sur la masse finale des CCPs, comme indiqué dans le *tableau V-1*.

**Tableau V-1:** Variables indépendantes et leurs niveaux utilisés dans la surface de réponse.

| Variables indépendantes       | Symbole        | Niveau de facteur |    |     |
|-------------------------------|----------------|-------------------|----|-----|
|                               |                | -1                | 0  | +1  |
| Temps d'extraction (min)      | X <sub>1</sub> | 30                | 60 | 120 |
| Température d'extraction (°C) | X <sub>2</sub> | 50                | 75 | 100 |
| Rapport d'eau (ml/g)          | X <sub>3</sub> | 30                | 60 | 100 |

L'équation quadratique complète utilisée est la suivante :

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{ij} b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \varepsilon_{ij}$$

Où  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ij}$  et  $b_{ii}$  représentent respectivement le terme constant, les coefficients des termes linéaires, des termes représentant les interactions entre variables et des termes quadratiques.  $X_i$  et  $X_j$  représentent les variables indépendantes codées ; et  $Y$  représente la réponse prédite.

Pour faire une analyse de variance (ANOVA) et pour déduire les constantes des différents modèles mathématiques ainsi que la présentation en 3D sous forme d'une surface de réponse  $Y = f(X_1, X_2)$ , nous avons utilisé un logiciel de statistique appelé Design-Expert.

L'objectif de cette analyse est de déterminer les facteurs et les interactions qui ont un effet statistiquement significatif sur les paramètres étudiés. La signification statistique des modèles de prédiction est évaluée par P-value et F-value d'ANOVA.

Les valeurs de  $R^2$  et  $R^2$  adjusted des modèles ont été évaluées pour vérifier le modèle adéquation. En outre, des expériences de confirmation supplémentaires ont été menées par la suite pour vérifier la validité du plan d'expérience statistique. P-valeurs de moins de 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives [14-16].

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

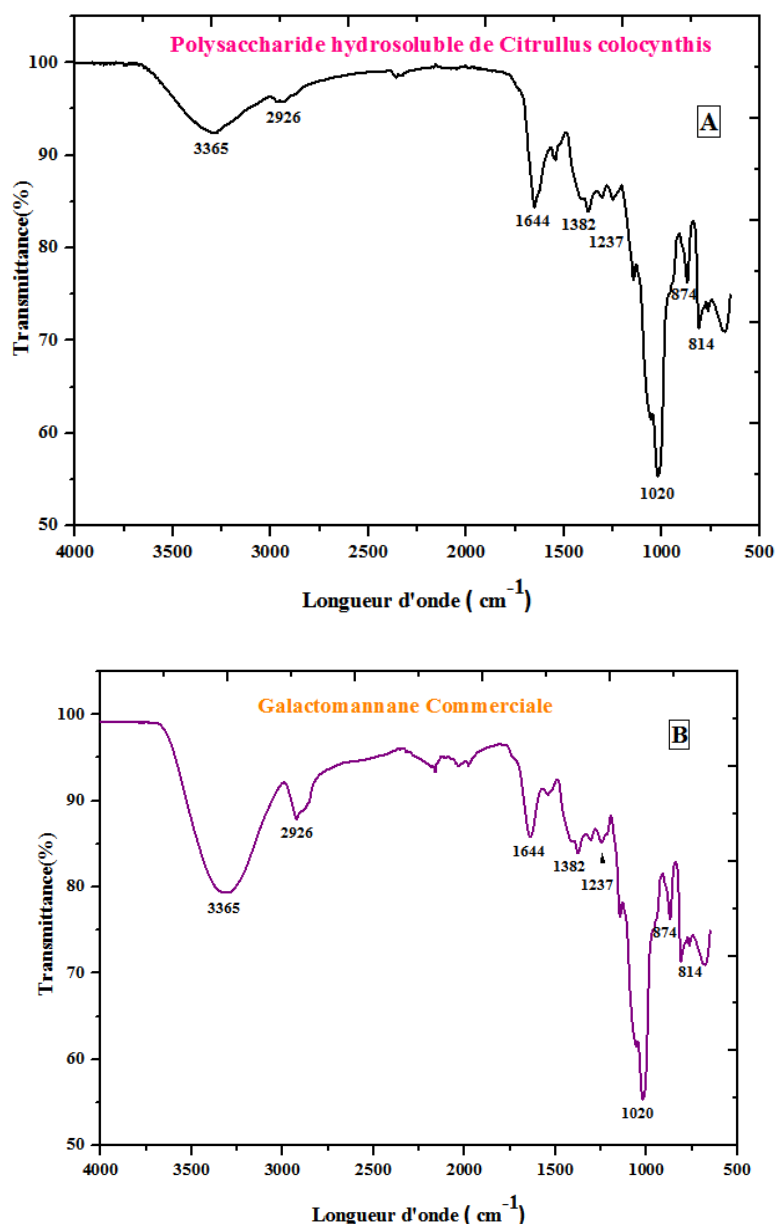
#### 3.1. Caractérisation des polysaccharides de *Citrullus Colocynthis*

Le polysaccharide préparé dans des conditions optimales est caractérisé par l'ATR-FTIR, la spectroscopie IR-Raman et la diffraction des rayons X.



### 3.1.1. Analyse d'ATR-FTIR

Les spectres ATR-FTIR des CCPs et de galactomannane commerciale sont représentés sur la *figure V-3* (A et B). L'analyse FTIR-ATR a été utilisée pour obtenir la connaissance immédiate sur le biopolymère de *Citrullus colocynthis*. Le galactomannane est un biopolymère et caractérisé par l'utilisation du spectre FTIR précédemment cité en littérature (*Figure V-3* (B) [17]). Le profil spectral et les intensités des bandes pour le matériau extrait de *Citrullus colocynthis* sont présentés sur la *figure V-3* (A).



**Figure V-3:** Spectres ATR-FTIR ; (A) matériau extrait de *Citrullus colocynthis*, (B) galactomannane commerciale.

Deux pics caractéristiques de polysaccharide ont été observés à environ  $3365\text{ cm}^{-1}$  et  $2926\text{ cm}^{-1}$ . Ces deux pics caractéristiques ont été attribués à la vibration d'étirement d'hydroxyle (O-H) [18, 19] et les groupes fonctionnels asymétriques (C-H), respectivement [20-23].

Le pic de  $1644\text{ cm}^{-1}$  représente la bande d'étirement du carboxylate ( $\text{COO}^-$ ) [24, 25]. La bande à  $1382\text{ cm}^{-1}$  est attribuée au groupe symétrique de ( $-\text{CH}_3$ ) [26, 27].

La bande autour de  $1237\text{ cm}^{-1}$  a été assignée à l'étirement du (C-O) dans un groupe acétyle [28-30] tandis que le pic à environ  $1020\text{ cm}^{-1}$  suggérait la présence de liaisons (C-O) du groupe alcool qui est une caractéristique des polymères glucidiques [1-3].

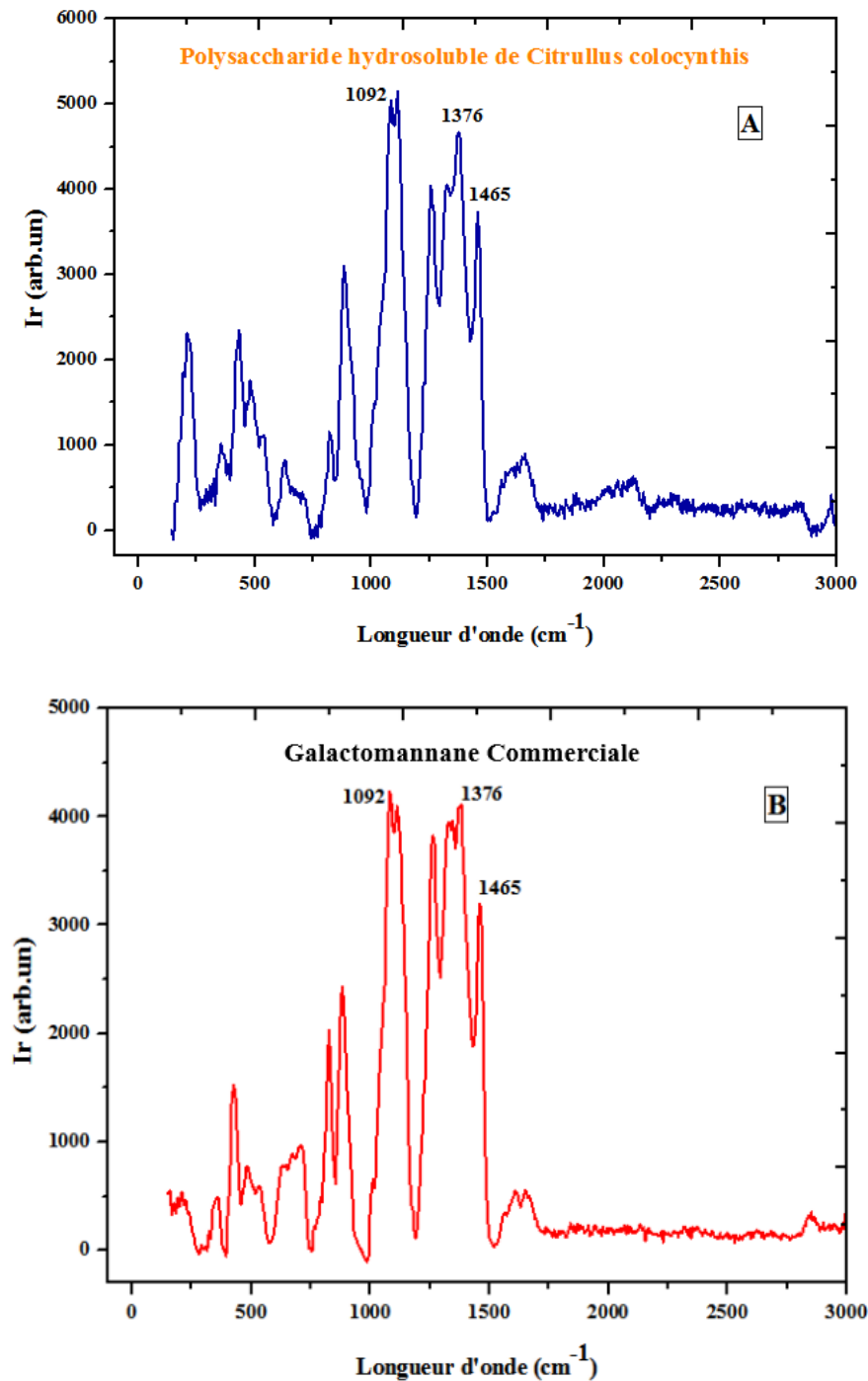
La caractéristique de l'absorption à  $874$  et  $814\text{ cm}^{-1}$ , est attribué aux unités  $\alpha$ -D-galactopyranose et aux unités  $\beta$ -D-mannopyranose, respectivement [1-3].

Enfin, le spectre FTIR-ATR confirme que le matériau extrait de *Citrullus colocynthis* est un galactomannane.

### 3.1.2. Analyse d'IR-Raman

Les spectres IR-Raman des CCPs et du galactomannane commerciale sont représentés sur la *figure V-4* (A et B).

Comme représenté sur la *figure V-4*, les spectres IR-Raman pour les deux échantillons sont similaires. Le signal IR-Raman présent à  $1092\text{ cm}^{-1}$  est attribué à l'étirement (C-H) et ( $\text{CH}_2$ ) et à la vibration asymétrique de la liaison glycosidique (C-O-C) [33, 34]. Le pic à  $1465\text{ cm}^{-1}$  indique une liaison (H-C-H) ; et le pic à  $1376\text{ cm}^{-1}$  représente la liaison (H-O-C) [35, 36].

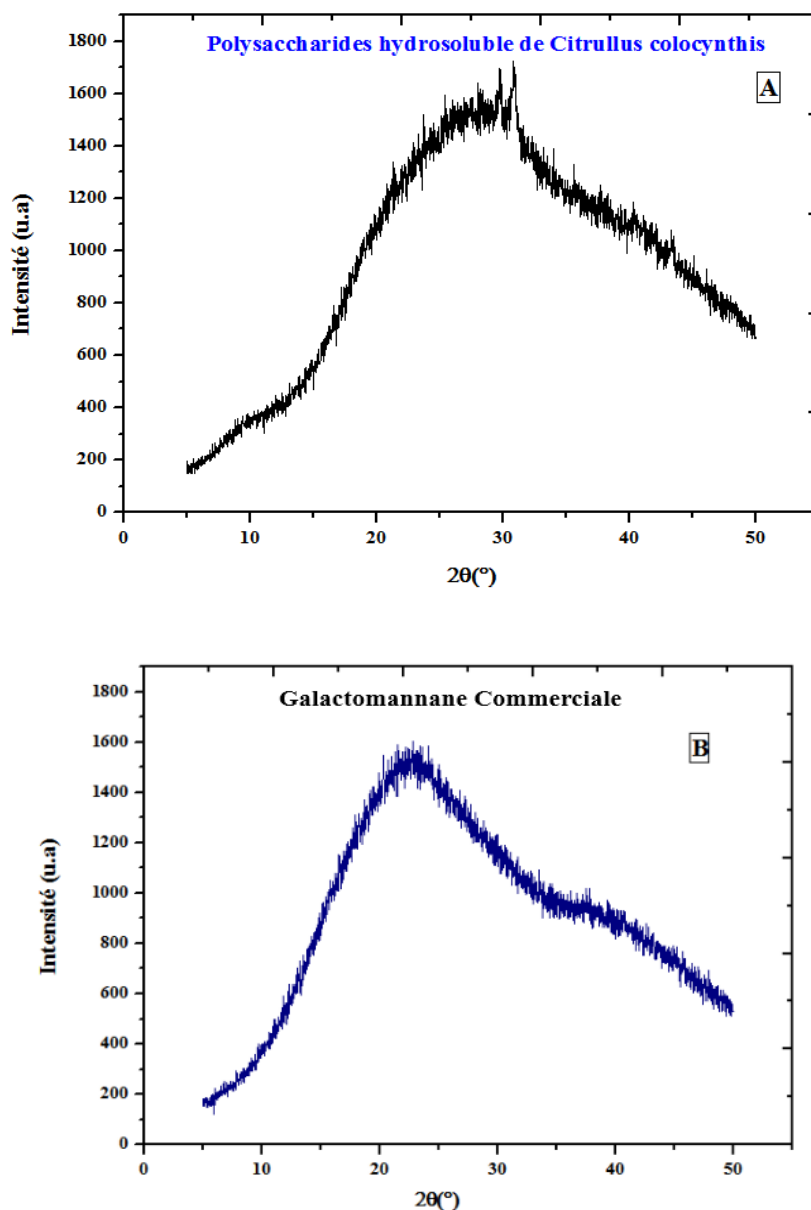


**Figure V-4:** Spectres IR-Raman ; (A) matériau extrait de *Citrullus colocynthis*, (B) galactomannane commerciale.

D'après les résultats d'IR-Raman, il n'y a pas des différences entre les spectres du galactomannane commerciale et l'extrait de *Citrullus colocynthis*. Enfin, le spectre de la matière extraite de Cc est identique au galactomannane commerciale.

### 3.1.3. Analyse DRX

Les diffractogrammes de rayons X du polysaccharide obtenu à partir des graines de *Citrullus colocynthis* et du galactomannane commerciale sont montrés sur la *figure V-5* (A et B).



**Figure V-5:** Diffraction des rayons X du polysaccharide (A) obtenu à partir des graines de *Citrullus colocynthis* et (B) du galactomannane commerciale.

L'analyse DRX du galactomannane commerciale pur n'a pas montré la présence de la région cristalline, comme déjà confirmé dans la littérature par Albuquerque et al [1, 3, 5, 6].

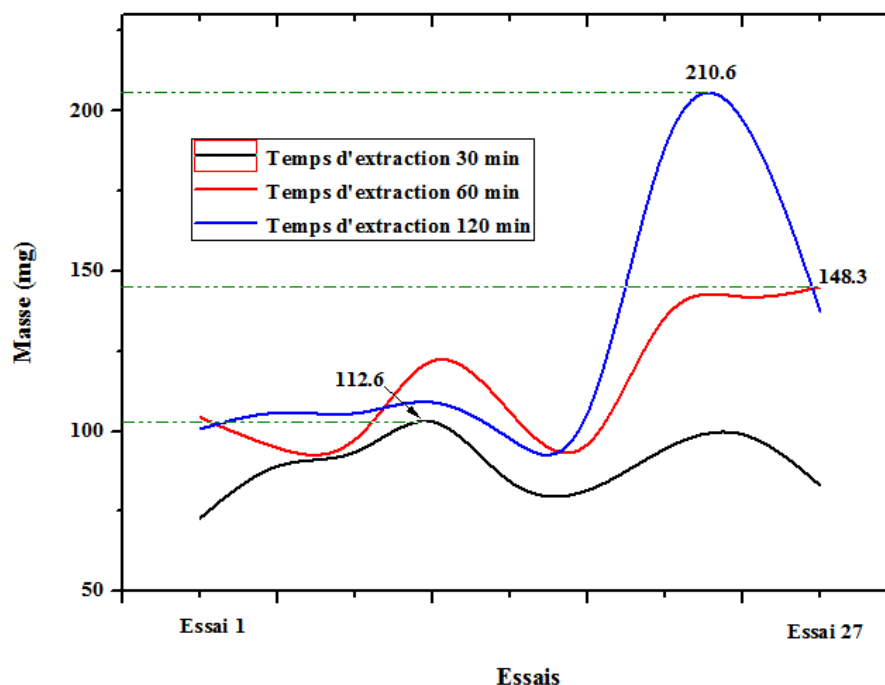
La diffraction des rayons X a confirmé la nature amorphe de l'extrait de *Citrullus colocynthis*, avec la présence des petits pics indiquant la présence d'impuretés dans ce biopolymère. D'après la *figure V-5*, il existe une forte similarité entre le galactomannane commerciale pur et l'extrait final de *Citrullus colocynthis*, ce qui indique que les deux échantillons dans la même phase amorphe. Ces résultats sont en accord avec littérature sur le galactomannane [37-40].

### 3.2. Effet des facteurs sur la masse finale de CCPs

Les procédures générales d'extraction du polysaccharide de *Citrullus colocynthis* ont été décrites ci-dessus. Différents temps d'extraction (30, 60 et 120 min), températures d'extraction (50, 75 et 100 °C), et rapport de l'eau (30, 60 et 100 ml/g) ont été étudiés par expériences à facteur unique pour l'optimisation du taux d'extraction des CCPs.

#### 3.2.1. Effet de différents temps sur la masse finale de CCPs

Le temps d'extraction est l'une des variables importantes qui affectent l'efficacité des polysaccharides [41-43]. Dans ce travail, le temps d'extraction a été fixé à 30, 60 et 120 min pour étudier son influence sur la masse finale des CCPs.



**Figure V-6:** Effets de différents temps sur la masse finale des CCPs.

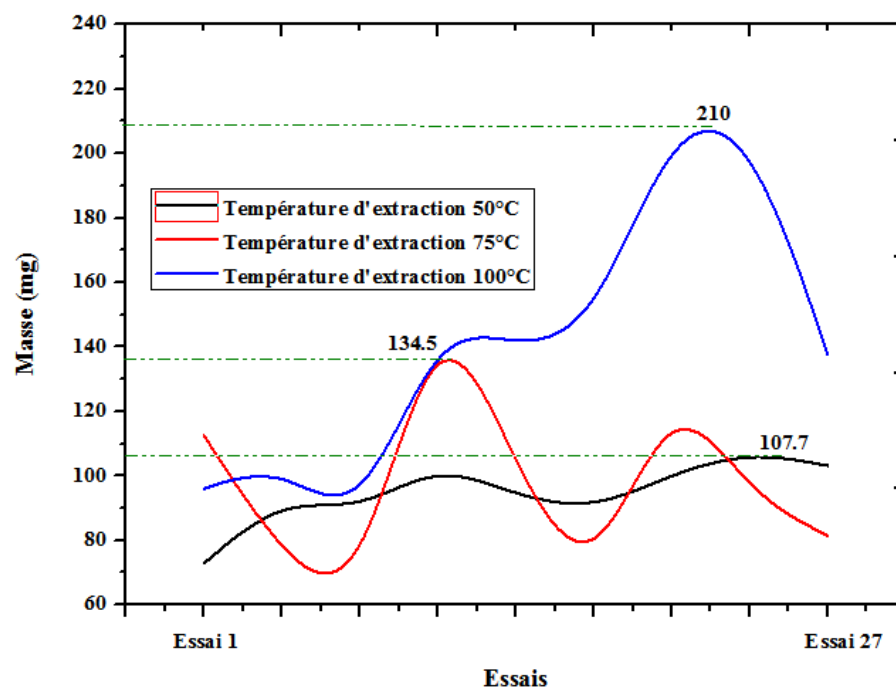


Comme le montre la *figure V-6*, la masse augmente significativement lorsque le temps variait de 30 à 120 min. La masse maximale 210,6 mg a été atteinte au temps de 120min. Quand le temps d'extraction était supérieur à 120 min, la masse diminuait avec l'augmentation du temps.

Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'un temps d'extraction plus élevé peut conduire à la dégradation, l'agrégation et l'hydrolyse des PCC [44-47]. Par conséquent, le temps de 120 min a été sélectionné comme temps d'extraction optimal.

### 3.2.2. Effet de différentes températures sur la masse finale de CCPs

La température est un facteur d'efficacité qui influencerait la masse finale des polysaccharides [15, 48]. L'effet de différentes températures (50, 75 et 100 °C) sur l'efficacité d'extraction des CCP a été étudié, et d'autres variables expérimentales ont été établies comme suit ;



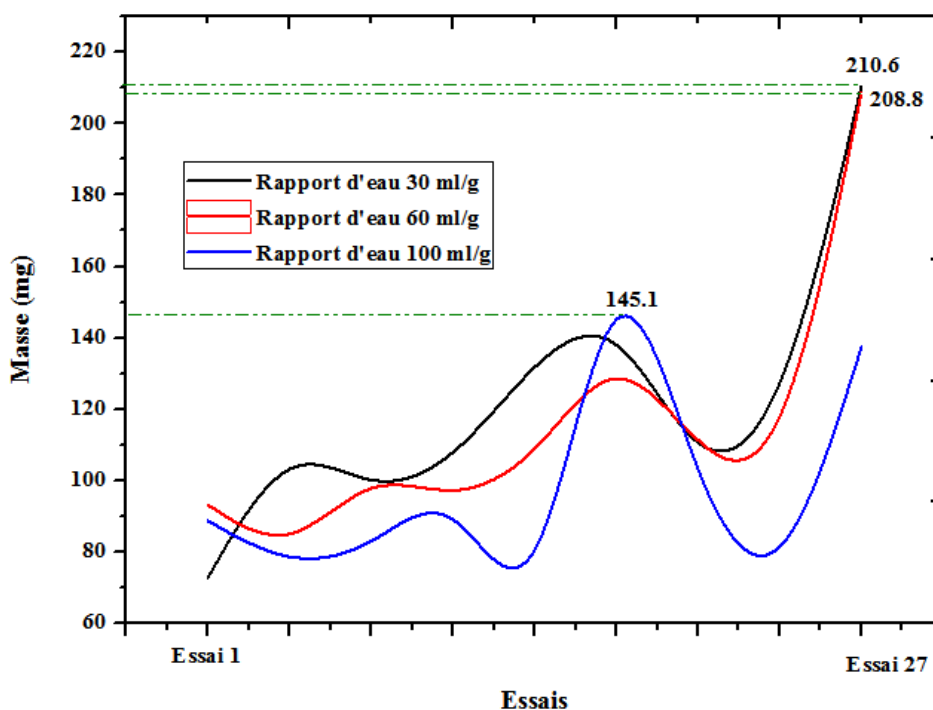
**Figure V-7:** Effets de différentes températures sur la masse finale des CCPs.

Comme le montre la *figure V-7*, la masse augmente significativement avec l'augmentation de la température de 50 à 100°C, puis la masse reste presque inchangée. Le taux d'extraction a augmenté jusqu'à atteindre le niveau maximal de 210 mg à 100°C, puis a diminué avec l'augmentation de la température.

Le bon effet de la température d'extraction pourrait s'expliquer par la solubilité des polysaccharides dans le solvant d'extraction, le coefficient de diffusion des molécules extraites et le transfert de masse amélioré à une température plus élevée. Cette tendance est en accord avec les rapports d'autres auteurs dans l'extraction des polysaccharides [15, 49, 50].

### 3.2.3. Effet de différents rapports d'eau sur la masse finale de CCPs

Le rapport d'eau à la matière première est également l'une des variables importantes qui influencent sur l'extraction du polysaccharide hydrosoluble de *Citrullus colocynthis*. Pour trouver la gamme optimale du rapport de l'eau, le procédé d'extraction a été effectué à différents rapports d'eau de 30, 60 et 100 ml/g. Dans cette étude, l'effet de différents rapports d'eau à la matière première sur la masse finale de polysaccharides solubles dans l'eau de *Citrullus colocynthis*, a été montré dans la *figure V-8*.



**Figure V-8:** Effets de différents rapports d'eau sur la masse finale des CCPs.

La masse de CCPs a été diminuée avec des rapports croissants de 30 à 100 (ml/g). Le polysaccharide hydrosoluble extrait de *Citrullus colocynthis* variait de 210,6 ml/g à 145,1 ml/g, avec une variation du temps d'extraction et de la température d'extraction. Il est indiqué que l'augmentation de l'eau au taux de matière première diminuera la concentration de polysaccharide hydrosoluble de *Citrullus colocynthis* [51, 52], et 30 (ml/g) a été choisi comme le meilleur rapport.



### 3.3. Model fitting et analyse statistique

RSM est plus efficace que l'optimisation traditionnelle à un seul paramètre car elle réduit le nombre d'expériences et fait gagner du temps. Il y a au total 27 essais pour l'optimisation des trois variables individuelles (X1: temps d'extraction, X2: température d'extraction et X3: rapport d'eau) dans Complete Factorial Design (CFD), comme montré dans le *tableau V-2*.

