

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

**OPTIMISATION DE L'EXTRACTION AQUEUSE ET
DETERMINATION DE QUELQUES PROPRIETES
PHYSICOCHIMIQUES ET FONCTIONNELLES DE
L'HUILE D'AVOCAT**

Doctorat/Ph.D. en Biochimie

Par :

SAHA FOUJO Brice Ulrich
DEA en Biochimie

Sous la direction
ETOA François-Xavier
Professeur

Année Académique
2014-2015





AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire de Yaoundé I. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : biblio.centrale.uyi@gmail.com

WARNING

This document is the fruit of an intense hard work defended and accepted before a jury and made available to the entire University of Yaounde I community. All intellectual property rights are reserved to the author. This implies proper citation and referencing when using this document.

On the other hand, any unlawful act, plagiarism, unauthorized duplication will lead to Penal pursuits.

Contact: biblio.centrale.uyi@gmail.com

DEDICACE

Avec la grâce de Dieu, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à:

Mes parents : Jonas et Hélène Foudjo;

Mes frères : Ntiwa Arsène, Tagnia Cédric, Konzeu Cyrille et Tchouala Ghislain ;

Mes sœurs : Matchinda Bertille et Bonwo Arlette ;

Ma feuie tante : Mme Saamago Madeleine ;

Les familles : Saamago, Tanguita, Timadjí, Chouna et Kamta;

Mon parrain : Patenou Jean-Baptiste ;

Pour leur présence dans tous les instants de ma vie,

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté,

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été l'occasion pour moi de découvrir les hauts et les bas de la recherche. De nombreuses personnes ont été là pour me soutenir et m'aider durant ces années enrichissantes, je tiens aujourd'hui à les en remercier.

Il y a 5 ans, mes directeurs de thèse, **Pr Etoa François-Xavier**, Chef de Département de Microbiologie, et **Pr Kansci Germain**, Maître de Conférences, acceptaient d'encadrer un étudiant en Science des Aliments et Nutrition. Durant ces années, ils n'ont pas cessé de m'instruire avec une inspiration constante afin de m'aider à mener à bien ce travail.

J'exprime toute ma gratitude au **Pr Moundipa Fewou Paul**, Chef de Département de Biochimie et aux enseignants dudit Département pour le temps qu'ils m'ont consacré et les enseignements reçus.

Merci au **Pr Fokou Elie**, Coordonnateur du Laboratoire des Sciences Alimentaires et Métabolisme (LabSAM) qui a accepté de m'accueillir dans ce laboratoire et pour les multiples conseils qu'il m'a prodigués.

Mes remerciements vont également à l'endroit du **Dr Claude Genot**, Directrice de Recherche, à l'Unité de Recherche BIA/INRA de Nantes (France) pour son assistance, sa disponibilité et ses conseils avisés tout au long de cette thèse. Je suis aussi reconnaissant de l'assistance technique de **Soumia Charaff**, **Valérie Breaumal**, **Geneviève Llamas** et **Bruno Novales** dans la réalisation de l'étude de la stabilité de l'émulsion d'huile d'avocat.

Je tiens à remercier le **Pr Pierre-Yves Pontalier** du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle de l'ENSIACET de Toulouse (France) pour ses conseils avertis dans l'optimisation de l'extraction aqueuse de l'huile d'avocat.

Durant ce cycle doctoral, j'ai eu l'opportunité d'être accueilli à l'Université Vasile Alecsandri de Bacau (Roumanie) par les **Pr Gabriel et Iuliana Lazar** pour réaliser des expérimentations en spectroscopie FTIR de l'huile d'avocat couplée à la chimiométrie. Je garde un très bon souvenir de ces personnes dotées d'un grand dévouement et d'une gentillesse inouïe.

Je voudrais saisir cette opportunité pour adresser mes remerciements à l'équipe de recherche du **Pr Wolfgang Schwack**, Directeur de l'Institut de Chimie Alimentaire à l'Université de Hohenheim (Allemagne) pour l'accueil, l'accompagnement et le soutien dans la caractérisation physicochimique et oxydative de l'huile d'avocat. J'ai été fasciné par leur sens du travail et leur critique constructive.

Je remercie également **M. Fonkeu Jean**, Chef de la section fruits à l'**Institut de Recherche Agricole pour le Développement** (IRAD), Station de Foumbot (Cameroun) pour les informations relatives à l'exploitation de l'avocat au Cameroun et pour m'avoir fourni les cultivars d'avocat utilisés tout au long de ce travail.

Je remercie l'Agence universitaire de la Francophonie (AUF) et le Gouvernement roumain de m'avoir accordé la bourse « **Eugen Ionescu** » pour effectuer un stage doctoral en Roumanie et une formation sur la gestion et la publication des articles en ligne.

Je tiens à témoigner ma gratitude à la Fondation « **Bayer Science & Education** » pour m'avoir attribué la bourse « **Otto Bayer** » qui a permis d'effectuer un stage doctoral en Allemagne.

Je remercie les **membres du jury** de cette thèse pour leur disponibilité et critiques qui permettront d'améliorer ce travail.

Le **collège des enseignants** du LabSAM, recevez toute ma gratitude pour le temps consenti lors des séminaires de laboratoire à faire de ce travail une contribution scientifique.

Je tiens à remercier le **Pr Nkengfack Augustin Ephrem**, Chef de Département de la Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I, pour l'apport matériel dans la réalisation ce travail de recherche.

Je remercie également le **Dr Achu, Dr Ngouana, Dr Ponka, Dr Koukala, Dr Kotué, M. Tchinda, M. Miafo** et l'**Abbé Monkou** pour leur assistance typographique dans la rédaction de cette thèse.

TABLE DE MATIERES

<i>Liste protocolaire des enseignants de la Faculté des Sciences</i>	<i>i</i>
<i>DEDICACE</i>	<i>xii</i>
<i>REMERCIEMENTS</i>	<i>xiii</i>
<i>RÉSUMÉ</i>	<i>xv</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xvi</i>
<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	<i>xvii</i>
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	<i>xviii</i>
<i>LISTE DES FIGURES</i>	<i>xix</i>
<i>INTRODUCTION GÉNÉRALE</i>	<i>1</i>
<i>Chapitre I : REVUE DE LA LITTERATURE</i>	<i>4</i>
I-Données générales sur l’avocat	4
I-1 Historique	4
I-2 Description	4
I-3 Différents cultivars d’avocats.....	4
I-4 Production, consommation et exportation d’avocat au Cameroun.....	5
I-5 Contraintes et atouts du secteur de l’avocat au Cameroun.....	8
II- Généralités sur l’huile d’avocat	8
II-1 Localisation structurale de l’huile d’avocat	8
II-2 Production mondiale de l’huile d’avocat	9
II-3 Facteurs influençant la teneur et la composition en lipides de l’avocat	9
II-4 Propriétés physicochimiques des huiles végétales.....	10
II-4-1 Composition chimique	10
II-4-2 Propriétés spectroscopiques	20
II-4-3 Autres propriétés chimiques de l’huile d’avocat	25
II-4-4 Propriétés physiques	25
II-5 Quelques propriétés fonctionnelles et biologiques de l’huile d’avocat	26
III- Procédés d’extraction et travaux antérieurs sur l’extraction d’huile d’avocat	28
III-1 Extraction par presse.....	28

III-2 Extraction par les solvants organiques	29
III-3 Extraction aqueuse.....	30
III-4 Extraction par les fluides supercritiques.....	31
III-5 Nouvelles avancées dans l'extraction des huiles végétales	32
III-5-1 Emploi des prétraitements	32
III-5-2 Extraction par les agro-solvants	32
III-5-3 Utilisation de la Méthodologie des Surfaces réponses (MSR)	33
IV- Emulsion et oxydation	40
IV-1 Emulsion.....	40
IV-1-1 Types d'émulsion	41
IV-1-2 Emulsifiants.....	41
IV-1-3 Propriétés d'une émulsion	42
IV-1-4 Stabilité d'une émulsion	43
IV-1-5 Mécanismes de destabilisation d'une émulsion	43
IV-2 Oxydation	46
IV-2-1 Auto-oxydation.....	46
IV-2-2 Photo-oxydation	47
IV-2-3 Facteurs influençant la stabilité oxydative des huiles	48
IV-2-4 Suivi de l'état d'oxydation des huiles	50
V- Conclusion de la bibliographie.....	52
<i>Chapitre II : MATERIEL ET METHODES.....</i>	54
I-Présentation du cadre expérimental	54
II-Domaine d'étude et échantillonnage.....	57
III-Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile d'avocat	58
III-1 Détermination de la teneur en eau (AOAC, 1980)	59
III-2 Détermination de la teneur en lipides neutres (AOAC, 1980).....	60
III-3 Extraction aqueuse de l'huile d'avocat.....	61
III-4 Détermination de la gamme des variables indépendantes : Plan unifactoriel	62
III-4-1 Détermination du domaine d'étude pour la température	63
III-4-2 Détermination du domaine d'étude pour le temps.....	63
III-4-3 Détermination du domaine d'étude pour le ratio eau/pulpe	63
III-4-4 Détermination du domaine d'étude pour le pH	64

III-5	Modélisation de l'extraction d'huile : Méthodologie des surfaces réponses.....	64
III-6	Optimisation multicritère des réponses	65
III-7	Conservation des échantillons d'huile	66
IV-	Détermination des propriétés physicochimiques	66
IV-1	Propriétés chimiques	67
IV-1-1	Caractérisation des huiles d'avocats par spectroscopie infrarouge	67
IV-1-2	Caractérisation de l'huile d'avocat par spectrophotométrie UV-Vis	68
IV-1-3	Caractérisation de l'huile d'avocat par spectroscopie de fluorescence	69
IV-1-4	Détermination de la teneur en insaponifiables (AOAC, 2000)	70
IV-1-5	Détermination de la teneur en chlorophylles (AOCS, 1987)	71
IV-1-6	Détermination de la teneur en Caroténoïdes (Ong <i>et al.</i> , 1982).....	71
IV-1-7	Détermination de la teneur en acide gras <i>trans</i> total (AOAC, 2000)	72
IV-1-8	Détermination de la composition en acide gras (AOCS, 1989)	73
IV-1-9	Détermination de la composition en glycérides partiels, acides gras libres et lipides polaires (Myher et Kursis, 1984).....	76
IV-1-10	Détermination de la composition en stérols et squalène (ISO 12228, 1999) ..	77
IV-1-11	Détermination de la composition en tocophérols et tocotriénols (Buttris et Diplock, 1984).....	79
IV-1-12	Détermination de la teneur en composés polaires totaux (Dobarganes <i>et al.</i> , 2000)	81
IV-1-13	Détermination de l'indice d'acide	83
IV-1-14	Détermination de l'indice de saponification	84
IV-1-15	Calcul du degré de pureté	86
IV-1-16	Détermination de l'indice d'iode.....	86
IV-2	Détermination des propriétés physiques.....	87
IV-2-1	Mesure de la couleur	87
IV-2-2	Mesure de la viscosité (Whorlow, 1992).....	88
IV-2-3	Mesure des températures de fusion et de cristallisation (AOCS, 1988).....	89
V-	Etude de la stabilité oxydative de l'huile d'avocat	90
V-1	Détermination de l'indice de peroxyde (Jian <i>et al.</i> , 1992).....	90
V-2	Détermination des teneurs en diènes et triènes conjugués (IUPAC, 1987).....	91
V-3	Détermination de l'indice de para-anisidine (La norme ISO 6885, 1998 modifiée) .	92

V-4 Détermination des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) (AOCS, 1998)	93
V-5 Détermination de la teneur en MDA	95
V-6 Modélisation et prédiction de l'altération de l'huile d'avocat à hautes températures	97
VI-Evaluation de la stabilité physique d'une émulsion d'huile d'avocat dans l'eau... 99	
VI-1 Emulsification et incubation des émulsions	99
VI-2 Caractérisation des émulsions	100
VI-2-1 Distribution de la taille des gouttelettes d'huiles	100
VI-2-2 Séparation et collecte des phases aqueuse et crémée	101
VI-2-3 Détermination de la répartition des protéines dans l'émulsion	101
VI-2-4 Evaluation de la cinétique de déstabilisation.....	102
VII-Analyse Statistique	103
Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	104
I – Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile	104
I-1 Teneurs en eau et en lipides neutres	104
I-2 Effet des différents facteurs sur le rendement d'extraction.....	105
I-2-1 Effet du ratio eau/pulpe	105
I-2-2 Effet du temps	106
I-2-3 Effet de la température	108
I-2-4 Effet du pH	110
I-3 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile d'avocat des 5 cultivars.....	112
I-3-1 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Hickson</i>	112
I-3-2 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Lula</i>	117
I-3-3 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Collinson</i> ...	122
I-3-4 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Booth 7</i>	127
I-3-5 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Booth 8</i>	132
I-4 Optimisation multicritère et validation expérimentale des modèles	137
II-Propriétés physicochimiques et fonctionnelles	139
II-1 Motif moléculaire distinctif et classification des huiles d'avocats	139
II-1-1 Motif moléculaire distinctif des huiles d'avocats	139
II-1-2 Classification des huiles d'avocats	141
II-2 Caractérisation spectrale dans l'ultraviolet et le visible.....	144

II-3 Caractérisation spectrale par fluorescence	147
II-4 Teneurs en chlorophylles, caroténoïdes, tocotriénols, tocophérols, squalène et stérols	149
II-5 Composition en acides gras et teneurs en acide gras <i>trans</i> , phospholipides, glycolipides et glycérides partiels	153
II-6 Teneur en composés polaires totaux	156
II-7 Indices d'acide, de saponification et d'iode	157
II-8 Propriétés physiques	159
III- Stabilité oxydative.....	161
III-1 Indices de peroxyde, para-anisidine et teneurs en sr-TBA, MDA, diènes et triènes conjugués	161
III-2 Altération de l'huile d'avocat à des hautes températures	164
IV- Stabilité physique d'une émulsion à base d'huile d'avocat.....	168
IV-1 Distribution des tailles des gouttelettes	168
IV-2 Distribution de la β -lactoglobuline dans les émulsions.....	171
IV-3 Cinétique de déstabilisation par examen visuel et imagerie.....	173
<i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	180
CONCLUSIONS.....	180
PERSPECTIVES	181
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	182
<i>ANNEXES</i>	<i>a</i>
Annexe I: Matrices des modélisations	<i>a</i>
Annexe II : Courbes d'étalonnage	<i>e</i>
Annexe III : Chromatogrammes	<i>a</i>
<i>PUBLICATIONS.....</i>	<i>I</i>

RÉSUMÉ

Les pertes *post-récoltes* des avocats sont très importantes au Cameroun. Elles sont, entre autres, dues à la qualité des fruits. La production d'huile d'avocat est une solution à la réduction de ces pertes. Plusieurs techniques sont utilisées pour extraire l'huile d'avocat mais l'extraction aqueuse est la moins onéreuse et la moins polluante malgré son faible rendement. La présente étude a pour but de contribuer à la valorisation des avocats à travers la définition des conditions optimales d'extraction aqueuse et la détermination de quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de son huile.

Cinq cultivars d'avocat (*Booth 7*, *Booth 8*, *Collinson*, *Hickson* et *Lula*) ont été collectés dans les plantations de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD). Après mûrissement, les conditions optimales d'extraction aqueuse de l'huile d'avocat (pH, temps, température et ratio eau/pulpe) ont été définies. Les propriétés physicochimiques (caractérisations spectrales dans le moyen infrarouge, l'ultraviolet, le visible, la fluorescence ; teneurs et composition en chlorophylles, tocophérols, caroténoïdes, acides gras, stérols, insaponifiables, squalène ; indices d'acide, d'iode et de saponification ; couleur, viscosité ; températures de fusion et de cristallisation) ont été déterminées. La stabilité oxydative à température ambiante (teneurs en composés polaires totaux, diènes et triènes conjugués, sr-TBA et malondialdéhyde ; indices de peroxyde et de para-anisidine) et à hautes températures (120 - 180°C) a été évaluée. La stabilité physique d'une émulsion d'huile d'avocat dans l'eau (tailles des gouttelettes, floculation, coalescence et crémage) en présence de β -lactoglobuline pendant 42 h à 25°C et de 42 h -120 h à 40°C a été évaluée.

Il ressort de cette étude que les conditions optimales d'extraction de l'huile d'avocat sont : pH (4,5), température (45°C), temps (180 min) et ratio eau/pulpe (6:1 (m/m)) pour des efficacités d'extraction variant de 7,86 à 31,42%. Les huiles d'avocat des 5 cultivars présentent des motifs distincts dans le moyen infrarouge de la fonction ester carboxylique (1690 – 1790 cm^{-1}). Le procédé d'extraction n'affecte pas les propriétés physicochimiques à l'exception de la teneur en caroténoïdes (37,62 mg/kg) qui était élevée et la teneur en tocophérols (28,40 $\mu\text{g/g}$) qui était basse comparée aux valeurs recommandées. L'huile d'avocat présente une stabilité oxydative et peut être utilisée à hautes températures (120°C à 180°C) pour des temps compris entre 4,3 et 232,5 min. L'émulsion d'huile d'avocat dans l'eau est partiellement stable pendant 42 h et enclin à la coalescence après 42 h.

Ces résultats suggèrent que l'extraction aqueuse de l'huile d'avocat est une approche intéressante pour faire face aux pertes *post-récoltes* liées à l'avocat. L'huile extraite peut servir pour des fritures modérées et assaisonnements.

Mots-clés : Avocat, extraction aqueuse, huile, optimisation, pertes *post-récoltes*, propriétés physicochimiques, propriétés fonctionnelles.

ABSTRACT

Avocado *post*-harvest losses are very important in Cameroon. They are, among others, due to fruit quality. Extraction of avocado oil is a solution for *post*-harvest loss reduction. Several techniques have been used for the extraction of its oil, but the aqueous extraction is the less costly and less polluting in spite of its low extraction yield. The present study aimed at contributing to the valorization of avocados through the definition of optimal aqueous extraction conditions and the determination of some physicochemical and functional properties of its oil.

Five avocado cultivars (*Booth 7*, *Booth 8*, *Collinson*, *Hickson* and *Lula*) have been collected in the fields of the Agricultural Research Institute for Development (IRAD). After ripeness, the optimal conditions of aqueous extraction of avocados' oils (pH, time, temperature and water/pulp ratio) were defined. The physicalchemical properties (mid-infrared, UV-vis and fluorescence spectrum characterizations; contents and composition in chlorophylls, tocopherols, carotenoids, fatty acids, sterols, unsaponifiables, squalene; acide, iodine and saponification values; color, viscosity, melting and crystallization temperatures) were determined. The oxidative stability at moderate temperatures (contents in total polar compounds, conjugated dienes and trienes, TBARS and malondialdehyde; peroxide and para-anisidine values) and at high temperatures (120°C to 180°C) was evaluated. The physical stability of avocado oil-in-water emulsion (droplet sizes, flocculation, coalescence and creaming) in presence of β -lactoglobulin for 42 hours at 25°C and from 42 – 120 hours at 40°C was assessed.

From this study, the optimal conditions of extraction of avocado oil are: pH (4.5), temperature (45°C), time (180 min) and water/pulp ratio (6:1) for efficiencies of extraction varying from 7.86 to 31.42%. Avocado oils of the 5 cultivars present distinct mid-infrared patterns in the spectral domain of carboxylic ester function (1690 cm^{-1} - 1790 cm^{-1}). The process of extraction did not affect the physicochemical properties except for carotenoid content that had high value (37.62 mg/kg) and tocopherol content had low values (28.40 $\mu\text{g/g}$) compared to standard values. The low fluorescent avocado oil presents an oxidative stability and can be used at high temperatures (120°C and 180°C) for a length of time ranging from 4.3 min to 232.5 min. Avocado oil-in-water emulsion is relatively stable during 42 hours and minded to coalescence after 42 hours.

These results suggest that the aqueous extraction of avocado oil is an interesting approach in reducing avocado *post*-harvest losses. The extracted oil will be used for dressings and moderate fryings.

Keywords: Avocado, aqueous extraction, oil, optimization, *post*-harvest losses, physicochemical properties, functional properties.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	: Analyse en Composantes Principales
AFNOR	: Association Française de Normalisation
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
AOCS	: American Oil Chemists' Society
ATR	: Attenuated Total Reflectance
BHT	: Butylhydroxytoluène
CCMHP	: Chromatographie en Couche Mince Haute Performance
CPT	: Composés polaires totaux
DHA	: Acide decosahexaénoïque
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique
EPA	: Acide éicosapentaénoïque
FAO	: Food and Agriculture Organization
FTIR	: Fourier Transform Infrared
G	: Guatémaltèque
H/E	: Huile-dans-l'eau
CLHP	: Chromatographie Liquide Haute Performance
I	: Indienne
IR	: Infrarouge
IS	: Indice de saponification
IRAD	: Institut de Recherche Agricole pour le Développement
M	: Mexicaine
MDA	: Malonediadehyde
MIR	: Mid-Infrared
MSR	: Méthodologie des Surfaces réponses
PIPES	: 1,4-piperazinediethanesulfonate
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
Sr-TBA	: Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TBARS	: Thiobarbituric Acid Reactive Substances
U.A.	: Unité arbitraire
UV-Vis	: Ultraviolet-visible
UHPLC	: Ultra-High Performance Liquid Chromatography

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des cultivars d'avocats cultivés au Cameroun selon Morton (1987)	4
Tableau II : Noms et structures majeurs du radical des sphingolipides (IUPAC-IUBMB, 1998).....	13
Tableau III : Bandes d'absorption dans l'UV-Vis des classes de molécules des huiles alimentaires	22
Tableau IV : Quelques propriétés physicochimiques de l'huile d'avocat (Pushkard <i>et al.</i> , 2001; Kameni and Tchamo, 2003; Ikhuoria and Maliki, 2007).....	25
Tableau V : Quelques propriétés physiques de l'huile d'avocat (Pushkard <i>et al.</i> , 2001; Kameni and Tchamo, 2003; Ikhuoria and Maliki, 2007; Akpabio <i>et al.</i> , 2011).....	26
Tableau VI : Codage des variables indépendantes du plan composite centré	98
Tableau VII : Teneurs en eau et en lipides des 5 cultivars d'avocat	104
Tableau VIII : Codage des variables indépendantes pour les plans factoriels centrés des différents cultivars d'avocat	112
Tableau IX : Analyse de variances de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar <i>Hickson</i> en fonction des facteurs.....	114
Tableau X : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Hickson</i>	115
Tableau XI : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar <i>Hickson</i>	116
Tableau XII : Analyse de variances de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar <i>Lula</i> en fonction des facteurs.....	119
Tableau XIII : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Lula</i> . ..	120
Tableau XIV : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar <i>Lula</i>	121
Tableau XV : Analyse de variances de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar <i>Collinson</i> en fonction des facteurs.	124
Tableau XVI : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Collinson</i>	125

Tableau XVII : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar <i>Collinson</i>	126
Tableau XVIII : Analyse de variances de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar <i>Booth 7</i> en fonction des facteurs.....	129
Tableau XIX : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Booth 7</i>	130
Tableau XX : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar <i>Booth 7</i>	131
Tableau XXI : Analyse de variance de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar <i>Booth 8</i> en fonction des facteurs.....	133
Tableau XXII : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar <i>Booth 8</i>	134
Tableau XXIII : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar <i>Booth 8</i>	135
Tableau XXIV : Valeurs minimale et maximale des efficacités d'extraction et bornes inférieure et supérieure des désirabilités individuelles des 5 cultivars	137
Tableau XXV : Valeurs expérimentales et prédites des efficacités d'extraction des huiles d'avocat	139
Tableau XXVI : Teneurs en chlorophylles, caroténoïdes, tocophérols, squalène et stérols de l'huile d'avocat du cultivar <i>Lula</i>	153
Tableau XXVII : Composition en acides gras de l'huile d'avocat du cultivar <i>Lula</i>	156
Tableau XXVIII : Indices d'acide, de saponification et d'iode de l'huile d'avocat du cultivar <i>Lula</i> obtenus comparés à celles d'autres auteurs	159
Tableau XXIX : Couleur et viscosité de l'huile d'avocat du cultivar <i>Lula</i>	161
Tableau XXX : Indicateurs primaires et secondaires de l'oxydation de l'huile d'avocat du cultivar <i>Lula</i>	163
Tableau XXXI : Significativité des paramètres et adéquation du modèle de thermodégradation.....	165
Tableau XXXII : Prédiction des temps limites ($t_{25\%}$) pour obtenir 25% de composés polaires à différentes températures	168

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Quelques cultivars d'avocat rencontrés dans le monde (IAC, 2010)	5
Figure 2 : Production et consommation d'avocats au Cameroun de 1960 à 2008 (FAOSTAT, 2010).....	6
Figure 3 : Origine géographique des flux inter provinces des avocats du Cameroun en 1998 (Temple, 1999).	7
Figure 4 : Structure des phospholipides (Gordon, 2003)	12
Figure 5 : Structure d'un monogalactosyldiglycéride (Gordon, 2003).....	13
Figure 6 : Structure des tocophérols et tocotriénols (Woollard et Indyk, 2003).....	15
Figure 7 : Structures chimiques de quelques phytostérols (Fernandes et Cabral, 2007)	16
Figure 8 : Structure chimique de quelques caroténoïdes (Fur et Clark, 2003).....	17
Figure 9 : Structure de la chlorophylle (Puspitasari-Nienaber <i>et al.</i> , 2002).....	18
Figure 10 : Structure du squalène (Huang <i>et al.</i> , 2009)	19
Figure 11 : Exemples de représentation de courbes de surface réponse montrant l'effet du pH, la masse et le temps sur l'extraction de la bétalaïne : E est la forme d'une équation de second degré et F est la forme d'une équation de premier degré (Prakash <i>et al.</i> , 2013).....	38
Figure 12 : Schéma des mécanismes physiques majeurs de déstabilisation des émulsions (McClements, 2005).....	45
Figure 13 : Formation des hydroperoxydes à partir de l'acide linoléique lors de l'oxydation à l'oxygène singulet (Chloe et Min, 2006).	48
Figure 14 : Organigramme de la méthodologie utilisée dans cette étude	56
Figure 15 : Schémas des cultivars d'avocat utilisés dans cette étude (Photographie de Saha, 2011).....	58
Figure 16 : Effet du ratio eau/pulpe sur le rendement d'extraction de l'huile d'avocat.	106
Figure 17 : Effet du temps sur le rendement d'extraction de l'huile d'avocat.....	108
Figure 18 : Effet de la température sur le rendement d'extraction de l'huile d'avocat.....	109
Figure 19 : Effet du pH sur le rendement d'extraction de l'huile d'avocat.	111
Figure 20 : Recouvrement de l'huile d'avocat après séparation de la phase solide et aqueuse par centrifugation	111
Figure 21 : Homoscédasticité des résidus pour l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Hickson</i>	113
Figure 22 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Hickson</i>	113

Figure 23 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Hickson</i> en fonction du pH et du temps (le Ratio eau/pulpe et la température ont été fixés).....	117
Figure 24 : Homoscédasticité des résidus pour l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Lula</i>	118
Figure 25 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Lula</i>	118
Figure 26 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Lula</i> en fonction du ratio eau/pulpe et du temps (le pH et la température ont été fixés).	122
Figure 27 : Homoscédasticité des résidus pour l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Collinson</i>	122
Figure 28 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>collinson</i>	123
Figure 29 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Collinson</i> en fonction du pH et du Ratio (eau/pulpe) (la température et temps ont été fixés).....	127
Figure 30 : Homoscédasticité des résidus pour l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Booth 7</i>	128
Figure 31 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Booth 7</i>	128
Figure 32 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Booth 7</i> en fonction de la température et du pH (le temps et le ratio ont été fixés).	132
Figure 33 : Homoscédasticité des résidus pour l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Booth 8</i>	132
Figure 34 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Booth 8</i>	133
Figure 35 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar <i>Booth 8</i> en fonction de la température et du ratio eau/pulpe (le pH et ratio ont été fixés).....	136
Figure 36 : Représentation de la désirabilité en fonction de la température et du temps (pH et ratio ont été fixés).....	139
Figure 37 : Spectres d'absorbance des huiles d'avocats dans la zone 900 – 1300 cm ⁻¹	140
Figure 38 : Représentation des scores en ACP des cultivars d'huiles dans le domaine 2800 – 3050 cm ⁻¹	142

Figure 39 : Représentation de la variabilité des huiles dans le domaine 2800 – 3050 cm ⁻¹ .	143
Figure 40 : Représentation des scores en ACP des cultivars d’huiles dans le domaine 1690 – 1790 cm ⁻¹	143
Figure 41 : Représentation de la variabilité des huiles dans le domaine 1690 – 1790 cm ⁻¹ .	144
Figure 42 : Spectre d’absorption de l’huile du cultivar Lula à 30 g/L entre 300 nm et 700 nm	146
Figure 43 : Spectre d’absorption de l’huile du cultivar Lula à 2,3 g/L entre 210 nm et 600 nm	146
Figure 44 : Spectres dérivés secondes de l’huile du cultivar Lula aux concentrations 0,115 g/L ; 0,23 g/L et 2,3 g/L entre 220 nm et 300 nm.	147
Figure 45 : Carte d’isointensité excitation-émission de l’huile d’avocat à 0,46 g/L.	148
Figure 46 : Spectres d’excitation-émission de l’huile d’avocat à 2,3 g/L.....	149
Figure 47 : Formation des dérivés de la chlorophylle (Von Elbe et Schwartz, 1996)	151
Figure 48 : Chromatogramme en couche mince des composés polaires et non polaires extraits de l’huile d’avocat du cultivar <i>Lula</i>	157
Figure 49 : Evolution du taux de solide de l’huile d’avocat du cultivar <i>Lula</i> en fonction de la température.....	161
Figure 50 : Mécanisme de décomposition de l’acide linoléique en hydroperoxydes et en quelques composés secondaires d’oxydation (Choe et Min, 2006).	164
Figure 51 : Homoscédasticité des résidus pour la thermodégradation de l’huile d’avocat entre 120°C – 190°C	166
Figure 52 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de la thermodégradation de l’huile d’avocat entre 120°C – 190°C	166
Figure 53 : Représentation graphique de la teneur en composés polaires totaux en fonction du temps et de la température.....	167
Figure 54 : Distribution de la taille des gouttelettes des émulsions d’huiles d’avocat et de colza (purifiée et non purifiée) fraîchement préparées.....	170
Figure 55 : Distribution de la taille des gouttelettes de l’émulsion d’huile d’avocat fraîchement préparées en présence et en absence de SDS.	170
Figure 56 : Spectres d’émission de l’émulsion d’huile d’avocat fraîchement préparée, et des phases aqueuse et crémée préparées à partir de la même émulsion.	172
Figure 57 : Spectres d’émission de l’émulsion d’huile de colza purifiée fraîchement préparée, et des phases aqueuse et crémée préparées à partir de la même émulsion.	172

Figure 58 : Spectres d'émission de l'émulsion d'huile de colza non purifiée fraîchement préparée, et des phases aqueuse et crémée préparées à partir de la même émulsion.	173
Figure 59 : Présentation de 2 émulsions d'huiles d'avocat (jaunâtre à gauche) et une émulsion d'huile de colza (blanchâtre à droite) fraîchement préparées.....	174
Figure 60 : Présentation de 2 émulsions d'huiles d'avocat (jaunâtre à gauche) et une émulsion d'huile de colza (blanc à droite) après 24 h d'incubation	174
Figure 61 : Présentation de 2 émulsions d'huiles d'avocat (jaunâtre à gauche) et une émulsion d'huile de colza (blanchâtre à droite) après 40 h d'incubation	175
Figure 62 : Evolution des niveaux de gris pour une émulsion d'huile d'avocat à partir du fond du tube.	178
Figure 63 : Evolution des niveaux de gris pour une émulsion d'huile de colza à partir du fond du tube.	178
Figure 64 : Cinétique de crémage à 25°C pour des émulsions d'huiles d'avocat et colza ...	179
Figure 65 : Cinétique de crémage dans des conditions accélérées (40°C) pour des émulsions d'huiles d'avocat et colza	179

**INTRODUCTION
GENERALE**

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La production et la consommation d'avocat au Cameroun sont en constante croissance. Selon une estimation de la FAO (2011), sa production est passée de 12000 tonnes à 69532 tonnes entre 1962 et 2011 et sa consommation de 11300 tonnes à 45900 tonnes entre 1962 et 2002. L'avocat constitue ainsi une source importante de revenus pour les producteurs. Par ailleurs, 46,5% des avocats rencontrés à Yaoundé proviennent des avocats ayant moins de 10 ans d'âge, ce qui suggère un accroissement de la production dans l'avenir (Temple, 1999).

Cependant le secteur d'avocat, comme celui de tout autre fruit, reste miné par plusieurs difficultés telles que : la faible qualité hédonique de certains cultivars, l'abandon des avocats dans les champs faute de moyens d'entreposage et les contraintes de normalisation à l'export, qui entraînent des écarts de vente importants (Hatcheu, 2003). Face à ces difficultés, la production d'huile d'avocat constitue une alternative intéressante. Ceci d'autant plus que le Cameroun enregistre une perte de devises dans l'importation d'huiles alimentaires, soit par exemple 25 500 000 dollars pour l'importation de l'huile de palme (FAOSTAT, 2010), dont certaines sont de qualité douteuse (Kansci *et al.*, 2003). Des données disponibles montrent cependant que l'avocat produit au Cameroun constitue une source potentielle d'huile (Kameni et Tchamo, 2003).

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'extraction de l'huile d'avocat : de l'extraction à la presse, en passant par l'extraction aux solvants jusqu'à l'extraction par les fluides supercritiques (Schwartz *et al.*, 2007; Botha, 2008 ; Woolf *et al.*, 2008). L'extraction aqueuse répond à la quasi-totalité des critères de préservation de l'environnement en plus de la simplicité de mise en œuvre mais présente un faible rendement. Toutefois, des expérimentations menées sur l'extraction aqueuse des huiles de pistache, de melon et de colza en utilisant la méthodologie des surfaces réponses montre qu'il est possible d'améliorer ce rendement en contrôlant certaines variables telles que la température, le temps, le pH et le ratio solvant/matière (Guillemin, 2006 ; Nyam *et al.*, 2009 ; Ahmadi *et al.*, 2013).

Les travaux antérieurs sur les propriétés nutritionnelles de l'huile d'avocat ont montré qu'elle est assez proche de l'huile d'olive du point de vue de sa composition en acides gras. L'huile d'avocat peut être employée pour ses propriétés cosmétiques et pharmaceutiques

attribuées notamment à sa fraction insaponifiable (Alvarez et Rodriguez, 2000). Cette fraction possède la propriété d'inhiber les cellules cancéreuses de la prostate et soigner les maladies articulaires (Lu *et al.*, 2005 ; Verbruggen, 2006). Comparativement à l'huile d'olive, la composition de la fraction insaponifiable de l'huile d'avocat en certains constituants restent non élucidés à savoir : le squalène, les phospholipides, les glycérides partiels et les glycolipides. Ainsi, une exploration plus approfondie permettra de mettre en lumière certaines propriétés prêtées à l'huile d'avocat à savoir ses propriétés anticancéreuses qui pourraient être liées à la présence du squalène tel que démontré par Watterman et Lockwood (2007) dans l'huile d'olive. D'autres champs d'investigations (composition, oxydation et émulsion) permettront de clarifier l'importance et les applications de l'huile d'avocat.

D'abondantes applications associées aux propriétés physicochimiques de l'huile d'olive ont fait apparaître de nombreuses adultérations (Vigli *et al.*, 2003 ; De la Mata *et al.*, 2012). Au vu des diverses applications de l'huile d'avocat comparable à celles de l'huile d'olive (Requejo-Tapia, 1999), il est fort probable que l'huile d'avocat soit sujette à des contrefaçons. La spectroscopie infrarouge rend possible ce contrôle en quelques minutes (Bertrand *et al.*, 2000). Elle a fait ses preuves avec l'huile d'olive et dans divers autres domaines comme la thermodégradation des huiles (Vigli *et al.*, 2003 ; De la Mata *et al.*, 2012) et peut être utilisée pour identifier les empreintes spécifiques des huiles de différents cultivars d'avocat afin de limiter leur contrefaçon.

Par ailleurs, les huiles végétales sont généralement utilisées dans la confection des repas qui requiert plusieurs procédés culinaires. Dans certains cas, les huiles sont chauffées à des hautes températures. Ces températures peuvent entraîner une oxydation des huiles pouvant aboutir à la formation de substances néfastes pour la santé (Soupas *et al.*, 2004). Une étude a montré que l'huile d'avocat possède une stabilité thermique comparable à celle de l'huile d'olive à 180°C (Berasategi *et al.*, 2012). Cependant, elle n'avance pas des arguments concernant le temps limite d'utilisation à cette température qui est un paramètre essentiel à la performance de l'huile à des hautes températures (Guillén et Uriarte, 2011). La définition des temps limites d'utilisation de l'huile d'avocat à des hautes températures est une approche crédible pour son utilisation en friture.

La stabilité des systèmes dispersés impliquant l'huile d'avocat a également été étudiée pour une utilisation en alimentation. Les conclusions montrent que l'émulsion d'huile d'avocat dans l'eau en présence de concentrât de protéines de blé est stable sur 2 mois au regard des propriétés rhéologiques (Logaraj *et al.*, 2008). Toutefois, cette étude ne souligne pas les mécanismes de déstabilisation de l'émulsion qui s'opèrent en présence des protéines de blé et sous-tendent les propriétés rhéologiques observées. La compréhension de ces mécanismes de déstabilisation permettra d'accroître la durée de vie des aliments fait à base d'huile d'avocat.

Questions de Recherche

- ❖ Les conditions d'extraction aqueuse de l'huile d'avocat peuvent-elles être optimisées en vue d'une meilleure accessibilité aux producteurs locaux ?
- ❖ Quelles pourraient être les propriétés physicochimiques de l'huile d'avocat obtenue par extraction aqueuse ?
- ❖ L'huile d'avocat extraite à l'eau est-elle résistante à l'oxydation?
- ❖ Quelle serait la raison de la déstabilisation d'une émulsion faite à base d'une telle huile d'avocat ?

Objectif général

L'objectif de ce travail est de contribuer à la valorisation des avocats produits au Cameroun en vue de limiter les pertes *post-récoltes*. Il est question de définir les conditions optimales d'extraction de l'huile de 5 cultivars d'avocat et de déterminer quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles.

Objectifs spécifiques

- 1- Définir les conditions optimales d'extraction aqueuse de l'huile d'avocat ;
- 2- Déterminer quelques propriétés physicochimiques de l'huile d'avocat obtenue ;
- 3- Evaluer la stabilité oxydative de l'huile d'avocat ;
- 4- Evaluer la stabilité physique de l'émulsion d'huile d'avocat.

Chapitre I :

REVUE DE LA LITTERATURE

I-Données générales sur l'avocat

I-1 Historique

L'avocatier (*Persea americana* Mill) est une Lauraceae originaire d'Amérique Centrale. Sa découverte remonte au début des années 1500 lorsque les conquistadors espagnols ont colonisé les terres aztèques et incas et y ont découvert une culture intense de l'avocat. Il a été introduit en Floride, Hawaï et Californie au début des années 1800 où il a été domestiqué et s'est ensuite répandu à travers le globe (Smith *et al.*, 1992).

I-2 Description

L'avocat est décrit comme étant une baie avec un mésocarpe charnu qui entoure un noyau volumineux. L'avocat a une couleur qui va du vert jaunâtre au marron. L'avocat pèse entre 50 g à 1 kg (Schaffer et Andersen, 1994). L'avocat est constitué d'un exocarpe, d'un mésocarpe charnu, et d'un noyau. La partie consommable ou mésocarpe représente 50 à 80% du fruit total et le noyau 10 à 25% (Lewis, 1978).

I-3 Différents cultivars d'avocats

Il existe 3 variétés d'avocats : *Persea nubigena* var. *guatemalensis* L. Wms, *Persea americana* var. *drymifolia* Blake et *Persea americana* Mill. var. *americana*. Des formes hybrides (cultivars) existent entre ces trois variétés (Morton, 1987). Au Cameroun on a pu recenser 16 cultivars qui sont répertoriés dans le tableau I suivant la classification de Morton (1987). D'autres cultivars existent (figure 1).

Tableau I : Classification des cultivars d'avocats cultivés au Cameroun selon Morton (1987)

G	M	I	Hybride GM	Hybride GI	Hybride MI
<i>Anaheim</i>	<i>Goldfried</i>	<i>Peterson</i>	<i>Fuerte tonto</i>	<i>Booth 7</i>	<i>Semil 34</i>
<i>Nabal</i>		<i>Pollock</i>	<i>Fuerte Floride</i>	<i>Booth 8</i>	
<i>Taylor</i>			<i>Hass</i>	<i>Collinson</i>	
			<i>Lula</i>	<i>Hall</i>	
				<i>Hickson</i>	

Légende : G : Guatémaltèque, M : Mexicaine et I : Indienne

Le comportement de dix cultivars d'avocatriers a été étudié dans une zone d'altitude de l'Ouest du Cameroun. Les observations ont porté sur la croissance, les rendements, les périodes de floraison et fructification, la sensibilité à la cercosporiose, les qualités organoleptiques et commerciales des fruits. Le cultivar Hickson s'est montré le plus intéressant pour la plupart des critères observés (Ducelier, 1989).

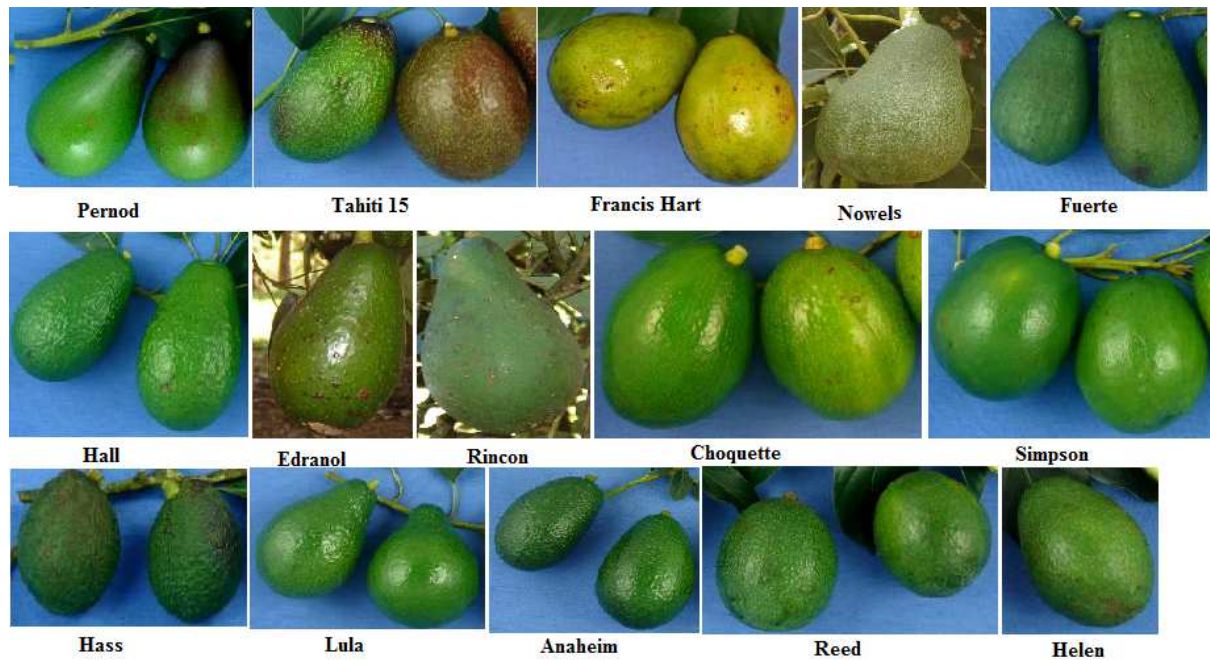


Figure 1 : Quelques cultivars d'avocat rencontrés dans le monde (IAC, 2010)

I-4 Production, consommation et exportation d'avocat au Cameroun

L'avocat est un produit très apprécié au Cameroun. En 1996, il comptait pour 14 millions de F CFA, soit 0,3% de la dépense de consommation et occupait la 10^{ème} place en termes de fruits à Douala (Hatcheu, 2003). En effet, une enquête menée dans la zone péri-urbaine de Yaoundé révèle que l'avocat est le fruit le plus représenté dans les parcelles de terrain (23,9%). En 2007, le Cameroun était le 17^{ème} pays producteur mondial d'avocats et le 12^{ème} pays consommateur d'avocats avec une consommation de 45,9 milliers de tonnes entre 2001 et 2002. La production et la consommation d'avocats au Cameroun sont en constante croissance. Selon une estimation de la FAO, la production a quadruplé de 13000 tonnes en 1962 à 52000 tonnes en 2002. Sa consommation dans la même période a également quadruplé de 11300 tonnes à 45900 tonnes, ceci en 4 décennies (figure 2) (FAOSTAT, 2010). De 1962 à

1992, l'évolution de la consommation et de la production était presque similaire. Mais après 1992, on note un écart entre la production et la consommation, en faveur de la production, qui est dû à une accélération plus importante de la production d'avocat. L'année 1993 pourrait donc être considérée comme le point de départ de l'apparition d'importantes pertes *post-récoltes* au Cameroun. Sur la base des modélisations linéaires (figure 2), la production sera de 83795 ± 1458 tonnes (Intervalle de prédiction à 95% (95% IP) étant de 77777,6 tonnes – 89952,4 tonnes) en 2035 et la consommation de 72590 ± 7690 tonnes (95% IP étant 54970 tonnes – 90474 tonnes), ce qui représente une différence de 10205 tonnes. Cet excédant de production devra être valorisé sinon il constituera les pertes *post-récoltes* liées l'avocat.

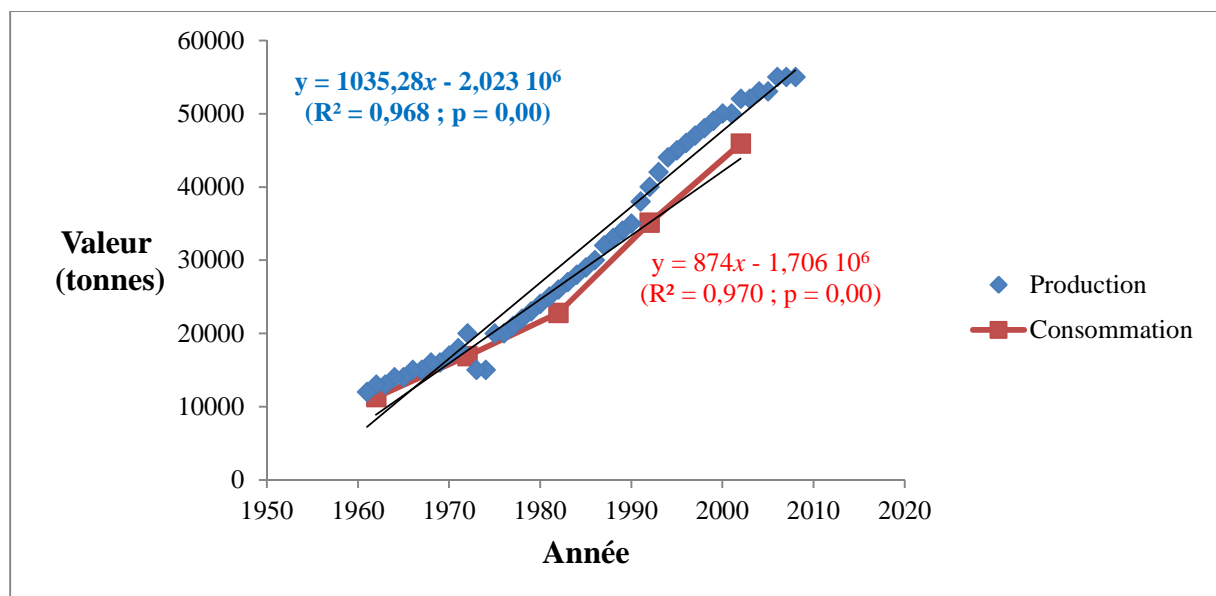


Figure 2 : Production et consommation d'avocats au Cameroun de 1960 à 2008 (FAOSTAT, 2010).

La période de grande production d'avocat au Cameroun est très courte car elle va de février à avril (Kuate et al., 2001). Les avocats de la zone du Bamboutos détiennent le monopole des hautes terres de l'Ouest-Cameroun. Le marché de Mbouda dans le département du Bamboutos, est le 2nd marché vivrier des hautes terres de l'Ouest et principal marché de collecte d'avocat d'avril à octobre (Hatcheu, 2003).

D'après l'étude menée de Temple (1999), 86,38%, soit 3890 tonnes d'avocat partiraient de l'Ouest Cameroun vers les autres régions du Cameroun et vers les pays limitrophes. Le reste proviendrait des régions du Centre, du Littoral, de l'Adamaoua, du Sud

et du Sud-Ouest (figure 3). Par ailleurs, le Cameroun a exporté 20 tonnes d’avocats vers le Tchad et 62,15 tonnes d’avocats vers la Guinée Equatoriale en 2007. Sur une plus longue distance, le marché des fruits et légumes atteindrait le Gabon et pourrait se développer vers plusieurs voies d’exportation à l’instar du port de Douala en direction de Pointe Noire, Lagos et Abidjan (Kamgaing, 2009 ; Aboubakar *et al.*, 2010).

Sur la base des données d’exportation actuelles, on a pu enregistrer une exportation d’avocats de 82,15 tonnes vers le Tchad et la Guinée Equatoriale en 2007. En prenant en compte une limite de sécurité de 10%, on peut estimer l’exportation de l’avocat dans cette période à 90,36 tonnes. En outre, sachant qu’en 2007 la production était de 55000 tonnes et en prédisant la consommation à 48250 ± 4026 tonnes (95%IP étant de 36272,6 tonnes – 60227,4 tonnes) sur la base de l’équation de prédiction en rouge (figure 2), on trouve une différence de 6882 tonnes. En faisant la soustraction à cette différence, la valeur estimée liée à l’exportation (90,36 tonnes), il reste une valeur de 6659,64 tonnes, qui représente pour cette année des pertes *post-récoltes* de 12,10% en supposant qu’aucune autre voie d’écoulement de l’avocat n’est envisagée. Si dans les années suivantes, on assiste à un ralentissement de la consommation et/ou une accélération de la production, cette perte se verra à la hausse. Il est donc important de mieux comprendre les difficultés liées au secteur de l’avocat afin de pallier à ce problème de hausse des pertes *post-récoltes*.

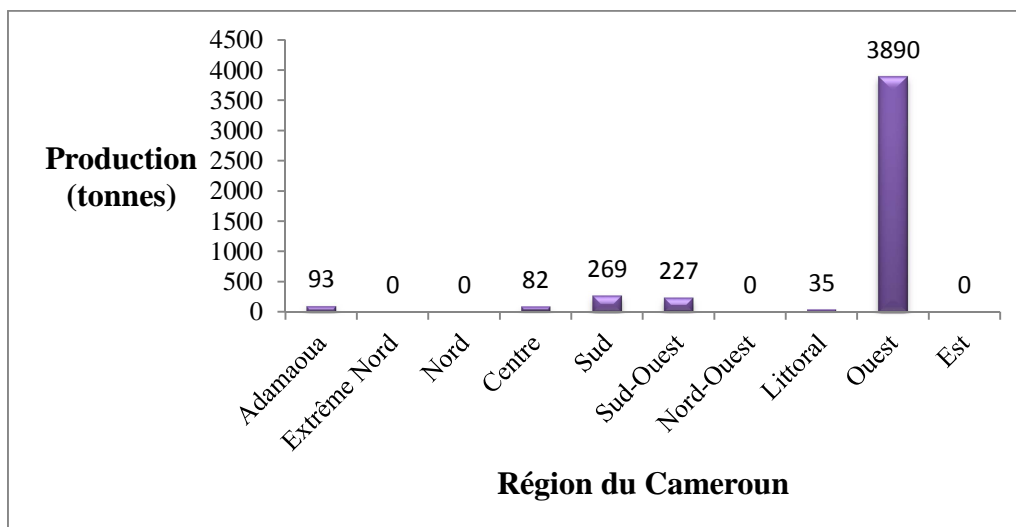


Figure 3 : Origine géographique des flux inter provinces des avocats du Cameroun en 1998 (Temple, 1999).

I-5 Contraintes et atouts du secteur de l'avocat au Cameroun

Le secteur fruits et légumes au Cameroun fait face à de nombreuses difficultés. L'avocat éprouve les mêmes difficultés à savoir : l'absence de vergers à caractère industriel, l'encadrement insuffisant des intervenants du secteur, le non élargissement du circuit de distribution, la prédominance des avocats à faible qualité sensorielle et la maîtrise limitée de la chaîne de production allant de la récolte à la consommation (Hatcheu, 2003). Néanmoins, ce secteur dispose des atouts indéniables à savoir : des conditions pédoclimatiques favorables, un marché très prometteur, des organisations professionnelles en émergence et la possibilité d'intensification des actions d'entretien et de réhabilitation des plantations (Hatcheu, 2003).

Ces atouts vont davantage permettre l'accélération de la production d'avocat mais ne permettront pas de résoudre les contraintes liées à la faible qualité sensorielle de certains cultivars d'avocats et des invendus qui sont à l'origine des écarts observés. La mise en place des voies de transformation de l'avocat, comme par exemple la production d'huile d'avocat, serait une alternative suffisamment pertinente pour réduire les pertes *post-récoltes*. Cette approche a été utilisée avec succès par certains pays tels que la Nouvelle-Zélande et USA (Requejo-Tapia, 1999).

II- Généralités sur l'huile d'avocat

II-1 Localisation structurale de l'huile d'avocat

Cummings et Schroeder (1942) ont été les premiers à mettre en évidence la présence des idioblastes à huile dans l'avocat. La présence des idioblastes à huile a été démontrée dans d'autres variétés d'avocat et dans le genre *Persea* (Platt-Aloia *et al.*, 1980). Ces idioblastes sont distribués uniformément dans le mésocarpe et représentent, en termes de volume, 2% de la portion consommable du fruit (Cummings et Schroeder, 1942). Ces idioblastes ont un diamètre de 80 μm avec une paroi de 4 μm d'épaisseur (Platt-Aloia *et al.*, 1980). Dans les fruits mûrs, ces cellules sont larges et anucléées (Platt-Aloia *et al.*, 1983). L'huile dans les idioblastes du fruit est constituée d'une unique gouttelette qui remplit la cellule alors que dans

les tissus environnants, elle est constituée de plusieurs gouttelettes (Rodriguez-Saona et Trumble, 2000).

II-2 Production mondiale de l'huile d'avocat

La production de l'huile d'avocat atteint des sommets dans les pays qui ont su faire bon usage de leur savoir-faire en matière de valorisation des produits agricoles. Ainsi en 1999, 149 000 tonnes d'avocats en Nouvelle Zélande, 94 580 tonnes d'avocats au Mexique, 930 000 tonnes en Afrique du Sud, et 3 740 tonnes aux Etats Unis ont été destinées à la production de l'huile d'avocat. Les pronostics montrent un accroissement de l'extraction de l'huile d'avocat dans ces pays dû à l'augmentation de la production de l'avocat dans les années à venir. Ceci permettra de pallier au problème d'invendus qui vont s'accroître avec l'intensification de la culture de l'avocat (Requejo-Tapia, 1999).

Au Cameroun, aucune donnée n'a été enregistrée sur la production de l'huile d'avocat. Sur la base des prévisions des pays faites plus haut, il serait important que le Cameroun s'arrime à la nouvelle donne en ce qui concerne la production de l'huile d'avocat de bonne qualité afin d'anticiper l'accroissement des pertes *post*-récoltes et promouvoir l'intensification de la production d'avocats. Cependant, des productions individuelles ont déjà été identifiées sur l'étendue du territoire national, mais pour une meilleure gestion des pertes, un approfondissement des connaissances dans l'extraction de l'huile d'avocat et de ses propriétés et une fédération des efforts permettra la mécanisation et l'industrialisation de cette production.

II-3 Facteurs influençant la teneur et la composition en lipides de l'avocat

La teneur et la composition en lipides de l'avocat dépendent de nombreux facteurs à savoir :

- ❖ Le type de variété : les variétés guatémaltèque et mexicaine ont une plus grande teneur en lipides (10 – 30%) comparée à celle indienne (3 – 10%) (Schaffer and Andersen, 1994). Dans la même variété, on a enregistré des variations de composition comme

c'est le cas de 3 cultivars de Malaisie qui présentent des profils chimiques différents (Yanty *et al.*, 2011) ;

- ❖ La taille du fruit : Une corrélation positive a été observée entre la teneur en lipides et la taille de l'avocat (Lahav et Kalmar, 1977) ;
- ❖ La saison et le climat : Les besoins énergétiques de l'avocatier font varier la teneur et la composition en lipides en fonction des conditions pédo-climatiques (Woolf *et al.*, 1999) ;
- ❖ L'état de maturité : La période de récolte a un impact considérable sur la teneur en huile des avocats (Arpaia *et al.*, 2006);
- ❖ Méthodes d'extraction : La teneur et la composition en huile d'avocat sont différentes en fonction de la technique d'extraction employée, par exemple, l'extraction à froid (la presse) ne donne pas les mêmes résultats que l'extraction à chaud (Soxhlet) (Moreno *et al.*, 2003 ; Dos Santos *et al.*, 2014).

II-4 Propriétés physicochimiques des huiles végétales

II-4-1 Composition chimique

II-4-1-1 Composition de la matière saponifiable

La matière saponifiable d'une huile comestible est la fraction grasse qui peut subir une hydrolyse alcaline à chaud. Elle fait généralement référence aux triglycérides, phospholipides et glycolipides.

II-4-1-1-1 Acides gras et triacylglycérols

Les acides gras sont des acides carboxyliques avec une longue chaîne aliphatique qui peut être saturée ou insaturée (Gunstone, 1996). Les triglycérides qui sont une association de glycérol et acides gras, possèdent une très grande gamme d'acides gras qui dans le cas de l'huile d'avocat contiennent 76% d'acides gras monoinsaturés (acides palmitoléique et oléique), 12% d'acides gras polyinsaturés (acides linoléique et linoléique) et 12% d'acides gras saturés (acides palmitique et stéarique) (Vingering *et al.*, 2010 ; Wong *et al.*, 2010 ; Akpabio *et al.*, 2011).

La structure des lipides de l'huile, plus particulièrement leur niveau d'insaturation dans les triglycérides, est un indicateur de sa stabilité oxydative (Hammond et White, 2011). La vitesse d'autooxydation d'un système polyinsaturé est plus rapide que son analogue monoinsaturé. Gunstone (1996) a montré que la vitesse d'oxydation de l'oléate de méthyle, linoléate de méthyle et linoléate de méthyle est de 1:12:25.

Une huile végétale possédant une teneur en acide linoléique inférieure à 2% est dénommée huile de friture et d'assaisonnement suivant la norme française (décret 97-298, article 3, paragraphe IV). Par ailleurs, Il a été démontré que les acides gras *oméga* 3 à très longue chaîne, les acides eicosapentaénoïque (EPA) et decosahexaénoïque (DHA), ont des effets bénéfiques sur la protection contre les maladies cardio-vasculaires et confèrent des propriétés anti-inflammatoires (Williams, 2000). Contrairement à ces derniers, les acides gras *trans* sont connus pour leur implication dans les maladies cardio-vasculaires (Mozaffarian *et al.*, 2009).

II-4-1-1-2 Phospholipides

Les phospholipides sont des esters de glycérol, d'acides gras, d'acide phosphorique et autres alcools (figure 4). Les phospholipides couramment rencontrés dans la pulpe d'avocat sont : la lysophosphatidylcholine, la phosphatidylcholine, la phosphatidylsérine, la phosphatidyléthanolamine, l'acide phosphatidique et la phosphatidylinositol (Pacetti *et al.*, 2007). Ils sont les constituants principaux des membranes cellulaires (Rock et Jackowski, 2013). Ce sont des composés alimentaires que l'on retrouve dans les huiles végétales, l'huile de soja étant la principale source. Dans les huiles végétales brutes, les phospholipides peuvent représenter 0,1 – 0,8% (1000 – 18000 mg/kg) des lipides totaux extraits (Meng *et al.*, 2014). Du fait de leur grande oxydabilité, ils sont généralement éliminés lors du raffinage de l'huile brute par dégommeage (Pan *et al.*, 2000).

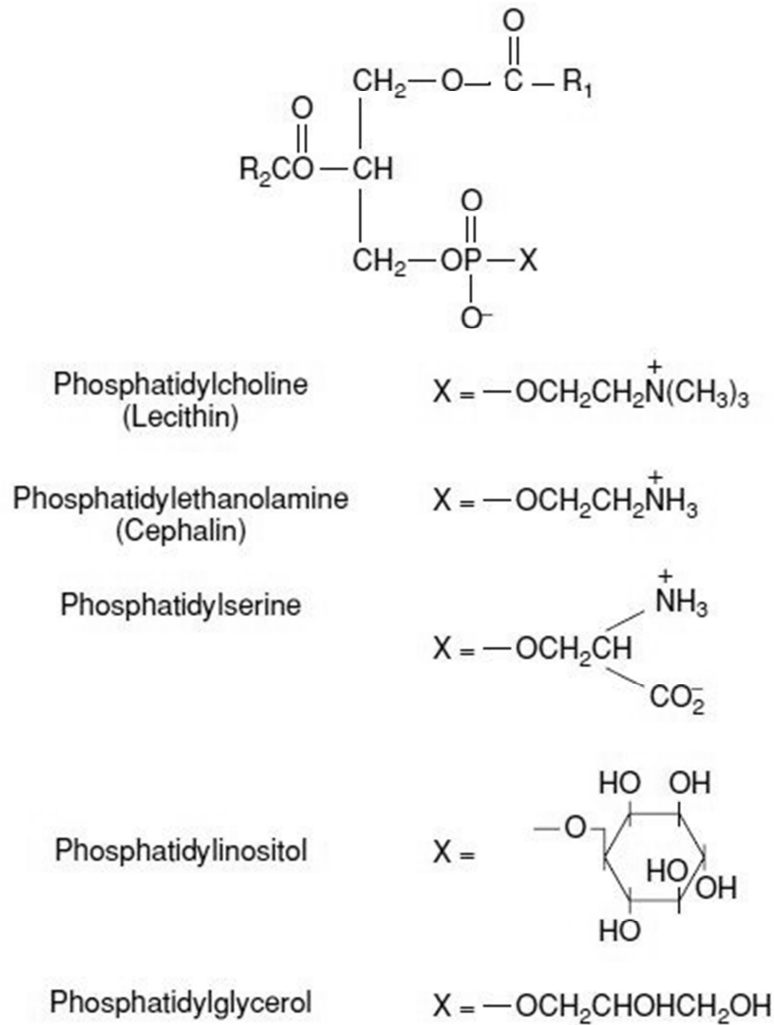


Figure 4 : Structure des phospholipides (Gordon, 2003)

II-4-1-1-3 Glycolipides

Le nom « glycolipide » est une catégorie de lipides glycosylés comme les acylglycérols, les céramides et les prényls. C'est un glycoconjugué composé d'une partie saccharidique liée à une chaîne aglycone hydrophobe (Kopitz *et al.*, 1997). Les glycolipides peuvent être divisés en glycosphingolipides, glycolipides majoritairement retrouvés chez les animaux, et en glyco-glycérolipides, abondamment rencontrés chez les bactéries et les plantes. Les glycosphingolipides représentent l'un des trois types principaux de lipides associés à la membrane cellulaire, les deux autres étant les phospholipides et le cholestérol. Les glycosphingolipides sont classés en différentes séries selon la structure centrale de leur chaîne

saccharidique (tableau II). Les séries lacto, néolacto et globo peuvent recevoir par la suite les antigènes des groupes sanguins ABO et Lewis (Kobata et Takasaki, 1992).

Tableau II : Noms et structures majeurs du radical des sphingolipides (IUPAC-IUBMB, 1998)

Séries	Symboles	Structure du radical
ganglio	Gg	Gal β 3GalNAc β 4Gal β 4Glc-
lacto	Lc	Gal β 3GlcNAc β 3Gal β 4Glc-
neolacto	nLc	Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc
globo	Gb	GalNAc β 3Gal β 4Gal β 4Glc-
isoglobo	iGb	GalNAc β 3Gal β 3Gal β 4Glc-
mollu	Mu	GlcNAc β 2Man β 3Man β 4Glc-
arthro	At	GalNAc β 4GlcNAc β 3Man β 4Glc-

Les monogalactosyldiglycérides (figure 5) sont des glycolipides largement répandus dans les feuilles des plantes et des algues. Ils possèdent une teneur élevée en acides gras polyinsaturés et jouent un rôle important lors de la photosynthèse. On les retrouve également dans le système nerveux central des mammifères. Les digalactosyldiglycérides sont présents à des faibles concentrations avec les monogalactosyldiglycérides dans la chlorophylle des plantes supérieures et algues (Gordon, 2003).

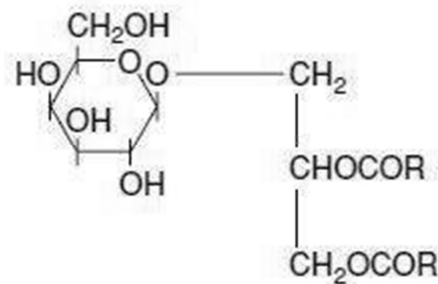


Figure 5 : Structure d'un monogalactosyldiglycéride (Gordon, 2003)

II-4-1-2 Composition de la matière insaponifiable

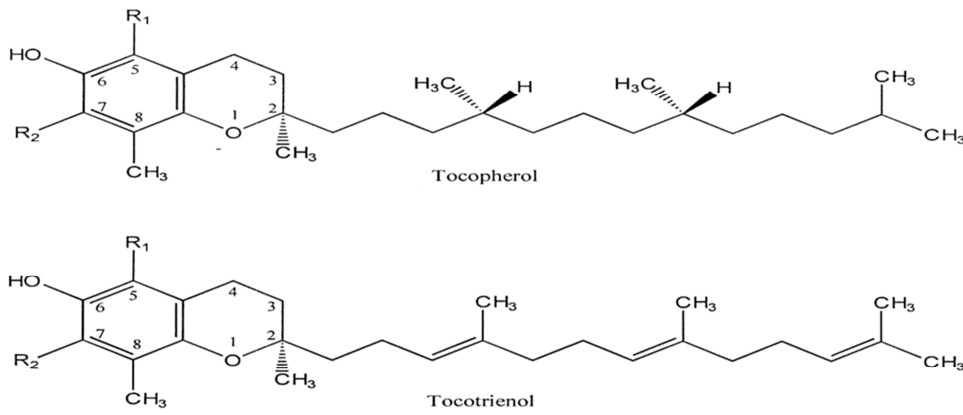
La matière insaponifiable représente 1 à 12% dans les huiles d'avocats (Botha, 2008). Elle est généralement constituée des tocophérols, de la chlorophylle, des stérols, des terpènes, des alcools et des caroténoïdes.

II-4-1-2-1 Tocophérols et tocotriénols

La Vitamine E est le terme générique pour désigner les 4 formes de tocophérols et les 4 formes de tocotriénols (figure 6). Les tocophérols et tocotriénols ont en commun un noyau chromanol. La différence se situe au niveau de la présence (tocotriénols) ou l'absence (tocophérols) d'insaturations sur la chaîne phytyle liée en position C-2 du noyau chromanol. Dans chaque catégorie, des isomères existent en position C-5 et C-7 du noyau chromanol (α , β , γ et δ). Des formes esters existent en position C-6 du noyau chromanol (Woollard et Indyk, 2003).

La forme α -tocophérol se retrouve largement dans les chloroplastes et les autres formes (β -, γ - et δ -tocophérols) dans la membrane plasmique (Hess, 1993). Contrairement à ces derniers, les tocotriénols se rencontrent dans le germe des noyaux et des céréales (Comb, 1992). Leurs apports nutritionnels conseillés sont suffisamment comblés par les populations à savoir : 3 mg chez les enfants et 12 mg chez les adultes (Woollard et Indyk, 2003). L'huile d'avocat est riche en antioxydants, le α -tocopherol (70 – 190 mg/kg d'huile) représentant l'antioxydant principal et dans une moindre mesure β -, γ - et δ -tocopherols (< 10 mg/kg d'huile) (Vingering *et al.*, 2010 ; Wong *et al.*, 2010). Lozano *et al.* (1993) ont montré que les tocophérols sont plus abondants dans la matière insaponifiable d'une huile provenant d'un avocat immature (20,1 – 45,6 mg/100 g d'huile) comparé à celle provenant d'un avocat mature (5 – 10,3 mg/100 g d'huile).

Les tocophérols sont les antioxydants les plus connus qui fonctionnent en donnant l'hydrogène de leur groupement hydroxyle aux radicaux libres. La facilité des isomères à libérer l'hydrogène se fait dans l'ordre suivant : $\delta > \beta > \gamma > \alpha$ (Murcia *et al.*, 2001).



R ₁	R ₂	Composés
CH ₃	CH ₃	α
CH ₃	H	β
H	CH ₃	γ
H	H	δ

Figure 6 : Structure des tocophérols et tocotriénols (Woollard et Indyk, 2003)

II-4-1-2-2 Stérols

Les phytostérols sont des composés mineurs que l'on retrouve dans la membrane cellulaire des fruits, graines et végétaux à des concentrations variables (Mouloungui *et al.*, 2006). Woolf *et al.* (2008) ont estimé la teneur en phytostérols de l'huile d'avocat entre 3,3 – 4,5 mg/g d'huile. Lozano *et al.* (1993) ont montré que les stérols sont plus abondants dans la matière insaponifiable d'une huile provenant d'un avocat immature (1,1 – 6,2%) comparé à celle provenant d'un avocat mature (0,8 – 2,0%).

Les stérols sont des composés isoprénoïdes avec un noyau stérol et une chaîne acyle. Lorsqu'ils ont une insaturation en position C-5, ils prennent l'appellation de Stanols (Moreau *et al.*, 2002). Les formes les plus courantes sont : les β-sitostérols (24-α-éthylcholestérol), campestérol (24-α-méthylcholestérol) et stigmastérol (Δ²²-24-α-éthylcholestérol) (figure 7). Ils existent sous forme de stérols libres, estérifiés avec des acides gras et glycosylés à un hexose (Qullez *et al.*, 2003).

Les phytostérols sont d'un grand intérêt en nutrition grâce à leur capacité à réduire le cholestérol total et le LDL-cholestérol chez les humains en inhibant l'absorption du cholestérol alimentaire et la réabsorption du cholestérol biliaire à travers le cycle

entérohépatique (Piironen *et al.*, 2002). Des études récentes menées en Hollande ont montré une corrélation positive entre la fortification des margarines en phytostérols et la réduction des maladies cardiovasculaires (Hoekstra *et al.*, 2013). La composition en phytostérols est également employée en industries alimentaires comme discriminant des types de fromages (Kim *et al.*, 2014).

Les stérols tels que les fucostérols, le Δ -5-avenastérol, le vernastérol et le citrostadiénol ont présenté des propriétés antioxydantes dans des huiles portées à 180°C (Rajalakshmi et Narasimhan, 1995) alors que le stigmastérol et le cholestérol n'ont présenté aucune activité antioxydante. Ces stérols bioactifs agiraient en libérant l'hydrogène de leur groupement hydroxyle (Gordon et margos, 1983).

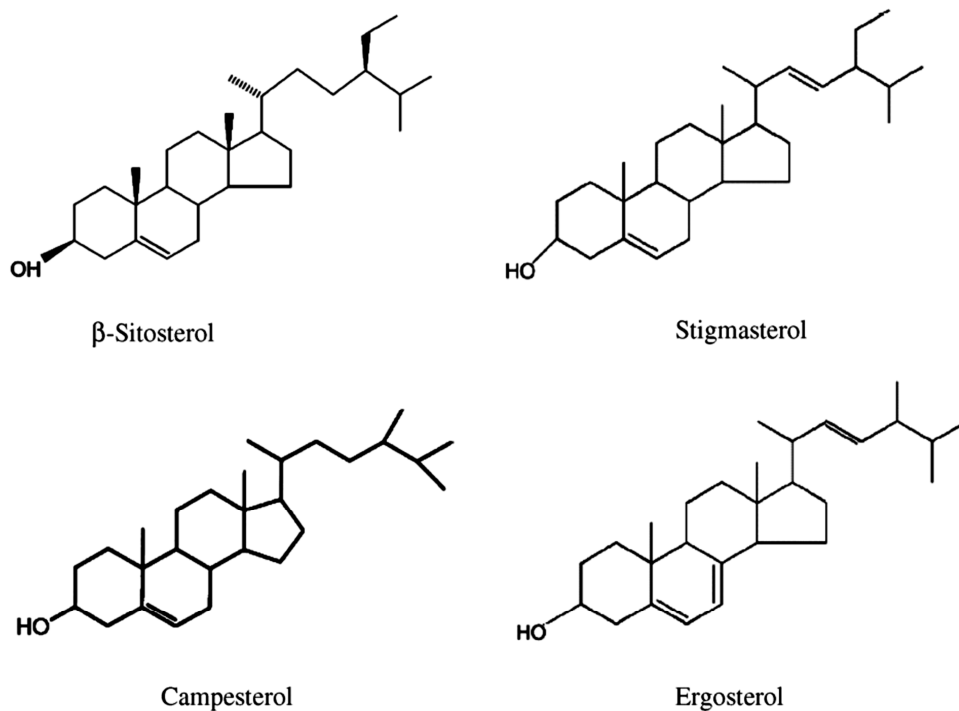


Figure 7 : Structures chimiques de quelques phytostérols (Fernandes et Cabral, 2007)

II-4-1-2-3 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules hydrophobes constituées de tetraterpènes. On les retrouve dans les chromoplastes des cellules végétales. Ce sont des pigments (rouge et jaune) responsables de la couleur de nombreux fruits, fleurs et feuilles. En fonction de leur structure chimique, on les classe en 2 catégories : les xanthophylles et les carotènes. Les caroténoïdes

sont présents dans plusieurs huiles végétales à savoir celles du maïs, coton, olive, tournesol, soja et d'avocat (Zeb et Mehmood, 2004). Dans l'huile d'avocat, les caroténoïdes ont une teneur variant entre 1 – 3,5 mg/kg d'huile (Vingering *et al.*, 2010 ; Wong *et al.*, 2010). Dans la nature, les caroténoïdes sont synthétisés par addition d'unités d'isopentyldiphosphate au diméthylallyldiphosphate pour former le geranylgeranyldiphosphate (20 carbones). 2 molécules de geranylgeranyldiphosphate se combinent pour donner le premier caroténoïde, le phytoène, qui est par la suite désaturé pour donner le lycopène que l'on retrouve dans les tomates mûres. Presque tous les autres caroténoïdes peuvent être obtenus à partir du lycopène. Sa cyclisation aboutit à la formation des α et β -carotènes qui donnent à leur tour par oxygénation les xanthophylles comme le β -cryptoxanthine, la zéaxanthine et la lutéine (figure 8) (Ishida et Bartley, 2005).

Les caroténoïdes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes par fixation de l'oxygène singulet. Ils agissent en synergie avec la vitamine E comme démontré par Schroeder *et al.* (2006) dans l'huile de palme.