**Tableau V-2:** Données expérimentales des CCPs avec les variables indépendantes.

| Essai | X <sub>1</sub> (min) | X <sub>2</sub> (°C) | X <sub>3</sub> (ml/g) | masse finale (mg) |         |
|-------|----------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|---------|
|       |                      |                     |                       | Expérimentale     | Predite |
| 1     | 30                   | 50                  | 30                    | 72.9              | 87.07   |
| 2     | 30                   | 50                  | 60                    | 93.3              | 80.91   |
| 3     | 30                   | 50                  | 100                   | 88.8              | 86.05   |
| 4     | 30                   | 75                  | 30                    | 112.6             | 104.07  |
| 5     | 30                   | 75                  | 60                    | 78.5              | 90.23   |
| 6     | 30                   | 75                  | 100                   | 78.7              | 77.38   |
| 7     | 30                   | 100                 | 30                    | 96.1              | 95.88   |
| 8     | 30                   | 100                 | 60                    | 103.7             | 94.82   |
| 9     | 30                   | 100                 | 100                   | 83.1              | 91.23   |
| 10    | 60                   | 50                  | 30                    | 104.3             | 98.52   |
| 11    | 60                   | 50                  | 60                    | 93.8              | 95.07   |
| 12    | 60                   | 50                  | 100                   | 89.2              | 95.12   |
| 13    | 60                   | 75                  | 30                    | 134.5             | 124.04  |
| 14    | 60                   | 75                  | 60                    | 105.1             | 108.54  |
| 15    | 60                   | 75                  | 100                   | 80.6              | 84.75   |
| 16    | 60                   | 100                 | 30                    | 148.3             | 156.36  |
| 17    | 60                   | 100                 | 60                    | 139.7             | 149.26  |
| 18    | 60                   | 100                 | 100                   | 145.1             | 128.90  |
| 19    | 120                  | 50                  | 30                    | 100.7             | 99.00   |
| 20    | 120                  | 50                  | 60                    | 107.7             | 107.06  |
| 21    | 120                  | 50                  | 100                   | 103.2             | 105.05  |
| 22    | 120                  | 75                  | 30                    | 113.3             | 118.85  |
| 23    | 120                  | 75                  | 60                    | 97.8              | 106.10  |
| 24    | 120                  | 75                  | 100                   | 81.5              | 68.58   |
| 25    | 120                  | 100                 | 30                    | 210.6             | 209.46  |
| 26    | 120                  | 100                 | 60                    | 208.8             | 196.36  |
| 27    | 120                  | 100                 | 100                   | 137.5             | 150.59  |



L'équation quadratique complète a été utilisée pour corrélérer les paramètres indépendants avec le rendement des CCPs. Le modèle mathématique de la masse (Y) pour prédire les relations entre les variables indépendantes et la variable dépendante peuvent être exprimés par:

$$Y = -142.08 \times 2.16X_1 + 7.73X_2 + 0.83X_3 - 0.074X_1 \times X_2 + 0.019X_1 \times X_3 - 0.06X_2 \times X_3 + 3.13 \times 10^{-3}X_1^2 - 0.062X_2^2 + 0.013X_3^2 - 1.95 \times 10^{-4}X_1 \times X_2 \times X_3 - 1.68 \times 10^{-4}X_1^2 \times X_2 + 3.76 \times 10^{-5}X_1^2 \times X_3 + 8.53 \times 10^{-4}X_1 \times X_2^2 - 1.04 \times 10^{-4}X_1 \times X_3^2 + 5.45 \times 10^{-4}X_2^2 \times X_3 - 1.11 \times 10^{-4}X_2 \times X_3^2$$

L'analyse de la variance pour les résultats expérimentaux de Complete Factorial Design (CFD) est représentée dans le *tableau V-3*.

**Tableau V-3:** Résultats d'ANOVA pour les données expérimentales.

| Source  | Sum of Squares | df | Mean Square | F Value | p-Value |                   |
|---|----------------|----|-------------|---------|---------|-------------------|
| <b>Model</b>                                    | 30580,5        | 16 | 1911,28     | 9,82    | 0,0004  | <b>Signifiant</b> |
| X <sub>1</sub>                                  | 186,73         | 1  | 186,73      | 0,96    | 0,3505  |                   |
| X <sub>2</sub>                                  | 3198,86        | 1  | 3198,86     | 16,43   | 0,0023  |                   |
| X <sub>3</sub>                                  | 1440,24        | 1  | 1440,24     | 7,4     | 0,0216  |                   |
| X <sub>2</sub> *X <sub>1</sub>                  | 3769,31        | 1  | 3769,31     | 19,36   | 0,0013  |                   |
| X <sub>1</sub> * X <sub>3</sub>                 | 416,88         | 1  | 416,88      | 2,14    | 0,1741  |                   |
| X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub>                 | 865,5          | 1  | 865,5       | 4,44    | 0,0612  |                   |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup>                     | 926,52         | 1  | 926,52      | 4,76    | 0,0541  |                   |
| X <sub>2</sub> <sup>2</sup>                     | 3195,67        | 1  | 3195,67     | 16,41   | 0,0023  |                   |
| X <sub>3</sub> <sup>2</sup>                     | 60,01          | 1  | 60,01       | 0,31    | 0,591   |                   |
| X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub> | 489,92         | 1  | 489,92      | 2,52    | 0,1438  |                   |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup> *X <sub>2</sub>     | 221,16         | 1  | 221,16      | 1,14    | 0,3116  |                   |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup> *X <sub>3</sub>     | 21,83          | 1  | 21,83       | 0,11    | 0,7446  |                   |
| X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub> <sup>2</sup>     | 2386,85        | 1  | 2386,85     | 12,26   | 0,0057  |                   |
| X <sub>2</sub> * X <sub>3</sub> <sup>2</sup>    | 129,11         | 1  | 129,11      | 0,66    | 0,4344  |                   |
| X <sub>2</sub> <sup>2</sup> * X <sub>3</sub>    | 572,94         | 1  | 572,94      | 2,94    | 0,117   |                   |
| X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub> <sup>2</sup>     | 44,08          | 1  | 44,08       | 0,23    | 0,6444  |                   |
| <b>Résiduel</b>                                 | 1947,18        | 10 | 194,72      |         |         |                   |
| <b>Cor Total</b>                                | 32527,69       | 26 |             |         |         |                   |

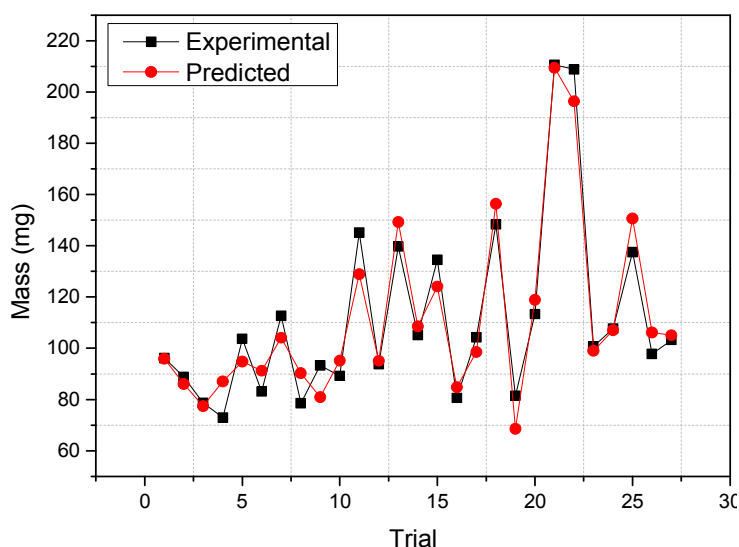
**R<sup>2</sup>= 94.01%**      **Adj-R<sup>2</sup>= 84.44%**

Les données ont révélé que le modèle proposé pour la masse de polysaccharide était adéquat avec une valeur R<sup>2</sup> satisfaisante. Les valeurs de R<sup>2</sup> et adj-R<sup>2</sup> étaient de 0,9401 et

0,8444 respectivement, ce qui a confirmé une meilleure corrélation entre les valeurs expérimentales et théoriques prédites par le modèle polynomial [16, 53, 54].

Le coefficient du terme quadratique ( $X_2^2$ ), les coefficients linéaires ( $X_2$ ,  $X_3$ ) et les termes d'interaction ( $X_2 \times X_1$ ) et ( $X_1 \times X_2^2$ ) étaient significatifs ( $p < 0,05$ ) pour le rendement des CCPs. Par conséquent, la valeur F-value du modèle de 9,82 impliquait que le modèle était significatif [16, 54].

La *figure V-9* montre les résultats expérimentaux et prédits de la masse finale des polysaccharides de *Citrullus colocynthis*. L'écart entre les prévisions et les données expérimentales ne dépassent pas 6%.

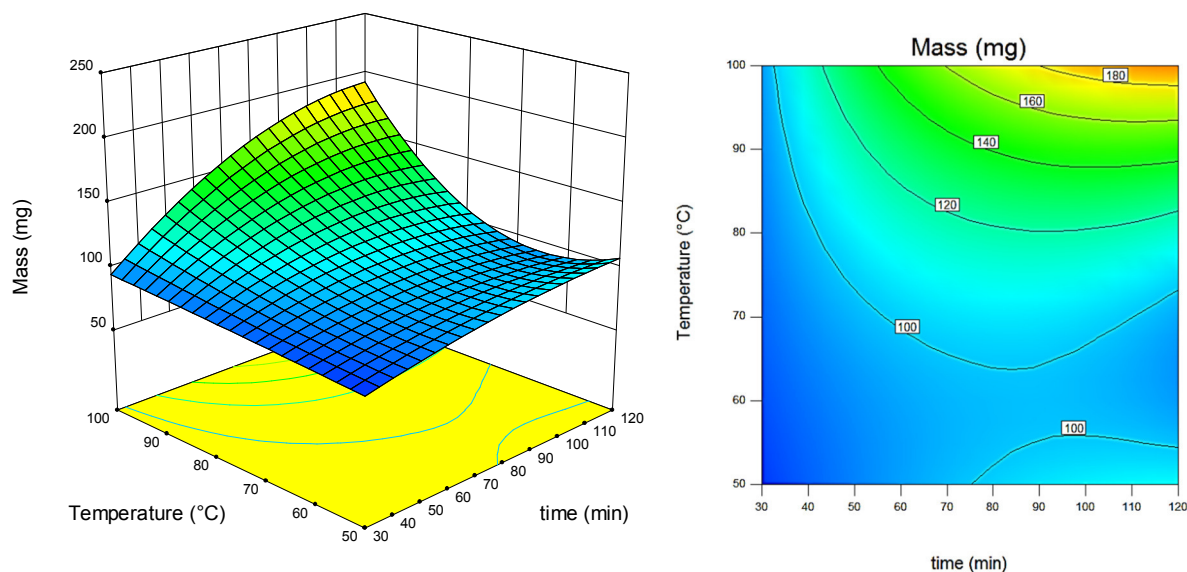


**Figure V-9:** Comparaison des résultats prédits et expérimentaux de la masse finale de polysaccharides hydrosolubles de *Citrullus colocynthis*.

### 3.4. Effet des paramètres d'extraction sur les facteurs de réponse de surface

Les surfaces de réponse ont été obtenues en utilisant le logiciel Design-Expert qui évalue les effets des variables et de leurs interactions sur la masse de polysaccharide *Citrullus colocynthis*.

La courbe de surface de réponse 3D et la courbe de contour 2D, comme le montre la *figure V-10*, étaient très utiles pour estimer les effets d'interaction des paramètres sur la réponse. Ces graphiques représentent les effets de trois variables sur la réponse à la fois.



**Figure V-10:** Les courbes de la surface de réponse (3D) et (2D) montrant les effets du temps d'extraction et de la température d'extraction sur la masse finale des CCPs.

Les graphiques de la *figure V-10* montrent que la masse d'extraction des CCPs a augmenté conformément avec augmentation de la température d'extraction, temps d'extraction et rapport d'eau de 50 à 100 °C, 30 à 120 min et de 30 à 100 ml/g, respectivement.

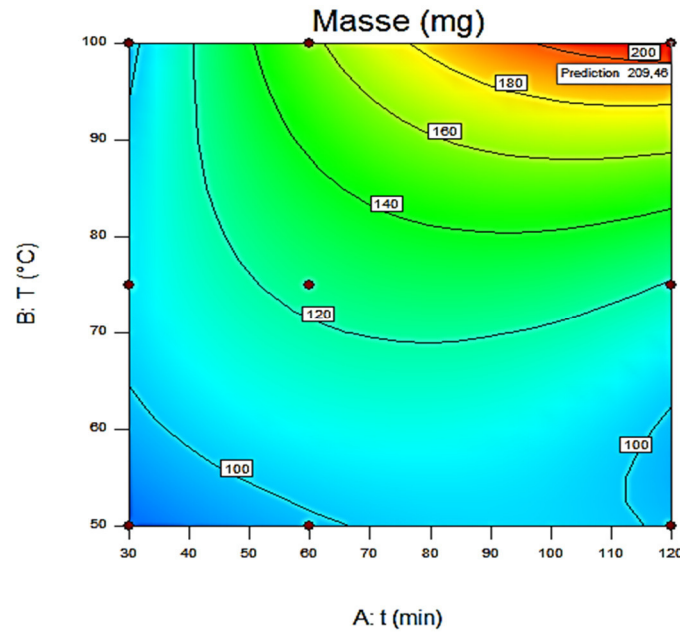
Afin d'étudier les influences des paramètres d'extraction sur les CCP, la surface de réponse est dessinée sur la figure IV-10 qui représente l'influence de la température et du temps sur le polysaccharide de *Citrullus colocynthis* (CCPs).

La meilleure masse d'extraction de CCP est obtenue avec la combinaison du temps d'extraction le plus élevé et de la température d'extraction la plus élevée, comme rapporté par les chercheurs précédents [14-16].

### 3.5. Optimisation d'extraction de CCPs

Le modèle prédit une réponse maximale de 209,4 mg avec une valeur de désirabilité de 0,992, ce qui indique que le modèle de régression était adéquat et précis pour l'extraction des polysaccharides de *Citrullus colocynthis*, voir la *figure V-11*.

Il a été conclu que la condition d'extraction optimale de polysaccharide de *Citrullus colocynthis* était une température d'extraction de 100°C, un temps d'extraction de 120 min et un rapport d'eau de 30 ml/g.



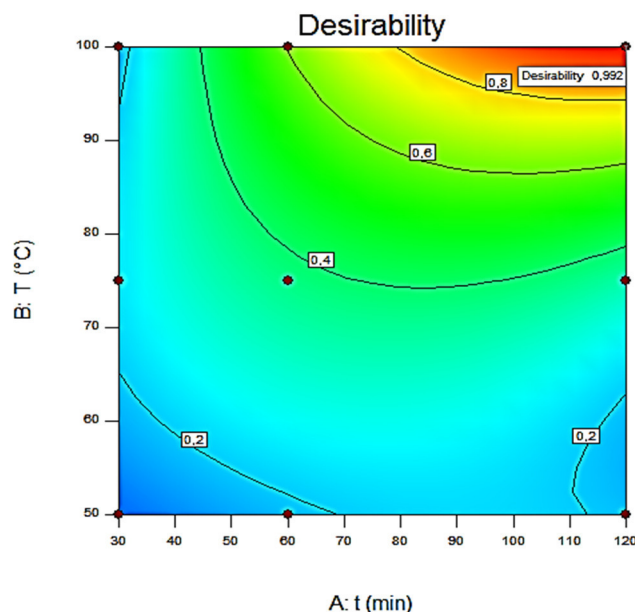
**Figure V-11:** Courbe de contour de la condition optimale d'extraction pour les CCPs.

Le *tableau V-4* montre les résultats d'optimisation de RSM des polysaccharides des graines de *Citrullus Colocynthis* (CCPs) afin de diminuer le niveau de désirabilité.

**Tableau V-4:** Optimisation de la réponse pour les paramètres CCPs.

| Conditions Optimales |                  |                      | Masse finale (mg) |              |
|----------------------|------------------|----------------------|-------------------|--------------|
| Temps (min)          | Temperature (°C) | Rapport d'eau (ml/g) | Prédite           | Désirabilité |
| <u>120</u>           | <u>100</u>       | <u>30</u>            | <u>209,460</u>    | <u>0,992</u> |
| 119,591              | 100              | 30,001               | 209,405           | 0,991        |
| 119,294              | 100              | 30,096               | 209,349           | 0,991        |
| 120                  | 100              | 30,855               | 209,339           | 0,991        |
| 118,931              | 100              | 30                   | 209,306           | 0,991        |
| 120                  | 100              | 31,249               | 209,278           | 0,99         |
| 120                  | 100              | 31,541               | 209,231           | 0,99         |
| 118,991              | 100              | 30,947               | 209,178           | 0,99         |
| 120                  | 100              | 32,068               | 209,141           | 0,989        |
| 120                  | 100              | 32,337               | 209,094           | 0,989        |

La courbe de contour de la désirabilité de la *figure V-12* a été tracée entre deux paramètres ; temps et température.



**Figure V-12:** Courbe de contour de la désirabilité pour les CCPs.

La caractéristique de réponse multiple maximale est trouvée où la température varie de 95 à 100°C avec temps de 110 à 120 min. Ces régions fermées indiquent la zone optimale de réponse où les CCPs seront maximisées.

#### 4. CONCLUSION

Dans le présent chapitre, l'extrait final de *Citrullus colocynthis* a une forte similitude avec le galactomannane pur commerciale avec une nature également amorphe. Le RSM a été utilisé pour déterminer les paramètres d'extraction optimaux qui ont donné une masse d'extraction élevée.

Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) pour l'équation du modèle était de 0,9401 et la valeur de probabilité (p-value) de 0,0004, qui ont démontré une très grande signification pour le modèle de régression.

La masse maximale de 209,46 mg a été obtenue dans les conditions suivantes : température d'extraction de 100°C, temps d'extraction de 120 min et rapport eau 30 ml/g. Dans ces conditions, la masse d'extraction expérimentale de 210,6 mg correspond bien à la valeur prédite.



---

## Les références du chapitre V

---

- [1]: Albuquerque, P.B., Barros, W., Santos, G.R., Correia, M.T., Mourão, P.A., Teixeira, J.A., Carneiro-da-Cunha, M.G. (2014). Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. *Carbohydrate Polymers* 104: 127-134.
- [2]: Busch, V.M., Kolender, A.A., Santagapita, P.R., Buera, M.P. (2015). Vinal gum, a galactomannan from *Prosopis ruscifolia* seeds: Physicochemical characterization. *Food Hydrocolloid*. 51: 495-502.
- [3]: Chaubey, M., Kapoor, V.P. (2001). Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. *Carbohydrate Research* 332: 439-444.
- [4]: Lee, Y., Chang, Y.H. (2015). Effects of galactomannan addition on rheological, pasting and physical properties of water chestnut starch. *J. Text. Stud.* 46: 58-66.
- [5]: Pawar, H.A., Lalitha, K.G. (2014). Isolation, purification and characterization of galactomannans as an excipient from *Sennatoria* seeds. *International Journal of Biological Macromolecule* 65: 167-175.
- [6]: Albuquerque, P. B., Soares, P. A., Aragão-Neto, A. C., Albuquerque, G. S., Silva, L. C., Lima-Ribeiro, M. H., Neto, J.C.S., Coelho, L.C.B.B., Correie, M.T.S., Teixeira, J.A.C., Carneiro-da-Cunha, M. G. (2017). Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *International Journal of Biological Macromolecule*. 102: 749-757.
- [7]: Cunha, P.L., Vieira, Í.G., Arriaga, Â.M., De Paula, R.C.M., Feitosa, J.P. (2009). Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana*Tul. seeds as a potential guar gum substitute. *Food Hydrocolloid*. 23: 880-885.
- [8]: Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2011). Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Food Science Technology* 22: 662-671.
- [9]: Cui, W., Mazza, G., Oomah, B.D., Biliaderis, C.G. (1994). Optimization of an aqueous extraction process for flaxseed gum by response surface methodology. *Food Science Technology* 27: 363-369.



- [10]: **Cacace, J.E., Mazza, G. (2003).** Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science* 68: 240-248.
- [11]: **Wu, Y., Cui, S.W., Tang, J., Gu, X. (2007a).** Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. *Food Chemistry* 105: 1599-1605.
- [12]: **Miao, Y.Z., Lin, Q., Cao, Y., He, G.H., Qiao, D.R., Cao, Y. (2011).** Extraction of water-soluble polysaccharides (WSPS) from Chinese truffle and its application in frozen yogurt. *Carbohydrate Polymers* 86: 566-573.
- [13]: **Karazhiyan, H., Razavi, S.M., Phillips, G.O. (2011).** Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. *Food Hydrocolloid*. 25: 915-920.
- [14]: **Yolmeh, M., Jafari, S.M. (2017).** Applications of response surface methodology in the food industry processes. *Food Bioproduct Technology* 10: 413-433
- [15]: **Ye, C.L., Jiang, C.J. (2011).** Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 84: 495-502.
- [16]: **Sin, H.N., Yusof, S., Hamid, N.S.A., Rahman, R.A. (2006).** Optimization of hot water extraction for sapodilla juice using response surface methodology. *Journal of Food Eng.* 74: 352-358.
- [17]: **Rashid, F., Hussain, S., Ahmed, Z. (2018).** Extraction purification and characterization of galactomannan from fenugreek for industrial utilization. *Carbohydrate Polymers* 180: 88-95.
- [18]: **Qiao, D., Hu, B., Gan, D., Sun, Y., Ye, H., Zeng, X. (2009).** Extraction optimized by using response surface methodology, purification and preliminary characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydrate Polymers* 76 : 422-429
- [19]: **Xu, R., Ye, H., Sun, Y., Tu, Y., Zeng, X. (2012).** Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry Toxicology* 50: 2473-2480.



- [20]: Fan, L., Cao, M., Gao, S., Wang, W., Peng, K., Tan, C., Wen, F., Tao, S., Xie, W. (2012). Preparation and characterization of a quaternary ammonium derivative of pectin. *Carbohydrate Polymers* 88: 707-712.
- [21]: Gopi, D., Kanimozhi, K., Bhuvaneshwari, N., Indira, J., Kavitha, L. (2014). Novel banana peel pectin mediated green route for the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles and their spectral characterization. *Spectrochemistry Acta, Part A*. 118: 589-597.
- [22]: Qiao, D., Liu, J., Ke, C., Sun, Y., Ye, H., Zeng, X. (2010). Structural characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydrate Polymers* 82 : 1184-1190.
- [23]: Li, N., Yan, C., Hua, D., Zhang, D. (2013). Isolation, purification, and structural characterization of a novel polysaccharide from *Ganoderma capense*. *International Journal of Biological Macromolecules* 57: 285-290.
- [24]: Gnanasambandam, R., Proctor, A. (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 68: 327-332.
- [25]: Wahab, M.A., Jellali, S., Jedidi, N. (2010). Ammonium biosorption onto sawdust: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling. *Bioresources Technology* 101: 5070-5075.
- [26]: Fadavi, G., Mohammadifar, M.A., Zargarran, A., Mortazavian, A.M., Komeili, R. (2014). Composition and physicochemical properties of Zedo gum exudates from *Amygdalusscoparia*. *Carbohydrate Polymers* 101: 1074-1080.
- [27]: Fathi, M., Mohebbi, M., Koocheki, A. (2016). Some physico-chemical properties of *Prunus armeniaca* L. gum exudates. *International Journal of Biological Macromolecules* 82: 744-750.
- [28]: Popescu, C.M., Larsson, P.T., Olaru, N., Vasile, C. (2012). Spectroscopic study of acetylated kraft pulp fibers. *Carbohydrate Polymers* 88: 530-536.
- [29]: Popescu, M.C. (2017). Structure and sorption properties of CNC reinforced PVA films. *International Journal of Biological Macromolecules* 101: 783-790.
- [30]: Peredo, K., Escobar, D., Vega-Lara, J., Berg, A., Pereira, M. (2016). Thermochemical properties of cellulose acetate blends with acetosolv and sawdust lignin: A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules* 83: 403-409.

- [31]: Yang, X., Wang, R., Zhang, S., Zhu, W., Tang, J., Liu, J., Chen, P., Zhang, D., Ye, W., Zheng, Y. (2014). Polysaccharides from *Panaxjaponicus* CA Meyer and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers* 101: 386-391.
- [32]: Zhang, G., Yin, Q., Han, T., Zhao, Y., Su, J., Li, M., Ling, J. (2015). Purification and antioxidant effect of novel fungal polysaccharides from the stroma of *Cordyceps kyushuensis*. *Industrial Crops and Products* 69: 485-491.
- [33]: Alves, A.P.P., de Oliveira, L.P., Castro, A.A., Neumann, R., de Oliveira, L.F., Edwards, H.G., Sant'Ana, A.C. (2016). The structure of different cellulosic fibres characterized by Raman spectroscopy. *Vib. Spectroscopy* 86: 324-330.
- [34]: Gierlinger, N. (2017). New insights into plant cell walls by vibrational microspectroscopy. *Applied Spectroscopy*: 1-35.
- [35]: Agarwal, U.P., Ralph, S.A., Reiner, R.S., Baez, C. (2016). Probing crystallinity of never-dried wood cellulose with Raman spectroscopy. *Cellulose* 23: 125-144.
- [36]: Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I.U. (2007). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy* 42: 493-541.
- [37]: Kadokawa, J.I., Kato, T., Setoyama, M., Yamamoto, K. (2013). Preparation of galactomannan-based materials compatibilized with ionic liquids. *Journal of Polymers Environments*. 21: 512-519.
- [38]: Jiang, J.X., Jian, H.L., Cristhian, C., Zhang, W.M., Sun, R.C. (2011). Structural and thermal characterization of galactomannans from genus *Gleditsia* seeds as potential food gum substitutes. *Journal of Science Food Agricultural* 91: 732-737
- [39]: Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B.S. (2012). X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum. *International Journal of Biological Macromolecules* 50: 1035-1039.
- [40]: Singh, V., Tiwari, A., Shukla, P., Singh, S.P., Sanghi, R. (2006). Grafting of methylmethacrylate on to the plant seed galactomannans using potassium persulphate/ascorbic acid redox pair. *Reactive and functional polymers* 66: 1306-1318.
- [41]: Yin, X., You, Q., Jiang, Z. (2011). Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholomamatsutake* by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 86: 1358-1364.



- [42]: Fan, T., Hu, J., Fu, L., Zhang, L. (2015). Optimization of enzymolysis ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Momordica charabtia* L. by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 115: 701-706.
- [43]: Liu, J.L., Zheng, S.L., Fan, Q.J., Yuan, J.C., Yang, S.M., Kong, F.L. (2015). Optimisation of high-pressure ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacity of polysaccharides from the rhizome of *Ligusticum chuanxiong*. *International Journal of Biological Macromolecule* 76: 80-85.
- [44]: Sun, Y.X., Liu, J.C., Kennedy, J.F. (2010). Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from the fruiting bodies of *Chroogomphisrutilus* (Schaeff.: Fr.) OK Miller by Box-Behnken statistical design. *Carbohydrate Polymers* 82: 209-214.
- [45]: Sheng, Z.L., Wan, P.F., Dong, C.L., Li, Y.H. (2013). Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos Populi* using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 43: 778-786.
- [46]: Kaiser, S., Verza, S.G., Moraes, R.C., Pittol, V., Peñaloza, E.M.C., Pavei, C., Ortega, G. G. (2013). Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat's claw bark by Box–Behnken design. *Industrial Crops and Products* 48: 153-161.
- [47]: Wu, C., Wang, X., Wang, H., Shen, B., He, X., Gu, W., Wu, Q. (2014). Extraction optimization, isolation, preliminary structural characterization and antioxidant activities of the cell wall polysaccharides in the petioles and pedicels of Chinese herbal medicine *Qian* (*Euryale ferox* Salisb.). *International Journal of Biological Macromolecules* 64: 458-467
- [48]: Samavati, V. (2013). Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 95: 588-597.
- [49]: Vinogradov, E.V., Brade, L., Brade, H., Holst, O. (2003). Structural and serological characterisation of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Acinetobacterbaumannii* strain 24. *Carbohydrate Research* 338: 2751-2756.
- [50]: Xu Jie, H., Wei, C. (2008). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible *BaChu* mushroom by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 72: 67-74.



- [51]: Tahmouzi, S., Ghodsi, M. (2014). Optimum extraction of polysaccharides from motherwort leaf and its antioxidant and antimicrobial activities. *Carbohydrate Polymers* 112: 396-403.
- [52]: Zeng, H., Zhang, Y., Lin, S., Jian, Y., Miao, S., Zheng, B. (2015). Ultrasonic–microwave synergistic extraction (UMSE) and molecular weight distribution of polysaccharides from *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle. *Separation and Purification Technology* 144: 97-106.
- [53]: Fan, G., Han, Y., Gu, Z., Chen, D. (2008). Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *Food Science Technology* 41: 155-160.
- [54]: Feng, C.H., Sun, D.W. (2014). Optimisation of immersion vacuum cooling operation and quality of Irish cooked sausages by using response surface methodology. *International Journal of Food Science Technology* 49: 1850-1858.



---

## Conclusion générale et perspectives

---

### Conclusion générale et perspectives

Avec le développement et l'intérêt croissant des matériaux et molécules biosourcés, de nombreuses recherches sont menées sur l'identification de nouvelles sources de molécules végétales, en particulier à partir de plantes à propriétés médicinales. C'est dans ce contexte que nous sommes intéressés à trouver ou bien valoriser une nouvelle source végétale pour l'extraction des biomatériaux ; en particulièrement dans la plante « *Citrullus colocynthis* » (la coloquinte) de la famille de "Cucurbitacée".

Les travaux décrits dans ce manuscrit se sont orientés sur deux problématiques.

- Dans un premier temps, nous avons décrit deux méthodes pour l'extraction de polysaccharides insolubles dans l'eau à partir de graines Cc.

Le premier concerne la déprotéinisation des graines broyées dans une solution aqueuse de NaOH 1M (1 :30) à 70°C pendant 24h, suivi par l'extraction des lipides dans le solvant chloroforme/méthanol (2 :1) à température ambiante pendant 4h, suivi aussi par un traitement de blanchiment.

Le deuxième procédé consiste à extraire le matériau lipidique avant l'étape de déprotéinisation suivi par une méthode du blanchiment.

Avant le traitement du blanchiment, les méthodes de caractérisation montrent que l'extrait est un mélange de plusieurs polysaccharides comme la cellulose, la lignine et l'hémicellulose. Nous avons effectué un traitement de blanchiment dans le but de purifier la cellulose et d'éliminer la lignine et l'hémicellulose.

Après ce traitement du blanchiment, nous avons observé un changement de couleur pour les extraits insolubles du marron clair au blanche. Aussi les rendements massiques pour les extraits finaux de Cc après le traitement du blanchiment pour les deux méthodes A et B sont changés à cause d'élimination de la lignine et de l'hémicellulose.

Le pourcentage de protéines et de lipides trouvés selon la méthode A est de 45% et le pourcentage d'extrait insoluble et de la lignine est respectivement de 42% et 13% respectivement. Par contre, le pourcentage des lipides et des protéines selon la deuxième méthode B est 23% et 23%, respectivement, et le pourcentage du matériau insoluble et de la lignine est 40% et 13% respectivement.





La dispersion de la lignine indique une plus grande efficacité des procédés de blanchiment. L'enlèvement de la lignine est confirmé par l'absence à 1507 et 1595  $\text{cm}^{-1}$  dans le spectre ATR-FTIR, et 1600  $\text{cm}^{-1}$  dans la spectroscopie IR-Raman. L'indice de cristallinité déterminé pour la cellulose obtenue à partir de Cc est de 56%.

On trouve aussi que la cellulose isolée des graines Cc avait une analogie structurale forte comparable à la cellulose commerciale microcristalline car aucune différence significative n'a été observée dans la morphologie de la cellulose microcristalline commerciale avec la cellulose obtenue après traitement de blanchiment selon l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  de solide et l'ATG.

D'après les résultats de la microscopie électronique à transmission MET, on a pu confirmer la possibilité d'obtenir des nanofibrilles de cellulose à partir de fibres de *Citrullus colocynthis* par hydrolyse acide.

- Dans une seconde partie, nous avons décrit la méthode d'extraction de polysaccharide soluble dans l'eau ; en particulier le Galactomannane tel que, il a été extrait en utilisant l'eau bouillante à différents temps d'extraction ( $X_1$  : 30, 60 et 120 min), des températures d'extraction ( $X_2$  : 50, 75 et 100 °C) et un rapport de matière ( $X_3$  : 30, 60 et 100 ml/g), pour le but d'optimiser le procédé d'extraction et d'améliorer le rendement massique final.

Le système ANOVA a été utilisé pour étudier l'optimisation des procédés d'extraction de ce polysaccharide hydrosoluble. Les conditions optimales d'extraction sont les suivantes: 100°C, 120min et rapport eau 30 ml/g. Dans ces conditions, la masse finale expérimentale est de 210,6 mg.

La courbe de surface de réponse 3D et la courbe de contour dérivée 2D des modèles mathématiques montrent que la masse d'extraction des CCPs augmente en fonction de la température d'extraction, temps d'extraction et rapport d'eau, respectivement et la meilleure masse d'extraction de CCPs est obtenue avec la combinaison du temps d'extraction le plus élevé et de la température d'extraction la plus élevée.

Les méthodes de caractérisation et l'identification de ce polysaccharide comme l'FT-IR IR-Raman et la DRX confirment que l'extrait final brut a une forte analogie structurale avec le Galactomannane.



### Perspectives

Les perspectives de ce travail sont multiples :

- Concernant le polysaccharide soluble le Galactomannane une étude supplémentaire est envisageable pour déterminer et évaluer le ratio ou bien le rapport entre galactose et mannose par la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et également par d'autres méthodes d'analyses.

- ✚ Extraction d'autres polysaccharides solubles qui sont trouvés dans la plante de la coloquinte Cc avec l'optimisation des procédés d'extraction.

- Concernant le deuxième type de polysaccharide insoluble de la coloquinte Cc la cellulose, on va essayer d'améliorer le rendement massique d'extraction par l'optimisation.

- ✚ Extraction et caractérisation d'autres biopolymères comme l'amidon, la pectine, etc.

- ✚ Etude des effets et des propriétés thermique, physique et mécanique de ce matériau biodégradable.

- ✚ Préparation des copolymères avec d'autres biopolymères pour construire un nouveau matériau à partir de la plante de la coloquinte.

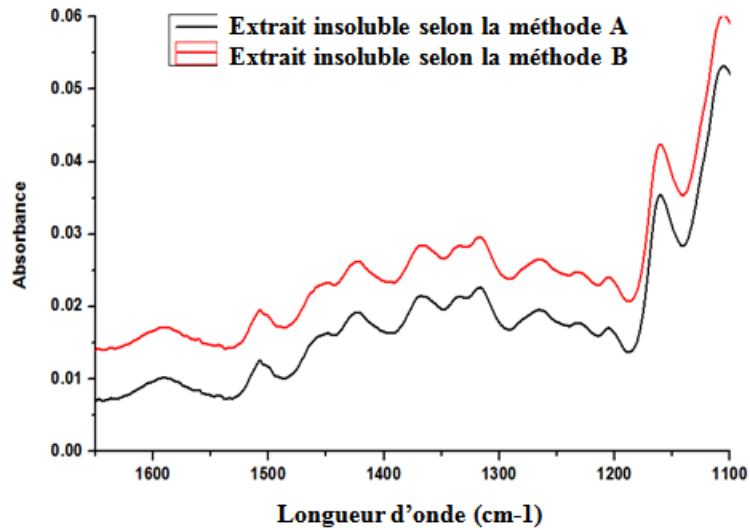
- ✚ En finale, l'application dans des différents domaines industriels.



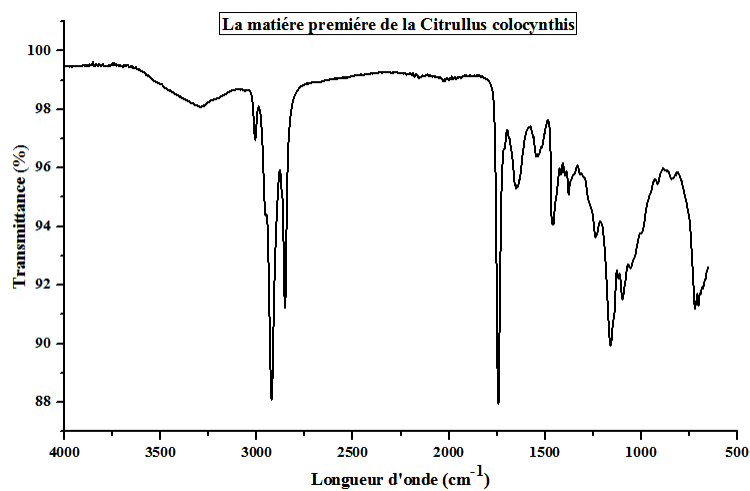
---

# Annexes

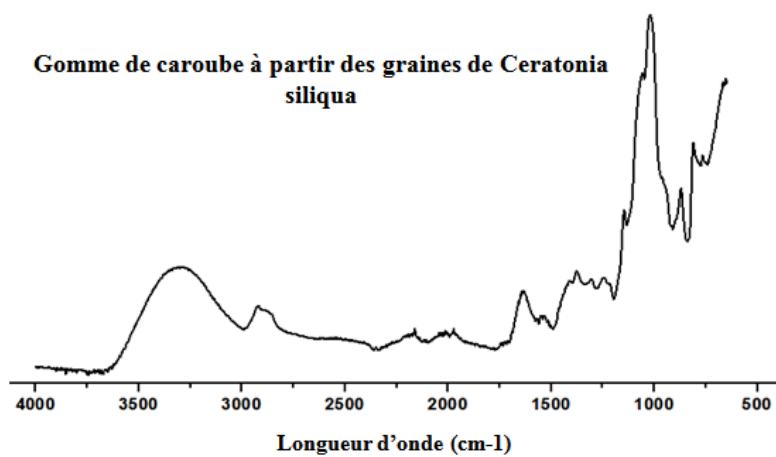
---



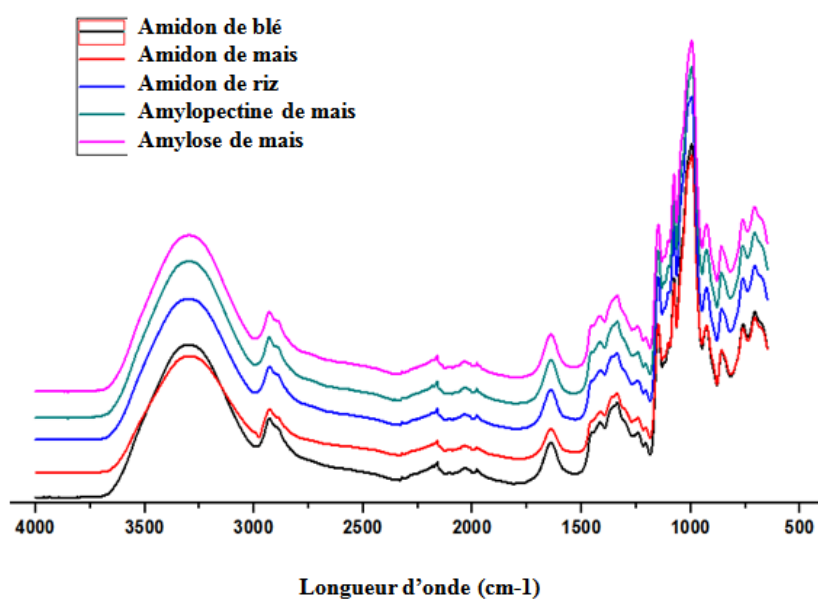
**Figure S1:** ATR-FTIR des extraits insolubles de *Cc* selon les méthodes d'extraction A et B (1550-1100 cm<sup>-1</sup>).



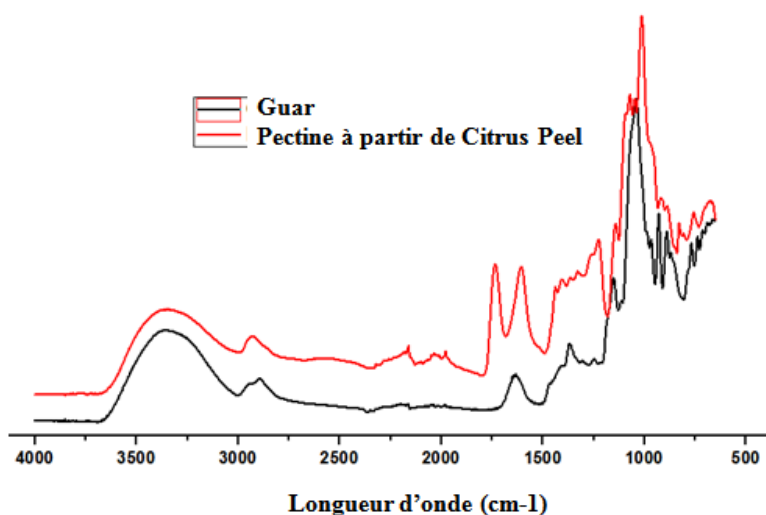
**Figure S2:** la matière première de *Cc* sans traitement.



**Figure S3:** ATR-FTIR de Gomme de caroube.



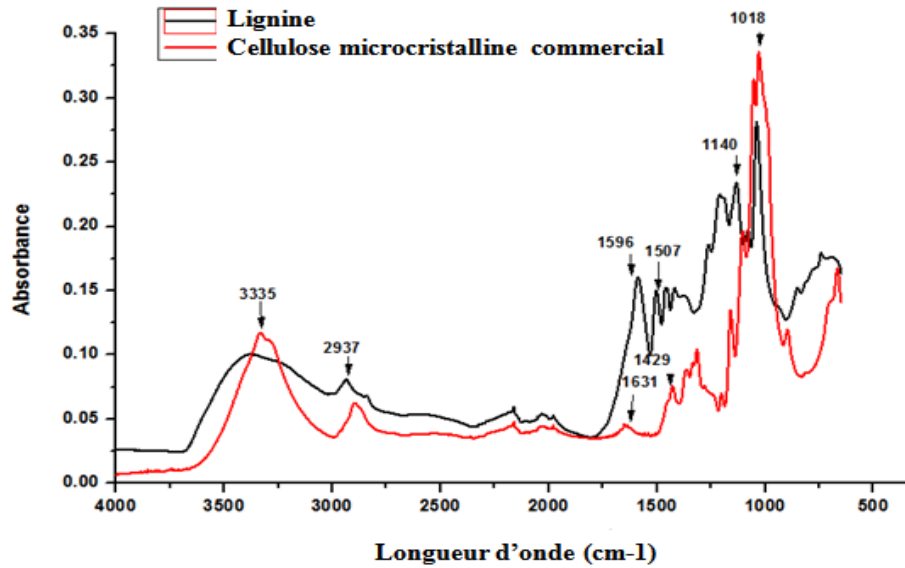
**Figure S4:** ATR-FTIR des polysaccharides commerciaux.



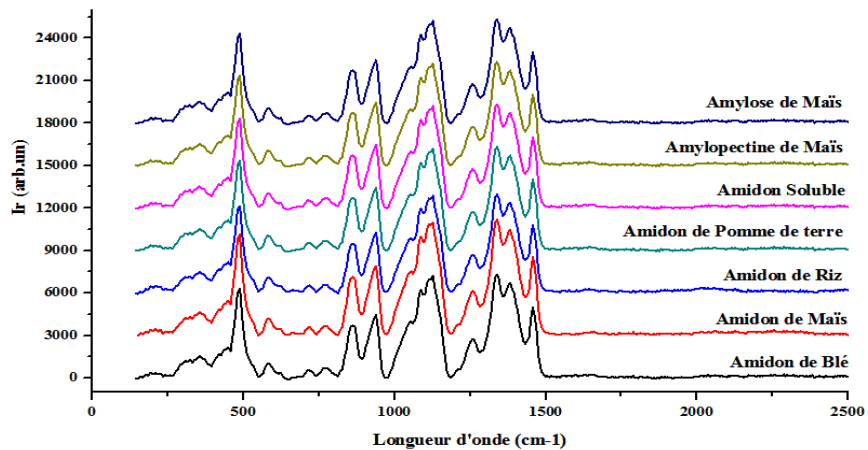
**Figure S5:** ATR-FTIR des Guar et Pectine.

**Tableau S1:** les bandes caractéristiques pour ATR-FTIR.

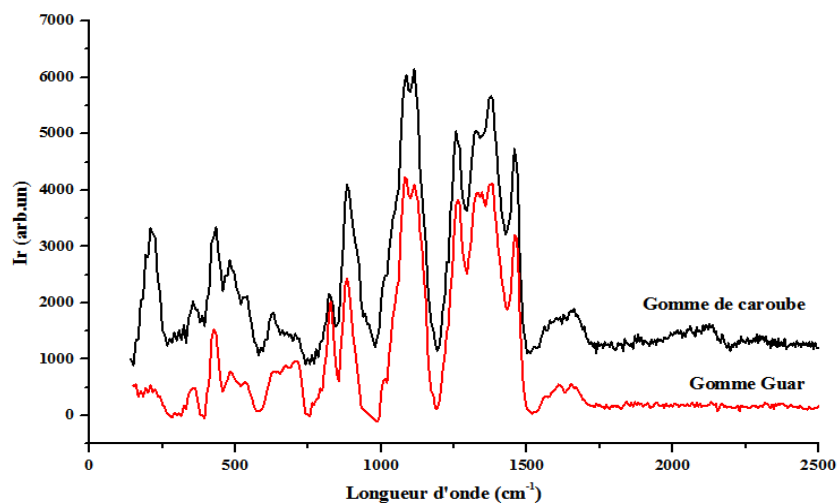
| Frequency (cm <sup>-1</sup> ) | Component  |
|-------------------------------|--|
| 3335                          | O-H stretching vibrations of the hydrogen bonded hydroxyl groups   |
| 2937                          | C-H stretching vibration   |
| 1631                          | O-H bending vibration mode of the absorbed water in cellulose  |
| 1429                          | -CH <sub>2</sub> bending   |
| 1596; 1507                    | Aromatic C=C stretch from aromatic ring vibration.   |
| 1140                          | -C-O antisymmetric bond stretching vibration   |
| 1018                          | C-O-C stretching vibrations of the β-1,4-glycosidic ring linkages between the D-glucose units in cellulose |



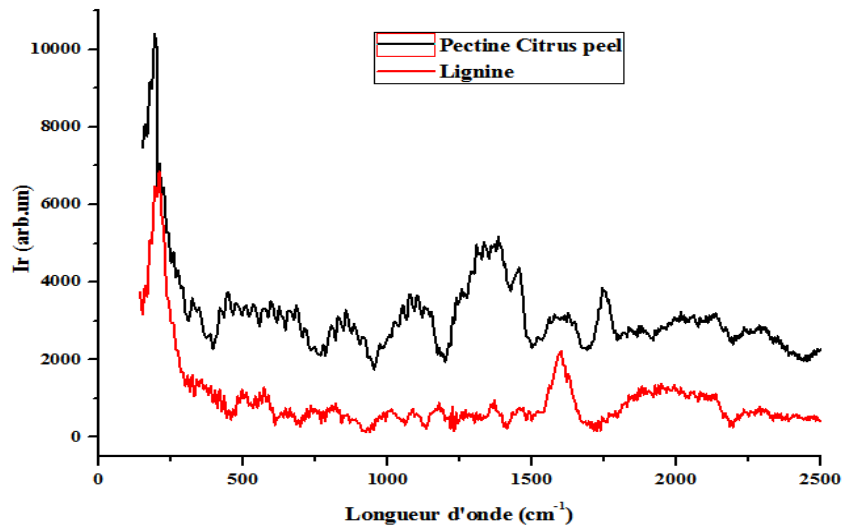
**Figure S6:** ATR-FTIR de la Lignine et la cellulose microcristalline commerciale.



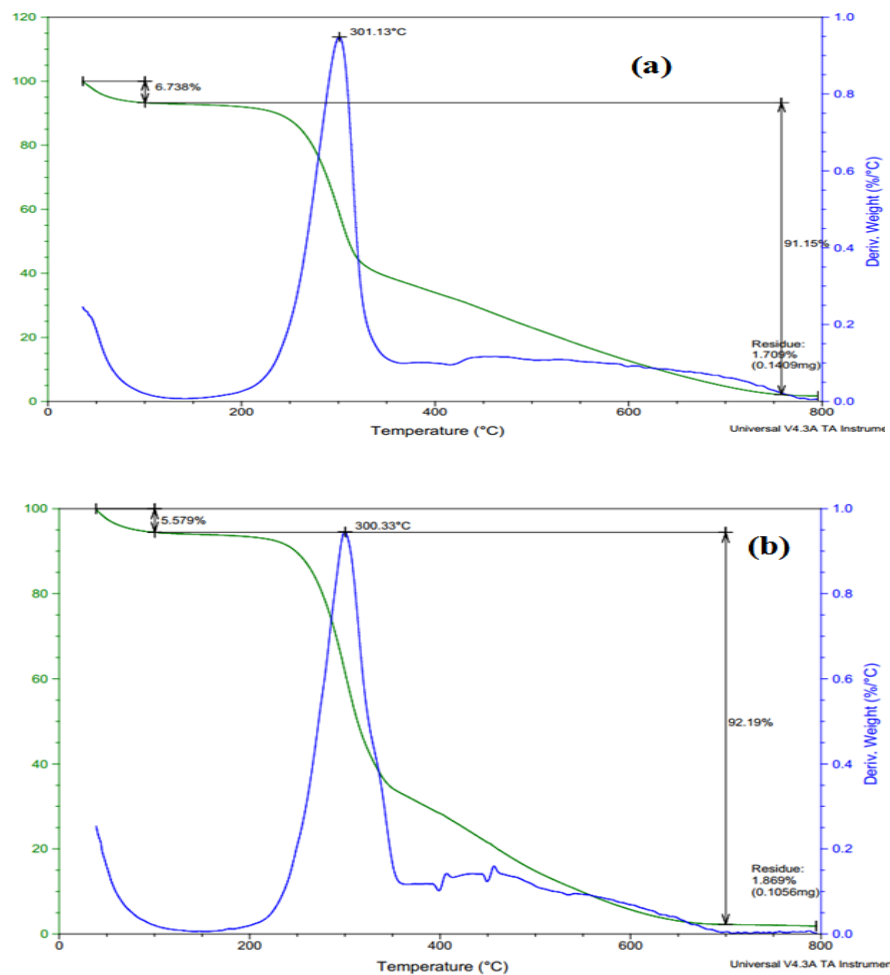
**Figure S7:** les spectres IR-Raman des polysaccharides commerciaux.



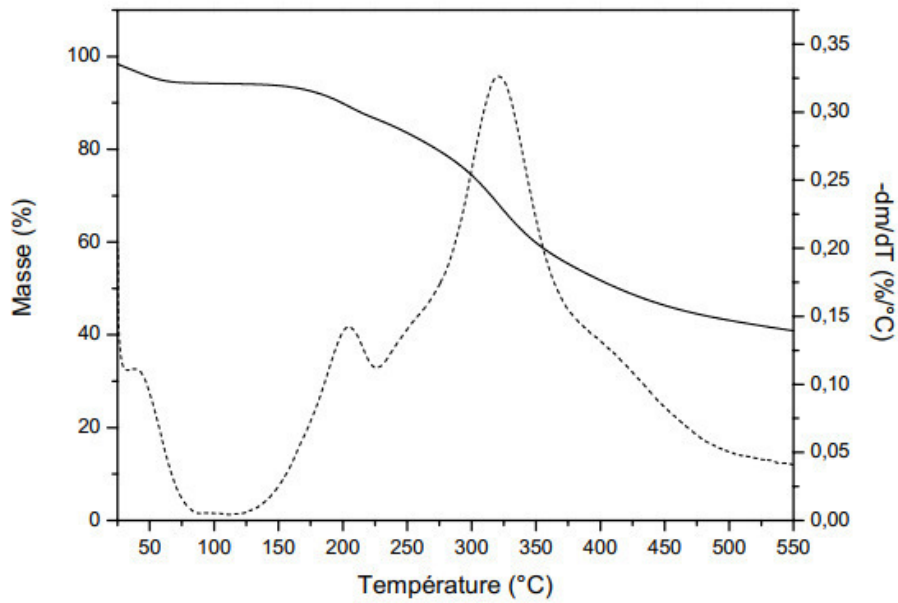
**Figure S8:** les spectres IR-Raman de gomme de caroube et gomme guar.



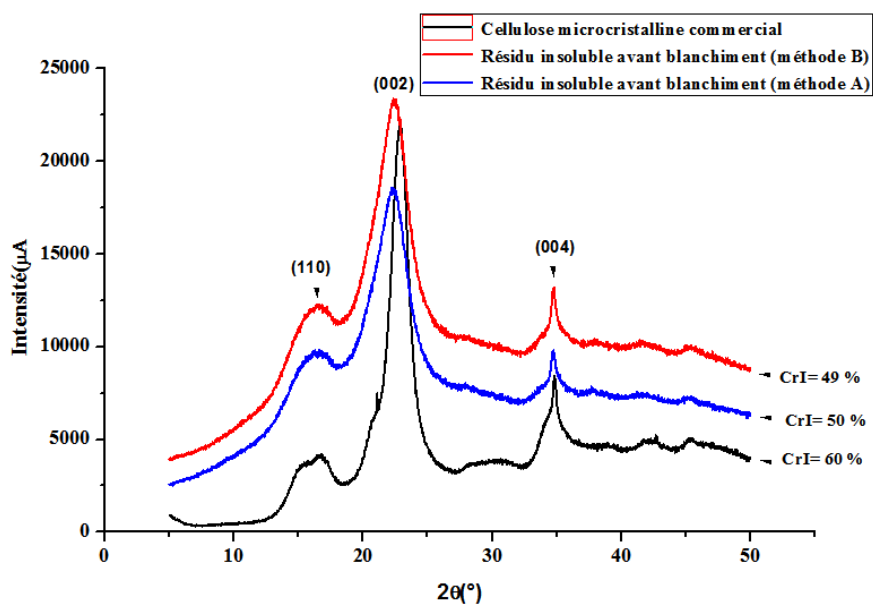
**Figure S9:** les spectres IR-Raman de la lignine et de pectine.



**Figure S10 :** Thermogrammes d'ATG des résidus insolubles avant blanchiment selon les deux méthodes A et B de Cc et ses dérivées de la température ambiante à 800°C avec un balayage à 10°C/min.