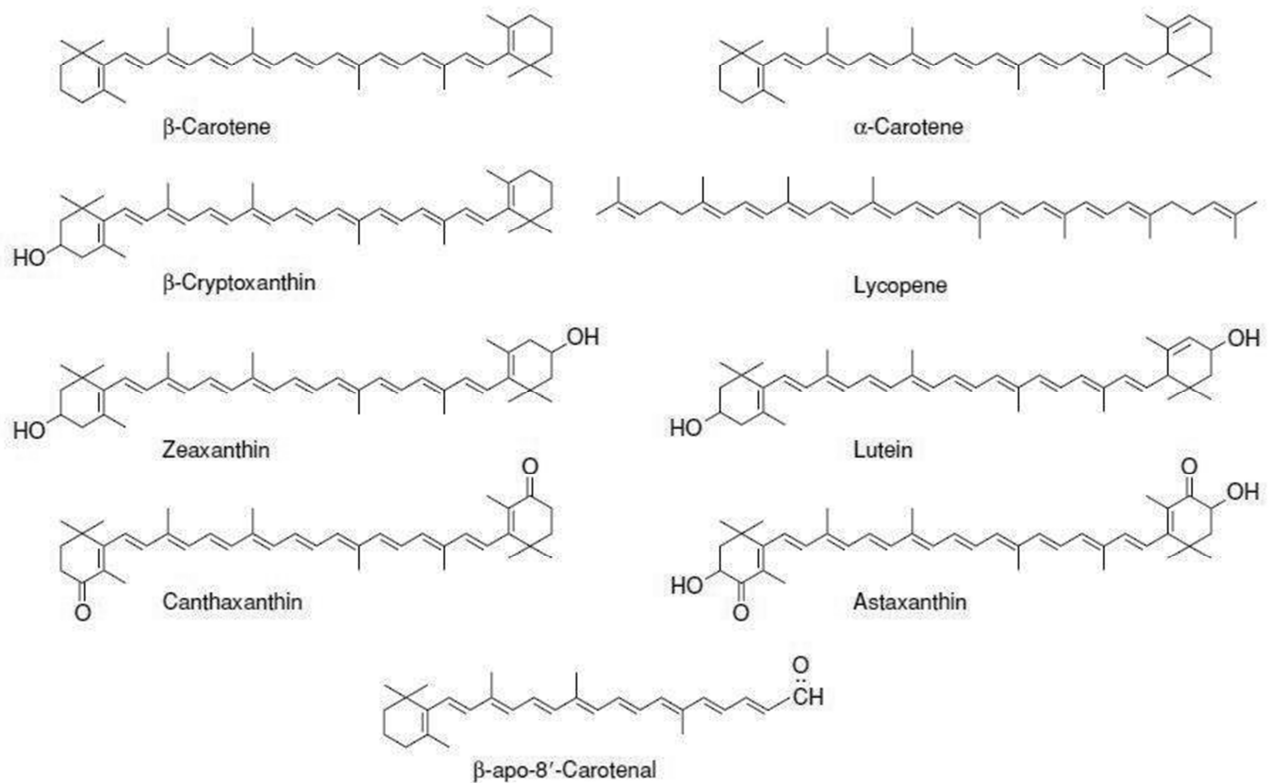


Figure 8 : Structure chimique de quelques caroténoïdes (Fur et Clark, 2003)

II-4-1-2-4 Chlorophylle

La chlorophylle et ses dérivés sont des complexes magnésiques dérivés de porphine (figure 9) (Von Elbe et Schwartz, 1996). Plusieurs types de chlorophylles et dérivés existent dans la nature à savoir : Chlorophyllides, pheophytines, pheophorbides et pyropheophytines (Gunstone, 2004). L'huile d'avocat extraite de la pulpe possède une teneur en chlorophylle comprise entre 11 – 19 mg/kg d'huile (Vingering *et al.*, 2010 ; Wong *et al.*, 2010).

La chlorophylle est généralement connue comme un prooxydant du fait de sa capacité à transférer l'énergie de la lumière à d'autres molécules pour former des produits hautement prooxydants à l'instar de l'oxygène singulet qui pourrait initier l'oxydation d'une huile végétale (Foote, 1979). D'où l'attention portée aux huiles végétales de couleur verte lors de leur conditionnement et entreposage. Paradoxalement, certains dérivés de la chlorophylle sont connus pour leurs propriétés antioxydantes. La pheophytine b et la pheophorbide possèderaient une activité antioxydante comparable à celle du BHT. Ils agiraient, non en donnant un atome d'hydrogène, mais soit en protégeant l'acide linoléique et/ou en inhibant la décomposition des hydroperoxydes (Lanfer-Marquez *et al.*, 2005). Dans le cas de l'avocat, la pelure contient une quantité considérable de chlorophylles comparée à la pulpe et au noyau mais ses chlorophylles ne présentent pas de capacité antioxydante (Wang *et al.*, 2010).

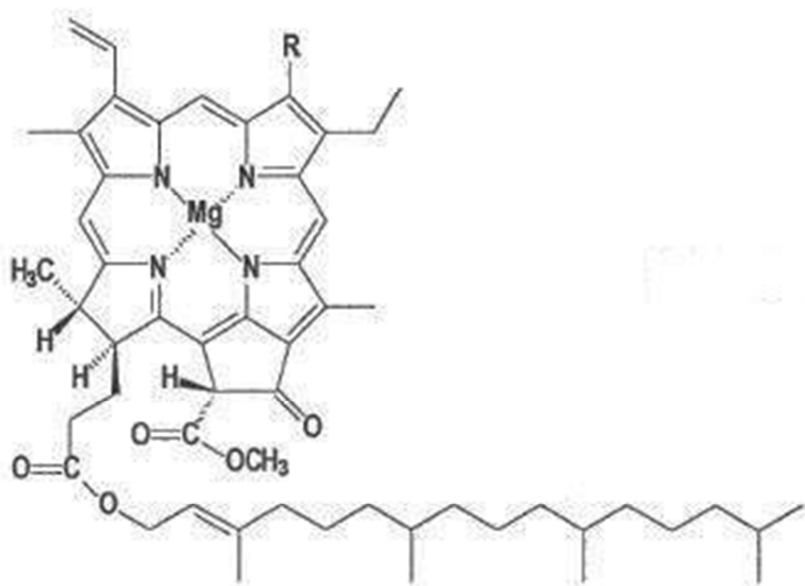


Figure 9 : Structure de la chlorophylle (Puspitasari-Nienaber *et al.*, 2002)

II-4-1-2-5 Squalène

Le squalène (figure 10) est un triterpène intermédiaire de la biosynthèse du cholestérol que l'on rencontre dans les règnes animaux et végétaux dans des proportions variables. Dans les huiles végétales, on le retrouve dans une gamme comprise entre 0,002 – 0,03% (Owen *et al.*, 2000). Une exposition importante aux radiations ultraviolettes entraîne la formation de molécules d'oxygène singulet cancérogènes pour la peau. Ainsi, la teneur élevée de squalène (par exemple dans l'huile d'olive et l'huile de requin) dans l'alimentation des populations méditerranéennes serait responsable de la faible incidence de cancer de la peau dans cette population (Watterman et Lockhood, 2007). Le squalène emploierait le même mécanisme antiradicalaire que la Vitamine E et la β -carotène. Il posséderait également des propriétés émoullientes et hydratantes très recherchées dans la formulation des produits cosmétiques (Huang *et al.*, 2009).

Il présente également un effet thermoprotecteur à des hautes températures comme dans l'huile de colza à 170°C dans une gamme de concentration allant de 0,1 à 1% (Malecka, 1994). Ceci est d'autant plus vrai qu'une enquête menée dans 21 restaurants en Grèce réalisant une friture profonde des pommes de terre avec plusieurs types d'huiles végétales (Huile de tournesol, huile de coton, huile de maïs, huile de soja, huile de palme, huile d'olive, des graisses alimentaires) a montré une rétention de 50% du squalène après 30 heures de friture (Kalogelopoulos et Andrikopoulos, 2004).

Aucune étude, à notre connaissance, n'a porté sur l'identification du squalène dans l'huile d'avocat.

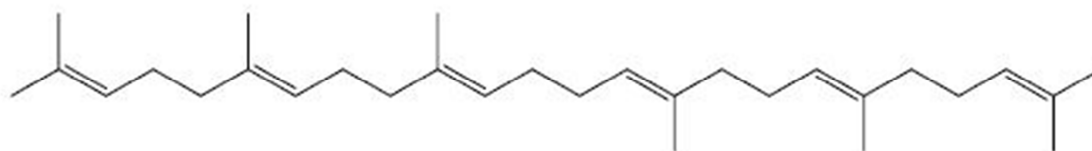


Figure 10 : Structure du squalène (Huang *et al.*, 2009)

II-4-2 Propriétés spectroscopiques

II-4-2-1 Spectroscopie UV-Vis

La spectroscopie d'absorption dans l'ultraviolet (UV) et le visible est basée sur la propriété qu'ont certaines molécules à absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. Elle ne permet pas l'identification d'un produit mais du chromophore qu'il contient. Le domaine UV-visible s'étend de 10 à 800 nm. Il se divise en 3 régions : UV-lointain (10 – 200 nm), proche-UV (200 – 400 nm) et le visible (400 – 800 nm) (Wrolstad *et al.*, 2005).

Dans une molécule, les transitions électroniques UV-visibles mettent en jeu des énergies qui sont les énergies de liaison des molécules et ces rayonnements peuvent parfois provoquer des ruptures de liaisons. Plus généralement, ils provoquent des transitions électroniques entre les différents niveaux d'énergie des molécules. Une transition UV-visible (souvent 180 à 750 nm) correspond à un saut d'un électron d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée à une orbitale moléculaire excitée vacante. La matière absorbe alors un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre le niveau fondamental et le niveau excité. Mais toutes les transitions énergétiquement possibles ne sont pas permises. Les transitions permises sont celles qui provoquent une variation du moment dipolaire électrique. En d'autres termes, le photon fait changer la symétrie de l'orbitale occupée par l'électron avant et après la transition mais ne fait pas changer le spin de cet électron. Ainsi, Les transitions électroniques correspondent au passage des électrons des orbitales moléculaires liantes ou non liantes remplies, vers des orbitales moléculaires antiliantes non remplies (Wrolstad *et al.*, 2005). On distingue donc 4 types de transition (Kumar et Viswanathan, 2013) :

- ❖ **Transition $\sigma - \sigma^*$:** La grande stabilité des liaisons σ des composés organiques fait que la transition d'un électron d'une orbitale moléculaire (OM) liante σ vers une orbitale moléculaire (OM) antiliante σ^* demande beaucoup d'énergie. La bande d'absorption correspondante est intense et située dans l'UV-lointain, vers 130 nm. Les huiles alimentaires susceptibles d'effectuer ce type de transition sont les huiles alimentaires saturées qui possèdent des liaisons carbone-carbone. Or, le domaine du

spectre ultraviolet utilisable en analyse s'étend de 190 à 400 nm. On comprend mieux pourquoi de telles huiles présenteront une faible absorption dans le proche-UV ;

- ❖ **Transition n - σ^*** : Le transfert d'un électron du doublet n d'un hétéroatome (O, N, S, Cl..) à un niveau σ^* est observé pour les alcools, les éthers, les amines ainsi que pour les dérivés halogénés. Cette transition peut être initiée vers 150 – 250 nm et c'est dans ce domaine qu'une huile saturée peut présenter un spectre d'absorption ;
- ❖ **Transitions n - π^*** : Ce type de transition a lieu dans le cas des molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé. La plus connue est celle qui correspond à la bande carbonyle située entre 270 et 280 nm ;
- ❖ **Transition π - π^*** : La transition électronique dans les composés possédant une double liaison isolée conduit à une forte bande d'absorption vers 165-200 nm. Elle se rencontre dans les huiles alimentaires mono et polyinsaturées comme l'huile de ricin, l'huile de moutarde et l'huile de Neem. Les huiles polyinsaturées absorberont davantage dans ce domaine en raison de leur abondance en insaturations. Aussi, les molécules conjuguées absorberont aisément de l'énergie comparée aux molécules non conjuguées. Plus une huile possédera des conjugaisons au sein de ses molécules, plus grand se fera le déplacement de sa longueur d'onde maximale d'absorption.

Les classes de molécules contenues dans les huiles alimentaires ont des bandes d'absorption répertoriées dans le tableau III suivant :

Tableau III : Bandes d'absorption dans l'UV-Vis des classes de molécules des huiles alimentaires

Classes des molécules	Bandes d'absorption	Références bibliographiques
Diènes et triènes conjugués	230 – 270 nm	Cerretani <i>et al.</i> , 2005
Hydroperoxydes	270 – 280 nm	Gomez <i>et al.</i> , 2011
Polyphénols	300 – 400 nm	Cerretani <i>et al.</i> , 2005
Caroténoïdes	442 – 460 nm	Standard polonais PN-A-86934, 1995
Chlorophylles	625 – 710 nm	Mińkowski <i>et al.</i> , 2010

II-4-2-2 Spectroscopie par fluorescence

La spectroscopie par fluorescence est une technique qui a été longuement utilisée en recherche analytique dans de nombreuses disciplines dont l'analyse des aliments (Karoui et Blecker, 2011). Les huiles végétales constituent une importante classe d'aliments où la spectroscopie par fluorescence a été largement appliquée. La fluorescence est une forme de photoluminescence dans laquelle une molécule, à l'état excité, absorbe des radiations UV, visibles ou du proche infrarouge et par émission d'un photon, retourne dans son état fondamental. Pour qu'une émission ait lieu, il faudrait que la valeur du spin électronique soit de 0 dans les 2 états (excité et fondamental). Cette transition se produit à une très grande vitesse, soit 10^8 s^{-1} (Lakowicz, 2006).

La fluorescence se produit généralement avec des molécules aromatiques en raison de la faible énergie de transition $\pi - \pi^*$ qu'elles sont à même d'effectuer. Les molécules possédant des groupements carbonyles ou des doubles liaisons conjuguées peuvent également être fluorescentes. Dans les huiles végétales par exemple, les fluorophores connus sont : la vitamine E, les polyphénols, les chlorophylles et les produits d'oxydation. Les tocophérols se distinguent par leur excitation vers 290 nm et une émission vers 320 nm, les chlorophylles par une excitation vers 405 nm et une émission vers 670 nm, les produits d'oxydation par une

excitation vers 365 nm et une émission vers 400 – 500 nm et les polyphénols par une excitation vers 270 nm et une émission vers 310 – 457 nm (Tena *et al.*, 2009).

L'intensité de fluorescence est fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Un spectre d'émission peut être obtenu en maintenant la longueur d'onde d'excitation constante (λ_{ex}) et en scannant les longueurs d'onde d'émission (λ_{em}), avec $\lambda_{em} > \lambda_{ex}$. L'inverse est obtenu pour le spectre d'excitation où c'est λ_{em} qui est constante et les λ_{ex} sont scannées. Mais, lorsqu'on procède à un balayage simultané des λ_{ex} et λ_{em} , on a une représentation tridimensionnelle appelée matrice d'excitation-émission (Baeyens *et al.*, 1991).

Plusieurs facteurs peuvent affecter la fluorescence d'une molécule : l'élévation de la température, la diminution de la viscosité du solvant et une concentration élevée en fluorophores vont accroître la collision entre molécules qui vont induire un phénomène d'absorption interne des molécules et ainsi aboutir à la réduction de la fluorescence (Skoog et Leary, 1994). Le phénomène de quenching est un problème couramment rencontré et qui concerne la compétition entre un fluorophore et une autre substance présente dans le système pour l'absorption des radiations. L'oxygène est le compétiteur le plus connu mais il en existe d'autres (Lakowicz, 2006).

II-4-2-3 Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une technique basée sur l'aptitude vibratoire des atomes d'une molécule. Les radiations infrarouges sont des radiations électromagnétiques comprises entre 780 nm et 1000 μ m. Le domaine de l'infrarouge se divise en trois bandes : le proche infrarouge (780 nm – 5 μ m), le moyen infrarouge (5 – 30 μ m) et l'infrarouge lointain (300 – 1000 μ m) (Stuart, 2004).

Un spectre d'infrarouge est obtenu en soumettant un échantillon à des radiations infrarouges et en déterminant la fraction de radiation incidence absorbée par cet échantillon à une énergie particulière. Cette énergie associée à un pic d'absorption correspond à la fréquence vibratoire d'une partie d'un type de molécule bien précise dans l'échantillon. Il existe plusieurs types de vibration dans l'infrarouge qui déterminent un groupement

fonctionnel ou la représentation spatiale d'un atome de la molécule. Par exemple, toute molécule qui comporte la fonction carbonyle aura une bande d'absorption entre 1800 et 1650 cm^{-1} ; celle possédant la fonction amine, une bande d'absorption entre 3400 et 3300 cm^{-1} et celle possédant une fonction phényle, une bande d'absorption entre 1600 et 1500 cm^{-1} . L'explication de la différence de fréquence réside dans la valeur constante de la force d'élongation de la liaison dans les différentes molécules. Le spectre infrarouge peut de ce fait être considéré comme une « empreinte » de la molécule (Stuart, 2004).

Le proche infrarouge et l'infrarouge lointain n'ayant eu aucune application considérable dans les huiles végétales, la suite de cette partie sera dédiée au moyen infrarouge qui a une grande importance dans les huiles végétales pour sa capacité à établir des relations structure-fonctionnalité et son aspect quantitatif. En moyen infrarouge, la spectroscopie à Transformée de Fourier (FTIR) est généralement utilisée (Stuart, 2004).

Le spectre du moyen infrarouge (4000 – 400 cm^{-1}) se divise en quatre régions : la région de l'élongation O-H, C-H et N-H (4000 – 2500 cm^{-1}), la région des liaisons triples C \equiv C et C \equiv N (2500 – 2000 cm^{-1}), la région des doubles liaisons C=C, C=O et C=N (2000 – 1500 cm^{-1}) et la région des empreintes digitales liée à des déformations de la molécule (1500 – 600 cm^{-1}) (Stuart, 2004).

La spectroscopie moyen infrarouge joue un rôle crucial dans la chimie des huiles et graisses. La bande d'absorption à 996 cm^{-1} fût la première découverte dans l'emploi de la spectroscopie moyen infrarouge dans l'identification des doubles liaisons *trans* dans les huiles (Sherazi *et al.*, 2009). Par la suite, la spectroscopie associée à la chimométrie a été largement utilisée pour identifier des empreintes spectrales dans les huiles alimentaires afin de pouvoir les classer, par exemple sur la base de leur composition en acides gras (Brodnjak-Voncina *et al.*, 2005). Par ailleurs, Elle a permis de mettre en évidence la présence de l'huile d'olive dans d'autres huiles alimentaires (De la Mata *et al.*, 2012). Elle peut servir également à contrôler la stabilité oxydative des huiles végétales et prédire leur indice de peroxyde (Pizarro *et al.*, 2013). Elle a également mis en exergue l'impact de différentes méthodes d'extraction

(extractions au solvant et à la presse) sur la présence d'acides gras *trans* dans les huiles d'avocat des cultivars Hass, Criollo et Fuerte (Ariza-Ortega *et al.*, 2010). En outre, Cette méthodologie permet d'identifier des contrefaçons issues d'ajout d'huiles de tournesol, de canola et de soja dans l'huile d'avocat (Quiñones-Islas *et al.*, 2013).

II-4-3 Autres propriétés chimiques de l'huile d'avocat

Il existe d'autres indicateurs chimiques qui renvoient à l'acidité (indice d'acide), au degré d'impuretés (indice d'acide, indice d'ester et indice de saponification), la conduite du raffinage (portion insaponifiable) et au degré d'insaturation (indice d'iode) dans une huile végétale. Ces paramètres pour l'huile d'avocat sont consignés dans le tableau IV :

Tableau IV : Quelques propriétés physicochimiques de l'huile d'avocat (Pushkard *et al.*, 2001; Kameni and Tchamo, 2003; Ikhuoria and Maliki, 2007)

Indicateurs chimiques	Valeurs
Indice d'acide	1,23 - 4,5
Indice de saponification	178,3 – 246,84
Indice d'iode	42,66 - 86,6
Teneur en insaponifiable	15,25 - 22,1%
Indice d'ester	241,64

II-4-4 Propriétés physiques

Les propriétés physiques d'une huile végétale apportent une appréciation rapide sur la composition des huiles et sur le traitement technologique qu'elles peuvent subir. Par exemple, la viscosité d'une huile augmente avec son degré de polymérisation et la longueur de chaîne de ses acides gras, mais elle est également déterminante lors de la friture et la filtration de l'huile (Gertz *et al.*, 2000). Elles permettent également de mettre en évidence des fraudes pour des huiles possédant une composition presque identique comme c'est le cas, de l'huile d'olive extra-vierge qui est contrefaite par ajout d'huile de noisette présentant une composition presque similaire à l'huile d'origine. La contrefaçon est identifiée lors de l'analyse calorimétrique différentielle par l'accroissement de l'enthalpie de cristallisation de l'huile d'olive extra-vierge et la disparition progressive d'un évènement exothermique à -27°C due à

l'augmentation de la concentration d'huile de noisette (Chiavaro *et al.*, 2008). La couleur peut également permettre d'identifier des contrefaçons dans les huiles végétales. C'est le cas par exemple des huiles de palme et de ricin qui peuvent être détectées dans l'huile de tournesol par l'analyse colorimétrique à 450 nm. Cette détection se caractérise par une augmentation de l'absorbance due à la présence d'huiles étrangères. La sensibilité de l'analyse colorimétrique augmente lorsqu'elle est combinée à l'analyse en composante principale (ACP). Sa sensibilité atteint une valeur de 5% en composition pour les 2 huiles dans l'huile de tournesol (Durga Karthik *et al.*, 2014).

Quelques propriétés physiques de l'huile d'avocat ont été consignées dans le tableau V :

Tableau V : Quelques propriétés physiques de l'huile d'avocat (Pushkard *et al.*, 2001; Kameni and Tchamo, 2003; Ikhuoria and Maliki, 2007; Akpabio *et al.*, 2011)

Indicateurs physiques	Valeurs
Point de fumée	145 – 165°C
Point de cristallisation	4 – 8°C
Point de fusion	31 – 33°C
Humidité (%)	1,2
Index de réfraction (28°C)	1,40 – 1,46
Densité spécifique (28°C)	0,9 – 0,93
Viscosité (poise)	0,357
Couleur	Vert jaunâtre

II-5 Quelques propriétés fonctionnelles et biologiques de l'huile d'avocat

L'huile d'avocat est utilisée comme émolliente, protectrice et régénératrice en cosmétique (Rabasco et Rodriguez, 2000). En effet, De Oliveira *et al.* (2013) ont montré que l'huile d'avocat accroissait la synthèse du collagène et réduisait l'activité inflammatoire des cellules lors du processus de cicatrisation chez les rats.

Des essais menés sur les capacités de l'huile d'avocat à posséder une activité athérogénique et à amoindrir la sévérité de l'athérosclérose chez des lapins ont été démontré par Kritchevsky *et al.* (2003). Une autre étude a montré que la supplémentation de

l'alimentation de rats à la dose de 1 mL d'avocat/250 g de poids corporel atténuait les altérations induites par le diabète de type I et le stress oxydatif au niveau du transfert d'électron du complexe II au complexe III de la chaîne de transporteurs d'électrons située dans les mitochondries rénales (Ortiz-Avila *et al.*, 2013).

L'huile d'avocat a fait l'objet de formulations de sa matière insaponifiable avec celles de l'huile d'olive. Ces formulations ont pour but de lutter contre les maladies articulaires, ostéoarthrite et la schistosomiase dans des modèles animaux. Une formulation d'insaponifiables d'avocat et de soja (6 g/jour) a permis de réduire de manière significative la dégradation du cartilage articulaire et une hémorragie synoviale chez 8 chevaux auxquels on a induit une ostéoarthrite. L'effet curatif a pu être noté après 8 semaines d'administration (Frisbie *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'administration de 300 mg/kg d'une formulation d'insaponifiables d'avocat et soja chez des souris atteintes de schistosomiase (*Schistosoma mansoni*) a permis de réduire la charge parasitaire de 30,2% dès le premier jour de l'étude. Cette formulation a présenté une activité anti-inflammatoire durant les 9 semaines d'expérimentation en abaissant le taux de cytokines, d'interférons- γ et interleukine-4 (Soliman, 2012). Il a également été prouvé que les caroténoïdes contenus dans l'avocat (extrait acétonique) ont la capacité d'arrêter la multiplication des cellules cancéreuses de la prostate humaine à la phase G2/M de la division cellulaire (Lu *et al.*, 2005).

L'huile d'avocat est connue pour être toxique pour de nombreux organismes allant des champignons aux insectes. Elle contient en effet une molécule, la persine, une acétogénine aux propriétés antifongiques à la concentration de 1600 $\mu\text{g/mL}$. Elle inhibe le développement de *C. gloeosporioides* qui cause l'antracnose chez l'avocatier. Elle possède également des propriétés insecticides contre *Bombyx mori L.* à la concentration de 200 $\mu\text{g/g}$ (Rodriguez-Saona et Trumble, 2000).

III- Procédés d'extraction et travaux antérieurs sur l'extraction d'huile d'avocat

III-1 Extraction par presse

L'extraction à la presse est un procédé qui permet d'obtenir de l'huile végétale à l'aide d'une pression exercée sur le matériel végétal. C'est la méthode d'extraction la plus vieille et la plus simple utilisée dans l'extraction des huiles végétales. Aucun produit chimique n'est utilisé. Il existe deux types de procédés d'extraction par pression : Le procédé discontinu et le procédé continu. Le premier procédé utilise des presses hydrauliques de type Marseillaises, Anglo-américaines ou à cages. Le deuxième procédé utilise des presses mécaniques composées généralement de deux vis sans fin (Achaya, 1994).

La presse mécanique dans la pratique commune comporte deux étapes : la préparation et l'extraction. La phase de préparation consiste au nettoyage, rupture, broyage et traitement thermique afin d'amener le matériel à extraire dans un état optimal pour être pressé (Fils, 2000). Le processus thermique s'effectue généralement entre 90 et 115°C pour dénaturer les protéines et ainsi accroître le recouvrement de l'huile. Enfin, l'extraction est faite par presse à vis qui peut permettre le recouvrement jusqu'à 71-82% d'huile. L'huile obtenue par pression est dite de première pression. Le tourteau rejeté contient encore une partie plus au moins importante de l'huile résiduelle. Cette dernière peut être extraite par solvant ou par pression après chauffage du tourteau ; cette huile est communément appelée huile de seconde pression. (Gunstone, 2004).

Depuis des décennies, plusieurs chercheurs se sont lancés dans la production de l'huile d'avocat employant diverses méthodes d'extraction. La plus lointaine extraction de l'huile d'avocat remonte à 1934 où Eaton et Ball ont extrait l'huile d'avocat à partir des pulpes par simple presse (20,7 à 27,6 MPa) sans prétraitement thermique. Ensuite Dean (1938) à procéder à l'utilisation d'un prétraitement thermique à la vapeur. La presse hydraulique a par la suite été utilisée par Love (1942) suivie d'une extraction au solvant de l'huile d'avocat sur les tourteaux obtenus pour accroître son rendement. La méthode par presse hydraulique permet un recouvrement de l'huile d'avocat de 94%.

III-2 Extraction par les solvants organiques

L'extraction par les solvants des huiles est un procédé qui met en contact la matière oléagineuse à traiter avec un solvant approprié. L'extraction par solvants organiques volatils reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (Kim et Lee, 2002).

Le choix du type de solvant dépend de la solubilité du soluté dans le solvant, sa capacité à conduire le procédé d'extraction et à assurer un rendement maximum. Il a été démontré que l'extraction par les solvants organiques présente l'avantage d'obtenir une teneur résiduelle beaucoup plus faible en huile dans la matrice solide par rapport à l'extraction à la presse (Goss, 1946). Le broyage, le traitement thermique, le pressage ou l'écaillage sont les opérations préliminaires effectuées avant l'extraction par les solvants organiques afin de rompre les cellules porteuses d'huile, ce qui la rend facilement accessible. Au cours de l'extraction aux solvants, deux processus sont responsables de la sortie de l'huile : Dans la première étape, qui est relativement rapide, l'extraction de l'huile se fait principalement par diffusion. Lors du contact entre la matrice oléagineuse et un solvant, le solvant diffuse à travers la matrice et extrait l'huile facilement disponible à partir des cellules rompues. Dans le second procédé, l'élimination de la quantité résiduelle d'huile se produit par osmose ou lessivage pendant un temps assez long (Goss, 1946).

L'huile d'avocat a été sujette à l'extraction aux solvants organiques. L'extraction à l'hexane (60°C pendant 2 h) et à l'éthanol (78°C pendant 2 h) donne des rendements d'extraction de 23,9% et 42% respectivement (Adama et Edoga, 2011). Ariza-Ortega *et al.* (2013) ont montré qu'une extraction hexanique menée à 69°C pendant 4 h donnait un rendement d'extraction de 90%.

Malgré ces rendements importants, l'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement (Bargale, 1997).

III-3 Extraction aqueuse

L'extraction aqueuse est une variante de l'extraction par solvants qui utilise l'eau comme solvant d'extraction. Apparue dans les années 50, elle représente la méthode la plus en vue à ce moment car elle permet le recouvrement simultané de l'huile et des protéines. Ces derniers étant détruits lors des traitements précédents. Elle limite également la destruction de la couche d'ozone comparé à l'utilisation des solvants organiques. Contrairement à ces derniers, elle s'appuie non pas sur la dissolution de l'huile mais sur l'immiscibilité de l'huile dans l'eau. Après diffusion de l'huile de la matrice végétale, la théorie voudrait qu'il y ait démixtion de phase du fait de l'instabilité thermodynamique du mélange. Le procédé répond à la méthode de flottation à l'eau chaude qui repose sur les étapes suivantes : conditionnement de la matière végétale, broyage, extraction de l'huile par de l'eau bouillante, recouvrement de l'huile et séchage (Rosenthal *et al.*, 1996).

La mise en place d'une émulsion stable huile dans l'eau, liée notamment à la présence d'agents tensioactifs tels que : les phospholipides, les glycolipides ou les protéines, rend cette opération d'extraction délicate. De plus, la structure complexe de la matrice végétale est un obstacle à la pénétration de l'eau. Et enfin, la physicochimie de la pulpe implique qu'un nombre considérable de variables va influencer sur les rendements d'une telle extraction qui s'avèrent globalement assez faible (Rosenthal *et al.*, 1996).

Les principaux paramètres influençant ce rendement sont les suivants : la finesse du broyage et sa réalisation (broyage à sec ou humide), le temps, la température, le pH et le ratio solide/eau lors de l'extraction. Une étude menée par Rosenthal *et al.* (1998) a montré que les conditions optimales pour l'extraction de l'huile de soja lors d'un tel procédé étaient les suivantes : température 50°C, temps d'extraction 15 min, ratio graines/eau 1/10 et pH 8,0. Cette approche conduirait à un rendement en huile de 60%.

Werman et Neeman (1987) ont investigué l'extraction de l'huile d'avocat par centrifugation et ont retenu comme conditions optimales d'extraction : température 75°C, pH 5,5 et NaCl 5% pour un rendement d'extraction de 75,3%. Buenrostro et Lopez-Munguia (1986) ont été les premiers à employer un mélange d'enzymes (polygalacturonase, α -amylase

et protéase) comme prétraitement avant de procéder à l'extraction de l'huile par centrifugation. Cet emploi d'enzymes était justifié car sans elles, ils obtenaient un rendement de 2%. Les conditions optimales dans ce cas étaient : température 65°C, temps 1 heure et ratio de pulpe/eau 1/5 pour un rendement d'extraction de 65%. Bizimana *et al.* (1993) ont rapporté un rendement d'extraction entre 70 et 80% par centrifugation dans les conditions opératoires suivantes : température 78 – 98°C, pH 5,5, ratio pulpe/eau 1/5 avec emploi de 5% de CaCO₃ et CaSO₄.

III-4 Extraction par les fluides supercritiques

L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique utilise de manière majoritaire le dioxyde de carbone (Khajeh *et al.*, 2005). D'autres travaux de recherches montrent l'utilisation de l'eau dans son état supercritique (Deng *et al.*, 2005). Dans cette opération, il se produit un transfert de masse par emploi du fluide à des valeurs critiques de température et de pression afin de porter le solvant à un état de la matière intermédiaire entre liquide et gazeux à chaque stade du processus. Ceci lui confère d'extraordinaires propriétés d'extraction (Gomez et De la Ossa, 2002). La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression - détente. En outre, des températures d'extraction basses sont utilisées dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. L'innocuité, l'inertie et l'ininflammabilité du CO₂ sont également des raisons qui encouragent son utilisation. Le frein du développement de cette technologie est le coût élevé des appareillages liés à l'application de pressions élevées (Lagunez, 2006).

Cette méthode a été utilisée dans l'extraction d'huiles de plusieurs oléagineuses à savoir : l'huile de germe de blé (Piras *et al.*, 2009) et l'huile de sésame (Corsoa *et al.*, 2010). Il a été rapporté que cette méthode permettait d'accroître la teneur en tocophérols (458,7 µg/g d'huile) dans l'huile de noisette comparée à la méthode d'extraction à l'hexane (382,2 µg/g d'huile) (Bernado-Gil *et al.*, 2002). Plus récemment, l'huile d'avocat s'est vue produite par le biais de l'extraction au dioxyde carbone supercritique (Botha, 2008). La température

d'extraction était de 37°C avec une pression 135 atm pour un temps d'une heure. Le rendement d'extraction d'huile d'avocat obtenu sur des pulpes d'avocat séchées à 80°C était de 60,4%.

III-5 Nouvelles avancées dans l'extraction des huiles végétales

III-5-1 Emploi des prétraitements

Afin d'accroître le rendement d'extraction d'huile de certaines oléagineuses, on a vu apparaître de nouvelles techniques de prétraitement de la matière première avant extraction à savoir :

- ❖ **Prétraitement enzymatique :** Le choix de l'enzyme est très important car elle est déterminante pour la rupture de la paroi cellulaire dont la constitution varie en fonction du végétal (Chen et Diosady, 2003). Ces enzymes couramment utilisées sont des pectinases, des cellulases et des hémicellulases (Ranalli *et al.*, 2003). L'utilisation des enzymes dans l'extraction de l'huile de sésame a permis d'accroître le rendement d'extraction de 12,3% à 16,5 – 24,8% (Latif et Anwar, 2010) ;
- ❖ **Prétraitement aux ultrasons :** L'emploi des ultrasons est également un bon moyen pour accroître l'efficacité d'extraction. Goula (2013) a utilisé les ultrasons comme prétraitement lors de l'extraction d'huile de grenade. Une fréquence de 20 KHz pendant 2 à 40 min a permis de faire passer le rendement de 20% à 59,8%.
- ❖ **Prétraitement aux micro-ondes :** les micro-ondes sont des radiations électromagnétiques de fréquences comprises entre 0,3 – 300 GHz (Camel, 2001). Les micro-ondes grâce à leur champ électrique vont générer de la chaleur par rotation dipolaire et conduction ionique qui vont rompre les liaisons et par conséquent la paroi végétale (Sinquin *et al.*, 1993). L'utilisation de l'extraction à l'hexane assistée de microondes d'une fréquence de 2,45 MHz a permis d'accroître le rendement de l'huile de coton et l'huile de ricin (Taghvaei *et al.*, 2013).

III-5-2 Extraction par les agro-solvants

L'extraction par agro-solvants est un procédé de production d'huile végétale utilisant des solvants d'origine végétale. Leur émergence comme solvants de substitution a été

encouragée par la toxicité, l'inflammabilité et la consommation d'énergie des solvants conventionnels. Issus de matières premières renouvelables, ils présentent l'avantage d'offrir une alternative aux ressources fossiles et un bilan environnemental positif. Les agro-solvants se regroupent en différentes catégories : ceux issus des filières céréalières/sucrières (éthanol, sorbitol, lactate d'éthyle et l'acide succinique), ceux issus des filières oléo-protéagineuses (carbonate de glycérol et esters méthyliques), et ceux issus de la filière bois (d-limonène, α et β -pinène) (Fine *et al.*, 2013).

Le Soxhlet au d-limonène assisté par micro-ondes a été utilisé pour extraire l'huile d'olive. Les résultats obtenus par les deux techniques d'extraction ont montré que le rendement d'extraction obtenu avec le d-limonène a été légèrement supérieur à celui obtenu avec le n-hexane. Cette différence s'explique par le caractère légèrement moins polaire du n-hexane vis-à-vis du d-limonène et d'un pouvoir solvant plus marqué envers les triglycérides de ce dernier (Virot *et al.*, 2008).

III-5-3 Utilisation de la Méthodologie des Surfaces réponses (MSR)

La méthodologie des surfaces réponses est un ensemble de techniques statistiques et mathématiques faisant partie des plans expérimentaux destinés à analyser le comportement d'un système expérimental dans le but d'en comprendre et améliorer le fonctionnement à travers la modélisation d'une réponse d'intérêt par rapport aux facteurs susceptibles de l'influencer (Montgomery, 2005). En général, une telle relation n'est pas connue mais elle peut être approximée grâce à l'utilisation d'un modèle polynomiale de faible degré qui s'écrit comme suit (Khuri et Mukhopadhyay, 2010) :

$$y = f(x_1, \dots, x_n) + \varepsilon$$

x_1 et x_2 sont les variables indépendantes, y est la variable dépendante et ε est l'erreur expérimentale dont on suppose être distribué normalement avec une moyenne de 0 et une variance de s^2 .

Dans cette procédure d'approximation, la fonction $f(x_1, \dots, x_n)$ peut être décrite par l'un des plus simples modèles de régression qui est le modèle du 1^{er} degré qui s'écrit comme suit (Khuri et Mukhopadhyay, 2010) :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

Lorsqu'il est insuffisant pour rendre compte avec efficacité de la réalité expérimentale, il est courant d'utiliser un modèle du second degré incluant des effets quadratiques des facteurs en présence (Khuri et Mukhopadhyay, 2010):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon$$

Le modèle choisi, les données doivent être collectées en utilisant un plan d'expérience approprié. Une fois collectée, la méthode des moindres carrés est employée pour estimer les paramètres dans le modèle polynomial. Ces paramètres seront par la suite jugés à l'aide des outils classiques de régression linéaire multiple. Les objectifs de la méthodologie des surfaces réponses peuvent être les suivants (Bradley, 2007) :

- ❖ Comprendre la topographie de la surface réponse (maximum local, minimum local, les lignes ridges) ;
- ❖ Trouver la région où la réponse optimale se situe. Le but est de se déplacer de manière rapide et efficace sur le chemin optimal pour déterminer la réponse maximale et minimale qui permettra d'identifier la réponse optimale.

III-5-3-1 Criblage des variables

Plusieurs variables peuvent affecter la réponse d'un système. Vouloir identifier et évaluer la contribution de chacune de ces variables est impossible. Il est donc important d'identifier les variables et leurs interactions qui influencent significativement la réponse. Les plans factoriels et fractionnaires peuvent être utilisés à cet effet vu qu'ils sont efficaces et

économiques (Lundstedt *et al.*, 1998). Cette phase intervient donc souvent en début d'étude expérimentale.

Il est important de noter qu'afin de faciliter la détermination des optima, les variables indépendantes sont codées dans un intervalle compris entre -1 et +1, et le point 0 représentant la valeur centrale (Bradley, 2007).

III-5-3-2 Quelques modèles couramment employés

On classe en général les modèles en 2 groupes comme précédemment mentionnés : les modèles du premier degré et les modèles du second degré. Les modèles du premier degré les plus couramment rencontrés sont les suivants (Khuri et Mukhopadhyay, 2010) :

- ❖ **Plans factoriels 2^k .** Dans un tel plan les variables indépendantes sont mesurées à 2 niveaux à savoir -1 et +1. On réalise par la suite toutes les combinaisons des k facteurs retenus présentant 2 niveaux, ce qui représente 2^k traitements ;
- ❖ **Plan de Plackett-Burman.** Cette méthodologie a été développée pour des plans ayant un nombre important d'essais et plus particulièrement lorsque le nombre d'expériences est un multiple de 4. Ainsi, il peut être utilisé lorsque le nombre de facteurs est par exemple de 3, 7, 11 et 15. Ce type de plan est une forme de plans factoriels fractionnaires 2^{k-q} qui sont réputés pour être économiques ;
- ❖ **Plan de type Simplex.** Ils sont très employés dans la formulation de produits alimentaires et ont une correspondance étroite avec les modèles polynomiaux. Dans le cas d'un mélange à k constituants, le simplex-lattice permet une modélisation à l'aide d'un modèle polynomial de degré m sous forme canonique notée {k,m}. Les proportions de chacun des k constituants prennent m+1 valeurs uniformément espacées de 0 à 1. Ce type de plan est un plan de mélange.

Les modèles du second degré les plus couramment rencontrés sont (Bezerra *et al.*, 2008 ; Khuri et Mukhopadhyay, 2010) :

- ❖ **Les plans factoriels 3^k .** Pour cette planification d'expériences, on a 3 niveaux (-1, 0, +1) pour chacun des k facteurs. Ce qui rend le nombre d'expériences très important

d'où leur substitution par des plans réduits tels que : les plans composites centrés, Box-Behnken et Doehlert. Ils sont plus fréquemment employés en chromatographie.

- ❖ **Les plans Composites Centrés.** Introduits par Box et Wilson, ils sont constitués de points factoriels (2^k ou 2^{k-q}), les points centraux et les points axiaux ($\alpha = 2^{k/4}$, où k est le nombre de facteurs). Le nombre d'expériences est égal à $k^2 + 2k + C_p$, où k est le nombre de facteurs et C_p le nombre de points centraux ;
- ❖ **Le plan de Box-Behnken.** Ce plan provient d'un sous-ensemble d'un plan factoriel 3^k . le nombre d'expériences est égal à $2k(k-1) + C_p$, où k est le nombre de facteurs et C_p le nombre de points centraux. Les facteurs présentent 3 niveaux équidistants.

D'autres plans du second degré existent mais ne sont pas fréquemment utilisés tels que Doehlert, Roquemore, Box-Draper et Hoke (Khuri et Mukhopadhyay, 2010).

Le choix d'un plan d'expérience dépend de la propriété recherchée. Les propriétés les plus couramment rencontrées sont : l'orthogonalité et la rotation. L'orthogonalité permet d'endiguer le problème de multicolinéarité dans les modèles et s'assurer que l'erreur expérimentale est normalement et indépendamment distribuée. Par contre, la rotation permet à la variance du résidu de rester constant (Khuri et Mukhopadhyay, 2010).

III-5-3-3 Evaluation de l'adéquation du modèle

Lorsque l'on développe un modèle, il est important de s'assurer de sa qualité ainsi que de sa capacité à approximer la réponse réelle. Les outils généralement employés sont :

- ❖ **Le test de normalité.** Cet indicateur est la condition pour la réalisation de l'analyse de régression. En effet, une erreur expérimentale doit être normalement et indépendamment distribuée avec une moyenne de 0 et une variance de s^2 . Ceci est vérifié en traçant la probabilité normale en fonction de celle du résidu. Si les points se rapprochent de la courbe alors l'hypothèse de normalité est vérifiée et on peut ainsi passer à l'étape suivante (Bradley, 2007) ;
- ❖ **L'analyse de variance.** L'idée centrale ici est de comparer la variation des traitements (combinaisons des différents niveaux des paramètres) à celle de l'erreur

aléatoire inhérente à la mesure des réponses. Il est ainsi possible de déterminer la significativité des paramètres en rapport avec la réponse (Bradley, 2007) ;

- ❖ **L'analyse de régression.** Dans cette partie, il est question d'évaluer la significativité des paramètres à travers la comparaison du rapport de Fisher observé F à la distribution de Fisher. Si le rapport F observé est supérieur au F de la table de distribution pour un paramètre, alors ce dernier est significatif (Bradley, 2007) ;
- ❖ **Le test de manque d'ajustement.** Ce dernier test permet de s'assurer de l'adéquation du modèle employé pour décrire les données collectées. S'il est non significatif, cela montre que le modèle utilisé est le meilleur (Bradley, 2007) ;
- ❖ **Les coefficients de détermination.** Ils servent à expliquer la proportion de la variabilité de la réponse par rapport à celle des variables indépendantes. Ils varient entre 0 et 1. Lorsque les coefficients de détermination (ajusté et non ajusté) sont proche de 1, cela traduit une bonne estimation du modèle par rapport à la réponse, et proche de 0 l'inverse. Le R^2 non ajusté a cette tendance à augmenter par ajout des variables dans le modèle, c'est dans cette perspective que le R^2 ajusté, plus stable, lui est adjoint afin de pallier à ce problème. Si le R^2 ajusté est proche du R^2 non ajusté cela signifie que les variables présentes dans le modèle sont celles qui influencent significativement la réponse (Bradley, 2007);
- ❖ **Le test de Mallows Cp.** Plus rarement employé, il joue également le même rôle que le R^2 ajusté qui est celui de discriminer les facteurs influençant le modèle. Pour chaque combinaison de facteurs possible pouvant entrer dans le modèle, il existe un indicateur de Mallows Cp. L'indicateur de plus faible valeur correspond à la combinaison de paramètres jugée apte à faire partie du modèle ;
- ❖ **Représentations graphiques.** L'examen des courbes de surfaces réponses et d'iso-réponses peut également confirmer l'hypothèse d'adéquation du modèle. Une représentation de la courbe de surface réponse ou d'iso-réponse bidimensionnelle ou plan traduit l'existence d'une équation du premier degré (figure 11F). L'inverse indique l'existence d'une équation du second degré (figure 11E) (Bradley, 2007).

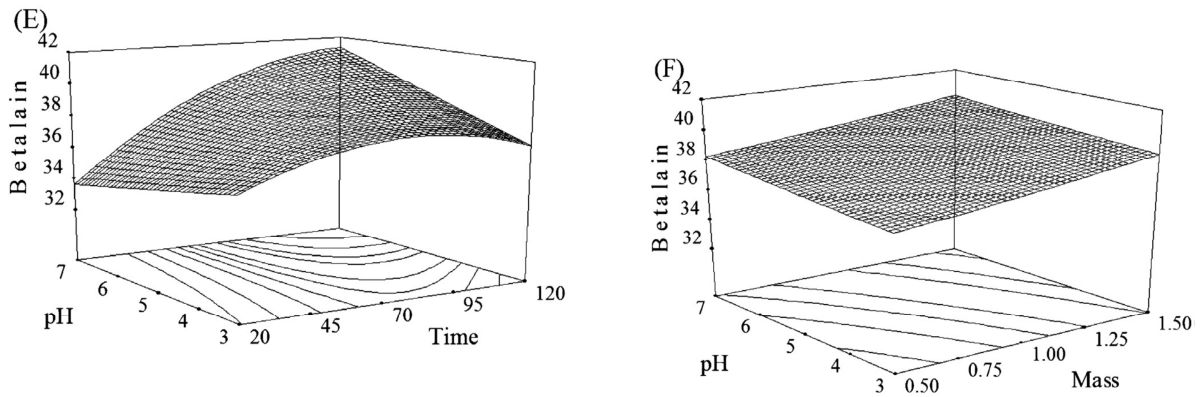


Figure 11 : Exemples de représentation de courbes de surface réponse montrant l'effet du pH, la masse et le temps sur l'extraction de la bétalaïne : E est la forme d'une équation de second degré et F est la forme d'une équation de premier degré (Prakash *et al.*, 2013).

L'utilisation de la méthodologie des surfaces réponses dans l'extraction des huiles végétales est en développement constant dans l'optimisation du rendement d'extraction. Des résultats satisfaisants ont été obtenus dans le processus d'optimisation de l'extraction aqueuse de l'huile de pistache et l'huile de grain de melon. L'emploi d'un plan composite centré a permis de faire passer le rendement d'extraction de l'huile de pistache de 58,79% à 66,83% en contrôlant les paramètres tels que la température (52,43°C), le pH (7,5) et le temps (20 h). Ce même plan d'expérience a été utilisé pour l'extraction aqueuse de l'huile de melon et le rendement d'extraction était de 71,15% avec l'enzyme Flavourzyme dans des conditions d'extraction suivantes : pH (6), température (50°C), temps d'incubation (36 h) et concentration en enzyme (21g/kg) (Nyam *et al.*, 2009 ; Ahmadi *et al.*, 2013). Ces études suggèrent que la température, le temps et le pH sont les variables qui influencent le rendement d'extraction aqueuse de l'huile. En outre, Guillemain (2006) souligne également l'importance du ratio eau/pulpe dans l'optimisation de l'extraction aqueuse de l'huile de colza.

III-5-3-4 Détermination des conditions optimales

Les courbes de surface réponse générées par des modèles linéaires peuvent être utilisées pour définir le sens de déplacement du plan de départ afin de déterminer les conditions optimales. Néanmoins, si le plan de départ ne peut être déplacé pour des raisons

physiques ou expérimentales, il est donc nécessaire de chercher les meilleures conditions opératoires dans le domaine d'étude de départ par inspection visuelle (Bezerra *et al.*, 2008).

Les techniques d'optimisation vont dépendre de la nature du modèle utilisé. Pour les modèles du premier degré, la méthode « *Steepest ascent* » est la technique intéressante pour se déplacer de manière séquentielle vers l'optimum. Pour les modèles du second degré, la méthode d'analyse de Ridge est habituellement employée dans le processus d'optimisation (Khuri et Mukhopadhyay, 2010). Pour des modèles quadratiques (second degré), le point critique (optimum) peut être caractérisé comme maximum ou minimum. Il est également possible de calculer les coordonnées du point critique à travers les premières dérivés (partielles ou non) de la fonction mathématique (équation du modèle) comme illustré dans l'exemple ci-dessous (Bezerra *et al.*, 2008) :

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

où x_1 et x_2 sont les variables indépendantes et y la variable dépendante (réponse).

Ainsi pour déterminer les coordonnées du point critique (optimum), il est important de résoudre le système d'équations formé par les dérivés partielles ci-dessous (Bezerra *et al.*, 2008) :

$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = b_1 + 2b_{11}x_1 + b_{12}x_2 = 0$$

$$\frac{\partial y}{\partial x_2} = b_2 + 2b_{22}x_2 + b_{12}x_1 = 0$$

III-5-3-5 Optimisation multiple des réponses

Dans le cas de l'optimisation multiple des réponses, plusieurs réponses sont mesurées pour un groupe de variables indépendantes bien définies. Ces réponses sont généralement supposées indépendantes même si elles sont liées aux mêmes facteurs. Le choix d'un critère d'optimalité doit prendre en compte toutes les réponses simultanément. Lind *et al.* (1960) ont développé une approche graphique qui consistait à superposer les courbes d'iso-réponses des

différentes réponses afin de déterminer la région où se trouve l'optimum. Mais lorsque le nombre de réponses devient important, cette approche graphique devient difficile.

Des approches numériques sont apparues pour pallier aux problèmes graphiques. Un critère très populaire est le critère de D-optimalité développé par Fedorov (1972) et amélioré par Imhof (2000) pour des modèles linéaires. Ce critère suppose une bonne compréhension de la matrice variance-covariance.

Harrington (1965) est l'auteur de l'approche de l'optimisation multiple par la fonction de désirabilité. Dans son algorithme, des transformations exponentielles sont utilisées pour convertir chacune des réponses en une fonction de désirabilité. Derringer et Suich (1980) ont généralisé ces transformations et ont mis sur pied des approches plus flexibles. Les fonctions de désirabilité individuelles de chacune des réponses (moyenne géométrique) ont été incorporées dans une seule fonction pour générer une fonction de désirabilité globale de l'ensemble des réponses qui peut être soit maximiser ou minimiser. Del Castillo *et al.* (1999) ont par la suite modifié la fonction de désirabilité de Derringer et Suich (1980) pour la rendre continue. Mais leur approche ne prenait pas en compte les variations et corrélations existant dans les différentes réponses. Wu (2005) a par la suite corrigé cette imperfection en introduisant la notion de fonction de désirabilité exponentielle double.

Tan et Quoc (2011) sont les seules à notre connaissance à avoir fait usage de l'optimisation multiple des réponses (efficacité d'extraction, vitamine E et vitamine A) lors de l'extraction hexanique de l'huile d'avocat. Les valeurs optimales étaient : volume spécifique d'hexane (12 mL/g), temps (6,56 heures), température (43,18°C), l'efficacité d'extraction (89,31%), pertes en vitamine E (1,41%) et vitamine A (2,59%) après utilisation de la méthode du point utopien comme procédé d'optimisation.

IV- Emulsion et oxydation

IV-1 Emulsion

Une émulsion est une dispersion qui comprend 2 liquides non miscibles (en général l'huile et l'eau), l'un étant dispersé en petites gouttelettes dans l'autre. La surface de contact

entre les 2 liquides est l'interface. La plupart des émulsions alimentaires se situe entre 0,1 μm et 100 μm (Walstra, 1996).

IV-1-1 Types d'émulsion

Les émulsions peuvent être classées en fonction de la distribution de la phase huileuse et de la phase aqueuse. Lorsque les gouttes dispersées (phase dispersée ou interne) sont constituées d'huile en phase aqueuse (phase continue ou externe), on parle d'émulsion huile-dans-l'eau (H/E) comme le lait, la mayonnaise, la crème et les sauces. A l'inverse, lorsque la phase dispersée est l'eau et que la phase continue est l'huile on parle d'émulsion eau-dans-l'huile (E/H) comme le beurre et la margarine. Les constituants de l'émulsion sont alors répartis entre l'huile, l'eau et les régions interfaciales et ce, en fonction de leur concentration et des interactions avec l'environnement local (Guillemin, 2006).

En plus des émulsions conventionnelles, il existe des émulsions doubles ou multiples qui sont caractérisées par une faible stabilité thermodynamique. On peut avoir des émulsions eau-dans-l'huile-dans-l'eau (E/H/E) et huile-dans-l'eau-dans-l'huile (H/E/H). Leur usage a été développé dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Benichou et Garti, 2002).

IV-1-2 Emulsifiants

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiques instables qui tendent à se déstabiliser dues à un excès d'énergie libre de surface. Cet excès d'énergie libre trouve son origine dans le contact non favorable entre l'huile et l'eau et la densité élevée de l'eau comparée à l'huile (McClements et Chanamai, 2000).

Une stabilité durable dans le temps requiert donc un agent émulsifiant. Les émulsifiants, de la famille des tensioactifs, sont des molécules qui s'adsorbent à l'interface afin de réduire la tension interfaciale entre l'huile et l'eau pour faciliter la formation et la dispersion des gouttelettes lors de l'homogénéisation à travers des forces de répulsion (Surh *et al.*, 2005). Il existe plusieurs types d'émulsifiants qui peuvent être classifiés en 2 groupes : les surfactifs de faible poids moléculaires (phospholipides et autres molécules ioniques et non

ioniques) et les macromolécules (protéines, polysaccharides et d'autres biopolymères (Taherian, 2006).

Les protéines entraînent une stabilité des émulsions à travers des répulsions électrique et stérique d'une part et la formation d'un film viscoélastique d'autre part (Hunter *et al.*, 2008). Les polysaccharides agissent quant à eux en accroissant la viscosité de la phase aqueuse et en s'adsorbant majoritairement à l'interface à l'aide d'interactions électrostatiques (Dickinson, 2003). Les phospholipides, plus efficaces que les protéines, exercent leur pouvoir émulsifiant en formant un film fin ayant une structure semi-cristalline (Shchipunov *et al.*, 1996).

IV-1-3 Propriétés d'une émulsion

Plusieurs propriétés des émulsions sont exploitées dans la formulation des produits alimentaires. Ces principales propriétés ont été décrites par Akoh (2008) :

- ❖ **La fraction volumique de la phase dispersée**, ϕ , désigne le volume de la phase interne divisée par le volume de la phase externe. Elle influence le goût et l'apparence du produit final. Plus la phase dispersée lipidique est importante, plus grande sera la viscosité du produit final ;
- ❖ **La taille des gouttelettes** a une influence notable sur la durée de conservation, l'apparence, la texture et leur goût. Dans la plupart des systèmes, elles n'ont pas notamment toutes la même taille, forme et charge électrique et constituent des systèmes polydispersés par opposition aux systèmes idéaux monodispersés ;
- ❖ **Les propriétés interfaciales** (la composition, l'épaisseur, la structure, la charge et les propriétés rhéologiques du film interfacial), la charge des gouttelettes et leur état physique (taux de cristallinité) sont également des facteurs essentiels à la caractérisation d'une émulsion. Les propriétés physico-chimiques et sensorielles d'une émulsion dépendent de la façon dont elle a été formée (quantité d'énergie fournie, efficacité d'homogénéisation et température) et des ingrédients utilisés (type et concentration de l'émulsifiant, composition et propriétés physicochimiques des 2 phases).

Les propriétés rhéologiques (écoulement, consistance et viscosité apparente) d'une émulsion huile d'avocat-dans-l'eau avec un concentré de protéines de blé (rapport protéine/huile de 1/10) à pH 3 était stable pendant 2 mois à température ambiante. La distribution de taille des gouttelettes était unimodale et comprise entre 2 et 10 μm . l'huile d'avocat et son émulsion ont présenté un comportement non-Newtonien (Logaraj *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'usage d'un prétraitement pectinolytique (46°C, 1h) réduit davantage la viscosité apparente de l'émulsion formée lors de l'extraction aqueuse de l'huile d'avocat comparé à un prétraitement thermique (65°C, 1 h). La réduction est de 60% avec le prétraitement pectinolytique et de 50% avec le traitement thermique. L'emploi d'une dilution contribue également à abaisser la viscosité apparente (Freitas *et al.*, 1996).

IV-1-4 Stabilité d'une émulsion

Une émulsion dite stable lorsqu'on n'observe aucun changement apparent dans la distribution des tailles des gouttelettes, l'état d'agrégation ou l'arrangement spatial durant le temps d'étude. La durée de stabilité peut varier de quelques heures à des mois en fonctions de plusieurs facteurs tels que la nature de l'émulsifiant, la structure et la composition de la couche interfaciale (Dickinson, 2003). La stabilité d'une émulsion est la vitesse avec laquelle une émulsion crème, floccule ou coalesce. Ces changements peuvent être déterminés par la distribution des tailles des gouttelettes et la viscosité des diverses phases de l'émulsion (Huang *et al.*, 2001).

Ainsi la sélection de l'émulsifiant est une étape critique dans la réalisation de ce processus vu que plusieurs paramètres interviennent dont la viscosité de surface, la pression de surface, la tension dynamique de surface, la vitesse de migration vers l'interface, le temps de relaxation à l'interface et l'adsorption compétitive avec d'autres surfactifs (Benichou et Garti, 2002).

IV-1-5 Mécanismes de déstabilisation d'une émulsion

Une émulsion peut devenir instable du fait de multiples processus physiques ou chimiques. L'instabilité physique induit une altération de la distribution spatiale ou de l'organisation structurale des molécules alors qu'une instabilité chimique va modifier les

propriétés structurales de ces molécules. Les processus physiques (figure 12) (McClements, 2005) sont :

- ❖ **Le crémage et la sédimentation.** Ces 2 phénomènes sont la résultante de 2 forces à savoir la force de pesanteur et l'agitation brownienne. Les gouttes dispersées sont animées d'un mouvement brownien induit par la phase dispersante dans le système. Le crémage a lieu lorsque la gravité surpasse l'agitation brownienne ;
- ❖ **La floculation.** Elle a pour origine l'adhésion des molécules liée à une compétition entre l'agitation thermique et les forces de Van der Waals (interactions majoritaires). Le mouvement des gouttes conduit à des collisions entre gouttelettes. Si l'interaction attractive entre les gouttes est suffisante, les gouttes ainsi mises en contact restent associées ;
- ❖ **La coalescence.** Deux ou plusieurs gouttes vont alors fusionner pour donner une goutte de diamètre supérieur. Le phénomène se répétant, la phase dispersée finit par disparaître par démixtion et l'on revient au système diphasé de départ. C'est un phénomène irréversible ;
- ❖ **La maturation d'Oswald.** Dans chaque classe de taille de gouttelettes, il existe une surpression de Laplace différente. L'existence de cette surpression implique que le potentiel chimique dans les petites gouttes est plus élevé que dans les grosses gouttes. Le retour vers l'équilibre thermodynamique s'accompagne donc d'un flux de matière des petites gouttes vers les grosses gouttes, au travers de la phase continue. La granulométrie se modifie, les classes de plus faible taille laissent alors place à des gouttes de taille supérieure ;
- ❖ **Inversion de phase.** L'addition du composant de la phase dispersée (sous agitation) va permettre de faire varier la fraction volumique et donc de modifier la viscosité du système, ce qui aboutit à l'inversion de phase irréversible chaotique. Si au contraire, c'est la variation de la nature des tensioactifs à l'interface qui induit l'inversion de phase, la fraction volumique est donc constante, on aboutit donc à une inversion de la phase transitionnelle.

L'oxydation et l'hydrolyse appartiennent quant à eux aux procédés de déstabilisation chimique (Fen, 1996). L'un des objectifs scientifiques est de déterminer l'importance de chacun des mécanismes, de leurs relations, et les facteurs qui les régissent. Grâce à la compréhension de ces mécanismes, une maîtrise de la stabilité des émulsions peut être envisagée. D'autre part, la production de certains aliments implique une déstabilisation contrôlée de l'émulsion lors du procédé de fabrication : c'est le cas pour la production de crème glacée (coalescence partielle lors de la formation des cristaux de glace), de crème fouettée (Ho et Chow, 2002) ou d'huile par voie aqueuse.

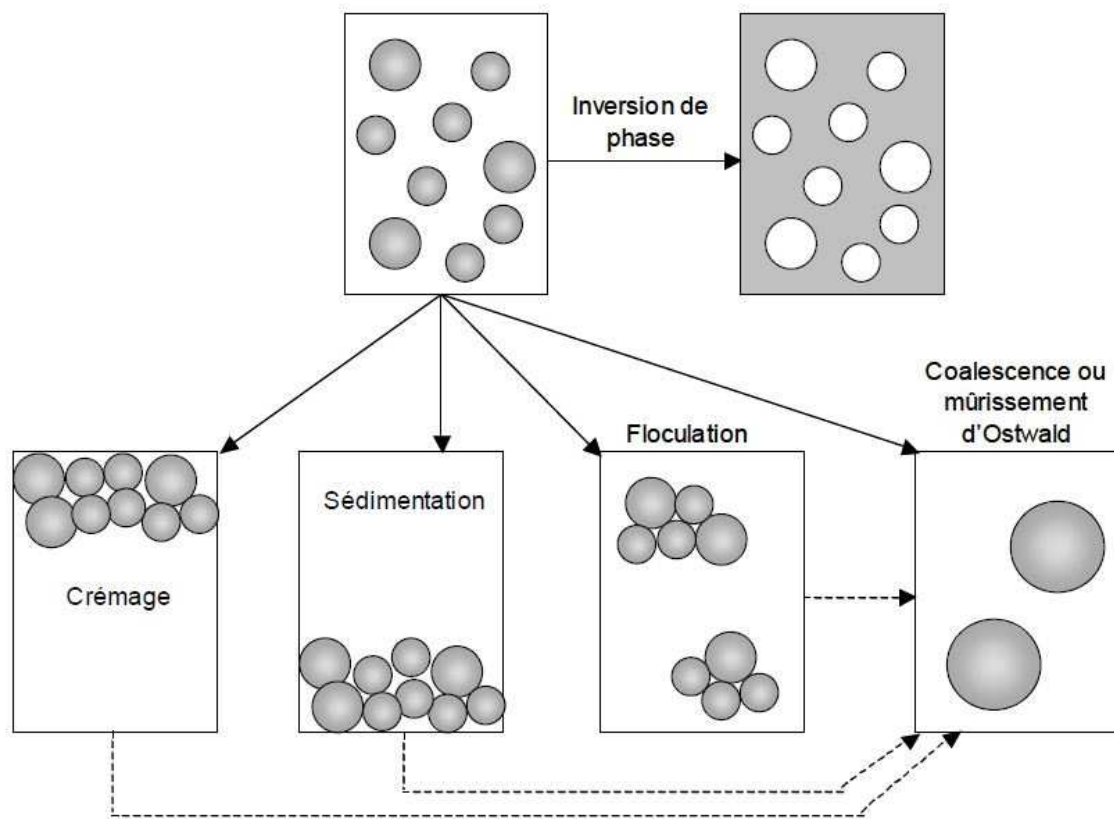


Figure 12 : Schéma des mécanismes physiques majeurs de déstabilisation des émulsions (McClements, 2005)

L'utilisation de microencapsulations d'isolat de protéines de blé/maltodextrine (90 :10, 50 :50 et 10 :90) dans l'émulsion huile d'avocat est stable à l'oxydation (indice de peroxyde de 4,5 mEq g/kg d'huile) à basse température (4°C) et à température ambiante (25°C) pendant 2

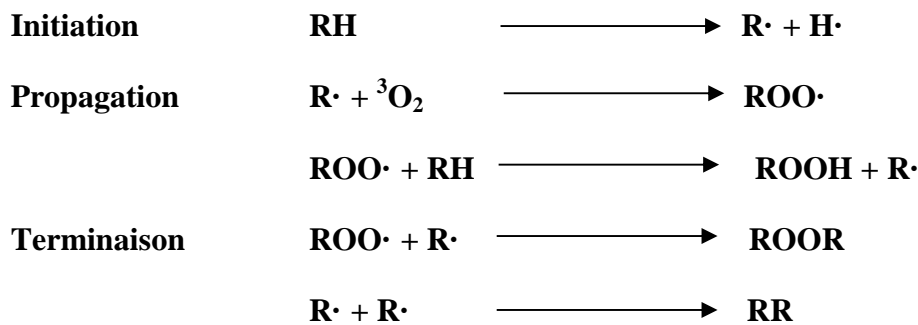
mois. Ces microencapsulations amenuisent également l'oxydation à 60°C (Bae and Lee, 2008).

IV-2 Oxydation

Différents mécanismes chimiques interviennent dans l'oxydation des huiles à savoir : l'auto-oxydation et la photo-oxydation qui utilisent l'oxygène triplet atmosphérique ($^3\text{O}_2$) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) respectivement (Choe et Min, 2006).

IV-2-1 Auto-oxydation

L'auto-oxydation se fait en 3 étapes qui sont : l'initiation, la propagation et la terminaison. Les étapes sont résumées selon le schéma ci-dessous (Choe et Min, 2006) :



Dans la phase d'initiation, la réaction entre un acide gras ou un acylglycérol, dans son état fondamental, et l'oxygène triplet est thermodynamiquement impossible (Min et Bradley, 1992). Il est donc impératif qu'un atome d'hydrogène soit arraché à la molécule d'acide gras ou d'acylglycérol pour permettre à la réaction de se produire. La dissociation de l'hydrogène requiert de l'énergie, qui elle va dépendre de la position de l'atome d'hydrogène sur l'acide gras ou l'acylglycérol. L'hydrogène rattaché au carbone situé entre 2 doubles liaisons est plus facile à arracher. Par exemple, l'hydrogène en C11 de l'acide linoléique requiert 50 kcal/mol, celui en C14 75 kcal/mol et C17 ou C18 approximativement 100 kcal/mol. Ce processus peut être accéléré par la chaleur, les métaux et la lumière (Min et Boff, 2002).

Dans la phase de propagation, le radical acyle réagit instantanément avec $^3\text{O}_2$, à une pression atmosphérique normale, pour donner le radical peroxy qui lui également arrache un atome d'hydrogène à une molécule lipidique pour former un hydroperoxyde, composé primaire de l'oxydation (Aidos *et al.*, 2002).

Ces molécules d'hydroperoxydes sont très stables à température ambiante et en absence de métaux. Mais lorsque les conditions changent (hautes températures et/ou présence d'oxygène), les hydroperoxydes sont rapidement convertis en radicaux alcoyles. Les radicaux alcoyles vont donc subir une β -scission homolytique de la liaison carbone-carbone pour produire des composés oxo, et des acyles saturés et insaturés. Après réarrangement électronique, addition du radical hydroxyle ou transfert d'hydrogène, on aboutit aux composés ultimes de l'oxydation à savoir : les aldéhydes, les cétones, les alcools et les composés hydrocarbonés à courtes chaînes ; c'est la terminaison (Choe et Min, 2006).

La vitesse de passage des composés primaires aux composés secondaires dépend de la nature de l'huile végétale. Par exemple, ce passage est instantané dans l'huile d'olive alors qu'il ne se produit dans l'huile de tournesol que lorsqu'une quantité appréciable d'hydroperoxydes est produite (Guillen et Cabo, 2002).

IV-2-2 Photo-oxydation

L'oxydation de l'huile est accélérée par la lumière surtout en présence des sensibilisateurs comme la chlorophylle. Un sensibilisateur triplet excité peut accepter un hydrogène ou un électron d'un substrat pour former un radical. Aussi, ce sensibilisateur triplet excité peut réagir avec $^3\text{O}_2$ pour former un anion peroxyde ou transférer son énergie d'excitation à $^3\text{O}_2$ pour former un $^1\text{O}_2$ grâce à une réaction d'annihilation triplet-triplet et ainsi retourner à son état fondamental singulet. L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) électrophile peut réagir avec les doubles liaisons des acides gras ou acylglycérols pour donner des hydroperoxydes sans transiter par des radicaux acyles. Une fois les hydroperoxydes formés, il peut y avoir résonance des doubles liaisons et formation des doubles liaisons *trans* pour produire des hydroperoxydes conjugués et non conjugués (figure 13). Ce qui diffère de l'auto-oxydation où il n'y a pas production d'hydroperoxydes non conjugués. Enfin, les hydroperoxydes produits se décomposent en produits secondaires de l'oxydation comme dans l'auto-oxydation (Chloe et Min, 2006).

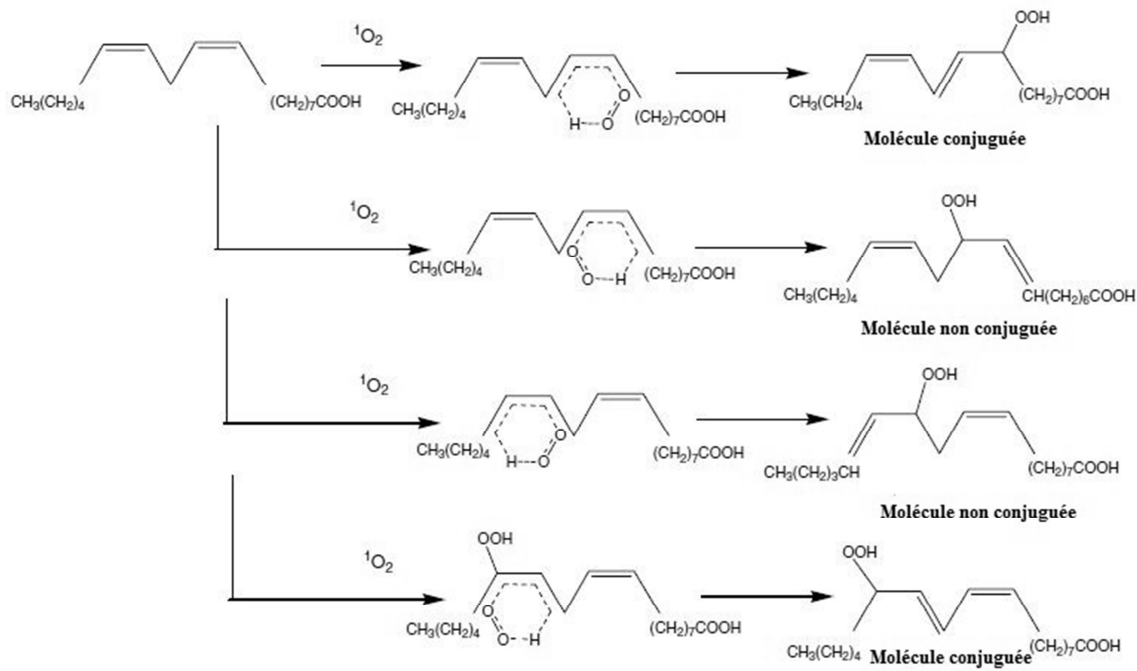


Figure 13 : Formation des hydroperoxydes à partir de l'acide linoléique lors de l'oxydation à l'oxygène singulet (Chloe et Min, 2006).

IV-2-3 Facteurs influençant la stabilité oxydative des huiles

Malgré la complexité du phénomène d'oxydation, les facteurs influençant l'évolution oxydative des huiles sont extrinsèques et intrinsèques. Les facteurs extrinsèques sont :

- ❖ **L'oxygène.** La solubilité de l'oxygène est importante à pression atmosphérique et à des températures faibles et modérées. L'oxygène va ainsi entraîner la formation des radicaux peroxy plus facilement dans ces conditions (Scott, 1965) ;
- ❖ **La température.** A des hautes températures, les réactions d'initiation sont accélérées malgré la faible pression en oxygène. La production des composés acyles et peroxy augmente ainsi que leur polymérisation (Scott, 1965);
- ❖ **La lumière.** En présence des sensibilisateurs tels que la chlorophylle, la lumière va induire la formation des produits d'oxydation (Jadhav, 1996). Néanmoins, à des hautes températures, l'effet de la lumière sur l'oxydation est totalement inexistant (Lundberg, 1962).

Les facteurs intrinsèques influençant sont :

- ❖ **Triacylglycérols.** Les huiles les plus insaturées s'oxydent plus vite que celles saturées (Parker *et al.*, 2003) ;
- ❖ **Acides gras et mono- et diglycérides.** Les acides gras libres sont plus susceptibles à l'auto-oxydation que les acides gras estérifiés (Kinsella *et al.*, 1978). Les acides gras libres et les mono- et diglycérides réduisent la tension superficielle des huiles alimentaires, augmentent la vitesse de diffusion de l'oxygène dans l'huile et ainsi accélèrent l'oxydation des huiles. (Mistry et Min, 1988) ;
- ❖ **Les phospholipides.** Ces lipides agissent comme des anti-oxydants ou des pro-oxydants en fonction de leur concentration et de la présence de métaux (Lyberg *et al.*, 2005) ;
- ❖ **Les métaux.** Les métaux comme le fer et le cuivre sont présents dans les huiles et accélèrent l'oxydation des huiles en réduisant l'énergie d'activation de l'étape d'initiation de l'auto-oxydation entre 63 et 104 KJ/mol (Jadhav *et al.*, 1996) ;
- ❖ **La chlorophylle.** La chlorophylle et ses produits de dégradation (phéophytine et pheophorbides) agissent comme des sensibilisateurs pour accélérer l'oxydation (Gutierrez-Rosales *et al.*, 1992) ;
- ❖ **Composés issus de l'oxydation thermique.** Lors du raffinage des huiles brutes, il y a production des composés oxydés par la chaleur comme les dimères et trimères qui accélèrent l'auto-oxydation des huiles par le même processus que celui des acides gras libres (Min et Jung, 1989) ;
- ❖ **Antioxydants.** Les huiles alimentaires contiennent des antioxydants naturels tels que les tocophérols, les tocotriénols, les caroténoïdes, les stérols, le squalène et autres composés phénoliques. Ils agissent comme suit :
 - Les tocophérols, tocotriénols et composés phénoliques compétissent avec les acides gras insaturés pour le radical peroxydes afin de se convertir en radicaux tocophéroxydes plus stables que leurs analogues lipidiques par le phénomène de résonance (Kamal-Elden et Appelavist, 1996) ;

- Les caroténoïdes peuvent ralentir l'oxydation dans les huiles en filtrant la lumière, en piégeant $^1\text{O}_2$ et les radicaux ; et en inactivant les sensibilisateurs (Chloe et Min, 2006) ;
- Les phytostérols semblent ne pas être actifs à des températures basses mais agiraient à des hautes températures en inhibant la polymérisation lors de l'oxydation (Gordon et Magos, 1983) ;
- Le squalène jouerait son rôle antioxydant en régénérant les tocophérols à partir des radicaux tocophéroxyles (Manzi *et al.*, 1998).

IV-2-4 Suivi de l'état d'oxydation des huiles

Comme présenté plus haut, l'oxydation de l'huile aboutit à la formation de composés primaires instables (radicaux libres, peroxydes et diènes conjugués) et composés secondaires (aldéhydes, cétones, alcools par exemple). Etudier le phénomène d'oxydation est souvent très difficile pour la simple raison que l'oxydation des lipides donne des produits d'oxydation variés (Roman, 2012). Malgré le large choix de méthodes pour suivre l'oxydation, chacune à ses avantages et inconvénients en fonction du produit d'oxydation ciblé (Roman, 2012). Les méthodes classiques sont les suivantes :

- ❖ **Le dosage des acides gras** permet de suivre le changement de la composition de ces derniers avec le temps (Roman, 2012) ;
- ❖ **Le dosage des hydroperoxydes** donne une estimation globale de l'état d'oxydation des matières lipidiques surtout lors de sa phase primaire. La limite de cette méthode est que la quantité de peroxydes formés est le résultat de la formation et la décomposition des hydroperoxydes (Roman, 2012) ;
- ❖ **Le dosage des diènes conjugués** permet de suivre le passage de la forme malonique des acides gras polyinsaturés à la forme conjugué. Cette méthode est rapide mais peu être peu spécifique et conduire parfois à des interférences avec les antioxydants (Gray, 1978);

- ❖ **La mesure de l'indice de para-anisidine** est un indicateur fiable de rancissement oxydatif. Il est plus sensible dans le cas des aldéhydes insaturés que ceux saturés mais n'est comparable que pour le même type d'huile (Guillen et Cabo, 2002) ;
- ❖ **Le dosage des composés polaires** est un indicateur de la qualité des huiles de friture. Le dosage de ses composés est à la base de la réglementation actuelle qui limite leur taux à 25%. Elle a pour inconvénient l'utilisation de solvant et la durée d'extraction (Roman, 2012) ;
- ❖ **Le dosage des polymères** est un bon marqueur pour évaluer l'état d'altération de l'huile mais difficile applicable au suivi régulier dans les aliments en raison du temps important nécessaire pour l'analyse (Roman, 2012) ;
- ❖ **Le suivi des espèces radicalaires par Résonance Paramagnétique Electronique** présente l'avantage de pouvoir détecter des radicaux libres à très faibles durée de vie mais nécessite l'utilisation d'un piègeur qui peut interférer avec la chaîne d'oxydation (Roman, 2012).

Werman et Neeman (1986) sont les premiers à investiguer la stabilité oxydative de l'huile d'avocat. Ils ont montré que l'huile d'avocat raffinée s'oxyde très vite à la lumière du jour et au contact des ondes fluorescentes. La teneur en chlorophylle est très rapidement réduite dans ces conditions. Par contre, une grande stabilité a été enregistrée dans l'obscurité. Sur la base de l'indice Totox, la stabilité oxydative de l'huile d'avocat (3,6) est supérieure à celles d'autres huiles mono-insaturées comme les huiles de noix (5,7), de riz (6,4), de noisette (9,7), de sésame (12,1), d'amande (14,8) et de raisin (17,5) (Madawala, 2012). L'ajout de composés phénoliques (300 ppm) comme l'acide caféique et l'acide p-coumarique retarde l'oxydation dans l'huile d'avocat à 20°C et 60°C après 50 jours d'entreposage. En effet, ils agiraient en chélatant les ions métalliques contenus dans l'huile d'avocat. Leur action serait fonction de la température d'entreposage, de leur structure chimique, du type et du degré d'insaturation (Sun-Waterhouse *et al.*, 2011). Par ailleurs, L'huile d'avocat possède une stabilité thermique comparable à celle de l'huile d'olive à 180°C du point de vue de l'évolution des sr-TBA pendant 9 h. Sa teneur en sr-TBA a presque doublé tout comme celle de l'huile d'olive. Ses rapports AGPI/AGS (0,61 à t=0) et ω -6/ ω -3 (14,06 à t=0) étaient

élevés tout au long de l'expérimentation comparés à ceux de l'huile d'olive (Berasategi *et al.*, 2012).

V- Conclusion de la bibliographie

Les avocats produits au Cameroun sont sujets à des pertes *post-récoltes*. Ces pertes *post-récoltes* trouvent leur origine dans la mauvaise qualité sensorielle de certains cultivars qui limite leur exportation et accroît les invendus. De plus, l'absence de la maîtrise de la chaîne de production et d'organisations structurées dans la gestion des produits vivriers pousse les marchés locaux à s'orienter vers certains cultivars. Ainsi, les deux problèmes majeurs des pertes *post-récoltes* sont : la qualité des fruits et la gestion de la production. Une solution plausible est la transformation de l'excédent de production et des fruits de « mauvaise qualité » en huile. Cette approche a déjà été utilisée avec succès par les plus grands producteurs d'avocat tels que la Nouvelle Zélande et les Etats Unis.

L'huile d'avocat est une huile monoinsaturée qui possède une fraction insaponifiable riche en antioxydants (tocophérols, stérols et caroténoïdes) et prooxydants (chlorophylle). Ces antioxydants lui confèrent de nombreuses propriétés biologiques. L'état actuel des lieux ne mentionne pas d'autres antioxydants que l'on rencontre dans l'huile d'olive tels que le squalène qui participerait de la faible incidence du cancer dans la population méditerranéenne. Sa présence donnera à l'huile d'avocat une valeur ajoutée certaine. En outre, elle ne souligne pas l'existence ou non des lipides polaires (phospholipides, glycérides partiels et glycolipides) qui sont présents dans l'huile non raffinée et initiateurs de l'oxydation.

Depuis quelques années, il est apparu un attrait prononcé pour des méthodes de détection et de quantification des molécules d'intérêt dans les huiles. L'usage de la spectroscopie joue un rôle indéniable dans cette démarche de par sa rapidité d'exécution et son niveau de précision. L'emploi des méthodes spectrales permettra d'orienter la quantification de certaines molécules cibles dans l'ultraviolet et le visible tout en développant une signature spectrale dans le moyen infrarouge pour l'identification rapide de l'huile d'avocat lors des contrôles qualités.

Plusieurs méthodes sont employées dans l'extraction de l'huile d'avocat à savoir : l'extraction à la presse, par les solvants organiques et les fluides supercritiques. Ces méthodes

produisent des rendements d'huile élevés, mais leur coût élevé, leur toxicité et leur impact négatif sur l'environnement, ne font pas d'elles des méthodes de choix dans des pays tels que le Cameroun, à faible pouvoir d'achat et qui militent pour la protection de l'environnement. L'extraction aqueuse est la méthode convenable qui tient compte de ces contraintes malgré son faible rendement d'extraction. Toutefois, des expérimentations menées sur l'extraction aqueuse de l'huile de pistache en utilisant la méthodologie des surfaces réponses montre qu'il est possible d'améliorer ce rendement en contrôlant certaines variables telles que la température, le temps, le pH et le ratio solvant/matière.

Le principal phénomène de détérioration de l'huile étant l'oxydation, il s'avère toujours indispensable d'investiguer l'état oxydatif de l'huile produite avant toute application. Ceci surtout lorsqu'on voudrait l'utiliser pour des fritures où les températures avoisinant 180°C accélèrent l'oxydation. La stabilité thermique de l'huile d'avocat a déjà été étudiée à 180°C pendant 9 h en suivant l'évolution des sr-TBA, la composition en acides gras et la teneur en vitamine E. Mais cette étude ne dégage pas le temps limite d'utilisation de l'huile d'avocat à 180°C qui est un paramètre important pour définir la performance d'une huile à hautes températures. L'usage du dosage des composés polaires dans l'évaluation de l'oxydation est une démarche crédible en raison de sa réglementation qui limite son taux à 25% dans les huiles oxydées lors de la friture. La détermination des temps limite d'utilisation de l'huile d'avocat à des températures élevées par le dosage des composés polaires est une base probante à son application lors des fritures.

Les huiles végétales sont très utilisées dans l'assaisonnement des crudités telles que les mayonnaises, les sauces, les crèmes et les margarines. La réussite et la compréhension de l'émulsion sont à la base de leur stabilité. Cette stabilité requiert donc la présence d'émulsifiants (surfactifs et macromolécules). Une étude menée sur l'émulsion d'huile d'avocat dans l'eau en présence de concentré de protéines de blé montre qu'elle est stable sur 2 mois au regard des propriétés rhéologiques. Toutefois, elle ne met pas en exergue les mécanismes de déstabilisation de l'émulsion d'huile d'avocat dans l'eau en présence de protéines qui sous-tendent les propriétés rhéologiques observées.

Chapitre II :
MATERIEL ET METHODES

I-Présentation du cadre expérimental

Le but de ce travail est de limiter les pertes *post*-récoltes liées à l'avocat. Pour y parvenir, il fallait déterminer les conditions optimales d'extraction de l'huile de 5 cultivars et déterminer quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'huile d'avocat. Cinq étapes ont été nécessaires pour l'atteinte de cet objectif (figure 14).

Dans un premier temps, il est question de récolter 5 cultivars d'avocat parmi lesquels le cultivar le plus apprécié par les populations locales (*Hickson*) et 4 autres cultivars négligés qui sont sélectionnés par échantillonnage aléatoire simple. Ces cultivars sont collectés dans les champs de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD). L'efficacité d'extraction aqueuse des huiles des cultivars est améliorée en utilisant la méthodologie des surfaces réponses. L'optimisation du procédé d'extraction aqueuse débute par la sélection des variables indépendantes (température, temps, pH et ratio eau/pulpe) basée sur la littérature et la définition d'un espace de recherche grâce à un plan unifactoriel. Ce plan unifactoriel permet de définir le domaine d'étude des variables indépendantes qui sont utilisées dans la modélisation de l'extraction aqueuse de l'huile de chaque cultivar d'avocat par l'utilisation d'un plan factoriel complet centré. Les modèles statistiques dérivés permettent de prédire et valider les conditions optimales d'extraction de l'huile pour chaque cultivar. Par la suite, l'optimisation multicritère est appliquée pour définir les conditions optimales d'extraction générales pour les 5 cultivars.

Dans un second temps, il s'est agi de mettre sur pied une méthode rapide permettant d'identifier l'huile d'avocat issue des cultivars par la détermination d'une signature spectrale. Cela a été effectué par la détection des points de similitude et de différence par spectroscopie dans le moyen infrarouge assistée d'une analyse en composantes principales.

Dans un troisième temps, l'un des cultivars est retenu pour la suite des analyses de l'huile d'avocat sur la base de ses performances lors de l'optimisation de l'extraction et son comportement distinctif dans l'infrarouge. Ensuite, des screenings spectraux dans

l'ultraviolet, le visible et par fluorescence sont effectués afin d'identifier les composés d'intérêt couramment rencontrés dans l'huile d'avocat et réaliser ainsi une quantification orientée. Les composés recherchés étaient : les chlorophylles, les caroténoïdes, les tocophérols, les diènes conjugués et les peroxydes. Il s'en est suivi la caractérisation de quelques constituants saponifiables (glycérides partiels, phospholipides, glycolipides et acides gras) et insaponifiables (stérols, caroténoïdes, chlorophylles, squalènes, tocophérols, tocotriénols) de l'huile d'avocat. D'autres propriétés physicochimiques sont également étudiées à savoir : les températures de fusion et de cristallisation, la viscosité, la couleur, les indices d'acide, de saponification et d'iode.

Dans un quatrième temps, il était important de s'assurer que les conditions d'extraction n'ont pas généré une huile d'avocat oxydée, prérequis pour son utilisation à des hautes températures. Pour l'évaluation de la stabilité oxydative, les indicateurs primaires (indice de peroxyde et les teneurs en diènes et triènes conjugués) et secondaires (indice de para-anisidine et les teneurs en sr-TBA, MDA) de l'oxydation de l'huile sont déterminés. Afin de prédire le comportement de l'huile d'avocat à des hautes températures, un modèle de thermodégradation est développé par l'usage d'un plan composite centré. La température et le temps sont les variables indépendantes et la teneur en composés polaires totaux est la réponse. Les temps limites entre 120°C et 180°C sont prédits pour une teneur en composés polaires totaux de 25%.

Dans un cinquième temps, la possibilité d'utilisation de l'huile d'avocat dans des sauces et des vinaigrettes est investiguée à travers l'étude de l'émulsion d'huile d'avocat dans l'eau à température ambiante (25°C) et dans des conditions accélérées (40°C). La capacité émulsifiante de l'huile d'avocat est évaluée à l'aide des paramètres suivants : la taille et la flocculation des gouttelettes, et la répartition de l'émulsifiant (β -lactoglobuline) à l'interface. Ensuite, il s'agit de prédire les formes de déstabilisation de l'émulsion d'huile d'avocat dans le temps. La coalescence et le crémage sont les principales formes de déstabilisation recherchées lors de la remontée des gouttelettes au fil du temps.

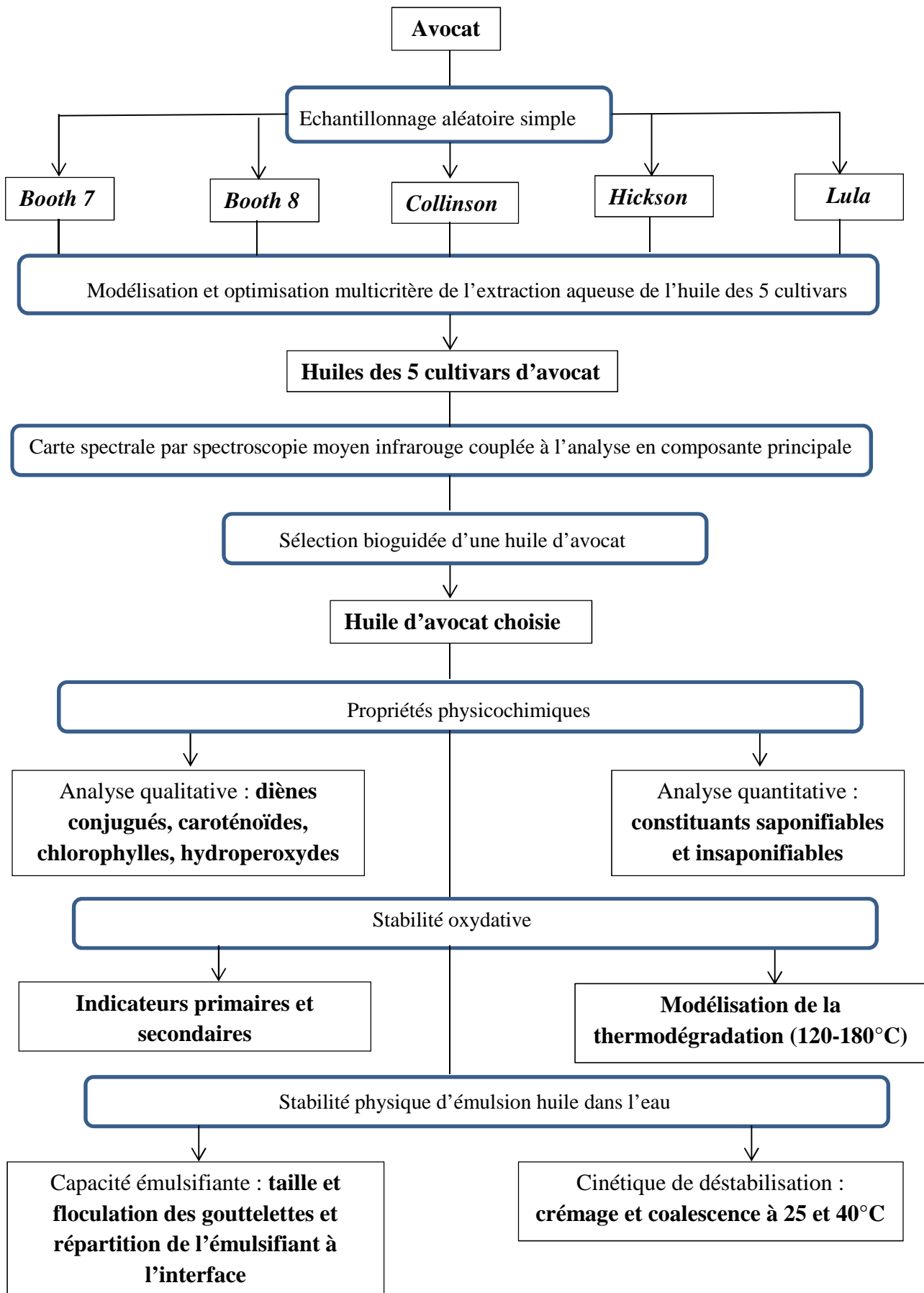


Figure 14 : Organigramme de la méthodologie utilisée dans cette étude

II-Domaine d'étude et échantillonnage

Les avocats sains et matures ont été récoltés dans les plantations de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD), station de Foubot, Cameroun. Un échantillonnage aléatoire simple a été utilisé pour sélectionner les 4 cultivars d'avocats, à savoir : *Booth 7*, *Booth 8*, *Collinson* et *Lula*. De plus, le cultivar *Hickson* a été retenu parce qu'il est le cultivar le plus consommé selon notre enquête menée à l'IRAD (figure 15). Selon cette même enquête, ces cultivars représentent une production de 480 kg/arbre/an sur 1320 kg/arbre/an des 16 cultivars répertoriés. Les avocats matures ont été transportés dans des cartons aérés au Laboratoire des Sciences Alimentaires et Métabolisme (LabSAM). Une fois au laboratoire, les avocats sont conservés à température ambiante afin de favoriser leur mûrissement. Après mûrissement, les avocats sont réfrigérés à 4°C pour retarder la senescence. Les 5 cultivars d'avocat, à l'état mûr, ont été utilisés pour l'optimisation de l'extraction aqueuse de l'huile d'avocat.

Les échantillons d'étude (5 cultivars) ne pouvaient pas être considérés comme représentatifs de tous les avocats du Cameroun, la généralisation globale n'étant pas un objectif prioritaire. Le but principal de ce travail était de montrer que l'extraction aqueuse de l'huile d'avocat au Cameroun permettrait de réduire les pertes *post-récoltes*. Néanmoins, les résultats de cette étude peuvent être généralisés aux sites de récolte produisant les mêmes cultivars d'avocat ou aux sites apparentés.



Figure 15 : Schémas des cultivars d’avocat utilisés dans cette étude (Photographie de Saha, 2011)

III-Modélisation et optimisation de l’extraction de l’huile d’avocat

Cette optimisation consistait à évaluer l’effet de la température, du ratio eau/pulpe, du pH et du temps sur l’efficacité d’extraction à l’eau de l’huile d’avocat chez les cultivars *Hickson*, *Booth 8*, *Booth 7*, *Lula* et *Collinson*.

La méthode aqueuse a été choisie parce que l’huile produite est directement utilisable et n’a plus besoin de subir une étape de raffinage (Latif et Anwar, 2009). La méthode d’extraction à l’hexane est utilisée comme méthode de référence pour son aptitude à extraire presque exclusivement les lipides neutres contenus dans la matrice alimentaire qui sont recherchés dans l’huile lors du processus de raffinage.

Les variables indépendantes (température, temps, ratio eau/pulpe et pH) ont été sélectionnées pour leur implication dans l’extraction aqueuse des huiles de colza, de melon et de pistache (Guillemin, 2006 ; Nyam *et al.*, 2009 ; Ahmadi *et al.*, 2013). Elles ont également été retenus pour les raisons suivantes : la température influence l’activité des enzymes

hydrolytiques de la paroi des cellules de l'avocat, la viscosité et la diffusion de l'huile (Wilke et Chang, 1955 ; Platt Aloa *et al.*, 1980) ; le temps contribue à accroître la diffusion de l'huile de la pulpe d'avocat (Morin et Richard, 1985) ; le ratio eau/pulpe permet de définir la quantité d'eau requise pour recouvrir le maximum d'huile d'avocat (Ganou, 1993) et le pH agit sur la formation d'une émulsion stable induite par les protéines après diffusion de l'huile dans le compartiment aqueux (Rosenthal *et al.*, 1996). En outre, ces paramètres ont également été choisis pour leur facilité de mise en œuvre par les producteurs d'huiles artisanales qui utilisent une méthode aqueuse presque similaire.

Cette modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile d'avocat s'est ainsi faite en 6 étapes séquentielles à savoir :

- Echantillonnage des 5 cultivars d'avocats ;
- Evaluation de la teneur en lipides des 5 cultivars ;
- La détermination du domaine d'étude de chaque facteur grâce à un plan unifactoriel ;
- La modélisation et l'optimisation de l'extraction d'huile des 5 cultivars par l'emploi de la méthodologie des surfaces réponses utilisant un plan factoriel complet avec cinq répétitions au point central ;
- Optimisation multicritère des réponses afin de définir les conditions optimales pour réduire les pertes *post-récoltes* ;
- Validation expérimentale des conditions obtenues.

III-1 Détermination de la teneur en eau (AOAC, 1980)

Principe

Elle repose sur la propriété qu'a l'eau libre contenue dans les aliments de se vaporiser à plus de 100°C. Elle implique 2 types de transfert : un transfert d'énergie thermique de l'environnement de l'étuve vers l'aliment et un transfert de masse (eau), jusqu'à poids constant de l'aliment, de l'intérieur de l'aliment vers sa surface et ensuite le passage de l'eau

en phase gazeuse. Connaissant le poids de l'aliment de départ et après déshydratation, on calcule la teneur en eau en termes de pourcentage de perte de masse de l'aliment.

Mode opératoire

Les avocats sont épluchés, la pulpe obtenue découpée en tranches et collectée à l'aide d'une spatule et pesée ($M_1 = 5$ g) dans une capsule en porcelaine à l'aide d'une balance électrique à précision (1 / 1000). L'ensemble (pulpe + capsule) est placé dans une étuve à ventilation à une température de 105°C pendant 24 heures. À la sortie de l'étuve, la pulpe sèche est laissée à refroidir dans un dessiccateur contenant de la silice pendant 1 heure. La masse M_2 est alors déterminée et la teneur en eau calculée selon la formule suivante:

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{(M_1 - M_2)}{M_1} \times 100$$

Où M_1 : masse de la pulpe d'avocat fraîche et M_2 : masse de la pulpe d'avocat séchée.

III-2 Détermination de la teneur en lipides neutres (AOAC, 1980)

Principe

Elle exploite la capacité qu'ont les lipides à être solubles dans les solvants organiques apolaires tels que l'hexane et présentés un point de vaporisation plus élevé que ces solvants. Le solvant pénètre dans l'aliment séché, solubilise les lipides et diffuse hors de l'aliment avec les lipides pour se retrouver dans le ballon après siphonnage. Le solvant étant plus volatil que les lipides, il se vaporise du ballon chauffé, passe dans le tube adducteur, est liquéfié dans le condenseur et retombe dans l'extracteur où le cycle d'extraction des lipides se poursuit jusqu'à poids constant de l'aliment. La teneur en lipides se calcule en termes de pourcentage de perte de masse de l'aliment.

Mode opératoire

La teneur en lipides est effectuée en utilisant la méthode au Soxhlet. Une quantité de 5 g de pulpe d'avocat séchée est prélevée à l'aide d'une spatule et pesée sur du papier filtre. L'ensemble est ensuite soigneusement emballé et introduit dans l'extracteur de l'appareil de Soxhlet monté sur un ballon lavé, contenant 3 billes de verres. 250 mL d'hexane sont mis dans l'extracteur jusqu'à siphonnage et une quantité supplémentaire d'hexane est ajoutée dans l'extracteur jusqu'au quart du siphon. Le réfrigérant est enfin monté sur l'extracteur et le ballon chauffé pendant 8 heures. Au bout de ce temps, le ballon est démonté, refroidi à température ambiante et le solvant évaporé grâce à un évaporateur rotatif à 70°C. L'huile ainsi extraite est laissée à température ambiante dans un flacon en verre opaque pour éliminer les traces de solvant puis pesée, étiquetée et conservée à 4°C.

III-3 Extraction aqueuse de l'huile d'avocat

Principe

Elle repose sur la capacité qu'a l'eau portée à une certaine température de diffuser dans l'aliment, solubiliser les matières hydrosolubles et diffuser hors de l'aliment en entraînant les lipides avec elle. La phase lipidique (huile) est séparée des phases solides insolubles et liquides hydrophiles grâce à plusieurs cycles de centrifugation.

Mode opératoire

L'extraction aqueuse de l'huile d'avocat a été adaptée selon le protocole de Bizimana *et al.* (1993). 10 g de pulpe d'avocat mûr sont écrasées dans un mortier en porcelaine et 5 g sont prélevées et placées dans un bécher de 100 mL. De l'eau distillée est introduite pour obtenir le rapport de quantité d'eau sur quantité de matière désiré. Le pH du mélange est ajusté par ajout du HCl 0,1N, l'ensemble est porté à la température souhaitée et au temps voulu sous agitation constante (niveau 2, Agitateur C-MAG HS 7 IKAMAG). Une fois le

chauffage terminé, le mélange est directement centrifugé à 3000 tr/min (971 g) pendant 5 min (Centrifugeuse Labofuge 200) et on obtient 3 phases : une phase liquide hydrophobe (surnageant), une phase liquide hydrophile (au milieu) et une phase solide insoluble (au fond). Le surnageant (huile d'avocat) a été récupéré à l'aide d'une micropipette. Une seconde centrifugation, à 3000 tr/min (971 g) pendant 5 min, sur l'huile d'avocat récupérée a été effectuée afin d'éliminer la fraction solide résiduelle. De nouveau, le surnageant (huile) est récupéré à l'aide d'une micropipette et pesé.

Deux paramètres sont calculés : Le rendement d'extraction et l'efficacité d'extraction. Le rendement d'extraction de l'huile d'avocat est la quantité d'huile d'avocat en gramme contenue dans 100 g de matière fraîche (avocat). Il se matérialise par la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction} = \frac{\text{Masse de l'huile obtenue}}{\text{Masse de la matière première de départ}} \times 100$$

L'efficacité d'extraction de l'huile d'avocat est la quantité d'huile d'avocat extraite à l'eau en gramme pour 100 g d'huile d'avocat extractible par l'hexane. Il se calcule par la formule suivante :

$$\text{Efficacité d'extraction} = \frac{\text{Rendement d'extraction}}{\text{Teneur en Lipides pour 100 g de matière fraîche}} \times 100$$

III-4 Détermination de la gamme des variables indépendantes : Plan unifactoriel

Des expériences préliminaires ont été effectuées pour déterminer l'espace de recherche des conditions optimales d'extraction de l'huile d'avocat. Pour se faire, le domaine d'étude des variables indépendantes (facteurs) ayant une influence sur le rendement d'extraction de l'huile d'avocat. Sur cette base, les trois niveaux (supérieur, médian et inférieur) de chaque

variable indépendante (température, temps, pH et ratio eau/pulpe) ont été déterminés. Le niveau médian d'un facteur correspond au rendement d'extraction maximal pour ce facteur ; en statistique c'est le mode. Les niveaux inférieur et supérieur correspondent respectivement à une unité en deçà et au dessus du mode du facteur considéré.

Pour réaliser cette section de l'étude qui consiste à déterminer les domaines d'étude des différents facteurs, le cultivar *Hickson* a été sélectionné de manière aléatoire parmi les cinq cultivars en utilisant la fonction ALEA de Microsoft Excel 2007.

III-4-1 Détermination du domaine d'étude pour la température

L'extraction à l'eau de l'huile d'avocat a été effectuée suivant le protocole adapté de Bizimana *et al.* (1993). Le temps considéré était de 90 min, le pH 4,5, le ratio eau/pulpe de 5:1(m/m), la vitesse de centrifugation de 3000 tr/min (971 g), l'agitation magnétique réglée à l'indice 2 et la gamme de température était 40, 45, 50, 55, 60 et 65°C. La meilleure température correspondait à la valeur maximale du rendement d'extraction.

III-4-2 Détermination du domaine d'étude pour le temps

L'extraction à l'eau de l'huile d'avocat était effectuée suivant le protocole adapté de Bizimana *et al.* (1993). La température considérée était de 50°C, le pH 4,5, le ratio eau/pulpe 5:1(m/m), la vitesse de centrifugation de 3000 tr/min (971 g), l'agitation réglée à l'indice 2 et la gamme de temps était 90, 120, 150, 180 et 210 min. Le meilleur temps correspondait à la valeur maximale du rendement d'extraction.

III-4-3 Détermination du domaine d'étude pour le ratio eau/pulpe

L'extraction à l'eau de l'huile d'avocat était effectuée suivant le protocole adapté de Bizimana *et al.* (1993). La température considérée était de 50°C, le pH 4,5, le temps 90 min, la vitesse de centrifugation de 3000 tr/min (971 g), l'agitation réglée à l'indice 2 et la gamme

du ratio (m/m) était 3 :1, 4 :1, 5 :1 et 6 :1. Le meilleur ratio correspondait à la valeur maximale du rendement d'extraction.

III-4-4 Détermination du domaine d'étude pour le pH

L'extraction à l'eau de l'huile d'avocat était effectuée suivant le protocole adapté de Bizimana *et al.* (1993). La température considérée était de 50°C, le ratio eau/pulpe de 5:1(m/m), le temps 90 min, la vitesse de centrifugation 3000 tr/min (971 g), l'agitation réglée à l'indice 2 et la gamme du pH était 4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 et 6,5. Le meilleur pH correspondait à la valeur maximale du rendement d'extraction.

III-5 Modélisation de l'extraction d'huile : Méthodologie des surfaces réponses

La régression linéaire multiple était utilisée dans la méthodologie des surfaces réponses (RSM) pour décrire la variabilité de l'efficacité d'extraction de l'huile d'avocat en fonction des variables indépendantes (température, pH, temps et ratio eau/pulpe). Un plan factoriel complet 2^4 , contenant les niveaux de +1, - 1 et cinq points centraux (niveau 0), était réalisé selon la méthode présentée par Myers et Montgomery (2002). Les 21 expériences du modèle statistique sont construites grâce à l'algorithme de Yates. Les variables indépendantes sont codées en utilisant la formule suivante :

$$x_i = \frac{x_i - x_0}{\Delta x_i} \quad i = 1, 2$$

Où x_i représente les valeurs expérimentales codifiées de la variable indépendante i , x_0 est la valeur expérimentale de la variable indépendante au point central et Δx_i est la dispersion sur x_i .

Un modèle statistique du premier degré est utilisé :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

Où y est la réponse prédite, β_0 la constante, β_i les termes linéaires, x_i les variables indépendantes, k le nombre de paramètres, ε le résidu.

L'adéquation et la validité des modèles de régression multiple développées sont vérifiées par la normalité, l'homoscédacité, l'autocorrélation des résidus, l'analyse de variance, le test de manque d'ajustement, les coefficients de détermination (ajusté et non) et le test de Mallows tels que décrit par Bradley (2007).

III-6 Optimisation multicritère des réponses

Toutes les réponses obtenues après la modélisation sont maximisées afin de trouver les conditions idéales optimales d'extraction des 5 cultivars. La technique employée est la fonction de désirabilité qui s'appuie sur la moyenne géométrique pondérée développée par Derringer et Suich (1980) suivant l'équation :

$$D = (d_1^{w_1} \times d_2^{w_2} \times \dots \times d_i^{w_i})^{1/k}$$

Où D est la fonction de désirabilité globale des 5 réponses par essai, d_i est la fonction de désirabilité individuelle de chaque réponse par essai, k est le nombre de réponses (il vaut 5 dans cette étude) et w_i est le poids relatif de la i ème réponse.

Rappelons que 21 essais sont effectués, ceci correspond à 21 désirabilités globales pour chacun des cultivars utilisés.

Dans cette étude le poids relatif des réponses de *Booth 7*, *Booth 8*, *Collinson* et *Hickson* sont identiques ($w_1 = w_2 = w_3 = w_4 = 0,21$) et celui de *Lula* de 0,16 sur la base de la productivité agricole des cultivars : *Booth 7*, *Booth 8*, *Collinson* et *Hickson* de 100 kg/arbre/an chacun (ce qui fait un ratio de $100/480 = 0,21$) et *Lula* de 80 kg/arbre/an (ce qui fait un ratio de $80/480 = 0,16$). La fonction de désirabilité globale devient donc :

$$D = (d_1^{0,21} \times d_2^{0,21} \times d_3^{0,21} \times d_4^{0,21} \times d_5^{0,16})^{1/5}$$

Les desirabilités individuelles (d_1, d_2, d_3, d_4 et d_5) sont calculées selon la formule suivante :

$$d_i = \frac{Y(x_i) - L_i}{T_i - L_i}$$

Où $Y(x_i)$ est la valeur de l'efficacité d'extraction obtenue après chacun des 21 essais pour chaque cultivar ; L_i et T_i sont respectivement les bornes inférieure et supérieure de l'efficacité d'extraction fixées pour la desirabilité individuelle pour chaque cultivar après réalisation de la matrice d'expériences.

L'obtention des 21 desirabilités globales permet de retrouver la desirabilité globale la plus proche de 1 qui correspond à l'essai qui donne les conditions idéales d'extraction des 5 cultivars.

Rappelons que la desirabilité globale varie entre 0 et 1. Si elle est proche de 1 alors nous sommes proches des conditions idéales communes ; dans le cas contraire, il s'avère que les optima des différentes réponses soient très éloignés les uns des autres pour aboutir à un compromis (Raissi et R-Eslami Farmi, 2009).

III-7 Conservation des échantillons d'huile

Les échantillons d'huile ont été extraits en utilisant les conditions optimales produites par les équations de régression multiple pour la méthode d'extraction aqueuse. Les échantillons d'huile obtenus étaient conditionnés dans des flacons en verre opaques et conservés à 4°C pour les analyses futures.

IV-Détermination des propriétés physicochimiques

Afin de s'assurer que le traitement d'extraction qui a été défini, a amélioré le rendement d'extraction tout en préservant sa composition chimique, le cultivar *Lula* a été choisi pour la suite du travail. En effet, ce cultivar présente le plus grand rendement

d'extraction. Il fait partie des cultivars délaissés par les marchands d'avocat et est le cultivar qui permet au mieux une étude comparative avec la littérature. Exception a été faite pour la détermination des similitudes et différences par spectroscopie infrarouge où les huiles extraites des 5 cultivars sont utilisées. Sur l'huile du cultivar *Lula* a été effectuée un screening spectral qualitatif afin de mettre en évidence la présence les polyphénols, caroténoïdes, chlorophylles, tocophérols. Ensuite, il s'en est suivi une quantification de ces derniers ainsi que les constituants saponifiables et insaponifiables de l'huile. Par la suite, ce même cultivar a été utilisé pour étudier la stabilité oxydative de l'huile ainsi que la stabilité physique d'une émulsion huile dans l'eau.

IV-1 Propriétés chimiques

IV-1-1 Caractérisation des huiles d'avocats par spectroscopie infrarouge

Principe

Cette caractérisation est basée sur l'aptitude qu'ont les groupes fonctionnels et les liaisons des molécules à présenter des bandes d'absorption dans un domaine spectral du moyen infrarouge ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$) à savoir : $2800 - 3050 \text{ cm}^{-1}$ pour les doubles insaturations et $1690 - 1790 \text{ cm}^{-1}$ pour la fonction ester carboxylique. L'enregistrement de ces pics permet de comparer la variance des facteurs responsables de la différence des échantillons d'huile à la variance résiduelle à l'aide d'une analyse en composante principale afin de ressortir les similitudes et les empreintes spécifiques dans le domaine de l'infrarouge moyen (Dunteman, 1989 ; Ismael *et al.*, 1997).

Mode opératoire

Dans une première étape, le spectre de référence est d'abord enregistré avec l'air. Ensuite, à l'aide d'une micropipette, $20 \mu\text{L}$ d'huile d'avocat sont déposés à la surface du cristal du support porte-échantillon du spectromètre. Une bonne pression était exercée afin d'avoir un bon contact optique. L'interférogramme est enregistré, suivi du nettoyage du cristal

avec de l'hexane afin d'éviter une contamination entre les extraits d'huile à mesurer. L'huile d'avocat commerciale (Bioleane, France, certifiée organique par Ecosert SEE Ltd., UK-ECO-007) est utilisée comme huile standard. Chaque mesure par échantillon est effectuée 3 fois. La génération des spectres est effectuée à l'aide d'un spectromètre à Transformée de Fourier (Model Tensor 27, Bruker, Allemagne) équipé d'un détecteur à sulfate de triglycérine deutéré (DTGS) qui collecte des spectres à réflexion totale atténuée de 400 – 4000 cm^{-1} en 264 scans avec une résolution de 8 cm^{-1} . L'intégration des pics est faite avec le logiciel OPUS 6.0. Les données spectrales sont classées avec le logiciel Origin Pro 8.6.1 dans une version compatible au logiciel Unscrambler 9.7 (Camo, Norvège) avec lequel l'analyse en composante principale (ACP) est conduite pour déterminer les similitudes et les différences entre les huiles.

IV-1-2 Caractérisation de l'huile d'avocat par spectrophotométrie UV-Vis

Principe

Cette caractérisation est basée sur l'aptitude qu'ont les groupes fonctionnels et les liaisons des chromophores à présenter des bandes d'absorption dans les domaines spectraux de l'ultraviolet et du visible (Coroghi & Banni, 1994). Dans ce cas les molécules recherchées sont les diènes et triènes conjugués qui absorbent entre 230 – 270 nm, les hydroperoxydes entre 270 – 280 nm, les polyphénols entre 300 – 400 nm, les caroténoïdes entre 442 – 460 nm et les chlorophylles entre 625 – 710 nm (Standard polonais PN-A-86934, 1995 ; Cerretani *et al.*, 2005 ; Mińkowski *et al.*, 2010 ; Gomez *et al.*, 2011).

Les spectres dérivés servent à mettre en évidence les changements de pente des spectres (épaulement par exemple). Ainsi dans un spectre dérivé d'ordre n, un pic du spectre d'origine se traduit par l'existence de n+1 pics alternant des pics positifs et négatifs. Dans le cas des spectres dérivés secondes (d'ordre 2), les pics du spectre d'origine sont représentés par des pics négatifs.

Mode opératoire

Les spectres d'absorption de l'huile d'avocat en solution dans l'isopropanol (2,3 et 30 mg/mL) placée dans une cuve optique en quartz de 1 cm de trajet optique (Hellma, 108.002 QS, 10 mm) sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis double faisceau (UV-1800 Shimadzu, logiciel UVProbe 2.33) contre le solvant. La plage de balayage était comprise entre 200 – 700 nm. Un spectre dérivé seconde est produit avec l'huile d'avocat dans l'ultraviolet (220 – 300 nm) aux concentrations 0,115 g/L ; 0,23 g/L et 2,3 g/L, afin d'amplifier l'absorption des diènes conjugués (235 nm) et des hydroperoxydes (277 nm).

IV-1-3 Caractérisation de l'huile d'avocat par spectroscopie de fluorescence

Principe

La carte d'isointensité ou les spectres d'excitation-émission de fluorescence peuvent être obtenues par balayage sur une large plage de longueurs d'ondes d'excitation (200 à 500 nm) et d'émission (250 à 600 nm) de l'échantillon d'huile d'avocat afin de pouvoir déceler la présence de fluorophores qui se caractérise par des auréoles traduisant l'émission de lumière. Ici on exploite l'aptitude qu'ont les fluorophores d'absorber l'énergie lumineuse d'une radiation et de libérer ensuite de la lumière dans un spectre d'émission de plus faible énergie et donc de longueur d'onde plus élevée.

Mode opératoire

2 mL d'huile d'avocat aux concentrations de 0,46 et 2,3 g/L dans l'isopropanol sont introduits de manière séquentielle dans une cuve en quartz pour fluorescence. L'acquisition des spectres d'excitation et d'émission est effectuée grâce au spectromètre de fluorescence HITACHI Appareil F-4500 équipé d'un dispositif à angle droit thermostaté à 25°C. Le spectre d'excitation (200 – 320 nm), à la longueur d'onde d'émission de 330 nm, et le spectre d'émission (300 – 500 nm), à la longueur d'onde d'excitation de 290 nm, sont enregistrés à une vitesse de défilement de 240 nm/min avec des fentes d'excitation et d'émission réglées à

5 nm respectivement. Une carte d'isointensité excitation-émission est réalisée avec le même spectrofluorimètre pour des gammes de longueurs d'onde comprises entre 200 à 500 nm pour l'excitation et 250 à 600 nm pour l'émission. La vitesse de défilement est de 2400 nm/min, des fentes de 5 nm, des pas d'acquisition de 2 et 5 nm pour l'émission et l'excitation respectivement.

IV-1-4 Détermination de la teneur en insaponifiables (AOAC, 2000)

Principe

Elle repose sur l'hydrolyse alcaline à chaud de l'huile d'avocat et la séparation des fractions insaponifiable et saponifiable par partition liquide – liquide sur la base de leur différence de solubilité dans les solvants organiques apolaires.

Mode opératoire

Une quantité de 2,5 g d'huile d'avocat est introduite dans une fiole de 250 mL munie d'un réfrigérant à reflux. On y ajoute par la suite 25 mL d'éthanol 95%, 1,5 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium 50% et le tout est chauffé dans un bain-marie pendant 1 heure, en agitant fréquemment. Le contenu du ballon est transféré dans une ampoule à décanter après ajout de 25 mL d'éthanol et 25 mL d'eau distillée. Le tout est laissé à refroidir à température ambiante. Ensuite on introduit 50 mL d'éther de pétrole dans l'ampoule à décanter et le tout est laissé au repos. La couche savonneuse inférieure est collectée et 2 nouvelles extractions à l'éther de pétrole (50 mL chacune) sont faites sur cette couche. Les phases étherées sont combinées dans une autre ampoule à décanter et ces derniers sont lavés 3 fois avec 25 mL d'une solution hydroéthanolique et 25 mL d'eau distillée pour s'assurer que la phase ne contient plus d'hydroxyde de sodium. Le test à la phénolphtaléine est effectué pour s'assurer que l'extrait étheré est exempt d'hydroxyde de sodium. L'extrait étheré est transféré dans un ballon de 250 mL et l'évaporation de l'éther de pétrole est conduite jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 3 mL approximativement dans le ballon. Ces 3 mL sont transférés dans un tube à

essai et évaporés sous un courant d'azote jusqu'à poids constant. L'extraction des insaponifiables a été faite en triple.

Le calcul s'est fait en utilisant la formule suivante :

$$\text{Teneur en insaponifiables} = \frac{M_r}{M_e} \times 100$$

Où la teneur en insaponifiable est exprimée en %, M_r est la masse (g) de la fraction insaponifiable et M_e (g) la masse de l'huile d'avocat de départ.

IV-1-5 Détermination de la teneur en chlorophylles (AOCS, 1987)

Principe

Elle repose sur l'absorption de la phéophytine a à 670 nm dans l'hexane après correction de l'absorption de fond car elle est le pigment le plus abondant dans les huiles végétales brutes.

Mode opératoire

Dans 10 mL d'hexane utilisé aussi comme solution de référence, 1 g d'huile d'avocat y est dissout. L'absorbance de la solution est mesurée à 630, 670 et 710 nm à l'aide d'une cuve en verre dans un spectrophotomètre UV/Vis (Cary20). La mesure des absorbances est effectuée en triple. La teneur en chlorophylle est calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{Teneur en chlorophylles} = \frac{[A_{670} - (0,5 \times A_{630}) - (0,5 \times A_{710})]}{L} \times 345,3$$

Où la teneur en chlorophylle est exprimée en meqg de phéophytine a /kg d'huile, A est l'absorbance de chaque longueur d'onde respective et L est la largeur de la cuve (1 mm).

IV-1-6 Détermination de la teneur en Caroténoïdes (Ong *et al.*, 1982)

Principe

Elle consiste à mesurer la teneur en β -carotène qui a une absorption maximale à 446 nm dans l'isooctane et qui représente le caroténoïde le plus abondant dans les huiles végétales brutes.

Mode opératoire

Dans une quantité de 25 mL d'isooctane utilisée aussi comme solution de référence, est dissout 0,15 g d'huile d'avocat. L'absorbance de la solution est mesurée à 446 nm à l'aide d'une cuve en verre en utilisant un spectrophotomètre UV/visible à doubles faisceaux (Perkin Elmer Lambda 12). La mesure des absorbances est effectuée en triple. La teneur en caroténoïdes est calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{Teneur en caroténoïdes} = \frac{V \times A \times 1000}{M \times 2610}$$

Où la teneur en caroténoïdes est exprimée en meqg de β -carotène /Kg d'huile, V est le volume de l'isooctane (25 mL), A est l'absorbance à 446 nm, M est la masse de l'huile (g) et 2610 est le coefficient d'extinction du β -carotène dans l'isooctane.

IV-1-7 Détermination de la teneur en acide gras *trans* total (AOAC, 2000)

Principe

Elle consiste à déterminer le ratio dans le domaine $945 - 990 \text{ cm}^{-1}$ entre l'interférogramme atténué de l'échantillon sur celui de la référence dépourvue de liaison *trans* afin de générer un spectre d'absorption ayant un pic maximal à 966 cm^{-1} dont l'aire en dessous du pic projetée sur la courbe d'étalonnage donne la teneur en acides gras *trans* dans l'échantillon.

Mode opératoire

Dans une première étape, le spectre de référence est d'abord enregistré. C'est l'huile d'avocat commerciale (Spinnrad, Segerberg, Allemagne) qui a servi d'échantillon de référence dépourvu d'acide gras *trans*. Ensuite, à l'aide d'une micropipette, 20 μL d'huile d'avocat sont déposés à la surface du cristal du support porte-échantillon du spectromètre. Une bonne pression est exercée afin d'avoir un bon contact optique. L'interférogramme est

également enregistré, suivi du nettoyage du cristal à l'aide de l'hexane afin d'éviter une contamination entre les répétitions d'essais. Les mesures sont effectuées 3 fois. La génération des spectres est effectuée à l'aide d'un spectromètre à Transformée de Fourier (Nicolet Avatar 320, Allemagne) équipé d'un détecteur à sulfate de triglycérine deutéré (DTGS) qui collecte des spectres à réflexion totale atténuée de 900 – 1050 cm^{-1} en 128 scans avec une résolution de 4 cm^{-1} . L'intégration de la zone 945 – 990 cm^{-1} et la détermination de l'aire en dessous du pic sont effectuées avec le logiciel OMNIC 6.8. La courbe d'étalonnage est construite en pesant (0,3 – x) gramme d'huile d'avocat commerciale dans des tubes eppendorf où x représente la masse (g) de l'élaidine ayant les valeurs suivantes : 0,0015 ; 0,015 ; 0,03 ; 0,06 ; 0,09 ; 0,12 et 0,15 g. Cette progression de la gamme donne des teneurs en élaidine (liaisons *trans*) de 0,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% et 50% que l'on fait correspondre avec les aires en dessous des pics considérés. La teneur en acides gras *trans* dans l'huile d'avocat est déterminée grâce à la formule suivante :

$$\text{Pourcentage en acide gras } \textit{trans} = \frac{\text{Aire}}{\text{Pente}}$$

IV-1-8 Détermination de la composition en acide gras (AOCS, 1989)

Principe

Elle consiste en l'hydrolyse alcaline à chaud des lipides complexes afin de libérer les acides gras qui subiront avec des acides gras libres de la matière grasse une méthylation catalytique pour donner des esters d'acides gras plus volatils que leurs analogues non dérivés. La méthylation des acides gras permet leur identification et leur quantification en chromatographie en phase gazeuse grâce à des acides gras de référence (interne et externe).

Mode opératoire

Une portion de l'échantillon d'huile d'avocat est séchée à l'aide d'un évaporateur à azote et 10 mg sont pesés dans un tube en verre de 15 mL avec bouchon en téflon. Puis 0,5

mL d'acide pentadécanoïque 0,5 mg/mL (standard interne) est ajouté. Un volume de 0,4 mL d'une solution méthanolique d'hydroxyde de sodium 0,5N est ajouté et le tout bouché, le mélange est porté à ébullition à 100°C pendant 5 min afin que la saponification puisse avoir lieu. Ensuite le tube est refroidi à l'eau de robinet et 0,4 mL d'une solution méthanolique de trifluorure de bore (13 – 15%) est ajouté au mélange et le tout est porté à la température de 100°C pendant 5 min afin d'assurer la méthylation. Le tube est ensuite refroidi à l'eau de robinet, 2 mL d'isooctane et 8,5 mL d'eau distillée sont ajoutés successivement afin de séparer la phase aqueuse de la phase organique (contenant les esters d'acides gras). Le mélange est homogénéisé pendant 10 min et centrifugé pendant 5 min à 1000 g. Un volume de 1,5 mL du surnageant est récupéré et disposé dans un flacon de chromatographie en phase gazeuse contenant approximativement 1 mm de sulfate de sodium anhydre pour fixer le méthanol résiduel. L'analyse des acides gras est effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Perkin Elmer Autosystem XL, Allemagne) équipé d'une colonne Megabore DB 23 (25 m de long, 0,53 mm de diamètre intérieur et 0,5 µm d'épaisseur), d'un détecteur à ionisation de flamme (250°C) et d'un injecteur qui est utilisé en mode « avec division » à 250°C. Le volume d'injection était de 1 µL. Pour le four, le processus de température à gradient utilisé était le suivant : 60°C pendant 1 min, puis une vitesse de 20°C/min afin d'atteindre 190°C, puis une vitesse de 4°C/min pour atteindre 220°C et enfin une vitesse de 20°C/min pour atteindre 230°C où la température reste stationnaire pendant 10 min. Le gaz vecteur est l'azote de pureté 5.0 et avec un écoulement de 1 mL/min. Les profils chromatographiques sont traités par le logiciel TotalChrom 6.3.1 permettant une intégration de chaque pic. Les acides gras de l'échantillon sont identifiés et quantifiés en comparant leurs temps de rétention et leurs aires avec ceux des standards. L'expérience a été menée en triple.

Les standards externes (SIGMA-ALDRICH, Allemagne) utilisés ici sont des esters des acides gras suivants : acide myristique, acide pentadécanoïque, acide palmitique, acide

palmitoléique, acide stéarique, acide oléique, acide linoléique, acide linoléique et acide arachidonique. Ils sont tous préparés à la concentration de 0,5 mg/mL dans 1 mL d'isooctane.

Les concentrations et les proportions des acides gras ciblés dans l'huile d'avocat sont déterminées d'après le schéma de calcul ci-dessous :

- Détermination de l'aire corrigée de chaque acide gras présent dans l'huile :

$$\mathbf{Aire}_{c,x} = \frac{\mathbf{Aire}_{C15, standard}}{\mathbf{Aire}_{C15, \acute{e}chantillon}} \times \mathbf{Aire}_x$$

Où $\mathbf{Aire}_{c,x}$: Aire corrigée de l'acide gras x dans l'huile d'avocat ; $\mathbf{Aire}_{C15, standard}$: Aire du pentadécanoate de méthyle dans le standard externe et $\mathbf{Aire}_{C15, \acute{e}chantillon}$: Aire du pentadécanoate de méthyle comme l'échantillon (Standard interne) ; \mathbf{Aire}_x : Aire de l'acide gras x dans l'huile d'avocat ;

- Détermination de la concentration massique de chaque acide gras dans l'huile d'avocat :

$$[x] = \mathbf{Aire}_{c,x} \times \frac{\mathbf{Mx}_{standard}}{\mathbf{Aire}_{x, standard} \times \mathbf{M}}$$

Où $[x]$ est la concentration de l'acide gras x dans l'huile d'avocat (mg/g) ; $\mathbf{Mx}_{standard}$ la masse de l'acide gras x comme standard externe (mg) ; $\mathbf{Aire}_{c,x}$ l'aire corrigée de l'acide gras x dans l'huile d'avocat ; et $\mathbf{Aire}_{x, standard}$ l'aire de l'acide gras x comme standard externe ; \mathbf{M} la masse de la prise d'huile d'avocat (g).

IV-1-9 Détermination de la composition en glycérides partiels, acides gras libres et lipides polaires (Myher et Kursis, 1984)

Principe

Les constituants des lipides neutres sont dérivés en présence de la pyridine/BSA conduisant à la formation des dérivés triméthylsilylés volatils ayant la propriété d'être séparés et quantifier en chromatographie liquide haute performance (CLHP) grâce à des standards externes.

Mode opératoire

10 μL d'huile d'avocat solubilisé dans le chloroforme ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$) sont injectés automatiquement sur un système CLHP (Dionex RS-LC Ultimate 3000) équipé d'un injecteur automatique (Autosampler Ultimate 3000), d'une colonne de silice (PrevailSilica : $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$) et couplé à un détecteur à diffusion de lumière (Sedex model 85, S.E.D.E.R.E., Alfortville, France). La phase mobile était constituée du solvant A (chloroforme) et du solvant B (méthanol/ammoniaque/chloroforme : 460/35/5), préalablement filtrés sous vide sur filtre $0,22 \mu\text{m}$. La séparation chromatographique est réalisée à un débit de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ suivant un gradient linéaire en trois étapes: 0% solvant B ($t = 0 \text{ min}$), ensuite 50% solvant B ($t = 8 \text{ min}$), après 100% solvant B ($t = 12 \text{ min}$), puis 100% solvant B ($t = 15 \text{ min}$), ensuite 0% solvant B ($t = 15,1 \text{ min}$) et enfin 0% solvant B pendant 3 min. Le temps total d'analyse chromatographique était de 20 minutes par échantillon. La température de la colonne et des échantillons étaient maintenues respectivement à 30°C et 20°C . La détection des classes lipidiques est effectuée au moyen d'un détecteur à diffusion de lumière dont la pression de gaz nébuliseur est maintenue à 6 bars et la température du tube de nébulisation fixée à 50°C . L'identification des classes lipidiques est effectuée par comparaison des temps de rétention des pics obtenus pour les extraits lipidiques avec ceux de solutions standards. La quantification des lipides est réalisée grâce à un étalonnage externe.

La détermination des concentrations en acides gras libres, monoglycérides, diglycérides, phospholipides et glycolipides dans l'échantillon est faite en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration} = \frac{\text{M}}{\text{Volume d'injection}} \times \frac{\text{Volume final de l'échantillon}}{\text{Masse de l'échantillon}}$$

Où M est la masse en acides gras libres, phospholipides, monoglycérides, diglycérides, phospholipides ou glycolipides dans l'échantillon (μg), volume d'injection (ml), volume de l'échantillon (ml), masse de l'échantillon (g), concentration ($\mu\text{g/g}$).

IV-1-10 Détermination de la composition en stérols et squalène (ISO 12228, 1999)

Principe

Elle consiste en l'extraction différentielle de la fraction insaponifiable grâce à un solvant organique apolaire et la séparation des stérols et du squalène contenus dans cette fraction par chromatographie en phase gazeuse contre des standards externes.

Mode opératoire

Une portion de l'échantillon d'huile d'avocat est séchée à l'aide d'un évaporateur à azote et 20 mg sont pesés dans un tube en verre de 6 mL avec bouchon en téflon. 100 μL 5 α -cholestane 0,432 mg/mL (standard interne) sont introduits dans le tube. Ensuite 1 mL d'une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium 50% est ajouté au mélange, le tout bouché est porté à 80°C pendant 30 min. Le tube est ensuite refroidi à l'eau de robinet et 1 mL d'eau distillée et 2 mL d'isooctane sont successivement ajoutés. Le mélange est agité pendant 1 min dans un agitateur de tube puis centrifugé pendant 5 min à 1000 g. Puis 1 mL du surnageant est prélevé et introduit dans un flacon de chromatographie en phase gazeuse contenant approximativement 1 mm de sulfate de sodium anhydre pour fixer l'éthanol résiduel. L'analyse des stérols et du squalène est effectuée à l'aide d'un chromatographe en phase

gazeuse (Perkin Elmer Autosystem XL, Allemagne) équipé d'une colonne capillaire DB-5 (30 m de long, 0,32 mm de diamètre intérieur, et 0,25 µm d'épaisseur), d'un détecteur à ionisation de flamme (300°C) et d'un injecteur utilisé en mode « dans la colonne ». Le volume d'injection est de 1 µL. L'évolution de la température dans l'injecteur est comme suit : température initiale de 80°C, puis une vitesse de 190°C/min afin d'atteindre la température finale de 270°C qui reste constante pendant 20,5 min. Pour le four, le processus de température à gradient est utilisé selon qu'il suit : 80°C pendant 1 min, puis une vitesse de 20°C/min afin d'atteindre 250°C, puis une vitesse de 10°C/min pour atteindre 300°C où la température reste stationnaire pendant 7 min. Le gaz vecteur est l'hydrogène avec un écoulement de 2 mL/min. Les profils chromatographiques sont traités par le logiciel TotalChrom 6.3.1 permettant une intégration de chaque pic et les phytostérols de l'échantillon sont identifiés et quantifiés en comparant leurs temps de rétention et leurs aires de pic avec ceux des standards. L'expérience était menée en triple.

Un mélange de stérols et squalène dans l'isooctane correspondant aux standards externes (SIGMA-ALDRICH, Allemagne) utilisés ici, est constitué de : squalène (0,02 mg/mL), 5α-cholestane (0,02 mg/mL), brassicastérol (0,014 mg/mL), δ5-campestérol (0,012 mg/mL), stigmastérol (0,013 mg/mL), cholestérol (0,02 mg/mL) et β-sitostérol (0,019 mg/mL).

La détermination de la concentration et des proportions des acides gras ciblés dans l'huile d'avocat est faite suivant qu'il suit :

- Détermination du facteur de réponse de chaque stérol identifié :

$$F_x = \frac{\text{Aire}_{5\alpha\text{-cholestane}} \times [x]_{\text{std}}}{[5\alpha\text{-cholestane}] \times \text{Aire}_x}$$

Où F_x : est le facteur de réponse du stérol identifié ; $Aire_{5\alpha\text{-cholestane}}$: Aire du standard interne (5 α -cholestane) ; $Aire_x$: Aire du stérol considéré dans le mélange de standards externes ; $[5\alpha\text{-cholestane}]$: Concentration du standard interne dans l'isooctane (0,0216 mg/mL) ; et $[x]$: Concentration du stérol considéré dans le standard.

➤ La concentration des stérols dans l'huile :

$$[x] = \frac{Aire_x \times M_{std\ int} \times F_x}{Aire_{stdint} \times M} \times 100$$

Où $[x]$: concentration du stérol considéré (mg/100 g d'huile) ; $Aire_x$: Aire du stérol considéré dans le mélange de standard ; $Aire_{stdint}$: Aire du standard interne dans l'échantillon ; F_x : Facteur de réponse de chaque stérol ; M_{stdint} : Masse du standard interne (mg) ; et M : la masse de l'échantillon (g).

IV-1-11 Détermination de la composition en tocophérols et tocotriénols (Buttris et Diplock, 1984)

Principe

Elle est basée sur la capacité fluorescente des tocophérols et tocotriénols à exciter la lumière à 290 nm et en émettre à 330 nm. Cette propriété est exploitée en chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur à fluorescence après saponification pour les quantifier dans les huiles végétales brutes en utilisant des standards externes.

Mode opératoire

Environ 0,2 g d'huile d'avocat sont prélevés à l'aide d'une micropipette et directement pesés dans une fiole de 5 mL à l'aide d'une balance d'analyse (Mettler AT261 DeltaRange). Le volume est complété au trait de jauge avec de l'hexane. Cette solution est diluée au 1/5 avec de l'hexane dans un pilulier de 2 mL. La phase mobile est préparée en mélangeant de

l'hexane (75 mL) et ether terbuthylméthylique (15 mL), puis filtrée à travers les pores de 0,22 µm d'un appareil de filtration sous vide. Les échantillons sont disposés dans un passeur automatique d'un chromatographe isocratique équipé d'une pompe délivrant 1,5 mL de phase mobile/min, d'une colonne de silice, 120, 250 x4 mm (Supelcosil TH LC-Si, Supelco) d'un détecteur de fluorescence (Spectrofluorimètre SFM 25 Kontron Analytical), d'un passeur d'échantillons muni d'une vanne Rhéodyne avec une boucle d'injection de 20 µL. Les mesures sont effectuées à une excitation de 295 nm et une émission de 330 nm pendant un temps d'acquisition de 8 min avec une cadence de 5 points/seconde. Les tocophérols sont identifiés avec le logiciel APEX du micro ordinateur en comparant leur temps de rétention avec ceux des standards. La quantification est réalisée à l'aide d'une gamme d'étalonnage externe constituée du mélange des solutions standards d'α, β, γ, δ tocophérols et α, γ, δ tocotriénols. Les résultats sont exprimés en µg/g d'huile.

La détermination de la concentration de chaque tocophérol dans l'échantillon est faite en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration} = \frac{\frac{M_T}{\text{Volume d'injection}} \times \text{Volume final de l'échantillon}}{\text{Masse de l'échantillon}}$$

Où concentration des tocophérols ou tocotriénols (µg/g), volume final de l'échantillon (ml), M_T est la masse du tocophérol ou tocotriénols (µg), volume d'injection (ml), masse de l'échantillon (g).

IV-1-12 Détermination de la teneur en composés polaires totaux (Dobarganes *et al.*, 2000)

Principe

Il repose sur la sélectivité d'adsorption et d'élution des composés polaires et non polaires sur le gel de silice lors de la chromatographie sur colonne et leur révélation en chromatographie sur couche mince.

Mode opératoire

❖ Séparation par chromatographie sur colonne

La colonne (diamètre interne 10 mm et longueur 150 mm) est remplie avec 5 mL d'éther de pétrole/éther diéthylique 90/10 (v/v) et du coton chirurgical est introduit dans la partie inférieure à l'aide d'une barre en verre. 5 g de gel de silice 60 (Merck Millipore, Allemagne) préalablement séchés dans un four à 103°C et contenant 5% (m/m) d'eau sont pesés dans un bécher de 50 mL, et 10 mL du système solvant précédent y sont introduits. Le mélange est introduit dans la colonne à l'aide d'un entonnoir et le solvant de rinçage du bécher est introduit dans la même colonne. Le robinet de la colonne est ouvert afin de ramener le niveau du système solvant légèrement au dessus du gel de silice. La colonne est légèrement tapotée afin de permettre au gel de se tasser et d'éliminer les bulles d'air. Une quantité équivalente à 1 g de sable de mer est ajoutée au dessus à l'aide d'un entonnoir s'assurant qu'il soit légèrement submergé par le système solvant. Dans une fiole jaugée de 5 mL, 0,5 g d'huile est pesé. Le système solvant précédent est complété jusqu'au trait de jauge et le mélange est introduit dans la colonne à l'aide d'une micropipette de 1 mL tout en évitant de déstabiliser la surface du gel. Deux ballons à fond plat de 100 mL sont pesés et l'un est placé au niveau du robinet de la colonne. Ce premier ballon sert à éluer la fraction non polaire de l'huile à l'aide de 60 mL du système solvant précédent. La sortie de la colonne est nettoyée à l'aide d'une micropipette contenant le système solvant précédent. Ensuite le second ballon est placé et la fraction polaire de l'huile est éluee avec 50 mL d'éther diéthylique. Les systèmes solvants

contenus dans les 2 ballons sont évaporés sous vide à 60°C à l'aide d'un évaporateur rotatif et les ballons sont ensuite pesés. Le pourcentage en composés polaires est calculé avec la formule suivante :

$$\text{Teneur en composés polaires totaux} = \frac{M_1 - M_2}{M_3} \times 100$$

Où la teneur en composés polaires totaux est exprimée en pourcentage ; M_1 : masse en gramme du ballon + fraction polaire ; M_2 : masse en gramme du ballon vide ; M_3 : masse en gramme de l'huile d'avocat de départ.

❖ Evaluation de l'efficacité de la séparation : Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance (CCMHP)

Trois solutions sont préparées dans le chloroforme : l'une contenant l'huile d'avocat (50%), et les 2 autres avec les fractions non polaires et polaires à la concentration de 1%. Une ligne horizontale est tracée à 1 cm à l'aide d'un crayon sur la partie inférieure de la plaque de CCM 10 x10 cm (HPTLC gel de silice 60, Merck kGaA, HX070972, Allemagne) et la ligne de front à 0.5 cm. 3 marques à 2,5 cm d'écart sont réalisées sur cette ligne et on y dépose 2 μ L de chacune des solutions sur ces marques à l'aide d'un capillaire. Un volume de 15 mL d'éther de pétrole/éther diéthylique/acide acétique 70/40/1 (v/v/v) est préparé pour servir d'éluant. L'éluant est introduit dans la cuve chromatographique et laissé pendant 5 min afin de permettre à la cuve d'être saturée avec la vapeur de l'éluant. La plaque de CCM est ensuite introduite et l'éluant y monte par capillarité jusqu'à la ligne de front. La plaque est sortie et séchée à l'air libre et ensuite immergée dans un bain d'acide phosphomolybdique (100g/L d'éthanol) pour révélation des taches à l'aide d'un appareil d'immersion automatique (TLC chromatogram immersion devices III, CAMAG, Allemagne). Après évaporation à l'air libre de l'éthanol du chromatogramme, ce dernier est séché à 125°C sur un appareil de séchage des chromatogrammes CCM (TLC plate Heater III, CAMAG, Allemagne). Le chromatogramme

est ensuite introduit dans un visualiseur de CCM (TLC visualizer, CAMAG, Allemagne) afin de distinguer les taches et sauvegarder l'image. Les rapports frontaux, les facteurs de capacité et le facteur de sélectivité sont calculés comme suit :

$$R_f = (h/H) \times 100$$

$$k_i = (1/R_f) - 1$$

$$\alpha = k_1/k_2$$

Où R_f est le rapport frontal, h est la distance parcourue par le composé considéré, H la distance entre la ligne horizontale inférieure et la ligne de front, k_i est le facteur de capacité du composé considéré (i prend les valeurs 1 et 2 pour les 2 fractions) et α est le facteur de sélectivité.

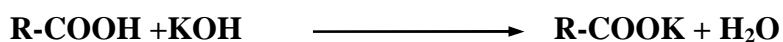
NB : Si α est différent de 1 alors la colonne est à même de séparer les 2 fractions.

IV-1-13 Détermination de l'indice d'acide

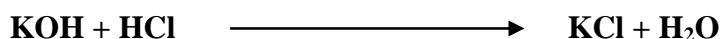
Principe

L'indice d'acide est le nombre de mg de KOH nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1 g de l'échantillon. La méthode utilisée ici est celle de l'AFNOR (1981). Elle est basée sur le principe selon lequel, dans un lipide, l'acidité résulte des groupes carboxyliques des acides gras libres. Ces acides gras sont estérifiés par un excès de KOH à température ambiante et le KOH restant est neutralisé par HCl à l'aide d'une titration colorimétrique contre un blanc avec la phénolphthaléine comme indicateur. Les équations sont les suivantes:

Processus de neutralisation:



Processus de titration:



Mode opératoire

Une solution de 500 mL d'éthanol - isobutanol 1 / 1 (v/v) est préparée dans une fiole jaugée de 500 mL. Un volume de 125 mL de la solution précédemment préparée est introduit dans quatre béchers de 500 mL et dans les trois premiers, 5 grammes d'huile d'avocat sont ajoutés au mélange précédent. Ensuite, 2 mL de phénolphtaléine, comme indicateur, sont ajoutées dans les quatre béchers et les solutions contenant l'huile d'avocat sont titrées avec du KOH 0,1 N jusqu'à ce qu'elles virent du jaune au violet. Le même volume de KOH 0,1 N est ajouté dans le bécher contenant l'éthanol-isobutanol et la phénolphtaléine (blanc). Sa couleur vire de l'incolore au rose. A la suite, le KOH restant est titré dans les béchers test et bécher témoin avec HCl 0,1 N. Le point d'équivalence est atteint lorsque l'indicateur repasse à l'incolore dans le tube témoin et au jaune dans les tubes test. L'indice d'acide (IA) est calculé en utilisant la formule ci-dessous:

$$\text{Indice d'acide} = \frac{(M_{\text{KOHtémoin}} - M_{\text{KOHtest}})}{M_{\text{échantillon}}}$$

Où $M_{\text{KOHtémoin}}$: est la quantité de KOH en mg titrée par HCl dans le bécher témoin ;
 M_{KOHtest} : est la quantité de KOH en mg titrée par HCl dans le bécher test ; $M_{\text{échantillon}}$: est la masse de l'échantillon (huile d'avocat) en gramme.

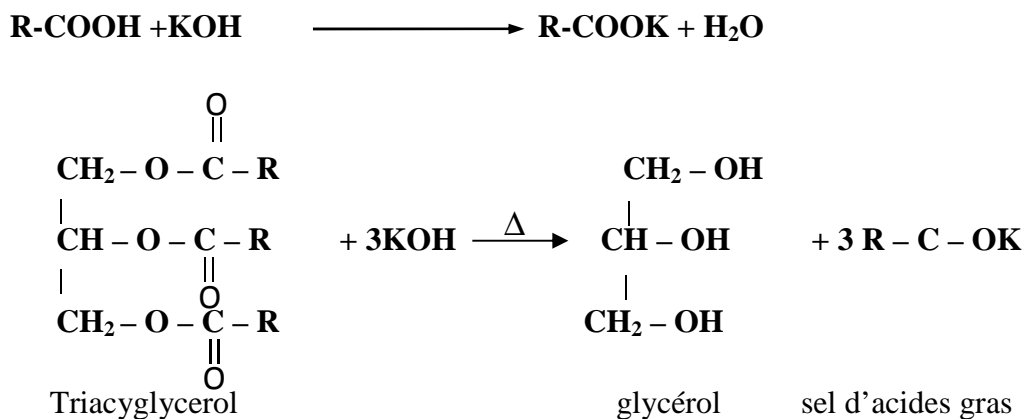
IV-1-14 Détermination de l'indice de saponification

Principe

L'indice de saponification (IS) représente le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium ou d'hydroxyde de sodium nécessaire pour saponifier 1 g de matières grasses dans les conditions spécifiées. La méthode utilisée ici est celle de l'AFNOR (1981). Elle est basée sur le principe que le KOH, à haute température, peut saponifier les triglycérides contenus dans les huiles et neutraliser les acides gras libres dans la même huile. Le KOH restant est

alors neutralisé par le HCl à l'aide d'une titration colorimétrique contre un blanc avec la phénolphthaléine comme indicateur. Les équations sont les suivantes:

Processus de neutralisation et de saponification:



Processus de Titration :



Mode opératoire

Le KOH éthanolique 0,5 N est réparti dans deux ballons (chacun recevant 20 mL). Des billes en porcelaine sont ajoutées dans chacun des ballons précédents ainsi que 2 mg d'huile d'avocat dans l'un des ballons. Un condenseur à air est fixé autour de chaque ballon et le tout est laissé à ébullition pendant 2 heures au bain-marie. Les ballons sont ensuite refroidis et la phénolphthaléine (environ 1 mL) est ajoutée jusqu'à ce que les deux solutions virent au rose. Ensuite, les deux solutions sont titrées avec HCl 1N à l'aide d'une burette. Par échantillons, 3 essais sont effectués et l'indice de saponification déterminé par l'expression suivante:

$$\text{Indice de saponification} = \frac{(V_1 - V_2) \times 56,1 \cdot 10^6 \times N_{H^+}}{M}$$

Où $N_{H^+} = 1N$; $V_1 =$ Volume du HCl 1N en litre utilisé pour titrer le témoin, $V_2 =$ Volume du HCl 1N en litre utilisé pour titrer l'échantillon, M est la masse de la prise d'essai en mg.

IV-1-15 Calcul du degré de pureté

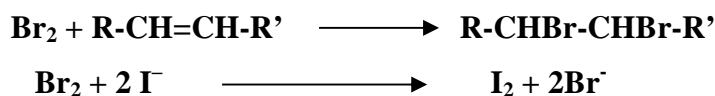
Le degré de pureté de l'huile sert à apprécier la pureté de l'huile. Les huiles alimentaires ne devraient pas avoir un pourcentage d'impuretés supérieur à 1%.

$$\text{Pourcentage d'impuretés (\%)} = \frac{\text{Indice d'acide de l'huile}}{\text{Indice de saponification de l'huile}} \times 100$$

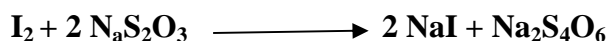
IV-1-16 Détermination de l'indice d'iode

Principe

La méthode utilisée ici est celle de Matissek *et al.* (2010). L'indice d'iode est une mesure du degré d'insaturation de l'huile. Il est défini comme le nombre de parties en masse d'iode absorbé par 100 parties en masse d'une huile ou de graisse. Il est basé sur la fixation du dibrome sur les doubles liaisons des acides gras insaturés, et l'excès de dibrome est réduit par l'iodure de potassium selon les équations:



L'iode en excès est titré par du thiosulfate de sodium de titre connu. La réaction suivante a lieu:



Mode opératoire

Dans une fiole de 250 mL, sont introduits respectivement 0,2 g d'huile d'avocat et 20 mL de toluol, et le tout laissé à dissoudre. Un volume de 20 mL d'une solution méthanolique

de bromure 0,1M est ajouté au mélange, le bouchon préalablement humidifié avec une solution d'iodure de potassium est insérée et la solution entreposée dans un endroit sombre à une température d'environ 25 à 30°C pendant 1 heure. Un volume de 15 mL de solution d'iodure de potassium (0,1N) et 100 mL d'eau distillée sont ajoutées. Le mélange obtenu est agité et titré avec du thiosulfate de sodium 0,1 N, en utilisant une solution d'amidon comme indicateur. Le nombre de mL nécessaire (V_1) est noté. L'expérience a été refaite 2 fois de plus. De la même manière, l'opération précédente est menée mais sans l'huile d'avocat et le nombre de mL de thiosulfate de sodium 0,1 N nécessaire (V_2) est noté.

L'indice d'iode est calculé par la formule suivante :

$$\text{Indice d'iode} = \frac{(V_1 - V_2) \times 0,01269 \times 100}{M}$$

Où M : masse en gramme de la prise d'essai ; V_1 : volume en mL de thiosulfate de sodium est introduit dans le bécher test et V_2 : volume en mL de thiosulfate de sodium est introduit dans le bécher témoin.

IV-2 Détermination des propriétés physiques

IV-2-1 Mesure de la couleur

Principe

La mesure de la couleur s'est faite par réflectance en utilisant un colorimètre portable qui enregistre le pourcentage de lumière réfléchiée des trois composantes du système de couleur de base en trois dimensions L^* , a^* et b^* de la « Communauté Internationale de l'Eclairage » (1976). L correspond à la clarté ou luminosité suivant une échelle allant de 0 à 100. La valeur 100 représente le blanc ou réflexion totale et la valeur 0 représente le noir ou absorbance totale. La composante a représente la chromaticité sur une échelle de 600 niveaux qui correspond au rougissement (299 valeurs positives) et au verdissement (300 valeurs négatives) en passant par le gris (0). La composante b représente la chromaticité sur une

échelle de 600 niveaux qui correspond au jaunissement (299 valeurs positives) et au bleuissement (300 valeurs négatives) en passant par le gris (0).