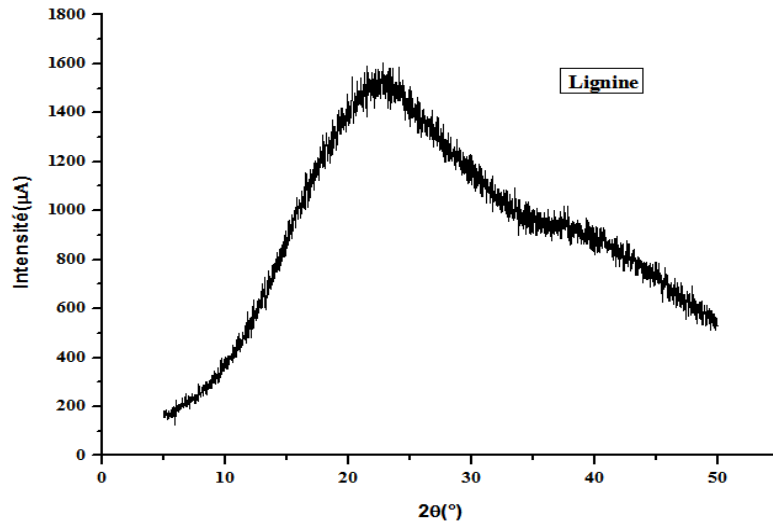


**Figure S11:** Thermogrammes d'ATG de la lignine commerciale et sa dérivée de la température ambiante à 550°C à 10°C/min.

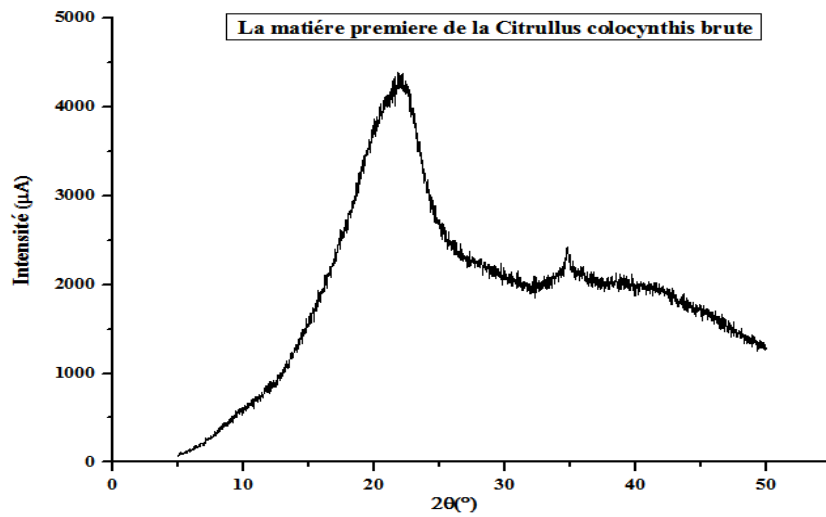


**Figure S12:** DRX de cellulose microcristalline commerciale et les résidus insolubles de Cc avant blanchiment.

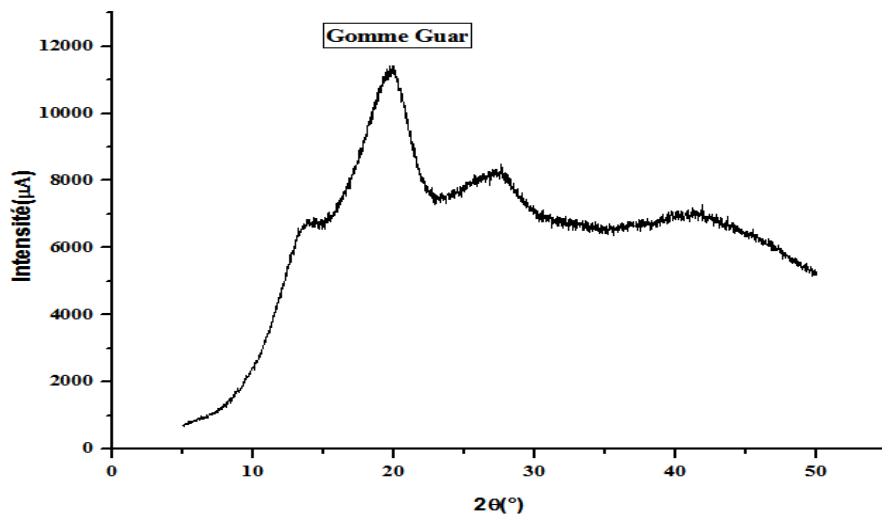




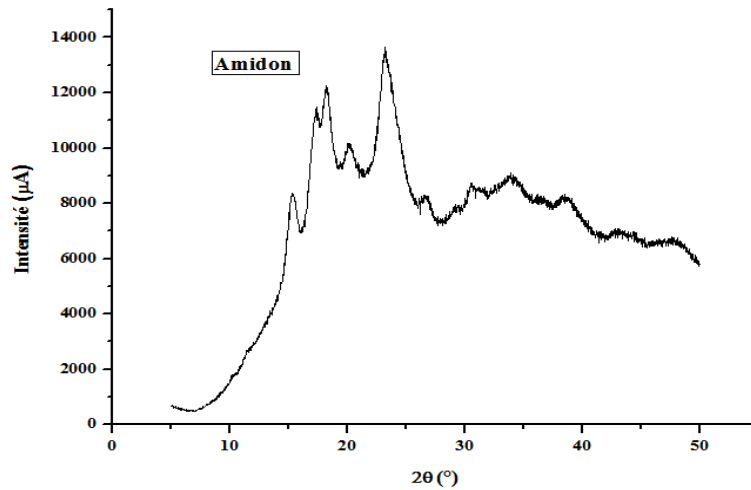
**Figure S13:** DRX de Lignine commerciale.



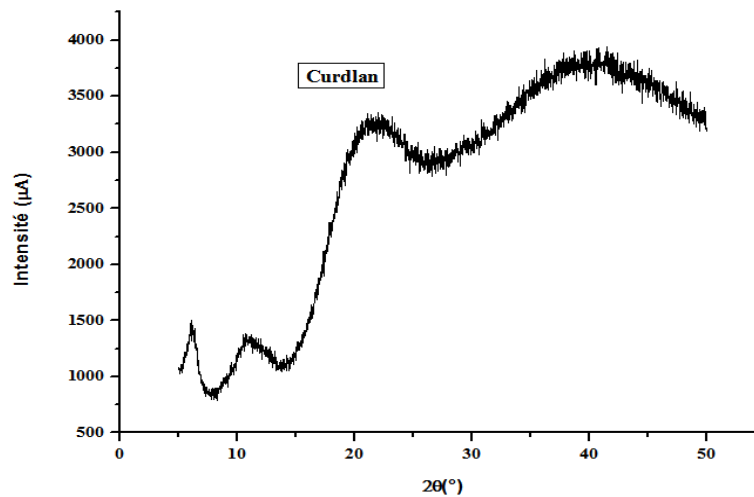
**Figure S14:** DRX de la matière première de Cc sans traitement.



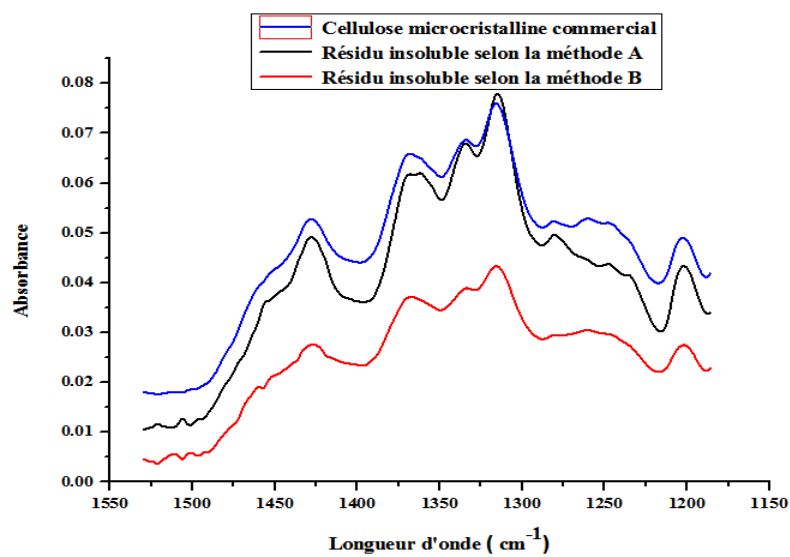
**Figure S15:** DRX de gomme Guar.



**Figure S16:** DRX de amidon.

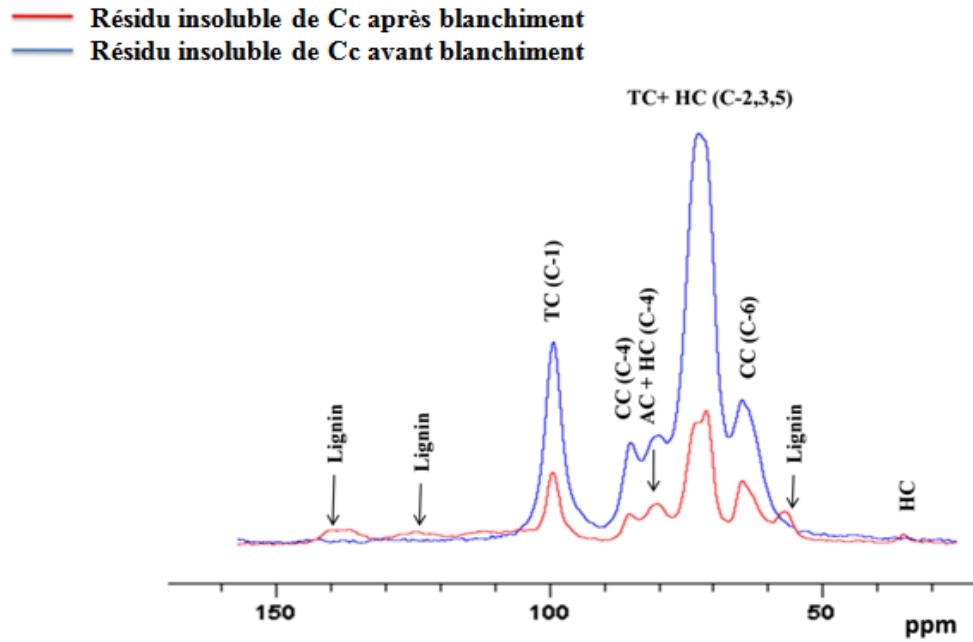


**Figure S17:** DRX de Curdlan.

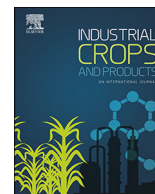


**Figure S18:** Spectres ATR-FTIR de la cellulose microcristalline commerciale et les résidus insolubles de Cc pour les deux procédés A et B après blanchiment (1550-1150).





**Figure S19:** Spectres RMN du carbone solide  $^{13}\text{C}$  avec (CP/MAS) des extraits insolubles de Cc avant et après blanchiment. (CC: Cellulose Cristalline, TC: Cellulose Totale, AC: Cellulose Amorphe).



## Extraction and characterization of cellulose and cellulose nanofibers from *Citrullus colocynthis* seeds

Imane Kouadri, Hamid Satha\*

Laboratoire des Silicates, des Polymères et des Nanocomposites (LSPN), Université 8 mai 1945, BP 401, Guelma 24000, Algeria



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Citrullus colocynthis*  
Extraction  
Water-insoluble polysaccharide  
Cellulose  
Nanofibers

### ABSTRACT

*Citrullus colocynthis* is a perennial herbaceous plant of the *Cucurbitaceae* family, cultivated in the Mediterranean basin and tropical countries as a traditional medicinal plant. In this paper, extraction of water-insoluble polysaccharides of *Citrullus colocynthis* seeds was performed using two chemical extraction processes. The first one involved the deproteinization of grinded *Citrullus colocynthis* seeds in sodium hydroxide aqueous solution, followed by lipid extraction in the chloroform/methanol solvent. The second process consisted of extracting the lipid material before deproteinization step. Several analytical techniques were used to identify cellulose as the main compound in the water-insoluble extract including ATR-FTIR and IR-Raman spectroscopy, CP/MAS <sup>13</sup>CNMR spectroscopy, X-ray diffraction and TEM. Further, almost 75 wt% of cellulose were obtained from the water-insoluble extract after bleaching process which determines the purification efficiency of cellulose and remove lignin and hemicellulose and the final percentages for this extraction are; 23%, 23%, 40% and 13% for lipids, proteins, cellulose and lignin, respectively. Finally, cellulose nanofibers having needle structure and fibrillar network were prepared by acid hydrolysis.

### 1. Introduction

The isolation of valorizable natural polymers from fruits and vegetables has been studied for decades, but still motivates academic and technological research in the principle of sustainable and ethical development (Guo et al., 2010; Minjares-Fuentes et al., 2017; Sousa et al., 2009). In recent years, polysaccharides from fruits and vegetables have become a focus of many researchers, because such isolated polysaccharides have been found to play an important role in biomedical due to their therapeutic effects. Moreover, they are also used to produce nanocomposite materials for energy production and storage, electrical devices and other engineering applications (Benaoun et al., 2017; Kouadri et al., 2018; Zhang et al., 2017; Zheng et al., 2015).

*Cucurbitaceae* is one of the most genetically diverse groups of food plants and are distributed all over the world, mainly as edible fruits. *Cucurbitaceae* includes about 118 genera and 825 species. Plants of this family are generally climbing herbaceous annual plants. The most important *Cucurbitaceae* plants are cucumber, gourd, bitter apple, melon and pumpkin (Hussain et al., 2014; Kouadri et al., 2018). *Citrullus colocynthis* is a perennial herbaceous plant of the *Cucurbitaceae* family. *C. colocynthis* is native of arid deserts in tropical and subtropical areas and it is widely distributed in the saharo-arabian region of Africa, the mediterranean basin and some parts of tropical Asia (Elsheikh, 2013;

Kouadri et al., 2018; Nehdi et al., 2013). The fruits of *C. colocynthis* are commonly named “bitter apple”, “bitter watermelon” and “colocynth” or “Handhal”, “Hdaj” and “Dellaa El-Wad” in the arab and mediterranean region (Eidi et al., 2015; Kouadri et al., 2018; Marzouk et al., 2010; Nehdi et al., 2013). Each *C. colocynthis* plant produces around 15–30 fruits, which are nearly spheric (5–10 cm diameter) and smooth (Dane et al., 2007; Najafi et al., 2010). *C. colocynthis* fruits contain around 200–300 seeds in compressed form (~5 mm long by ~3 mm wide), smooth and brownish when ripe. Generally, seeds represent about 75 wt % of dry fruits (Najafi et al., 2010).

*C. colocynthis* fruits are usually recognized for their wide range of traditional medicinal uses, e.g. in diabetes, asthma, gastrointestinal disorders and different microbial infections (Abdel-Hassan et al., 2000; Kouadri et al., 2018; Mehta et al., 2013).

Several bioactive chemical constituents from fruits were recorded such as glycosides, flavonoids, alkaloids, cucurbitacins, colocynthosides, fatty acids and essential oils (Gurudeeban et al., 2010; Nayab et al., 2006; Nehdi et al., 2013; Sturm and Stuppner, 2000). The fruit of *C. colocynthis* has been studied extensively for its biological activities, which include antioxidant, cytotoxic, antidiabetic, antilipidemic, insecticide, antimicrobial and anti-inflammatory (Abdel-Hassan et al., 2000; Mehta et al., 2013). The plant was also shown to be rich in nutritional value with high protein contents and important minerals as

\* Corresponding author.

E-mail address: [satha.hamid@univ-guelma.dz](mailto:satha.hamid@univ-guelma.dz) (H. Satha).

well as edible quality of seed oil (Akinyele and Oloruntoba, 2013). Although, the composition of proteins and lipids are well documented in the open literature, however, to the best of our knowledge, only a few publications were devoted to the polysaccharides content in *C. colocythis* seeds (Eidi et al., 2015; Elsheikh, 2013; Hussain et al., 2014). So, further investigations on polysaccharides extracted from *C. colocythis* seeds are necessary for better understanding the material properties.

The polysaccharides found in this plant used in different fields. Among these non-hydrosoluble polysaccharides, Cellulose is a biopolymer and the most abundant polymer in the environment and nature (Dehnad et al., 2014a,b; Righi et al., 2011). This natural polymer regards as the main component of several natural fibers and the most important elements in the plant structures and guarantees the integrity of cellular structure (Dehnad et al., 2014a,b; Morán et al., 2008; Righi et al., 2011). In the search for new polymer materials with well-defined properties, Materials researchers have developed high-performance composite materials in which cellulose nanofibers are embedded in a polymer and can be used as lightweight materials with mechanical properties (Dehnad et al., 2014a,b; Klemm et al., 2011). On an industrial scale, Researchers are currently focused on the isolation and characterization of nanocellulose, which consists of fibers or crystals less than 100 nm in diameter. In this form, it should create materials combining low weight with high mechanical stability (Azerado et al., 2010; Dehnad et al., 2014a,b; Klemm et al., 2005). These cellulose nanofibers are thus a raw material obtained by biological means, also biodegradable, usable for technical purposes, for example for the reinforcement of (bio) polymers for the production of light materials intended for industry, by industry food, pharmaceutical, automotive industry or to produce membranes or biomedical filters (Dehnad et al., 2014a,b; Hansson et al., 2013; Klemm et al., 2005).

Therefore, this study aims to extract and identify main water-insoluble polysaccharides present in *C. colocythis* seeds. Thus, a chemical process was developed to isolate water-insoluble polysaccharides of high purity by removing the other components, i.e. proteins, lipids and water-soluble materials. Identification of water-insoluble polysaccharides was carried out by applying a convergent set of characterization techniques such as ATR-FTIR and IR-Raman spectroscopy, CP/MAS  $^{13}\text{C}$ NMR spectroscopy, X-ray diffraction and TEM. The production of Cellulose nanofibrils from *Citrullus colocythis* is the dominant theme in this manuscript. Cellulose nanofibrils can be extracted from cellulosic fibers using mechanical disintegration methods; however, there is a strong need of using alternative ways in order to facilitate fibers fibrillation and to reduce the energy consumption during the production process. In this context, chemical hydrolysis techniques are known to be applied in combination with mechanical treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Raw materials, chemicals and pretreatment methods

*C. colocythis* fruits were collected from the periphery of Ouargla located in the east-south of Algeria. The seeds of *C. colocythis* were manually separated from the fruits, dried at room temperature during several days, ground by an electric mixer until a fine powder is obtained and stored at room temperature (Fig. 1).

All chemicals used in the present study were purchased from Sigma–Aldrich, namely sodium hydroxide (assay > 97%), chloroform (assay > 99.9%), methanol (assay > 99.9%), acetone (assay > 99.8%), sulfuric acid (assay > 96%), sodium chlorite (assay > 80%), sulfuric acid- $\text{d}_2$  solution (assay > 98%), acetic acid (assay > 99.8%), starch from wheat, starch from rice, starch from corn, amylose from corn, amylopectin from maize, gum locust bean from seeds of ceratonia siliqua, guar, lignin alkali, pectin from citrus peel and microcrystalline cellulose.

### 2.2. Extraction process of water-insoluble polysaccharides

#### 2.2.1. Deproteinization process

Grinded seeds (Method A in Fig. 2) or lyophilized material B1 (Method B in Fig. 2) were mixed with an aqueous NaOH solution (1 M) in the ratio powder/solution 1:30 (g/mL) in a Soxhlet apparatus. After 24 h at 70 °C, the insoluble part was collected by centrifugation (10,000 rpm, 20 min), washed several times with purified water until neutral pH, and then lyophilized (−85 °C, 0.0014 mbar, 24 h) to get a light brown powder. (Hassainia et al., 2018).

#### 2.2.2. Lipid extraction process

Grinded seeds (Method B in Fig. 2) or lyophilized material A1 (Method A in Fig. 2) were mixed with a chloroform/methanol solution (2:1; v/v) in the ratio powder/solution 1:20 (g/mL). After stirring 4 h at room temperature, the insoluble part was collected by centrifugation (10 000 rpm, 20 min), washed three times with acetone, and finally lyophilized (−85 °C, 0.0014 mbar, 24 h) to get a light brown powder (Supriya and Ramachandra, 2012).

#### 2.2.3. Bleaching process

For the preparation of the bleached solution, an aqueous chlorite solution (1.7 wt%  $\text{NaClO}_2$  in water) was mixed with a sodium acetate buffer (pH = 4.8) in the ratio chlorite solution/acetate buffer 1:1 (v/v). Lyophilized material (A2 or B2 in Fig. 2) was stirred with the bleaching solution, in the ratio powder/solution 1/30 (g/mL), at 80 °C during 6 h. The insoluble part was then filtered, washed several times with purified water until neutral pH and finally lyophilized (−85 °C, 0.0014 mbar, 24 h) to get a white powder (de Rodriguez et al., 2006).

#### 2.2.4. Extraction of cellulose nanofibers

150 mg of *C. colocythis* extract B was mechanically stirred in 7.5 mL of 40% (v/v) aqueous sulfuric acid solution in the ratio powder/solution 20:1 (mg/mL), at room temperature for 30 min or 4 h. The suspension was then subsequently diluted with purified water to stop the acid hydrolysis. The insoluble part was separated by centrifugation (10,000 rpm; 10 °C, 20 min), washed with purified water until neutral pH and finally lyophilized (−85 °C, 0.0014 mbar, 24 h). The lyophilizate was then resuspended in purified water (20:1 w/v), treated by sonication (20 kHz) during 10 min, and finally filtered on 45  $\mu\text{m}$  hydrophilic nylon membrane leading to cellulose nanofibers (Morán et al., 2008).

### 2.3. Characterization of water-insoluble polysaccharides

#### 2.3.1. ATR-FTIR spectroscopy

FTIR spectra were obtained in the attenuated total reflectance (ATR) mode using a Thermo Scientific Nicolet iS10 (Smart iTR) spectrometer equipped with a diamond-based ATR accessory. All the ATR-FTIR spectra were obtained in the range 4000–500  $\text{cm}^{-1}$  with a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . Each spectrum was collected from an average of 64 scans. The positions of significant transmittance peaks were determined by the OMNIC software.

#### 2.3.2. Infra-red Raman spectroscopy

Infra-red Raman spectra were obtained using an Infra-red Raman spectrometer (Ramspec 1064 from Bayspec/PhotonLines). The laser ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ) incident beam was focused in a spot diameter of about 1 mm on the sample. The incident power was adjusted between 10 mW and 450 mW to avoid degradation of the samples. Typical exposure time was 30 s; each spectrum was an average of 4 scans. The measurements were collected over the wave number range from 200 to 3000  $\text{cm}^{-1}$  with spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.3.3. $^{13}\text{C}$ NMR spectroscopy

Solid-state cross-polarization/magic angle spinning (CP/MAS)  $^{13}\text{C}$



Fig. 1. Pictures of *Citrullus colocynthis* (*C. colocynthis*) fruits and seeds.

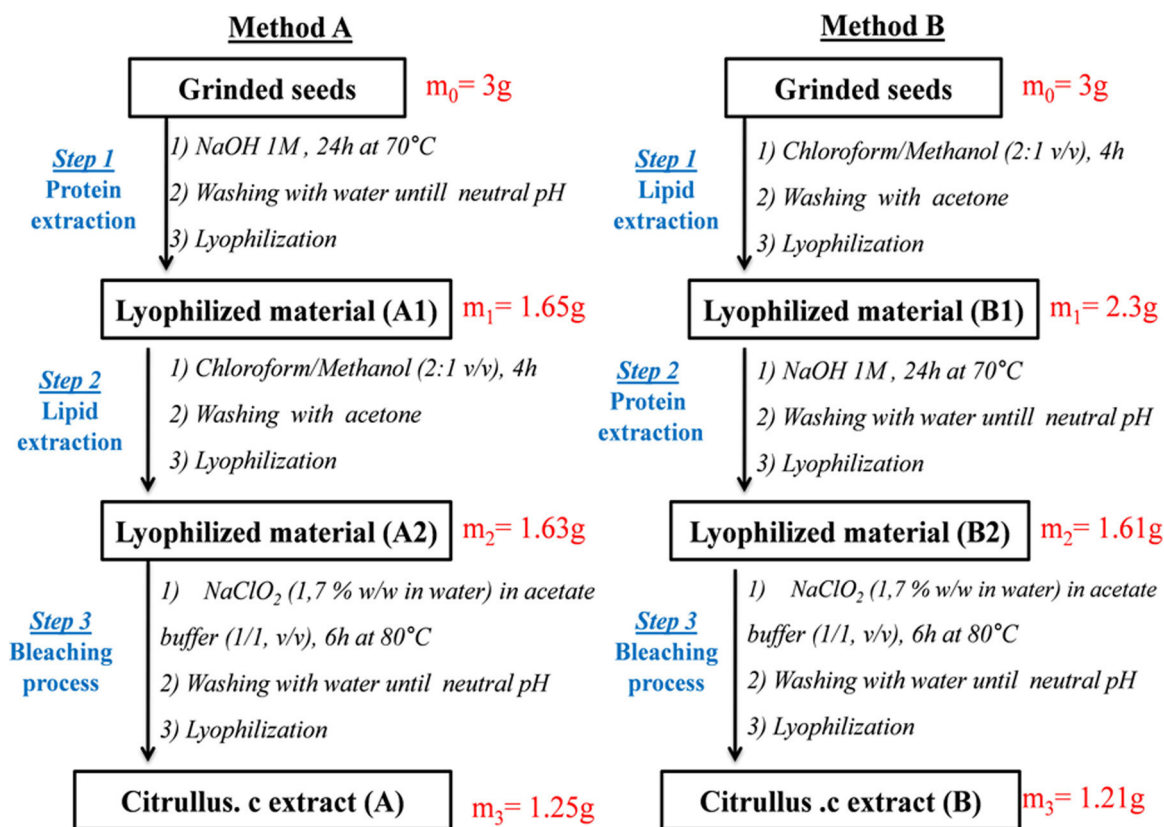


Fig. 2. The extraction process of water-insoluble polysaccharides from *Citrullus colocynthis* seeds according to method A and B.

NMR spectra were obtained using a Bruker spectrometer equipped with a 4 mm MAS probe operated at 75.48 MHz and room temperature (299 K). The samples have been placed in a rotor as zirconium for MAS at approximately 10 kHz. Spectra were recorded with an acquisition time of 1.5 ms and a recycling time of 10 s. Spectra of CP/MAS <sup>13</sup>C NMR were treated with the TOPSPIN 3.2 software.

### 2.3.4. X-ray diffraction

X-ray diffraction (XRD) was performed on a Bruker D8-Advance diffractometer (Henry Longchambon X-ray diffraction Center at UCBL) with a copper anti cathode operated at 40 kV and 40 mA. The scattered intensities were measured in the 2θ angular domain from 5° to 50°, for a total measurement time of 58 min with variable slits of 4 mm. The detector used was a linear detector (LYNXEYE XE) with an angular aperture of 3°. Diffraction was performed on power samples spread

evenly on a neutral quartz glass sample holder.

The cellulose crystallinity index was calculated from the X-ray diffraction patterns according to the following equation (Granja et al., 2001):

$$\text{CrI} = ((I_{002} - I_{\text{am}}) / I_{002}) * 100$$

Where  $I_{002}$  and  $I_{\text{am}}$  are the intensities of the diffraction peaks at  $2\theta$  values close to  $22^\circ$  and  $18^\circ$  respectively.

### 2.3.5. Transmission electron microscopy

For TEM investigation, a droplet of  $5\ \mu\text{l}$  “cellulose nanofibers” dispersion was deposited onto a carbon film coated on copper grid. To keep the sample onto the grid, excess solution was not blotted off as usual, only let air-dried at room temperature. For imaging, a transmission electron microscope Philips CM120 at an accelerating voltage of 120 kV was used.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Chemical extraction of water-insoluble polysaccharides

Two chemical routes were developed for the extraction of water-insoluble polysaccharides from *C. colocyntis* seeds as illustrated in Fig. 2. The first extraction process (process A in Fig. 2) involved the deproteinization of grinded *C. colocyntis* seeds by an aqueous 1 M sodium hydroxide solution at  $70^\circ\text{C}$  during 24 h, followed by the lipid extraction in chloroform/methanol (2:1 v/v) at room temperature for 4 h. The second extraction process (process B in Fig. 2) was carried out in extracting the lipid material before the deproteinization step using same reaction conditions compared to the process A.

In both extraction processes, water-insoluble polysaccharides were isolated in comparable mass yield (ca. 54% w/w) from the starting grinded seeds after the first two extraction steps. However, according to the methods A and B, different mass yield values were obtained for both the deproteinization and lipid extraction steps. Thus, for the deproteinization step, the mass yield is around 55% (w/w) in process A compared to 70% (w/w) in process B.

Furthermore, for the lipid extraction step, mass yields are 99% (w/w) and 77% in process A and B, respectively. In fact, these results show that mass yields of deproteinization and lipid extraction depend on the sequence of each step in the extraction process. To explain these mass yield differences, it worth noting that an important proportion ( $> 97\%$  (w/w)) of the lipid material was also removed during the deproteinization step in process A, due to the formation of a triphasic system (lipidic phase/aqueous phase/water-insoluble phase) in these aqueous extraction conditions.

Therefore, only the process B enabled an accurate estimation of lipid and protein contents in *C. colocyntis* seeds around 23% (w/w) for each, taking into account mass yields of both lipid extraction and deproteinization steps. These estimations are in good agreement with content values given in the literature, i.e. 14–28% (w/w) for proteins (Sawaya et al., 1986; Uruakpa and Aluko, 2004), and 23–27% (w/w) for lipids (Elsheikh, 2013; Sawaya et al., 1986).

ATR-FTIR spectroscopy was used to analyze extracted materials obtained after each extraction step in process A and B. Thus, for both extraction processes, Fig. 3 displays the evolution of FTIR spectra between grinded *C. colocyntis* seeds and extract materials isolated after the deproteinization and lipid extraction steps.

In Fig. 3a, the comparison of spectra shows clearly that both proteins and lipids were mostly removed during the first step of the process A, since extracts A1 and A2 led to very similar FTIR spectra, characterized by the absence of typical vibrations signals of lipids (ca.  $1741\ \text{cm}^{-1}$ ) and proteins (ca.  $1650\ \text{cm}^{-1}$ ).

In contrast, Fig. 3b brings out that lipid and protein materials were removed separately during the process B: as expected, lipid and

proteins materials were completely removed during the first and the second step of the process, respectively. Thus, the FTIR spectrum of the extract B1 shows the absence of lipid absorption signals (ca.  $1747\ \text{cm}^{-1}$ ), but the presence of protein absorption signals (ca.  $1636\ \text{cm}^{-1}$ ), which disappeared afterwards in the extract B2 spectrum.

Finally, as illustrated in Fig. 4, extracts A2 and B2 led to completely similar FTIR spectra, indicating that the sequence of deproteinization and lipid extraction steps has no significant influence in the extraction process on both the composition of water-insoluble polysaccharides and their extraction mass yield. (See Fig. S1 in Supplementary material)

### 3.2. Identification of insoluble alkaline residue

The identification of the polysaccharide of the alkaline insoluble residues of *C. colocyntis* was performed by the comparison with the FTIR spectra of a library of other polysaccharides. (See Supplementary material, the corresponding spectra are given in Figs. S2–S5 and Table S1 for details), from this comparison with the previous polysaccharides, it is found that the spectrum of the final extract of plant is similar with cellulose by the presence of identical peaks in the two spectra. So, commercial microcrystalline cellulose can be shown to be the major polysaccharide in the insoluble residues of *C. colocyntis* seeds, as displayed in Fig. 5.

According to Fig. 5, the *C. colocyntis* extract exhibited two additional absorption bands at  $1507$  and  $1595\ \text{cm}^{-1}$  in comparison with the microcrystalline cellulose spectrum. This could be due to the presence of phenolic groups related to the axial deformations of the aromatic cycles of lignin, as shown in the FTIR spectrum of pure lignin (Vestena et al., 2016).

A similar analysis could be performed by IR-Raman. Fig. 6 shows the spectra of commercial microcrystalline cellulose and the alkaline insoluble residues of *C. colocyntis* before bleaching for both methods A and B. The IR-Raman spectra libraries of polysaccharides are given in Figs. S6–S8 in Supplementary material.

As depicted in Fig. 6, the Raman spectra of obtained from the two-extraction methods A and B are similar but there is a small difference by the presence of a peak in the extract of method B at  $1000\ \text{cm}^{-1}$  may be due to the presence of another type of minor polysaccharide (possibly, hemicellulose). The Raman spectrum for commercial microcrystalline cellulose is also different from that of the spectrum for alkaline insoluble residues of both method A and B by the presence of a peak located at  $1600\ \text{cm}^{-1}$ ; this peak is attributed to aromatic ring stretching and is present in the Raman spectrum of lignin (Alves et al., 2016). (See Supplementary material, Fig. S8).

When comparing this result with IR-Raman and FTIR-ATR of lignin, we find that the same peak at  $1600\ \text{cm}^{-1}$  and  $1596\ \text{cm}^{-1}$  respectively, in this case the peak at  $1600\ \text{cm}^{-1}$  in the insoluble alkali residue for both methods A and B is for lignin.

Solid state NMR was also used as an additional technique for providing supplementary information on the molecular structure of *C. colocyntis* extracts. Fig. 7 presents the  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectrum of Lignin, commercial microcrystalline cellulose and the extracts of Cc for both methods A and B.

Again, in Fig. 7 we observed that the spectra of the extracts from both methods A and B (before bleaching) are similar to commercial microcrystalline cellulose with additional resonance peaks in 54 and 146 ppm of Lignin. But the extracts for the both methods A and B are not the same; since the extract of method A exhibit an additional peak at 29 ppm, this peak due to the presence of hemicelluloses (Tai et al., 2017).

From that point method B as a better extraction procedure because yielding a purer cellulose.

The results of ATR-FTIR, IR-Raman and Solid-state NMR  $^{13}\text{C}$  (CP/MAS) show that the alkaline insoluble residues of *C. colocyntis* for the both extraction methods A and B exhibit strong structural analogies with cellulose in the presence of other minor polysaccharide are lignin

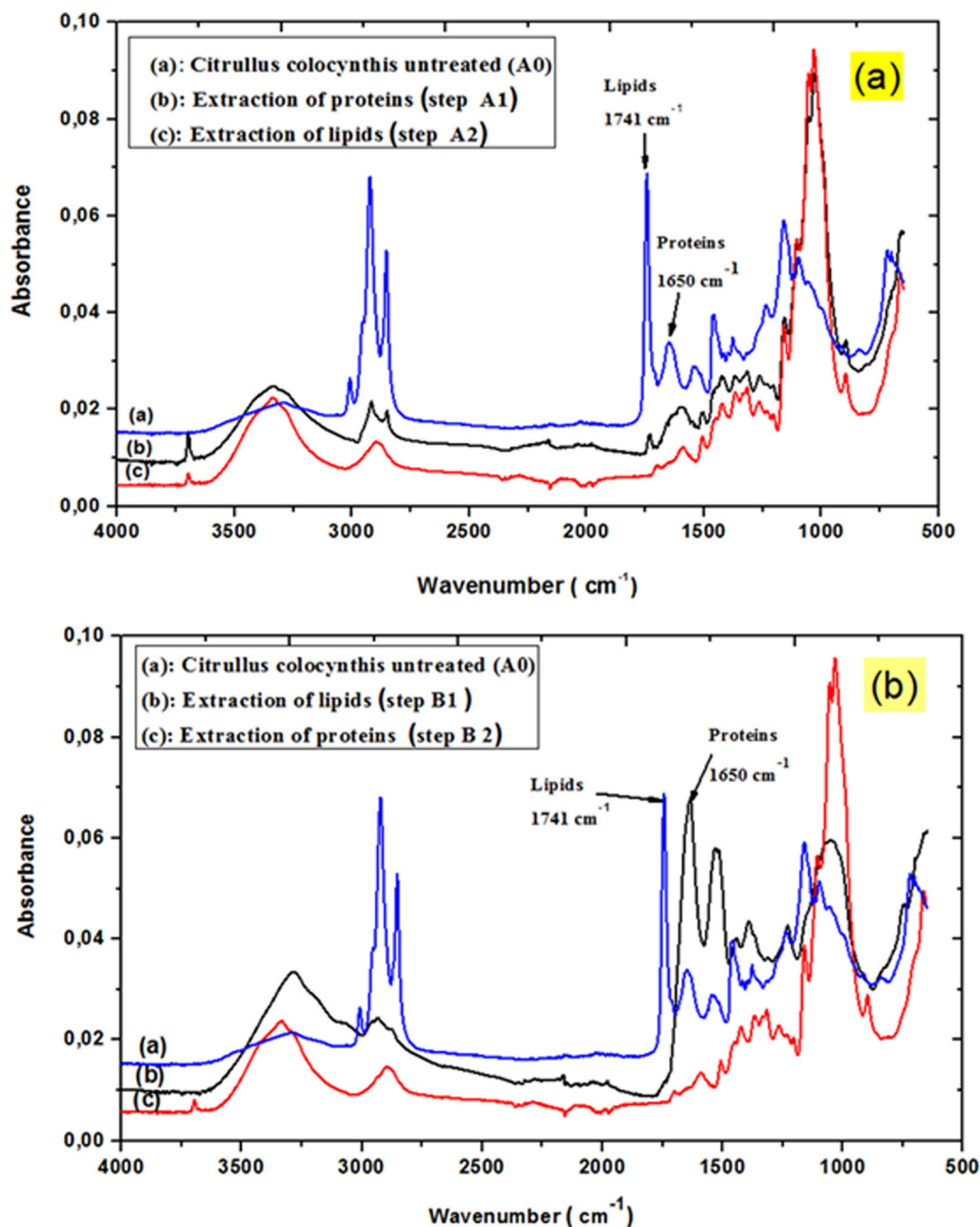


Fig. 3. (a); ATR-FTIR spectra of Untreated raw material (A0), the final insoluble residue according to method A after A1, A2 steps and (b); according to method B after B1, B2 steps.

and hemicellulose.

### 3.3. Impact of bleaching of the insoluble alkaline residues

As the insoluble alkaline residue of *C. colocynthis* for both methods A and B displayed to the contribution of lignin, in the aim to purify cellulose and remove lignin and hemicellulose, we performed a bleaching treatment (de Rodriguez et al., 2006).

Fig. 8.

As expected, we observed a change in color of the extract from light brown to white. The mass yields for the final *C. colocynthis* extract after the bleaching treatment for both methods A and B can be deduced from Fig. 2. First, we start with the first method A; we can be seen that when step A1 there is a great loss of weight, it begins at the departure with  $m_0 = 3$  g but you get just  $m_1 = 1.65$  g, but at the second step A2 the mass remains almost the same (loss of negligible mass), it becomes

$m_2 = 1.63$  g and after the bleaching treatment the mass becomes  $m_3 = 1.25$  g. Therefore, the percentage of proteins and lipids found according to method A is 45% and the percentage of final extract and lignin is 42% and 13% respectively. In the following, we will now turn to the method B when the step B1 there is not a great loss in weight, starting mass  $m_0 = 3$  g it becomes  $m_1 = 2.3$  g, then we extracted only lipids, but when passing to the step B2 the mass is still changed it becomes  $m_2 = 1.61$  g and after the bleaching treatment the mass becomes  $m_3 = 1.21$  g. The percentage of lipids and protein according to the second method B is 23% and 23%, respectively, and the percentage of the insoluble material and lining is 40% and 13% respectively.

#### 3.3.1. Wide angle X-ray diffraction

The X-ray diffractograms of the microcrystalline cellulose and the samples studied are shown in Fig. 9.

As can be seen from the curves, the four peaks at around  $2\theta = 14^\circ$ ,



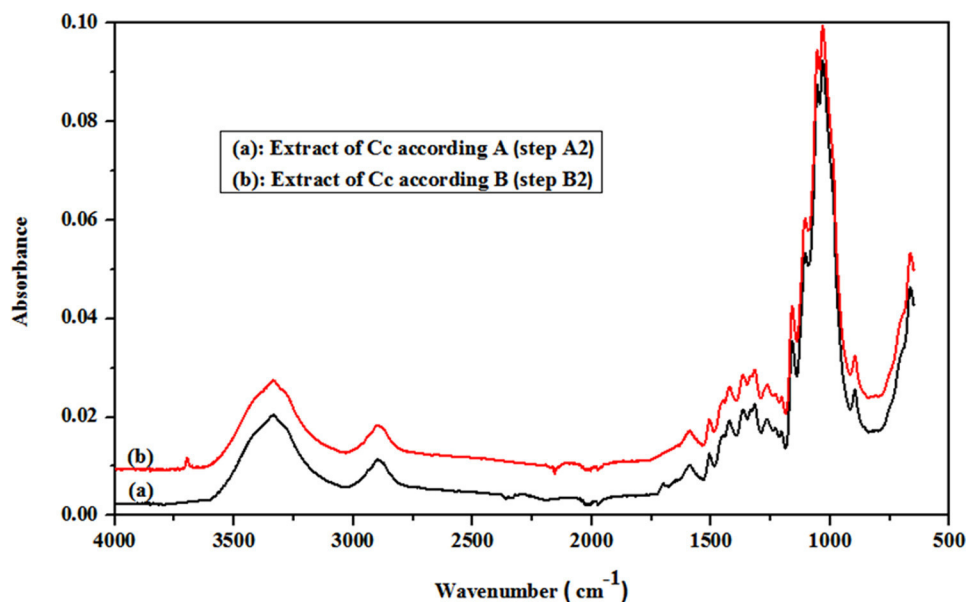


Fig. 4. ATR-FTIR spectra of the residues according to method A and B after A1 and B2 steps.

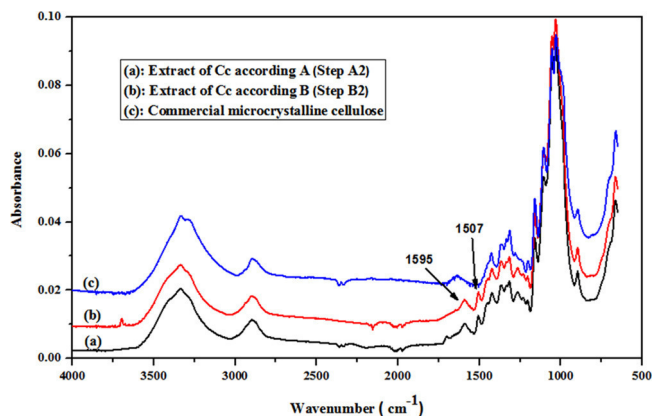


Fig. 5. ATR-FTIR spectra of microcrystalline cellulose and the alkaline insoluble residue from extraction method A and B (steps A2 and B2) before bleaching.

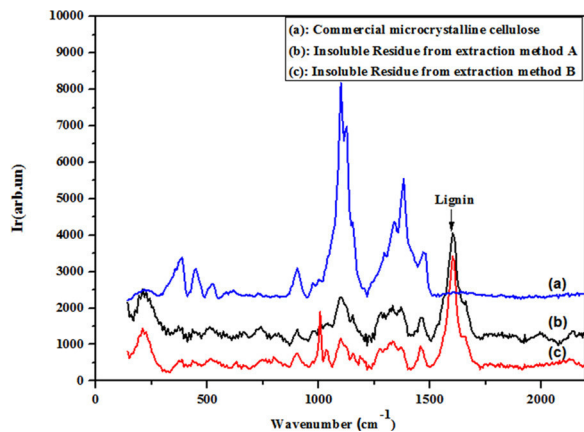


Fig. 6. Comparison of the IR-Raman spectra of Commercial cellulose and the alkaline insoluble residues of *C. colocyntis* seeds from extraction method A and B before bleaching.

$2\theta = 16^\circ$ ,  $2\theta = 22^\circ$ , and  $2\theta = 34^\circ$  respectively correspond to the reflection on the family of planes (110), (1–10), (200) and (004) of cellulose I (de Araújo Júnior et al., 2016; Morais et al., 2013; Zhang et al.,

2018).

The crystallinity index of commercial microcrystalline cellulose and the extracts for both methods A and B was calculated from the X-ray diffraction patterns, according to equation such as, 60%, 56% and 55% respectively. According to these values, we note that the commercial microcrystalline cellulose contains the strongest crystallinity index compared to the other samples of *C. colocyntis*.

According to Fig. S9 in Supplementary material additional information on the degree of crystallinity before and after the bleaching treatment, such that the crystallinity rate is increased with the bleaching by the increase of the crystalline phase and deteriorates the amorphous phase and lignin such as the degree of crystallinity before bleaching for commercial microcrystalline cellulose and the final extract for both methods A and B are 60%, 50% and 49%, respectively. And this also confirms the loss of mass before and after bleaching treatment for the two methods A and B.

### 3.3.2. ATR-FTIR and IR-Raman spectroscopy analysis

Fig. 10 shows the Structural identification of microcrystalline cellulose and the samples obtained by isolation from the raw materials of *C. colocyntis* for the both methods A et B after the bleaching treatments in the range of 500–4000  $\text{cm}^{-1}$ .

Table S1 and Fig. S10 in Supplementary material has been determined and explained the interpretation of the spectra of each sample.

A spectroscopic analysis was performed on the Raman data to further quantify the Raman bands obtained from the sample structures found in the 0–2500  $\text{cm}^{-1}$  spectral range. The FT-Raman spectra are shown in Fig. 11.

The characteristic IR-Raman signal was present at 1092  $\text{cm}^{-1}$ , which are attributed to C–H and C–H<sub>2</sub> stretching and asymmetric stretching vibration of the C–O–C glycosidic linkage (Alves et al., 2016). However, the peaks at 1465  $\text{cm}^{-1}$  indicate H–C–H bending; the characteristic peak at 1376  $\text{cm}^{-1}$  represents H–O–C bending (Agarwal et al., 2016).

According to the results of ATR-FTIR and IR-Raman, there are no difference between the spectra of microcrystalline cellulose and the alkaline insoluble residue of *C. colocyntis* after the bleaching treatments, and the Absence of shoulders at 1507 and 1595  $\text{cm}^{-1}$  indicates that complete removal of lignin, and the greater efficiency of the bleaching processes, also with IR-Raman spectra absence the peak at 1000  $\text{cm}^{-1}$  indicates that absence of hemicellulose; the spectrum is

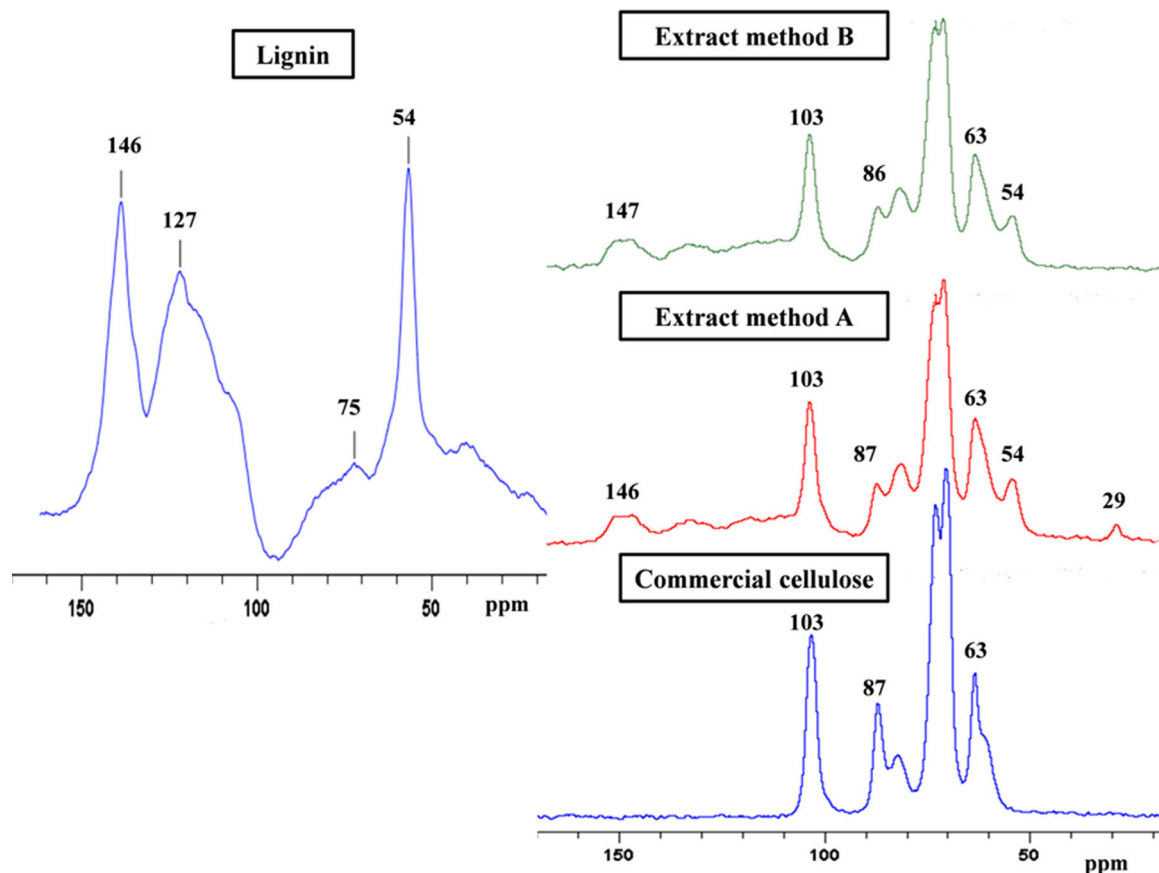


Fig. 7. NMR spectrum of solid carbon  $^{13}\text{C}$  with (CP/MAS) of alkali Lignin, commercial cellulose and the extract of *C. colocyntis* before bleaching.

indicative of commercial microcrystalline cellulose.

### 3.3.3. NMR spectra analysis

As already mentioned and according to the previous results, the extract of *C. colocyntis* is a lignocellulosic biomass, which is primarily composed of cellulose lignin and hemicellulose before bleaching treatment. So, solid state  $^{13}\text{C}$  NMR was selected as an additional technique for providing supplementary information on the molecular structure.

Fig. 12 presents an NMR spectrum of solid carbon  $^{13}\text{C}$  with cross-polarization and magic-angle spinning (CP/MAS) of microcrystalline cellulose and the extract of *C. colocyntis* after bleaching treatment.

The signals between 54 and 63 ppm are ascribed to C6. In addition, the up-field region from 71 ppm is attributed to C2, C3 and C5 of

cellulose (da Silva Filho et al., 2006; Jiang et al., 2016).

Obviously, the down field signals at 81 and 87 ppm are assigned to the C4 carbon. Eventually, the signal at 103 ppm is assigned to C1 (Martins et al., 2006).

The peaks at 81 and 54 ppm are due to the amorphous region, where as the signals at 87 and 63 ppm is due to C4 and C6 of the crystalline region (Wikberg and Maunu, 2004).

On the other hand, the NMR peaks at 87 and 63 ppm are crystalline cellulose (CC) and the peaks in 103 and 70 ppm are total cellulose (TC). While, the peak in 81 ppm is amorphous cellulose (AC), which appeared to be unaltered in Cc samples (Tai et al., 2017).

From Fig. 12, there is a strong similarity between the commercial microcrystalline cellulose and the final extract of *C. colocyntis* after the bleaching treatment. But there is a small difference almost negligible



Fig. 8. The powder of the alkaline extract of *C. colocyntis* seeds: (a); Before bleaching treatment, (b); After bleaching treatment.

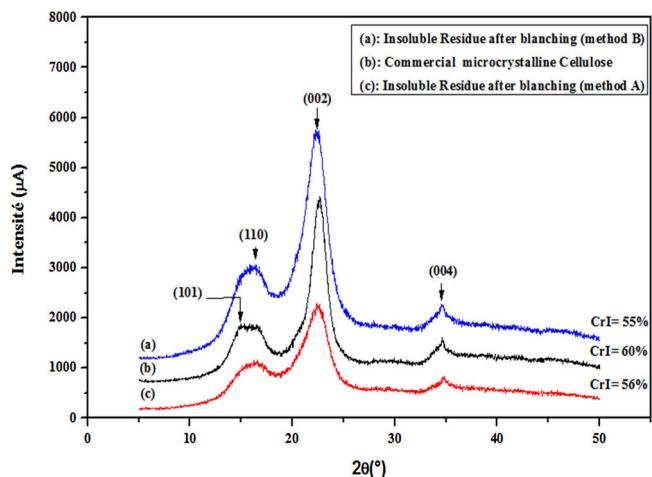


Fig. 9. X-ray diffraction of microcrystalline cellulose and the alkaline insoluble residue of *C. colocyntis* after bleaching.

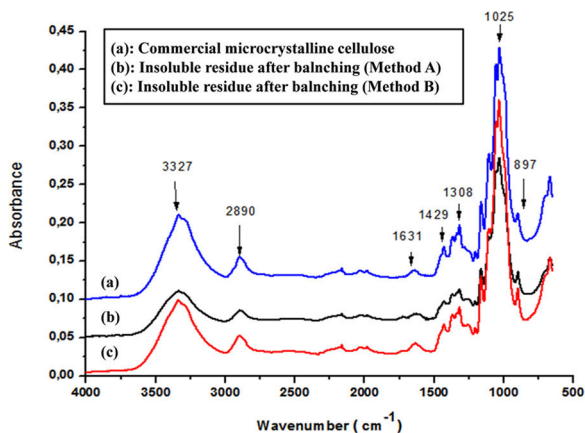


Fig. 10. ATR-FTIR spectra of microcrystalline cellulose and the alkaline insoluble residue of *C. colocyntis* for both methods A and B after bleaching.

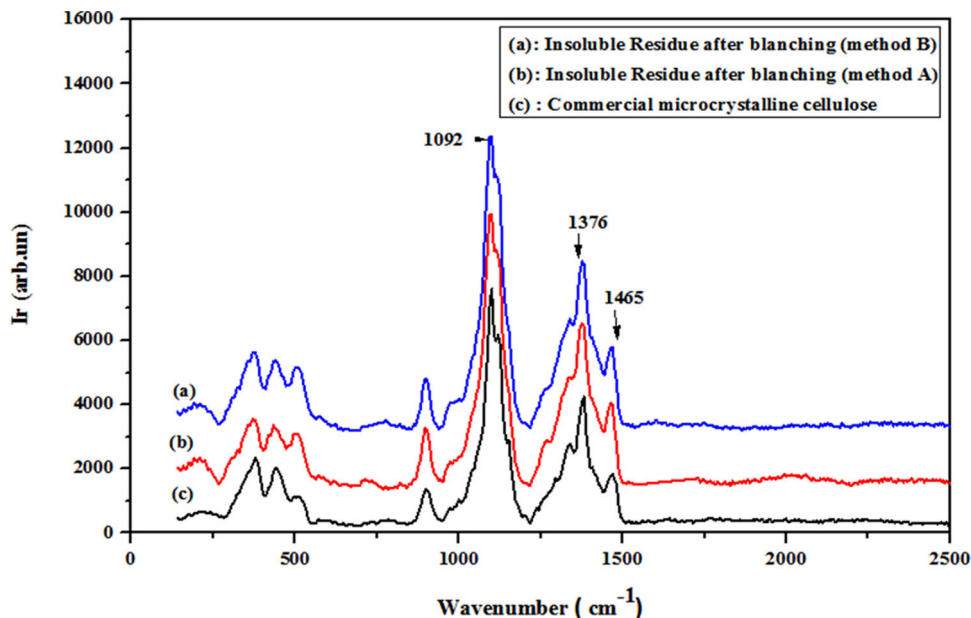


Fig. 11. IR-Raman spectra of microcrystalline cellulose and the alkaline insoluble residue of *C. colocyntis* in the Wavenumber range 0–2500 cm<sup>-1</sup>.