Mode opératoire

L'échantillon d'huile d'avocat est étalé sur un fond blanc. L'orifice de mesure du colorimètre (Chromamètre Konica Minolta série CR-400, Japon) est placé au dessus de l'échantillon dont la surface, avec un arc xénon pulsé de manière diffuse, est éclairée par un flash d'une seconde. La lumière réfléchiée par l'échantillon est analysée et le pourcentage de réflexion transformé en un système à trois dimensions L^* , a^* , b^* dont les valeurs s'affichent sur l'écran du colorimètre. Celles-ci correspondent aux coordonnées cartésiennes à la luminosité encore appelée clarté (L^*), la chromaticité rouge-vert (a^*) et la chromaticité jaune-bleu (b^*).

IV-2-2 Mesure de la viscosité (Whorlow, 1992)

Principe

Elle consiste à imposer une vitesse de rotation à l'échantillon induisant une déformation du liquide par cisaillement entre deux surfaces, l'une immobile (stator) et l'autre mobile (rotor). Les grandeurs expérimentales sont le couple de force généré par le fluide (à partir duquel on calcule la contrainte de cisaillement) et la vitesse de rotation appliquée à l'un des mobiles (qui donne la vitesse de cisaillement). Pour les fluides newtoniens tels que les huiles, la viscosité est obtenue par le rapport de la contrainte de cisaillement à la vitesse de cisaillement.

Mode opératoire

Environ 10 mL d'huile d'avocat sont déposés à l'aide d'une pipette dans le cylindre creux du stator (Diamètre interne 40 mm, diamètre externe 44,4 mm) du rhéomètre rotatif AR2000 (TA Instruments Inc., New Castle, USA). La résolution angulaire est de 0,04 μ rad. L'échantillon est cisailé à 30°C par l'administration d'une vitesse de rotation qui donne la

vitesse de cisaillement notée γ (en s^{-1}). Ensuite, on fait varier la vitesse de rotation de 0 à $100.s^{-1}$ sur 2 minutes puis on l'a ramène à $0.s^{-1}$ sur 2 minutes également. On enregistre directement la contrainte de cisaillement notée τ (en Pa) en fonction de la vitesse de cisaillement. La courbe obtenue (courbe d'écoulement) est une droite dans le cas des fluides newtoniens. La viscosité exprimée en (Pa.s) est donnée par la pente de cette droite. Les données sont analysées grâce au logiciel Rheology Advantage version 5.7.

IV-2-3 Mesure des températures de fusion et de cristallisation (AOCS, 1988)

Principe

Elle repose sur le sens des échanges de chaleur entre l'échantillon et la référence (capsule vide) qui dépend de la nature du processus de transition. La différence d'énergie fournie entre un échantillon et la référence chauffés ou refroidis simultanément à la même vitesse est enregistrée en fonction du temps. En l'absence d'événement thermique, les températures de la référence et de l'échantillon augmentent toutes deux linéairement en fonction du temps. Leur différence restant quasiment nulle et constante. Lorsqu'un événement thermique affecte l'échantillon, le calorimètre différentiel à balayage lui fournit plus ou moins de l'énergie pour maintenir sa température égale à celle de la référence. C'est la différence entre les flux de chaleur fournis à l'échantillon et à la référence, considérée comme un excès ou un déficit de chaleur spécifique qui est enregistrée. Les aires des thermogrammes sont ainsi reliées aux enthalpies des pics des transitions. La cristallisation est un phénomène exothermique qui se traduit par un pic négatif sur le thermogramme. La fusion est un phénomène endothermique qui se traduit par un pic positif. Les températures à ces pics correspondent aux températures de fusion et de cristallisation.

Mode opératoire

Deux capsules en aluminium sont préparées, l'une contenant 5,52 mg d'huile d'avocat et l'autre de l'air. Les capsules sont refermées et placées dans les porte-échantillons du four

du calorimètre à balayage différentiel PerkinElmer DSC 8500 (Shelton, CT06484, USA). L'azote est pulvérisé dans le four échantillon pour remplacer l'air par l'azote. Ensuite la température est maintenue à 10°C pendant 1 min puis amenée à 80°C à la vitesse de 20°C/min. Puis cette température est maintenue à 80°C pendant 1 min puis ramenée à - 60°C à la vitesse de 20°C/min. Un thermocouple est placé entre l'échantillon et la référence afin d'enregistrer les variations de chaleur. Une courbe représentant la chaleur en fonction de la température est obtenue avec 2 pics : l'un orienté vers le bas (cristallisation) et l'autre orienté vers le haut (fusion). La fin de l'ascension et la descente des pics représente respectivement le point de fusion et le point de cristallisation de l'huile. Les pics sont intégrés et les enthalpies de transition calculées grâce au logiciel Pyris version 10.1.

V- Etude de la stabilité oxydative de l'huile d'avocat

V-1 Détermination de l'indice de peroxyde (Jian *et al.*, 1992)

Principe

La méthode FOX (Oxydation du Fer/xylénol orange) est basée sur la capacité des peroxydes lipidiques à oxyder l'ion ferreux (Fer II) en milieu acide. La résultante de cette oxydation est la formation de l'ion ferrique (Fer III) qui se complexe avec le xylénol orange et donne un chromophore qui absorbe à 560 nm. L'intensité de la couleur produite est proportionnelle à la teneur en peroxydes.

Mode opératoire

Une quantité de 15,5 mg d'huile d'avocat est pesée dans un tube en verre borosilicaté 16 x 125 mm et 9,9 mL d'une solution de chloroforme/méthanol 7 :3 (v/v) est ajouté au tube. Les tubes sont homogénéisés pendant 4 sec et 50 µL d'une solution aqueuse de xylénol orange 10 mM sont ajoutés au mélange. Le tout est homogénéisé, puis 50 µL d'une solution aqueuse de chlorure ferreux 0,5% sont introduits dans le tube. L'ensemble est homogénéisé et laissé au repos pendant 5 min. La solution témoin est préparée en mélangeant 9,9 mL d'une

solution de chloroforme/méthanol 7 :3 (v/v), 50 µL d'une solution aqueuse de chlorure ferreux 0,5% et 50 µL d'une solution aqueuse de xylénol orange 10 mM. La densité optique est lue à 560 nm dans une cuve en verre à l'aide d'un spectrophotomètre UV/visible à double faisceaux (Perkin Elmer Lambda 12).

Une courbe d'étalonnage est réalisée grâce à du chlorure ferrique dont les quantités de fer III étaient les suivantes pour un volume final de 10 mL : 8, 11, 14, 17 et 20 µg.

L'indice de peroxyde est calculé à partir de l'expression suivante:

$$\text{Indice de peroxyde} = \frac{(A_e - A_t) \times P_i}{M_e \times 55,84 \times 2}$$

Où l'indice de peroxyde est exprimé en meq d'oxygène actif/kg d'huile ; A_e : absorbance de l'échantillon ; A_t : absorbance du témoin ; P_i : inverse de la pente de la courbe d'étalonnage ; M_e : masse de l'échantillon (g) ; 55,84 est la masse atomique du fer (g/mol) et le facteur 2 est nécessaire pour exprimer l'indice de peroxyde en meq d'oxygène.

V-2 Détermination des teneurs en diènes et triènes conjugués (IUPAC, 1987)

Principe

Elle repose sur l'absorption de la lumière des diènes et des triènes conjugués respectivement aux longueurs d'onde de 233 et 268 nm. Les concentrations des diènes et triènes conjugués sont exprimées en termes de l'hydroperoxyde de l'acide linoléique.

Mode opératoire

Dans une fiole jaugée de 25 mL est introduite respectivement, 20 mg d'huile d'avocat et 25 mL d'isooctane. La solution est homogénéisée et l'absorbance mesurée à 233 et 268 nm dans une cuve en quartz à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à double faisceaux (Perkin Elmer Lambda 12). La formule suivante a été ensuite appliquée pour déterminer la concentration en diènes et triènes conjugués en mmol/mL :

$$[x] = \frac{A_x}{\epsilon \times l}$$

Où $[x]$: concentration en diènes ou triènes (mmol/mL) ; A_x : absorbance à 233 nm ou 268 nm pour la détermination respective des diènes ou triènes conjugués ; ϵ : coefficient d'extinction molaire de l'hydroperoxyde de l'acide linoléique ($2,525 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ; l : largeur de la cuve (cm).

La conversion de la concentration des diènes ou des triènes conjugués des mmol/mL en $\mu\text{mol/g}$ s'est effectuée grâce à la formule suivante :

$$[y] = \frac{[x] \times 25}{M}$$

Où 25 : facteur qui compense le volume d'isooctane utilisé (25 mL) ; M : masse de l'huile d'avocat (g) ; $[x]$: concentration en diènes ou triènes (mmol/mL) et $[y]$: concentration en diènes ou triènes conjugués ($\mu\text{mol/g}$).

V-3 Détermination de l'indice de para-anisidine (La norme ISO 6885, 1998 modifiée)

Principe

Cette méthode repose sur la réaction, en milieu acide, des aldéhydes insaturés avec la para-anisidine pour donner un complexe jaune dont l'absorbance est mesurée à 350 nm. L'intensité de la couleur produite est proportionnelle à la concentration en aldéhydes insaturés.

Mode opératoire

1 g d'huile est pesé dans une fiole jaugée de 25 mL et dissout jusqu'au trait de jauge avec de l'isooctane (E_0). Un blanc (B_1) est réalisé dans un tube à essai de 10 mL en y introduisant 5 mL d'isooctane et 1 mL de para-anisidine. L'essai (E_1) est réalisé dans un autre

tube à essai dans lequel on a introduit 5 mL de la solution E₀ et 1 mL de para-anisidine. Les deux tubes sont agités au vortex et placés à l'obscurité pendant 8 min. Chacune des solutions (E₀, B₁ et E₁) est introduite dans une cuve en quartz propre et sèche puis bouchée hermétiquement. Après un temps total de réaction de 10 min, les absorbances sont mesurées à 350 nm au spectrophotomètre UV visible à double faisceaux (Perkin Elmer Lambda 12) contre une cuve de référence contenant exclusivement de l'isooctane. L'indice de para-anisidine est ensuite calculé grâce à la formule suivante :

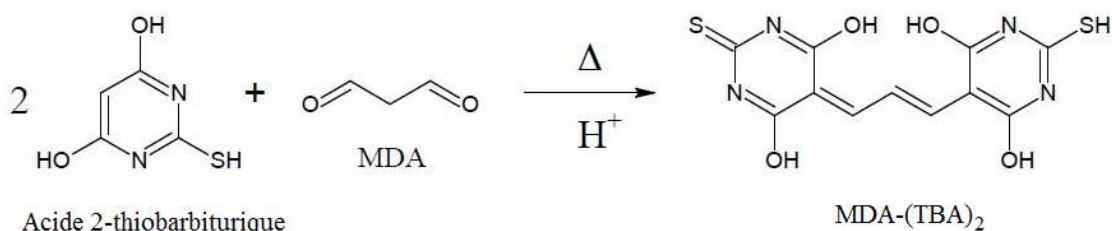
$$\text{Indice de para-anisidine} = \frac{V \times 1,2 \times (A_{E1} - A_{B1})}{M}$$

Où V : volume dans lequel l'huile a été dissoute (mL) ; M : masse de l'échantillon (g) ; A_{E1} : absorbance de l'essai ; A_{B1} : absorbance dans le blanc.

V-4 Détermination des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) (AOCS, 1998)

Principe

Elle repose sur la réaction entre 2 molécules d'acide thiobarbiturique avec une molécule de dialdéhyde pour donner un complexe rouge qui absorbe à 532 nm. L'intensité de la couleur produite est proportionnelle à la concentration en molécules réactives à l'acide thiobarbiturique.



Mode opératoire

Dans un erlenmeyer de 25 mL sont introduits respectivement 100 mg d'huile d'avocat et 25 mL de butan-1-ol. Le mélange est homogénéisé et 5 mL de la solution précédente sont transférés dans un tube en verre et 5 mL d'une solution butanolique d'acide thiobarbiturique (0,2%) y sont introduits. Le mélange est bouché et un témoin, ne contenant que 5 mL de butan-1-ol et 5 mL de TBA, sont portés à 95°C pendant 2 heures. Les tubes à essai sont refroidis à l'eau de robinet et l'absorbance mesurée à 532 nm à l'aide d'une cuve en verre. L'essai est réalisé en triple. Une courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide du malonaldéhyde bis(diméthylacétal) aux concentrations suivantes : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 10 µM.

Dans un premier temps, la valeur de la constante K est déterminée :

$$K = \frac{P_i \times PM \times FD \times 10^6}{M}$$

Où P_i : inverse de la pente de la courbe d'étalonnage ; PM : masse molaire du malonaldéhyde ; FD est le facteur de dilution ; 10^6 est le facteur de conversion qui permet d'exprimer la concentration en meq gramme de malonaldéhyde/g d'huile ; M : masse de l'échantillon (mg).

L'indice de TBARS en meq gramme de malonaldéhyde/g d'huile est déterminé grâce à l'équation qui suit :

$$\text{Indice de sr-TBA} = K \times A_{532}$$

Où A_{532} : absorbance de l'huile à 532 nm.

V-5 Détermination de la teneur en MDA

Principe

L'aldéhyde malonique (MDA), formé au cours de l'oxydation de l'huile réagit avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former un complexe de couleur rose possédant des propriétés fluorimétriques. La concentration en MDA est évaluée par mesure, après séparation du complexe MDA-(TBA)₂ par « Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) » et excitation à 535 nm contre un étalon externe selon la même équation chimique mentionnée à la section IV-4 (Seljeskog *et al.*, 2006 ; Mendes *et al.*, 2009).

Mode opératoire

Préparation de la gamme étalon : La quantification est réalisée grâce à un étalonnage externe. Une solution mère de MDA est préparée par hydrolyse acide, d'une solution de 1,1,3,3-tetra-ethoxypropane (TEP) à 1 mg/mL dans du HCl 0,1 N, au bain-marie bouillant. La concentration de cette solution de MDA est déterminée par mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 245 nm. Le coefficient d'extinction molaire était de 13500. Cette solution mère de MDA est utilisée pour établir la courbe d'étalonnage par dilutions successives aux concentrations 0 ; 0,0125 ; 0,25 ; 1,25 et 5 µM. Les conditions de réaction entre le réactif TBA 55,5 mM et les solutions de la gamme étalon de même que le blanc réactif (constitué d'acide trichloroacétique) sont identiques à celles des échantillons.

Extraction du MDA à partir des huiles : Exactement 100 µL d'huile (96,464 mg), 40µL de solution de BHT (1 mg/mL) dans l'éthanol, 80µL de solution EDTA (0,1 M) et 10 mL de acide trichloroacétique (TCA) à 5% (p/v) (0,3M) sont successivement ajoutés dans un tube à vis de 10 mL muni d'un bouchon à joint téflon. L'ensemble est mélangé pendant 1 min et les tubes sont ensuite introduits dans un bain de glace et mis au bain à ultrason pendant 5 min. Il s'est formé une phase inférieure aqueuse trouble sous une pellicule lipidique. A un volume de 3 mL de cette phase inférieure contenu dans un tube à essai est ajouté 3 mL de

réactif TBA (55,5 mM). Les tubes fermés par des bouchons à joint téflon sont homogénéisés au vortex pendant 5 secondes et incubés pendant 20 min au bain-marie à 70°C. A la sortie du bain-marie, ces tubes sont ensuite placés dans un bain d'eau froide pour refroidissement et leurs contenus (2 µL) introduits dans les piluliers pour analyse UHPLC/Fluorimétrie.

Conditions d'analyse UHPLC/Fluorimétrie : la séparation est faite à l'aide d'une chaîne UHPLC (Dionex RS-LC Ultimate 3000 équipée d'une colonne Symmetry C18 (150 m x 4,6 mm, 5 µm) couplée à un détecteur fluorimétrique (Dionex RF-2000)). La phase mobile, constituée d'un mélange tampon NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50 mM, pH: 6,8)-méthanol-acétonitrile (72:17:11, v/v/v) est filtrée sous vide sur filtre 0,22 µm, l'élution, en mode isocratique, est faite à un débit de 1mL/min. La température de la colonne est maintenue à 20°C et celle des échantillons à 10°C. L'acquisition fluorimétrique, d'une durée de 8 minutes est caractérisée par une excitation à 535 nm. Les longueurs d'ondes d'excitation optimale et d'émission maximale sont déterminées sur des solutions standards après réaction avec le réactif TBA à l'aide d'un spectrofluorimètre (HITACHI F-4500).

Traitement des données et expression des résultats : le pic correspondant au complexe MDA-(TBA)₂ est sélectivement détecté, et son aire obtenue par intégration grâce au logiciel Chromoléon. La relation de proportionnalité entre la concentration en MDA des solutions injectées ([MDA]), exprimée en µM, et la valeur de l'aire des pics (S_{MDA-(TBA)₂}), exprimée en mV.min, correspondant au volume de solution injectée est la suivante : S_{MDA-(TBA)₂} = a x [MDA]¹.

La concentration de MDA dans l'extrait lipidique avant ajout de réactif TBA est donnée par la relation [MDA]² = 2 x [MDA]¹.

Le nombre de μ mole de MDA dans la solution lipidique avant ajout de réactif est donnée par la relation: $n_{\text{MDA-(TBA)}_2} = [\text{MDA}]^2 \times V_{\text{T des tubes}}$ avec $V_{\text{T des tubes}} = V_{\text{huile}} + V_{\text{BHT/EtOH}} + V_{\text{EDTA}} + V_{\text{TCA}}$.

Les quantités en μ mole de MDA par gramme d'huile sont données par la relation:

$$Q_{\text{MDA}} = [(n_{\text{MDA-(TBA)}_2}) / \text{prise d'essai}] \times 1000$$

Avec : $[\text{MDA}]^1$ et $[\text{MDA}]^2$ en μM ; V_{huile} , $V_{\text{BHT/EtOH}}$, V_{EDTA} et V_{TCA} en L ; Prise d'essai en mg ; a = pente de la droite étalon ; 2 = facteur de dilution induit par le mélange 1/1 d'extrait et de réactif TBA.

V-6 Modélisation et prédiction de l'altération de l'huile d'avocat à hautes températures

Principe

Elle consiste à porter l'huile d'avocat à des températures et temps définis selon un plan composite centré afin de suivre la formation des composés polaires totaux quantifiés par chromatographie sur colonne. La matrice d'expériences ainsi obtenue permettra de développer un modèle linéaire de second ordre qui servira à faire des prédictions des temps d'utilisation de l'huile d'avocat dans une plage de températures données (120°C – 180°C) pour une valeur maximale en composés polaires totaux fixée à 25%.

Mode opératoire

Pour chaque expérience, 600 mg d'huile d'avocat sont pesés dans un bécher de 25 mL et chauffés sur un agitateur magnétique thermostaté dans des plages de températures et temps qui tiennent compte de la matrice d'expérimentation d'un plan composite centré (tableau VI). Dans une fiole jaugée de 5 mL, 500 mg d'huile chauffée sont introduits et le volume est complété jusqu'au trait de jauge avec le système solvant l'éther de pétrole/éther diéthylique 90/10 (v/v). Le mélange est introduit dans une colonne (diamètre interne 10 mm et longueur 150 mm), contenant du gel de silice 60 (voir section IV-1-12 précédente), à l'aide d'une

micropipette de 1 mL tout en évitant de déstabiliser la surface du gel. Deux ballons à fond plat de 100 mL sont pesés et l'un est placé au niveau du robinet de la colonne. Ce premier ballon sert à éluer la fraction non polaire de l'huile à l'aide de 60 mL du système solvant précédent. La sortie de la colonne est nettoyée à l'aide d'une micropipette contenant le système solvant précédent. Ensuite le second ballon est placé et la fraction polaire de l'huile est élue avec 50 mL d'éther diéthylique. Le ballon contenant la fraction polaire est évaporé sous vide à 60°C à l'aide d'un évaporateur rotatif et le ballon est ensuite pesé. Le pourcentage en composés polaires totaux est calculé selon la formule en section IV-6 précédente (Dobarganes *et al.*, 2000).

Le mécanisme de thermodégradation de l'huile d'avocat est décrit en utilisant un modèle composite centré rotatoire et orthogonal qui comprend 2 niveaux (-1 et +1), 2 points axiaux (- 1,414 et + 1,414) et des points centraux (0) selon Myers et Montgomery (2002). Les facteurs indépendants sont la température (120 et 190°C) et le temps (11 et 209 min) et le facteur dépendant est la teneur de composés polaires totaux.

Tableau VI : Codage des variables indépendantes du plan composite centré

Valeurs codées	Valeurs réelles	
	Température (°C)	Temps (min)
-1,41	120	11
-1	130	40
0	155	110
+1	180	180
+1,41	190	209

Les 16 expériences du modèle sont réalisées de manière aléatoire et une équation polynômiale du second degré est utilisée, à savoir :

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

Où Y est la réponse prédite, β_0 est la constante, β_i les termes linéaires, β_{ii} les termes quadratiques, β_{ij} le terme d'interaction, x_i et x_j les variables indépendantes, ε le résidu.

Les coefficients de détermination, le test de manque d'ajustement, l'analyse de variance et les coefficients de détermination (ajusté et non) sont utilisés pour évaluer la significativité du modèle et son adéquation (Bradley, 2007). La contrainte dans les prévisions étant que la teneur en composés polaires totaux n'excède pas 25%.

VI-Evaluation de la stabilité physique d'une émulsion d'huile d'avocat dans l'eau

VI-1 Emulsification et incubation des émulsions (Berton *et al.*, 2011)

Les émulsions 30% (p/p) sont constituées de 30 g d'huiles de colza ou d'avocat et de 70 g de solution aqueuse pour 100 g d'émulsion. Cette proportion correspond à des matrices alimentaires telles que certaines sauces ou vinaigrettes allégées. Les émulsions sont préparées à partir d'huiles de colza (purifiée ou non) et d'avocat et de solution aqueuse d'émulsifiant. La protéine (β -lactoglobuline) est solubilisée dans du tampon PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonate) 10 mM, NaCl 80 mM, pH 6,8 (5 g/L). Les deux phases sont pesées dans un bécher à chicanes de 250 mL. Une pré-émulsion est tout d'abord réalisée avec un homogénéisateur rotor-stator (Heidolph SilentCrusher M 595-06000-00-2) à 15000 tr/min pendant 2 minutes pour 50 g d'émulsion. L'émulsion grossière ainsi obtenue est ensuite émulsionnée plus finement avec un homogénéisateur à valve haute pression (A0812 W-A-CD, StanstedFluid Power, Stansted, Angleterre) avec une pression d'homogénéisation de 50 bars pendant 5 min, l'émulsion homogénéisée une première fois étant recyclée directement en positionnant le tuyau de sortie dans le bécher à chicanes. Les émulsions ainsi obtenues sont distribuées par aliquotes de 3 mL dans des flacons de 22 mL hermétiquement fermés à l'aide d'un septum eux même placés sous agitation rotative, l'agitateur (5 rpm) étant entreposés dans une étuve à 25°C à l'obscurité pendant 48 heures.

VI-2 Caractérisation des émulsions

VI-2-1 Distribution de la taille des gouttelettes d'huiles

Principe

La granulométrie laser est une technique basée sur la diffraction de la lumière. Pour des particules de taille supérieure à la longueur d'onde, l'analyse des données s'appuie sur la théorie de Fraunhofer qui utilise les hypothèses suivantes : on considère des particules sphériques non poreuses et non opaques, de diamètre supérieur à la longueur d'onde, animées d'un mouvement aléatoire. On suppose que les particules diffractent la lumière avec la même efficacité quelle que soit leur taille. Lorsqu'un faisceau laser éclaire une particule, on peut observer des franges de diffraction. L'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction sont fonction de la taille des particules. Plus la particule est grosse, plus l'angle de déviation de la lumière sera faible. Dans le cas où le diamètre des particules est inférieur à la longueur d'onde, la théorie de Fraunhofer cesse d'être valable et on utilise la théorie de Mie, basée sur les approximations de Rayleigh. Dans cette théorie, on suppose que la lumière est non seulement diffractée par les particules, mais qu'elle est également réfléchie et diffusée. Elle se propage jusqu'à ce qu'il y ait une variation dans l'indice de réfraction du milieu. Cette variation d'indice induit une réfraction du faisceau monochromatique qui arrive sur le détecteur en ayant subi plusieurs déviations de sa direction de propagation. L'application de la théorie de Mie nécessite donc une connaissance des propriétés optiques des particules et du milieu de dispersion.

Mode opératoire

La mesure de la taille des gouttelettes présentes dans les émulsions est réalisée avec un granulomètre laser (Mastersizer S long banc ; Malvern Instruments, Malvern, UK). La longueur d'onde du laser utilisée est de 658 nm et la distance focale de la lentille de 200 mm. Les indices de réfraction de l'eau et de l'huile de colza utilisés pour paramétrer l'analyse sont 1,331 et 1,473 respectivement (Zhang *et al.*, 2006). Les émulsions, diluée et non diluée

environ au 1/10^{ème} dans une solution de SDS à 1 g/100 g, sont ajoutées goutte à goutte jusqu'à atteindre un taux d'obscuration de 5 à 10%, le taux initial étant inférieure à 0,3%. Le résultat de l'analyse est présenté sous forme d'une courbe de fréquences de distribution des populations selon la taille des gouttelettes. Les distributions obtenues pour les différentes émulsions fraîchement préparées sont comparées sur la base des diamètres en volume ($d(v, 0,1)$, $d(v, 0,5)$; $d_{4,3}$).

Le $d_{4,3}$ est le diamètre moyen en volume. Les $d(v, 0,1)$ et $d(v, 0,5)$ sont des diamètres en volume pour des percentiles de 10% et 50% respectivement. Ces diamètres sont des indicateurs à considérer dans la stabilité physique d'une émulsion. Plus petits sont ces diamètres, plus stable sera l'émulsion.

VI-2-2 Séparation et collecte des phases aqueuse et crémée (Berton *et al.*, 2011)

Les émulsions d'huiles d'avocat et de colza sont centrifugées à 3500g pendant 45 minutes à 20°C afin de séparer les phases crémées, concentrant les gouttelettes d'huile recouvertes de leur interface, des phases aqueuses. Les phases aqueuses sont récupérées et filtrées successivement sur des membranes d'acétate de cellulose de 0,45 ; 0,20 puis 0,10 μm . Cette filtration permet d'éliminer la plupart des petites gouttelettes d'huile résiduelle dans la phase aqueuse après centrifugation. Les phases crémées sont collectées séparément.

VI-2-3 Détermination de la répartition des protéines dans l'émulsion (Berton *et al.*, 2011)

Deux approches sont utilisées. Tout d'abord l'absorbance à 280 nm permet la quantification de la β -lactoglobuline dans la phase aqueuse des émulsions d'huile d'avocat et de colza. Ensuite, l'enregistrement des spectres d'émission entre 300 – 450 nm à la longueur d'onde d'excitation de 290 nm des phases aqueuses, des phase crémées et des émulsions des deux huiles permet de confirmer la proportion de protéines dans les différentes phases. Ces spectres d'émission sont enregistrés à l'aide d'un spectrofluorimètre en mode frontal. Ce

dispositif permet d'enregistrer les spectres de fluorescence sur des échantillons concentrés et optiquement opaques placés entre les deux lames d'une cellule de quartz de trajet optique 0,5 mm (106QS, Hellma). La lumière émise à la surface de l'échantillon suite à son excitation est enregistrée sans aucune dilution de l'échantillon.

VI-2-4 Evaluation de la cinétique de déstabilisation

Les émulsions préparées selon le protocole de Berton *et al.* (2011) sont placées dans des tubes en verre ayant un diamètre interne de 2,2 cm, eux même disposés dans un aquarium rempli d'eau thermostatée (Huber) à 25°C. Les images des émulsions sont automatiquement enregistrées sur un ordinateur interfacé au système de vision artificielle (Novales *et al.*, 2003). Le système de vision artificielle utilisé pour le suivi de la stabilité des émulsions comprend une caméra 3CCD (Hamamatsu Photonics France) équipée d'un zoom 16 mm (Cosmicar) permettant d'acquérir des images en couleur. Les images sont digitalisées en 512x512 pixels avec des intensités de niveaux de gris allant de 0 (pour le noir) à 255 (pour le blanc) pour chaque canal (Rouge, Vert et Bleu). L'algorithme d'analyse d'images est basé sur les variations de niveaux de gris observées dans les images qui sont des indicateurs des phénomènes de déstabilisation se produisant au sein des émulsions. En effet, comme un fond noir sert à collecter les images, une phase claire au sein de l'émulsion se traduit par des niveaux de gris plus faible. Inversement, une phase concentrée (les émulsions ayant un aspect laiteux) se traduira par de plus grandes intensités de niveaux de gris. Pour des émulsions huile-dans-l'eau, le crémage conduit à la formation d'une phase aqueuse claire voire transparente au fond du tube et à l'apparition d'un front de crémage de plus en plus net. Ce front de crémage remontant progressivement vers le haut du tube, caractérise la formation d'une phase plus concentrée en gouttelettes. La coalescence peut de son côté aboutir à l'apparition d'une couche huileuse transparente à la surface de l'émulsion. Les deux phases aqueuse et huileuse correspondront donc à des niveaux de gris faibles alors qu'une émulsion

homogène présentera des niveaux de gris élevés. Avant cette séparation de phases, les variations de niveaux de gris d'un point particulier dans l'émulsion seront indicatrices de la migration des gouttelettes au sein de l'émulsion (Novales *et al.*, 2003).

A partir des images, les intensités de niveaux de gris moyenne observées depuis le fond du tube jusqu'au sommet des émulsions des huiles d'avocat et de colza fraîchement préparées (0 heure), à 10 heures, à 24 heures et à 40 heures sont extraites et permettent l'obtention des profils d'intensités (Novales *et al.*, 2003).

Les cinétiques de formation des phases crémées dans les émulsions d'huiles d'avocat et de colza sont réalisées pendant 42 heures à 25°C et de 48 – 120 heures à 40°C (Novales *et al.*, 2003).

VII-Analyse Statistique

Les mesures sont effectuées en double ou triple et les valeurs obtenues sont présentées en moyenne \pm erreur standard. La modélisation, l'optimisation, la détermination des moyennes et des erreurs standards sont faites avec le logiciel Statgraphics plus 5.0. L'analyse en composante principale est faite avec les logiciels Origin Pro 8.6.1 et Unscrambler 9.7. L'intégration des pics pour des acides gras, les stérols et squalène est faite avec le logiciel TotalChrom 6.3.1. L'intégration des pics pour la détermination des teneurs en acides gras *trans* et tocophérols est faite grâce aux logiciels OMNIC 6.8 et APEX respectivement. La détermination de la viscosité est effectuée par le logiciel Rheology Advantage 5.7 et les températures de fusion et de cristallisation, et les taux de solide sont calculés à partir du logiciel Peak-Fit 4.0. L'intégration des pics lors de la caractérisation et classification des huiles d'avocat grâce au logiciel OPUS 6.0. Le test de Student pour échantillon unique est appliqué pour tester si la moyenne des constituants de la composition chimique de l'huile d'avocat diffère des valeurs recommandées grâce au logiciel IBM SPSS 20.0. Les graphiques sont réalisés à l'aide de Microsoft Excel 2007. Le seuil de probabilité est fixé à 5%.

Chapitre III :
RESULTATS ET DISCUSSION

I – Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile

I-1 Teneurs en eau et en lipides neutres

Les teneurs en lipides neutres et en eau des différents cultivars d'avocat étudiés sont présentées dans le tableau VII suivant :

Tableau VII : Teneurs en eau et en lipides des 5 cultivars d'avocat

Cultivars	Teneurs en eau (g/100 g d'avocat)	Teneurs en lipides neutres (g/100 g de matière fraîche)	Teneurs en lipides neutres (g/ 100 g de matière sèche)
<i>Booth 7</i>	82,12 ± 0,75 ^{bc}	12,34 ± 2,38 ^b	68,56 ± 13,22 ^a
<i>Booth 8</i>	84,27 ± 5,24 ^c	9,44 ± 0,44 ^a	59,00 ± 2,75 ^{ab}
<i>Collinson</i>	78,09 ± 0,64 ^{ab}	12,33 ± 0,14 ^b	56,04 ± 0,64 ^{ab}
<i>Hickson</i>	81,43 ± 1,34 ^{bc}	10,64 ± 0,88 ^{ab}	48,50 ± 4,01 ^b
<i>Lula</i>	75,97 ± 0,63 ^a	15,52 ± 0,56 ^c	64,67 ± 2,33 ^a

NB : les moyennes portant des lettres différentes dans la même colonne sont statistiquement différentes ($p < 0,05$)

Il ressort du tableau VII que les teneurs en eau varient de 75,97% à 84,27% tandis que les teneurs en lipides oscillent entre 9,44% et 15,52% pour 100 g de matière fraîche. Les cultivars *Lula* et *Collinson* ont les plus faibles teneurs en eau comparées aux 3 autres. La teneur en matière sèche de l'avocat est internationalement reconnue comme indice de commercialisation (Kader et Arpaia, 2000). Les cultivars *Booth 7*, *Booth 8* et *Hickson* sont conformes à la commercialisation suivant la norme australienne qui stipule que la teneur en matière sèche doit être inférieure à 21%, soit une teneur en eau supérieure à 79%. Par ailleurs, les cultivars *Booth 7* et *Booth 8* sont non conformes à la commercialisation en Californie (USA) pour qui les teneurs en matière sèche doivent être comprises entre 19 – 25%, soit une

teneur en eau comprise entre 75 – 81% (Kader et Arpaia, 2000 ; McCarthy, 2001). Ceci renforce davantage l'idée de l'exploitation de l'huile d'avocat.

Les teneurs en lipides neutres varient de 48,5% à 68,56% pour 100 g de matière sèche (tableau VII). Les cultivars *Booth 7*, *Booth 8*, *Collinson* et *Lula* présentent les plus hautes teneurs en lipides neutres pour 100 g de matière sèche. Ces résultats sont inférieurs à la teneur en lipides du cultivar *Fuerte* qui est de 78,24% (Pushkard *et al.*, 2001). Un essai de corrélation montre un lien négatif fort entre la teneur en eau et la teneur en lipides pour 100 g de matière fraîche des avocats ($R = - 0,89$; $p = 0,042$).

I-2 Effet des différents facteurs sur le rendement d'extraction

Pour réaliser cette section de l'étude qui consiste à déterminer les domaines d'étude des différentes variables indépendantes, le cultivar *Hickson* a été utilisé par sélection aléatoire simple. Le rendement d'extraction a servi de réponse pour les variables indépendantes étudiées.

I-2-1 Effet du ratio eau/pulpe

Il ressort des observations que le rendement d'extraction croît pour des ratios eau/pulpe entre 0 et 4 :1 (m/m) pour atteindre une valeur de 2,06% puis deviendrait approximativement constant entre 4 :1 (m/m) et 6 :1 (m/m) (figure 16). On en conclut que le flux de sortie de l'huile augmente avec le gradient de concentration entre la phase aqueuse et la phase solide pour atteindre un équilibre. Johnson et Lusas (1983) ont montré que le phénomène de diffusion de l'huile lors de l'extraction aqueuse était majoritairement dû à l'insolubilité de l'huile qu'à sa dissolution dans l'eau. Dans ce cas, les composantes hydrosolubles de la matrice végétale, auxquelles est rattachée l'huile, diffusent dans l'eau, libérant l'huile qui peut par conséquent être relarguée dans le compartiment aqueux (Rosenthal *et al.*, 1996). Le relargage de cette huile hors du compartiment cellulaire serait

également l'œuvre de la différence de pressions hydrauliques entre les deux compartiments qui inciterait le mouvement de l'eau, et simultanément celui de l'huile, hors du compartiment cellulaire (Ganou, 1993). Ainsi donc, plus grande sera la diffusion des composantes hydrosolubles dans l'eau, plus important sera le volume d'huile relarguée. Ainsi plus le ratio eau/pulpe augmente dans la première phase (entre 0 et 4 :1 (m/m)), plus important est le recouvrement de l'huile. Cette phase d'accroissement du rendement d'extraction avait déjà été observée par Aderemi et Umar (2008) qui ont démontré que le volume du solvant avait un effet positif sur l'extraction hexanique de l'huile de lima. Au-delà du ratio eau/pulpe 4, ce rapport semble ne plus avoir beaucoup d'effet sur l'extraction de l'huile car l'équilibre dans la répartition de l'huile entre les deux compartiments serait atteint. Le pic maximal (5) est compris entre 4 et 6, et cet intervalle représente la gamme d'étude.

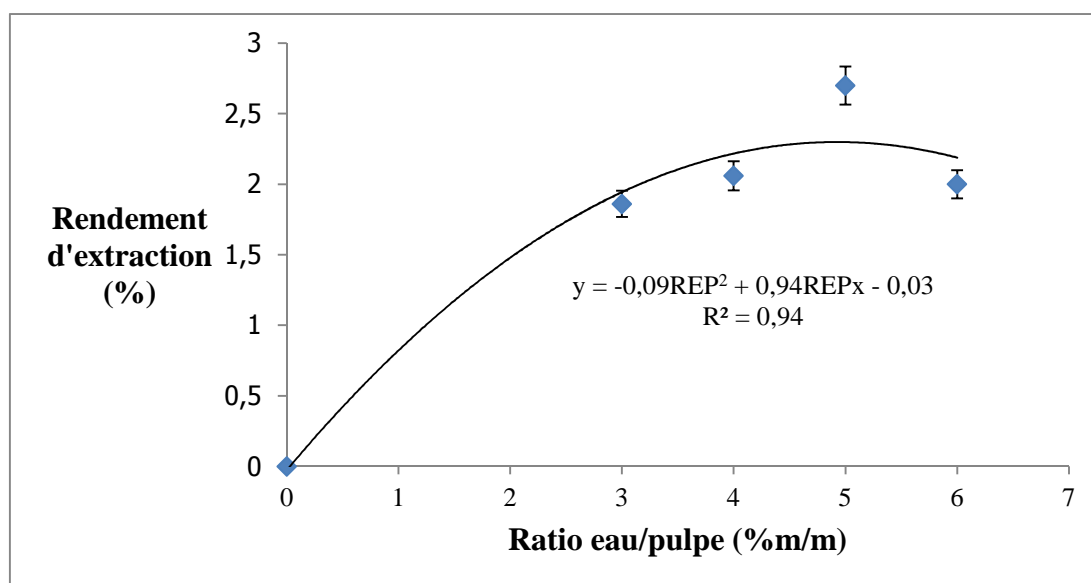


Figure 16 : Effet du ratio eau/pulpe sur le rendement d'extraction de l'huile d'avocat.

I-2-2 Effet du temps

En étudiant la cinétique d'extraction de l'huile d'avocat (figure 17), on observe que le rendement d'extraction croît de 0 à 120 min pour atteindre une valeur de 4,2% puis devient approximativement constant entre 120 min et 180 min. Ceci montre que le flux de sortie de

l'huile d'avocat s'effectue selon un mode diffusif qui dépend du gradient de concentration entre la phase aqueuse et la phase solide. Ainsi on peut conclure que la progression de l'extraction se fait globalement de manière lente.

Afin de délimiter le domaine d'étude pour ce travail, il est important de travailler au temps où l'extraction d'huile est maximale c'est-à-dire à l'équilibre. Pour ce faire, l'équation polynomiale dérivée à la figure 16 a permis de définir cette période. On observe que la vitesse initiale d'extraction est $0,56 \cdot 10^{-1}$ g/100g d'avocat/min, puis elle descend à $1,52 \cdot 10^{-2}$ g/100g/min dans les deux premières heures (120 min). Ensuite cette vitesse décroît ($0,5 \cdot 10^{-2}$ g/100g d'avocat/min) les 30 prochaines minutes (à 150 min), pour enfin devenir nulle après 164,7 min. Ce ralentissement de l'extraction de l'huile d'avocat correspond à une décélération de $0,00017 \cdot 2$, soit $34 \cdot 10^{-5}$ g/100 g d'avocat/min². Par conséquent, le rendement d'extraction d'huile maximale prédit à l'équilibre serait de 4,65% à 164,7 min. D'autre part, on note également que 91,87% de cette huile est extraite après 120 min. L'extraction solide-liquide serait mieux décrite par un modèle du second degré (Rakotondramasy *et al.*, 2007). Cette affirmation pourrait davantage s'expliquer par la théorie de l'extraction qui stipule que le processus d'extraction s'effectue en deux phases. La première phase étant très rapide due à la force d'entraînement du solvant dépourvu de corps étrangers. Ensuite la seconde étape, beaucoup plus lente, dont la diffusion de l'huile restante est influencée par l'huile déjà transportée. Ainsi, la constante de vitesse est rapide au début et s'amenuise progressivement par la suite (Akinoso et Onsurinade, 2012). C'est pour ces raisons que la gamme d'étude s'est située entre 120 et 180 min pour la modélisation.

Cette cinétique a été observée par Embong et Jelen (1977) qui ont montré que le rendement d'extraction aqueuse de l'huile de colza augmente avec le temps, mais une ébullition assez longue occasionnait la stabilisation de l'émulsion huile dans l'eau. Cette stabilisation serait due aux modifications chimiques qui se produiraient dans l'huile telles

que : l'hydrolyse, l'hydratation, la déprotonation et la cyclisation (Morin et Richard, 1985). Aussi, un temps assez long pourrait entraîner la dégradation oxydative de l'huile (Jiang *et al.*, 2010).

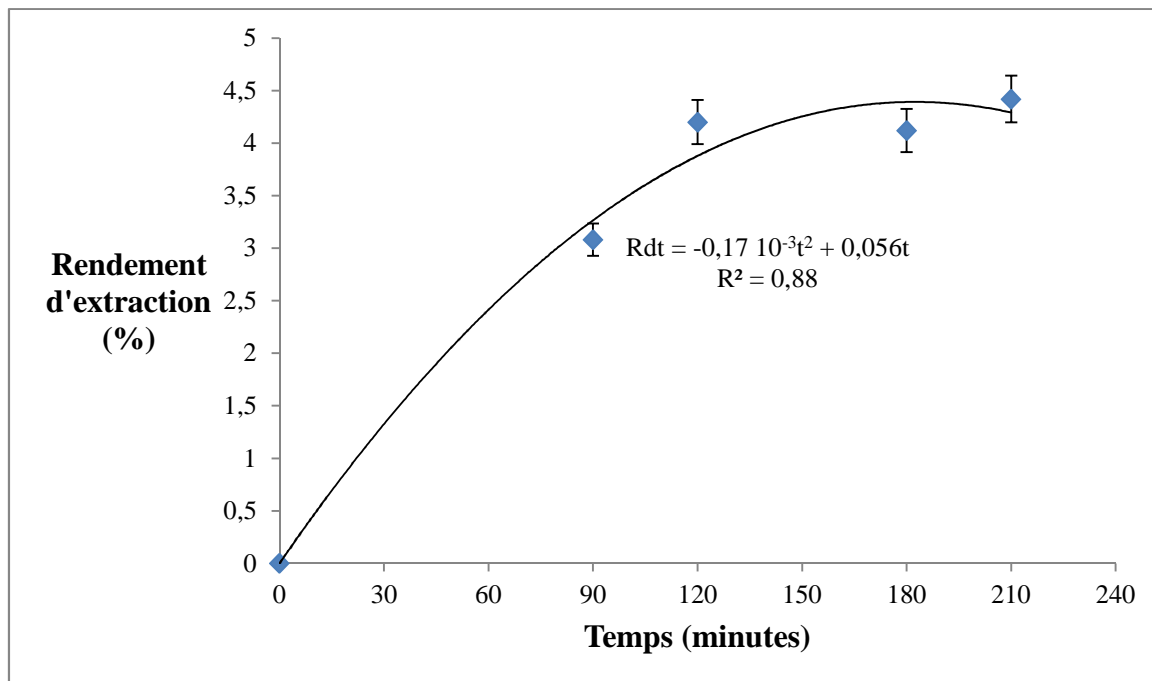


Figure 17 : Effet du temps sur le rendement d'extraction de l'huile d'avocat.

I-2-3 Effet de la température

On observe que le rendement d'extraction croît entre 40 et 45°C pour atteindre une valeur maximale de 4,2%, puis décroît jusqu'à 1,6% (figure 18). Cette évolution avait déjà été observée par Rosenthal *et al.* (1998) lors de l'extraction aqueuse de l'huile de soja. Cette dualité d'effet de la température avait également été observée par Sayyar *et al.* (2009) lors de l'extraction de l'huile de jatropha à l'éther de pétrole et à l'hexane. La température est effectivement connue pour accroître le rendement d'extraction parce que la diffusivité moléculaire est proportionnelle à la température selon l'équation de Stokes-Einstein (Wilke et Chang, 1955). Cet effet positif avait déjà été observé par Ferreira-Dias *et al.* (2003) qui ont montré que la température améliorait le rendement d'extraction hexanique de l'huile des fruits de *Quercus suber* L.

Dans cette étude, pour une température élevée (>55°C) et une composition de l'huile précise, deux phénomènes se produiraient simultanément : La dénaturation des protéines et l'oxydation de l'huile. L'hypothèse de la dénaturation des protéines serait en accord avec les travaux de Jiang *et al.* (2010) qui ont montré qu'à des températures proches de 70°C, les protéines formeraient des agrégats insolubles par dénaturation thermique. Ces agrégations réduiraient considérablement la solubilité des protéines à travers l'accroissement de l'hydrophobicité des protéines qui réduiraient l'extractibilité de l'huile. L'auto-oxydation de l'huile se produirait simultanément avec la polymérisation des monomères, ce qui augmenterait la viscosité de l'huile qui est inversement proportionnelle à la diffusion selon la loi de Stokes (Wilke et Chang, 1955) et affecte ainsi négativement l'extraction de l'huile.

La gamme de température de haut rendement est comprise entre 45 et 55°C. C'est cette dernière qui a été prise en compte dans la modélisation.

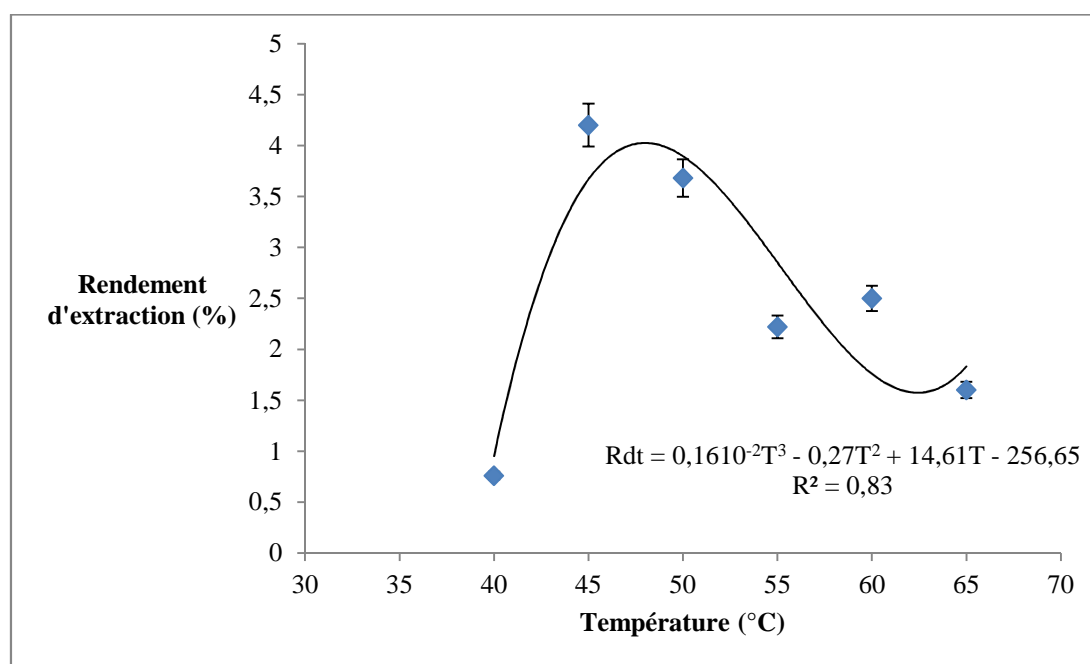


Figure 18 : Effet de la température sur le rendement d'extraction de l'huile d'avocat.

I-2-4 Effet du pH

Les observations montrent que le rendement d'extraction croît du pH 4 à 4,5 pour atteindre une valeur de 4,62% puis le rendement varie très peu pour des pH compris entre 4,5 et 5,5 (figure 19) et enfin décroît pour atteindre une valeur de 0,28% au pH 6,5. Rosenthal *et al.* (1996) ; (1998) ont montré que chez certaines oléagineuses, l'extraction optimale en milieu aqueux de l'huile était étroitement liée à l'extractibilité des protéines. Par conséquent, le plus faible rendement d'extraction de l'huile a été observé pour une faible solubilité des protéines c'est-à-dire à leur point isoélectrique. Ainsi, la zone 4,5 à 5,5 serait un domaine très éloigné du point isoélectrique global des protéines. Par ailleurs, Lusas *et al.* (1982) ont constaté que les protéines avaient tendance à former des concentrats dans la phase solide lorsque le pH du milieu était acide et des isolats dans la phase aqueuse pour des pH basiques. D'après la figure 20, la phase solide du culot serait plus dense que la phase aqueuse, ce qui suggérerait qu'à la zone de pH 4,5 – 5,5, les protéines se seraient concentrées dans la phase solide.

Au-delà du pH 5,5, le rendement d'extraction tend à régresser de manière importante. Cet effet du pH pourrait être imputé à la stabilisation progressive de l'émulsion huile/eau par les protéines du compartiment aqueux comme décrit par Embong et Jelen (1977). Cette stabilisation serait l'œuvre des protéines qui à leur point ou zone isoélectrique ont tendance à réduire la tension interfaciale entre l'huile et l'eau comme démontré par Rosenthal *et al.* (1996). Cette action émulsifiante des protéines atteindrait son optimum à pH de 6,55 selon l'équation décrivant le comportement du modèle dans le domaine étudié. Ce pH correspondrait au point isoélectrique global des protéines de l'avocat.

Pour la suite, Les pH 4,5 et 5,5 serviront de domaine d'étude dans la modélisation.

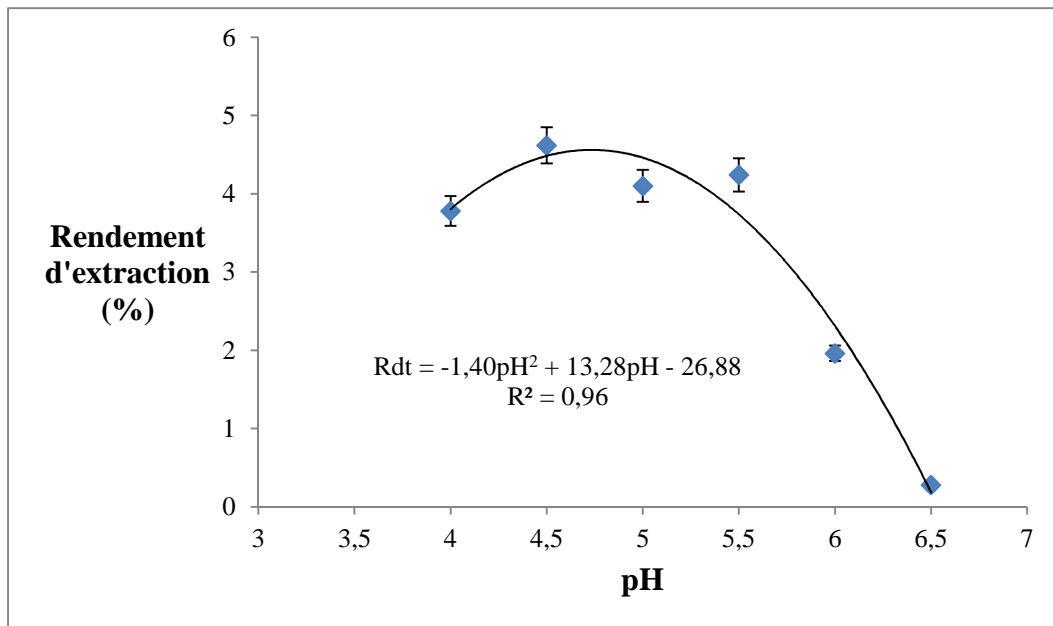


Figure 19 : Effet du pH sur le rendement d'extraction de l'huile d'avocat.

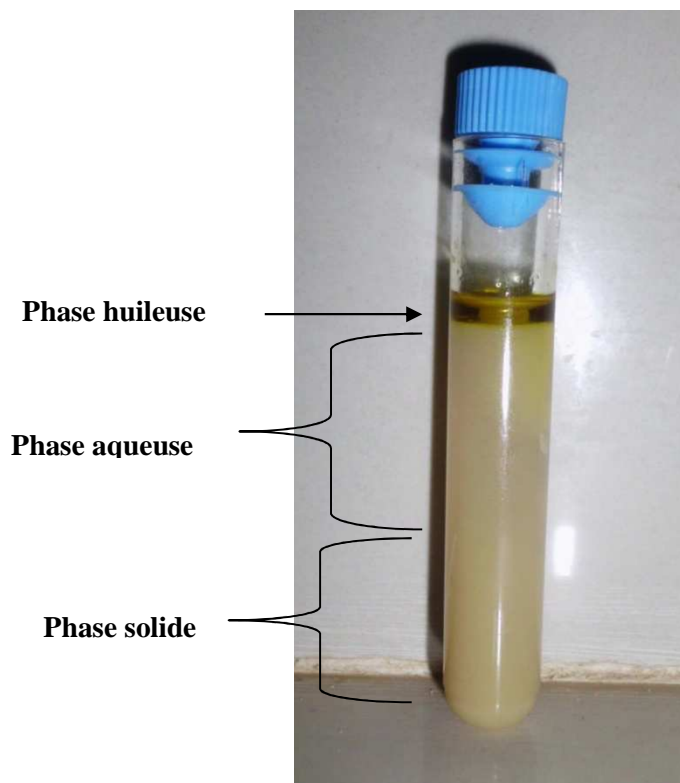


Figure 20 : Recouvrement de l'huile d'avocat après séparation de la phase solide et aqueuse par centrifugation

I-3 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile d'avocat des 5 cultivars

Après interprétation des plans unifactoriels, les domaines d'étude des variables indépendantes obtenues ont été codées pour être utilisées dans la modélisation et l'optimisation des efficacités d'extraction des différents cultivars telles que consignées dans le tableau VIII. La validité d'un modèle linéaire dépend de la validité des hypothèses formulées sur les résidus (normalité, homoscedasticité et intercorrélacion) et les variables indépendantes (analyse de variance, R^2 , R^2 ajusté et Cp Mallows) de l'efficacité d'extraction des cultivars.

Tableau VIII : Codage des variables indépendantes pour les plans factoriels centrés des différents cultivars d'avocat

Variables indépendantes codées	Variables indépendantes réelles			
	Température (°C)	Temps (min)	pH	Ratio eau/pulpe (m/m)
-1	45	120	4,5	4 :1
0	50	150	5,0	5 :1
+1	55	180	5,5	6 :1

I-3-1 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar *Hickson*

L'homoscedasticité des résidus sert à démontrer que la variance des résidus est constante. Le nuage de points de la figure 21 se répartit de manière presque uniforme autour de la droite. Ceci signifie que la variance des résidus est constante. Par ailleurs, le diagramme quantile – quantile est un outil graphique permettant d'évaluer la pertinence de l'ajustement d'une distribution donnée à un modèle théorique. Dans cette étude, il permet de montrer que la distribution est normale. Le nuage de points du diagramme quantile - quantile s'ajuste bien autour de la droite (figure 22). Ceci signifie que les résidus suivent une distribution normale. Le test de Durbin-Watson permet de se rassurer que les résidus sont non corrélés. Pour le cultivar *Hickson*, le test de Durbin-Watson s'avère non significatif (2,38 ; $p = 0,15$), donc les

résidus ne sont pas corrélés. En somme, les hypothèses formulées sur les résidus pour un modèle linéaire sont respectées.

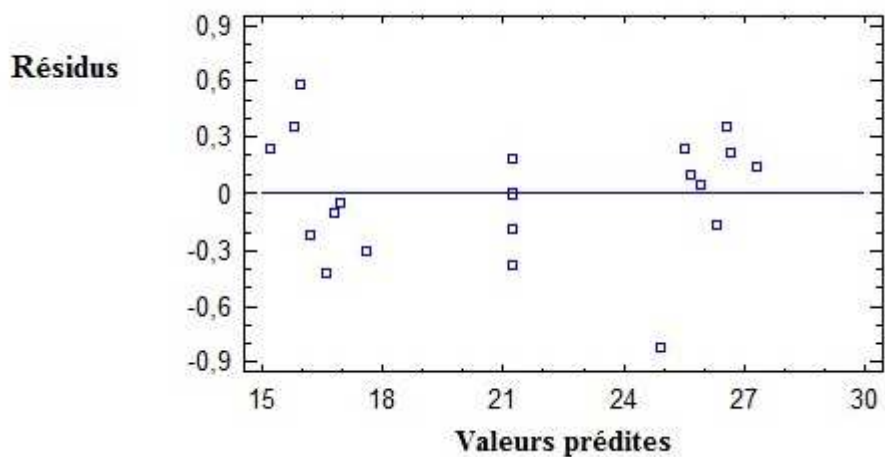


Figure 21 : Homoscédasticité des résidus pour l’efficacité d’extraction du cultivar *Hickson*

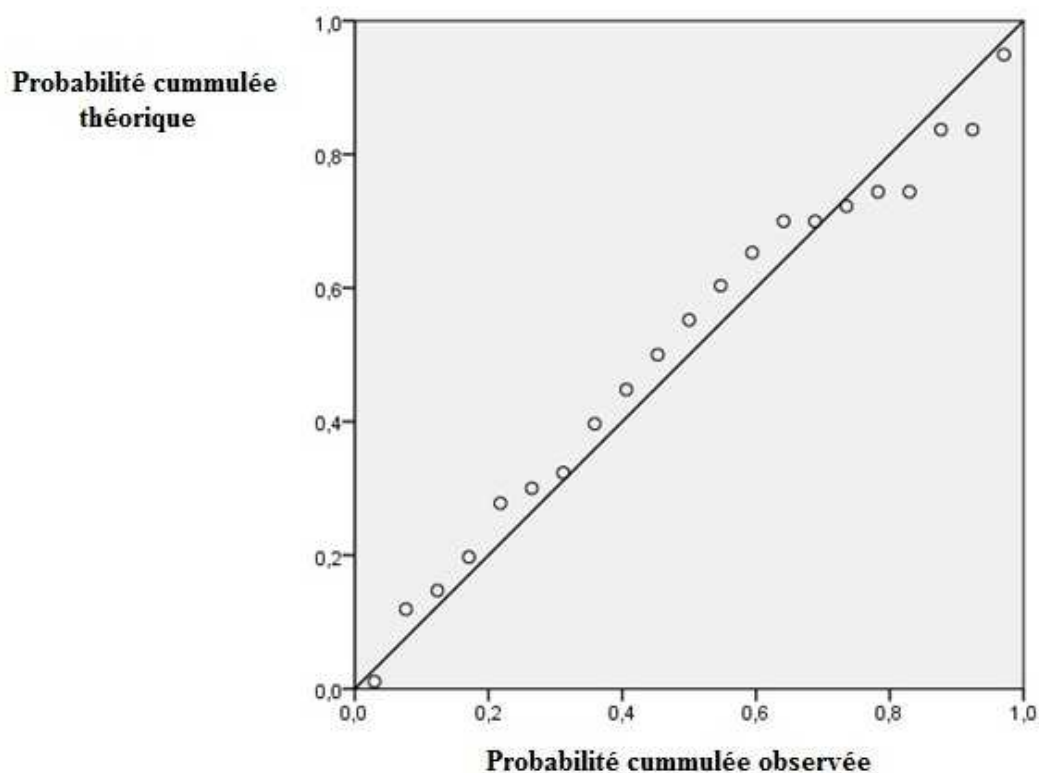


Figure 22 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l’efficacité d’extraction du cultivar *Hickson*.

Une analyse de la variance a permis de vérifier s'il existe une relation linéaire entre l'efficacité d'extraction et les facteurs étudiés (température, temps, pH et ratio eau/pulpe). On observe que la probabilité est inférieure à 0,05 (tableau IX), ce qui implique qu'il existe une relation linéaire statistiquement significative entre l'efficacité d'extraction et les facteurs utilisés.

Tableau IX : Analyse de variances de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar *Hickson* en fonction des facteurs.

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Modèle	384,76	4	96,19	747,79	0,00*
Résidu	2,06	16	0,13		
Total	386,82	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté et F : ratio de Fisher

La linéarité du modèle étant vérifiée, un examen de la significativité des facteurs pour construire un modèle de prédiction a été effectué. Une analyse de variance permet de tester l'effet des facteurs estimés. Le tableau X montre que la température, le pH, le temps et le ratio eau/pulpe ont tous une probabilité inférieure à 0,05 ; ils sont donc tous significatifs. Par contre, les interactions et les paramètres quadratiques sont non significatifs ($p \geq 0,05$). L'erreur pure calculée permet d'estimer l'erreur expérimentale et réaliser le test de manque d'ajustement dont le rôle est de vérifier l'adéquation du modèle par rapport aux données observées (Montgomery, 2001). Dans ce cas, celui-ci est non significatif indiquant que le modèle du premier degré utilisé décrit bien les variations de l'efficacité d'extraction en fonction des variables indépendantes traitées.

Tableau X : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar *Hickson*.

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Température (A)	376,66	1	376,66	6270,92	0,00*
Temps (B)	1,61	1	1,61	26,80	0,01*
pH (C)	2,40	1	2,40	40,04	0,00*
Ratio (D)	4,08	1	4,08	67,95	0,00*
AA + BB + CC + DD	0,01	1	0,01	0,15	0,71
Température x Temps	0,27	1	0,27	4,45	0,10
Température x pH	0,05	1	0,05	0,92	0,39
Température x Ratio	0,50	1	0,50	8,27	0,05
Temps x pH	0,64	1	0,64	10,62	0,31
Temps x Ratio	0,00	1	0,00	0,04	0,86
pH x Ratio	0,00	1	0,00	0,04	0,86
Test de manque d'ajustement	0,35	5	0,07	1,15	0,46
Erreur pure	0,24	4	0,06		
Totale	386,82	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté ; F : ratio Fisher

Avec un modèle du premier degré, une régression linéaire multiple de l'extraction de l'huile donne le modèle empirique suivant (exprimé en fonction des valeurs codées des facteurs):

$$\text{Efficacité d'extraction} = 21,24 - 4,85 \times \text{Température} - 0,32 \times \text{Temps} - 0,39 \times \text{pH} + 0,50 \times \text{Ratio} \\ (\text{eau/pulpe}).$$

Le coefficient de détermination (R^2) indique que le modèle explique à 99,46% les variations de l'efficacité d'extraction, et le coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté), qui

est plus sensible à l'ajout de facteurs non significatifs, est de 99,33%. Ces coefficients de détermination renvoient également à la plus petite valeur du test de Mallows ($C_p = 5,0$) qui a permis de retenir la température, pH, temps et le ratio (eau/pulpe) dans ce modèle (tableau A3, Annexe I). L'absence d'effet de courbure dans les courbes de surfaces réponses conforte l'idée de l'adéquation du modèle du premier degré (figure 23).

L'équation du modèle permet de mettre en relief les facteurs les plus importants. Ainsi, en moyenne, l'efficacité d'extraction diminue de 9,7% (soit $2 \times 4,85$) quand on passe de 45°C à 55°C ; de 0,76% (soit $2 \times 0,38$) quand on passe d'un pH de 4,5 à 5,5 et de 0,63% (soit $2 \times 0,317$) quand on passe d'un temps d'extraction de 120 min à 180 min. Par contre, l'efficacité d'extraction augmente de 1% (soit $2 \times 0,5$) quand on passe d'un ratio eau/pulpe de 4 :1 (m/m) à 6 :1 (m/m). En somme, on note que la température est le facteur le plus influant suivi du ratio eau/pulpe, du pH et enfin du temps. Dans une stratégie d'optimisation (maximisation) de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar *Hickson*, un choix judicieux serait donc un niveau bas de la température, du temps, du pH et un niveau élevé du ratio eau/pulpe. Sur la base de l'équation, les conditions optimales peuvent alors être déterminées. La valeur optimale de l'efficacité d'extraction est de 27,30%. Celle des facteurs est consignée dans le tableau XI.

Tableau XI : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar *Hickson*.

Facteurs	Valeurs inférieures	Valeurs supérieures	Valeurs optimales codées	Valeurs optimales non codées
Température	-1	1	-1	45°C
Temps	-1	1	-1	120 min
pH	-1	1	-1	4,5
Ratio	-1	1	1	4 :1 (m/m)

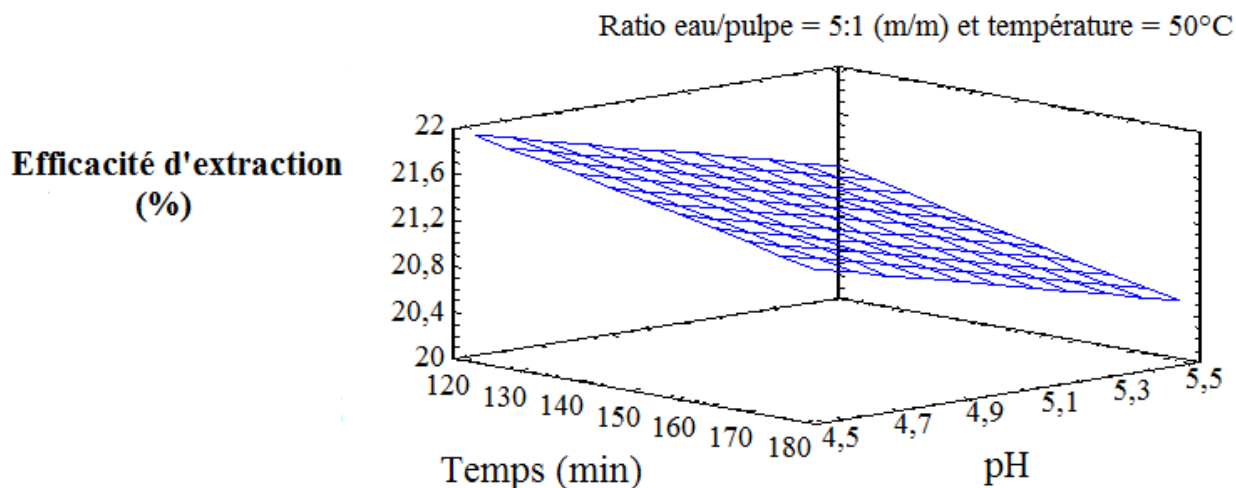


Figure 23 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar *Hickson* en fonction du pH et du temps (le Ratio eau/pulpe et la température ont été fixés).

I-3-2 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar *Lula*

La figure 24 montre un nuage de points qui se répartit presque uniformément autour de la droite. Ceci signifie que la variance des résidus est quasi constante. Par ailleurs, le nuage de points du diagramme quantile - quantile s'ajuste bien autour de la droite (figure 25). Ceci signifie que les résidus suivent une distribution presque normale. Pour le cultivar *Lula*, les résidus ne sont pas corrélés en raison de la non significativité du test de Durbin-Watson (3,13 ; $p = 0,14$). En somme, les hypothèses formulées sur les résidus pour un modèle linéaire sont respectées.

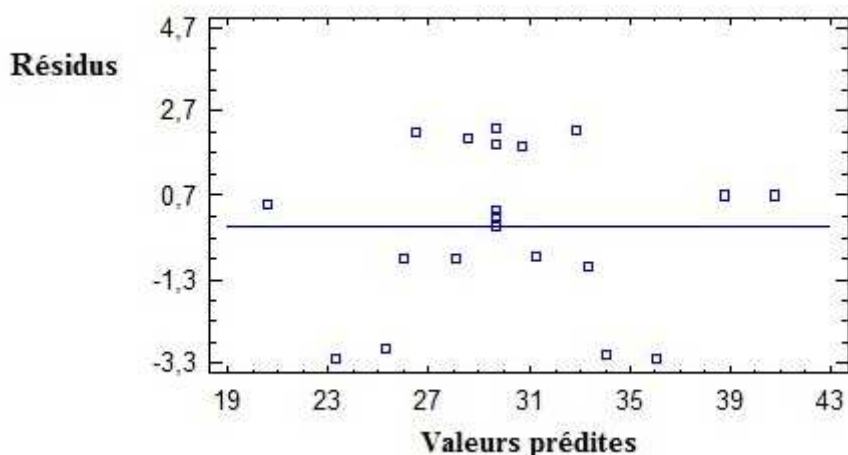


Figure 24 : Homoscédasticité des résidus pour l'efficacité d'extraction du cultivar *Lula*

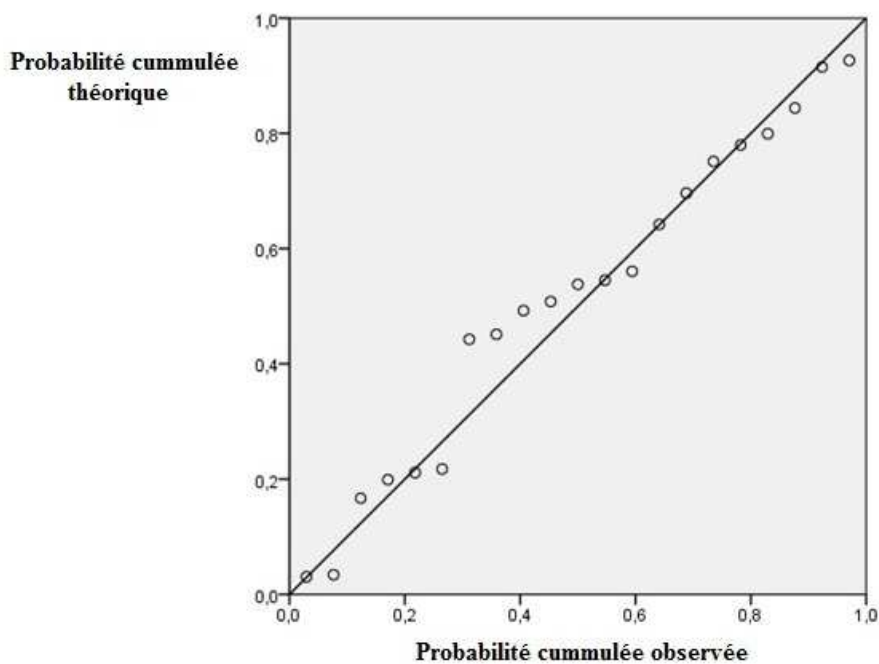


Figure 25 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l'efficacité d'extraction du cultivar *Lula*.

Une analyse de la variance a permis de vérifier l'existence d'une relation linéaire entre l'efficacité d'extraction et les facteurs étudiés (température, temps, pH et ratio eau/pulpe). Une relation linéaire statistiquement significative existe entre l'efficacité d'extraction et les facteurs utilisés avec une probabilité est inférieure à 0,05 (tableau XII).

Tableau XII : Analyse de variances de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar *Lula* en fonction des facteurs.

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Modèle	582,82	4	145,71	33,65	0,00*
Résidu	69,29	16	4,33		
Total	652,11	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté et F : le ratio de Fisher

La linéarité du modèle étant vérifiée, il a été question d'examiner la significativité des facteurs pour construire un modèle de prédiction. Le tableau XIII montre que la température, le temps, le pH et le ratio eau/pulpe ont tous une probabilité inférieure à 0,05 ; ils sont donc tous significatifs. Par contre, les interactions et les paramètres quadratiques sont non significatifs ($p \geq 0,05$). Le test de manque d'ajustement s'est avéré non significatif indiquant que le modèle du premier degré utilisé décrit bien les variations de l'efficacité d'extraction en fonction des facteurs étudiés.

Tableau XIII : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar *Lula*.

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Température (A)	222,49	1	222,49	196,16	0,00*
Temps (B)	16,74	1	16,74	14,76	0,02*
pH (C)	254,31	1	254,31	224,22	0,00*
Ratio (D)	89,28	1	89,28	78,71	0,00*
AA + BB + CC + DD	5,75	1	5,75	5,07	0,09
Température x Temps	0,03	1	0,03	0,02	0,89
Température x pH	13,73	1	13,73	12,10	0,20
Température x Ratio	44,47	1	44,47	39,21	0,30
Temps x pH	0,05	1	0,05	0,04	0,84
Temps x Ratio	0,05	1	0,05	0,04	0,84
pH x Ratio	0,76	1	0,76	0,67	0,46
Test de manque d'ajustement	0,09	5	0,02	0,02	0,99
Erreur pure	4,54	4	1,13		
Totale	652,11	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté ; F : ratio de Fisher

Avec un modèle du premier degré, une régression linéaire multiple de l'extraction de l'huile donne le modèle empirique suivant (exprimé en fonction des valeurs codées des facteurs):

Efficacité d'extraction = 29,68 + 3,73*Température + 1,02*Temps - 3,99*pH + 2,36*Ratio.

Le modèle explique 89,89% des variations de l'efficacité d'extraction de par le coefficient de détermination (R^2). Le coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté), qui est plus approprié, est de 87%. Ces coefficients de détermination renvoient également à la plus

petite valeur du test de Mallows ($C_p = 5,0$) qui a permis de retenir la température, temps, pH et le ratio (eau/pulpe) dans ce modèle (tableau A4, Annexe I). L'absence d'effet de courbure sur la courbe de surfaces réponses (figure 26) conforte l'hypothèse de l'adéquation du modèle du premier degré.

L'équation du modèle permet de mettre en relief les facteurs les plus importants. Ainsi, en moyenne, l'efficacité d'extraction augmente de 7,46% (soit $2 \times 3,73$) quand on passe de 45°C à 55°C, de 4,72% (soit $2 \times 2,46$) quand on passe d'un ratio eau/pulpe de 4 :1 (m/m) à 6 :1 (m/m) et de 2,04% (soit $2 \times 1,02$) quand on passe d'un temps d'extraction de 120 min à 180 min. Par contre, l'efficacité d'extraction diminue de 7,96% (soit $2 \times 3,98$) quand on passe d'un pH de 4,5 à 5,5. En somme, on note que le pH est le facteur le plus influant suivi de la température, du ratio eau/pulpe et du temps. Dans une stratégie d'optimisation (maximisation) de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar *Lula*, un choix judicieux serait donc un niveau bas du pH et un niveau haut du ratio eau/pulpe, du temps et de la température. Sur la base de l'équation de prédiction, les conditions optimales peuvent alors être déterminées. La valeur optimale de l'efficacité d'extraction est de 40,78%. Celle des facteurs est consignée dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar *Lula*.