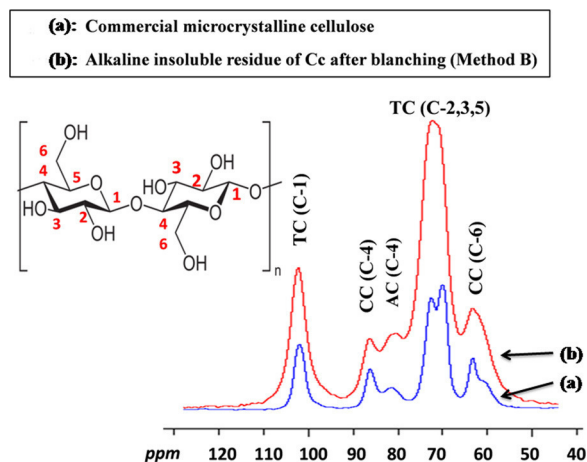


Fig. 12. NMR spectrum of solid carbon <sup>13</sup>C with (CP/MAS) of Commercial cellulose and the extract of *Cc* after bleaching for method B. (CC: Crystalline Cellulose, TC: Total Cellulose, AC: Amorphous Cellulose).

between the two due to the crystallinity of each material, such that the microcrystalline commercial cellulose is more crystalline than the final extract of the *C. colocyntis* plant because the intensity of commercial cellulose is stronger than the extract of *C. colocyntis* as indicated in Fig. 12 and the results of DRX.

According to Fig. S11 in Supplementary material and when comparing the crystallinity before and after the bleaching treatment is changed such that the crystallinity increases because during the bleaching treatment the amorphous region has been degraded.

Microcrystalline commercial cellulose and the extract of *C. colocyntis* after bleaching treatments showed no signals in the aromatic region in 54 and 146 ppm of their spectra and the <sup>13</sup>C NMR spectrum of a sample of *C. colocyntis* shows typical characteristics of commercial microcrystalline cellulose. So, solid-state NMR ensures a good elimination of lignin after the bleaching treatment.

### 3.4. Extraction of cellulose nanofibers

The nanofibril morphology of *C. colocyntis* cellulose was studied after the degradation of the amorphous cellulose by acid hydrolysis

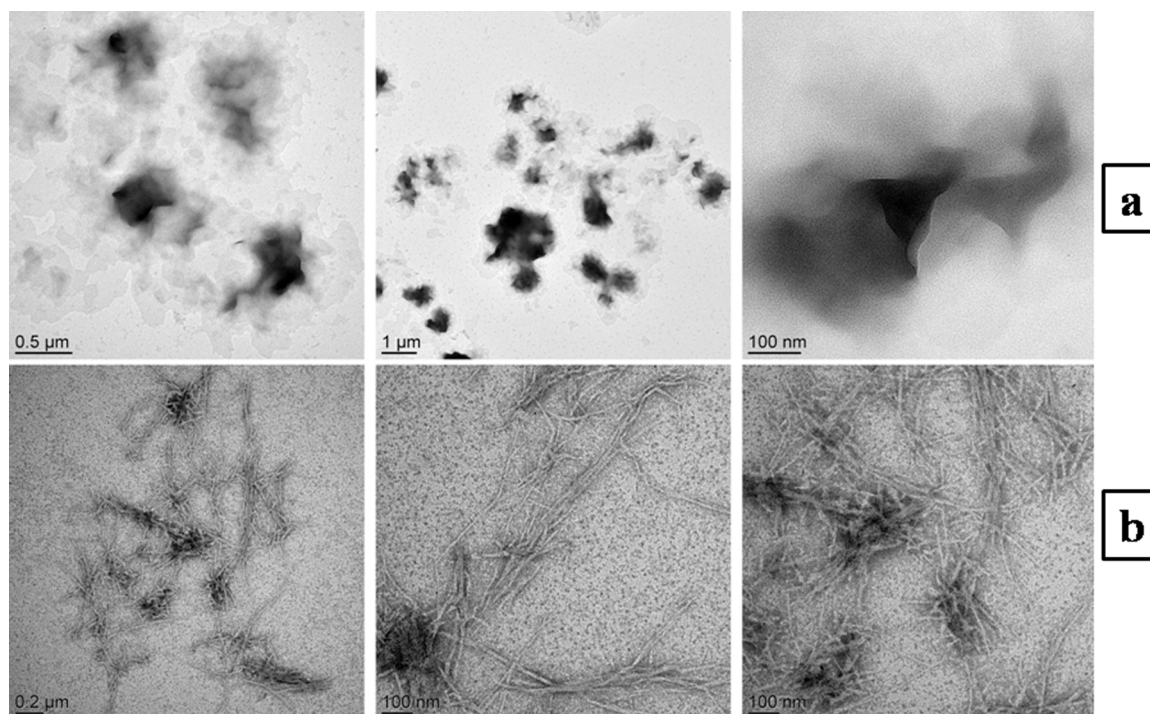


Fig. 13. Transmission electron micrograph (TEM) of cellulose nanofibrils obtained from *Citrullus colocynthis* Seeds; (a): Prepared with 30 min of hydrolysis, (b): Prepared with 4 h of hydrolysis.

using sulfuric acid 40% during 30 min and 4 h, as shown in Fig. 13. Sonication was necessary to observe the fibrillar morphology inducing an efficient disruption of the bundles of nanofibers (Nascimento et al., 2015).

Significant differences were observed in the morphology of the *C. colocynthis* extracts obtained after 30 min and 4 h of hydrolysis.

The nanofibers of cellulose in Fig. 13(a) showed larger agglomerated particles, in which the presence of fibrils hardly could be evidenced. This result indicated that 30 min of acid hydrolysis was not enough time for the degradation of the amorphous cellulose extracted from *C. colocynthis* seeds. In Fig. 13(b) the micrographs exhibited nanometer scale fibrils (0.2 μm, 0.5 μm, 1 μm and 100 μm) most of them still aggregated to form a fibrillar network (Hebeish et al., 2013; Pinheiro et al., 2017).

The geometrical characteristics for cellulose fibrils or nanofibers depend on the origin of cellulose and acid hydrolysis conditions (i.e. time, temperature, and purity of materials) (Wikberg and Maunu, 2004). So, TEM examination (Fig. 13(a,b)) discloses that, the *C. colocynthis* cellulose successfully undergoes acid hydrolysis to bring about well stabilized polydispersed cellulose nanoparticles having needle structure.

#### 4. Conclusion

This work reports an integrated two methods for extraction water-insoluble polysaccharides from a *C. colocynthis* seeds and ATR-FTIR, <sup>13</sup>C NMR, X-ray diffraction, IR-Raman Spectroscopy and TEM, were used to characterize the extract of *C. colocynthis* before and after bleaching treatment. The dispersion of the lignin indicated the greater efficiency of the bleaching process. The removal of lignin as confirmed by the absence peaks at 1507 and 1595 cm<sup>-1</sup> in ATR-FTIR, and at 1600 cm<sup>-1</sup> in IR-Raman spectroscopy. The crystallinity indices determined for the microcrystalline commercial cellulose (60%) and were higher than obtained cellulose (50–49%). we note that the commercial microcrystalline cellulose contains the strongest crystallinity index compared to the other samples of *C. colocynthis* according to X-ray diffraction

analysis. The NMR spectra analysis showed that the isolated cellulose from *C. colocynthis* seeds had Strong analogy comparable with microcrystalline commercial cellulose because no significant difference was observed in the morphology of microcrystalline commercial cellulose with cellulose obtained after bleaching treatment. This work demonstrates the production of nanofibrillated cellulose from *Citrullus colocynthis* by acid hydrolysis, having needle structure and fibrillar network, renewable and biodegradable character, which makes it promising for applications in such fields as composites, packaging, adhesives, biomedicine and automotive.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.051>.

#### References

- Abdel-Hassan, I.A., Abdel-Barry, J.A., Mohammeda, S.T., 2000. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 71, 325–330.
- Agarwal, U.P., Ralph, S.A., Reiner, R.S., Baez, C., 2016. Probing crystallinity of never-dried wood cellulose with Raman spectroscopy. *Cellulose* 23, 125–144.
- Akinyele, B.J., Oloruntoba, O.S., 2013. Comparative studies on *Citrullus vulgaris*, *Citrullus colocynthis* and *Cucumeropsis mannii* for ogiri production. *Br. Microb. Res. J.* 3, 1–18.
- Alves, A.P.P., de Oliveira, L.P., Castro, A.A., Neumann, R., de Oliveira, L.F., Edwards, H.G., Sant'Ana, A.C., 2016. The structure of different cellulosic fibres characterized by Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 86, 324–330.
- Azerado, H.M.C., Mattoso, L.H.C., Avena-Bustillos, R.J., Filho, G.C., Munford, M.L., Wood, D., McHugh, T.H., 2010. Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *J. Food Sci.* 75, N1–N7.
- Benaoun, F., Delattre, C., Boual, Z., Ursu, A.V., Vial, C., Gardarin, C., Wadouachi, A., Le Cerf, D., Varacavoudin, T., El-Hadj, M.D.O., Pierre, G., Michaud, P., 2017. Structural characterization and rheological behavior of a heteroxylan extracted from *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) seeds. *Carbohydr. Polym.* 175, 96–104.
- da Silva Filho, E.C., de Melo, J.C., Airolidi, C., 2006. Preparation of ethylenediamine-anchored cellulose and determination of thermochemical data for the interaction between cations and basic centers at the solid/liquid interface. *Carbohydr. Res.* 341, 2842–2850.
- Dane, F., Liu, J., Zhang, C., 2007. Phylogeography of the bitter apple, *Citrullus colocynthis*. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54, 327–336.

- de Araújo Júnior, A.M., Braido, G., Saska, S., Barud, H.S., Franchi, L.P., Assunção, R.M., Scarel-Caminaga, R.M., Ticiano, S.O., Capote, T.S.O., Messaddeq, Y., Ribeiro, S.J., 2016. Regenerated cellulose scaffolds: preparation, characterization and toxicological evaluation. *Carbohydr. Polym.* 136, 892–898.
- de Rodriguez, N.L.G., Thielemans, W., Dufresne, A., 2006. Sisal cellulose whiskers reinforced polyvinyl acetate nanocomposites. *Cellulose* 13, 261–270.
- Dehnad, D., Emam-Djomeh, Z., Mirzaei, H., Jafari, S.M., Dadashi, S., 2014a. Optimization of physical and mechanical properties for chitosan–nanocellulose biocomposites. *Carbohydr. Polym.* 105, 222–228.
- Dehnad, D., Mirzaei, H., Emam-Djomeh, Z., Jafari, S.M., Dadashi, S., 2014b. Thermal and antimicrobial properties of chitosan–nanocellulose films for extending shelf life of ground meat. *Carbohydr. Polym.* 109, 148–154.
- Eidi, S., Azadi, H.G., Rahbar, N., Mehmannaavaz, H.R., 2015. Evaluation of antifungal activity of hydroalcoholic extracts of *Citrullus colocynthis* fruit. *J. Herb. Med.* 5, 36–40.
- Elsheikh, Y.A., 2013. Preparation of *Citrullus colocynthis* biodiesel via dual-step catalyzed process using functionalized imidazolium and pyrazolium ionic liquids for esterification step. *Ind. Crops Prod.* 49, 822–829.
- Granja, P.L., Pouysegue, L., Petraud, M., De Jeso, B., Baquely, C., Barbosa, M.A., 2001. Cellulose phosphates as biomaterials. I. Synthesis and characterization of highly phosphorylated cellulose gels. *J. Appl. Polym. Sci.* 82, 3341–3353.
- Guo, S., Mao, W., Han, Y., Zhang, X., Yang, C., Chen, Y., Chen, Y., Xu, J., Li, H., Qi, X., Xu, J., 2010. Structural characteristics and antioxidant activities of the extracellular polysaccharides produced by marine bacterium *Edwardsiella tarda*. *Bioresour. Technol.* 101, 4729–4732.
- Gurudeeban, S., Satyavani, K., Ramanathan, T., 2010. Bitter apple (*Citrullus colocynthis*): an overview of chemical composition and biomedical potentials. *Asian J. Plant Sci.* 9, 394–401.
- Hansson, S., Trouillet, V., Tischer, T., Goldmann, A.S., Carlmark, A., Barner-Kowollik, C., Malmstrom, E., 2013. Grafting efficiency of synthetic polymers onto biomaterials: a comparative study of grafting-from versus grafting-to. *Biomacromolecules* 14, 64–74.
- Hassainia, A., Satha, H., Boufi, S., 2018. Chitin from *Agaricus bisporus*: extraction and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 117, 1334–1342.
- Hebeish, A., Farag, S., Sharaf, S., Rabie, A.M., Shaheen, T.I., 2013. Modulation of the nanostructural characteristics of cellulose nanowhiskers via sulfuric acid concentration. *Egypt. J. Chem.* 56, 271–289.
- Hussain, A.I., Rathore, H.A., Sattar, M.Z., Chatha, S.A., Sarker, S.D., Gilani, A.H., 2014. *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad (bitter apple fruit): a review of its phytochemistry, pharmacology, traditional uses and nutritional potential. *J. Ethnopharmacol.* 155, 54–66.
- Jiang, J., Hu, Y., Tian, Z., Chen, K., Ge, S., Xu, Y., Tian, D., Yang, J., 2016. Development of a rapid method for the quantification of cellulose in tobacco by <sup>13</sup>C CP/MAS NMR. *Carbohydr. Polym.* 135, 121–127.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A., 2005. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chemie Int. Ed.* 44, 3358–3393.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., Dorris, A., 2011. Nanocelluloses: a new family of nature-based materials. *Angew. Chemie Int. Ed.* 50, 5438–5466.
- Kouadri, I., Layachi, A., Makhlof, A., Satha, H., 2018. Optimization of extraction process and characterization of water-soluble polysaccharide (Galactomannan) from Algerian biomass: *Citrullus colocynthis* seeds. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* 23, 362–375.
- Martins, M.A., Forato, L.A., Mattoso, L.H.C., Colnago, L.A., 2006. A solid state 13C high resolution NMR study of raw and chemically treated sisal fibers. *Carbohydr. Polym.* 64, 127–133.
- Marzouk, B., Marzouk, Z., Décor, R., Mhadhebi, L., Fenina, N., Aouni, M., 2010. Antibacterial and antifungal activities of several populations of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. immature fruits and seeds. *J. Med. Vet. Mycol.* 20, 179–184.
- Mehta, A., Srivastva, G., Kachhwaha, S., Sharma, M., Kothari, S.L., 2013. Antimycobacterial activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. against drug sensitive and drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and MOTT clinical isolates. *J. Ethnopharmacol.* 149, 195–200.
- Minjares-Fuentes, R., Medina-Torres, L., González-Laredo, R.F., Rodríguez-González, V.M., Eim, V., Femenia, A., 2017. Influence of water deficit on the main polysaccharides and the rheological properties of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) mucilage. *Ind. Crops Prod.* 109, 644–653.
- Morais, J.P.S., de Freitas Rosa, M., Nascimento, L.D., do Nascimento, D.M., Cassales, A.R., 2013. Extraction and characterization of nanocellulose structures from raw cotton linter. *Carbohydr. Polym.* 91, 229–235.
- Morán, J.I., Alvarez, V.A., Cyras, V.P., Vázquez, A., 2008. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. *Cellulose* 15, 149–159.
- Najafi, S., Sanadgol, N., Nejad, B.S., Beiragi, M.A., Sanadgol, E., 2010. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Plant Res.* 4, 2321–2325.
- Nascimento, J.H.O.D., Luz, R.F., Galvão, F.M., Melo, J.D.D., Oliveira, F.R., Ladhumananandasivam, R., Zille, A., 2015. Extraction and characterization of cellulose nanowhisker obtained from discarded cotton fibers. *Mater. Today* 2, 1–7.
- Nayab, D., Ali, D., Arshad, N., Malik, A., Choudhary, M.I., Ahmed, Z., 2006. Cucurbitacin glucosides from *Citrullus colocynthis*. *Nat. Prod. Res.* 20, 409–413.
- Nehdi, I.A., Sbihi, H., Tan, C.P., Al-Resayes, S.I., 2013. Evaluation and characterisation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad seed oil: comparison with *Helianthus annuus* (sunflower) seed oil. *Food Chem.* 136, 348–353.
- Pinheiro, I.F., Ferreira, F.V., Souza, D.H.S., Gouveia, R.F., Lona, L.M.F., Morales, A.R., Mei, L.H.L., 2017. Mechanical, rheological and degradation properties of PBAT nanocomposites reinforced by functionalized cellulose nanocrystals. *Eur. Polym. J.* 97, 356–365.
- Righi, S., Morfino, A., Galletti, P., Samori, C., Tugnoli, A., Stramigioli, C., 2011. Comparative cradle-to-gate life cycle assessments of cellulose dissolution with 1-butyl-3-methylimidazolium chloride and N-methyl-morpholine-*N*-oxide. *Green Chem.* 13, 367–375.
- Sawaya, W.N., Daghir, N.J., Khalil, J.K., 1986. *Citrullus colocynthis* seeds as a potential source of protein for food and feed. *J. Agric. Food Chem.* 34, 285–288.
- Sousa, K.S., Silva Filho, E.C., Airoidi, C., 2009. Ethylenesulfide as a useful agent for incorporation into the biopolymer chitosan in a solvent-free reaction for use in cation removal. *Carbohydr. Res.* 344, 1716–1723.
- Sturm, S., Stuppner, H., 2000. Analysis of cucurbitacins in medicinal plants by high pressure liquid chromatography–mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* 1, 121–127.
- Supriya, G., Ramachandra, T.V., 2012. Optimal extraction of lipids from microalgae. *Microcyst. Nat. Environ. Pollut. Technol.* 11, 213–218.
- Tai, H.C., Li, G.C., Huang, S.J., Jhu, C.R., Chung, J.H., Wang, B.Y., Hsu, C.S., Brandmair, B., Chung, D.T., Chen, H.M., Chan, J.C.C., 2017. Chemical distinctions between Stradivari's maple and modern tonewood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 27–32.
- Uruakpa, F.O., Aluko, R.E., 2004. Heat-induced gelation of whole egusi (*Coccythsis citrullus* L.) seeds. *Food Chem.* 87, 349–354.
- Vestena, M., Gross, I.P., Muller, C.M.O., Pires, A.T.N., 2016. Isolation of whiskers from natural sources and their dispersed in a non-aqueous medium. *Polimeros* 26, 327–335.
- Wikberg, H., Maunu, S.L., 2004. Characterisation of thermally modified hard-and soft-woods by 13C CP/MAS NMR. *Carbohydr. Polym.* 58, 461–466.
- Zhang, L., Cheng, Z., Zhao, Q., Wang, M., 2017. Green and efficient PEG-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from superfine ground lotus plumule to investigate their antioxidant activities. *Ind. Crops Prod.* 109, 320–326.
- Zhang, L., Zhang, Q., Zheng, Y., He, Z., Guan, P., He, X., Hui, L., Dai, Y., 2018. Study of Schiff base formation between dialdehyde cellulose and proteins, and its application for the deproteinization of crude polysaccharide extracts. *Ind. Crops Prod.* 112, 532–540.
- Zheng, Y., Monty, J., Linhardt, R.J., 2015. Polysaccharide-based nanocomposites and their applications. *Carbohydr. Res.* 405, 23–32.



## Optimization of extraction process and characterization of water-soluble polysaccharide (Galactomannan) from Algerian biomass; *Citrullus colocynthis* seeds

Imane Kouadri<sup>a</sup>, Abdelheq Layachi<sup>a,b</sup>, Azzedine Makhoul<sup>a,c</sup>, and Hamid Satha<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire des Silicates, Polymères et Nanocomposites, Université du 8 Mai 1945, Guelma, Algeria; <sup>b</sup>Institut des Sciences et Technique Appliquée, UPMC 1, Algeria; <sup>c</sup>Université Abbes Laghrour Khenchela, Khenchela, Algeria

### ABSTRACT

In this work, the optimization of extraction of polysaccharides from *Citrullus colocynthis* curd polysaccharides (CCPs) is investigated by using the analysis of variance. For this aim, a chemical extraction method has been developed in order to be able to isolate CCPs at high level of purity. The extraction was performed by using boiling water at different extraction times (30, 60 and 120 min), extraction temperatures (50, 75 and 100°C), and a material ratio (30, 60 and 100 g/ml), for maximum polysaccharide extraction. The 3-D response surface plot and the contour plot derived from the mathematical models are used to determine the optimal conditions. The optimum extraction conditions are as follows: extraction temperature 100°C, extraction time 120 min and the ratio of water 30 ml/g. Under these conditions, the experimental final mass is 210.6 mg which is very close to the predicted value (209.46 mg) with a regression coefficient of 94.01%. In addition, the existence of the polysaccharide has been confirmed by the characterization of the galactomannan obtained from *C. colocynthis* obtained by Fourier transform infrared-attenuated total reflection, IR-Raman spectroscopy and X-ray diffraction.

### ARTICLE HISTORY

Received 4 March 2018  
Accepted 18 March 2018

### KEYWORDS

ANOVA; *Citrullus colocynthis*; extraction; galactomannan; optimization; polysaccharide

## Introduction

In recent years, researches focus on polysaccharides from fruits and medicinal plants, in view of the significant biomedical role played by such isolated polysaccharides with their antioxidant,<sup>[1–3]</sup> immunostimulatory and antitumor effects.<sup>[4–6]</sup> *Citrullus colocynthis* is a medicinal plant which largest family is the Cucurbitaceae. This latter includes about 118 genera with 825 species. Plants of this family are mostly known as climbing herbaceous annual plant, regarded as being one of the most genetically diverse groups of food plants and predominantly distributed over the world as well as around the tropics, mostly as edible fruits.<sup>[7–9]</sup> The fruits of *C. colocynthis*, commonly named bitter apple, ground melon, Handhal, and Dellaa El-Wad were gathered as deadly poison. The ripe fruit of *C. colocynthis* is nearly globular, yellow in color and characterized by a thin but hard rind. The fruits have a soft, white spongy pulp, filled with numerous ovate compressed seeds, which are edible whereas ground provides a rough bread for the Bedouins living in desert.<sup>[10,11]</sup> *C. colocynthis* native of tropical Asia and Africa is now widely distributed in the Saharo-Arabian phylogeographic region of Africa, in the Mediterranean region, eastward through Iran to India and other parts of tropical Asia.<sup>[7–11]</sup> In Algeria, the fruits of *C. colocynthis* have been used for centuries in traditional medicine as a remedy against diabetes as well as cancer, and to treat the hemorrhoids. Also, they are used as a component of remedies against breast inflammation, anemia, fever, ulcers, bronchitis, and several

**CONTACT** Abdelheq Layachi  [layachi.abdelheq@umc.edu.dz](mailto:layachi.abdelheq@umc.edu.dz); [abdelhak2416@live.fr](mailto:abdelhak2416@live.fr)  Laboratoire des Silicates, Polymères et Nanocomposites, Université du 8 Mai 1945, Guelma 24000, Algeria.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at [www.tandfonline.com/gpac](http://www.tandfonline.com/gpac).

other diseases.<sup>[12,13]</sup> Galactomannans are neutral polysaccharides commonly extracted from the endosperm of numerous seed plants due to its specific physicochemical properties such as water solubility, inexpensive, eco-friendly and absence of toxicity. Then, it is used in various industries including reserve of carbohydrates.<sup>[14–17]</sup> Galactomannans are reserve polysaccharides with the typical structure being a  $\beta$ -(1–4)-D-mannan backbone with single D-galactose branches linked  $\alpha$ -(1–6). Their mannose/galactose (M/G) ratios differ according to the natural species.<sup>[18–21]</sup> This work aims at extracting this polysaccharide from *C. colocynthis* seeds given that it is one of the main sources of galactomannans. In extraction processes of *C. colocynthis* curd polysaccharides (CCPs), multiple independent factors might interact and affect the final mass. The classical method of studying single factor at a time fails to consider the combined effects of several factors involved. However, response surface methodology (RSM) is an optimization method that can determine all the factors as well as the possible interactions among different independent variables, so that a set of experimental conditions can be optimized.<sup>[22–24]</sup>

In this essay, as many factors can influence the extraction yield, RSM is applied to fit and exploit a mathematical model representing the relationship between the responses (the final mass) and variables (i.e., temperature, time, and the ratio of water).<sup>[25,26]</sup>

This essay aims at optimizing the process for extraction of water-soluble polysaccharide (galactomannan) from the *C. colocynthis* (Cucurbitaceae), using RSM, applying a three-level and three-variants to study the effects of extraction time, extraction temperature and the ratio of water on the final mass of CCPs. Identification of water-soluble polysaccharides is carried out by applying a convergent set of characterization techniques of natural water-soluble polymers, such as attenuated total reflection-Fourier transform infrared (ATR-FTIR), IR-Raman spectroscopy and X-ray diffraction (XRD).

## Materials and methods

### Samples

*Citrullus colocynthis* fruits (Cc) were collected from the south of Algeria, exactly from a region called Ouargla. The seeds of Cc were manually separated from the fruits, dried at room temperature during several days, grinded and stored at room temperature (Figure 1).

### Extraction procedure

The first step is devoted to the extraction of the powder of Cc seeds (5 g) with petroleum ether for 5 h and dried in the open air. Then, the residue was re-extracted with 80% ethanol for 5 h to remove some



Figure 1. Representation of *Citrullus colocynthis* with its fruits and seeds.

colored materials, oligosaccharides and some other low molecular weight compounds.<sup>[27–29]</sup> The resulting residue was dried again and used for next extraction.<sup>[30,31]</sup>

The second step concerns the dried sample that was extracted with deionized water for three times in water-bath for certain different durations, different temperatures, and different ratio of water: (30, 60, and 120 min), (50, 75, and 100°C) and (30, 60, and 100 ml/g), respectively. Then, the mixture was centrifuged (10000 rpm, 20 min).<sup>[32,33]</sup>

The supernatant fluids were concentrated to 1/3 volume using a rotary evaporator at 60°C.<sup>[34,35]</sup> The extract was precipitated by the addition of 3 volumes of Isopropanol at 4°C for overnight and the precipitates were collected by centrifugation (10000 rpm, 20 min), then, washed with acetone 3 times and finally lyophilized. Crude water-soluble polysaccharides were obtained.

## Experimental design and statistical analysis

Response Surface Methodology was used to estimate the effect of extraction parameters (extraction times  $X_1$ , extraction temperature  $X_2$ , and the ratio of water  $X_3$ ) on the final mass of CCPs as shown in Table 1.

The complete quadratic equation used is as follows:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{ij}^k b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

Where  $b_0$ ,  $b_i$ , and  $b_{ij}$ , represent the regression coefficients for intercept, linear, quadratic and interaction terms, respectively;  $X_i$  and  $X_j$  represent the coded independent variables; and  $Y$  represents the predicted response.

The 3D response surfaces  $Y = f(X_1, X_2)$  were constructed by using the Design-Expert-8 statistics software. The analysis of variance (ANOVA) was generated and the effect as well as regression coefficients of individual linear, quadratic, and interaction terms were determined.

The values of  $R^2$ , adjusted  $R^2$  of models were evaluated to check the model adequacies. Also, an additional confirmation experiments were subsequently conducted to verify the validity of the statistical experimental design.  $P$ -values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.<sup>[36,37,38]</sup>

## Results and discussion

### Characterization of *Citrullus colocynthis* polysaccharides

The polysaccharide prepared under optimum conditions is characterized by ATR-FTIR, IR-Raman and X-ray diffraction (XRD) techniques.

### ATR-FTIR analysis

Fourier transform infrared spectra were obtained at room temperature in the attenuated total reflection (ATR) mode using a Thermo Scientific Nicolet iS10 (Smart iTR) spectrometer equipped with a diamond-based ATR accessory. All the ATR-FTIR spectra were obtained in the range of 4000 and 500  $\text{cm}^{-1}$  with a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . Each spectrum was collected from an average of 64 scans.

**Table 1.** Independent variables and their levels used in the response surface design.

| Independent variables       | Symbol | Factor level |    |     |
|-----------------------------|--------|--------------|----|-----|
|                             |        | -1           | 0  | +1  |
| Extraction time (min)       | $X_1$  | 30           | 60 | 120 |
| Extraction temperature (°C) | $X_2$  | 50           | 75 | 100 |
| Ratio of water(ml/g)        | $X_3$  | 30           | 60 | 100 |



The ATR-FTIR spectrum of CCPs and the commercial galactomannan are shown in Figure 2(a) and (b). Attenuated total reflection-Fourier transform infrared analysis has been used to get the firsthand knowledge of biopolymers from *C. colocynthis*. Galactomannan is a biopolymer and characterized by using FTIR previously in literature Figure 2(b). The obtained spectral profile and intensities of the bands for the extracted material from *C. colocynthis* are shown in Figure 2(a).

Two characteristic peaks of polysaccharides were observed at approximately 3365, then, 2926  $\text{cm}^{-1}$  is a carbohydrate ring characteristic. Those two characteristic peaks were assigned to the hydroxyl stretching vibration (O-H)<sup>[40,41]</sup> and asymmetric C-H functional groups, respectively.<sup>[42-45]</sup> The peak 1644  $\text{cm}^{-1}$  represented the carboxylate (COO<sup>-</sup>) stretching band.<sup>[46,47]</sup> The band at 1382  $\text{cm}^{-1}$  is attributed to the bending group of symmetric-CH<sub>3</sub>.<sup>[48,49]</sup> The band around 1237  $\text{cm}^{-1}$  was assigned to stretching C-O in an acetyl group<sup>[50-52]</sup> while peak at about 1020  $\text{cm}^{-1}$  suggested the presence of C-O bonds from alcohol group that is a characteristic of carbohydrates polymers.<sup>[53,54]</sup> The characteristic of absorption at 874 and 814  $\text{cm}^{-1}$ , is assigned to  $\alpha$ -D-galactopyranose units and  $\beta$ -D-mannopyranose units, respectively.<sup>[14-16]</sup> Finally, the spectrum FTIR-ATR confirms that the extracted material from *C. colocynthis* is a galactomannan.

### IR-Raman analysis

Infra-red Raman spectra were obtained by using an Infra-red Raman spectrometer (Ramspec 1064 from Bayspec/Photon Lines). The laser ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ) incident beam was focused in a spot diameter of about 1 mm on the sample. The incident power was adjusted between 10 mW and 450 mW to avoid degradation of the samples. Typical exposure time was 30 s; each spectrum was an average of 4 scans. The measurements were collected over the wave number range from 0 to 3000  $\text{cm}^{-1}$  with spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$ . The IR-Raman spectrum of CCPs and the commercial galactomannan are shown in Figure 3(a) and (b).

As depicted in Figure 3, the Raman spectra of both samples obtained are similar. The characteristic IR-Raman signal was present at 1092  $\text{cm}^{-1}$ , that are attributed to C-H and C-H<sub>2</sub> stretching and asymmetric stretching vibration of the C-O-C glycosidic linkage.<sup>[55,56]</sup> However, the peaks at 1465  $\text{cm}^{-1}$  indicate H-C-H bending; the characteristic peak at 1376  $\text{cm}^{-1}$  represents H-O-C bending.<sup>[57,58]</sup> According to the results of IR-Raman, there is no difference between the spectra of commercial galactomannan and the extracted material from *C. colocynthis*. Finally, the spectrum of the extracted material from Cc is indicative of commercial galactomannan.

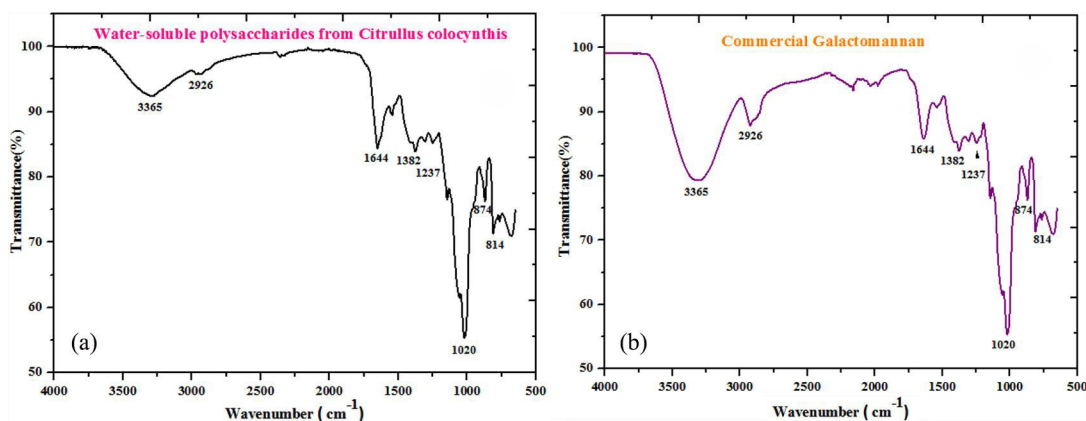
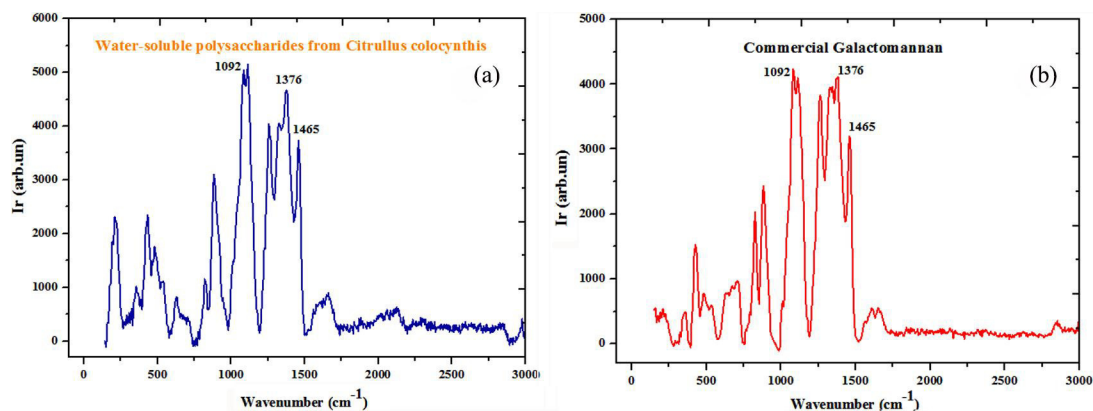


Figure 2. ATR-FTIR spectrum of (a) the extracted material from *Citrullus colocynthis* and (b) commercial galactomannan. Note: ATR-FTIR, Attenuated Total Reflection-Fourier transform infrared.



**Figure 3.** IR-Raman spectrum of (a) the extracted material from *Citrullus colocynthis* and (b) commercial galactomannan.

### XDR analysis

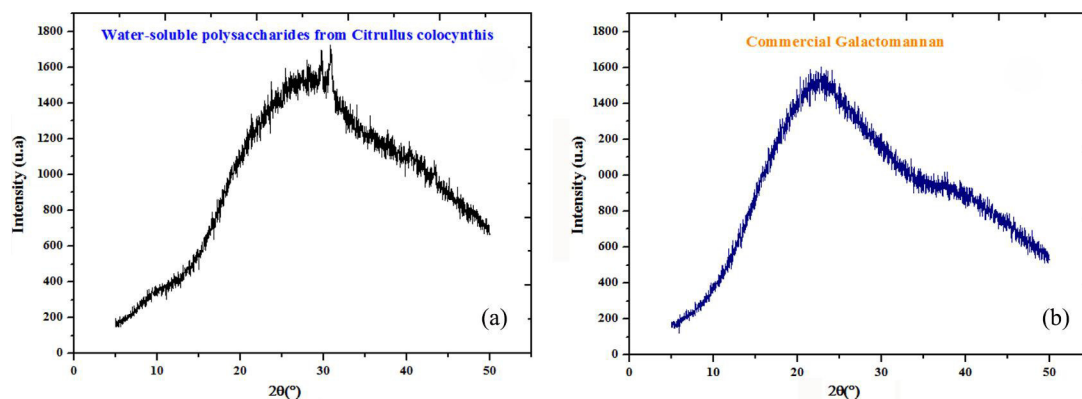
X-ray diffraction was performed on a Bruker D8-Advance diffractometer with a copper anti cathode operated at 40 kV and 40 mA. The scattered intensities were measured in the  $2\theta$  angular domain from  $5^\circ$  to  $50^\circ$ , for a total measurement time of 58 min with variable slits of 4 mm. The detector used was a linear detector (LYNXEYE XE) with an angular aperture of  $3^\circ$ . Diffraction was performed on power samples spread evenly on a neutral quartz glass sample holder.

The X-ray diffractograms of the polysaccharide obtained from *C. colocynthis* seeds and the commercial galactomannan are shown in Figure 4(a) and (b).

The XRD analysis of pure commercial galactomannan did not show the presence of crystalline region, as already confirmed in literature by Albuquerque et al.<sup>[14,16,18,19]</sup> X-ray diffraction confirmed the amorphous nature of extract of *C. colocynthis*, but it depicted a number of small peaks indicating the possible presence of impurities in this biopolymer. From Figure 4, one can see a strong similarity between the pure commercial galactomannan and the final extract of *C. colocynthis*, indicating that both samples in the system are in amorphous form. These results are in agreement with other reports of galactomannan studies.<sup>[59–62]</sup>

### Single factor designs for CCPs extraction

General procedures of CCPs extraction were described above. Different extraction times (30, 60, and 120 min), extraction temperatures (50, 75, and  $100^\circ\text{C}$ ), and the ratio of water (30, 60, and 100 ml/g) were investigated by single factor experiments for CCPs extraction rate optimization.



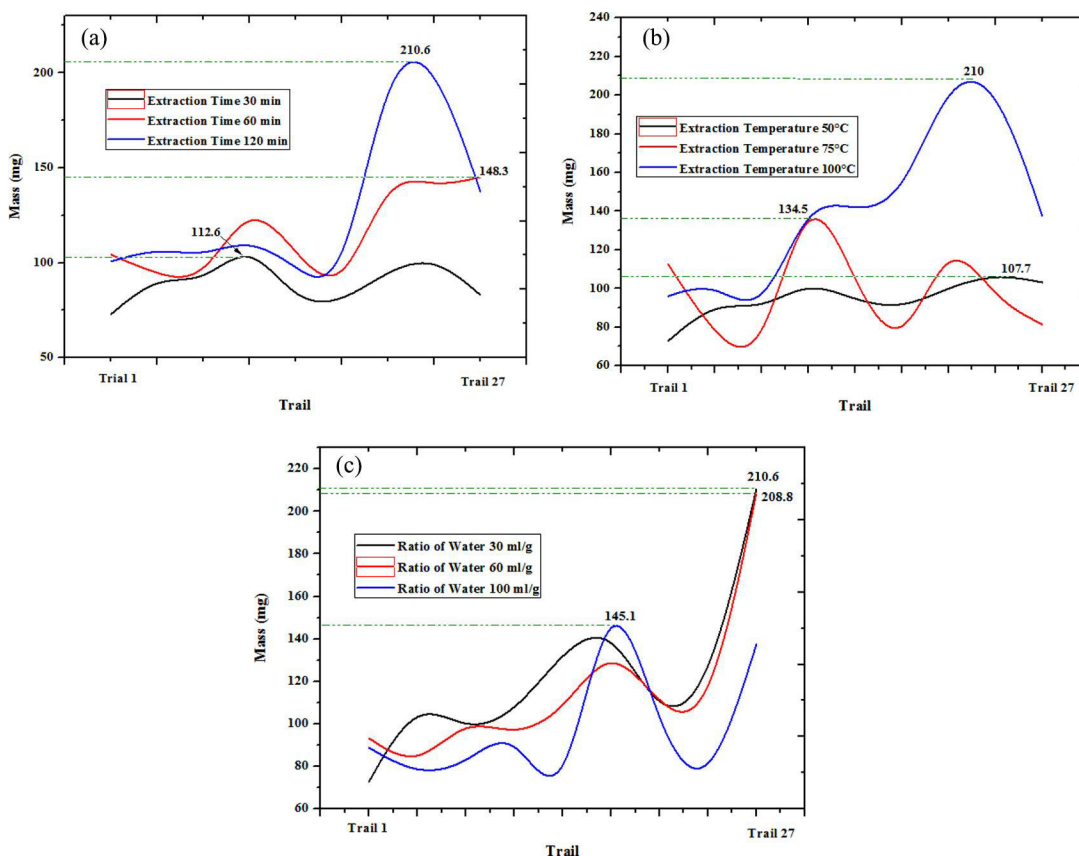
**Figure 4.** X-ray diffraction of (a) polysaccharide obtained from *Citrullus colocynthis* seeds and (b) the commercial galactomannan.

### Effect of different times on the final mass of CCPs

Extraction time is one of the important variables which affect the efficiency of polysaccharides.<sup>[63–65]</sup> In this work, extraction time was set at 30, 60, and 120 min to investigate its influence on the final mass of CCPs. As shown in Figure 5(a), the mass increased significantly when the time ranged from 30 to 120 min. The maximum mass 210.6 mg was achieved at the time of 120 min. When an extraction time was higher than 120 min, the mass decreased with the further increase of time. These results suggest that using a higher extraction time may lead to degradation, aggregation, and hydrolysis of the CCPs.<sup>[64–67]</sup> Therefore, 120 min was selected as the optimum extraction time.

### Effect of different temperature on the final mass of CCPs

Temperature is an efficiency factor that should influence the final mass of polysaccharides.<sup>[37,70]</sup> Effect of different temperatures (50, 75, and 100°C) on the extraction efficiency of CCPs was investigated, and other experimental variables were set as follows. As shown in Figure 5(b), the mass significantly increased along with the increase of temperature from 50 to 100°C, and then the mass were almost unchanged. The extraction rate increased up to maximum level of 210 mg at 100°C, and then decreased with the further increase of temperature. The good effect of extraction temperature could be explained by the enhanced solubility of polysaccharides in the extracting solvent, the higher diffusion coefficient of the extracted molecules and the improved mass transfer at higher temperature. This tendency is in accordance with reports of other authors in extracting polysaccharides.<sup>[37,71,72]</sup>



**Figure 5.** Effects of different (a) times, (b) temperatures, (c) ratios of water, on the final mass of CCPs. Note: CCPs, *Citrullus colocynthis* curd polysaccharides.

### Effect of different ratio of water on the final mass of CCPs

The ratio of water to the raw material is also one of the important variables which influence the extraction of water-soluble polysaccharide from *C. colocynthis*. To find the optimum range of water ratio for the efficient extraction of polysaccharide, extraction process was carried out at different water ratios 30, 60, and 100 ml/g. In this study, the effect of different ratio of water, to raw material on the final mass of water-soluble polysaccharides from *C. colocynthis*, was shown in Figure 5(c). The mass of CCPs was decreased continuously with increasing ratios from 30 to 100 (ml/g). The crude water-soluble polysaccharide extracted from *C. colocynthis* varied from 210.6 to 145.1 ml/g, with a variation of extraction time and extraction temperature. It is indicated that the water increase to the raw material ratio will decrease the concentration of water-soluble polysaccharide of *C. colocynthis*.<sup>[73,74]</sup> Thus, 30 (ml/g) was chosen as the best ratio.

### Model fitting and statistical analysis

RSM is more efficient than the traditional single parameter optimization because it reduces the number of experiments and saves the time. There were a total of 27 runs for optimizing the three individual variables ( $X_1$ : extraction time,  $X_2$ : extraction temperature and  $X_3$ : ratio of water) in the current Complete Factorial Design (CFD), as shown in Table 2.

The complete quadratic equation was used to correlate the independent parameters with the yield of CCPs. The matched model for mass ( $Y$ ) to predict the relationships between the independent variables and the dependent variable can be expressed by:

$$\begin{aligned}
 Y = & -142.08 \times 2.16X_1 + 7.73X_2 + 0.83X_3 - 0.074X_1 \times X_2 + 0.019X_1 \times \\
 & X_3 - 0.06X_2 \times X_3 + 3.13 \times 10^{-3}X_1^2 - 0.062X_2^2 + 0.013X_3^2 - 1.95 \times 10^{-4}X_1 \times X_2 \times \\
 & X_3 - 1.68 \times 10^{-4}X_1^2 \times X_2 + 3.76 \times 10^{-5}X_1^2 \times X_3 + 8.53 \times 10^{-4}X_1 \times X_2^2 - 1.04 \times \\
 & 10^{-4}X_1 \times X_3^2 + 5.45 \times 10^{-4}X_2^2 \times X_3 - 1.11 \times 10^{-4}X_2 \times X_3^2
 \end{aligned} \quad (2)$$

**Table 2.** CCPs experimental data with the independent variables.

| Trial | $X_1$ (min) | $X_2$ (°C) | $X_3$ (ml/g) | The final mass (mg) |           |
|-------|-------------|------------|--------------|---------------------|-----------|
|       |             |            |              | Experimental        | Predicted |
| 1     | 30          | 50         | 30           | 72.9                | 87.07     |
| 2     | 30          | 50         | 60           | 93.3                | 80.91     |
| 3     | 30          | 50         | 100          | 88.8                | 86.05     |
| 4     | 30          | 75         | 30           | 112.6               | 104.07    |
| 5     | 30          | 75         | 60           | 78.5                | 90.23     |
| 6     | 30          | 75         | 100          | 78.7                | 77.38     |
| 7     | 30          | 100        | 30           | 96.1                | 95.88     |
| 8     | 30          | 100        | 60           | 103.7               | 94.82     |
| 9     | 30          | 100        | 100          | 83.1                | 91.23     |
| 10    | 60          | 50         | 30           | 104.3               | 98.52     |
| 11    | 60          | 50         | 60           | 93.8                | 95.07     |
| 12    | 60          | 50         | 100          | 89.2                | 95.12     |
| 13    | 60          | 75         | 30           | 134.5               | 124.04    |
| 14    | 60          | 75         | 60           | 105.1               | 108.54    |
| 15    | 60          | 75         | 100          | 80.6                | 84.75     |
| 16    | 60          | 100        | 30           | 148.3               | 156.36    |
| 17    | 60          | 100        | 60           | 139.7               | 149.26    |
| 18    | 60          | 100        | 100          | 145.1               | 128.90    |
| 19    | 120         | 50         | 30           | 100.7               | 99.00     |
| 20    | 120         | 50         | 60           | 107.7               | 107.06    |
| 21    | 120         | 50         | 100          | 103.2               | 105.05    |
| 22    | 120         | 75         | 30           | 113.3               | 118.85    |
| 23    | 120         | 75         | 60           | 97.8                | 106.10    |
| 24    | 120         | 75         | 100          | 81.5                | 68.58     |
| 25    | 120         | 100        | 30           | 210.6               | 209.46    |
| 26    | 120         | 100        | 60           | 208.8               | 196.36    |
| 27    | 120         | 100        | 100          | 137.5               | 150.59    |

CCPs, *Citrullus colocynthis* curd polysaccharides.

**Table 3.** ANOVA result for experimental data.

| Source                              | Sum of squares | Df | Mean square | F-Value | p-Value |             |
|-------------------------------------|----------------|----|-------------|---------|---------|-------------|
| Model                               | 30580,5        | 16 | 1911,28     | 9,82    | 0,0004  | significant |
| $X_1$                               | 186,73         | 1  | 186,73      | 0,96    | 0,3505  |             |
| $X_2$                               | 3198,86        | 1  | 3198,86     | 16,43   | 0,0023  |             |
| $X_3$                               | 1440,24        | 1  | 1440,24     | 7,4     | 0,0216  |             |
| $X_2 * X_1$                         | 3769,31        | 1  | 3769,31     | 19,36   | 0,0013  |             |
| $X_1 * X_3$                         | 416,88         | 1  | 416,88      | 2,14    | 0,1741  |             |
| $X_2 * X_3$                         | 865,5          | 1  | 865,5       | 4,44    | 0,0612  |             |
| $X_1^2$                             | 926,52         | 1  | 926,52      | 4,76    | 0,0541  |             |
| $X_2^2$                             | 3195,67        | 1  | 3195,67     | 16,41   | 0,0023  |             |
| $X_3^2$                             | 60,01          | 1  | 60,01       | 0,31    | 0,591   |             |
| $X_1 * X_2 * X_3$                   | 489,92         | 1  | 489,92      | 2,52    | 0,1438  |             |
| $X_1^2 * X_2$                       | 221,16         | 1  | 221,16      | 1,14    | 0,3116  |             |
| $X_1^2 * X_3$                       | 21,83          | 1  | 21,83       | 0,11    | 0,7446  |             |
| $X_1 * X_2^2$                       | 2386,85        | 1  | 2386,85     | 12,26   | 0,0057  |             |
| $X_2 * X_3^2$                       | 129,11         | 1  | 129,11      | 0,66    | 0,4344  |             |
| $X_2^2 * X_3$                       | 572,94         | 1  | 572,94      | 2,94    | 0,117   |             |
| $X_2 * X_3^2$                       | 44,08          | 1  | 44,08       | 0,23    | 0,6444  |             |
| Residual                            | 1947,18        | 10 | 194,72      |         |         |             |
| Cor Total                           | 32527,69       | 26 |             |         |         |             |
| $R^2 = 94.01\%$ $Adj-R^2 = 84.44\%$ |                |    |             |         |         |             |

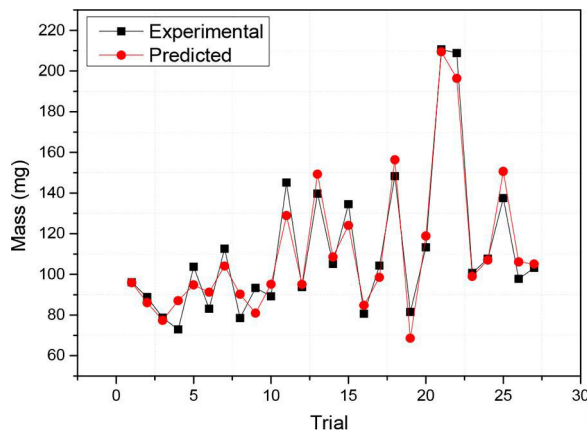
ANOVA, analysis of variance.

The ANOVA for the experimental results of the CFD is represented in Table 3.

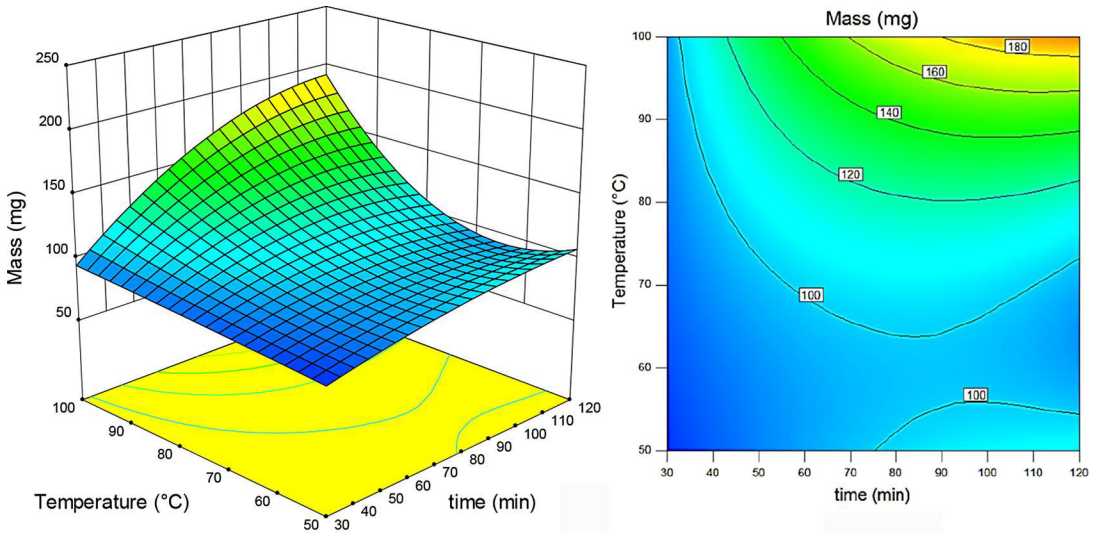
The data revealed that the proposed regression model for the mass of polysaccharide was adequate with satisfactory  $R^2$  value (a measure of the degree of fit). The  $R^2$  and adj- $R^2$  values for yield were 0.9401 and 0.8444, respectively, which confirmed a better degree of correlation between the experimental and the theoretical values predicted by the polynomial model.<sup>[38,75,76]</sup>

The significance of regression coefficient was evaluated for fitness and adequacy using the p-value in Table 3. The quadratic term coefficient ( $X_2^2$ ), linear coefficients ( $X_2$ ,  $X_3$ ) and the interaction terms, ( $X_2 \times X_1$ ) and ( $X_1 \times X_2^2$ ) were significant ( $p < 0.05$ ) to the yield of CCPs. Therefore, the Model F-value of 9.82 implied that the model was significant.<sup>[38,76]</sup>

Figure 6 shows the experimental and predicted results of the final mass of water-soluble polysaccharides from *C. colocythis*. The deviation between predicted and experimental data doesn't exceed 6%.



**Figure 6.** Comparison of predicted and experimental results of the final mass of water-soluble polysaccharides from *Citrullus colocythis*.