Facteurs	Valeurs inférieures	Valeurs supérieures	Valeurs optimales codées	Valeurs optimales non codées
Température	-1	1	1	55°C
Temps	-1	1	1	180 min
pH	-1	1	-1	4,5
Ratio	-1	1	1	4 :1 (m/m)

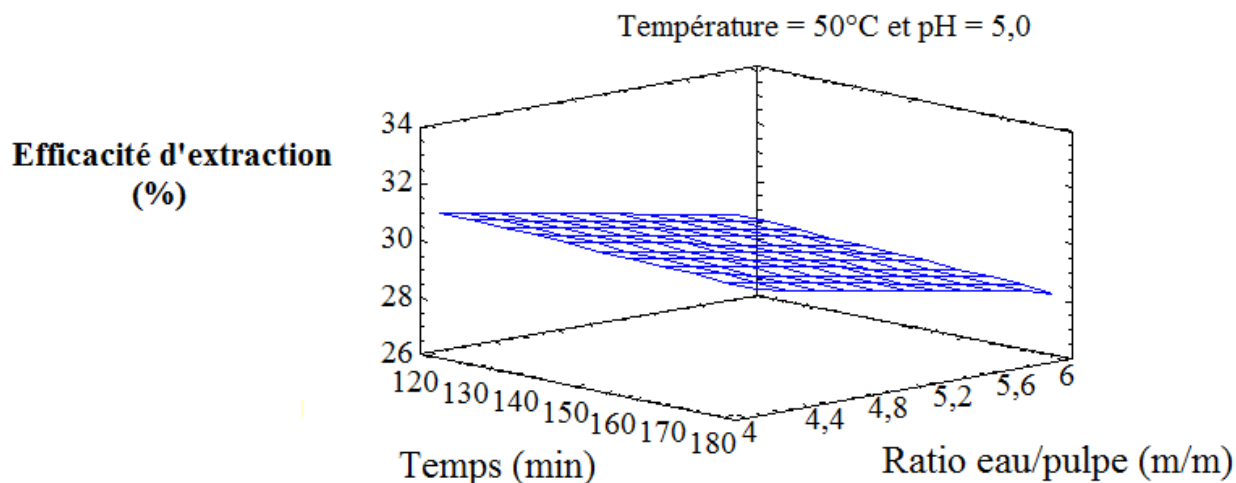


Figure 26 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar *Lula* en fonction du ratio eau/pulpe et du temps (le pH et la température ont été fixés).

I-3-3 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar *Collinson*

Le nuage de points de la figure 27 se répartit de manière presque uniforme autour de la droite et celui du diagramme quantile - quantile s'ajuste bien autour de la droite (figure 28). Ceci signifie que la variance des résidus est constante et la distribution normale. Pour le cultivar *Collinson*, le test de Durbin-Watson s'avère non significatif (2,29 ; $p = 0,33$), on en conclut que les résidus ne sont pas corrélés. En somme, les hypothèses formulées sur les résidus pour un modèle linéaire sont respectées.

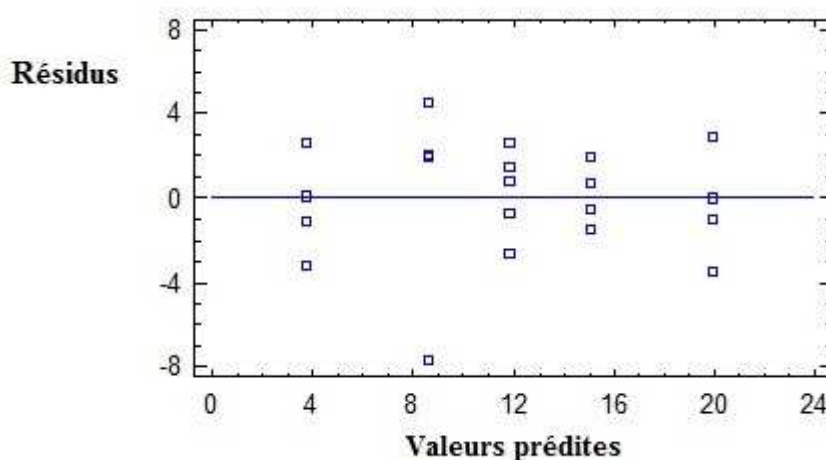


Figure 27 : Homoscédasticité des résidus pour l'efficacité d'extraction du cultivar *Collinson*

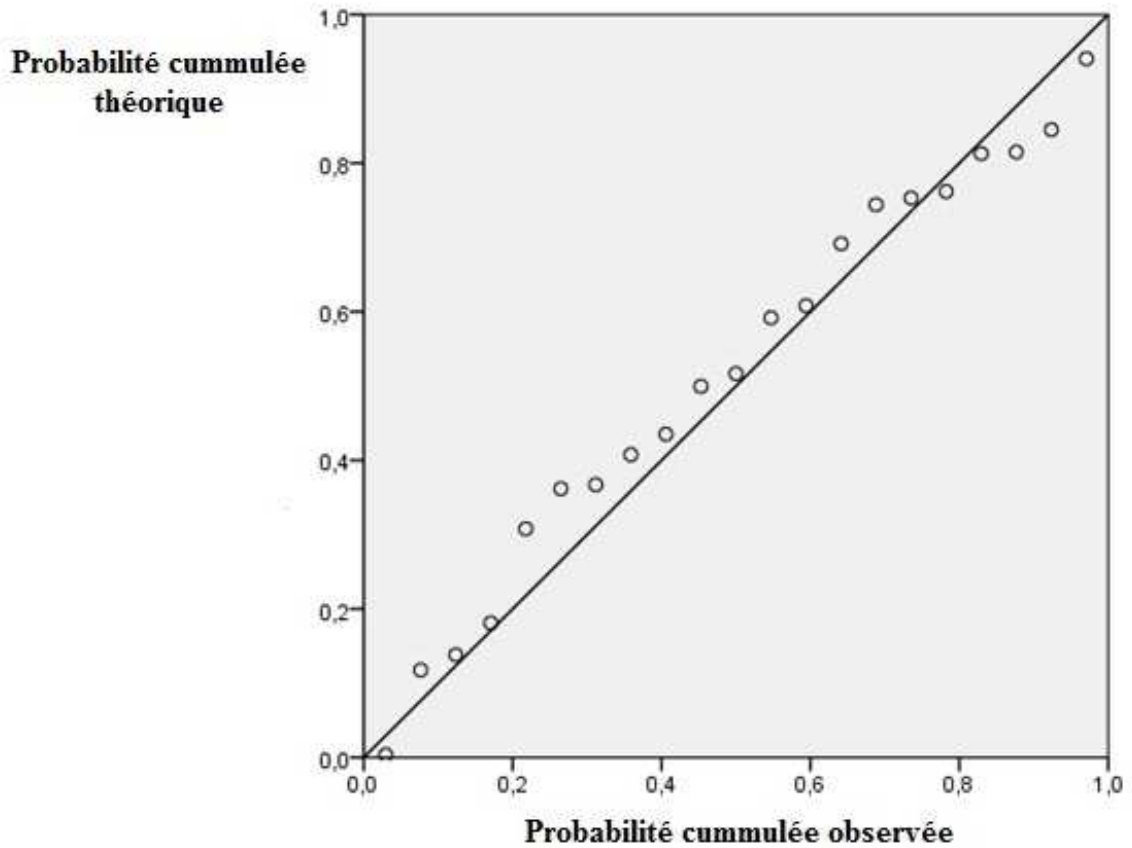


Figure 28 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l’efficacité d’extraction du cultivar *collinson*

Une relation linéaire existe entre l’efficacité d’extraction et les facteurs étudiés (température, temps, pH et ratio eau/pulpe) avec une probabilité est inférieure à 0,05 (tableau XV). Le tableau XVI montre que la température et le temps ont une probabilité inférieure à 0,05 ; ils sont donc significatifs. Le pH, le ratio eau/pulpe, les interactions et les paramètres quadratiques sont non significatifs ($p > 0,05$). le test de manque d’ajustement est non significatif indiquant que le modèle du premier degré utilisé décrit bien les variations de l’efficacité d’extraction en fonction des facteurs traités.

Tableau XV : Analyse de variances de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar *Collinson* en fonction des facteurs.

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Modèle	619,61	4	154,90	18,42	0,00*
Résidu	134,57	16	8,41		
Total	754,19	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté et F : le ratio de Fisher

Tableau XVI : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar *Collinson*.

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Température (A)	510,18	1	510,18	126,32	0,00*
Temps (B)	95,51	1	95,51	23,65	0,01*
pH (C)	7,38	1	7,38	1,83	0,25
Ratio (D)	6,54	1	6,54	1,62	0,27
AA + BB + CC + DD	0,59	1	0,59	0,15	0,72
Température x Temps	1,20	1	1,20	0,30	0,61
Température x pH	30,86	1	30,86	7,64	0,05
Température x Ratio	11,88	1	11,88	2,94	0,16
Temps x pH	0,37	1	0,37	0,09	0,78
Temps x Ratio	14,84	1	14,84	3,67	0,13
pH x Ratio	17,44	1	17,44	4,32	0,11
Test de manque d'ajustement	41,24	5	8,25	2,04	0,25
Erreur pure	16,15	4	4,04		
Totale	754,19	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté ; F : ratio Fisher

Une régression linéaire multiple a été employée pour décrire l'extraction de l'huile selon le modèle empirique qui suit (exprimé en fonction des valeurs codées des facteurs):

$$\text{Efficacité d'extraction} = 11,86 + 5,65 * \text{Température} + 2,44 * \text{Temps}.$$

Le modèle explique 80,31% (R^2) des variations de l'efficacité d'extraction et le coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté), de 78,12%, conforte cette idée. Ces

coefficients de détermination renvoient également à la plus petite valeur du test de Mallows ($C_p = 2,65$) qui a permis de retenir la température et le temps dans ce modèle (tableau A5, Annexe I). L'hypothèse de l'adéquation du modèle du premier degré est confortée par l'absence d'effet de courbure sur la courbe de surfaces réponses (figure 29) conforte.

L'équation du modèle ainsi dérivée permet de classifier les facteurs en fonction de leur importance sur l'efficacité d'extraction. Ainsi, en moyenne, l'efficacité d'extraction augmente de 11,3% (soit $2 \times 5,65$) quand on passe de 45°C à 55°C et de 4,88% (soit $2 \times 2,44$) quand on passe d'un temps d'extraction de 120 min à 180 min. En somme, on note que la température est le facteur le plus influant suivi du temps. Ainsi, un choix raisonnable serait donc un niveau haut du temps et de la température dans une stratégie d'optimisation (maximisation) de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar *Collinson*. Sur la base de l'équation du modèle, les conditions optimales peuvent alors être calculées. La valeur optimale de l'efficacité d'extraction est 19,95%. Celle des facteurs est représentée dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar *Collinson*.

Facteurs	Valeurs inférieures	Valeurs supérieures	Valeurs optimales codées	Valeurs optimales non codées
Température	-1	1	1	55°C
Temps	-1	1	1	180 min
pH	-1	1	-1	4,5
Ratio	-1	1	-1	6 :1 (m/m)

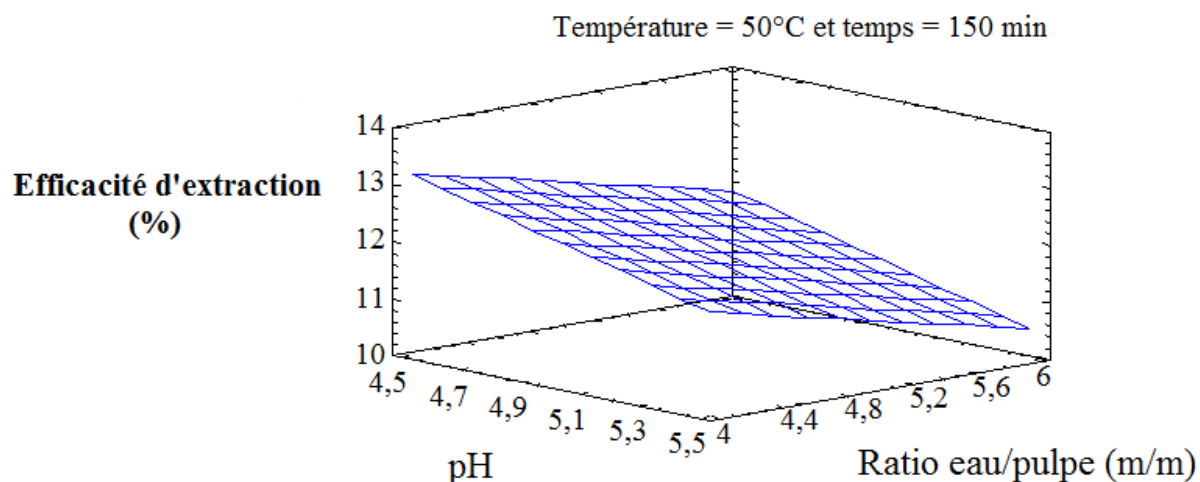


Figure 29 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar *Collinson* en fonction du pH et du Ratio (eau/pulpe) (la température et temps ont été fixés).

I-3-4 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar *Booth 7*

Le nuage de points de la figure 30 se répartit de manière presque uniforme autour de la droite. Ceci suggère que la variance des résidus est constante. Par ailleurs, le diagramme quantile – quantile présente un nuage de points qui s'ajuste bien autour de la droite (figure 31). Ceci signifie que les résidus suivent une distribution normale. Pour le cultivar *Booth 7*, le test de Durbin-Watson s'avère non significatif (1,86 ; $p = 0,47$), donc les résidus ne sont pas corrélés. En somme, les hypothèses formulées sur les résidus pour un modèle linéaire sont respectées.

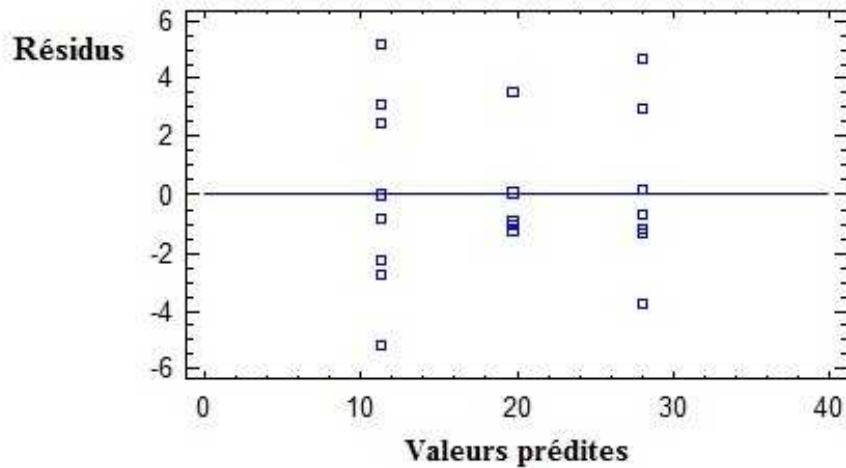


Figure 30 : Homoscédasticité des résidus pour l'efficacité d'extraction du cultivar *Booth 7*

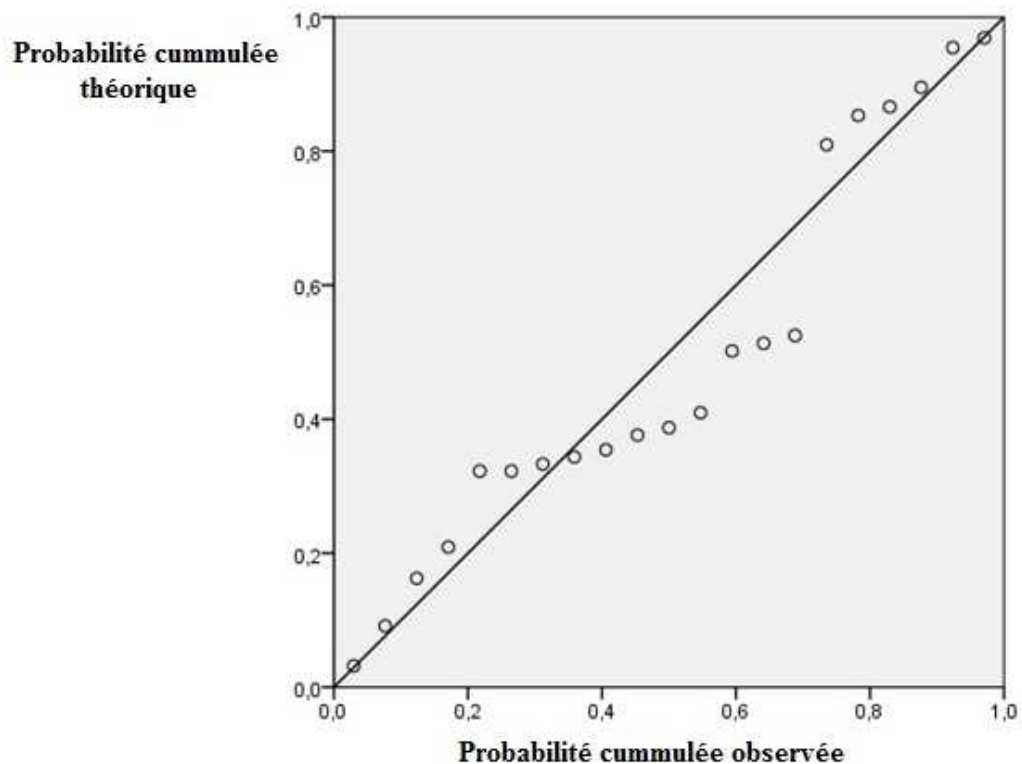


Figure 31 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l'efficacité d'extraction du cultivar *Booth 7*

Une analyse de la variance a permis de s'assurer de l'existence d'une relation linéaire entre l'efficacité d'extraction et les facteurs étudiés (température, temps, pH et ratio eau/pulpe). On observe une probabilité inférieure à 0,05 (tableau XVIII), ce qui implique qu'il existe une relation linéaire statistiquement significative entre l'efficacité d'extraction et les facteurs utilisés.

Tableau XVIII : Analyse de variances de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar *Booth 7* en fonction des facteurs.

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Modèle	1128,40	4	282,10	33,68	0,00*
Résiduelle	134,02	16	8,38		
Total	1262,43	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté et F : le ratio de Fisher

Une estimation de la significativité des facteurs (tableau XIX) montre que la température a une probabilité inférieure à 0,05 ; elle est donc significative. Par contre, le pH, temps, le ratio eau/pulpe, les interactions et les paramètres quadratiques sont non significatifs ($p > 0,05$). Le test de manque d'ajustement est également non significatif indiquant que le modèle du premier degré utilisé décrit bien les variations de l'efficacité d'extraction en fonction des facteurs considérés.

Tableau XIX : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar *Booth 7*

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Température (A)	1114,72	1	1114,72	287,70	0,00*
Temps (B)	2,63	1	2,63	0,68	0,46
pH (C)	0,03	1	0,03	0,01	0,94
Ratio (D)	11,03	1	11,03	2,85	0,17
AA + BB + CC + DD	0,06	1	0,06	0,01	0,91
Température x Temps	2,63	1	2,63	0,68	0,46
Température x pH	32,18	1	32,18	8,31	0,40
Température x Ratio	12,14	1	12,14	3,13	0,15
Temps x pH	2,13	1	2,13	0,55	0,50
Temps x Ratio	8,99	1	8,99	2,32	0,20
pH x Ratio	13,30	1	13,30	3,43	0,14
Test de manque d'ajustement	47,10	5	9,42	2,43	0,20
Erreur pure	15,50	4	3,87		
Totale	1262,43	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté ; F : ratio Fisher

Avec un modèle du premier degré, une régression linéaire multiple donne un modèle empirique suivant (exprimé en fonction des valeurs codées des facteurs):

$$\text{Efficacité d'extraction} = 19,68 - 8,35 * \text{Température}$$

Le coefficient de détermination (R^2) indique que le modèle explique 88,30% des variations de l'efficacité d'extraction et le coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté), 87,68%. Ces coefficients de détermination renvoient également à la plus petite valeur du test

de Mallows ($C_p = 0,63$) qui a permis de retenir la température dans ce modèle (tableau A7, Annexe I). L'absence d'effet de courbure sur la courbe de surfaces réponses (figure 32) conforte l'hypothèse de l'adéquation du modèle du premier degré.

L'équation du modèle ainsi développé permet de mettre en relief l'effet de la température sur l'efficacité d'extraction. Ainsi, en moyenne, l'efficacité d'extraction diminue de 16,68% (soit $2 \times 8,34$) quand on passe de 45°C à 55°C. Ainsi, dans une stratégie d'optimisation (maximisation) de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar *Booth 7*, un choix éclairé serait donc un niveau bas de la température. Sur la base de l'équation du modèle, les conditions optimales peuvent alors être calculées. La valeur optimale de l'efficacité d'extraction est 28,58%. Celle des facteurs est consignée dans le tableau XX.

Tableau XX : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar *Booth 7*

Facteurs	Valeurs inférieures	Valeurs supérieures	Valeurs optimales codées	Valeurs optimales non codées
Température	-1	1	-1	45°C
Temps	-1	1	-1	120 min
pH	-1	1	1	5,5
Ratio	-1	1	-1	6 : 1

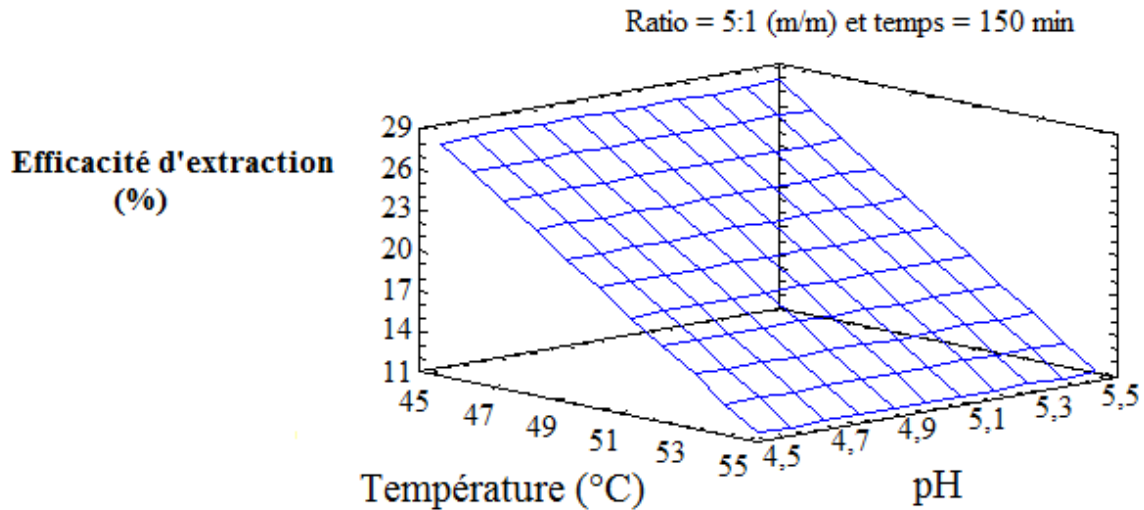


Figure 32 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar *Booth 7* en fonction de la température et du pH (le temps et le ratio ont été fixés).

I-3-5 Modélisation et optimisation de l'extraction de l'huile du cultivar *Booth 8*

La figure 33 présente un nuage de points qui se répartit de manière presque uniforme autour de la droite. Ceci signifie que la variance des résidus est constante. Par ailleurs, Le nuage de points du diagramme quantile - quantile s'ajuste bien autour de la droite (figure 34). Les résidus suivent donc une distribution normale. Pour le cultivar *Booth 8*, le test de Durbin-Watson s'avère non significatif (1,93 ; $p = 0,47$), donc les résidus ne sont pas corrélés. En somme, les hypothèses formulées sur les résidus pour un modèle linéaire sont respectées.

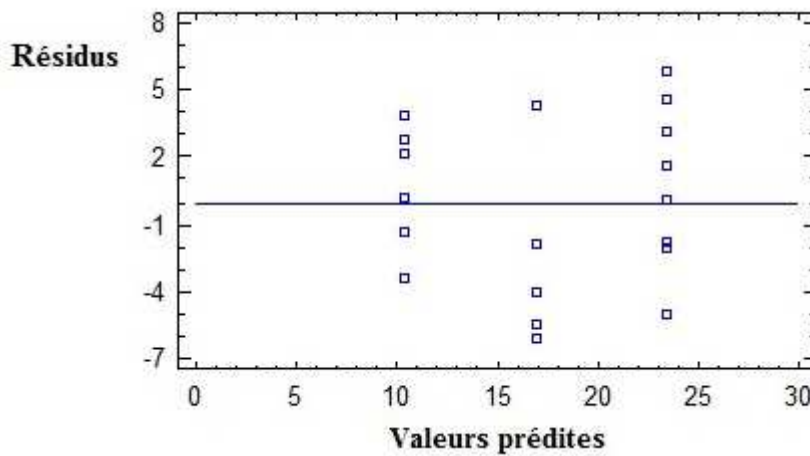


Figure 33 : Homoscédasticité des résidus pour l'efficacité d'extraction du cultivar *Booth 8*

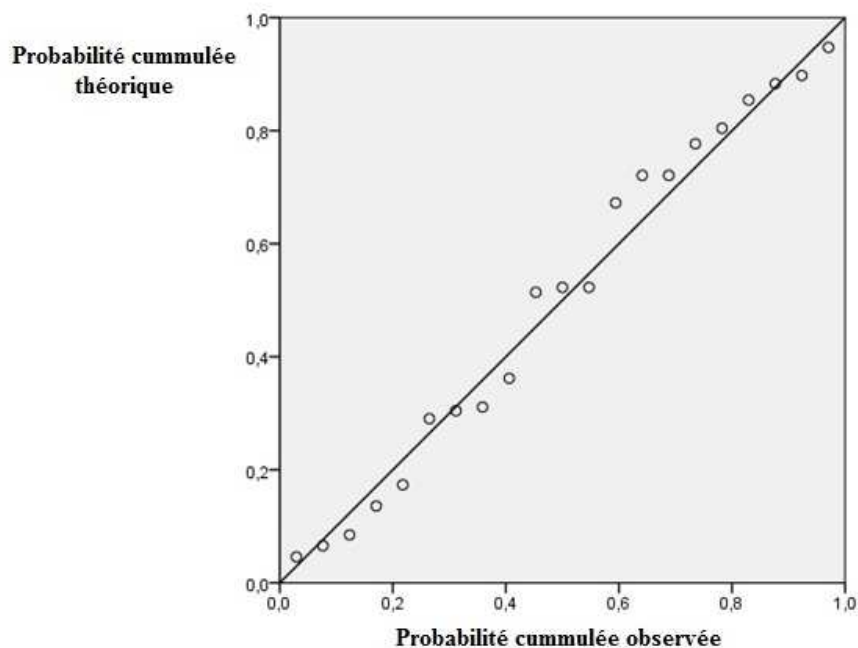


Figure 34 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de l’efficacité d’extraction du cultivar *Booth 8*

Le tableau XXI présente une probabilité inférieure à 0,05, ce qui implique qu’il existe une relation linéaire statistiquement significative entre l’efficacité d’extraction et les facteurs étudiés (température, temps, pH et ratio eau/pulpe).

Tableau XXI : Analyse de variance de l’efficacité d’extraction de l’huile du cultivar *Booth 8* en fonction des facteurs.

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Modèle	723,43	4	180,86	14,44	0,00*
Résidu	200,44	16	12,53		
Total	923,87	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté et F : le ratio de Fisher

Le tableau XXII montre que la température a une probabilité inférieure à 0,05 ; elle est donc significative. Par contre, le pH, temps et le ratio eau/pulpe sont non significatifs ($p > 0,05$). La non significativité du test de manque d’ajustement indique que le modèle du

premier degré utilisé décrit bien les variations de l'efficacité d'extraction en fonction des facteurs considérés.

Tableau XXII : Significativité des coefficients de régression et du test de manque d'ajustement pour les variables indépendantes de l'extraction de l'huile du cultivar *Booth 8*

Source	Somme des carrés	DL	Carré moyen	F	Probabilité
Température (A)	676,33	1	676,33	38,51	0,00*
Temps (B)	11,85	1	11,85	0,67	0,46
pH (C)	9,11	1	9,11	0,52	0,51
Ratio (D)	26,13	1	26,13	1,49	0,29
AA + BB + CC + DD	44,67	1	44,67	2,54	0,19
Température x Temps	0,47	1	0,47	0,03	0,88
Température x pH	6,73	1	6,73	0,38	0,57
Température x Ratio	0,02	1	0,02	0,00	0,97
Temps x pH	0,14	1	0,14	0,01	0,93
Temps x Ratio	1,48	1	1,48	0,08	0,78
pH x Ratio	24,26	1	24,26	1,38	0,30
Test de manque d'ajustement	52,13	5	10,42	0,59	0,71
Erreur pure	70,26	4	17,56		
Totale	754,19	20			

*Significatif au seuil de 0,05 ; DL : degré de liberté ; F : ratio de Fisher

Une régression linéaire multiple a été utilisée pour décrire l'extraction de l'huile grâce à un modèle empirique (exprimé en fonction des valeurs codées des facteurs):

$$\text{Efficacité d'extraction} = 16,89 - 6,50 \cdot \text{Température.}$$

Le coefficient de détermination (R^2) indique que le modèle explique 73,20% des variations de l'efficacité d'extraction avec un coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté) de 71,79%. Ces coefficients de détermination renvoient également à la l'avant dernière valeur du test de Mallows ($C_p = 2,78$) qui a permis de retenir la température dans ce modèle (tableau A6, Annexe I). L'absence d'effet de courbure sur la courbe de surface réponse (figure 35) conforte l'idée de l'adéquation du modèle du premier degré.

L'équation du modèle permet de mettre en relief l'effet de la température sur l'efficacité d'extraction. Ainsi, en moyenne, l'efficacité d'extraction réduit de 13% ($2 \times 6,5$) quand on passe de 45°C à 55°C. Dans une stratégie d'optimisation (maximisation) de l'efficacité d'extraction de l'huile du cultivar *Booth 8*, un choix judicieux serait donc un niveau bas de la température. Sur la base de l'équation du modèle, les conditions optimales peuvent alors être calculées. La valeur optimale de l'efficacité d'extraction est 24,67%. Celle des facteurs est consignée dans le tableau XXIII.

Tableau XXIII : Conditions optimales des variables indépendantes d'extraction de l'huile du cultivar *Booth 8*

Facteurs	Valeurs inférieures	Valeurs supérieures	Valeurs optimales codées	Valeurs optimales non codées
Température	-1	1	-1	45°C
Temps	-1	1	1	180 min
pH	-1	1	-1	4,5
Ratio	-1	1	1	4 :1 (m/m)

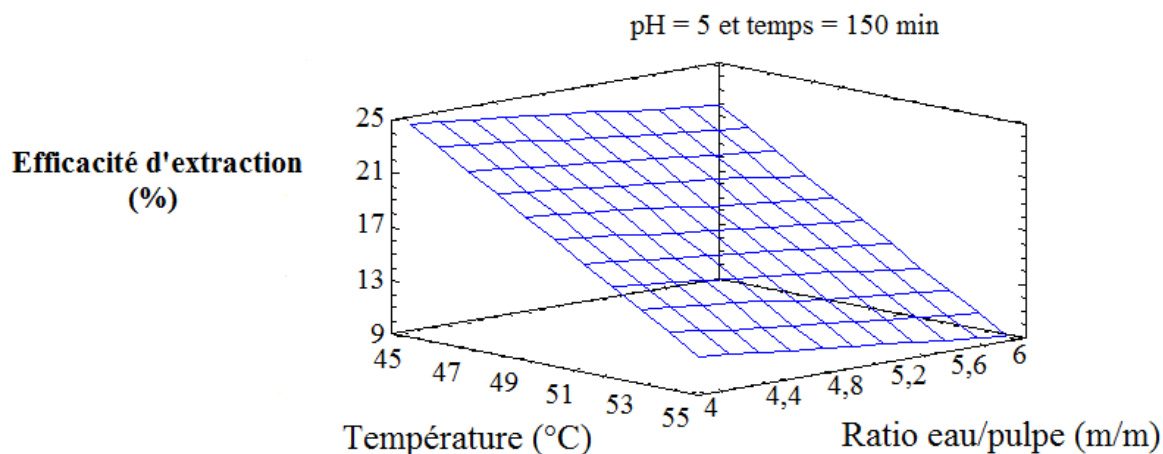


Figure 35 : Représentation des courbes de surfaces réponses de l'efficacité d'extraction du cultivar *Booth 8* en fonction de la température et du ratio eau/pulpe (le pH et ratio ont été fixés).

De manière globale dans les différents modèles développés, on note que les facteurs étudiés affectent l'efficacité d'extraction à différents degrés et de manière sélective. Ces résultats vont en droite ligne avec les conclusions formulées par Guillemain (2006) selon lesquelles la diffusion de l'huile dans le procédé d'extraction aqueuse serait étroitement liée à la température, le pH, le temps et le ratio eau/pulpe. Sur la base de la grandeur des coefficients de régression, la température est le facteur le plus important et qui se retrouve dans toutes les équations, ensuite viennent le temps, le ratio eau/pulpe et le pH. Cet ordre d'importance des facteurs avait déjà été décrit par Koocheki *et al.* (2009) lors de l'optimisation du rendement d'extraction du mucilage des graines de *Lepidium perfoliatum*. On en conclut que l'extraction aqueuse de l'huile d'avocat ne peut se faire sans agitation thermique ; ceci justifie davantage l'aspect endothermique de cette extraction. Par ailleurs, au vu des optimisations individuelles des extractions des cultivars, les optima ne concordent pas les uns avec les autres. Il serait donc avisé d'avoir recours à la fonction de désirabilité pour trouver un compromis entre ces optima.

I-4 Optimisation multicritère et validation expérimentale des modèles

Après réalisation des matrices d'expériences, les valeurs minimales et maximales des efficacités d'extraction des 5 cultivars ont été recueillies afin de définir les bornes inférieures et supérieures des désirabilités individuelles des 5 cultivars telles que consignées dans le tableau XXIV. Les bornes inférieure et supérieure des désirabilités individuelles choisies sont identiques aux valeurs minimales et maximales des efficacités d'extraction des 5 cultivars afin de rester dans l'espace de recherche fixé par les domaines d'étude des variables indépendantes.

Tableau XXIV : Valeurs minimale et maximale des efficacités d'extraction et bornes inférieure et supérieure des désirabilités individuelles des 5 cultivars

Cultivars	Efficacités d'extraction (%)		Désirabilités individuelles (%)	
	Valeurs minimales	Valeurs maximales	Bornes inférieures	Bornes supérieures
<i>Booth 8</i>	6,99	29,24	6,99	29,24
<i>Booth 7</i>	6,15	32,74	6,15	32,74
<i>Collinson</i>	0,65	22,87	0,65	22,87
<i>Hickson</i>	15,41	27,44	15,41	27,44
<i>Lula</i>	19,33	41,49	19,33	41,49

Dans les différents domaines d'étude, la fonction de désirabilité globale a été maximisée pour trouver les conditions optimales d'extraction de l'huile d'avocat ainsi que les valeurs optimales des réponses. La valeur obtenue graphiquement (figure 36) et par calcul est 0,93. Cette valeur est proche de 1. En effet, la fonction de désirabilité est connue pour varier entre 0 et 1. Si elle est proche de 1 alors nous sommes proches des conditions communes idéales, dans le cas contraire, il s'avère que les optima des différentes réponses soient très éloignés les uns des autres pour aboutir à un compromis (Raissi et R-Eslami Farmi, 2009). La combinaison de facteurs générée par la fonction de désirabilité obtenue est la suivante : la température est de 45°C, le temps de 180 min, le pH de 4,5 et le ratio eau/pulpe de 6 :1 (m/m).

Cette combinaison de facteurs ne correspond à aucune des conditions optimales individuelles des cultivars. Dans ces conditions, les valeurs optimales théoriques sont les suivantes : *Booth 7* (28,03%), *Booth 8* (23,39%), *Collinson* (8,66%), *Hickson* (26,67%) et *Lula* (33,32%).

La validation du modèle s'est faite par la détermination expérimentale des efficacités d'extraction des huiles des 5 cultivars en utilisant les conditions optimales obtenues par la fonction de désirabilité. Les valeurs expérimentales sont confrontées aux valeurs théoriques grâce au coefficient de corrélation linéaire (r). Un r de 0,98 a été obtenu, ce qui valide les résultats théoriques observés (tableau XXV).

La valeur de la température observée (45°C) est très proche de celle obtenue lors de l'extraction des graines de sésame, tournesol et canola qui était de 40°C après emploi d'enzymes hydrolytiques (Latif, 2009). Le domaine 40 – 50°C avait déjà été perçu comme zone d'activité optimale de bon nombre d'enzymes hydrolytiques qui hydrolysent la paroi de la cellule lors du mûrissement (Platt Aloa *et al.*, 1980). On pourrait donc penser que la diffusion de l'huile à 45°C serait l'action combinée de la chaleur et des enzymes contenues dans les cellules des avocats. Buenrostro et Lopez-Munguia (1986) ont rapporté un ratio eau/pulpe de 5 :1 (m/m) pour l'extraction de l'huile d'avocat qui est inférieur à la valeur 6 du ratio obtenue dans cette étude. En convertissant les efficacités d'extraction des huiles d'avocat (compris entre 8,66 et 33,32%) en des rendements d'extraction (4,64% – 21,55%), on observe que ces rendements sont supérieurs à celle Buenrostro et Lopez-Munguia (1986), soit 2%. Ceci suggère le rôle indubitable de la méthodologie des surfaces réponses dans l'optimisation des procédés d'extraction des huiles végétales en général et celui de l'huile d'avocat en particulier.

Sachant que les procédés d'extraction sont connus pour faire varier la composition physicochimique de l'huile d'avocat (Farine *et al.*, 1995 ; Moreno *et al.*, 2003) qui elle influe sur les propriétés fonctionnelles de l'huile d'avocat, il serait donc intéressant de déterminer

les propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'huile d'avocat extraite pour des applications ultérieures.

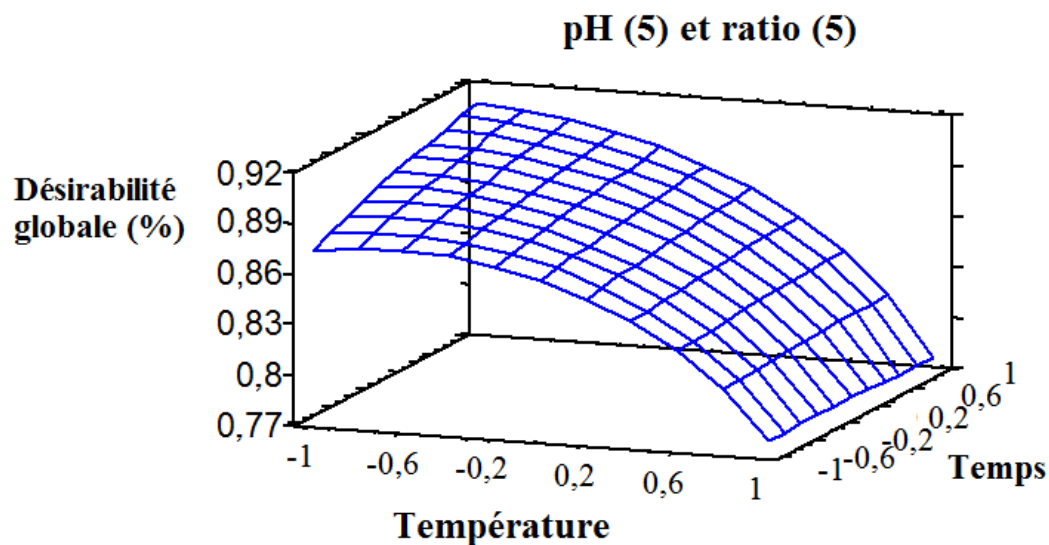


Figure 36 : Représentation de la désirabilité en fonction de la température et du temps (pH et ratio ont été fixés).

Tableau XXV : Valeurs expérimentales et prédites des efficacités d'extraction des huiles d'avocat

Cultivars	<i>Booth 7</i>	<i>Booth 8</i>	<i>Collinson</i>	<i>Hickson</i>	<i>Lula</i>
Valeurs prédites (%)	28,03	23,39	8,66	26,67	33,32
Valeurs expérimentales (%)	25,03 ± 0,21	23,91 ± 0,12	7,86 ± 0,28	26,11 ± 0,14	31,42 ± 0,96

II-Propriétés physicochimiques et fonctionnelles

II-1 Motif moléculaire distinctif et classification des huiles d'avocats

II-1-1 Motif moléculaire distinctif des huiles d'avocats

Après balayage du domaine 400 – 4000 cm^{-1} , la zone distinctive des huiles d'avocat a été déterminée entre 900 – 1300 cm^{-1} (figure 37). Pour l'huile d'avocat commerciale, les

bandes sont 918, 966, 1097, 1165, 1239 et 1267 cm^{-1} avec un pic d'intensité maximale à 1165 cm^{-1} qui est considéré comme empreinte distinctive. Pour l'huile du cultivar *Booth 7*, on a les bandes 924, 979, 1095, 1167, 1239 et 1268 cm^{-1} avec un pic distinctif à 1167 cm^{-1} . En ce qui est de l'huile du cultivar *Booth 8*, on a les bandes 936, 970, 1105, 1164, 1237 et 1277 cm^{-1} avec un pic caractéristique à 1164 cm^{-1} . Concernant l'huile du cultivar *Collinson*, on a les bandes 927, 969, 1098, 1157, 1235 et 1271 cm^{-1} avec un pic caractéristique à 1157 cm^{-1} . Pour l'huile du cultivar *Hickson*, on a les bandes 929, 954, 970, 1106, 1162, 1235 et 1284 cm^{-1} avec un pic caractéristique à 1162 cm^{-1} . Concernant l'huile du cultivar *Lula*, on a des bandes à 1036, 1105, 1143, 1164, 1229 et 1276 cm^{-1} avec un pic caractéristique à 1164 cm^{-1} . Leur taux de concordance est de 1 ($p = 0,0085$) malgré la présence de points divergents. Leur domaine de similitude se situe entre 1157 – 1167 cm^{-1} . On peut donc dire que les huiles d'avocat étudiées présentent des similarités et pourraient donc être exploitées à des fins communes.

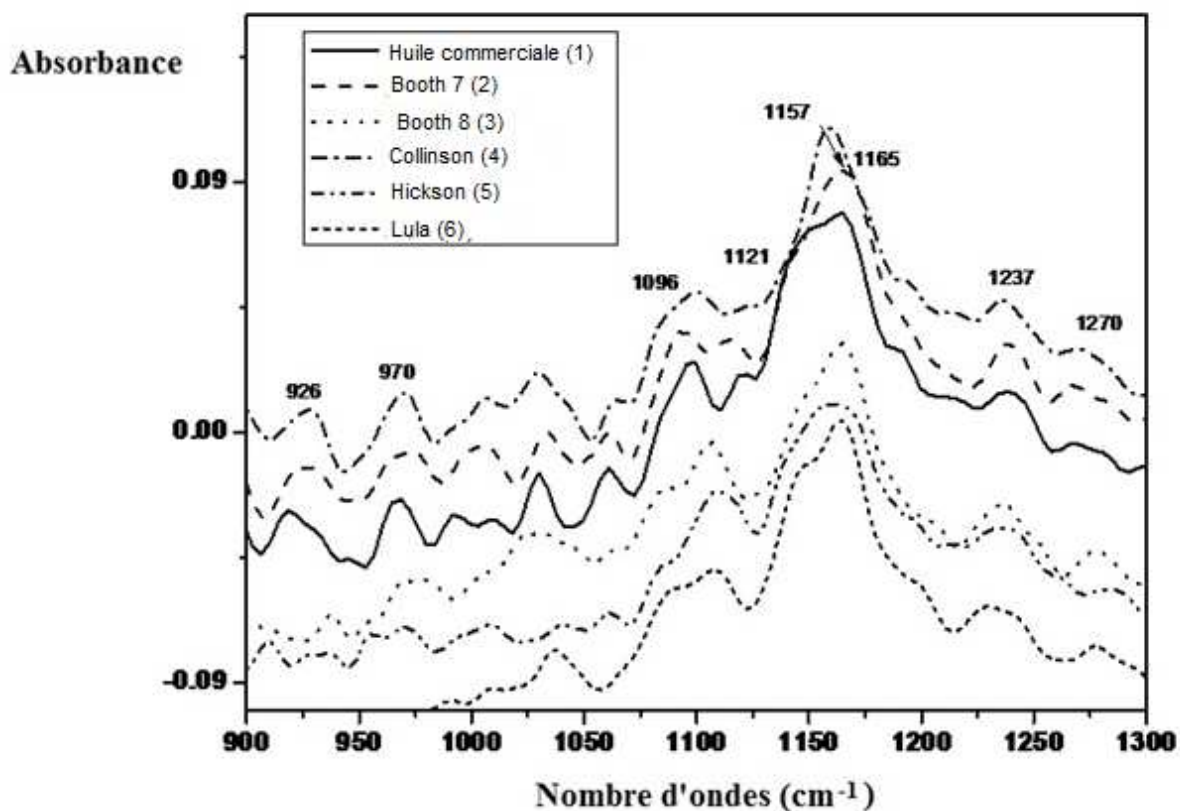


Figure 37 : Spectres d'absorbance des huiles d'avocats dans la zone 900 – 1300 cm^{-1}

II-1-2 Classification des huiles d'avocats

La première classification s'est faite dans la région spectrale des insaturations, à savoir $2800 - 3050 \text{ cm}^{-1}$ et la seconde dans la région spectrale de la fonction ester carboxylique, à savoir $1690 - 1790 \text{ cm}^{-1}$. Dans la classification en fonction du degré d'insaturation, on a un contrôle de 59,61% de la variance totale avec la composante principale PC1 (33,30%) qui explique mieux la variance totale comparée à la composante principale PC2 (26,31%). Sur la base de la PC1, on peut regrouper les huiles en 4 catégories (figures 38 et 39) : catégorie 1 (huile commerciale), catégorie 2 (*Booth7 et Collinson*), catégorie 3 (*Hickson et Booth 8*) et catégorie 4 (*Lula*). La seconde classification impliquant la fonction ester comme classifieur a permis d'expliquer 91,36% de la variance totale soit 61,61% pour la PC1 et 29,75% pour la PC2 (figures 40 et 41). Une fois de plus en utilisant la PC1 qui dispose de la plus grande proportion de variance totale, on a abouti aux regroupements suivants : catégorie 1 (*Booth 7 et Collinson*), catégorie 2 (huile commerciale), catégorie 3 (*Lula*) et catégorie 4 (*Booth 8 et Hickson*). Cette classification est due principalement au pic 1746 cm^{-1} . Avec les deux classifieurs (degré d'insaturation et liaison ester) ont abouti au même regroupement avec une similitude notable avec les teneurs en lipides des cultivars. La classification a été principalement effectuée grâce à la liaison ester à 1746 cm^{-1} . Cette dernière serait un bon moyen d'identification de la contrefaçon.

Dupuy *et al.* (1996), en employant la spectroscopie FTIR couplée à l'analyse en composante principale, ont réussi à classer les huiles de tournesol, d'olive et d'arachide sur la base de leurs insaturations ($2700 - 3050 \text{ cm}^{-1}$) avec une variance expliquée de 70%. Cette classification est plus explicative que celle observée dans cette étude (59,61%) mais moins explicative que celle employant la fonction ester (91,36%). Ceci renforce l'idée de l'emploi

de la fonction ester utilisant la classification des huiles d'avocat avec la spectroscopie FTIR couplée à l'analyse en composante principale.

Du fait que le cultivar *Lula* présente la plus grande teneur en lipides, l'efficacité d'extraction la plus élevée et le score le plus élevé dans la classification, il a été utilisé pour la suite des analyses. De plus, plusieurs travaux ont été effectués sur *Lula* comparé aux quatre autres et il peut donc servir de base de comparaison pour étudier l'effet du procédé d'extraction sur les propriétés physicochimiques et fonctionnelles de l'huile extraite.

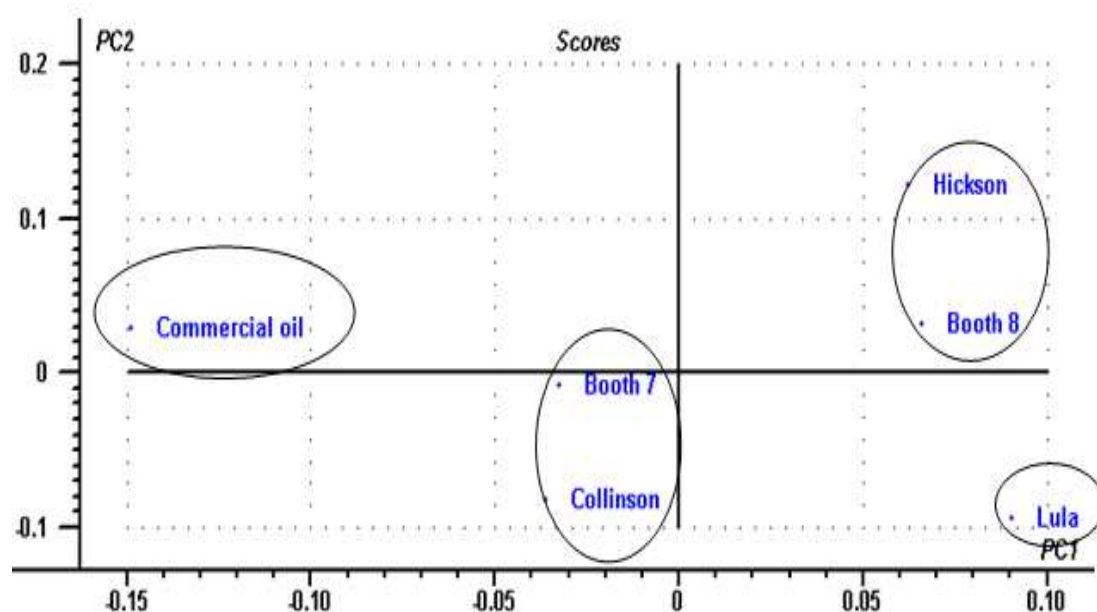


Figure 38 : Représentation des scores en ACP des cultivars d'huiles dans le domaine 2800 – 3050 cm^{-1}

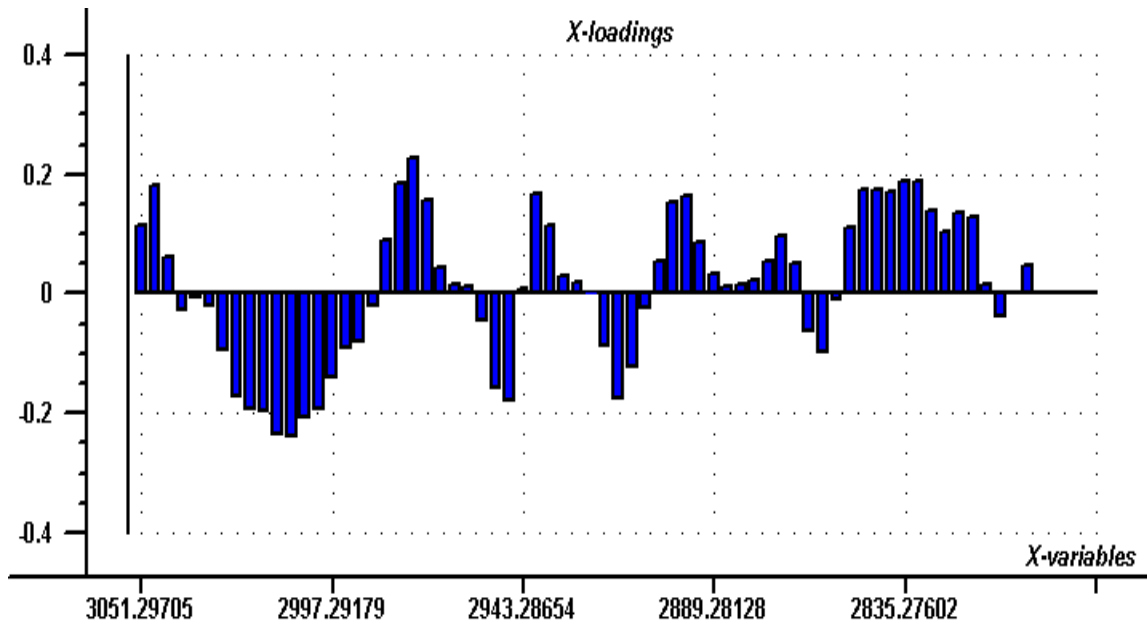


Figure 39 : Représentation de la variabilité des huiles dans le domaine 2800 – 3050 cm^{-1}

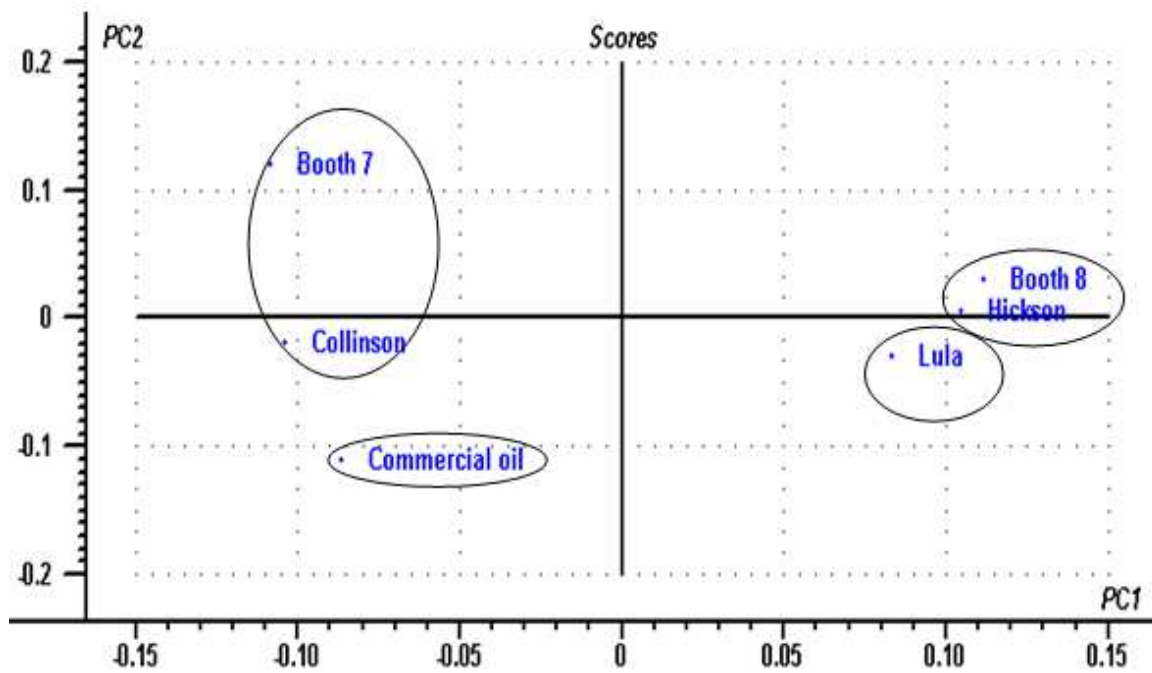


Figure 40 : Représentation des scores en ACP des cultivars d’huiles dans le domaine 1690 – 1790 cm^{-1}

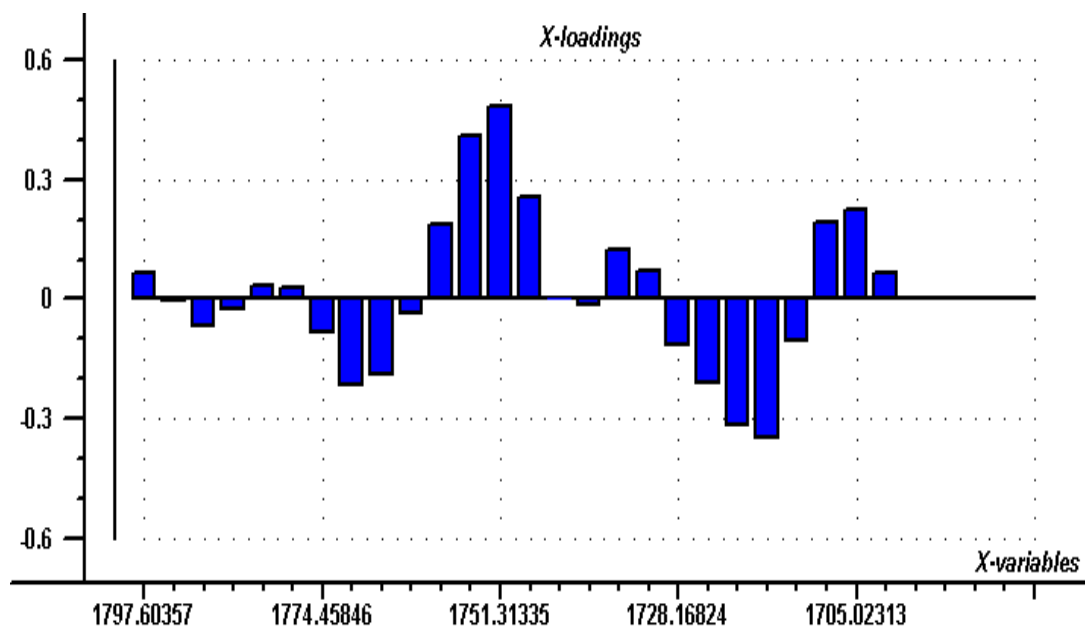


Figure 41 : Représentation de la variabilité des huiles dans le domaine 1690 – 1790 cm⁻¹

II-2 Caractérisation spectrale dans l’ultraviolet et le visible

Le spectre d’absorption d’huile d’avocat montre que l’intensité d’absorption est plus marquée dans le domaine de l’ultraviolet, 210 nm – 390 nm, que dans le domaine du visible, 390 – 600 nm (figure 43). Par ailleurs, le domaine du visible (figure 42) présente 2 principaux domaines d’absorption : celui présentant la bande d’absorption la plus élevée entre 390 nm et 428 nm et l’autre présentant la bande d’absorption la moins élevée (630 nm et 685 nm). L’absorption maximale dans le visible se situe à 417 nm avec un épaulement à 400 nm. Un second pic, de plus faible intensité, est observé à 665 nm.

La forte absorption dans l’ultraviolet comparée au visible s’explique par la présence d’une quantité abondante d’insaturations dans l’huile d’avocat. En effet, le domaine d’absorption entre 210 et 390 nm correspond à la bande où les transitions $n - \pi^*$ (hydroperoxydes) et $\pi - \pi^*$ (diènes conjugués et acides gras mono et polyinsaturés) sont favorables et nécessitent la présence d’insaturations (Kumar et Viswanathan, 2013). Du fait que les molécules conjuguées aient une plus grande facilité à effectuer ce type de transition, une analyse du domaine ultraviolet a été effectuée en utilisant un spectre dérivé seconde pour

amplifier leur signal et estimer leur contribution. Le spectre dérivé seconde de l'huile d'avocat présente 2 pics négatifs de faible intensité à 235 nm et 245 nm (figure 44) caractéristiques des diènes conjugués et 2 autres pics négatifs de plus faible intensité à 265 nm et 277 nm caractéristiques des hydroperoxydes (Cerretani *et al.*, 2005 ; Gomez *et al.*, 2011). Ceci suggérerait que cette forte absorption serait due aux insaturations non conjuguées des acides gras qu'aux diènes conjugués résultant de l'oxydation de ces acides gras. La quantification des diènes conjugués, des hydroperoxydes et des acides gras permettra de confirmer cette hypothèse.

L'épaule observé à 400 nm est caractéristique des polyphénols et le pic à 417 nm est caractéristique des caroténoïdes dont la bande d'absorption se serait déplacée vers les courtes longueurs d'ondes (effet hypsochrome) (Standard polonais PN-A-86934, 1995 ; Cerretani *et al.*, 2005). Aussi, le pic à 665 nm est caractéristique des chlorophylles (Mińkowski *et al.*, 2010) et leur présence dans l'huile d'avocat serait responsable du domaine de faible absorption dans le visible. Ainsi, la teneur en Caroténoïdes dans l'huile d'avocat serait supérieure à celle des chlorophylles. La quantification des teneurs en chlorophylles et caroténoïdes dans la suite du travail permettra de confirmer cette assertion.

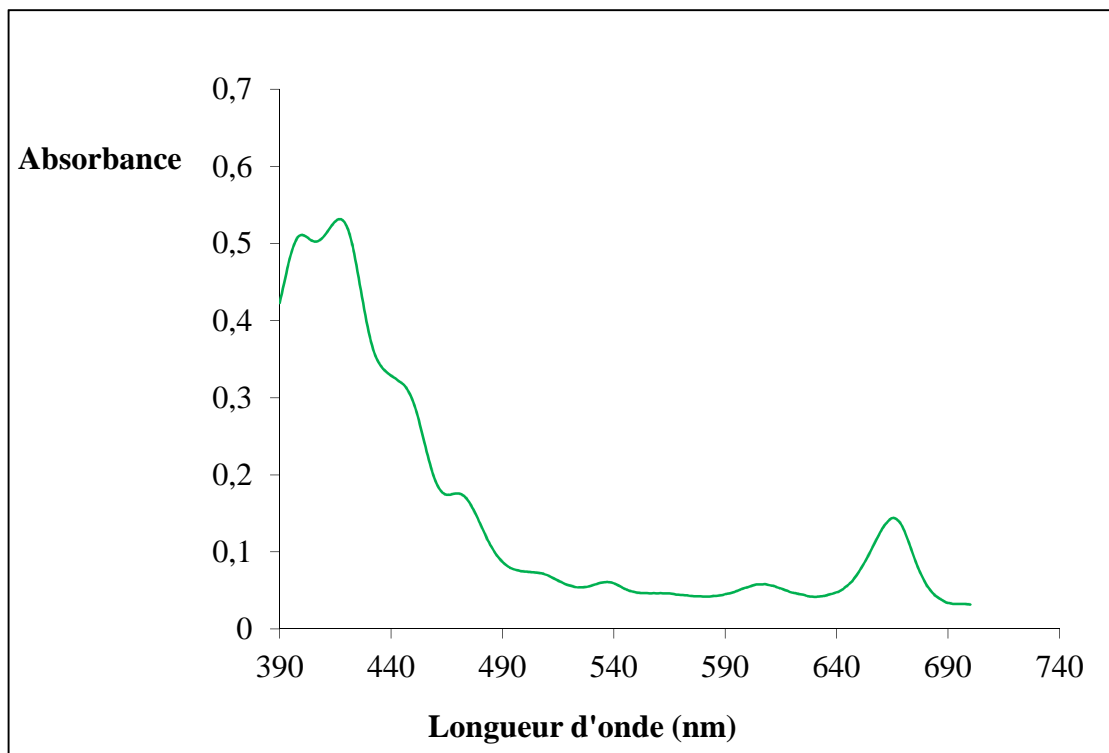


Figure 42 : Spectre d'absorption de l'huile du cultivar Lula à 30 g/L entre 300 nm et 700 nm

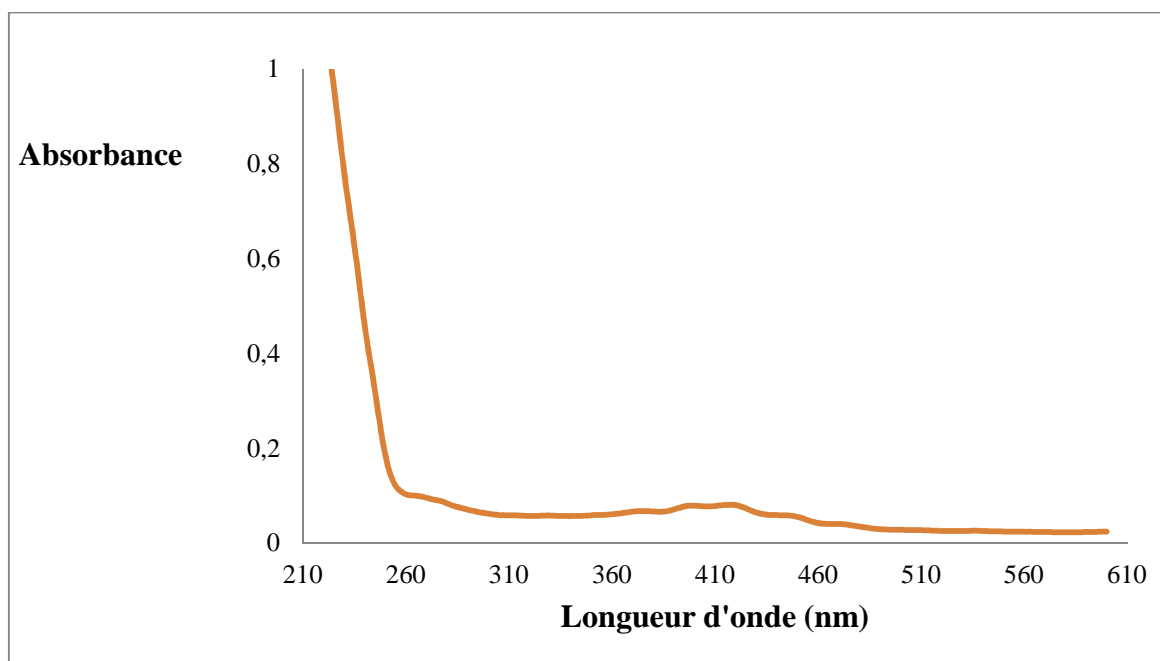


Figure 43 : Spectre d'absorption de l'huile du cultivar Lula à 2,3 g/L entre 210 nm et 600 nm

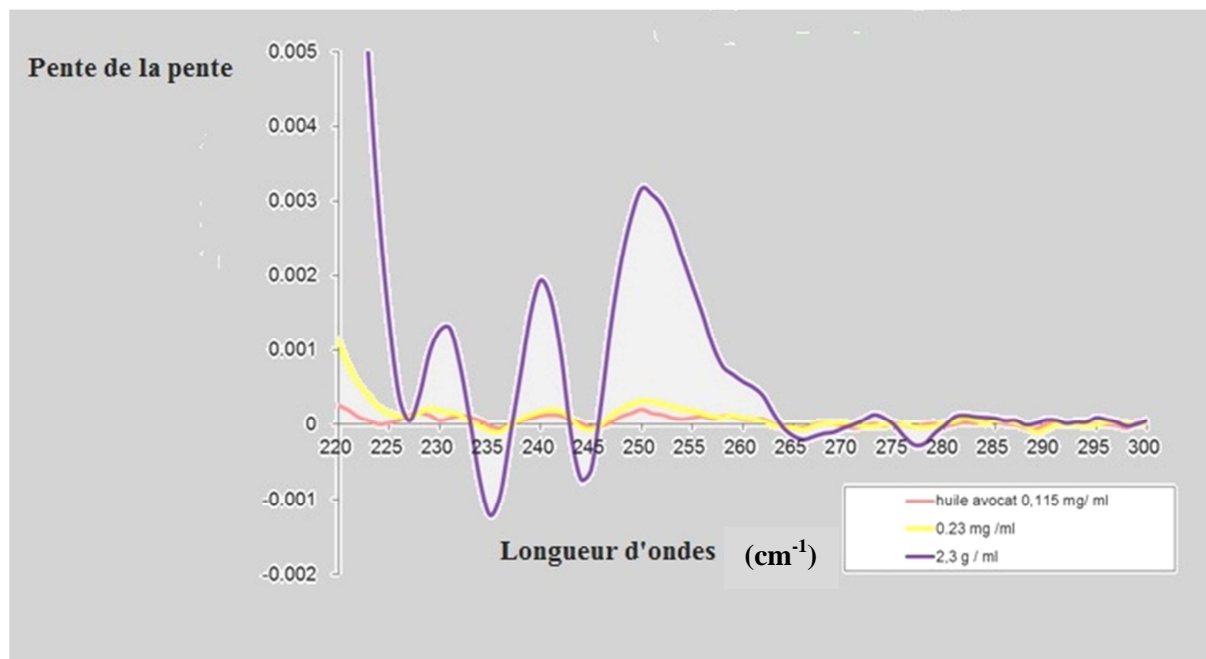


Figure 44 : Spectres dérivés secondes de l'huile du cultivar Lula aux concentrations 0,115 g/L ; 0,23 g/L et 2,3 g/L entre 220 nm et 300 nm.

II-3 Caractérisation spectrale par fluorescence

La carte d'isointensité excitation-émission de l'huile d'avocat à 0,46 g/L (figure 45) présente deux zones de fluorescence : une plus petite zone avec une bande d'excitation vers 310 nm et une bande d'émission vers 335 nm ; et une plus grande zone avec une bande d'excitation vers 366 nm et une bande d'émission vers 503 nm. Le spectre d'excitation et d'émission de l'huile d'avocat (figure 46) confirment les bandes d'excitation et d'émission de la plus petite zone de fluorescence avec des maxima proches de 297 nm en excitation et de 330 nm en émission.

Les fluorophores qui s'excitent et émettent aux longueurs d'ondes de la petite zone de fluorescence sont les tocophérols présents dans les huiles végétales (Tena *et al.*, 2009). Les tocophérols et tocotriénols de l'huile d'avocat présentent une faible fluorescence (proche de 270 unités arbitraires) comparée à celle de l'huile de soja, l'huile de sésame, l'huile des graines de raisins, l'huile des graines de coton, l'huile de palme raffinée et l'huile de tournesol (1000 et 3000 u.a.) mais proche de l'huile d'olive extra-vierge (approximativement 300 u.a.)

(Kongbonga *et al.*, 2011). L'intensité de fluorescence des tocophérols et tocotriénols aurait présentée un faible signal dans l'huile d'avocat du fait de leurs faibles concentrations ou du fait d'une perte de fluorescence par la collision des fluorophores ou le phénomène de quenching (Skoog et Leary, 1994). Une quantification des tocophérols et tocotriénols par HPLC-fluorescence permettra de mieux comprendre.

Les fluorophores qui s'excitent et émettent dans la grande zone de fluorescence seraient les produits d'oxydation présents dans les huiles végétales (Tena *et al.*, 2009). Si c'est le cas, il apparaît sur la carte d'isointensité que ces produits d'oxydation seraient en quantité plus importante que celle des tocophérols et tocotriénols.

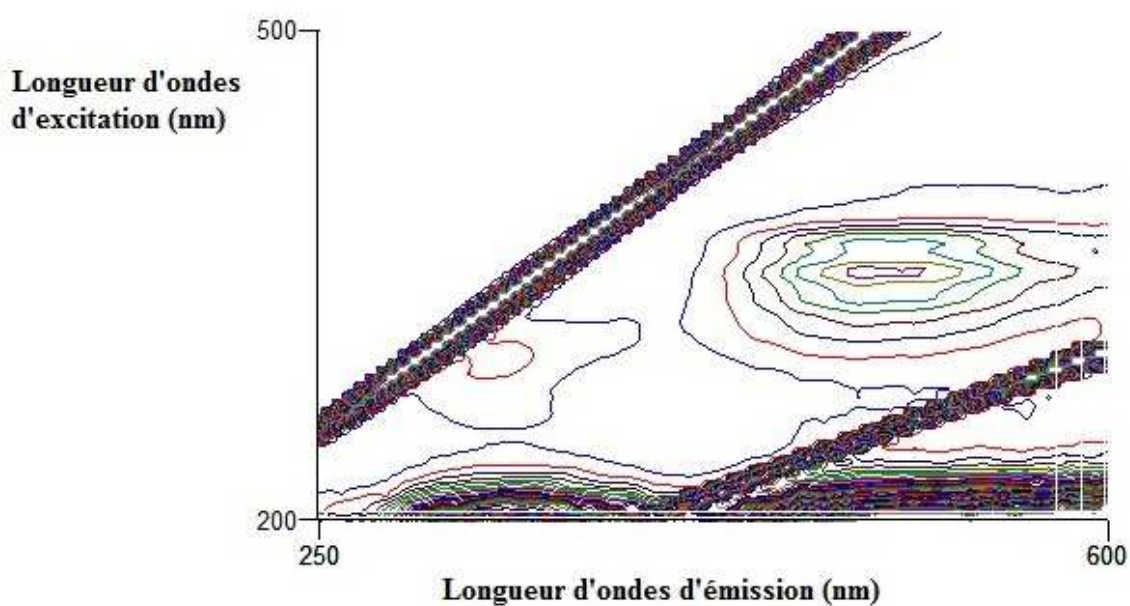


Figure 45 : Carte d'isointensité excitation-émission de l'huile d'avocat à 0,46 g/L.

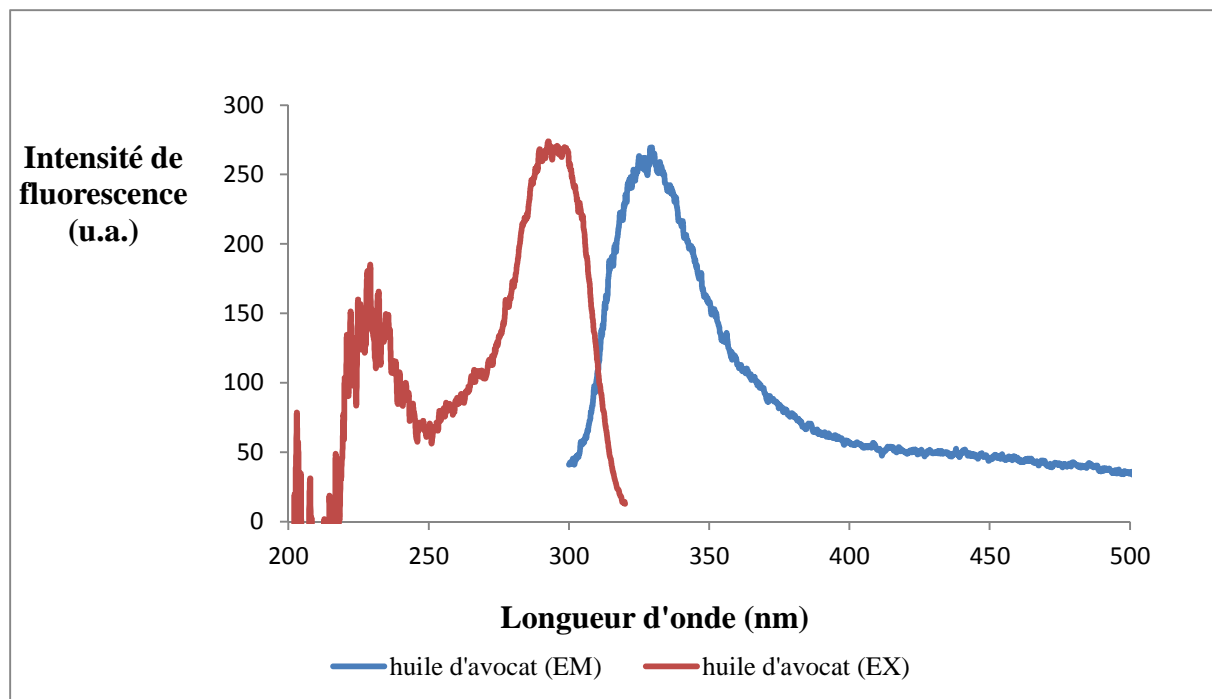


Figure 46 : Spectres d'excitation-émission de l'huile d'avocat à 2,3 g/L.

II-4 Teneurs en chlorophylles, caroténoïdes, tocotriénols, tocophérols, squalène et stérols

La teneur en insaponifiable dans cette étude est de 1,05 g/100g, soit 1,05% (tableau XXVI). La somme des constituants recherchés dans la fraction insaponifiable (chlorophylle, caroténoïde, tocophérols, squalène et stérols) donne un total de 0,75 g/100g, soit 71,43% de la fraction insaponifiable. Les stérols sont les plus représentés et compte pour 81,28% du total de la fraction insaponifiable identifiés. Tout ceci suggère que la composition de 28,57% de la fraction insaponifiable reste inconnue. Ces composantes inconnues de la fraction insaponifiable serait constituées des alcools terpéniques, des hydrocarbures saturés, des composés trihydroxylés, des stérols et de la fraction I telles que rapporté par Benoit (2004) qui a déterminé les constituants des insaponifiables de l'huile d'avocat. Par ailleurs, la teneur en insaponifiable de 1,05% est inférieure à celle de Lozano *et al.* (1993), Pushkard *et al.* (2001), Kameni et Tchamo (2003), et Ikhuoria et Maliki (2007) qui ont employé la méthode hexanique au soxhlet (5 – 22,1%). Elle est pourtant en accord avec les résultats de Farines *et*

al. (1995) qui ont montré que la teneur en insaponifiable varie de 1 – 2% dans les avocats frais et de 3 – 7% dans ceux séchés. Mis à part le facteur maturité, on pourrait également tenir compte de la polarité du solvant dans l'extraction qui aurait un effet négatif dans cette étude car les insaponifiables sont connus pour être beaucoup plus solubles dans les solvants apolaires.

La teneur en chlorophylles (8,83 mg/kg) est statistiquement identique ($t = -1,61$; $p = 0,25$) au seuil inférieur recommandé pour l'huile d'avocat extra-vierge qui ont des valeurs comprises entre 11 – 19 mg/kg (Wong *et al.*, 2010). Pareillement, la teneur en caroténoïdes (3,76 mg/kg) de cette étude est identique à la valeur supérieure ($t = 1,81$; $p = 0,21$) à celle recommandée pour l'huile d'avocat extra-vierge qui a des valeurs comprises entre 1 – 3,5 mg/kg (Wong *et al.*, 2010). En effet, l'avocat contient la lipoxygénase II, qui en présence de l'oxygène, dégrade les caroténoïdes par un mécanisme de co-oxydation (Jacobo-Velazquez *et al.*, 2010). Cette lipoxygénase II aurait été inactivée par le procédé d'extraction et ceci pourrait justifier en partie la grande concentration en caroténoïdes enregistré dans cette étude.

Les dérivés de la chlorophylle, quant à eux, se forment sous l'action des enzymes, de la chaleur et des acides (figure 47). La phéophytine et la chlorophyllide qui proviennent de la transformation de la chlorophylle, utilisent deux voies distinctes de synthèse (Von Elbe et Schwartz, 1996). Etant donné que la teneur en chlorophylle a été exprimée en équivalent gramme de phéophytine *a*, on peut penser que la voie de synthèse de la phéophytine a été privilégiée au détriment de la synthèse enzymatique de la chlorophyllide dans l'avocat. Ceci pourrait justifier la teneur acceptable en chlorophylle enregistrée dans l'huile d'avocat extraite. De plus, il est important de noter que les concentrations en caroténoïdes et chlorophylles dans l'avocat dépendent de son degré de maturité et de la saison de récolte (Lu *et al.*, 2005). Ces hypothèses permettent d'expliquer la fluctuation de la concentration en caroténoïdes dans les huiles d'avocat. Le procédé d'extraction est également connu pour

influencer la composition en insaponifiables de l'huile d'avocat (Farines *et al.*, 1995). Ceci permet de dire que les nouvelles conditions d'extraction ont accru la teneur en caroténoïdes et maintenu celle de la chlorophylle au regard des valeurs recommandées pour l'huile d'avocat extra-vierge.

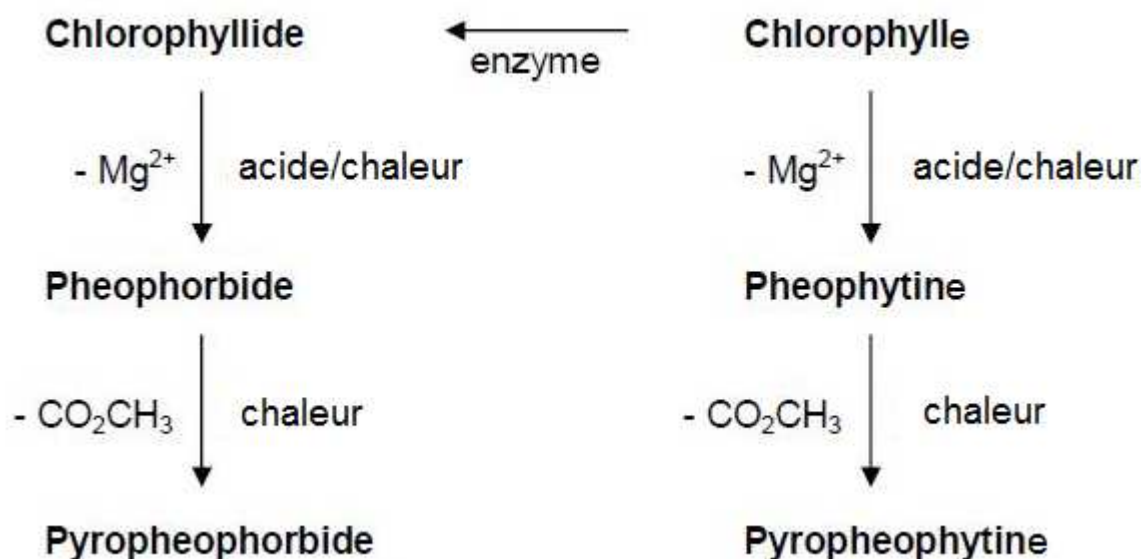


Figure 47 : Formation des dérivés de la chlorophylle (Von Elbe et Schwartz, 1996)

La teneur totale en tocophérols ($28,4 \pm 0,13$ mg/kg) est inférieure ($t = - 313,22$; $p = 0,0$) au seuil inférieur recommandé pour l'huile d'avocat extra-vierge (70 – 90 mg/kg) (Wong *et al.*, 2010). Elle est également inférieure à celle de Lozano *et al.* (1993) qui ont aussi utilisé le cultivar *Lula* mature et ont obtenu une valeur totale de 103 μ g/g d'huile par extraction à l'hexane. Cette faible concentration en tocophérols est en adéquation avec la faible fluorescence observée (figure 51) dans les domaines d'excitation (285 nm – 335 nm) et d'émission (315 nm – 355 nm). Cette observation permet ainsi de rejeter l'hypothèse d'un phénomène de quenching occasionné par d'autres fluorophores intrinsèques. Néanmoins, la proportion en α -tocophérol (92,6%) dans cette étude est supérieure à celle obtenue par Dos Santos *et al.* (2014). Ces derniers ont enregistré des proportions inférieures à 1,25%. Cette

variation en proportion est due à la différence de méthodes d'extraction employées (presse et extraction à l'éther de pétrole). Les tocotriénols ont été inexistantes dans l'huile d'avocat extraite dans cette étude. Cerretani *et al.* (2010) rapportent des teneurs en tocotriénols de 22,5 µg/g dans l'huile d'avocat raffinée. Ceci suggère que le procédé aqueux n'a pas favorisé l'extraction des tocotriénols. L'effet du procédé sur la composition et la teneur en insaponifiables dans l'huile d'avocat s'en trouve une fois de plus vérifié comme montré par Moreno *et al.* (2003).

D'après le tableau XXVI, la teneur totale en stérols ($6,10 \pm 0,25$ mg/g d'huile) est identique à la valeur seuil supérieur ($t = 6,29$; $p = 0,1$) de celle prédite par Woolf *et al.* (2008) qui les situaient entre 3,30 et 4,50 mg/g d'huile. Elle est également identique à la valeur seuil supérieur recommandé ($t = 6,37$; $p = 0,1$) pour l'huile d'avocat extraite par presse à froid dont l'intervalle est 2,28 – 4,48 mg/g (Wong *et al.*, 2010).

D'après le tableau XXVI, 4 types de stérols sont identifiés à savoir : β -sitostérol, stigmastérol, brassicastérol et Δ -5 campestérol. Le β -sitostérol (82,96%) est le stérol le plus abondant dans l'huile d'avocat. Ce constat avait déjà été fait par Woolf *et al.* (2008). La teneur en β -sitostérol de l'huile d'avocat (505,75 mg/kg) est supérieure à celle de plusieurs huiles végétales telles que : l'huile de palme (46,10 mg/100 g) et l'huile de colza (406 mg/100 g) (Tabee *et al.*, 2008). La présence de β -sitostérols, de la classe des 4-desméthylstérols, dans l'huile d'avocat est très importante car les β -sitostérols sont réputés pour leurs activités hypocholestérolémiantes, anti-inflammatoires, antiatherogéniques et antioxydantes (Berges *et al.*, 2004). D'autres 4-desméthylstérols sont présents à savoir : le Δ 5-campestérol (62,96 mg/100 g) et le stigmastérol (20,05 mg/100 g). Des proportions similaires en stérols avaient déjà été rapportées par Madawala *et al.* (2012) et Dos santos *et al.* (2014).

La concentration en squalène (133,05 mg/100 g) dans l'huile d'avocat (tableau XXVI) est plus élevée que celle trouvée par Murkorvic *et al.* (2004) dans l'huile d'olive (0,63

mg/100 mL d'huile). Le squalène a été longtemps utilisé en cosmétique pour sa capacité à fixer l'oxygène singulet lors des irradiations ultraviolettes (Kohno *et al.*, 1995). Le squalène ainsi rencontré en grande quantité dans les plats méditerranéens est associé à la faible incidence du cancer de la peau dans cette région. Il exerce donc un effet chimioprotecteur (Watterman et Lockhood, 2007).

Tableau XXVI : Teneurs en chlorophylles, caroténoïdes, tocophérols, squalène et stérols de l'huile d'avocat du cultivar *Lula*

Composantes		Teneurs
Chlorophylles (10^{-4} g/100g huile)		8,83 ± 2,33
Caroténoïdes (10^{-4} g/100g huile)		3,76 ± 0,14
Squalène (g/100 g huile)		0,13 ± 0,01
Tocophérols (10^{-4} g/100g huile)	α	26,30 ± 0,12
	β	0,30 ± 0,00
	γ	1,70 ± 0,01
	δ	0,10 ± 0,00
Stérols (10^{-3} g/100 g huile)	β -sitostérol	505,75 ± 38,75
	Δ^5 -campestérol	62,96 ± 1,84
	Brassicastérol	21,63 ± 8,55
	Stigmastérol	20,05 ± 4,14
Constituants inconnus (g/100g)		0,30
Insaponifiable total (g/100 g)		1,05 ± 0,13

II-5 Composition en acides gras et teneurs en acide gras *trans*, phospholipides, glycolipides et glycérides partiels

La concentration totale en acides gras de l'huile d'avocat est de 895,25 mg/g, soit 89,52% de l'huile. Il en découle donc que 10,46% de la fraction saponifiable sont constitués de glycérol. Par ailleurs, en additionnant la proportion d'insaponifiable identifiée dans l'huile d'avocat (0,75%) à celle des acides gras, on en déduit que 90,27% des constituants de l'huile

d'avocat ont été identifiés. Par ailleurs, l'huile d'avocat étudiée contient : 69,77% d'acides gras monoinsaturés, 2,88% d'acides gras polyinsaturés et 27,35% d'acides gras saturés (tableau XXVII). Ce résultat est très proche de ceux d'Akpabio *et al.* (2011) et Madawala *et al.* (2012) donc les valeurs en acides gras monoinsaturés se situent entre 56,64 – 76,50%, celles des polyinsaturés entre 10,30 – 14,45%, et celles des saturés entre 13,10 – 28,90%. Ceci confirme l'idée selon laquelle l'huile d'avocat est une huile oléique (Kapseu, 2009). L'acide oléique (44,35%) est l'acide majoritaire de l'huile extraite suivi par l'acide palmitique (25,46%). L'acide myristique (0,02%) est l'acide gras le moins représenté. Cette teneur en acide oléique est inférieure à celle de Wang *et al.* (2010) qui ont trouvé des proportions plus importantes dans l'huile d'avocat du cultivar Hass de différents pays (61,70 – 77,80%). La teneur en acide palmitoléique (9,66%), un acide gras monoinsaturé, est supérieure à celle rapportée par Plaza *et al.* (2009), soit 6%. L'huile d'avocat extraite contient une teneur en acide linoléique (0,82%) inférieure à 2%, ce qui lui confère la dénomination d'huile de friture et d'assaisonnement suivant la norme française (décret 97-298, article 3, paragraphe IV). Le rapport de concentration massique de l'huile d'avocat ω -6/ ω -3 est de 2,52. Il est bien compris entre 1 et 4 pour un rapport alimentaire optimal de ces 2 classes d'acides gras et très proche du rapport recommandé qui est compris entre 1 et 2 (Simopoulos et Cleland, 2003). Il est reconnu que les huiles monoinsaturés réduisent le taux de LDL-cholestérol tout en favorisant le HDL-cholestérol qui réduit les risques de maladies coronariennes (Ngogang *et al.*, 1996).

L'huile d'avocat extraite ne contient aucun acide gras *trans*. Moreno *et al.* (2003) ont rapporté des teneurs en acides gras *trans* de 0,33 ; 0,50 ; 0,52 et 0,87% respectivement pour l'huile d'avocat extraite à la presse assistée de micro-ondes, à l'action combinée de l'hexane et les micro-ondes, à l'hexane et à l'acétone. L'extraction à la presse assistée de micro-ondes est la seule méthode qui permettait d'obtenir une teneur en acides gras *trans* inférieure à

0,50% dans l'huile d'avocat telle que recommandée par la FDA (1999). On peut donc penser que l'extraction aux solvants organiques favoriserait la formation ou l'extraction des acides gras *trans*. Par contre, l'extraction aqueuse dans cette étude limiterait la formation des liaisons *trans*. L'absence des acides gras *trans* est intéressante lorsqu'on sait qu'ils interviennent dans la survenue des maladies cardiovasculaires et aggravent l'insulino-résistance (Mozaffarian *et al.*, 2009).

Les teneurs en glycérides partiels, en phospholipides et en glycolipides n'ont pas pu être détectées dans l'huile d'avocat par CLHP-ELSD. Sachant que la séparation chromatographique débute par un système solvant apolaire en CLHP-ELSD, il faudrait que les concentrations en lipides polaires soient 10 fois plus élevées que celles des lipides neutres dans la prise d'essai. De plus, le seuil de détection pour les triacylglycérides, diacylglycérides et acides gras libres est compris entre 1 et 4 μg contre 20 à 40 μg pour les phospholipides, glycolipides et monoacylglycérides (Kobayashi *et al.*, 2013). Or, il est reconnu que les phospholipides et glycolipides contenus dans la membrane des cellules des avocats sont essentiellement constitués d'acides gras insaturés tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique (Hudson, 1975). Ces 2 acides gras sont présents à faible concentration (2,88%) dans l'huile d'avocat extraite dans cette étude. Sachant qu'ils se répartissent dans les glycérides, les phospholipides et les glycolipides, on comprend mieux la difficulté à mesurer la concentration des glycérides, des phospholipides et les glycolipides dans l'huile d'avocat extraite par CLHP-ELSD. Ceci est davantage plus vrai pour des lipides contenant majoritairement l'acide linoléique (0,82%).

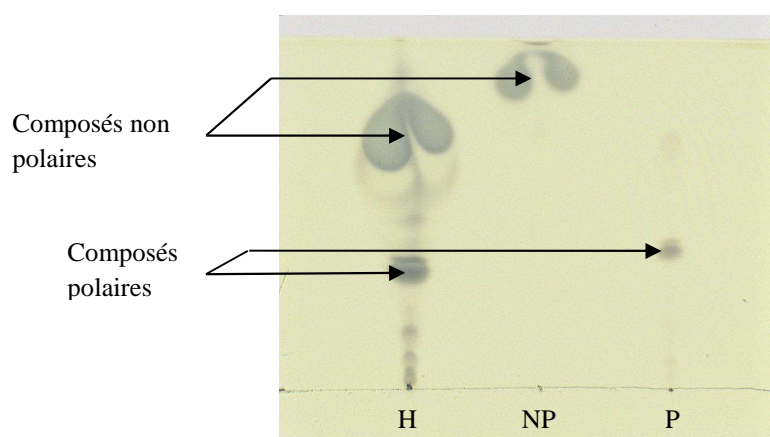
Tableau XXVII : Composition en acides gras de l'huile d'avocat du cultivar *Lula*

Classes	Acides gras	Concentrations (mg/g)	Pourcentages (%)
Acides gras saturés	Acide myristique	0,22 ± 0,00	0,02
	Acide palmitique	227,98 ± 3,21	25,46
	Acide stéarique	16,76 ± 0,73	1,87
Total en acides gras saturés		244,96	27,35
Acides gras monoinsaturés	Acide palmitoléique	227,66 ± 2,11	25,42
	Acide oléique	396,74 ± 15,82	44,35
Total en acides gras monoinsaturés		624,40	69,77
Acides gras polyinsaturés	Acide linoléique	18,53 ± 0,71	2,06
	Acide linoléique	7,36 ± 0,28	0,82
Total en acides gras polyinsaturés		25,89	2,88
Total en acides gras		895,25	100
ω-6/ω-3		2,52	/

II-6 Teneur en composés polaires totaux

L'analyse des fractions polaires et non polaires de l'huile d'avocat extraite par chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP) (figure 48) présente un facteur de sélectivité de 40. Une bonne séparation en CCMHP doit présenter un facteur de sélectivité différent de 1. On peut donc conclure que la chromatographie sur mini-colonne a bien permis de séparer les fractions polaires des fractions non polaires. La teneur en composés polaires totaux dans l'huile d'avocat extraite a été de $8,06 \pm 2,94$ g/100g. Les composés

polaires résultent de l'hydrolyse et/ou de l'oxydation des triglycérides en leurs monomères et dimères d'acylglycérols libérant les acides gras. Ils représentent ainsi un bon indicateur de la comestibilité de l'huile, et leur valeur maximale admissible dans les huiles est de 25% (Firestone, 2007). Dans le cas présent, il représente les lipides polaires de l'huile d'avocat extraite. Par ailleurs, il est important de noter que la teneur en composés polaires totaux dans les huiles raffinées se situe entre 0,40 et 6,40 g/100g (Lumley, 1988). La teneur en composés polaires totaux trouvée dans cette étude est statistiquement identique ($t = 0,56$; $p = 0,67$) à la norme supérieure (6,40 g/100g). L'huile d'avocat dans cette étude n'étant pas raffinée, les composés polaires tels que les acides gras libres, les phospholipides, les glycolipides, les mono et diglycérides contribuent à sa forte polarité.



Légende. *H* : huile d'avocat, *NP* : fraction non polaire, *P* : fraction polaire.

Figure 48 : Chromatogramme en couche mince des composés polaires et non polaires extraits de l'huile d'avocat du cultivar *Lula*

II-7 Indices d'acide, de saponification et d'iode

Sur la base des teneurs en acides gras de l'huile d'avocat étudiée (tableau XXVII), il est possible de calculer l'indice de saponification théorique. L'indice de saponification théorique (187,37) est statistiquement identique ($t = 0,66$; $p = 0,63$) à la valeur expérimentale obtenue (224,4) et consignée dans le tableau XXVIII. Par ailleurs, en utilisant les teneurs en acides gras insaturés identifiées, l'indice d'iode théorique donne une valeur de 64. Cette

valeur théorique est statistiquement identique ($t = 7,05$; $p = 0,09$) à celle observée expérimentalement (75,19) et consignée dans le tableau XXVIII. La composition en acide gras est donc conforme aux indices d'iode et de saponification trouvés. Pour ce qui est de l'indice d'acide trouvé (1,72), il est statistiquement identique ($t = -2,82$; $p = 0,11$) à la valeur seuil recommandée pour une huile d'avocat vierge (≤ 2) (Woolf *et al.*, 2008). De plus, l'indice d'acide est inférieur ($t = -49,29$; $p = 0,00$) à la valeur admissible par le Codex Alimentarius (2001) pour une huile d'olive vierge de bonne qualité à savoir 6,6.

Les valeurs des indices trouvés sont en accord avec ceux de Pushkard *et al.* (2001), Kameni et Tchamo (2003), et Ikhuoria et Maliki (2007). La valeur d'indice d'acide trouvé par Moreno *et al.* (2003) avec l'extraction à l'acétone est plus élevée (2,84) comparée que celle de cette étude. Les autres méthodes (presse assistée de micro-ondes, hexane assisté de micro-ondes, hexane) ont des valeurs faibles comprises entre 0,14 et 0,65. Ceci laisse penser que la polarité du solvant aurait une influence sur l'indice d'acide. Plus le solvant d'extraction serait polaire, plus l'indice d'acide gras serait élevé.

A l'inverse, l'huile d'avocat extraite à l'acétone présente le plus faible indice de saponification (168) comparé à celle extraite à l'hexane assistée de micro-ondes (235) et à l'hexane (273) (Moreno *et al.*, 2003). L'indice de saponification étant inversement proportionnel au poids moléculaire de l'huile, ceci revient à dire que les huiles extraites aux solvants polaires sont plus denses que celles extraites à l'hexane. Cette forte densité serait attribuable à la forte teneur en insaponifiables dans les huiles extraites aux solvants apolaires.

Moreno *et al.* (2003) ont montré que l'indice d'iode varie en fonction de la méthode d'extraction. Ils étaient compris entre 82,10 et 94,80. Celui de cette étude est statistiquement identique ($t = -2,72$; $p = 0,22$) au seuil inférieur de la norme officielle mexicaine pour l'huile d'olive (NOM-F 109) qui est comprise entre 79,50 et 91. De plus, l'indice d'iode reste dans la

gamme admissible par le Codex Alimentarius (2001) pour une huile d'olive vierge de bonne qualité à savoir : 75 – 94.

Le degré d'impureté est de 0,76%, valeur inférieure à 1, ce qui suggère une faible quantité d'acides gras libres dans l'huile. On en déduit que les nouvelles conditions définies de l'extraction aqueuse n'ont pas accéléré la mise en place des réactions telles que l'hydrolyse et l'hydratation des esters et des molécules insaturées dans l'huile d'avocat.

Tableau XXVIII : Indices d'acide, de saponification et d'iode de l'huile d'avocat du cultivar *Lula* obtenus comparés à celles d'autres auteurs

Indicateurs	Valeurs	Pushkar <i>et al.</i> (2001), Kameni et Tchamo (2003), et Ikhuoria et Maliki (2007)
Indice d'acide	1,72 ± 0,17	1,23 – 4,50
Indice de saponification	224,40 ± 79,33	178,40 – 246,86
Indice d'iode	75,19 ± 2,44	42,66 – 86,60

II-8 Propriétés physiques

L'analyse colorimétrique de l'huile d'avocat extraite du cultivar *Lula* montre qu'elle a une couleur jaune verdâtre claire (tableau XXIX). La lutéine, un caroténoïde présent à 70% dans l'huile d'avocat, a une couleur jaune verdâtre (Lu *et al.*, 2005). Cette observation permet de dire que la lutéine est le caroténoïde le plus abondant dans l'huile d'avocat de cette étude. Par ailleurs, l'ajout de la pelure verte de l'avocat à la pulpe est une technique utilisée pour accroître la coloration vert caractéristique de l'huile d'avocat. Lorsque 100% de la pelure est ajoutée, la teneur en chlorophylle passe de 7,30 à 27,50 µg/g et la lutéine de 1,13 à 3,21 µg/g (Wong *et al.*, 2011).

Les températures de fusion et de cristallisation sont de bons indicateurs de la région d'origine des huiles alimentaires car elles sont liées à leur composition chimique (Dyszal et

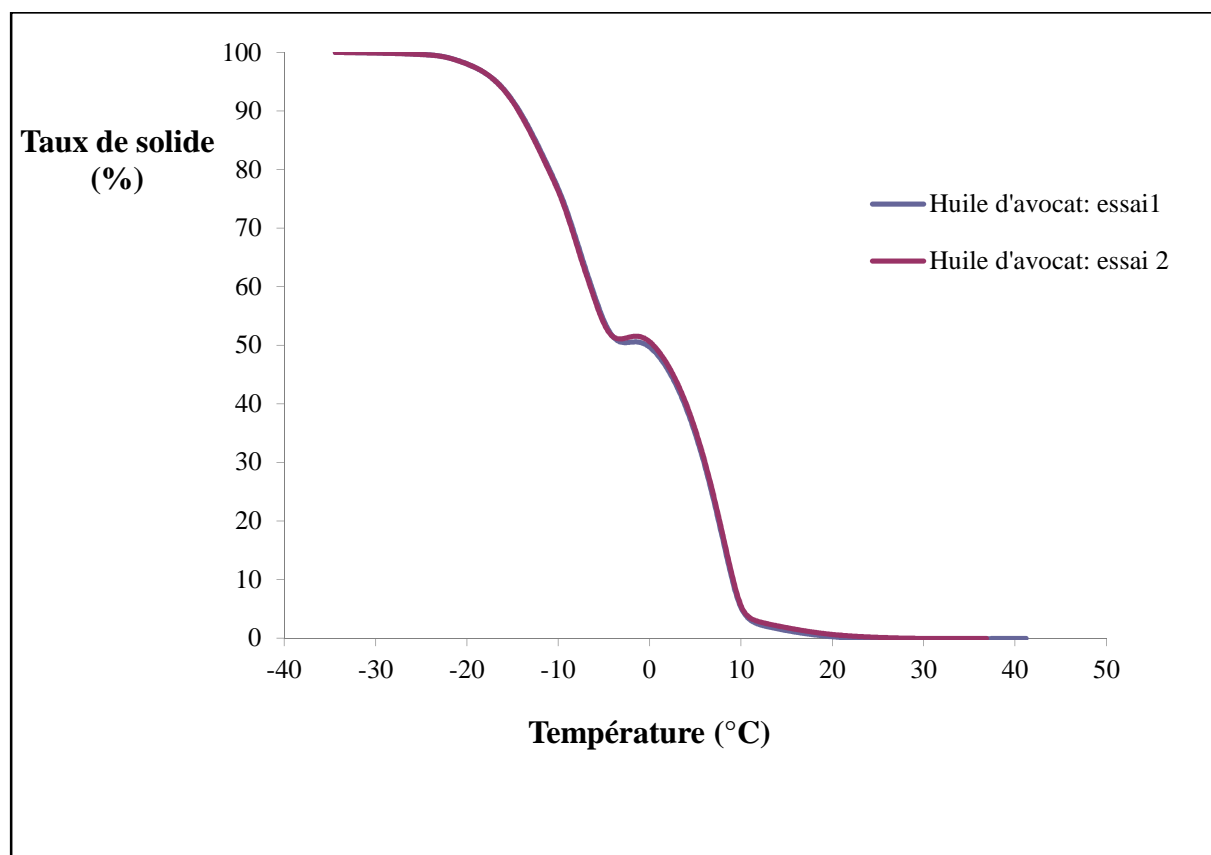
Petit, 1990). Elles sont également importantes pour les propriétés organoleptiques des produits faits à base d'huile alimentaire à savoir : la texture, la consistance et la palatabilité. La teneur en graisses solides contenues dans l'huile est responsable des températures de fusion et de cristallisation (Brekke, 1980).

La figure 49 montre l'évolution du taux de solide en fonction de la température dans l'huile d'avocat du cultivar *Lula*. On observe que la courbe est constante entre $-34,42^{\circ}\text{C}$ et $-29,59^{\circ}\text{C}$ pour un taux de solide de 99,9% ($\cong 100\%$), puis elle décroît de 99,9% à 50% pour une température de 0°C et y reste constante. Ensuite, elle décroît de 50% à 0,045% ($\cong 0\%$) à $23,78^{\circ}\text{C}$ et à partir de cette température elle demeure à 0%. Le premier plateau observé entre $-34,42^{\circ}\text{C}$ et $-29,59^{\circ}\text{C}$ correspond à la zone de cristallisation complète avec pour température de cristallisation de $-29,59^{\circ}\text{C}$. Le deuxième plateau (0°C) correspond à la zone où l'huile d'avocat possède 50% des lipides à l'état cristallisé et 50% à l'état liquide. Le dernier plateau ($\geq 23,78^{\circ}\text{C}$) correspond à la zone de fusion complète avec pour température de fusion de $23,78^{\circ}\text{C}$. La température de fusion trouvée dans cette étude ($23,78^{\circ}\text{C}$) est très éloignée de la gamme observée pour l'huile d'avocat ($31 - 33^{\circ}\text{C}$) par Akpabio *et al.* (2011). Ceci signifie une composition en matière grasse différente. Par ailleurs, La température de cristallisation de $-29,59^{\circ}\text{C}$ confirme l'idée selon laquelle on a affaire à une huile et non à une graisse végétale qui est connue pour être complètement solide à 15°C (A cette température, le taux de solide de l'huile d'avocat étudiée est de 1,52%).

La faible viscosité observée (0,07 Pa.s) est due au fait que la température de mesure (30°C) soit supérieure à la température de fusion de l'huile d'avocat étudiée ($23,78^{\circ}\text{C}$). En réalité, à 30°C , température de mesure, tous les lipides de l'huile sont sous forme liquide.

Tableau XXIX : Couleur et viscosité de l'huile d'avocat du cultivar *Lula*

Paramètres physiques		Valeurs
Couleur	L*	82,83 ± 0,34
	a*	-10,34 ± 0,18
	b*	40,29 ± 1,20
Viscosité apparente à 30°C (Pa.s)		0,07

**Figure 49** : Evolution du taux de solide de l'huile d'avocat du cultivar *Lula* en fonction de la température

III- Stabilité oxydative

III-1 Indices de peroxyde, para-anisidine et teneurs en sr-TBA, MDA, diènes et triènes conjugués

La valeur de l'indice de peroxyde dans l'huile d'avocat extraite (4,09 meqg/kg) (tableau XXX) conforte l'idée de la présence de produits d'oxydation telle que suggérée par

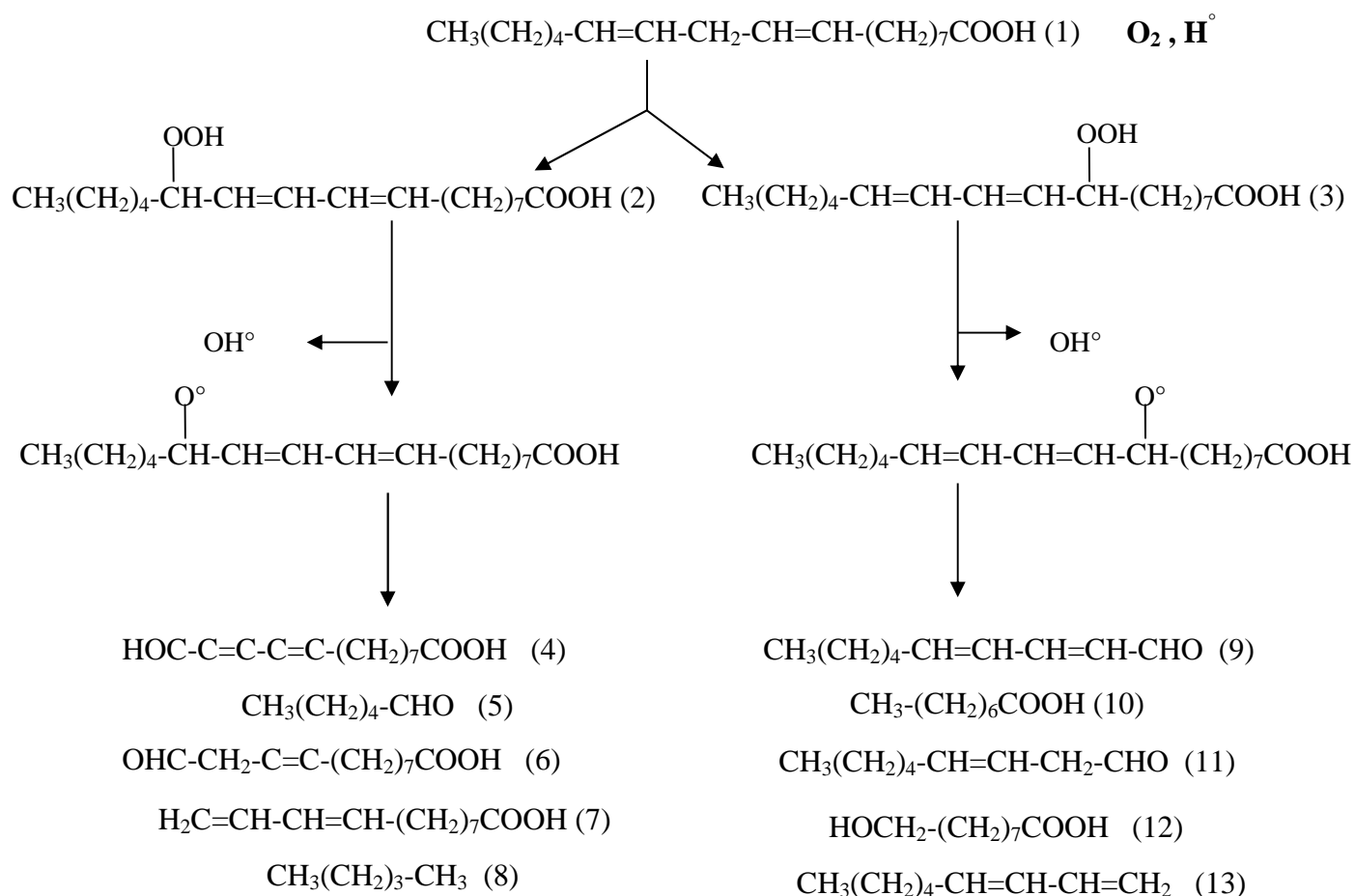
l'analyse spectrale dérivée seconde (Figure 44). La valeur de l'indice de peroxyde est en accord avec celles de Pushkard *et al.* (2001), Kameni et Tchamo (2003), et Ikhuoria et Maliki (2007), c'est à dire comprise entre 1,40 meqg/kg et 7,30 meqg/kg. Elle reste en dessous de la valeur limite admissible ($t = - 539,03$; $p = 0,001$) pour une huile alimentaire de bonne qualité à savoir : 20 meqg/kg d'huile (O'Connor *et al.*, 2007). De plus, la valeur de l'indice de peroxyde dans cette étude reste dans la gamme recommandée ($t = 3,13$; $p = 0,20$) pour une huile d'avocat extra-vierge, soit ≤ 4 meqg/kg. Une telle huile a une stabilité de 2 ans lorsqu'elle est conservée à température ambiante à l'abri de la lumière (Wong *et al.*, 2010).

Par ailleurs, les concentrations en diènes (3,28 $\mu\text{mol/g}$) confortent l'idée d'un pic enregistré à 235 nm par le spectre dérivé seconde (figure 44). Ainsi, par la présence de substitution ou de conjugaisons multiples, certains diènes absorberaient à des longueurs d'ondes plus grandes (passant de 233 nm à 235 nm) : c'est l'effet bathochrome. Les triènes conjugués sont inexistantes dans l'huile d'avocat de cette étude. Les concentrations en diènes ($t = - 7,41$; $p = 0,08$) sont comparables à celles du Codex Alimentarius (2001) pour l'huile d'olive vierge (3,50 $\mu\text{mol/g}$ pour les diènes). Ceci suggère qu'une peroxydation aurait eu lieu lors de l'extraction de l'huile d'avocat. Cette peroxydation a donné suite à la formation des composés secondaires (figure 50) identifiés par la mesure de la teneur en MDA (3,20 nmol/g), l'indice de para-anisidine (4,50) et la teneur en sr-TBA (0,12 meqg de MDA/g) (tableau XXX). La valeur de l'indice de para-anisidine (4,50) dans cette étude est identique ($t = - 0,71$; $p = 0,61$) à celle de Werman et Neeman (1986), soit 6. La teneur en sr-TBA (0,12 meqg de MDA/g) dans cette étude est supérieure ($t = 4,9$; $p = 0,04$) à celle de Beresategi *et al.* (2012), soit $0,12 \cdot 10^{-2}$ meqg de MDA/g. Par ailleurs, la teneur en MDA dans l'huile d'avocat étudiée est inférieure à celles de l'huile d'olive (2 mmol/g) et l'huile de tournesol (2,20 mmol/g) rapportées par Romojaro *et al.* (2013). Ceci suggère que l'oxydation n'a pas trouvé un terrain propice à sa réalisation dû à la faible teneur en acides gras polyinsaturés,

substrats de prédilection de l'oxydation. Les antioxydants dans l'huile d'avocat extraite tels que les caroténoïdes, les stérols et les tocophérols ont empêché la réaction radicalaire de se produire et/ou de se propager. Ces antioxydants agissent en neutralisant l'oxygène singulet nécessaire au processus d'initiation et aussi en donnant un atome d'hydrogène de leur fonction hydroxyle aux radicaux libres formés (Murcia *et al.*, 2001). Ainsi du point de vue oxydatif, l'huile d'avocat du cultivar *Lula* est de bonne qualité.

Tableau XXX : Indicateurs primaires et secondaires de l'oxydation de l'huile d'avocat du cultivar *Lula*

Indicateurs	Paramètres d'évaluation	Valeurs
primaires	Indice de peroxyde (meq d'oxygène actif/kg d'huile)	4,09 ± 0,03
	Concentration en diènes conjugués (µmol/g)	3,28 ± 0,03
	Concentration en triènes conjugués (µmol/g)	0,00
secondaires	Indice de para-anisidine	4,50 ± 2,12
	Teneur en sr-TBA (meqg de MDA/g)	0,12 ± 0,03
	Teneur en MDA (nmol/g)	3,20



Légende : (1) acide linoléique, (2) 13-hydroxyperoxyde de linoleate, (3) 9-hydroperoxyde de linoleate, (4) acide 13-hydroxytridecanoïque, (5) hexanal, (6) 12-hydroxydodécan-9-énoïque, (7) acide dodécane-9,11-diénoïque, (8) pentane, (9) acide décane-2,4-diénoïque, (10) acide octanoïque, (11) nonan-3-éanal, (12) acide 9-hydroxynonanoïque, (13) nonane-1,3-diène.

Figure 50 : Mécanisme de décomposition de l'acide linoléique en hydroperoxydes et en quelques composés secondaires d'oxydation (Choe et Min, 2006).

III-2 Altération de l'huile d'avocat à des hautes températures

L'analyse de variances (tableau XXXI) montre que tous les paramètres sont significatifs ($p < 0,01$). Le test de manque d'ajustement est non significatif ($p > 0,05$), ce qui montre qu'une équation de régression multiple rend bien compte du phénomène de thermodégradation. Les coefficients de détermination R^2 (0,98) et R^2 ajusté (0,97) témoignent également du fait que le modèle explique la relation qui lie la teneur en composés polaires à la température et au temps. La courbure observée dans la représentation de surface réponse conforte l'idée de l'adéquation d'un modèle du second degré (figure 53). Le nuage de points

de la figure 51 se répartit de manière presque uniforme autour de l'axe des abscisses. Ceci signifie que la variance des résidus est constante. Par ailleurs, le nuage de points du diagramme quantile - quantile s'ajuste approximativement bien autour de la droite (figure 52). Ceci signifie que les résidus suivent une distribution quasi-normale. Le test de Durbin-Watson s'avère non significatif (2,36 ; p = 0,34), donc les résidus ne sont pas corrélés. En somme, les hypothèses formulées sur les résidus pour un modèle linéaire sont respectées. Cette analyse a permis de dériver l'équation suivante :

$$\text{Teneur en composés polaires totaux (\%)} = 14,60 + 8,49*t + 14,77*T + 6,22*Tt + 3,86*t^2 + 10,05*T^2$$

Où t est le temps de chauffage et T est la température de chauffage.

Tableau XXXI : Significativité des paramètres et adéquation du modèle de thermodégradation

Paramètres	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	F	Probabilité
β_1	577,206	1	577,206	209,960	0,000*
β_2	1744,970	1	1744,97	634,750	0,000*
β_{11}	119,273	1	119,273	43,390	0,000*
β_{22}	809,106	1	809,106	56,390	0,000*
β_{12}	155,027	1	155,027	294,320	0,000*
Test de manque d'ajustement	35,580	3	11,860	4,310	0,0508
Erreur pure	19,243	7	2,749		

* Significatif au seuil de 0,05 ; F : rapport de Fisher

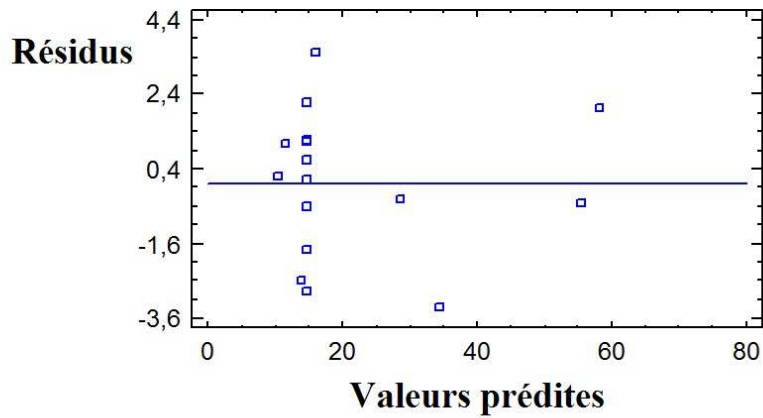


Figure 51 : Homoscédasticité des résidus pour la thermodégradation de l'huile d'avocat entre 120°C – 190°C

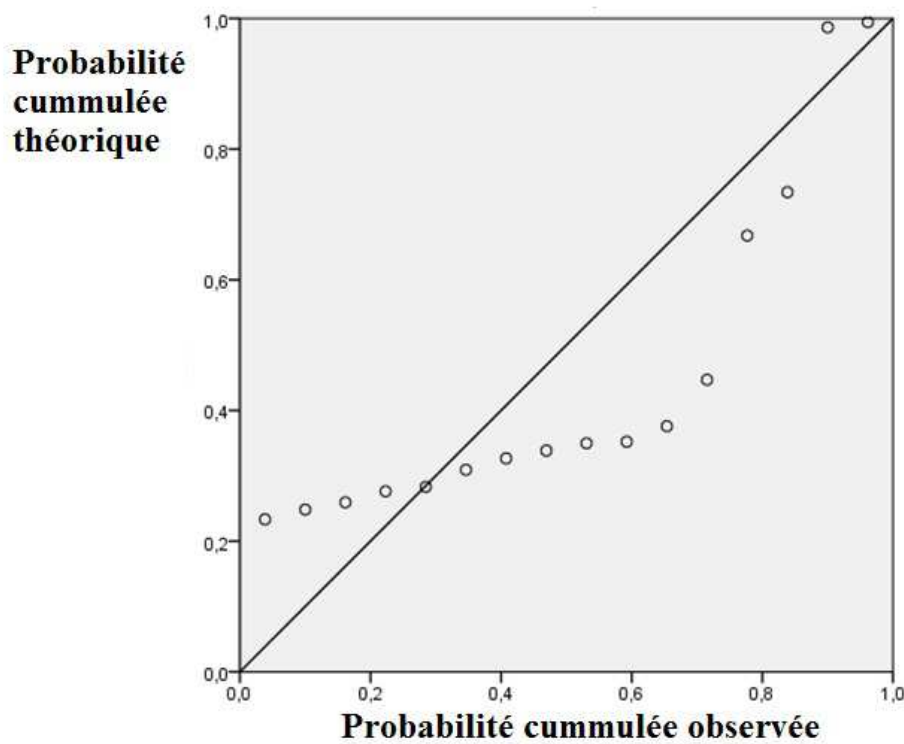


Figure 52 : Diagramme quantile – quantile des résidus standardisés de la thermodégradation de l'huile d'avocat entre 120°C – 190°C

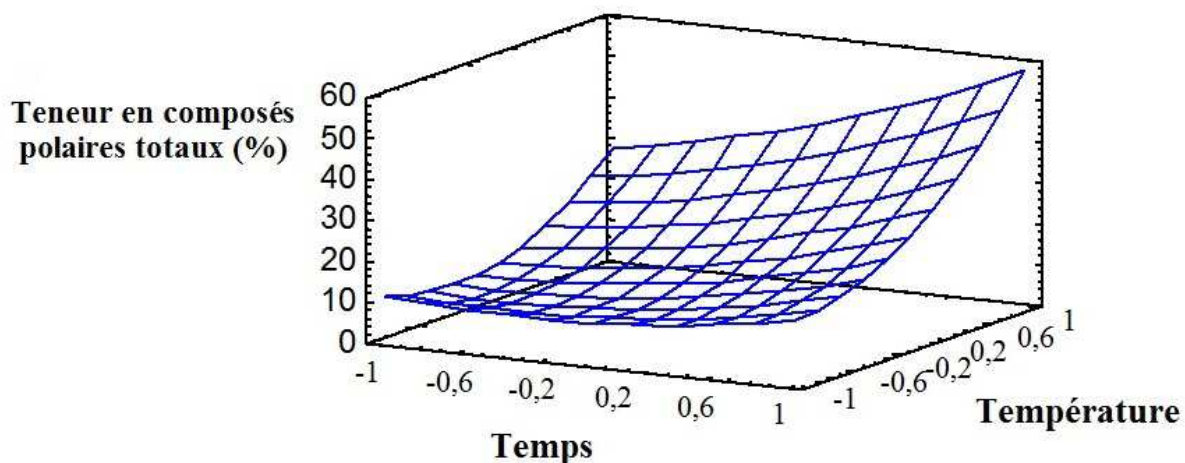


Figure 53 : Représentation graphique de la teneur en composés polaires totaux en fonction du temps et de la température.

D'après les paramètres de l'équation qui précède, on note que la température et le temps affectent positivement la détérioration de l'huile. La température a plus d'impact que le temps lors de l'oxydation de l'huile d'avocat ($14,77 > 8,49$). Cette linéarité positive sur les huiles végétales avait déjà été montrée par Guillén et Uriarte (2011) dans leur investigation du temps limite admissible au cours de la friture avec les huiles d'olive vierge, de tournesol et de lin. Ces auteurs ont également montré que plus l'huile est riche en acide oléique moins elle produit de composés polaires. L'inverse est vrai pour les huiles riches en acides linoléique et linoléique. Le temps a également été cité comme facteur clé lors de la prédiction du temps limite de friture de l'huile de tournesol par Farhoost et Tavassoli-Hafrani (2011). Une linéarité a été observée entre la teneur en composés polaires totaux et le temps.

Dans le but de déterminer les temps de chauffage maximal entre 120°C et 180°C , le seuil 25% pour la teneur en composés polaires dans l'huile a été utilisé et la prédiction a nécessité l'équation polynomiale développée plus haut. Les résultats sont consignés dans le tableau XXXII. On a noté que ce temps décroît quand la température augmente. Or on sait que l'auto-oxydation de l'huile croît avec la température (Rahmani et Csallani, 1998). On peut

ainsi en déduire que l'auto-oxydation y est prédominante comparée à l'oxydation à l'oxygène singulet, ce qui explique mieux les résultats obtenus.

La température de 180°C enregistre la plus faible durée de chauffage admissible. Or une étude menée par Beresategi *et al.* (2012) montre que l'huile d'avocat raffinée a la même stabilité thermique à 180°C comparée à l'huile d'olive et peut aller au-delà de 4,30 min. Ceci est compréhensible, lorsqu'on sait que ces auteurs ont rapporté une teneur en phytostérols faible (339,64 mg/100 g) comparée à celle de cette étude (610,39 mg/100g), et une plus forte teneur en vitamine E (245 µg/g) comparée à celle de cette étude (28,30 µg/g). Ce qui suppose que l'huile d'avocat extraite dans cette étude serait plus sensible à l'auto-oxydation que celle des auteurs précédents. L'huile d'avocat de cette étude peut être utilisée avec modération à des hautes températures pour des fritures.

Tableau XXXII : Prédiction des temps limites ($t_{25\%}$) pour obtenir 25% de composés polaires à différentes températures

Température (°C)	120	130	140	150	160	170	180
$t_{25\%}$ (min)	232,5	229,7	214,3	188,4	151,3	97,4	4,3

IV- Stabilité physique d'une émulsion à base d'huile d'avocat

IV-1 Distribution des tailles des gouttelettes

Pour des barèmes d'homogénéisation identiques, on a observé que les émulsions d'huiles de colza et d'avocat avaient des distributions de taille des gouttelettes monomodales et similaires (figure 54). Les diamètres en volume des gouttelettes des différentes émulsions d'huiles variaient entre 0,29 µm et 17,61 µm avec des maxima de 1,26 µm, 1,53 µm et 1,68 µm respectivement pour les émulsions d'huile d'avocat, d'huile de colza purifiée et d'huile de colza non purifiée. Pour une émulsion d'huile de colza similaire, Berton *et al.* (2011) ont

rapporté des valeurs proches (1,50 - 2 μm). Le diamètre moyen ($d_{4,3}$) est un indicateur à considérer dans la stabilité d'une émulsion. Plus petit est ce diamètre moyen, plus stable sera l'émulsion (Tharwat, 2009). Le $d_{4,3}$ de l'émulsion d'huile d'avocat (1,81 μm) est plus faible que ceux des émulsions d'huiles de colza ($d_{4,3} = 24,53 \mu\text{m}$). Cette différence indique que l'émulsion d'huile d'avocat serait plus stable que celle d'huile de colza du point de vue du diamètre moyen en volume ($d_{4,3}$) des gouttelettes.

Par ailleurs, l'émulsion d'huile d'avocat possède beaucoup plus de petites gouttelettes d'huile ($d(v, 0,1) = 0,64 \mu\text{m}$; $d(v, 0,5) = 1,41 \mu\text{m}$) comparée à l'émulsion d'huile de colza ($d(v, 0,1) = 0,85 \mu\text{m}$; $d(v, 0,5) = 4,76 \mu\text{m}$). Ceci suggérerait de nouveau une plus grande stabilité du point de vue des diamètres de gouttelettes. Rappelons que la $d(v, 0,1)$ et $d(v, 0,5)$ sont des diamètres en volume pour des percentiles de 10% et 50% respectivement.

Par ailleurs, l'ajout du dodecylsulfate de sodium (SDS) permet de mettre en évidence une éventuelle agrégation des gouttelettes. Comme les distributions de taille de gouttelettes de l'émulsion d'huile d'avocat sont similaires en présence et en absence de SDS (figure 55), on en conclut qu'il n'y a pas eu agrégation (floculation).

Ainsi, la méthode d'émulsification utilisée a permis d'obtenir de fines gouttelettes d'huile d'avocat dispersées dans la solution aqueuse avec des distributions de taille similaires à celles obtenues avec l'huile de colza.

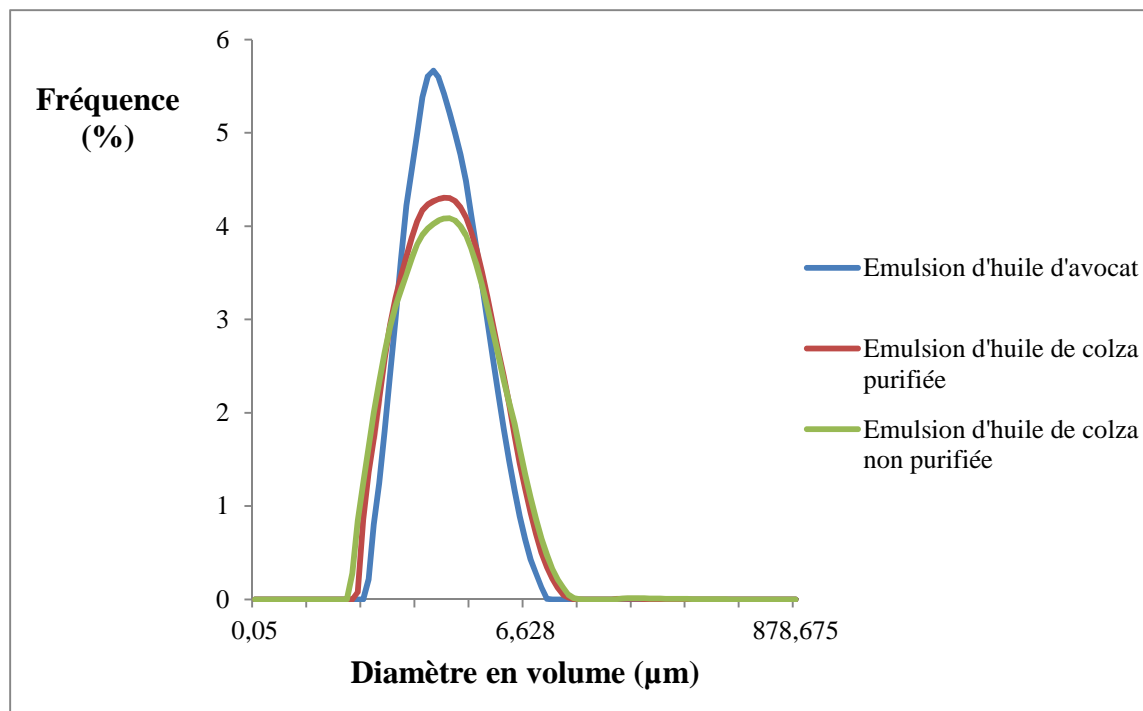


Figure 54 : Distribution de la taille des gouttelettes des émulsions d’huiles d’avocat et de colza (purifiée et non purifiée) fraîchement préparées

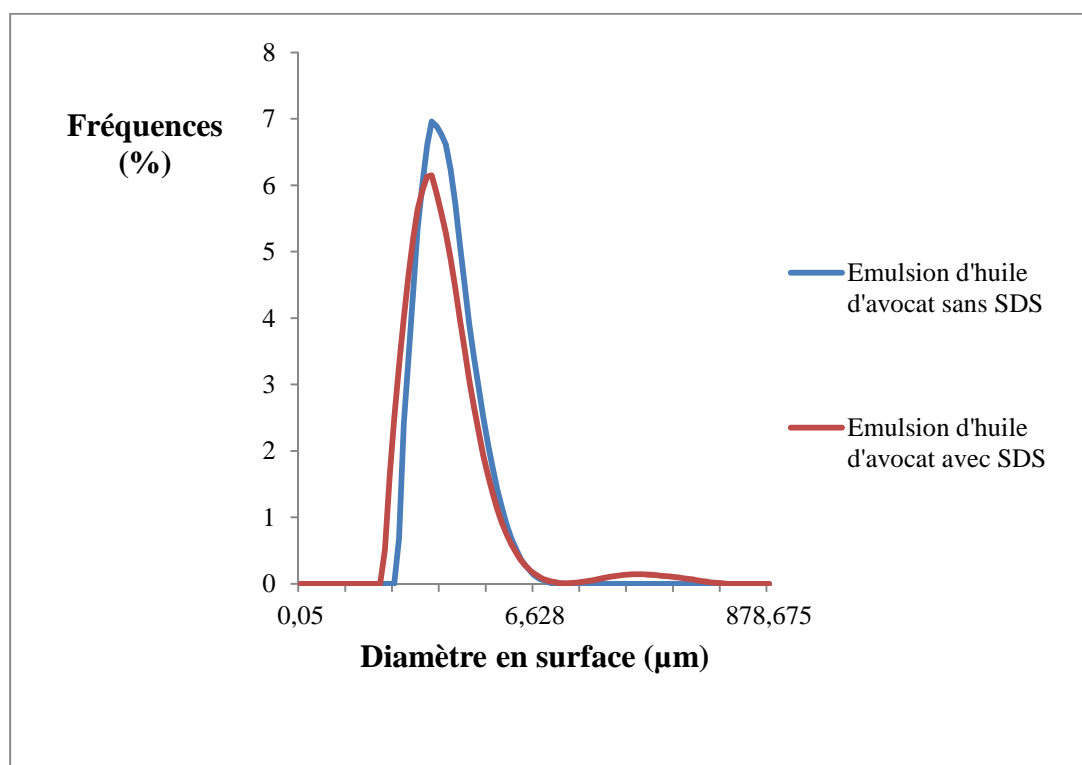


Figure 55 : Distribution de la taille des gouttelettes de l’émulsion d’huile d’avocat fraîchement préparées en présence et en absence de SDS.

IV-2 Distribution de la β -lactoglobuline dans les émulsions

L'évaluation de la teneur en β -lactoglobuline dans la phase aqueuse de l'émulsion fraîchement préparée à base d'huile d'avocat a donné une valeur de 4,47 g/L. Ainsi 89,40% de la protéine se trouvent dans la phase aqueuse et seulement 10,60% ont été adsorbés à l'interface des gouttelettes d'huile. A titre de comparaison, la concentration en protéines dans la phase aqueuse de l'émulsion d'huile de colza était d'environ 1,60 g/L, ce qui représente près de 70 % des protéines présentes dans l'émulsion adsorbés à l'interface. Une proportion d'absorption à l'interface presque similaire (67,20%) de la β -lactoglobuline dans une émulsion d'huile de colza a été décrite par Berton *et al.* (2011). Par ailleurs, une fluorescence maximale, due à la β -lactoglobuline, des émulsions d'huiles de colza et d'avocat a été émise à 329 nm après excitation des émulsions à 290 nm (figures 56, 57 et 58). A la longueur d'onde d'émission de 329 nm, 83,34% de la fluorescence sont enregistrées dans la phase aqueuse de l'émulsion d'huile d'avocat pour seulement 23,10% dans celle d'huile de colza non purifiée et 21,98% dans celle d'huile de colza purifiée. Ce qui confirme la faible absorption de la β -lactoglobuline dans l'émulsion d'huile d'avocat comparée à celles des huiles de colza.

Cette faible adsorption de la β -lactoglobuline à l'interface de l'émulsion d'huile d'avocat suggère que des tensio-actifs (acides gras libres, phospholipides, mono et diglycérides) présents dans l'huile d'avocat s'adsorbent préférentiellement à l'interface au détriment de la protéine. Cette fixation défavorable de la β -lactoglobuline dans les émulsions huile dans l'eau en présence d'un mélange de phospholipides avait déjà été rapportée par Wanninge *et al.* (2005). En effet, les tensio-actifs ont une plus grande activité de surface que les émulsifiants macromoléculaires (protéines et polysaccharides) et ainsi une facilité à provoquer leur désorption à l'interface (Genot *et al.*, 2013). Cette facilité de désorption de la β -lactoglobuline croît avec la concentration en tensio-actifs (Wilde *et al.*, 2004).

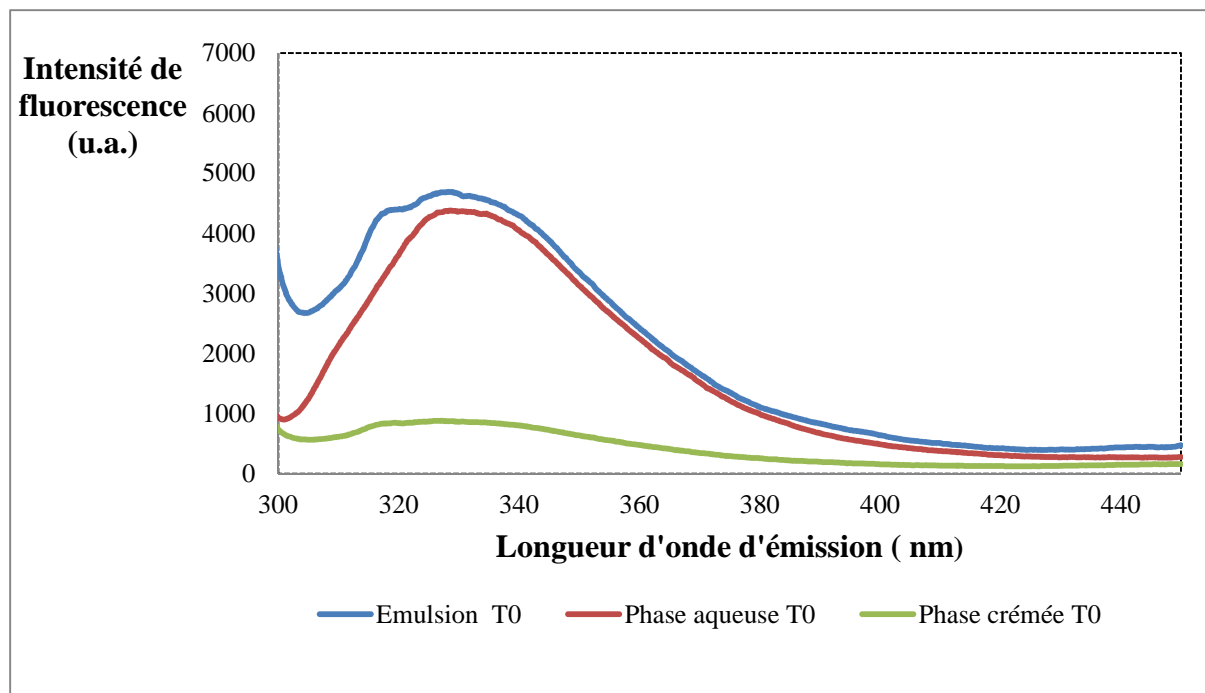


Figure 56 : Spectres d'émission de l'émulsion d'huile d'avocat fraîchement préparée, et des phases aqueuse et crémée préparées à partir de la même émulsion.

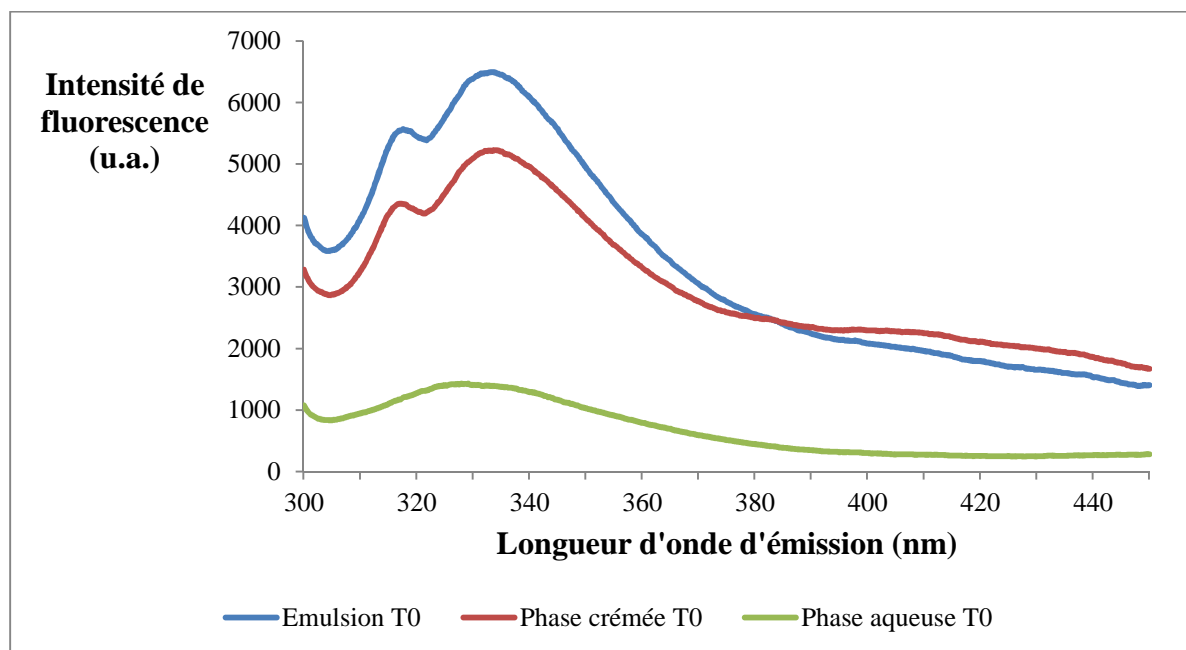


Figure 57 : Spectres d'émission de l'émulsion d'huile de colza purifiée fraîchement préparée, et des phases aqueuse et crémée préparées à partir de la même émulsion.

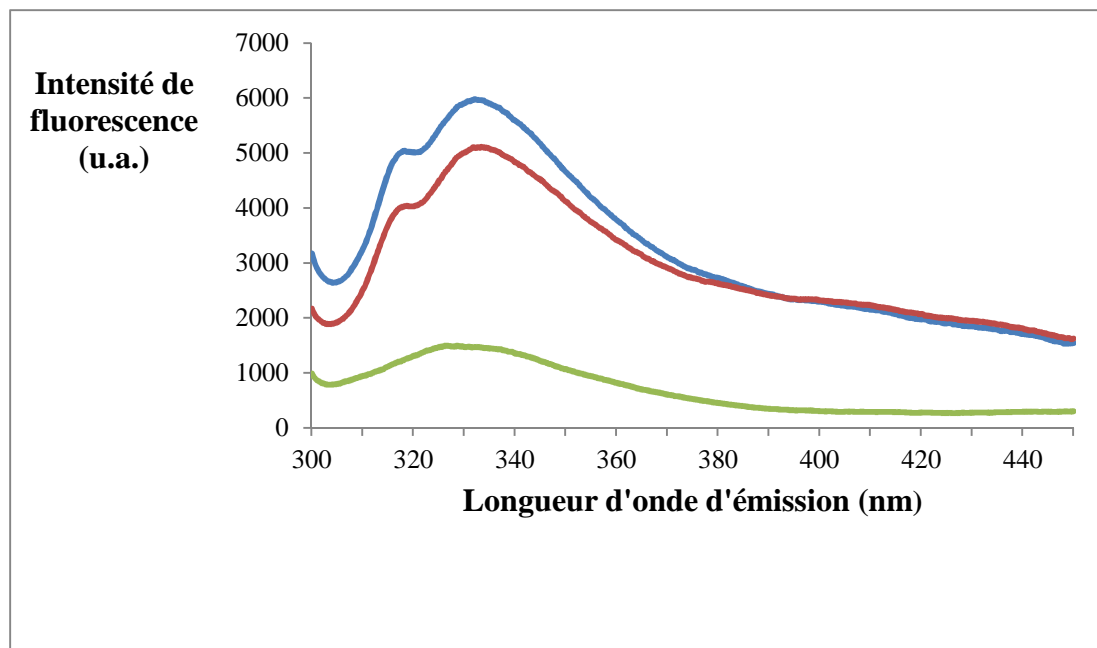


Figure 58 : Spectres d'émission de l'émulsion d'huile de colza non purifiée fraîchement préparée, et des phases aqueuse et crémée préparées à partir de la même émulsion.

IV-3 Cinétique de déstabilisation par examen visuel et imagerie

Après la réalisation des émulsions à base d'huiles de colza et d'avocat, on note qu'à $t=0$ les mélanges sont quasiment homogènes (figure 59). Après 24 heures d'incubation à 4°C (figure 60), un crémage partiel est observé dans l'émulsion d'huile d'avocat. Ceci semble s'accroître après 48 heures d'incubation (figure 61). A l'opposé, une stabilité apparente de l'émulsion d'huile de colza est observée après 24 heures et 48 heures (figures 59, 60 et 61).



Figure 59 : Présentation de 2 émulsions d’huiles d’avocat (jaunâtre à gauche) et une émulsion d’huile de colza (blanchâtre à droite) fraîchement préparées.

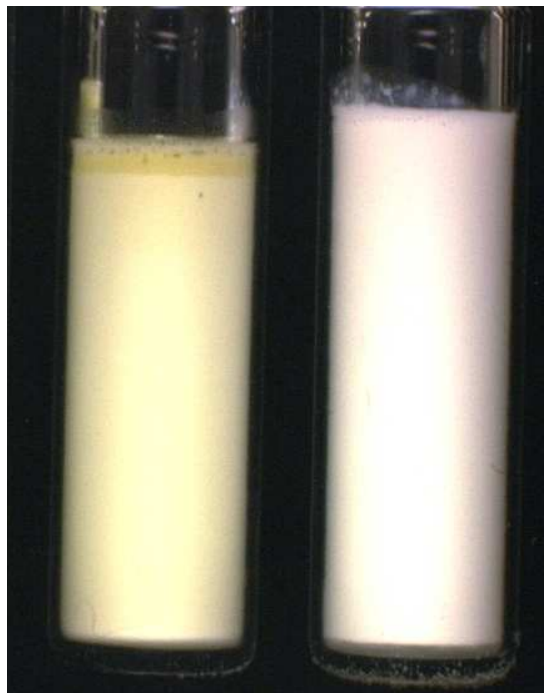


Figure 60 : Présentation de 2 émulsions d’huiles d’avocat (jaunâtre à gauche) et une émulsion d’huile de colza (blanc à droite) après 24 h d’incubation



Figure 61 : Présentation de 2 émulsions d’huiles d’avocat (jaunâtre à gauche) et une émulsion d’huile de colza (blanchâtre à droite) après 40 h d’incubation

Juste après la réalisation des émulsions à base d’huiles de colza et d’avocat, les mélanges sont tous homogènes par appréciation visuelle (figure 59). Ceci signifie que l’huile d’avocat comme l’huile de colza s’émulsifient bien. Après analyse par imagerie des émulsions d’huile d’avocat, on observe que l’intensité du gris au fond du tube (1) au départ est de 85 u.a., puis elle passe à 59 u.a. après 10 heures, ensuite à 39 u.a. après 24 heures et enfin à 34 u.a. après 40 heures (figure 62). Une décroissance similaire est observée pour l’émulsion d’huile de colza dont l’intensité du gris du fond du tube passe de 71 u.a. à 29 u.a. (figure 63). Ces diminutions progressives de l’intensité du gris du fond du tube traduisent une remontée progressive des gouttelettes d’huile plus marquée dans l’émulsion d’huile de colza. Cette différence se note de moins en moins lorsqu’on se rapproche du haut du tube parce que le front du crémage se déplace progressivement vers le bas du tube.

L’analyse de la cinétique de crémage à 25°C des émulsions d’huiles de colza et d’avocat au fond du tube (figure 64) montre que le pourcentage de crémage (1,25%) reste

constant dans l'émulsion d'huile d'avocat tout au long des 42 heures. Dans celle d'huile de colza, il croît progressivement de 0 à 28 heures, puis il amorce une croissance rapide jusqu'à atteindre une valeur de 5,59% après 42 heures.

Selon la loi de Stokes, la vitesse de crémage est proportionnelle à la taille des gouttelettes et inversement proportionnelle à la viscosité (Wilke et Chang, 1955) :

$$V = \frac{2(\rho_d - \rho_c) \cdot g \cdot R^2}{9\eta_c}$$

Où ρ_d et ρ_c sont les masses volumiques des phases dispersée et continue respectivement, g est l'accélération de la pesanteur, R le rayon des gouttelettes, η_c la viscosité de la phase continue et V la vitesse de crémage.

La vitesse de crémage peut donc être affectée par la taille des gouttelettes, la masse volumique des huiles et la viscosité de la phase continue. Or, comme les émulsions d'huiles d'avocat et de colza présentaient la même masse volumique de la phase dispersée (0,92 g/mL), les facteurs intervenant ici sont la taille des gouttelettes et la viscosité. La présence de plus petites gouttelettes au fond du tube dans l'émulsion d'huile d'avocat pourrait expliquer la faible remontée des gouttelettes d'huile comparée à celle de l'huile de colza. Par ailleurs, la différence de viscosité entre la phase aqueuse de l'émulsion d'huile d'avocat et celle d'huile de colza serait également incriminée dans cette différence de remontée des gouttelettes. La présence importante de protéines (β -lactoglobuline) dans la phase aqueuse de l'émulsion d'huile d'avocat comparée à celle de l'émulsion d'huile de colza augmenterait la viscosité de la phase aqueuse de l'émulsion d'huile d'avocat et réduirait ainsi la vitesse de crémage.

Lorsque les deux émulsions sont portées à 40°C (figure 65) après avoir séjourné pendant 48 heures à 25°C, le pourcentage de crémage dans l'émulsion d'huile d'avocat passe

brutalement de 1,3% à 69,75% après 84,4 heures pour rester constant après 120,4 heures. Par contre, le pourcentage de crémage n'est que de 6,4% dans l'émulsion d'huile de colza après 84,4 heures. Un crémage brutal n'est noté qu'après 87,4 heures (54,04%) puis progresse lentement pour atteindre un pourcentage de crémage de 69,75% après 115,4 heures. Ceci suggère une coalescence plus rapide des gouttelettes d'huile d'avocat comparée à celles des gouttelettes d'huile de colza qui induirait une plus grande vitesse de crémage de l'émulsion d'huile d'avocat comparée à celle d'huile de colza pour une durée de temps plus longue. Cette coalescence serait à l'origine de la couche d'huile observée à l'examen visuel.

L'adsorption défavorisée de la β -lactoglobuline, due à la présence des tensio-actifs interne à l'huile d'avocat, n'affecte pas forcément de manière négative la stabilité globale du système. On se rend compte que le crémage dans les deux émulsions ne présente que de légère différence. De plus, La production de certains aliments implique une déstabilisation contrôlée de l'émulsion lors du procédé de fabrication. C'est le cas de la production de crèmes glacées qui s'obtiennent par coalescence partielle lors de la formation de cristaux de glace (Ho et Chow, 2002). L'émulsion d'huile d'avocat pourrait donc être utilisée dans la production de crèmes glacées.

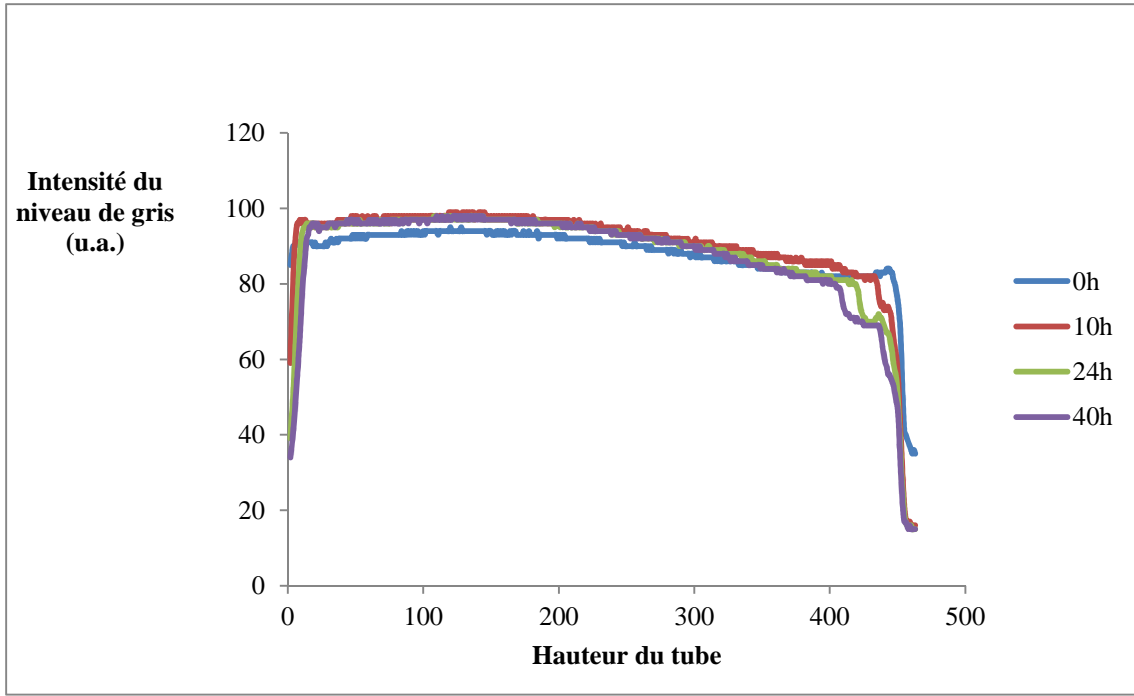


Figure 62 : Evolution des niveaux de gris pour une émulsion d'huile d'avocat à partir du fond du tube.