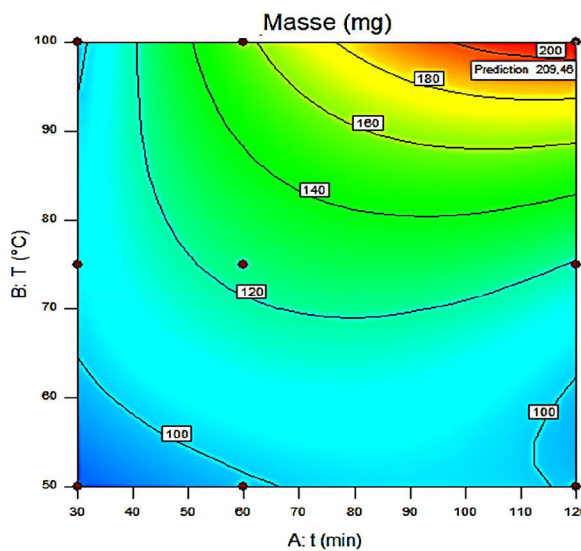


**Figure 7.** Response surface (3-D) and contour plots showing the effects of extraction time and extraction temperature on the CCPs final mass. Note: CCPs, *Citrullus colocynthis* curd polysaccharides.

**Effect of extraction parameters on surface response factors**

Response surfaces were obtained by using Design-Expert (version 8) software to evaluate the effects of variables and their interactions on the mass of CCPs. 3-D response surface plot and 2-D contour plot, as shown in Figure 7, were very helpful to estimate interaction effects of the parameters on the responses. These plots represent effects of three variables on the response at a time.

Plots in Figure 7, show that the extraction mass of CCPs increased in accordance with the increase of extraction temperature, extraction time and the ratio of water from 50 to 100°C, 30 to 120 min and from 30 to 100 ml/g, respectively.



**Figure 8.** Contour plot of optimal extraction condition for CCPs. Note: CCPs, *Citrullus colocynthis* curd polysaccharides.

**Table 4.** Response optimization for CCPs parameters.

| Extraction time (min) | Optimum conditions |                       | The final mass (mg) |              |
|-----------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|--------------|
|                       | Temperature (°C)   | Ratio of water (ml/g) | Predicted           | Desirability |
| 120                   | 100                | 30                    | 209,46              | 0,992        |
| 119,591               | 100                | 30,001                | 209,405             | 0,991        |
| 119,294               | 100                | 30,096                | 209,349             | 0,991        |
| 120                   | 100                | 30,855                | 209,339             | 0,991        |
| 118,931               | 100                | 30                    | 209,306             | 0,991        |
| 120                   | 100                | 31,249                | 209,278             | 0,99         |
| 120                   | 100                | 31,541                | 209,231             | 0,99         |
| 118,991               | 100                | 30,947                | 209,178             | 0,99         |
| 120                   | 100                | 32,068                | 209,141             | 0,989        |
| 120                   | 100                | 32,337                | 209,094             | 0,989        |

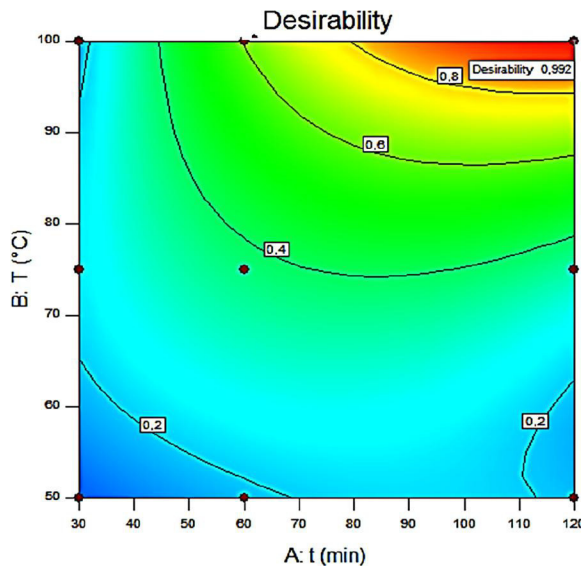
CCPs, *Citrullus colocynthis* curd polysaccharides.

To investigate influences of extraction parameters on the CCPs, response surface are drawn in Figure 7 which depicts the influence of temperature ( $T$ ) and time ( $t$ ) on CCPs. The best extraction mass of CCPs is achieved with the combination of the highest extraction time and the highest extraction temperature, as reported by earlier investigators.<sup>[36,37,38]</sup>

### Optimization for CCPs extraction

It was concluded that optimal extraction condition of polysaccharides from *C. colocynthis* was extraction temperature 100°C, extraction time 120 min and a ratio of water 30 ml/g. The model predicted a maximum response of 209.4 mg with a desirability value of 0.992 (which indicated that the regression model was adequate and accurate for the extraction of CCPs, see Figure 8. Table 4 shows the RSM optimization results (polysaccharides from CCPs in order to decrease desirability level.

The contour plot of desirability in Figure 9 has been plotted between two most significant parameters ( $T$  and  $t$ ). The multiple response characteristic found maximum where  $T$  ranges from 95–100°C with  $t$  from 110–120 min for CCPs. These enclosed regions indicate the optimum zone for response where CCPs will get maximized.



**Figure 9.** Contour plot of desirability for CCPs. Note: CCPs, *Citrullus colocynthis* curd polysaccharides.

## Conclusions

In the present essay, the final extract of *C. colocynthis* has a strong similarity with the pure commercial galactomannan with also amorphous nature. The RSM was used to determine the optimum process parameters that gave a high extraction mass. The coefficient of determination ( $R^2$ ) for the model equation was 0.9401 and the probability value ( $p$ -value) 0.0004, demonstrated a very high significance for the regression models predicting the responses. By analyzing the complete quadratic equation model, a maximum mass 209.46 mg was obtained under the following conditions: extraction temperature of 100°C, extraction time of 120 min and ratio of water 30 ml/g. Under this condition, the main experimental value extraction mass 210.6 mg corresponded well with the predicted value.

## References

- [1] Guo, S., W. Mao, Y. Han, X. Zhang, C. Yang, Y. Chen, Y. Chen, J. Xu, H. Li, X. Qi, and J. Xu. 2010. Structural characteristics and antioxidant activities of the extracellular polysaccharides produced by marine bacterium *Edwardsiellatarda*. *Bioresour. Technol.* 101:4729–4732.
- [2] Wang, J., S. Hu, S. Nie, Q. Yu, and M. Xie. 2016. Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxid. Med. Cell. Long.* 2016:1–13.
- [3] Chen, Y., W. Mao, H. Tao, W. Zhu, X. Qi, Y. Chen, H. Li, C. Zhao, Y. Yang, Y. Hou, C. Wang, and N. Li. 2011. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. *Bioresour. Technol.* 102:8179–8184.
- [4] Sun, Y., and J. Liu. 2009. Purification, structure and immunobiological activity of a water-soluble polysaccharide from the fruiting body of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresour. Technol.* 100:983–986.
- [5] Han, X. Q., X. M. Wu, X. Y. Chai, D. Chen, H. Dai, H. L. Dong, Z. Z. Ma, X. M. Gao, and P. F. Tu. 2011. Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Food Res. Int.* 44:489–493.
- [6] Silva, S., S. Martins, A. Karmali, and E. Rosa. 2012. Production, purification and characterisation of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumour activity. *J. Sci. Food Agric.* 92:1826–1832.
- [7] Mehta, A., G. Srivastva, S. Kachhwaha, M. Sharma, and S. L. Kothari. 2013. Antimycobacterial activity of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Against drug sensitive and drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and MOTT clinical isolates. *J. Ethnopharmacol.* 149:195–200.
- [8] Si, Y., F. Dane, A. Rashotte, K. Kang, and N. K. Singh. 2010. Cloning and expression analysis of the *Ccrboh* gene encoding respiratory burst oxidase in *Citrullus colocynthis* and grafting onto *Citrullus lanatus* (watermelon). *J. Exp. Bot.* 61:1635–1642.
- [9] Nimmakayala, P., Y. R. Tomason, J. Jeong, S. K. Ponniah, A. Karunathilake, A. Levi, R. Perumal, and U. K. Reddy. 2010. Genetic reticulation and interrelationships among *Citrullus* species as revealed by joint analysis of shared AFLPs and species-specific SSR alleles. *Plant Genet. Resour.* 8:16–25.
- [10] Dane, F., J. Liu, and C. Zhang. 2007. Phylogeography of the bitter apple, *Citrullus colocynthis*. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 54:327–336.
- [11] Si, Y., C. Zhang, S. Meng, and F. Dane. 2009. Gene expression changes in response to drought stress in *Citrullus colocynthis*. *Plant Cell.* 28:997–1009.
- [12] Bendjeddou, D., K. Lalaoui, and D. Satta. 2003. Immunostimulating activity of the hot water-soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpiniagalanga* and *Citrullus colocynthis*. *J. Ethnopharmacol.* 88:155–160.
- [13] Paris, H. S. 2015. Origin and emergence of the sweet dessert watermelon, *Citrullus lanatus*. *Annal. Bot.* 116:133–148.
- [14] Albuquerque, P. B., W. Barros, G. R. Santos, M. T. Correia, P. A. Mourão, J. A. Teixeira, and M. G. Carneiro-da-Cunha. 2014. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. *Carbohydr. Polym.* 104:127–134.
- [15] Busch, V. M., A. A. Kolender, P. R. Santagapita, and M. P. Buera. 2015. Vinal gum, a galactomannan from *Prosopis ruscifolia* seeds: Physicochemical characterization. *Food. Hydrocolloid.* 51:495–502.
- [16] Chaubey, M., and V. P. Kapoor. 2001. Structure of a galactomannan from the seeds of *Cassia angustifolia* Vahl. *Carbohydr. Res.* 332:439–444.
- [17] Lee, Y., and Y. H. Chang. 2015. Effects of galactomannan addition on rheological, pasting and physical properties of water chestnut starch. *J. Text. Stud.* 46:58–66.
- [18] Pawar, H. A., and K. G. Lalitha. 2014. Isolation, purification and characterization of galactomannans as an excipient from *Sennatoria* seeds. *Int. J. Biol. Macromol.* 65:167–175.
- [19] Albuquerque, P. B., P. A. Soares, A. C. Aragão-Neto, G. S. Albuquerque, L. C. Silva, M. H. Lima-Ribeiro, J. C. S. Neto, L. C. B. Coelho, M. T. S. Correia, J. A. C. Teixeira, and M. G. Carneiro-da-Cunha. 2017. Healing activity



- evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Int. J. Boil. Macromol.* 102:749–757.
- [20] Cunha, P. L., Í. G. Vieira, Â. M. Arriaga, R. C. M. De Paula, and J. P. Feitosa. 2009. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. Seeds as a potential guar gum substitute. *Food Hydrocolloid* 23:880–885.
- [21] Cerqueira, M. A., A. I. Bourbon, A. C. Pinheiro, J. T. Martins, B. W. S. Souza, J. A. Teixeira, and A. A. Vicente. 2011. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Trends Food Sci. Technol.* 22:662–671.
- [22] Cui, W., G. Mazza, B. D. Oomah, and C. G. Biliaderis. 1994. Optimization of an aqueous extraction process for flaxseed gum by response surface methodology. *Food Sci. Technol.* 27:363–369.
- [23] Cacace, J. E., and G. Mazza. 2003. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J. Food Sci.* 68:240–248.
- [24] Wu, Y., S. W. Cui, J. Tang, and X. Gu. 2007a. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited *sterculia* seeds by response surface methodology. *Food Chem.* 105:1599–1605.
- [25] Miao, Y. Z., Q. Lin, Y. Cao, G. H. He, D. R. Qiao, and Y. Cao. 2011. Extraction of water-soluble polysaccharides (WSPS) from Chinese truffle and its application in frozen yogurt. *Carbohydr. Polym.* 86:566–573.
- [26] Karazhiyan, H., S. M. Razavi, and G. O. Phillips. 2011. Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology. *Food Hydrocolloid* 25:915–920.
- [27] Wu, Y., S. W. Cui, J. Tang, Q. Wang, and X. Gu. 2007b. Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited *sterculia* seeds. *Carbohydr. Polym.* 70:437–443.
- [28] Wu, Y., S. W. Cui, J. Wu, L. Ai, Q. Wang, and J. Tang. 2012. Structure characteristics and rheological properties of acidic polysaccharide from boat-fruited *sterculia* seeds. *Carbohydr. Polym.* 88:926–930.
- [29] Di, T., G. Chen, Y. Sun, S. Ou, X. Zeng, and H. Ye. 2017. Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. *J. Funct. Food.* 28:64–75.
- [30] Yuan, Q., Y. Xie, W. Wang, Y. Yan, H. Ye, S. Jabbar, and X. Zeng. 2015a. Extraction optimization, characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Carbohydr. Polym.* 128:52–62.
- [31] Yuan, Q., L. Zhao, Q. Cha, Y. Sun, H. Ye, and X. Zeng. 2015b. Structural characterization and immunostimulatory activity of a homogeneous polysaccharide from *Sinonovacula constricta*. *J. Agric. Food Chem.* 63:7986–7994.
- [32] Zhao, S., C. Rong, Y. Liu, F. Xu, S. Wang, C. Duan, J. Chen, and X. Wu. 2015. Extraction of a soluble polysaccharide from *Auriculariapolytricha* and evaluation of its anti-hypercholesterolemic effect in rats. *Carbohydr. Polym.* 122:39–45.
- [33] Yang, L., T. Zhao, H. Wei, M. Zhang, Y. Zou, G. Mao, and X. Wu. 2011. Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities in vitro. *Int. J. Boil. Macromol.* 49:1124–1130.
- [34] Lai, F., Q. Wen, L. Li, H. Wu, and X. Li. 2010. Antioxidant activities of water-soluble polysaccharide extracted from mung bean (*Vignaradiata* L.) hull with ultrasonic assisted treatment. *Carbohydr. Polym.* 8:323–329.
- [35] Roy, P., S. Amdekar, A. Kumar, and V. Singh. 2011. Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *BMC Complementar. Alter. Medic.* 11:69.
- [36] Yolmeh, M., and S. M. Jafari. 2017. Applications of response surface methodology in the food industry processes. *Food Biopro. Technol.* 10:413–433.
- [37] Ye, C. L., and C. J. Jiang. 2011. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantagoasiatica* L. by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 84:495–502.
- [38] Sin, H. N., S. Yusof, N. S. A. Hamid, and R. A. Rahman. 2006. Optimization of hot water extraction for sapodilla juice using response surface methodology. *J. Food Eng.* 74:352–358.
- [39] Rashid, F., S. Hussain, and Z. Ahmed. 2018. Extraction purification and characterization of galactomannan from fenugreek for industrial utilization. *Carbohydr. Polym.* 180:88–95.
- [40] Qiao, D., B. Hu, D. Gan, Y. Sun, H. Ye, and X. Zeng. 2009. Extraction optimized by using response surface methodology, purification and preliminary characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydr. Polym.* 76:422–429.
- [41] Xu, R., H. Ye, Y. Sun, Y. Tu, and X. Zeng. 2012. Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (*Camellia sinensis*). *Food Chem. Toxicol.* 50:2473–2480.
- [42] Fan, L., M. Cao, S. Gao, W. Wang, K. Peng, C. Tan, F. Wen, S. Tao, and W. Xie. 2012. Preparation and characterization of a quaternary ammonium derivative of pectin. *Carbohydr. Polym.* 88:707–712.
- [43] Gopi, D., K. Kanimozhi, N. Bhuvaneshwari, J. Indira, and L. Kavitha. 2014. Novel banana peel pectin mediated green route for the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles and their spectral characterization. *Spectrochim. Acta, Part A* 118:589–597.
- [44] Qiao, D., J. Liu, C. Ke, Y. Sun, H. Ye, and X. Zeng. 2010. Structural characterization of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. *Carbohydr. Polym.* 82:1184–1190.
- [45] Li, N., C. Yan, D. Hua, and D. Zhang. 2013. Isolation, purification, and structural characterization of a novel polysaccharide from *Ganoderma capense*. *Int. J. Boil. Macromol.* 57:285–290.

- [46] Gnanasambandam, R., and A. Proctor. 2000. Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* 68:327–332.
- [47] Wahab, M. A., S. Jellali, and N. Jedidi. 2010. Ammonium biosorption onto sawdust: FTIR analysis, kinetics and adsorption isotherms modeling. *Bioresour. Technol.* 101:5070–5075.
- [48] Fadavi, G., M. A. Mohammadifar, A. Zargarran, A. M. Mortazavian, and R. Komeili. 2014. Composition and physicochemical properties of Zedo gum exudates from *Amygdalus scoparia*. *Carbohydr. Polym.* 101:1074–1080.
- [49] Fathi, M., M. Mohebbi, and A. Koocheki. 2016. Some physico-chemical properties of *Prunus armeniaca* L. gum exudates. *Int. J. Boil. Macromol.* 82:744–750.
- [50] Popescu, C. M., P. T. Larsson, N. Olaru, and C. Vasile. 2012. Spectroscopic study of acetylated kraft pulp fibers. *Carbohydr. Polym.* 88:530–536.
- [51] Popescu, M. C. 2017. Structure and sorption properties of CNC reinforced PVA films. *Int. J. Boil. Macromol.* 101:783–790.
- [52] Peredo, K., D. Escobar, J. Vega-Lara, A. Berg, and M. Pereira. 2016. Thermochemical properties of cellulose acetate blends with acetosolv and sawdust lignin: A comparative study. *Int. J. Boil. Macromol.* 83:403–409.
- [53] Yang, X., R. Wang, S. Zhang, W. Zhu, J. Tang, J. Liu, P. Chen, D. Zhang, W. Ye, and Y. Zheng. 2014. Polysaccharides from *Panax japonicus* CA Meyer and their antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.* 101:386–391.
- [54] Zhang, G., Q. Yin, T. Han, Y. Zhao, J. Su, M. Li, and J. Ling. 2015. Purification and antioxidant effect of novel fungal polysaccharides from the stroma of *Cordyceps kyushuensis*. *Ind. Crop. Prod.* 69:485–491.
- [55] Alves, A. P. P., L. P. de Oliveira, A. A. Castro, R. Neumann, L. F. de Oliveira, H. G. Edwards, and A. C. Sant’Ana. 2016. The structure of different cellulosic fibres characterized by Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 86:324–330.
- [56] Gierlinger, N. 2017. New insights into plant cell walls by vibrational microspectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 0:1–35.
- [57] Agarwal, U. P., S. A. Ralph, R. S. Reiner, and C. Baez. 2016. Probing crystallinity of never-dried wood cellulose with Raman spectroscopy. *Cellul.* 23:125–144.
- [58] Movasaghi, Z., S. Rehman, and I. U. Rehman. 2007. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc.* 42:493–541.
- [59] Kadokawa, J. I., T. Kato, M. Setoyama, and K. Yamamoto. 2013. Preparation of galactomannan-based materials compatibilized with ionic liquids. *J. Polym. Environ.* 21:512–519.
- [60] Jiang, J. X., H. L. Jian, C. Cristhian, W. M. Zhang, and R. C. Sun. 2011. Structural and thermal characterization of galactomannans from genus *Gleditsia* seeds as potential food gum substitutes. *J. Sci. Food Agric.* 91:732–737.
- [61] Mudgil, D., S. Barak, and B. S. Khatkar. 2012. X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum. *Int. J. Biol. Macromol.* 50:1035–1039.
- [62] Singh, V., A. Tiwari, P. Shukla, S. P. Singh, and R. Sanghi. 2006. Grafting of methylmethacrylate on to the plant seed galactomannans using potassium persulphate/ascorbic acid redox pair. *React. Funct. Polym.* 66:1306–1318.
- [63] Yin, X., Q. You, and Z. Jiang. 2011. Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from *Tricholomamatsutake* by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 86:1358–1364.
- [64] Fan, T., J. Hu, L. Fu, and L. Zhang. 2015. Optimization of enzymolysis-ultrasonic assisted extraction of polysaccharides from *Momordica charabtia* L. by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 115:701–706.
- [65] Liu, J. L., S. L. Zheng, Q. J. Fan, J. C. Yuan, S. M. Yang, and F. L. Kong. 2015. Optimisation of high-pressure ultrasonic-assisted extraction and antioxidant capacity of polysaccharides from the rhizome of *Ligusticum chuanxiang*. *Int. J. Boil. Macromol.* 76:80–85.
- [66] Sun, Y. X., J. C. Liu, and J. F. Kennedy. 2010. Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from the fruiting bodies of *Chroogomphus rutilus* (Schaeff.: Fr.) OK Miller by Box-Behnken statistical design. *Carbohydr. Polym.* 82:209–214.
- [67] Sheng, Z. L., P. F. Wan, C. L. Dong, and Y. H. Li. 2013. Optimization of total flavonoids content extracted from *Flos Populi* using response surface methodology. *Ind. Crop. Prod.* 43:778–786.
- [68] Kaiser, S., S. G. Verza, R. C. Moraes, V. Pittol, E. M. C. Peñaloza, C. Pavei, and G. Ortega. 2013. Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat’s claw bark by Box–Behnken design. *Ind. Crops Prod.* 48:153–161.
- [69] Wu, C., X. Wang, H. Wang, B. Shen, X. He, W. Gu, and Q. Wu. 2014. Extraction optimization, isolation, preliminary structural characterization and antioxidant activities of the cell wall polysaccharides in the petioles and pedicels of Chinese herbal medicine *Qian* (*Euryale ferox* Salisb.). *Int. J. Boil. Macromol.* 64:458–467.
- [70] Samavati, V. 2013. Polysaccharide extraction from *Abelmoschus esculentus*: Optimization by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 95:588–597.
- [71] Vinogradov, E. V., L. Brade, H. Brade, and O. Holst. 2003. Structural and serological characterisation of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Acinetobacterbaumannii* strain 24. *Carbohydr. Res.* 338:2751–2756.
- [72] Xu Jie, H., and C. Wei. 2008. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible *BaChu* mushroom by response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 72:67–74.
- [73] Tahmouzi, S., and M. Ghodsi. 2014. Optimum extraction of polysaccharides from motherwort leaf and its antioxidant and antimicrobial activities. *Carbohydr. Polym.* 112:396–403.

- [74] Zeng, H., Y. Zhang, S. Lin, Y. Jian, S. Miao, and B. Zheng. 2015. Ultrasonic–microwave synergistic extraction (UMSE) and molecular weight distribution of polysaccharides from *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle. *Separ. Purif. Technol.* 144:97–106.
- [75] Fan, G., Y. Han, Z. Gu, and D. Chen. 2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *Food Sci. Technol.* 41:155–160.
- [76] Feng, C. H., and D. W. Sun. 2014. Optimisation of immersion vacuum cooling operation and quality of Irish cooked sausages by using response surface methodology. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49:1850–1858.

## Résumé

Ce travail est focalisé sur les polysaccharides de graines de coloquinte. La coloquinte (*Citrullus Colocynthis*) est une plante herbacée de la famille des cucurbitacées, très abondante dans les régions saharo-arabiennes et du bassin méditerranéen. Les fruits de coloquinte sont utilisés depuis des temps très anciens en médecine traditionnelle, notamment en Algérie.

Cette thèse sera composée en deux parties. Dans la première, nous présenterons l'extraction de polysaccharide insoluble dans l'eau (Cellulose) qui a été réalisée grâce à deux procédés d'extraction chimique. Le premier concerne la déprotéinisation des graines broyées dans une solution aqueuse de NaOH, suivie de l'extraction des lipides dans le solvant chloroforme/méthanol. Le deuxième procédé consiste à extraire le matériau lipidique avant l'étape de déprotéinisation suivie par une méthode du blanchiment.

Dans la seconde partie, nous décrivons la méthode d'extraction de polysaccharide soluble dans l'eau (Galactomannane) ; tel que le système ANOVA a été utilisé pour étudier l'optimisation des procédés d'extraction de ce polysaccharide hydrosoluble à partir des graines de la coloquinte. Le polysaccharide soluble est extrait en utilisant l'eau bouillante à différents temps d'extraction ( $X_1$  : 30, 60 et 120min), des températures d'extraction ( $X_2$  : 50, 75 et 100 °C) et un rapport de matière ( $X_3$  : 30, 60 et 100 ml/g), pour une extraction maximale. La courbe de surface de réponse 3D et la courbe de contour dérivée 2D des modèles mathématiques sont appliquées pour déterminer les conditions optimales.

Les conditions optimales d'extraction sont les suivantes : température d'extraction 100°C, temps d'extraction 120min et rapport eau 30 ml/g. Dans ces conditions, la masse finale expérimentale est de 210,6 mg, ce qui est bien en accord avec la valeur prédite par le modèle 209,46 mg.

L'objectif de l'étude développée ici est donc d'identifier ces polysaccharides et de déterminer leurs compositions. Pour cela, un procédé d'extraction par voie chimique a été développé afin de pouvoir isoler, avec la plus grande pureté, les polysaccharides hydrosolubles et non hydrosolubles. L'identification des polysaccharides a nécessité une étude précise d'analyse structurale et physico-chimique en utilisant notamment les techniques de FT-IR, RMN, IR-Raman, DRX, ATG et TEM.

**Mots-clés** : *Citrullus Colocynthis*, Polysaccharide soluble et insoluble, Optimisation, ANOVA, Extraction, Caractérisation.

## Abstract

This work is focused on the polysaccharides of *Citrullus Colocynthis* seeds. *Citrullus Colocynthis* is an herbaceous plant of Cucurbitaceae family, very plentiful in the saharo-arabian regions and the Mediterranean basin. The fruits of colocynth are used since very old times in traditional medicine, in particular in Algeria.

This thesis will be composed in two parts. In the first one, we will present the extraction of polysaccharide insoluble in water (Cellulose) which was performed thanks to two chemical extraction processes. The first one involved the deproteinization of grinded *Citrullus colocynthis* seeds in aqueous NaOH solution, followed by the extraction of lipids in the solvent chloroform/methanol. The second process consisted in extracting the lipid material before the deproteinization step, followed by a method of the bleaching.

In the second part, we will describe the method of extraction of soluble polysaccharide in water (Galactomannan); such as the ANOVA system was used to study the optimization of extraction processes of this water-soluble polysaccharide from the seeds of the colocynth. The extraction was performed by using boiling water at different extraction times (30; 60 and 120 min), extraction temperatures (50; 75 and 100 °C), and a material ratio (30; 60 and 100 ml/g), for maximum polysaccharide extraction. The 3-D response surface plot and the contour plot derived from the mathematical models are used to determine the optimal conditions.

The optimum extraction conditions are as follows: extraction temperature 100°C, extraction time 120 min and the ratio of water 30ml/g. Under these conditions, the experimental final mass is 210.6 mg which is very close to the predicted value (209.46 mg) with a regression coefficient of 94.01%.

The objective of the study is to identify these polysaccharides and determine their compositions. For this, a chemical extraction process was developed in order to isolate with the highest purity the water-soluble and non-water-soluble polysaccharides. The identification of polysaccharides required a precise study of structural and physicochemical analysis using in particular the techniques of FT-IR, NMR, IR-Raman, XDR, ATG and TEM.

**Keywords:** *Citrullus Colocynthis*, Soluble and insoluble polysaccharide, Optimization, ANOVA, Extraction, Characterization.