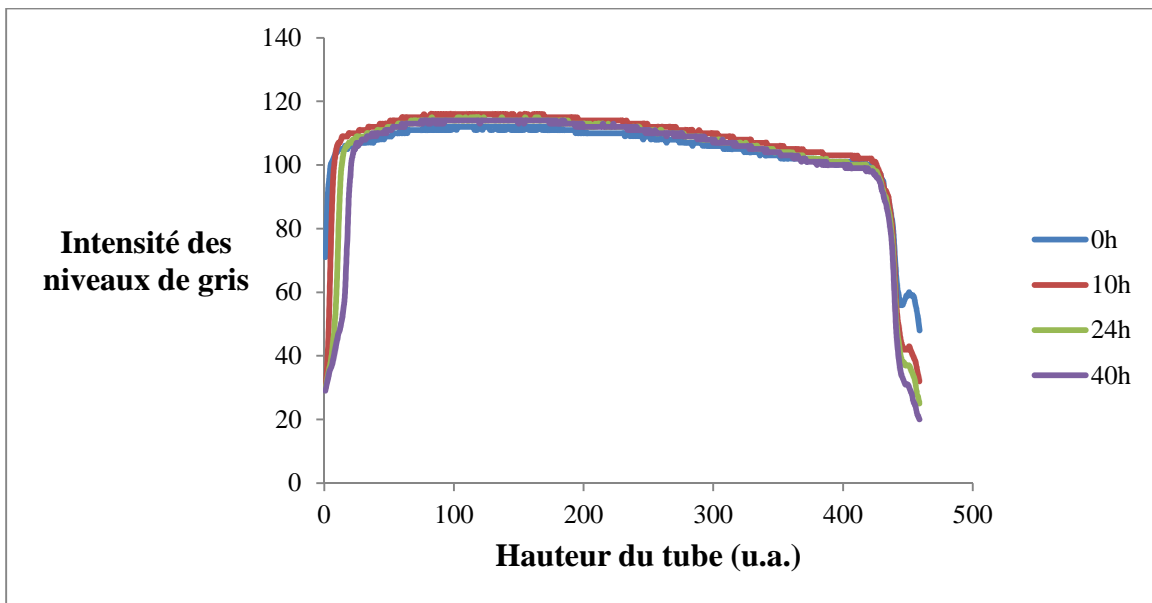


Figure 63 : Evolution des niveaux de gris pour une émulsion d'huile de colza à partir du fond du tube.

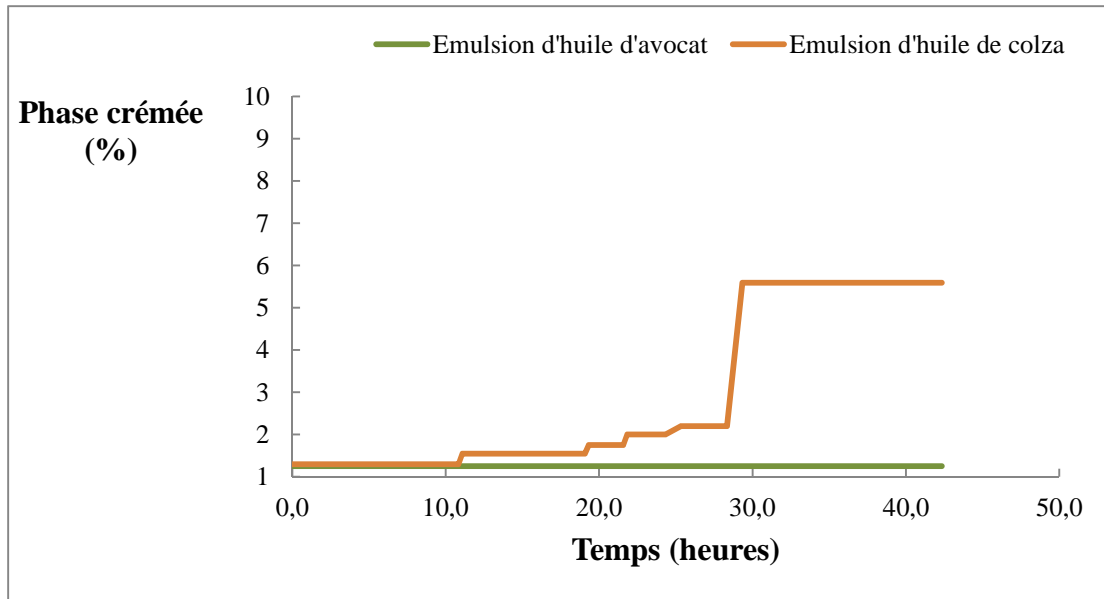


Figure 64 : Cinétique de crémage à 25°C pour des émulsions d'huiles d'avocat et colza

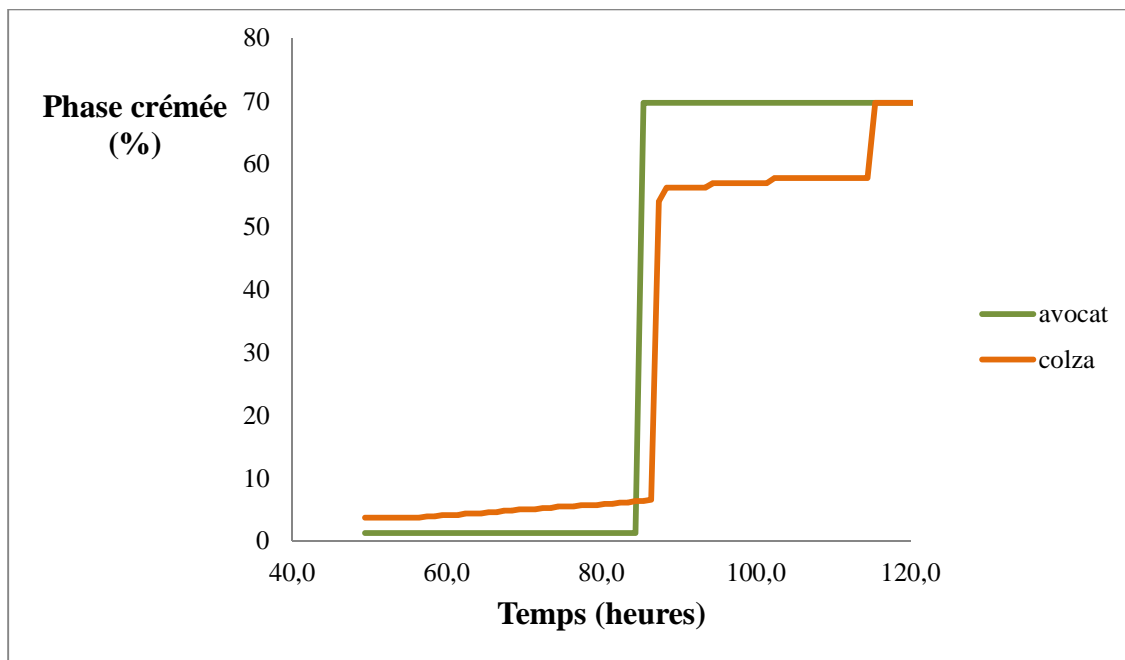


Figure 65 : Cinétique de crémage dans des conditions accélérées (40°C) pour des émulsions d'huiles d'avocat et colza

**CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSIONS

L'objectif de ce travail était de définir les conditions optimales d'extraction de l'huile de 5 cultivars d'avocat et de déterminer quelques propriétés physicochimiques et fonctionnelles. Il en découle les conclusions suivantes :

- ❖ **Les conditions optimales d'extraction de l'huile d'avocat**, qui sont: température (45°C), pH (4,5), temps (180 min) et ratio eau/pulpe (6 (m/m)).
- ❖ **Les propriétés physicochimiques :**
 - Les huiles d'avocat présentent d'énormes similitudes spectrales dans la gamme 1157 - 1165 cm^{-1} et le domaine spectral des esters carboxyliques (1690 – 1790 cm^{-1}) permet de mieux les classer. L'huile d'avocat, peu fluorescente, absorbe davantage dans l'ultraviolet que dans le visible où on enregistre des pics caractéristiques des polyphénols, caroténoïdes et des chlorophylles ;
 - La composition physicochimique de l'huile d'avocat n'est pas affectée lors de l'extraction exception faite des tocophérols dont la teneur (28,4 mg/kg) est faible par rapport aux valeurs recommandées pour l'huile d'avocat extra-vierge ;
- ❖ **L'huile d'avocat extraite présente une stabilité oxydative** dont témoignent les indicateurs primaires et secondaires avec possibilité d'utilisation à des hautes températures;
- ❖ **L'émulsion d'huile d'avocat** est partiellement stable en raison de la désorption de la β -lactoglobuline à l'interface probablement par les tensio-actifs dans l'huile d'avocat d'une part et de la coalescence des gouttelettes d'huile d'autre part.

En somme, les conditions optimales d'extraction des huiles des 5 cultivars d'avocat ont pu être définies et associées à des propriétés physicochimiques spécifiques. De par ces caractéristiques physicochimiques et fonctionnelles, l'huile d'avocat constitue ainsi une excellente alternative pour la réduction des pertes *post-récoltes* liées à l'avocat.

PERSPECTIVES

Pour la suite du travail, nous nous proposons de :

- ❖ Déterminer les conditions idéales d'extraction aqueuse des autres cultivars d'avocat rencontrés au Cameroun ;
- ❖ D'évaluer la durée de conservation de l'huile d'avocat extraite ;
- ❖ Déterminer les tensio-actifs présents dans l'huile d'avocat qui provoquent la désorption de la β -lactoglobuline à l'interface de l'émulsion ;
- ❖ Conduire une étude pilote sur l'extraction aqueuse de l'huile d'avocat à petite échelle.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aboubakar D. A.K., Sorto M., Woin N., Sali B., Gandebe M., Abdelkerim T., Essang M. Savanes africaines en développement: innover pour durer : Filières fruitières dans les savanes du Cameroun et du Tchad, version 1, 20 au 23 avril 2009, Garoua, Pôle Régional de Recherche appliquée en Développement des Systèmes agricoles d'Afrique Centrale (PRASAC). [S.l.]: CIRAD, Centre de Coopération internationale en Recherche agronomique pour le Développement, 00471165. (2010).
- Achaya K. T. Ghani: a traditional method of oil processing in India. *Food, Nutrition and Agriculture*, 11, 23-28. (1994).
- Adama K. K., Edoga M. O. Avocado apple (*Persea americana*) pericarp waste: A source of oil for industrial application obtained and characterized using extraction with different solvents. *Archives of Applied Science Research*, 3 (4), 398-410. (2011).
- Aderemi O.M., Umar G.M. Extraction and characterization of oil from Lima beans using 23 full factorial designs. *Assumption University Journal of Technology*, 12, 86-91. (2008).
- AFNOR. Association Française de Normalisation. Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés. In : Recueil de normes françaises. 2ème éd. Paris : AFNOR, 438p. (1981).
- Ahmadi M., Zahedi Gh., Karimi F. Application of response surface methodology for the optimization of aqueous enzymatic extraction of Pistacia Khinjuk oil. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 3, 1 – 10. (2013).
- Aidos I., Lourenco S., van der Padt A., Luten J. B., Boom R. M. Stability of crude herring oil produced from fresh byproducts: influence of temperature during storage. *Journal of Food Science*, 67, 3314–3320. (2002).
- Akinoso R., Onsurinade O. A. Mass transfer during oil extraction from Palm kernel, cocoa and groundnut. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 7 (4), 326 – 330. (2012).
- Akoh C.C., Min D.B. Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology, CRC Press. (2008).
- Akpabio U. D., Akpakpan A. E., Matthew I. E., Akpan A. U. Extraction and characterization of oil from avocado pear (*Persea americana*) and native pear (*Dacryodes edulis*) fruits. *World Journal of Applied Science and Technology*, 3 (2), 27 – 34. (2011).
- Alvarez A.M.R., Rodriguez M.L.G. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites*, 51 (1-2), 74 – 96. (2000).
- AOAC. Method 2000.10. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. In: Official Methods of Analysis. 17th ed., Gaithersburg: AOAC. (2000).
- AOAC. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. In: Official methods of analysis. 13th ed. (William Horwitz ed.). Washington: AOAC, 7, 56 – 132. (1980).

- AOCS. Method Cc 3-25. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 3rd ed. [S.l.]: AOCS, Champlain III. (1988).
- AOCS. Methods Cd 19-90. 2-Thiobarbituric acid value. Direct method. In: Official Method and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 5th ed (D. Firestone, ed.). [S.l.]: AOCS, Champlain, III. (1998).
- AOCS. Methods Ce 1b-89 and Ce 2-66. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th ed (V.C.Mehlenbacher, T.H. Hopper, E.M., Sallee, W.E. Link, R.O. Walker, R.C. Walker, and D. Firestone, Eds.). [S.l.]: AOCS, Champlain, III. (1989).
- AOCS. Official methods and recommended Practices. In : Official methods of analysis . 4th ed. (D. Firestone, ed.). Illinois : AOCS, Champlain, III. (1987).
- Ariza-Ortega J. A., Mendez-Ramos M. G., Diaz-Reyes J., Delgado-Macuil R. J., Robles-de-la-Torre R. R. Study by Fourier transform infrared spectroscopy of avocado oils of the varieties Hass, Criollo et Fuerte. *Journal of Materials Science and Engineering*, 4 (5), 67 – 73. (2010).
- Ariza-Ortega J. A., Robles López M. R., De La Torre R. R. R. Effect of electric field treatment on avocado oil. *International Journal of Research In Agriculture and Food Sciences*, 1 (1), 13-22. (2013).
- Arpaia M., Jacman C.R., Woolf A., White A., Thompson J.F., Slaughter D.S. Avocado postharvest quality. Proc. California Avocado Research Symposium, 143-155. (2006).
- Bae E.K., Lee S.J. Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation*, 25(8), 549–560. (2008).
- Baeyens W.R.G., De Keukeleire D., Korkidis K. Luminescence techniques in chemical and biochemical analysis, Marcel Dekker, Inc. New York. (1991).
- Bargale P. C. Mechanical oil expression from selected oilseeds under uniaxial compression. Thèse de Doctorat/PhD, Université de Saskatchewan, Canada. (1997).
- Benichou A., Garti N. Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1-3), 93-123. (2002).
- Benoit L. Apports des insaponifiables d'huiles d'avocat et de soja dans le traitement complémentaire des maladies parodontales. Thèse doctorale en Chirurgie-dentaire. Université d'Auvergne Clermont-Ferrand I, France. 45p. (2004).
- Berasategi I., Barriuso B., Ansorena D., Astiasarán I. Stability of avocado oil during heating: Comparative study to olive oil. *Food Chemistry*, 132, 439–446. (2012).
- Berges A., Jones P., Qbumweis S. Plant sterols : factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease*, 3 (1), 5. (2004).

- Bernardo-Gil M.G., Grenha J., Santos J. et Cardoso P. Supercritical fluid extraction and characterisation of oil from hazelnut. *European Food Research and Technology*, 104 (7), 402-409. (2002).
- Berton C., Genot C., Ropers M-H. Quantification of unadsorbed protein and surfactant emulsifiers in oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 354, 739–748. (2011).
- Bertrand D., Courcoux P. et Qannari El M. « Méthodes exploratoires » dans « la spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques », coordonnateurs Bertrand D. et Dufour E. Tec & Doc, Lavoisier. Paris, 261-266. (2000).
- Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S., Escaleira L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry: A review. *Talanta*, 76, 965–977. (2008).
- Bizimana V., Breene W.M., Csallany A.S. Avocado oil extraction with appropriate technology for developing countries. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 70, 821-822. (1993).
- Botha B.M. Supercritical fluid extraction of avocado oil. South African Avocado Growers' Association Yearbook, 27, 24-27. (2008).
- Bradley N. The response surface methodology. Thèse de Master en Mathématiques, Indiana University South Bend, USA. 84p. (2007).
- Brekke L.O. Food uses of soybean oil. In: Erikson DR, Pryde EH, Brekke OL, Monts TL, Falb RA (eds) Handbook of soy oil processing. [S.l.]: American Soybean Association and AOCS, Champlain, USA, pp.396. (1980).
- Brodnjak-Voncina D., Kodba Z.C., Novic N. Multivariate data analysis in classification of vegetable oils characterized by the content of fatty acids. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 75 (1), 31-43. (2005).
- Buenrostro M., Lopez-Munguia C.A. Enzymatic extraction of avocado oil. *Biotechnology Letters*, 8, 505-506. (1986).
- Buttris J.L., Diplock A.T. High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. *Methods in Enzymology*, 105, 131-138. (1984).
- Camel V. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurised fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126, 1182-1193. (2001).
- Cerretani L., Bendini A., Rotondi A., Lercker G. & Gallina Toschi T. Analytical comparison of monovarietal virgin olive oils obtained by both a continuous industrial plant and a low-scale mill. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107, 93-100. (2005).
- Cerretani L., Lerma-Garcia M. J., Herrero-Martinez J. M., Gallina-Toschi T. et Simo-Alfonso E. F. Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils by nanoliquid chromatography with ultraviolet-visible detection using a silica monolithic column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 757 – 761. (2010).

- Chen B.K., Diosady L.L. Enzymatic aqueous processing of coconuts. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 1 (1), 55-61. (2003).
- Chiavaro E., Vittadini E., Maria Rodriguez-Estrada T., Cerretani L., Bendini A. Differential scanning calorimeter application to the detection of refined hazelnut oil in extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, 110, 248–256. (2008).
- Choe E., Min David B. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation: Comprehensive Reviews. *Food Science and Food Safety*, (5), 169 – 185. (2006).
- Codex Alimentarius. Fats, oils and related products (CODEX STAN 33 – 1981). 2nd Ed. Rome : FAO et OMS, 8, 81p. (2001).
- Combs G.F., Jr. Vitamin E, in *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition & Health*, Academic Press Inc., San Diego, 179-203. (1992).
- Commission Internationale de l’Eclairage (CIE). 1976. *Encyclopedia Universalis*. Consulté le 12 Octobre 2014 à 11 h 01 min. Disponible à l’adresse: www.universalis/encyclopedie/colorimetrie/#i_36343
- Corongiu F. P. & Banni S. Detection of conjugated dienes by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *Methods in Enzymology*, 233, 303-310. (1994).
- Corsoa M.P., Fagundes-Klena M.R., Silvaa E.A., Filhob L.C., Santosc J.N., Freitasc L.S., Darivac C. Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 52(1), 56-61. (2010).
- Cumming K., Schroeder C.A. *Year book California Avocado Society*. 57. (1942).
- De la Mata P., Dominguez-Vidal A., Bosque-Sendra J. M., Ruiz-Medina A., Cuadros-Rodríguez L., Ayora-Cañada M. J. Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics. *Food Control*, 23, 449 – 455. (2012).
- De Oliveira A. P., de Souza F. E., Barreto R. R., Cordeiro D. P., de Melo R. G., de Aquino C. M. F., Silva A. A. R., de Medeiros P. L., da Silva T. G., da Silva Góes A. J., de Sousa M. M. B. Effect of Semisolid Formulation of *Persea Americana* Mill (Avocado) Oil on Wound Healing in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8p. (2013).
- Dean H.K. *Utilising of Fats*, A Harvey, London/2141. (1938).
- Del Castillo E., Fan S.K., Semple J. Optimization of dual response systems: a comprehensive procedure for degenerate and nondegenerate problems. *European Journal of Operational Research*, 112, 174–186. (1999).
- Deng C., Yao N., Wang A., Zhang X. Determination of essential oil in a traditional Chinese medicine, *Fructus amomi* by pressurized hot water extraction followed by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 536, 237-244. (2005).

- Derringer G, Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12, 214–219. (1980).
- Dickinson E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food Hydrocolloids*, 17 (1), 25-39. (2003).
- Dirección General de Normas, NOM-F-109-1982.
- Dobarganes M.C., Velasco J., Dieffenbacher A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols and diacylglycerols in oils and fats. *Pure and Applied Chemistry*, 72, 1563 – 1575. (2000).
- Dos Santos M. A. Z., Alicieo T. V. R., Pereira C. M. P., Ramis-Ramos G., Mendonça C. R. B. Profile of bioactive compounds in avocado pulp Oil: Influence of the drying. processes and extraction methods. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 91, 19–27. (2014).
- Ducelier D. The growing pattern of ten cultivars of avocado in West Cameroon. *Fruits*, 44 (2), 81 – 90. (1989).
- Dunteman G. H. Principal Components Analysis. Sage Publications, City. (1989).
- Dupuy N., Duponchel L., Huvenne J. P., Sombret B. et Legrand P. Classification of edible fats and oils by principal component analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry*, 51 (2), 245-251. (1996).
- Durga Karthik, Vijayarekha K., Manickkam V. A simple method for detecting adulteration in sunflower oil using chemometry. *Rasayan Journal of Chemistry*, 7 (1), 99 – 103. (2014).
- Dyszal S.M., Pettit B.C. Determination of the country origin of Pistachio nuts by DSC and HPLC. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 67, 947–951. (1990).
- Eaton & Ball. American Vefumer, 192. (1934).
- Embong M. B., Jelen P. Technical feasibility of aqueous extraction of rapeseed oil - a laboratory study. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*. 10, 239-243. (1977).
- FAOSTAT. Import of commodities by country for the year (2010). Food and Agriculture Organization, The United Nations, Rome, Italy. (Consulté le 22 juillet 2013). Disponible à l'adresse: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=342&lang=en>.
- Farhoosh R., Tavassoli-Kafrani M. H. Simultaneous monitoring of the conventional qualitative indicators during frying of sunflower oil. *Food Chemistry*, 125, 209–213. (2011).
- Farines M., Soulier J., Rancurel A., Montaudoin M.G., Leborgne L. Influence of avocado oil processing on the nature of some unsaponifiable constituents. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 72 (4), 473-476. (1995).
- Federal Register Notice. Trans fatty acids in nutrition labeling, nutrient content claims, and health claims; 1999; hyperlink <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/NEW00698.html>.
- Fedorov V. Theory of Optimal Experiments. New York: Academic Press. (1972).
- Fen N. O. R. In Food chemistry, 3ième ed., Marcel Dekker, New-York. (1996).

- Fernandes P., Cabral J.M.S. Phytosterols: Applications and recovery methods: A review. *Bioresource Technology*, 98, 2335–2350. (2007).
- Ferreira-Dias S., Dina G. V., Abreu J. M.F. Comparison between ethanol and hexane for oil extraction from *Quercus suber* L. fruits. *Grasas y Aceites*, 54, Fasc. 4, 378-383. (2003).
- Fils J.M. The Production of Oils. In: Hamm, W. and R.J. Hamilton, (Eds.), *Edible Oil Processing*. Sheffield: Sheffield Academy Press, U.K. (2000).
- Fine F., Vian M. A., Tixier A-S. F., Carre P., Pages X., Chemat F. Les agro-solvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *OCL*, 20(5) A502. (2013).
- Firestone D. Regulation of frying fat and oil. In: *Deep Frying: Chemistry, Nutrition and Practical Applications – 2nd Edition*, pp. 373-385 (ed. M.D. Erickson, AOCS Press, Champaign). (2007).
- Footo C.S. Quenching of singlet oxygen. In: *Singlet oxygen*, Wasserman H.H., Murray R.W. (Eds), Academic Press, New York, 139 – 171. (1979).
- Freitas S. P., Da Silva F. C., Lago R. C. A., Qassim R. Y. Rheological behavior of processed avocado pulp emulsions. *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 319 – 325. (1996).
- Frisbie D. D., DVM, Kawcak C. E., McIlwraith C. W. Evaluation of oral avocado/soybean unsaponifiables using an experimental model of equine osteoarthritis. *AAEP Proceedings*, 52, 570-571. (2006).
- Fur H.C., Clark R. M. *Physiology : Carotemoids*. Academic Press, Elsevier Ltd. 936 – 943. (2003).
- Ganou L. (1993). Contribution à l'étude des mécanismes fondamentaux de l'hydrodistillation des huiles essentielles. Thèse de Doctorat : Traitement des matières premières végétales, Institut National Polytechnique, Toulouse, France, 277p. (2003).
- Genot C., Kabri T.H., Meynier A. Stabilisation of omega-3 oils and enriched foods using emulsifiers. In 'Food enrichment with omega-3 fatty acids' C. Jacobsen, N.S. Nielsen, A. Frisenfeldt Horn & A.-D. Moltke Sorensen Eds. Woodhead Publishing Series in Food science, Technology and nutrition: 252 Woodhead Publishing Ltd, Cambridge (UK). 5 pp. 150-193. ISBN 978-0-85709-428-5 ch. (2013).
- Gertz C., Klostermann S., Kochhar S.P. Testing and comparing oxidative stability of vegetable oils and fats at frying temperature. *European Journal of Lipid, Science and Technology*, 102, 543–551. (2000).
- Gomez M.A, De la Ossa E. M. Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbone dioxide. *Chemical Engineering Journal*, 88, 103 – 109. (2002).
- Gomez N. A., Abonia R., Cadavid H. et Vargasc I. H. Chemical and spectroscopic characterization of a vegetable oil used as dielectric coolant in distribution transformers. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 22 (12), 2292-2303. (2011).

- Gordon H. M. Fat Classification. Academic Press, Elsevier Science Ltd, 2287 – 2292. (2003).
- Gordon M. H. et Magos P. The effect of sterols on the oxidation of edible oils. *Food Chemistry*, 10, 141-147. (1983).
- Goss W.H. Solvent extraction of oilseeds. *Oil and Soap*, 23, 349-354. (1946).
- Goula A. M. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil – Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, 117, 492–498. (2013).
- Gray J. Measurement of lipid oxidation: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 55(6), 539-546. (1978).
- Guillemin S. Extraction aqueuse d'huile de colza assistée par hydrolyse enzymatique : optimisation de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de procédés de déstabilisation. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, France, 228p. (2006).
- Guillen M. D., Cabo N. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*, 77, 503–510. (2002).
- Guillén M.D., Uriarte P.S. A very simple, fast, and non-destructive approach to predict the time at which edible oils submitted to high temperature reach the established limits of safety. *Food Chemistry*, 127, 802-806. (2011).
- Gunstone F. D. Fatty acid and lipid chemistry. 1st edition, Blackie Academic & Professional, London, 1 – 23. (1996).
- Gunstone F.D. The Chemistry of oils and fat: Sources, composition, properties and uses. CRC Press LLC, Boca Raton. (2004).
- Gutierrez-Rosales F., Garrido-Fernandez J., Gallardo-Guerrero L., Gandul-Rojas B., Minguéz-Mosquera M.I. Action of chlorophylls and the stability of virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 69, 866–871. (1992).
- Hammond E.G., White P.J. A brief history of lipid oxidation. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 88, 891–897. (2011).
- Harrington E.C.J. The desirability functions. *Quality Control*, 12, 494–498. (1965).
- Hatcheu E.T. L'approvisionnement et la distribution alimentaires à Douala (Cameroun) : Logiques sociales et pratiques spatiales des acteurs. Thèse de Doctorat : Géographie. Paris : Université de Paris I Panthéon Sorbonne, 455p. (2003).
- Hess J.L. Vitamin E: Tocopherol, in Antioxidants in higher plants (Alscher, R.G., and Hess, J.L., eds.) pp. 111-134, CRC Press, Boca Raton. (1993).
- Ho C. C., Chow M. C. In Encyclopedia of surface and colloidal science, T. Arthur (Ed.), Chap: Edible Emulsions, Santa Barbara Science Project, USA, 1561-1571. (2002).

- Hoekstra J., Fransen H.P., Jan C.H. van Eijkeren, Verkaik-Kloosterman J., Nynke de Jong, Owen H., Kennedy M., Verhagen H., Hart A. Benefit–risk assessment of plant sterols in margarine: A QALIBRA case study. *Food and Chemical Toxicology*, 54, 35–42. (2013).
- Huang X., Kakuda Y., Cui W. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15(4-6), 533-542. (2001).
- Huang Z-R., Lin Y-K., Fang J-Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: Potential uses in cosmetic dermatology: A review. *Molecules*, 14, 540-554. (2009).
- Hudson , B. J. F. Chemistry Industry. 763. (1975).
- Hunter T.N., Pugh R.J., Franks G.V., Jameson, G.J. The role of particles in stabilising foams and emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 137(2), 57-81. (2008).
- IAC, Institut Agronomique Néo-Calédonien. Avocats: Synthèse de données techniques pour le choix de variétés permettant un étalement de la production. *Arbofruits*, 19p. (2010).
- Ikhuria E.U., Malaki M. Characterization of avocado pear (*Persea Americana*) and African pear (*Dacryodes edulis*) extracts. *African Journal of Biotechnology*, 6 (7), 950 – 952. (2007).
- Imhof L. Optimum designs for a multiresponse regression model. *Journal of Multivariate Analyses*, 72, 120–131. (2000).
- International Organisation for Standardization. ISO 12228. Determination of individual and total sterols contents – gas chromatographic method) – Part 1: Animal and vegetable fats and oils. Genève: International Organisation for Standardization. (1999).
- Ishida B.K., Bartley G.E. Caroténoids: Chemistry, sources and physiology. Agricultural Research Service, Albany, CA, USA, Elsevier Ltd. 330 – 339. (2005).
- Ismail A.A., van de Voort F.R., Sedman J. «Fourier transform infrared spectroscopy : Principles and applications», in Instrumental methods in food analysis, Paré, J.R.J.; Bélanger, J.M.R., eds., Elsevier. 93-140. (1997).
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Method 2.505. Evidence of purity and deterioration from ultraviolet spectrophotometry. In: Standard Methods for the analysis of Oils, Fats and derivatives. 7th ed. (C. Paquot and A. Hautfenne, eds.), 212-213. Blackwell Scientific, Palo Alto, Calif. (1987).
- IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids. *Carbohydrate Research*, 312, 167-175. (1998).
- Jacobo-Velázquez D. A., Hernández-Brenes C., Cisneros-Zevallos L., Benavides J. Partial purification and enzymatic characterization of avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass) lipoxygenase. *Food Research International*, 43, 1079–1085. (2010).

- Jadhav S.J., Nimbalkar S.S., Kulkarni A.D., Madhavi D. L. Lipid oxidation in biological and food systems. In: Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, editors. Food antioxidants. New York: Marcel Dekker. 5–64. (1996).
- Jiang L., Hua D., Wang Z., Xu S. Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein Hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 233–238. (2010).
- Jiang Z.Y., Hunt J.V., Wolf S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202, 384 – 389. (1992).
- Johnson L. A., Lusas E. W. Comparison of alternative solvents for oils extraction. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 60, 229-242. (1983).
- Kader A. A., Arpaia M. L. Produce facts: Avocado – Recommendations for maintaining postharvest quality. Postharvest Technology Research and Information Centre, University of California, Davis, CA. (2000).
- Kalogelopoulos N., Andrikopoulos K. Squalene in oils and fats from domestic and commercial fryings of potatoes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55 (2), 125-129. (2004).
- Kamal-Elden A., Appelqvist L-A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671–701. (1996).
- Kameni A., Tchamo P. Water extraction of avocado oil in the high lands of Cameroon. *Tropical Science*, 42, 10 – 12. (2003).
- Kamgaing S. Rapport Panorama I sur les statistiques agricoles et alimentaires : Cameroun. Projet GCP/GLO/208/BMG « countryStat pour l’Afrique Sub-saharienne ». Rome : FAO, 78p. (2009).
- Kansci G., Genot C., Kamdem A. M., Tchana A., Viau M., Rampon V., Metro B., Moreau N. Composition and oxidation level of some vegetable oils consumed in Cameroon, determined by classical and mid infrared spectroscopic methods. *Sciences des aliments*, (3), 425-441. (2003).
- Kapseu C. Production, analyse et applications des huiles végétales en Afrique : Conférence de Chevreuil. *Organisation Communiste Libertaire*, 16 (4), 215 – 229. (2009).
- Karoui R., Blecker Ch. Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems – A review. *Food and Bioprocess Technology*, 4 (3), 364 – 386. (2011).
- Khajeh M., Yamini Y., Bahramifar N., Sefidkon F., Pirmoradei M.R. Comparison of essential oils compositions of *Ferula assa-foetida* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food Chemistry*, 91, 639-644. (2005).
- Khuri A. I., Mukhopadhyay S. Response surface methodology: Advanced Review. *John Wiley & Sons, Inc. WIREs Comp Stat*, 2, 128–149. (2010).

- Kim N. S., Lee J. H., Kyoung Han M., Kim J. W., Cho S., Kim J. Discrimination of commercial cheeses from fatty acid profiles and phytosterol contents obtained by GC and PCA. *Food Chemistry*, 143, 40–47. (2014).
- Kim N.S., Lee D.S. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 982, 31-47. (2002).
- Kinsella J.E., Shimp J.L., Mai J. The proximate composition of several species of freshwater fishes. *Food and Life Sciences Bulletin*, 69, 1–20. (1978).
- Kobata, A., Takasaki S. Structure and biosynthesis of cell surface carbohydrates, In Fukuda, M. (ed), *Cell Surface Carbohydrates and Cell Development*. CRC Press, Boca Raton, 1-24. (1992).
- Kobayashi N., Noel E. A., Barnes A., Rosenberg J., DiRusso C., Black P., Oyler G. A. Rapid detection and quantification of triacylglycerol by HPLC–ELSD in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella* Strains. *Lipids*, 48, 1035–1049. (2013).
- Kohno Y., Egawa Y., Itoh S., Nagaoka S., Takahashi M., Mukai K. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1256, 52–56. (1995).
- Kongbonga M. Y. G., Ghalila H., Onana B. M., Majdi Y., Lakhdar B. Z., Mezlini H., Sevestre-Ghalila S. Characterization of Vegetable Oils by Fluorescence Spectroscopy. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 692-699. (2011).
- Koocheki A., Taherian A.R., Razavi S.M.A., Bostan A. Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. *Food Hydrocolloids*, 23, 2369-2379. (2009).
- Kopitz J., Sinz K., Brossmer R., Cantz M. Partial characterization and enrichment of a membrane-bound sialidase specific for gangliosides from human brain tissue. *European Journal of Biochemistry*, 248(2), 527-534. (1997).
- Kritchevsky D., Tepper S. A., Wright S., Czarnecki S. K., Wilson T. A., Nicolosi R. J. Cholesterol vehicle in experimental atherosclerosis 24: Avocado Oil. *Journal of the American College of Nutrition*, 22 (1), 52–55. (2003).
- Kuate J., Bella M., Hernandez S., Damesse F. Le secteur des fruits et légumes au Cameroun: importance, potentialités, contraintes et stratégies de développement. Atelier de concertation sur les politiques agricoles avec les opérateurs économiques. Douala, 27 février - 02 mars 2001. 16 p. (2001).
- Kumar K.A., Viswanathan K. Study of UV transmission through a few edible oils and chicken oil. *Journal of Spectroscopy*, 1-5. (2013).

- Lagunez R. L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat des Sciences Agroressources, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 335p. (2006).
- Lahav E., Kalmar D. Water requirements of avocado in Israel II. Influence on yield, fruit growth and oil content. *Australian Journal of Agricultural Research*, 28, 869-877. (1977).
- Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. (2006).
- Lanfer-Marquez U. M., Barros R. M.C., Sinnecker P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, 38, 885–891. (2005).
- Latif S. Analytical investigations to compare the enzyme-assisted extraction of vegetable oils with conventional methods. Thèse de Doctorat: Chimie. Faisalabad: University of Agriculture, 178p. (2009).
- Latif S., Anwar F. Aqueous enzymatic sesame oil and protein extraction. *Food Chemistry*, DOI : 10.1016/j.foodchem.2010.09.064. (2010).
- Lewis C. The Maturity of Avocados - A General Review. *Journal of Science, Food and Agriculture*, 29, 857-866. (1978).
- Lind E.E., Goldin J., Hickman J.B. Fitting yield and cost response surfaces. *Chemical Engineering Progress*, 56, 62–68. (1960).
- Logaraj T.V., Bhattacharya S., Sankar K. U., Venkateswaran G. Rheological behaviour of emulsions of avocado and watermelon oils during storage. *Food Chemistry*, 106, 937–943. (2008).
- Love H. T. Puerto Rico Experimental Station, US Department of Agriculture, 18-19. (1942).
- Lozano Y. F., Dhuique-Maer C., Bannon C., Gaydou E. M. Unsaponifiable matter, total sterol and tocopherol contents of avocado oil varieties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70 (6), 561-565. (1993).
- Lu Q., Arteaga J., Zhang Q., Huerta S., Go V., Heber D. Inhibition prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 23 -30. (2005).
- Lumley I. D. Polar compounds in heated oils. In G. Varela, A. E. Bender, & I. D. Morton (Eds.), *Frying of food. Principles, changes, new approaches* (pp. 166–173). Chichester: Ellis Horwood Ltd. (1988).
- Lundberg W. O. Autoxidation and antioxidants. Interscience Publishers, New York, NY (USA). (1962).
- Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nyström A., Pertensen J., Bergman R. Chemometrics. *Intelligent Laboratory Systems*, 42, 3. (1998).

- Lusas E. W., Lawhon J. T., Rhee K. C. (Producing edible oil and protein from oilseeds by aqueous processing. *Oil Mill Gazer*, 4, 28-34. 1982).
- Lyberg A-M., Fasoli E., Adlercreutz. Monitoring the oxidation of docosahexaenoic acid in lipids. *Lipids*, 40, 969–979. (2005).
- Madawala S.R.P., Kochhar S.P., Dutta P.C. Lipid components and oxidative status of selected specialty oils. *Grasas y Aceites*, 63 (2), 143-151. (2012).
- Malecka M. The effect of squalene on the thermostability of rapeseed oil. *Die Nahrung*, 38 (2), 135-140. (1994).
- Manzi P., Panfili G., Esti M., Pizzoferrato L. Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *Journal of Science and Food Agriculture*, 77, 115-120. (1998).
- Matissek, Steiner, Fischer. *Lebensmittelanalytik*, 4th ed. Revisée en 2010. Auflage, [S.l.]:Springer Verlag, 49 – 51.
- McCarthy A. Avocado culture in western Australia. Department of Agriculture, Western Australia. (2001).
- McClements D.J., Chanamai R. Impact of weighting agents and sucrose on gravitational separation of beverage emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5561 – 5565. (2000).
- McClements D. J. *Food emulsions: Principles, practices, and techniques*. Boca Raton: CRC Press. (2005).
- Mendes R., Cardoso C., Pestana C. Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food Chemistry*, 112, 1038–1045. (2009).
- Meng X., Pan Q., Ding Y., Jiang L. Rapid determination of phospholipid content of vegetable oils by FTIR spectroscopy combined with partial least-square regression. *Food Chemistry*, 147, 272–278. (2014).
- Min D.B., Boff J. M. Lipid oxidation of edible oil. In: Akoh CC, Min DB, Eds. *Food Lipids*. New York: Marcel Dekker. 335–363. (2002).
- Min D.B., Bradley G.D. Fats and oils: flavors. In: Hui YH, editor. *Wiley encyclopedia of Food Science and Technology*. New York: John Wiley and Sons. 828 – 832. (1992).
- Min D.B., Jung M.Y. Effects of minor components on the flavor stability of vegetable oils. In: Min DB, Smouse TH, editors., *Flavor chemistry of lipid foods*. Champaign, Ill.: AOCS Press. 242–64. (1989).
- Mińkowski K., Grześkiewicz S., Jerzewska M., Ropelewska M. Characteristic of chemical composition of vegetable oil about high contents of linoleic acids *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 73, 146-157. (2010).

- Mistry B.S., Min D. B. Prooxidant effects of monoglycerides and diglycerides in soybean oil. *Journal of Food Science*, 53, 1896–1907. (1988).
- Montgomery D. C. Design and analysis of experiments: Response surface method and designs. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc. (2005).
- Montgomery D.C. Design and analysis of experiments. 5th ed. New York: John Wiley and Sons. (2001).
- Moreau R.A., Whitaker B.D., Hicks K.B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41, 457–500. (2002).
- Moreno A. O., Dorantes L., Galiández J., Guzmán N R. I. Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2216-2221. (2003).
- Morin P., Richard H. Thermal degradation of linalyl acetate during steam distillation. In: Progress in Flavour Research. 4th Weurmann Symposium. Amsterdam: Elsevier, 563-576. (1985).
- Morton, J. Avocado. In: Fruits of warm climates. Julia F. Morton, Miami, FL. 91 – 102. (1987).
- Mouloungui Z., Roche J., Bouniols A. Limitations extractives des ingrédients fonctionnels natifs: Lipides bioactifs par modifications chimiques. *Oléagineux, Corps gras Lipides*, 13(1), 16–22. (2006).
- Mozaffarian D., Aro A., Willett W. C. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence: A review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, S5–S21. (2009).
- Murcia M.A., Jiménez A.M., Martínez-Tomé M. Evaluation of antioxidant properties of Mediterranean and tropical fruits compared to common food additives. *Journal of Food Protection*, 64, 2037 – 2046. (2001).
- Murkovic M., Lechner S., Pietzka A., Bratacos M., Katzogiannos E. Analysis of minor components in olive oil. *Journal of Biochemical et Biophysic Methods*, 61, 155 – 160. (2004).
- Myers R., Montgomery D.C. Response surface methodology. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons. (2002).
- Myher J.J., Kursis A. Determination of plasma total lipid profiles by capillary gas liquid chromatography. *Journal of Biochemistry and Biophysic. Methods*, 10, 13-23. (1984).
- Ngogang J., Mbanya J.C., Niobe S., Dongmo C., Carteret P., Ossondo M., Lanson M. Effect of palm oil and cottonseed oil on plasma cholesterol and triglycerides concentration in rats. First Pan-African Conference on Biochemistry and Molecular Biology. Sept 2-6, Nairobi, Kenya. (1996).
- Norme ISO 6885, 1998 modifiée. Détermination de l'indice de para-anisidine. Corps gras d'origine animale et végétale, deuxième édition, 7 pages.

- Novales B., Papineau P., Sire A., Axelos M.A.V. Characterization of emulsions and suspensions by video image analysis. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 221, 81-89. (2003).
- Nyam K.L., Tan C.P., Lai O.M., Kamariah L., Man C., Yaakob B. Enzyme-assisted aqueous extraction of Kalahari Melon seed oil: optimization using response surface methodology. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 86 (12), 1235 – 1240. (2009).
- O'Connor C.J., Lal S.N.D., Eyres L. (eds). *Handbook of Australasian Edible Oils*. Auckland, New Zealand: Oils and Fats Specialist Group of NZIC. (2007).
- Ong A.S.H., Boey P.L., NG C.M. Spectrophotometric method for determination of solid fat content of palm oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 59 (5), 223 – 226. (1982).
- Ortiz-Avila O., Sámano-García C. A., Calderón-Cortés E., Pérez-Hernández I. H., Mejía-Zepeda R., Rodríguez-Orozco A. R., Saavedra-Molina A., Cortés-Rojo C. Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 17p. (2013).
- Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Würtele G., Spiegelhalter B., Bartsch H. Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncology*, 1, 107-112. (2000).
- Pacetti D., Boselli E., Lucci P., Frega N. G. Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. *Journal of Chromatography A*, 1150, 241–251. (2007).
- Pan L.G., Campana A., Tom M.C. S., An. M.C. A Kinetic study of phospholipid extraction by degumming process in sunflower seed oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 77, 1273–1276. (2000).
- Parker T.D., Adams D.A., Zhou K., Harris M., Yu L. Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. *Journal of Food Science*, 68, 1240 –1243. (2003).
- Piironen V., Toivo J., Lampi A-M. New data for cholesterol contents in meat, fish, milk, eggs and their products consumed in Finland. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 705–713. (2002).
- Piras A., Rosa A., Falconieri D., Porcedda S., Dessì M.A., Marongiu B. Extraction of oil from wheat germ by supercritical CO₂. *Molecules*, 14(7), 2573-2581. (2009).
- Pizarro C., Esteban-Díez I., Rodríguez-Tecedor S., González-Sáiz J.M. Determination of the peroxide value in extra virgin olive oils through the application of the stepwise orthogonalisation of predictors to mid-infrared spectra. *Food Control*, 34, 158-167. (2013).
- Platt-Aloia K.A., Oross J.W., Thomson W.W. *Botanical Gazette*. 144, 49. (1983).

- Platt-Aloia K.A., Thomson W.W., Young R. W. Ultrastructural changes in the walls of ripening avocados: transmission, scanning, and freeze fracture microscopy. *Botanical Gazette*, 141, 366-373. (1980).
- Plaza L., Sanchez-Moreno C., de Pascual-Teresa S., de Ancos B., Cano M. P. Fatty acids, sterols, and antioxidant activity in minimally processed avocados during refrigerated storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57(8), 3204- 3209. (2009).
- Prakash M. J., Manikandanb S., Mekala V. Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box–Behnken design with desirability function. *Industrial Crops and Products*, 49, 304– 311. (2013).
- Pushkard S. B., Narendra N., Rosalynd V.M. R., Marçal Q. P. Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits. *Grasas y Aceites*, 3-4 (52): 171-174. (2001).
- Puspitasari-Nienaber N. L., Ferruzzi M. G., Schwartz S. J. Simultaneous detection of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls in vegetable oils by direct injection C30 RP-HPLC with coulometric electrochemical array detection. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 79, 633–640. (2002).
- Quiñones-Islas N., Meza-Márquez O. G., Osorio-Revilla G., Gallardo-Velazquez T. Detection of adulterants in avocado oil by Mid-FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Food Research International*, 51, 148–154. (2013).
- Qullez J., García-Lorda P., Salas-Salvado J. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. *Clinical Nutrition*, 22(4): 343–351. (2003).
- Rabasco A. M., Rodriguez G.M.L. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y aceites*, 51 (1-2):74 – 96. (2000).
- Rahmani M., Saari Csallany A. Role of minor constituents in the photooxidation of virgin olive oil. *Journal of American Chemist's Society*, 75, 837 – 843. (1998).
- Raissi S., R-Eslami Farsani. Statistical process optimization through multi-response surface methodology. *International Journal of Computational and Mathematical Sciences*, 3, 291 – 295. (2009).
- Rajalakshmi D., Narasimhan S. Food antioxidants : Sources and methods of evaluation. In : Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunke D.K. (Eds.), *Food antioxidants*, Marcel Dekker Inc., New York, 65 – 159. (1995).
- Rakotondramasy R.L., Javet J.L., Porte C., Fauduet H. Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria Officinalis*: L-Analysis determination, kinetic reaction and model building. *Separation and Purification Technology*, 54, 253 – 261. (2007).
- Ranalli A., Gomes T., Delcuratolo D., Contentto S., Lucera L. Improving virgin olive oil quality by means of innovative extracting biotechnologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (9), 2597-2602. (2003).

- Requejo-Tapia L.C. International trends in fresh avocado and avocado oil production and seasonal variation of fatty acids in new Zealand-Grown cv. Hass. Thèse de Master: Agribusiness. Massey University, New Zealand, 258p. (1999).
- Rock C.O., Jackowski S. Phospholipids and phospholipid metabolism: A Preface. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831, 469–470. (2013).
- Rodriguez-Saona C., Trumble J.T. Biologically active aliphatic acetogenins from specialized idioblast oil cells. *Current Organic Chemistry*, 4, 1249 – 1260. (2000).
- Roman O. Mesure et prédiction de la réactivité des lipides au cours du chauffage d’huiles végétales à haute température. Thèse de doctorat en Sciences des Aliments, Instituts des Sciences et Industries du Vivant et de l’Environnement, France (AgroParisTech), 172p. (2012).
- Romajaro A., Sanchez-Bel P., Serrano M., Pretel M. T. Wild edible plants as potential antioxidants in vegetables oils. *Journal of Chemistry*, 4p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/457902>. (2013).
- Rosenthal A., Pyle D. L., Niranjana K. Aqueous and enzymatic processes edible oil extraction for edible oil extraction: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 19: 402-420. (1996).
- Rosenthal A., Pyle D. L., Niranjana K. Simultaneous aqueous extraction of oil and protein from soybean: mechanisms for process design. *Trans Institute of Chemical Engineers*, 76, 224-230. (1998).
- Sayyar S., Zurina Z. A., Robiah Y., Azhari M. Extraction of oil from Jatropha seeds-optimization and kinetics. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (7), 1390-1395. (2009).
- Schaffer, B., Andersen, P.C. Handbook of environmental physiology of fruit crops. Vol. 2. Sub-tropical and Tropical Crops. CRC Press Inc. Florida. (1994).
- Schroeder M. T., Becker E. M., Skibsted L. H. Molecular mechanism of antioxidant synergism of tocotrienols and carotenoids in palm oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3445-3453. (2006).
- Schwartz M., Olaeta J.A., Undurraga P. et Costa V. Performance improvement of avocado oil extraction. In: Proceedings VI World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate). Viña Del Mar, Chile, ISBN No 978-956-17-0413-8. (2007).
- Scott G. Atmospheric oxidation and antioxidants. *Elsevier Publishing Comp., Amsterdam* (The Netherlands). (1965).
- Seljeskog E., Hergiv T., Mansoor M. A. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clinical Biochemistry*, 39, 947–954. (2006).
- Shchipunov, Yu A. Phase behavior of lecithin at the oil water interface. *Langmuir*, 12, 6443-6445. (1996).

- Sherazi S.T.H., Kandro A., Mahesar S.A., Bhangar M.I., YounisTalpur M., Arain S. Application of transmission FT-IR spectroscopy for the trans fat determination in the industrially processed edible oils. *Food Chemistry*, 114 (1), 323 – 327. (2009).
- Simopoulos A.P., Cleland L.G. World Review of Nutrition and Dietetic. 92, 2084–2230. (2003).
- Sinquin A., Gorner T., Dellacherie E. L'utilisation des micro-ondes en chimie analytique. *Analysis*, 21, 1-10. (1993).
- Skoog D.A., Leary J.J. Análisis instrumental, 4th Ed., McGraw-Hill, Madrid. (1994).
- Smith N. J. H, Williams J.T., Plucknett D, L., Talbot J. P. Tropical forests and their crops. *Comstock Publishing Associates*. (1992).
- Soliman M.F.M. Evaluation of avocado/soybean unsaponifiable alone or concurrently with praziquantel in murine schistosomiasis. *Acta Tropica*, 122, 261– 266. (2012).
- Soupas L., Juntunen L., Saynajoki S., Lampi A., Piironen V. GC-MS method for characterization and quantification of sitostanol oxidation products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(2), 135-141. (2004).
- Standard Polonais PN-A-86934:1995 – Oils and animal and vegetable fats –Spectrophotometric determination of general color.
- Stuart B.H. Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications. *John Wiley & Sons, Ltd*. (2004).
- Sun-Waterhouse D., Thakorlal J., Zhou J. Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1575–1585. (2011).
- Surh J., Gu Y.S., Decker E.A., McClements D. J. Influence of environmental stresses on stability of OM emulsions containing cationic droplets stabilized by SDS-fish gelatin membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4236-4244. (2005).
- Tabee E., Azadmard-Damirchi S., Jagerstad M., Dutta P. C. Effects of alpha-tocopherol on oxidative stability and phytosterol oxidation during heating in some regular and high-oleic vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(9), 857-867. (2008).
- Taghvaei M., Jafari S. M., Nowrouzich S., Alishah O. Influence of cooking process on the microwave-assisted extraction of cottonseed oil. *Journal of Food Science and Technology*, Online ISSN 0975-8402. (2013).
- Taherian, A.R. Rheology and stability of beverage emulsions in concentrated and diluted forms. Department of Food Science and Agricultural Chemistry. Montreal, McGill University. PhD. (2006).
- Tan D. N., Quoc D. N. Application of multi-objective optimization to determining the technological mode of avocado oil extraction. *Canadian Journal on Chemical Engineering & Technology*, 2 (6), 106 – 113. (2011).

- Temple L. Le marché des fruits et légumes au Cameroun. *IRAD*. 7. (1999).
- Tena N., Garcia-Gonzalez D. L., Aparicio R. Evaluation of virgin olive oil thermal deterioration by fluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, (22) 10505-10511. (2009).
- Tharwat F. T. Emulsion Science and Technology. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*. 56p. (2009).
- Verbruggen G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology*, 45, 129–138. (2006).
- Vigli G., Philippidis A., Spyros A., Dais P. Classification of edible oils by employing ³¹P and ¹H NMR spectroscopy in combination with multivariate statistical analysis. A proposal for the detection of seed oil adulteration in virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5715-5722. (2003).
- Vingering N., Oseredczuk M., Du Chaffaut L., Ireland J., Ledoux M. Fatty acid composition of commercial vegetable oils from French market analysed using a long high polar column. *Oléagineux, Corps gras, Lipids*, 17 (3), 185 – 192. (2010).
- Virost M., Tomao V., Ginies C., Visinoni F., Chemat F. Microwave-integrated extraction of total fats and oils. *Journal of Chromatography A*, 1196, 57–64. (2008).
- Von Elbe & Schwartz. Colourants, In: E.R. Fennema (Ed). *Food Chemistry, 3rd Edition, Marcel Dekker, Inc., new York*, 659 – 680. (1996).
- Walstra P. Emulsion stability, in: Encyclopedia of Emulsion Technology, vol. 4, *Becher, P., Ed., Marcel Dekker, New York, chap. 1*. (1996).
- Wang S., Hwang H., Yoon S., Choe E. Temperature dependence of autoxidation of Perilla oil and tocopherol degradation. *Journal of Food Science*, 75(6), 498-505. (2010).
- Wang W., Bostic T. R., Gu L. Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, 122, 1193–1198. (2010).
- Waninge R., Walstra P., Bastiaans J., Nieuwenhuijse H., Nylander T., Paulsson M., Bergenståhl B. Competitive Adsorption between β -Casein or β -Lactoglobulin and Model Milk Membrane Lipids at Oil-Water Interfaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 716-724. (2005).
- Watterman E., Lockwood B. Active components and clinical applications of olive oil: A review. *Alternative Medicine Review*, 12 (4), 331 – 342. (2007).
- Werman M. J., Neeman I. Oxidative stability of avocado oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 63 (3), 355 – 360. (1986).
- Werman, M.J., Neeman, I. (1987). Avocado Oil Production and chemical characteristics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64 (2), 229-232.
- Whorlow R.W. Rheological techniques. *2nd ed. New York: Ellis Horwood*, 15-16. (1992).

- Wilde P., Mackie A., Husband F., Gunning P., Morris V. Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108 –109, 63–71. (2004).
- Wilke D.R., Chang P. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 1, 264-270. (1955).
- Williams C. M. Dietary fatty acids and human health: A review. *Annales de Zootechnies*, 49, 165–180. (2000).
- Wong M., Ashton O. B. O., McGhie T. K., Requejo-Jackman C., Wang Y., Woolf A. B. Influence of proportion of skin present during malaxing on pigment composition of cold pressed avocado oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 88,1373–1378. (2011).
- Wong M., Requejo-Jackman C., Woolf A. What is unrefined, extra virgin cold-pressed avocado oil? *Inform*, 21 (4), 198 – 202. (2010).
- Woolf A., Wong M., Eyres L., McGhie T., Lund C., Olsson S., Wang Y., Bulley C., Wang M., Friel E., Requejo-Jackman C. Avocado oil. In R. A. Moreau & A. Kamal-Eldin (Eds), *Gourmet and Health-promoting specialty oil* (pp. 73 – 125). *Urbana: AOCS Monograph Series on Oilseeds*. (2008).
- Woolf A.B., Ferguson I.B., Requejo-Tapia L.C., Boyd L., White A. Impact of sun exposure on harvest quality of Hass avocado fruit. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 5, 353-358. (1999).
- Woollard D.C., Indyk H.E. Tocophérols: Properties and determination. *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press Inc*, 5789 – 5796. (2003).
- Wrolstad R.E., Acree T.E., Decker E.A., Penner M.H., Reid D.S., Schwartz S.J., Shoemaker C.F., Sporns P. Handbook of Food Analytical Chemistry, Pigments, Colorants, Flavours, Texture, and Bioactive Food Components, *J. Wiley & Sons, Hoboken*. (2005).
- Wu F.C. Optimization of correlated multiple quality characteristics using desirability function. *Quality Engineering*, 17, 119–126. (2005).
- Yanty N. A. M., Marikkar J. M. N., Long K. Effect of varietal differences on composition and thermal characteristics of avocado oil. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 88, 1997–2003. (2011).
- Zeb A., Mehmood S. Carotenoïds content in various sources and their potential health applications. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (3), 199 – 204. (2004).
- Zhang G., Ni Y., Churchill J., Kokot S. Authentication of vegetable oils on the basis of their physico-chemical properties with the aid of chemometrics. *Talanta*, 70 (2), 293-300. (2006).

ANNEXES

Annexe I: Matrices des modélisations

Tableau A1: Matrice d'expériences et de réponses du plan factoriel 2⁴ centrés utilisé dans l'optimisation de l'extraction de l'huile d'avocat des 5 cultivars.

N°	Temperature	Temps	pH	RPE	Efficacités d'extraction (%)				
					<i>Booth 7</i>	<i>Booth 8</i>	<i>Collinson</i>	<i>Hickson</i>	<i>Lula</i>
1	-1	-1	-1	-1	28,20	18,43	6,33	26,13	28,74
2	1	-1	-1	-1	13,77	10,59	14,60	16,16	30,93
3	-1	1	-1	-1	26,90	21,61	10,54	25,75	30,67
4	1	1	-1	-1	16,53	13,13	19,95	16,54	32,86
5	-1	-1	1	-1	32,74	25,00	0,65	25,75	19,33
6	1	-1	1	-1	8,59	6,99	17,03	16,16	25,26
7	-1	1	1	-1	30,96	26,48	0,97	24,06	21,13
8	1	1	1	-1	6,16	9,11	18,98	15,41	27,32
9	-1	-1	-1	1	24,31	29,24	2,76	27,44	30,54
10	1	-1	-1	1	9,08	12,5	15,73	17,29	39,43
11	-1	1	-1	1	26,74	27,97	13,14	26,88	32,34
12	1	1	-1	1	11,34	14,19	16,54	16,92	41,49
13	-1	-1	1	1	26,74	21,40	3,89	26,88	20,10
14	1	-1	1	1	10,53	10,59	13,62	16,73	32,60
15	-1	1	1	1	27,39	23,52	10,70	25,94	22,42
16	1	1	1	1	14,42	12,50	22,87	15,98	35,05
17	0	0	0	0	18,48	12,92	9,24	21,43	30,02
18	0	0	0	0	18,80	21,19	11,19	20,86	29,64
19	0	0	0	0	19,77	10,80	12,65	21,05	31,96
20	0	0	0	0	18,64	11,44	14,44	21,43	29,90
21	0	0	0	0	23,18	15,04	13,30	21,24	31,57

Tableau A2 : Matrice d'expériences et de réponses du plan Composite centré utilisée dans la prédiction des temps limite admissibles pour l'huile d'avocat à hautes températures.

Essais	Temps	Température	Teneur en composés polaires totaux (%)
1	0	0	12,84
2	-1	1	28,14
3	0	0	15,70
4	1	-1	19,53
5	-1,41	0	10,50
6	0	1,41	55,10
7	0	0	15,79
8	0	0	13,99
9	0	-1,41	11,23
10	1	1	60,04
11	0	0	15,23
12	0	0	14,73
13	-1	-1	12,53
14	1,41	0	31,05
15	0	0	16,75
16	0	0	11,75

Tableau A3 : Sélection des combinaisons de variables à utiliser dans le modèle statistique d'extraction de l'huile de *Hickson* sur la base du R^2 , R^2 ajusté et le Cp Mallows.

R^2	R^2 ajusté	Cp de Mallows	Variables incluses
0,00	0,0	2988,18	0
5,00	0,0	2971,48	A
5,00	0,0	2958,43	B
97,37	97,24	61,95	C
5,00	0,00	2977,66	D
10,00	0,00	2941,74	AB
97,99	97,77	45,26	AC
10,00	0,00	2960,97	AD
98,43	98,25	32,21	BC
10,00	0,00	2947,92	BD
97,79	97,54	51,44	CD
99,05	98,88	15,51	ABC
15,00	0,00	2931,22	ABD
98,41	98,13	34,74	ACD
98,85	98,64	21,69	BCD
99,47	99,33	5,00	ABCD

Légende. A : pH ; B : ratio eau/pulpe ; C : température et D : temps

Tableau A4 : Sélection des combinaisons de variables à utiliser dans le modèle statistique d'extraction de l'huile de *Lula* sur la base du R^2 , R^2 ajusté et le Cp Mallows.

R^2	R^2 ajusté	Cp de Mallows	Variables incluses
0,0	0,00	131,21	0
38,99	35,79	74,63	A
13,66	9,12	112,68	B
34,12	30,65	81,96	C
5,00	0,00	129,35	D
52,66	47,40	56,10	AB
73,12	70,13	25,38	AC
41,56	35,07	72,77	AD
47,78	41,98	63,43	BC
16,23	6,92	110,83	BD
36,69	29,65	80,10	CD
86,78	84,45	6,85	ABC
55,23	47,33	54,25	ABD
75,68	71,39	23,52	ACD
50,35	41,59	61,58	BCD
89,35	86,68	5,00	ABCD

Légende. A : pH ; B : ratio eau/pulpe ; C : température, et D : temps

Tableau A5 : Sélection des combinaisons de variables à utiliser dans le modèle statistique d'extraction de l'huile de *Collinson* sur la base du R^2 , R^2 ajusté et le Cp Mallows.

R^2	R^2 ajusté	Cp de Mallows	Variables incluses
0,00	0,00	70,66	0
5,00	0,00	71,78	A
5,00	0,00	71,88	B
67,64	65,94	12,01	C
12,66	8,07	61,30	D
10,00	0,00	73,00	AB
68,62	65,14	13,13	AC
13,64	4,05	62,43	AD
68,51	65,01	13,13	BC
13,53	3,92	62,53	BD
80,31	78,12	2,65	CD
69,49	64,11	14,35	ABC
15,00	0,00	63,65	ABD
81,29	77,99	3,77	ACD
81,17	77,85	3,877	BCD
82,15	77,69	5,00	ABCD

Légende. A : pH ; B : ratio eau/pulpe ; C : température, et D : temps

Tableau A6 : Sélection des combinaisons de variables à utiliser dans le modèle statistique d'extraction de l'huile de *Booth 8* sur la base du R^2 , R^2 ajusté et le Cp Mallows.

R^2	R^2 ajusté	Cp de Mallows	Variables incluses
0,00	0,00	54,84	0
5,00	0,00	56,12	A
5,00	0,00	54,73	B
73,21	71,79	2,78	C
5,00	0,00	55,89	D
10,00	0,00	56,01	AB
74,19	71,32	4,06	AC
10,00	0,00	57,17	AD
76,06	73,40	2,67	BC
10,00	0,00	55,79	BD
74,49	71,65	3,84	CD
77,05	73,00	3,95	ABC
15,00	0,00	57,06	ABD
75,48	71,15	5,11	ACD
77,35	73,35	3,73	BCD
78,33	72,92	5,00	ABCD

Légende. A : pH ; B : ratio eau/pulpe ; C : température, et D : temps

Tableau A7 : Sélection des combinaisons de variables à utiliser dans le modèle statistique d'extraction de l'huile de *Booth 7* sur la base du R^2 , R^2 ajusté et le Cp Mallows.

R^2	R^2 ajusté	Cp de Mallows	Variables incluses
0,00	0,00	131,72	0
5,00	0,00	133,71	A
5,00	0,00	132,40	B
88,29	87,68	0,63	C
5,00	0,00	133,40	D
10,00	0,00	134,39	AB
88,30	87,00	2,63	AC
10,00	0,00	135,40	AD
89,17	87,97	1,3167	BC
10,00	0,00	134,09	BD
88,51	87,23	2,32	CD
89,18	87,27	3,31	ABC
15,00	0,00	136,08	ABD
88,51	86,48	4,32	ACD
89,38	87,51	3,00	BCD
89,38	86,73	5,00	ABCD

Légende. A : pH ; B : ratio eau/pulpe ; C : température, et D : temps

Annexe II : Courbes d'étalonnage

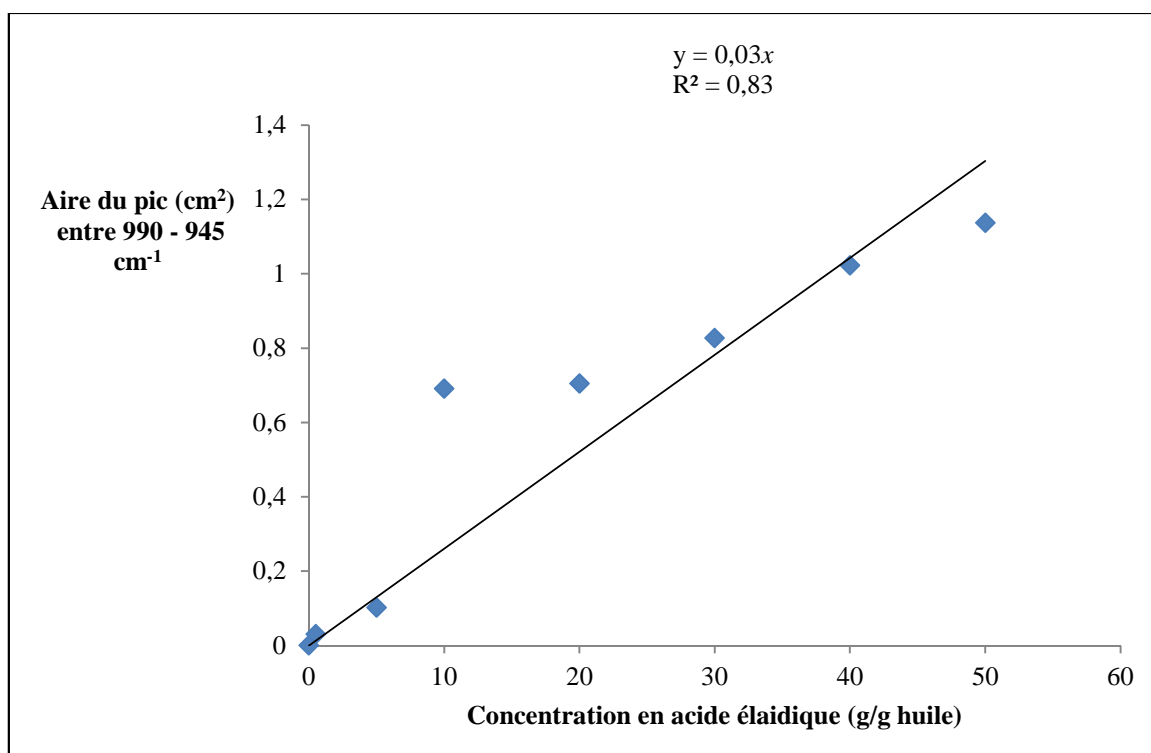
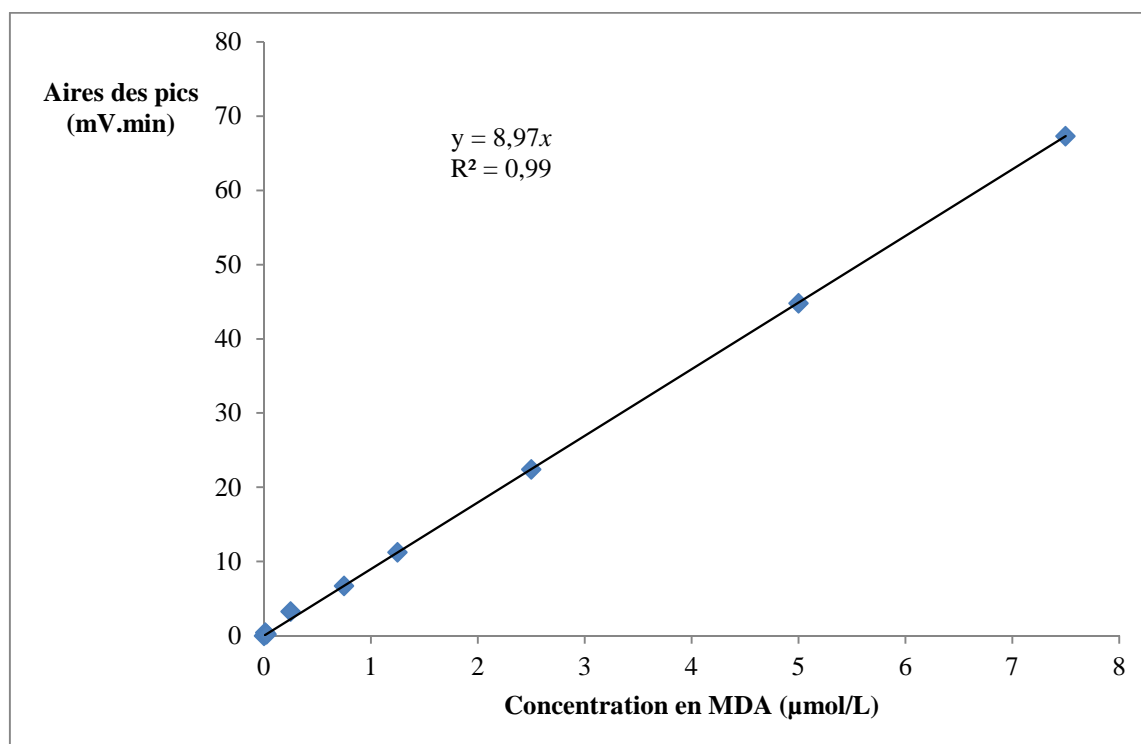
Figure A1 : Courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en acides gras *trans* dans l'huile d'avocat

Figure A2 : Courbe d'étalonnage pour la détermination de la teneur en MDA dans l'huile d'avocat

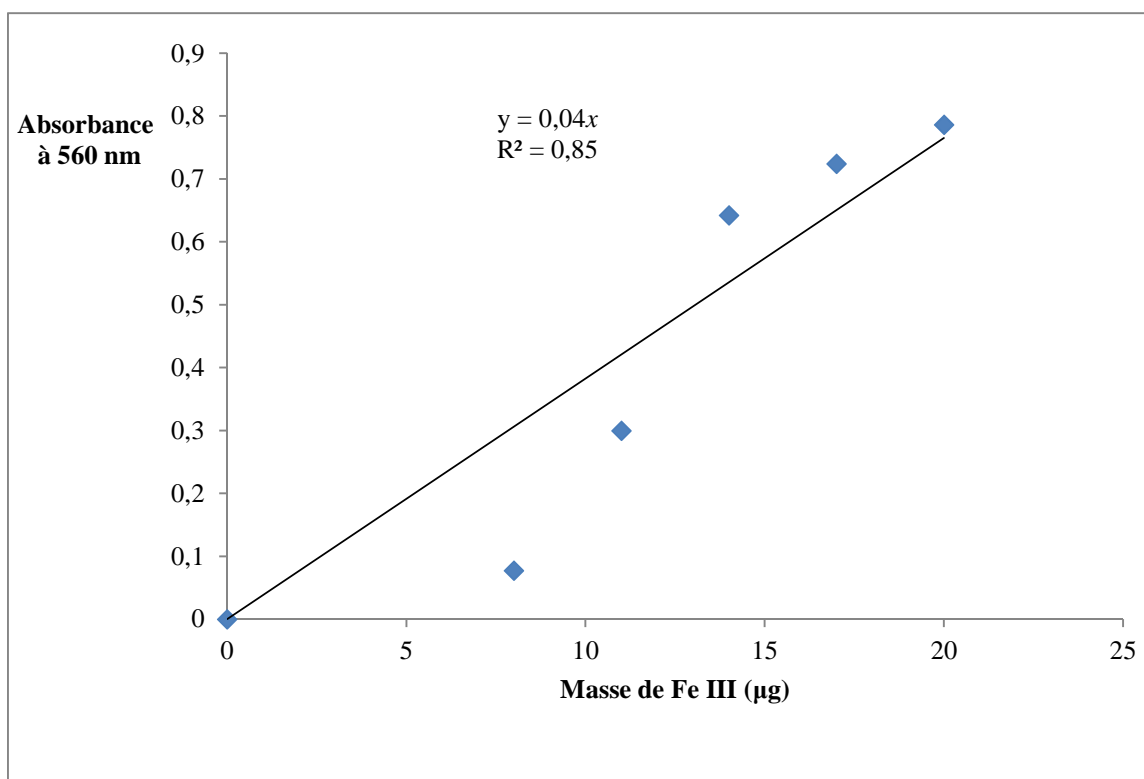


Figure A3 : Courbe d'étalonnage pour la détermination de l'indice de peroxyde dans l'huile d'avocat

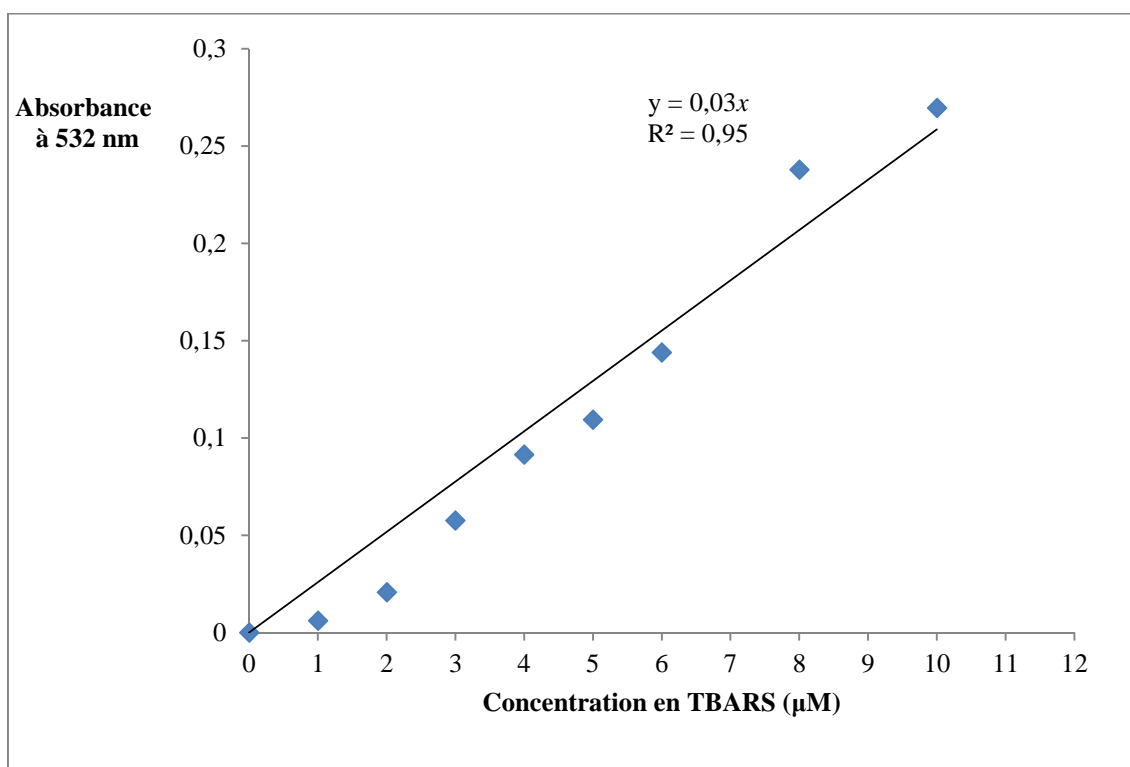


Figure A4 : Courbe d'étalonnage pour la détermination de l'indice de TBARS dans l'huile d'avocat

Annexe III : Chromatogrammes

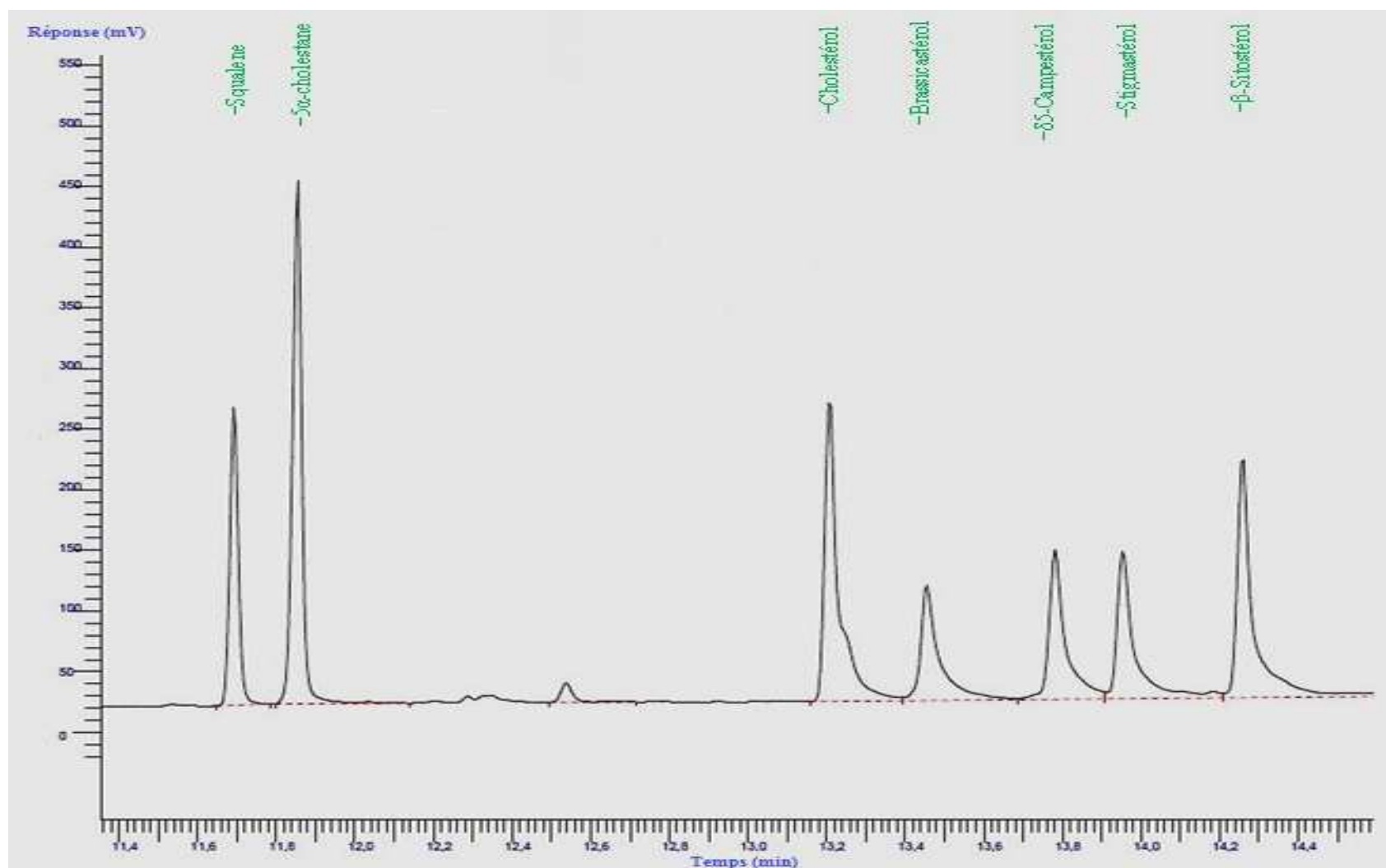


Figure A7 : Chromatogramme des standards pour la détermination de la composition en phytostérols par CPG-FD

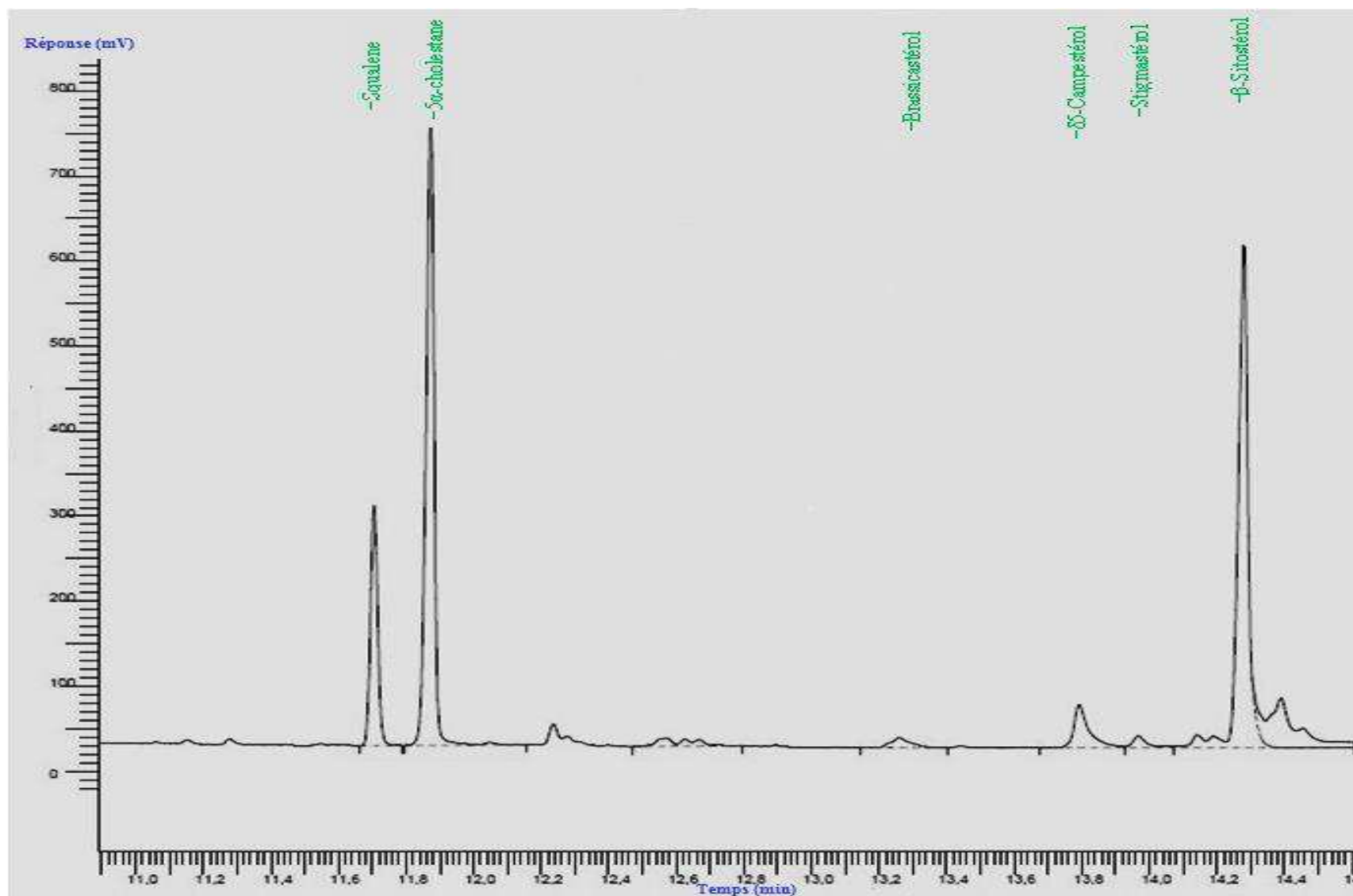
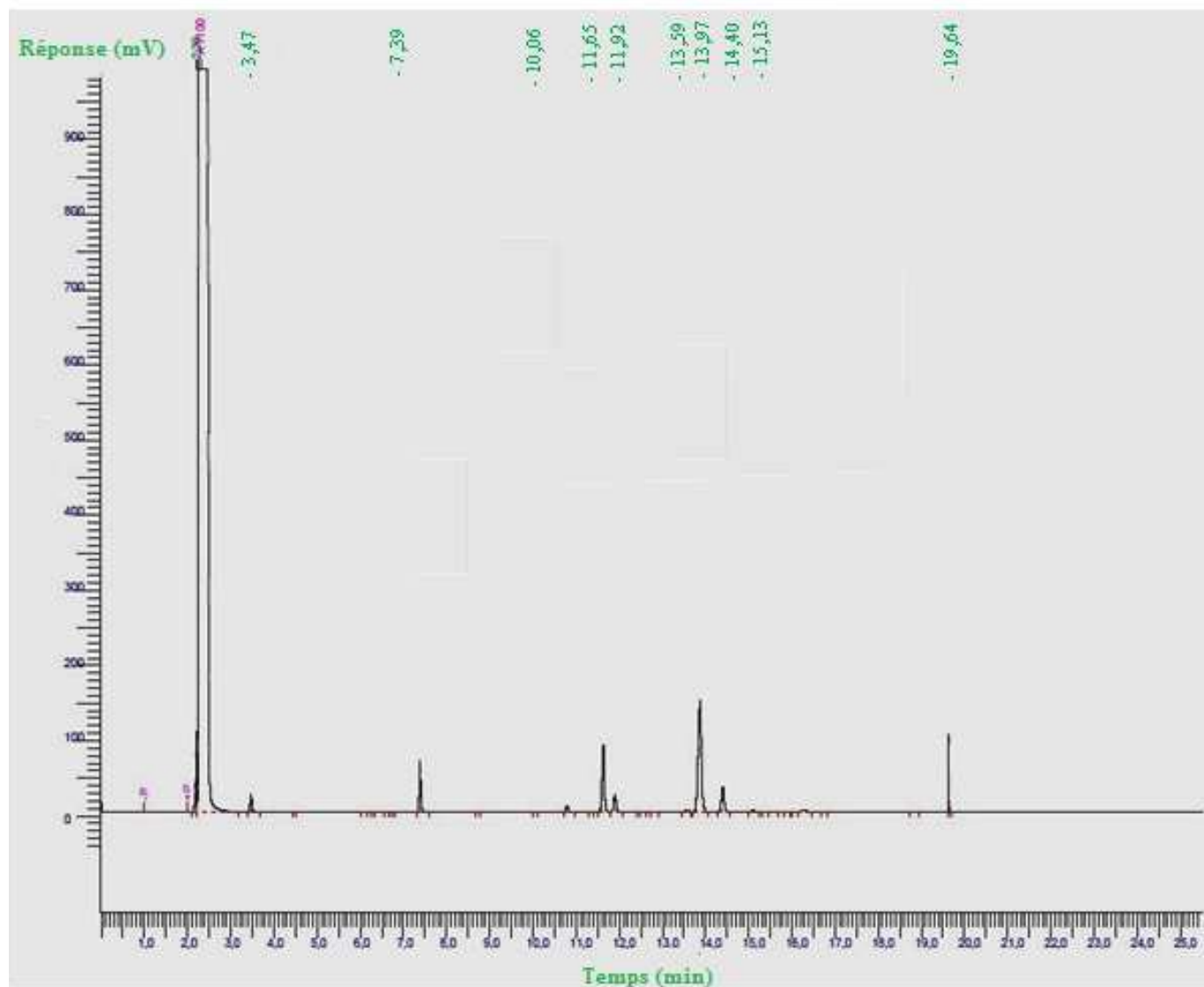


Figure A8 : Chromatogramme de l'huile d'avocat pour la détermination de la composition en phytostérols par CPG-FD



Légende	
Temps de rétention (min)	Composés
2,2	isooctane
3,47	inconnu
7,39	Acide décanoïque
10,06	Acide myristique
11,65	Acide palmitique
11,92	Acide palmitoléique
13,59	Acide stéarique
13,97	Acide oléique
14,40	Acide linoléique
15,13	Acide linoléique
19,64	inconnu

Figure A9 : Chromatogramme de l'huile d'avocat pour la détermination des acides gras par CPG-FD

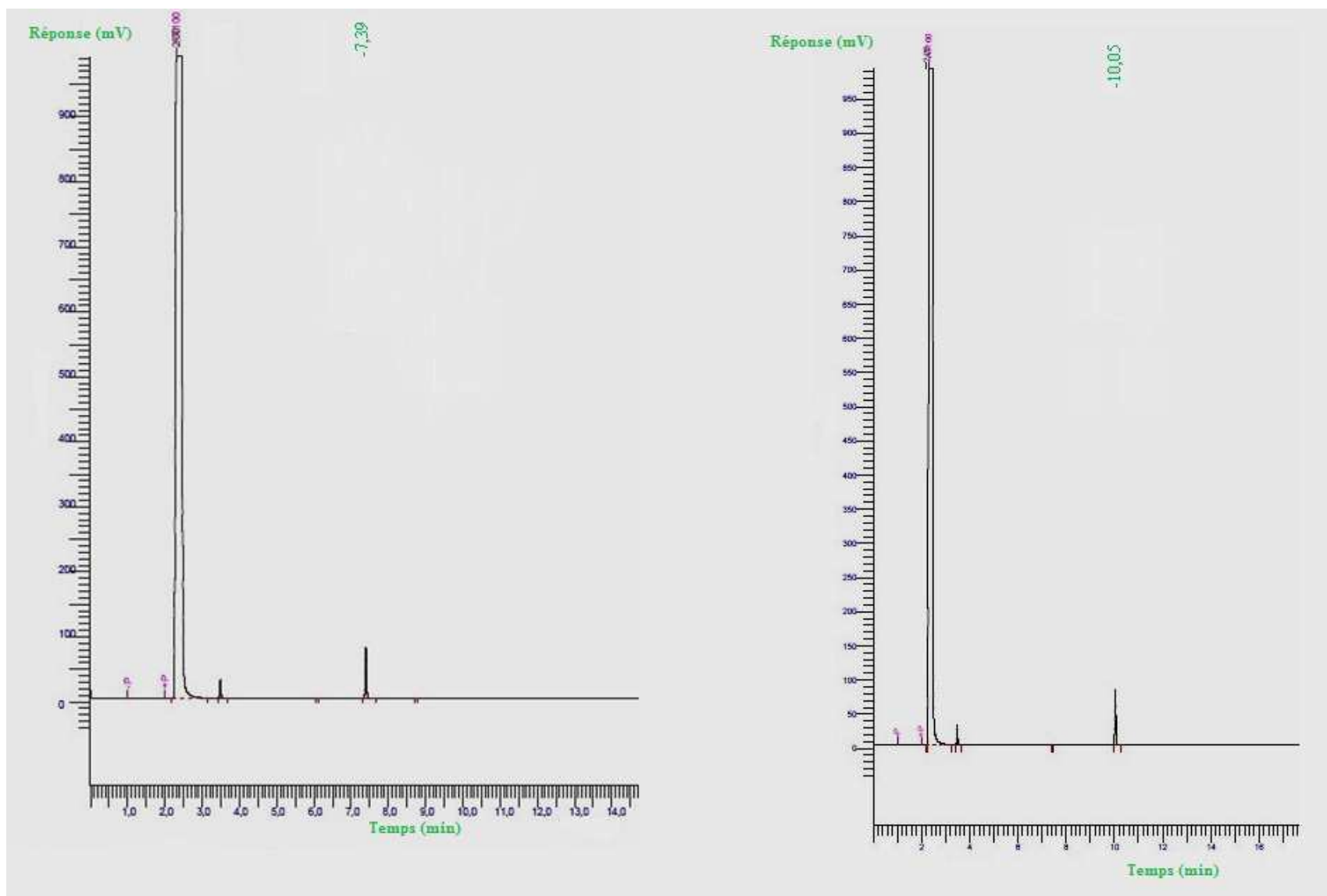


Figure A10 : Chromatogrammes du décanoate de méthyle (7,39 min) à gauche et du myristate de méthyle (10,05 min) à droite par CPG-FD

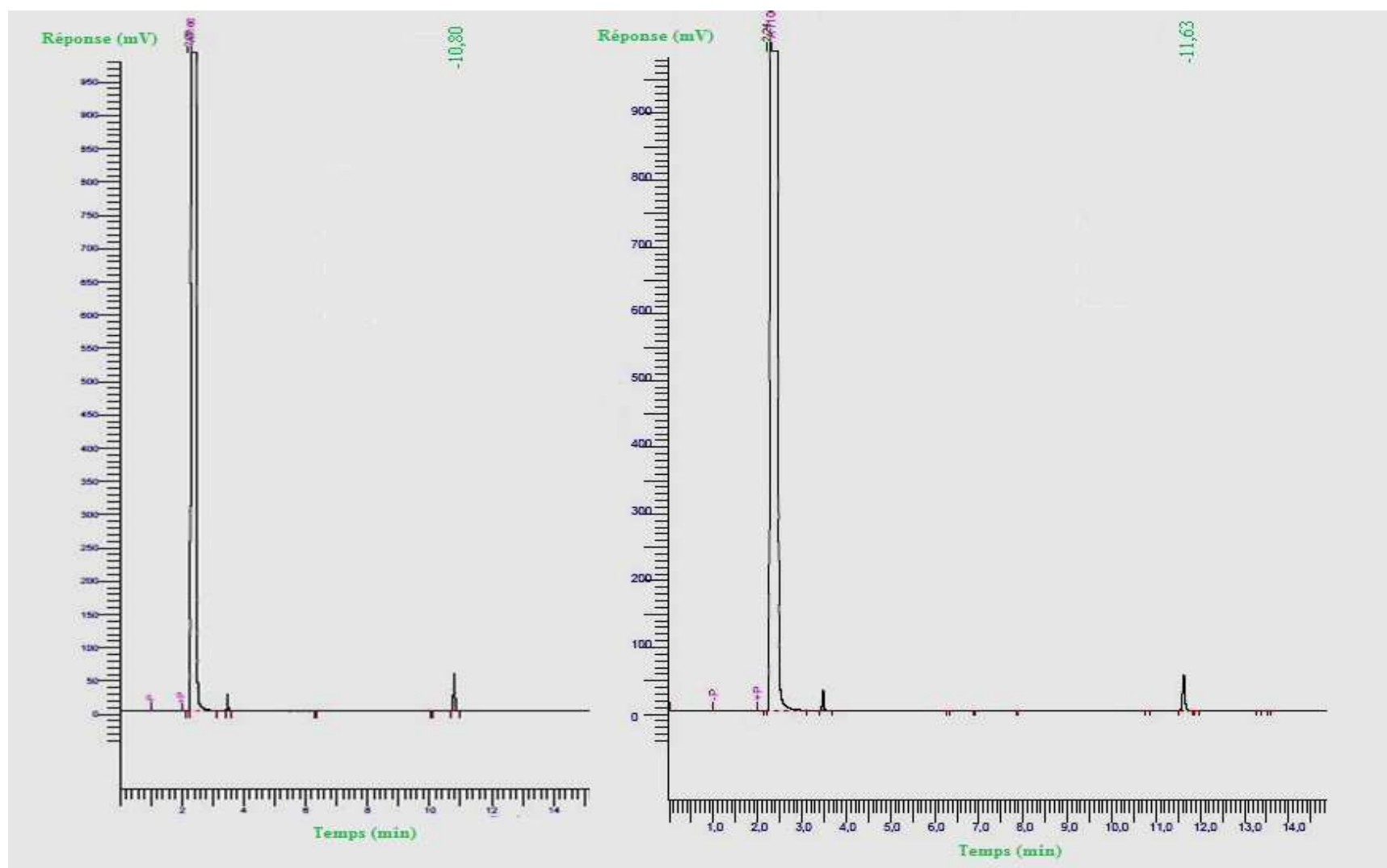


Figure A11 : Chromatogrammes du pentadécamoate de méthyle (10,80 min) à gauche et du palmitate de méthyle (11,63 min) à droite par CPG-FD

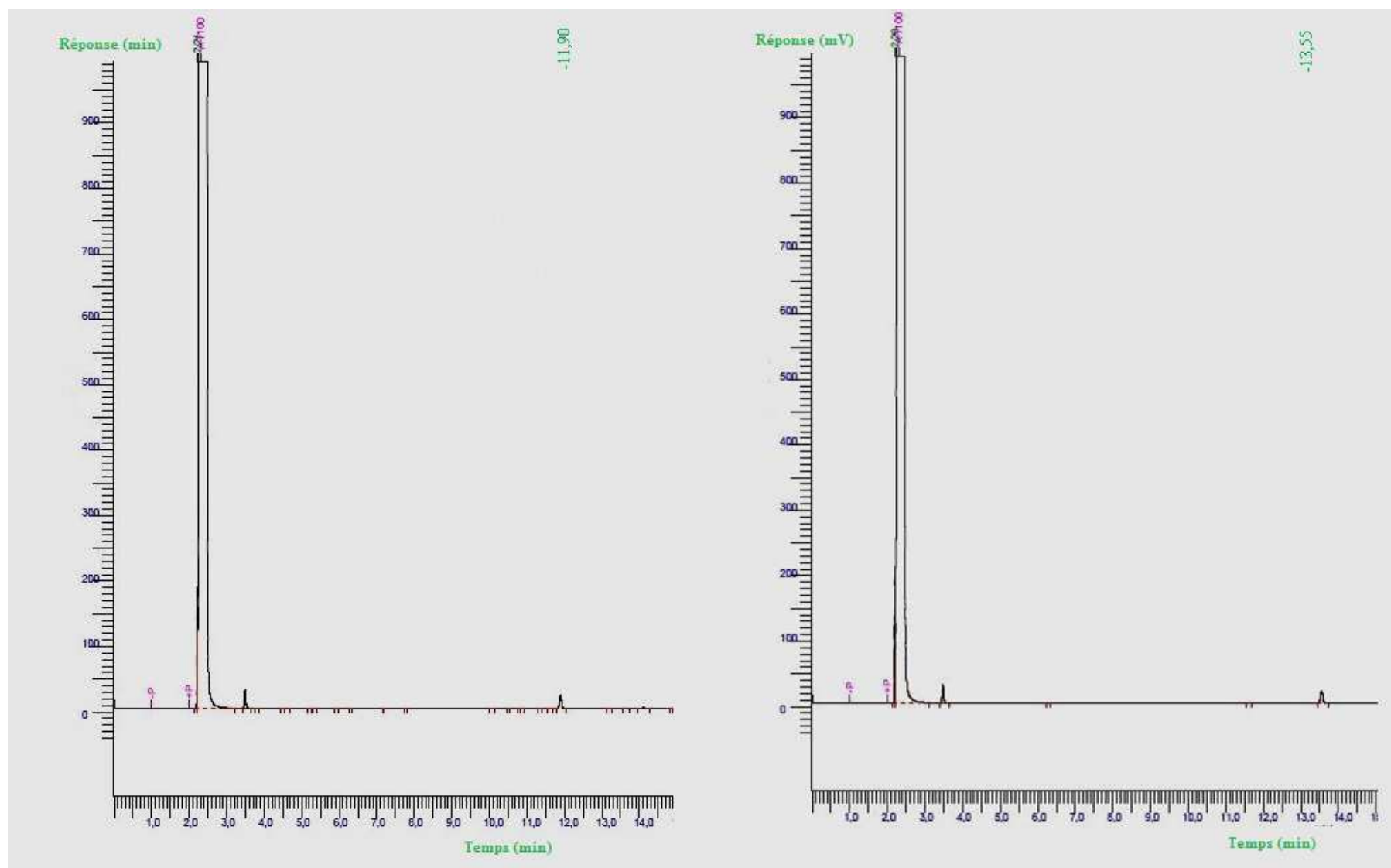


Figure A12 : Chromatogrammes du palmitoléate de méthyle (11,90 min) à gauche et du stéarate de méthyle (13,55 min) à droite par CPG-FD

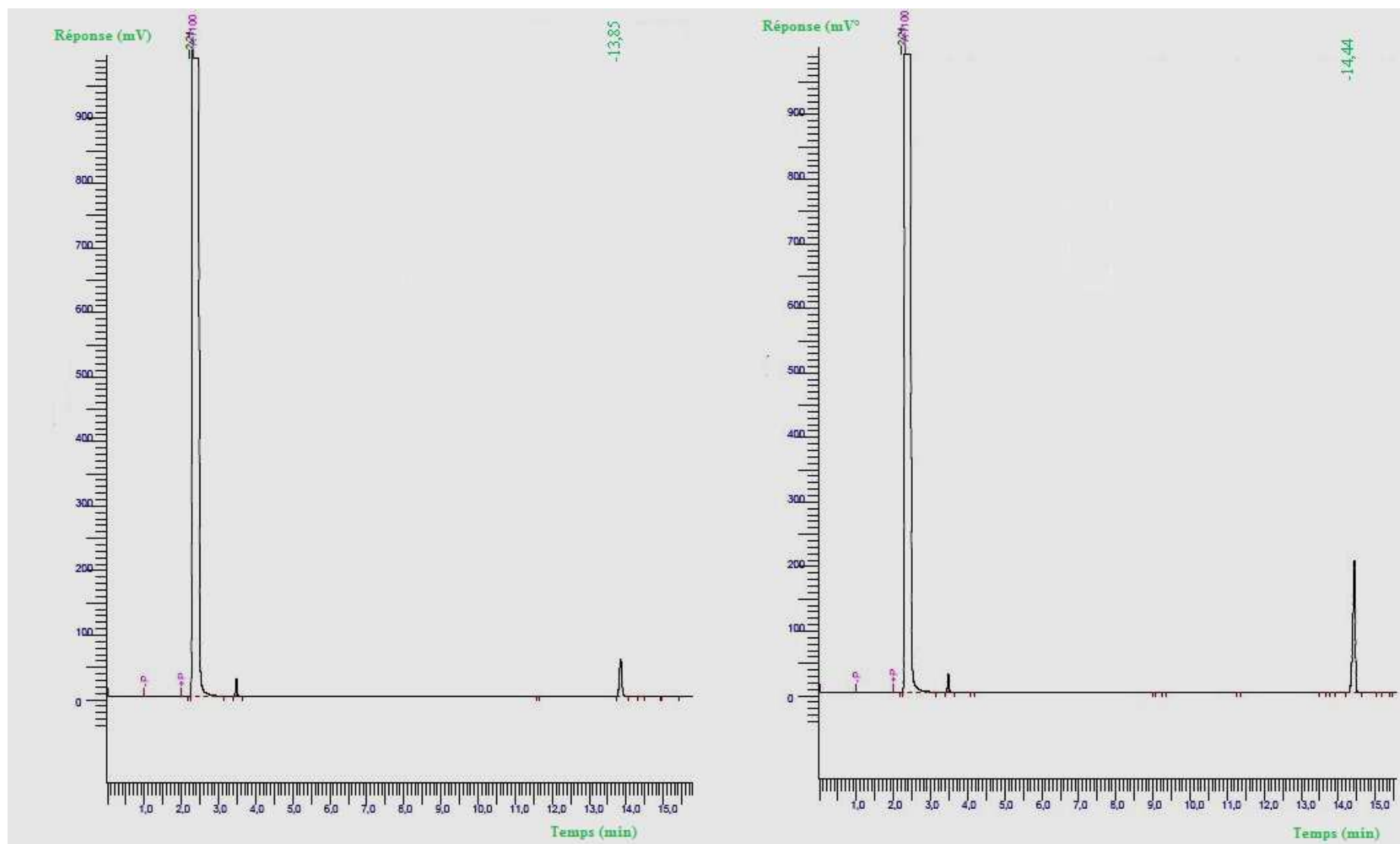


Figure A13 : Chromatogrammes de l'oléate de méthyle (13,85 min) à gauche et du linoléate de méthyle (14,44 min) à droite par CPG-FD

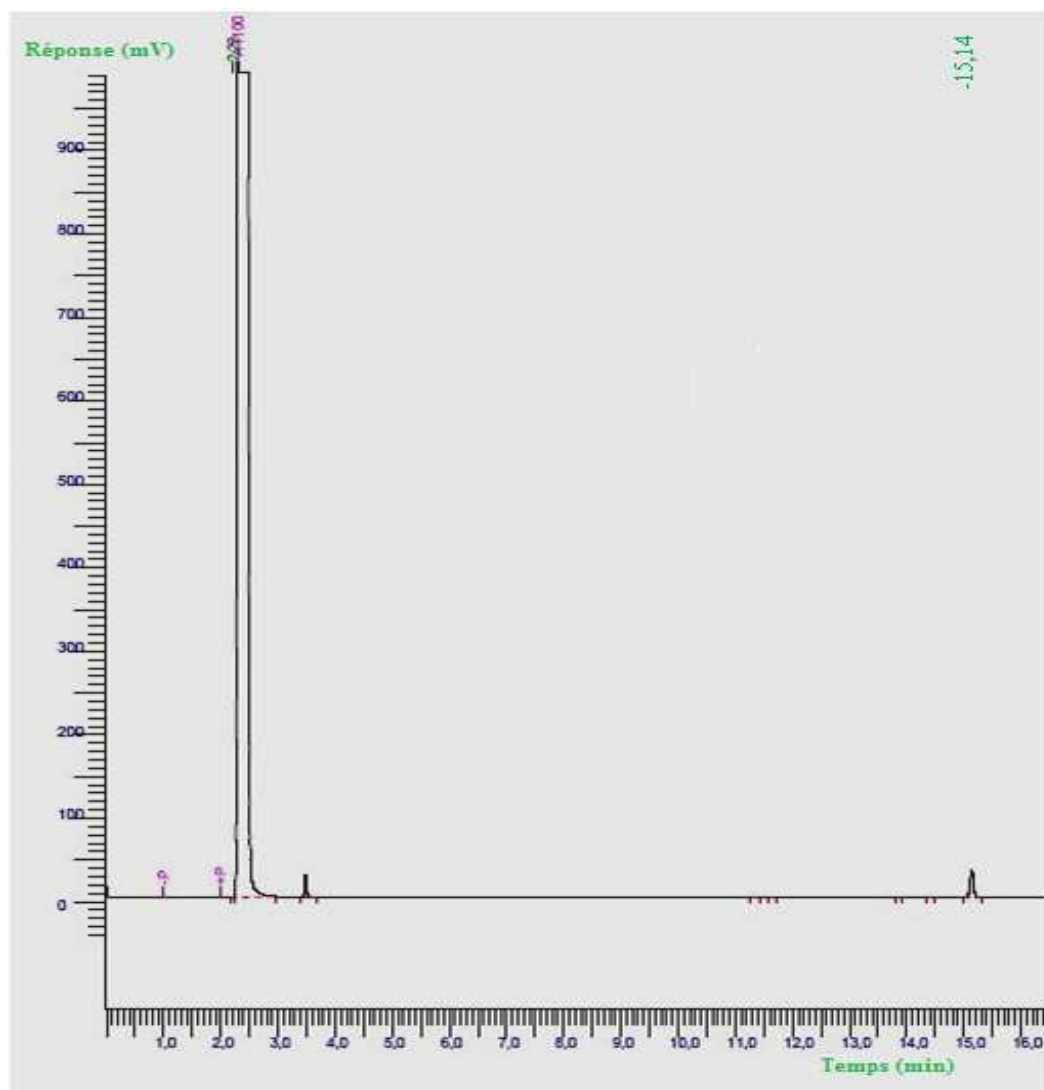


Figure A14 : Chromatogramme du linoléate de méthyle (15,14 min) par CPG-FD

PUBLICATIONS



“Gheorghe Asachi” Technical University of Iasi, Romania



MULTI-RESPONSE OPTIMIZATION OF AQUEOUS OIL EXTRACTION FROM FIVE VARIETIES OF CAMEROON-GROWN AVOCADOS

Brice Ulrich Saha Foudjo^{1,2*}, Germain Kansci¹, Elie Fokou¹, Iuliana Mihaela Lazar²,
Pierre-Yves Pontalier^{3,4}, François-Xavier Etoa¹

¹University of Yaoundé I, Department of Biochemistry, PO Box 812 Yaoundé, Cameroon

²“Vasile Alecsandri” University of Bacau, Department of Chemical and Food Engineering,
157 Calea Marasesti, 600115 Bacau, Romania

³INRA, UMR 1010, F-31432 Toulouse, France

⁴Université de Toulouse, INPT, ENSIACET, Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle,
4 Allée Emile Monso, F-31432 Toulouse, Cedex 4, France

Abstract

Production of avocado oil could be a way of reducing avocado *post*-harvest losses in Cameroon. The optimization of extraction of oil from five varieties of avocado was conducted using the Response Surface Methodology (RSM). The five varieties were *Booth 7*, *Booth 8*, *Collinson*, *Hickson* and *Lula*. The extraction efficiency (EE) was investigated with respect to four variables: temperature (T), time (t), pH and water-to-pulp ratio (WPR). A two-level full factorial design was used to develop regression models for the responses, and the desirability function of the multiple response surface methodology to determine the optimal conditions of extraction of the five cultivars. The results showed that the extraction efficiency was linearly affected by the variables depending on the variety. The optimal conditions were found to be 45°C, 180 min, 4.5 and 6 respectively for the temperature, time, pH and water-to-pulp ratio with the extraction efficiencies ranging from 7.86 to 31.42% of fresh, mature and ripe sample.

Key words: aqueous extraction, avocado oil, full factorial design, multiple response methodology

Received: August, 2012; *Revised final:* December, 2012; *Accepted:* December, 2012

* Author to whom all correspondence should be addressed: e-mail: sahabrice@yahoo.fr; Phone: 0023799262269

1. Introduction

The production of avocado in Cameroon has significantly increased during 1962 to 2010 (FAOSTAT, 2010). However, since few years, it has been noticed that local markets have oriented their demands towards some specific varieties, leaving aside others that are less appreciated by consumers. If nothing is done, the consequence will be the increase of Cameroon-grown avocado *post*-harvest losses that will lead to the disappearance of these underutilized varieties. One way of resolving this issue would be the production of avocado oil.

Oil content of avocado (*Persia americana* Mill.) varies from 2.5 to 30% depending on the race, the cultivars, the time in the season, the picking time, the length of storage and the climatic growing conditions (Gomez-Lopez, 1998; 1999; 2002).

Several researchers have investigated avocado oil production using aqueous methods, supercritical gas methods, solvent and enzyme-assisted extractions (Bizimana et al., 1993; Schwartz et al., 2007; Botha, 2008). Among all those techniques, aqueous extraction is the least pollutant and cheapest, despite its low yield.

Water extraction has already been investigated in Cameroon by Kameni and Tchamo (2003) and has been shown to possess interesting oil yield.

Response surface methodology (RSM), as an effective tool for optimizing the process, is usually employed when many factors and interactions affect the desired response (Triveni et al., 2001). RSM is an effective statistical technique for the investigation of complex processes with the main advantage of reducing the number of experimental runs required to provide sufficient information for statistically acceptable results. RSM has successfully been applied for the optimization of the different extraction conditions (Li et al., 2005; Tiezheng et al., 2010; Wani et al., 2006; Yi et al., 2011).

Optimization of the multi-response problem is a challenge to optimize output responses all together. The desirability function that is one of the approaches was originally developed by Harrington (1965) to simultaneously optimize the multiple responses and was later modified by Derringer and Suich (1980) to improve its practicality.

In this work, our purpose is to use Response Surface Methodology to improve the avocado oil extraction efficiency of the aqueous extraction method. The main goal is to redefine the aqueous extraction procedure of avocado oil in accordance with producers' limitations and environmental concerns.

2. Material and methods

2.1. Raw material preparation and pre-treatment

Five fresh, mature and unripe fruits of cultivars of avocado namely: *Hickson*, *Booth 8*, *Booth 7*, *Lula* and *Collinson*, were harvested on the farm of the National Research Institute of Agriculture and Development (IRAD) in Fombot, Cameroon

and carried to the laboratory. They were cleaned to remove dust and dirt, and kept at 4°C prior to experimentation. Before the experiments, the avocados were allowed to ripe at room temperature; seed and skin were discarded and the pulp was kept for utilization.

2.2. Moisture and oil contents of fresh avocado pulp

Fresh avocado fruit was sliced, the seed discarded and 25 g of the flesh chopped in a porcelain mortar and dried at 80°C in an oven to constant weight.

Moisture content (%) (Eq. 1):

$$W = \frac{M_0 - M}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

where M_0 is the initial weight of the fresh sample and M is the final weight of the dried sample.

For oil content determination, 5 g of dried flesh was ground and the oil extracted with hexane for 24 h in a Soxhlet apparatus.

Oil content, on wet basis (%) (Eq. 2):

$$S_0 = \frac{(100 - W) \cdot Z}{Y} \quad (2)$$

where W is the calculated moisture content, (%); Z is the weight of extracted oil (g), and Y is the weight of dried flesh sample, (g).

2.3. Efficiency of aqueous extraction

The protocol of Bizimana et al. (1993) was modified. Fresh avocado pulp (5 g) was crushed in a porcelain mortar and placed in 100 ml beaker. Distilled water was introduced to get the expected water-to-pulp ratio and the pH of the mixture was adjusted. The whole solution was heated to the desired temperature at constant stirring velocity (stirrer C-MAG HS 7IKAMAG) during the defined time. After the heating was completed, the mixture was centrifuged for 5 min at 3000 rpm (centrifuge Labofuge 200) and three phases were obtained: a hydrophobic liquid phase on the top (avocado oil), an insoluble phase (solid phase) in the medium and a hydrophilic liquid phase at the bottom (residual water). The supernatant (phase on the top) was recovered using a Pasteur pipette and a second cycle of centrifugation was held for the latter to remove contaminants (solid fraction). The supernatant (avocado oil) was again recovered, weighed and kept in a dark bottle. Extraction Efficiency (%) (Eq. 3):

$$EE = \frac{S}{S_0} \times 100 \quad (3)$$

where S_o is the calculated oil content (%) in fresh avocado flesh, extracted by hexane, and S is the calculated oil content (%) obtained by aqueous extraction using the Eq. 4:

$$S = \frac{\text{Quantity of oil recovered}}{\text{Quantity of pulp used}} \cdot 100 \quad (4)$$

2.4. Experimental design, statistical analysis and robustness of the models

The response surface methodology (RSM) was used to estimate the effect of independent variables: temperature (T) (45°– 55°C), pH (4.5 – 5.5), time (t) (120 – 180 min) and water-to-pulp ratio (WPR) (4 – 6) on the extraction efficiency (%). A two-level, four-factor factorial design augmented with 5 center points was employed for designing the experimental data. The randomized design was run in a single block with the statistical procedure presented by (Koocheki et al., 2009; Myers and Montgomery, 2002).

The software, Statgraphics plus 5.00, was utilized to assess statistical analyses of the models. The following first order monomial equation was applied (Eq. 5):

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \dots + \alpha_k X_k + \varepsilon \quad (5)$$

where α_0 (constant term), α_1 , α_2 , α_3 and α_4 (linear effects) and ε the observed residual. The adequacy of the model was addressed for each response by the analysis of variance (ANOVA), the lack-of-fit test, coefficient of variation (CV), Mallows Cp statistic, R-squared and adjusted-R-squared represented at 0.01 and 0.05 levels of significance.

Optimal extraction conditions were maximized over the studied region by the Multiple Response optimization process using the desirability function applying the weighted geometric mean with the following expression Derringer (1994) (Eq. 6):

$$D = (d_1^{w_1} x d_2^{w_2} x \dots x d_i^{w_i})^{1/\sum w_i} \quad (6)$$

where D is the overall desirability function to be maximized, d_i is the individual desirability function of each response function and w_i is the relative weight of the i th response.

EE was then tested under the specified optimal conditions. Each set of experiment was conducted in triplicate, and the experimental and predicted values were compared using the correlation coefficient (R), in order to examine the validity of the model.

3. Results

3.1. Water and lipid contents

Water and lipid contents of the pulp of different cultivars are presented in Table 1.

Table 1. Evaluation of the water and lipid contents of the pulp of the five avocado cultivars

Avocado cultivars	Water content (%)	Lipid content for 100 g of fresh matter (%)
Booth 7	82.12 ± 0.75 ^{bc}	12.34 ± 2.38 ^b
Booth 8	84.27 ± 5.24 ^c	9.44 ± 0.44 ^a
Collinson	78.09 ± 0.64 ^{ab}	12.33 ± 0.14 ^b
Hickson	81.43 ± 1.34 ^{bc}	10.64 ± 0.88 ^{ab}
Lula	75.97 ± 0.63 ^a	15.52 ± 0.56 ^c

NB: values carrying the same letter in the same column are not statistically significant ($p > 0.05$)

From the table above, we observed that water content of the avocados' pulp varied between 75.97% to 84.27% and lipid content from 9.44% to 15.52%. Cultivars *Lula* and *Collinson* have the lowest water content while *Booth 8* and *Hickson* exhibit the lowest lipid content. Cultivar *Lula* has the highest lipid content. There is a negative link between water content and lipid content ($R = -0.891$) that means the more the avocado is watery the less it is greasy.

3.2. Model fitting

Our experimental design was constructed on Yates algorithm and, regression analysis and ANOVA were used for fitting the model and to examine the statistical significance of the terms.

Variance analysis indicates that the selected variables used in the model are significant ($P \leq 0.05$). In the case of *Booth 7* and *Booth 8*, only the temperature was significant, while temperature and time were for *Collinson*; and all the variables were for *Hickson* and *Lula*.

The lack of fit is an indication of the failure for a model representing the capacity of the experimental data to fit the regression models (Montgomery, 2001). If there is a significant lack of fit which in our case is indicated by a low probability value, this will mean that either non significant independent variables were introduced in tested equation or a more complex model (a second order equation for instance) should be used to describe the phenomenon going on. The lack of fit illustrated in Table 2, did not result in a significant p-value for the selected variables, meaning that these models were sufficiently accurate for predicting the relevant responses.

Coefficient of determination, R^2 , is the proportion of variation in the response attributed to the model rather than to random error and was suggested that for a good fitted model, R^2 should not be less than 80%. When R^2 approaches to the unity, signifies the suitability of fitting empirical model to the actual data. The lower value of R^2 shows the

inappropriateness of the model to explain the relation between variables (Little and Hills, 1978; Mendenhall and Sincich, 1989). It should be noted that adding a variable to the model will always increase R^2 , regardless of whether the additional variable is statistically significant or not. Thus, a large value of R^2 does not always imply the adequacy of the model. For this reason, it is more appropriate to use in addition an adj- R^2 that should be close to its related R^2 and the Mallows C_p statistic that should be smaller as possible to select the best subset of predictors that will be used in the model and evaluate the model adequacy.

Our results showed that the R^2 values for these response variables were higher than 0.80, except EE_2 ($R^2 = 0.7320$), indicating the regression models were suitable to explain the behavior (Table 2). The adj- R^2 values were found to be very close to their corresponding R^2 for all the responses. The smallest value of Mallows C_p statistics was found to be in accordance with the subset of predictors identified by the R^2 and the adj- R^2 . This indicated that non significant terms have not been included in the model. Moreover, coefficient of variation (CV) describes the extent to which the data were dispersed. As a general rule, the coefficient of variation (CV) should not be greater than 10%. Daniel (1991) reported that a high CV indicates that variation in the mean value is high and does not satisfactorily develop an adequate response model. Our results showed that the coefficients of variation were less than 6% for all the responses, representing a better precision and reliability of the conducted experiments (Table 2).

3.3. Effect of parameters on the extraction efficiencies

The first order equations below were fitted with each of the five responses where EE_1 is for *Booth7*, EE_2 for *Booth8*, EE_3 for *Collinson*, EE_4 for *Hickson* and EE_5 for *Lula* (Eq. 7 - 11):

$$EE_1 = 19.6805 - 8.3468 * T \quad (7)$$

$$EE_2 = 16.8886 - 6.5016 * T \quad (8)$$

$$EE_3 = 11.8642 + 5.6468 * T + 2.4432 * t \quad (9)$$

$$EE_4 = 21.2406 - 4.85197 * T - 0.317199 * t - 0.387688 * pH + 0.505169 * WPR \quad (10)$$

$$EE_5 = 29.6821 + 3.7291 * T + 1.0229 * t - 3.9868 * pH + 2.3599 * WPR \quad (11)$$

We found from these model equations that the cultivars of avocado behaved differently to the selected operational parameters. Temperature was present in all the models and was the most significant parameter based on the regression coefficients (8.3468, 6.5016, 5.6468 and 4.85197) except in Eq. 11, then come water-to-pulp ratio (WPR), time and pH. The effect of temperature in avocado from the same region of study, 45° to 55°C, varied depending on the cultivar. It was negative in *Booth 7* and *Hickson* but positive in *Booth 8*, *Collinson* and *Lula*. The same observations were made for WPR that was found to have a negative impact in *Booth 7* and positive one in the rest of the cultivar. The time, on its turn, was negative in *Hickson* but positive in *Collinson* and *Lula*. The pH had only an effect in *Hickson* and *Lula* where it was negative. These results are also graphically observed on Fig. 1.

3.4. Optimization and validation of the optimal conditions

Raissi and R-Eslami Farmi (2009) stated that the desirability lies between 0 and 1 and it represents the closeness of a response to its ideal value. If a response falls within the unacceptable intervals, the desirability is 0, and if a response falls within the ideal intervals or the response reaches its ideal value, the desirability is 1. Meanwhile, when a response falls within the tolerance intervals but not the ideal interval, or when it fails to reach its ideal value, the desirability lies between 0 and 1. The more closely the response approaches the ideal intervals or ideal values, the closer the desirability is to 1. We were able to compute a desirability of 0.96 that is very close to 1 as shown in Fig. 2 below. This means that we have approached the ideal conditions of oil extraction of our varieties. In addition, we were able to come out with the combination of factor levels that maximizes the desirability function over the indicated region for the five cultivars. The results were: Temperature 45°C, time 180 min, pH 4.5 and WPR 6. We also noticed that in general, pH and temperature have exhibited their lowest values whereas time and WPR their highest values.

To validate the above results, experiments under the optimized conditions with the five cultivars were conducted using the values in Table 3 and the extraction efficiencies obtained compared to the predicted values. From this comparison, we had a high correlation coefficient of 0.98 (Table 3).

Table 2. Significance (*p*-value) of regression coefficients and lack of fit test for the dependent variables of oil extraction

	<i>EE</i> ₁	<i>EE</i> ₂	<i>EE</i> ₃	<i>EE</i> ₄	<i>EE</i> ₅
Model	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
α_1	0.0001**	0.0034**	0.0004**	0.0002**	0.0000**
α_2	0.4565	0.4575	0.0083**	0.0184*	0.0066**
α_3	0.9383	0.5111	0.2478	0.0001**	0.0032**
α_4	0.1668	0.2896	0.2721	0.0009**	0.0012**
Lack of fit	0.9349	0.7671	0.2013	0.0722	0.1924
R ²	0.8829	0.7320	0.8031	0.9946	0.8989
adj-R ²	0.8768	0.7180	0.781	0.993	0.87
Cp statistic	1.32	2.67	2.65	5.0	5.0
CV	3.1	4.29	5.57	0.25	0.78

*Significant at 0.05 level

**Significant at 0.01 level

Table 3. Observed and predicted extraction efficiencies for the validation of optimum conditions

Varieties	Extraction Efficiency				
	Booth 7	Booth 8	Collinson	Hickson	Lula
Predicted values (%)	28.03	23.39	8.66	26.67	33.33
Observed values (%)	25.03 ± 0.21	23.91 ± 0.12	7.86 ± 0.28	26.11 ± 0.14	31.42 ± 0.96

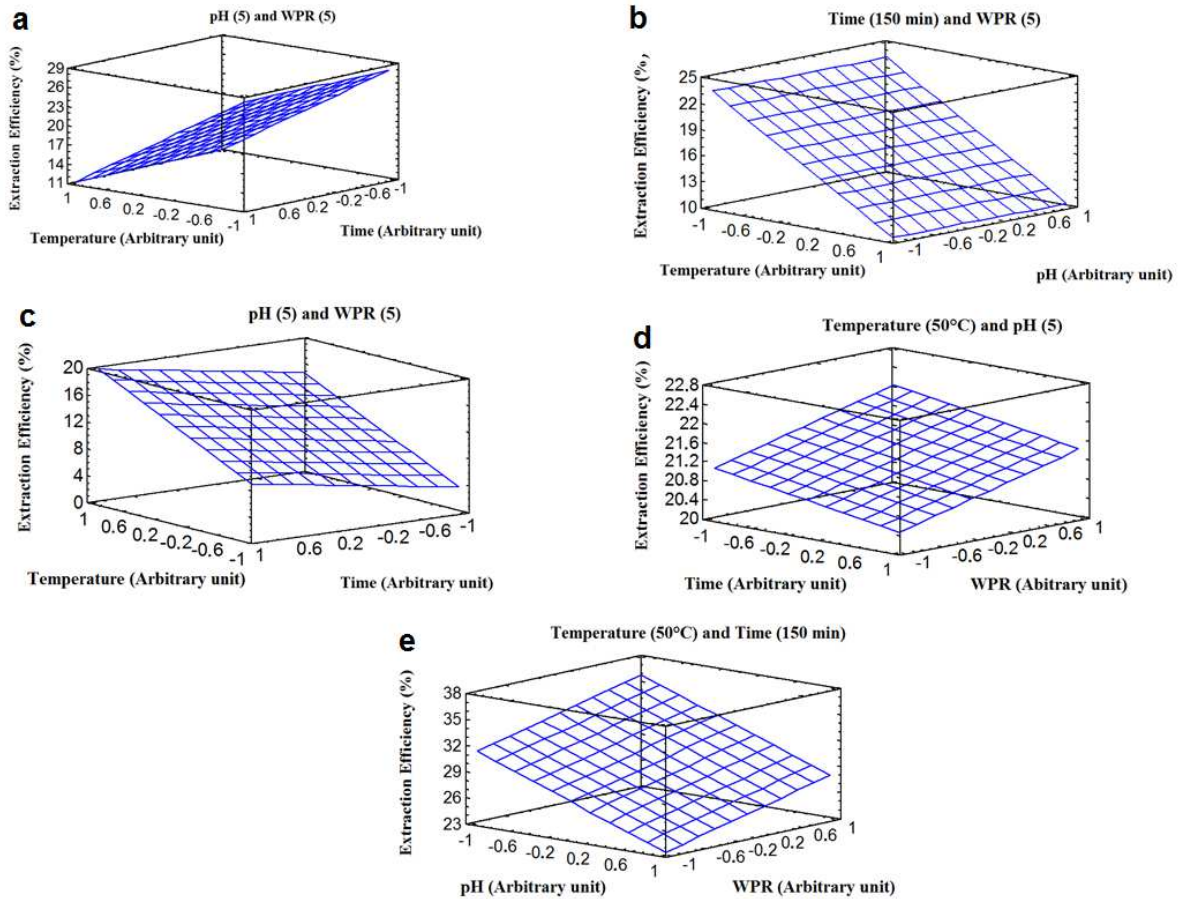


Fig. 1. Representation of the extraction efficiencies of the five avocado cultivars versus two of the parameters while two of them were kept constant: (a) *Booth 7*, (b) *Booth 8*, (c) *Collinson*, (d) *Hickson* and (e) *Lula*.

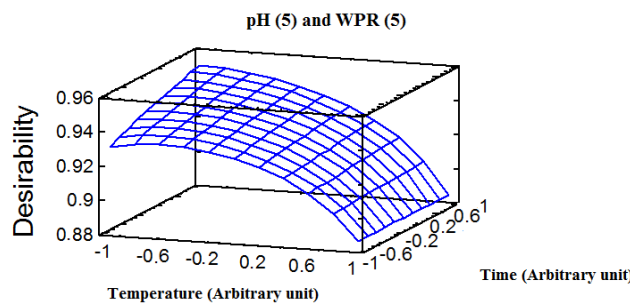


Fig. 2. Desirability versus temperature and time (pH and WPR were maintained constant)

4. Discussion

The order of importance in which the parameters intervened globally in the models had also been observed by (Koocheki et al., 2009) during the optimization of the extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds.

Temperature, in this optimization process, had the lowest value over the defined region, which can be misunderstood as it is known to increase the extraction yield based on the positive relationship that exists between the temperature and the molecular diffusivity in the Stokes-Einstein equation (Wilke and Chang, 1955). However, a study reported that for sesame, sunflower and canola seeds, 40°C was found to be the optimum when marketed enzymes (Natuzyne and Kemzyme) were employed during oil production using aqueous extraction assisted by enzymes.

No oil yield enhancement was observed above 50°C (Latif, 2009). This is interesting if the range of 40 – 50°C seems to be the optimal activity point of these commercial hydrolytic enzymes as Platt Aloia et al. (1980) have reported that avocado cells also contain endogenous cell wall hydrolytic enzymes that were suggested to be involved in ripening associated with a massive breakdown of cell walls. Temperature, 45°C, should have induced this same breakdown during our extraction and therefore improved on oil release. Above 45°C, denaturation might have started to take place.

The impact of the pH in the extraction process depends on the nature of the protein present during the extraction. In fact, proteins, when charged, are able to stabilize oil-in-water emulsion and therefore reduce the availability of oil for recovery which contributes to the reduction of the extraction yield as described by (Rosenthal et al., 1996). This phenomenon does not take place at the overall isoelectric point of the proteins. From this consideration, it could be assimilate the pH 4.5 as the isoelectric point of the proteins or a close value in the isoelectric region in the pulp cells of the five cultivars.

Water-to pulp ratio, which is one of the most important factors, has globally increased the extraction efficiency. This was also observed by (Aderemi and Umar, 2008) who had demonstrated that the volume of solvent had a positive effect on the hexanic extraction of lima oil. This could be

explained by the fact that pouring a large amount of water on the plant will establish a great difference of hydraulic pressure between the two compartments that will provoke fluid movement from the plant material and at the same time oil release as shown by (Ganou, 1993). Moreover, water-to-pulp ratio is selected so as to obtain less stable emulsion and generate less effluent; however to obtain the highest extraction rates and yield, it is usually necessary to use large quantities of water (Latif, 2009). Buenrostro and Lopez-Munguia (1986) reported that maximum oil yield of avocado oil was obtained with 5:1 water-to-solvent ratio using aqueous extraction while we obtained a close value of 6:1.

Time was shown to increase the extraction efficiency of avocado oil. This same assertion was observed by (Embong and Jelen, 1977) during rapeseed oil extraction. Finding the exact extraction time, as 180 min in our case, is essential, as a longer time could foster some chemical reactions such as hydrolysis, hydration, deprotonation and cyclization that could significantly increase the stabilization of water-to-oil emulsion and reduce oil recovery (Morin and Richard, 1985).

The oil yield of the different avocado cultivars were better than that of Buenrostro and Lopez-Munguia (1986) who using the aqueous extraction without optimizing, had a yield of 2%. This has shown the importance of response surface methodology in oil yield improvement. New eco-extraction approaches that have provided satisfactory results, have always yielded products valuable in pharmaceutical and food industries as it was the case of capsaicin (Popescu et al., 2011; Vaszilcsin et al., 2010). Thus, our extraction technique will be a good way of producing avocado oil for industrial uses.

5. Conclusion

The response surface methodology was efficient to determine the optimal conditions of aqueous extraction of the five cultivars of avocado. The ideal conditions (desirability 0.96) with the following parameter values: Temperature 45°C, pH 4.5, time 180 min and water-to-pulp ratio 6 are enough to improve their extraction efficiencies.

This friendly environmental methodology could successfully be employed on the other varieties of avocado to define the extraction optima.

Acknowledgement

We are grateful to the National Research Institute of Agriculture and Development (IRAD) in Fombot, Cameroon for providing us with avocado varieties, to the Romanian Government and the AUF (Agence universitaire de la Francophonie) who funded the internship of Brice Ulrich SAHA FOU DJO.

References

- Aderemi O.M., Umar G.M., (2008), Extraction and characterization of oil from Lima beans using 23 full factorial designs, *Assumption University Journal of Technology*, **12**, 86-91.

- Bizimana V., Breene W.M., Csallany A.S., (1993), Avocado oil extraction with appropriate technology for developing countries, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **70**, 821-822.
- Botha B.M., (2008), Supercritical fluid extraction of avocado oil, *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, **27**, 24-27.
- Buenrostro M., Lopez-Munguia C.A., (1986), enzymatic extraction of avocado oil, *Biotechnology Letters*, **8**, 505-506.
- Daniel W.W., (1991), *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*, 5th Edition, New York Wiley.
- Derringer G., (1994), A balancing act: Optimizing a product's properties, *Quality Progress*, **27**, 51-57.
- Embong M.B., Jelen P., (1977), Technical feasibility of aqueous extraction of rapeseed oil - a laboratory study, *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, **10**, 239-243.
- FAOSTAT, (2010), Production of avocados by country, Food and Agriculture Organization, The United Nations, Rome, Italy, On line at: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Ganou L., (1993), Contribution to the study of fundamental mechanisms of hydrodistillation of essential oils, (in French), PhD thesis, Institut National Polytechnique, Toulouse, France.
- Gomez-Lopez V.M., (1998), Characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) Varieties of low oil content, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **46**, 3643 - 3647.
- Gomez-Lopez V.M., (1999), Characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) varieties of low oil content, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **47**, 2707-2710.
- Gómez-López V.M., (2002), Fruit characterization of high oil content avocado varieties, *Scientia Agricola*, **59**, 403-406.
- Harrington E., (1965), The desirability function, *Industrial Quality Control*, **21**, 494-498.
- Kameni A., Tchamo P., (2003), Water extraction of avocado oil in the high lands of Cameroon, *Tropical Science*, **42**, 10 - 12.
- Koocheki A., Taherian A.R., Razavi S.M.A., Bostan A., (2009), Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity, hue and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds, *Food Hydrocolloids*, **23**, 2369-2379.
- Latif S., (2009), *Analytical investigations to compare the enzyme-assisted extraction of vegetable oils with conventional methods*, PhD thesis, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.
- Li Q.H., Fu C.L., (2005), Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein, *Food Chemistry*, **92**, 701-706.
- Little T.M., Hills F.J., (1978), *Agricultural Experimentation*, New York, Wiley.
- Mendenhall W., Sincich T., (1989), *Multiple regression, In: A Second Course in Business Statistics, Regression Analysis*, 3rd Edition, Dellen Publishing Co, San Francisco, USA.
- Montgomery D.C., (2001), *Design and Analysis of Experiments*, 5th Edition, John Wiley and Sons, Inc, New York, USA.
- Morin P., Richard H., (1985), *Thermal degradation of linalyl acetate during steam distillation*, Proc. 4th Weurman Symposium on Progress in Flavour Research, 563-576.
- Myers R., Montgomery D.C., (2002), *Response surface methodology*, 2nd Edition, John Wiley and Sons Inc., New York, USA.
- Platt-Aloia K.A., Thomson W.W., Young R. W., (1980), Ultrastructural changes in the walls of ripening avocados: transmission, scanning, and freeze fracture microscopy, *Botanical Gazette*, **141**, 366-373.
- Popescu C., Fitigau F., Segneanu A., Balcu I., Martagiu R., Vaszilcsin C.G., (2011), Separation and characterization of anthocyanins by analytical and electrochemical methods, *Environmental Engineering and Management Journal*, **10**, 697-701.
- Raissi S., R-Eslami Farsani, (2009), Statistical process optimization through multi-response surface methodology, *International Journal of Computational and Mathematical Sciences*, **3**, 291 - 295.
- Rosenthal A., Pyle D.L., Niranjana K., (1996), Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction, *Enzyme Microbial Technology*, **19**, 402-420.
- Schwartz M., Olaeta J.A., Undurraga P., Costa V., (2007), Performance improvement of avocado oil extraction, (in Spanish), Proc. 6th World Avocado Congress (Actas VI Congreso Mundial del Aguacate), Viña Del Mar, Chile.
- Tiezheng M., Qiang W., Haiwen W., (2010), Optimization of extraction conditions for improving solubility of peanut protein concentrates by response surface methodology, *LWT - Food Science and Technology*, **43**, 1450-1455.
- Triveni R., Shamala T.R., Rastogi N.K., (2001), Optimized production and utilization of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*, *Process Biochemistry*, **36**, 787-795.
- Vaszilcsin C.G., Segneanu A.-E., Balcu I., Pop R., Fitigău F., Mirica M.-C., (2010), Eco-friendly extraction and separation methods of capsaicines, *Environmental Engineering and Management Journal*, **9**, 971-976.
- Wani A.A., Sogi D.S., Grover L., Saxena D.C., (2006), Effect of temperature, alkali concentration, mixing time and meal solvent ratio on the extraction of watermelon seed proteins-response surface approach, *Biosystems Engineering*, **94**(1), 67-73.
- Wilke D.R., Chang P., (1955), Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions, *American Institute of Chemical Engineers Journal*, **1**, 264-270.
- Yi S., Bingjian D., Ting Z., Bing H., Fei Y., Rui Y., Xiaosong H., Yuanying N., Quanhong Li., (2011), Optimization of extraction process by response surface methodology and preliminary structural analysis of polysaccharides from defatted peanut (*Arachis hypogaea*) cakes, *Carbohydrate Research*, **346**, 305-310.



“Gheorghe Asachi” Technical University of Iasi, Romania



ATR-FTIR CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF AVOCADO OILS FROM FIVE CAMEROON CULTIVARS EXTRACTED WITH A FRIENDLY ENVIRONMENTAL PROCESS

Brice Ulrich Saha Foudjo^{1,2}, Germain Kansci¹, Iuliana Mihaela Lazar^{2*}, Gabriel Lazar³,
Elie Fokou¹, François-Xavier Etoa¹

¹University of Yaoundé I, Cameroon, Department of Biochemistry, PO Box 812 Yaoundé, Cameroon

²Department of Chemical and Food Engineering,

³Department of Mechanical and Environmental Engineering,

“Vasile Alecsandri” University of Bacău, 157 Calea Mărășești, 600115 Bacău, Romania

Abstract

Avocado *post*-harvest losses and cultivar-oriented trade are relevant issues in Cameroon that affect producers and retailers incomes. Identifying specific chemical characteristics of avocado oils would give an added value to underutilized species. Five avocado varieties, *Booth 7*, *Booth 8*, *Collinson*, *Hickson* and *Lula*, were subjected to aqueous extraction and the Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed Infrared spectrometry coupled with chemometrics (ATR-FTIR) profile of their extracted oils was analyzed to express their variability in terms of structural composition. The results showed that the oils have characteristic peaks within the region 900 to 1300 cm^{-1} that could be exploited in food control: 1167 cm^{-1} for *Booth 7*, 1164 cm^{-1} for *Booth 8*, 1157 cm^{-1} for *Collinson*, 1162 cm^{-1} for *Hickson*, 1164 cm^{-1} for *Lula* and 1165 cm^{-1} for the commercial oil which was used to compare. Principal Component Analysis used to classify the avocado oils based on their degree of unsaturation and their carboxyl ester group show similarity between *Booth 7* and *Collinson* oil, *Booth 8* and *Hickson* oil while *Lula* oil is totally different. This means that oils in the same cluster could be used for the same purpose in industries on chemical bases and identify during adulteration control on spectroscopic bases. Thus, ATR-FTIR spectrometry coupled with chemometrics have shown that neglected and appreciated avocados varieties share some similar properties that could be exploited by industries.

Key words: ATR-FTIR spectrometry, avocado oil, cultivars, principal component analysis

Received: September, 2012; *Revised final:* December, 2012; *Accepted:* December, 2012

* Author to whom all correspondence should be addressed: e-mail: ilazar@ub.ro; Phone: +40.234542411; Fax: +40.234545753

1. Introduction

Avocado is a tropical and subtropical fruit that is also cultivated in Cameroon. It is worldwide produced and its oil has a fatty acid profile very similar to olive oil. A typical avocado oil has 76% monounsaturated (oleic and palmitoleic acids), 12% polyunsaturated (linoleic and linolenic acids), and 12% saturated (palmitic and stearic acids) fatty acids. The main antioxidant in the oil is α -tocopherol, which is present at levels of 70–190 mg/kg oil. β -, γ -, and δ -tocopherols are only present in minor amounts (<10 mg/kg oil). Other non-lipid components present in the oil include chlorophylls (11–19 mg/kg oil) and carotenoids (1.0–3.5 mg/kg oil) (Wong et al., 2010). However, this composition and the corresponding physicochemical properties are said to be affected by the extraction methods, the race, the cultivars, the time in the season, the picking time, the length of storage and the climatic growing conditions (Moreno et al., 2003; Requejo-Tapia, 1999).

This variability in composition and in physicochemical characteristics came along with excellent therapeutic properties. Many studies have revealed that avocado oil is also used as an emollient, protector and regenerator in cosmetics (Rabasco and Rodriguez, 2000). The rheological properties of emulsion of avocado pulp oil with whey protein concentrate is said to be stable during storage for up to 2 months at room temperature (Logaraj et al., 2008). Avocado unsaponifiable material is said to inhibit prostate cancer cell growth and heal degenerative joint diseases (Lu et al., 2005; Verbruggen, 2006).

Gaillard (1987) has reported that farmers growing avocado in the western highlands of Cameroon had difficulty managing the surplus of fruits as they were perishable and transportation was limited. This situation is still persisting nowadays and if nothing is done, avocado *post*-harvest losses will increase and stakeholders will be facing financial worries as Teliz (2000) has reported that the economic and social importance of avocado resides in the benefit that its cultivation gives to producers, marketers, processors, and consumers. Turning the composition-based fluctuation stated above into an opportunity by directing each avocado cultivar to a specific use based on what property makes each of them unique, will be a way of challenging *post*-harvest losses and diversifying avocado uses.

Criteria to select avocado varieties have changed in recent times. Formerly, organoleptic properties were a key feature in the decision, but nowadays the new uses of avocado, for example, as a raw source of oil (Southwell et al., 1990), have changed the criteria and opened new possibilities for this crop (Swisher, 1988). Many of these avocado varieties have been studied to date and classified in four categories using pulp oil amount as an assortment criterion (Gomez-Lopez, 1998, 1999, 2002). On our knowledge until now, no classification has been developed based on the molecular structure of their lipids.

Several publications have reported the application of chemometrics techniques applied to

Fourier Transformed Infrared (FTIR) spectral data for quantitative analysis of certain plant and oils (Harmanescu et al., 2012). The presence of hazelnut oil (Groselj et al., 2008), sunflower and corn oils (Özdemir and Öztürk, 2007), sunflower, soybean, sesame, and corn oils (Vlachos et al., 2006), and palm oil (Rohman and Che Man, 2010) has been analyzed using FTIR spectroscopy combined with chemometrics techniques. This technique has proved to have several advantages because of its low cost, simple sample preparation and reduced analysis time in comparison with other instrumental techniques such as gas chromatography (GC) or High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Beltran et al., 2009).

The aim of the study is to compare the ATR-FTIR footprints and detect the similarity in terms of lipid structure of the five avocado oils extracted and a commercial oil using ATR-FTIR spectrometry coupled with chemometrics in order to increase available information on avocado cultivars and permit producers, scientists and industries to choose specific varieties according to their objectives.

2. Material and methods

2.1. Raw material preparation and pre-treatment

Five fresh, mature and unripe cultivars of avocado namely: *Hickson*, *Booth 8*, *Booth 7*, *Lula* and *Collinson*, were harvested on the farm of the National Research Institute of Agriculture and Development (IRAD) in Foumbot, Cameroon and carried to the laboratory. They were cleaned to remove dust and dirt, and kept at 4°C prior to oil extraction experimentation (Saha et al., 2012). Before the experiments, the avocados were allowed to ripe at room temperature; seed and skin were discarded and the pulp was kept for utilization.

2.2. Aqueous extraction of avocado oil

The protocol described by Saha et al. (2012) was used in this experimentation because of environmental concerns. Fresh avocado flesh (5 g) was crushed in a porcelain mortar and placed in 100 mL beaker. Distilled water was introduced to get the expected water-to-pulp ratio. The pH of the mixture was adjusted; the whole was heated to the desired temperature and time at constant stirring (stirrer C-MAG HS 7IKAMAG).

After the heating was completed, the mixture was centrifuged for 5 min at 3000 rpm (centrifuge Labofuge 200) and three phases were obtained: a hydrophobic liquid phase on the top (avocado oil), an insoluble phase (solid phase) in the medium and a hydrophilic liquid phase at the bottom (residual water).

The supernatant (phase on the top) was recovered using a Pasteur pipette and a second cycle

of centrifugation was held for the latter to remove contaminants (solid fraction). The supernatant (avocado oil) was again recovered, weighed and kept in a dark bottle.

2.3. ATR-FTIR spectra acquisition of the avocado oils and treatment

A FTIR spectrometer model Tensor 27 from Bruker, Germany equipped with a Deuterated Triglycerine Sulfate (DTGS) detector was used to collect Attenuated Total Reflectance (ATR) spectra of the oils and air background with a resolution of 8 cm^{-1} at 264 scans. $20\ \mu\text{l}$ of oil were deposited with a micropipette, creating a thin layer. After spectrum record, the crystal surface was cleaned with a soft paper wetted in ethanol to avoid cross-contamination between samples.

Commercial avocado oil (Bioleane, France, certified organic by Ecocert SEE Ltd., UK -ECO-007) was used as reference. All spectra were recorded between 4000 and 400 cm^{-1} in triplicate, and processed with the software OPUS Version 6.0.

2.4. Chemometric analysis of spectra

The principal component analysis PCA was carried out to evaluate the similarity of samples in terms of the ATR-FTIR spectra and characteristic subsets. The similarity between samples was evaluated to find principal components that shape well the essential features of the oils. ATR-FTIR spectra were treated using the software Origin Pro 8.5.1 to identify these subsets and PCA analysis was conducted using the Unscrambler version 9.7, Camo, Norway software.

The mathematical treatment of raw spectral data was made before making the calibration models for chemometric analyzed in order to improve the quality of the prediction models. The baseline was corrected and the absorbance data were scaled in order to set the minimum and maximum between 0 and 1, respectively (San-Blas et al., 2011; San-Blas et al., 2012). The spectrum was then smoothed with a 15-point adjacent averaging and 2 polynomial orders Savitzky-Golay method (Lazar et al., 2012).

The degree of unsaturation of lipids in the different oils was analyzed statistically using the One Sample T test (SPSS, version 20.0) at 95% of confidence level.

3. Results and discussion

3.1. Avocado extraction

The extraction of avocado oil from the different species gave oil yields of 3.46, 2.21, 1.07, 2.84 and 5.17 respectively for *Booth 7*, *Booth 8*, *Collinson*, *Hickson* and *Lula*. *Lula* has the highest

yield and *Collinson* the smallest (Saha et al., 2012). These results are better than that of Buenrostro and Lopez-Munguia (1986) with an oil yield of 2%.

3.2. ATR-FTIR analysis

3.2.1. Fingerprint region of avocado oils

Generally, spectrometric infrared analysis and its ATR-FTIR optimized version allows highlighting the specific “fingerprint” based on functional groups, as well as some chemical changes that take place during the oxidation process. The purpose of using this method is to study the ATR-FTIR specific fingerprint in order to characterize the oil extracts and identify the differences between samples at the molecular level. Fig. 1 reveals FTIR spectra of all investigated samples at fingerprint mid infrared region (900 - 1300 cm^{-1}). Assignments of the infrared bands (Table 1) corresponding to fingerprint region were made by comparison with literature data (Guillén and Cabo, 1997a; 1997b; Le Dréau et al., 2009; Lerma-García et al., 2011; Movasaghi et al., 2008; Rohman and Che Man, 2011; Sun, 2009). These spectra appear to be very alike even though their chemical composition varied. Slight differences consisting of displacement of peaks ($\sim 1157\text{ cm}^{-1}$ region) or even the absence of some ($\sim 1121\text{ cm}^{-1}$ region) were noticed. Some bands in oils and fats spectra were difficult to assign (Guillén and Cabo, 1997b).

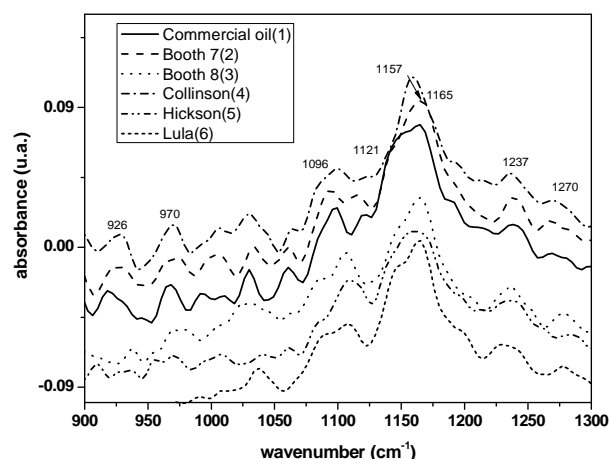


Fig. 1. Spectra of fingerprint region of avocado oils:

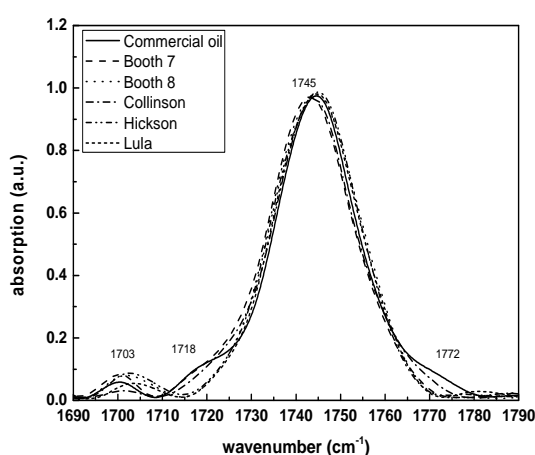
from 900 to 1300 cm^{-1}

For commercial oil, the fingerprint region includes characteristic bands at 918 , 966 , 1097 , 1165 , 1239 and 1267 cm^{-1} . The peak around 1165 cm^{-1} showing the highest intensity is considered as the characteristic peak of this commercial oil. For *Booth 7* oil, characteristic

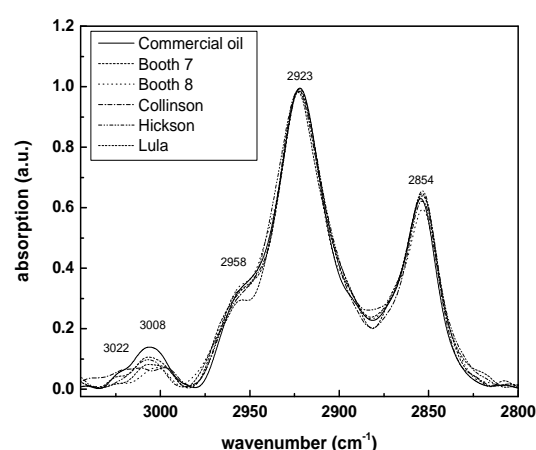
peaks appear at 924, 979, 1095, 1167, 1239 and 1268 cm^{-1} , and a specific peak is observed at 1167 cm^{-1} . The *Booth 8* oil shows in the fingerprint region characteristic bands with maximum absorption at 936, 970, 1105, 1164, 1237 and 1277 cm^{-1} ; a characteristic peak being observed at 1164 cm^{-1} . *Collinson* oil presents absorption bands at 927, 969, 1098, 1157, 1235 and 1271 cm^{-1} with a characteristic peak being observed at 1157 cm^{-1} . *Hickson* oil presents absorption bands 929, 954, 970, 1106, 1162, 1235 and 1284 cm^{-1} with a characteristic peak at 1162 cm^{-1} , while *Lula* oil presents absorption bands at 1036, 1105, 1143, 1164, 1229 and 1276 cm^{-1} , and a characteristic peak at 1164 cm^{-1} . These results support the idea that ATR-FTIR spectroscopy is a fingerprint technique in which the samples can be differentiated in terms of the number of peak and the peak intensities at fingerprint region (Rohman and Che Man, 2012).

Table 1. Assignment of ATR-FTIR absorption bands of avocado oils in fingerprint region 900-1300 cm^{-1}

Wavenumber (cm^{-1})	Function	Vibration	References
926	-HC=CH-(cis)	bending vibration out-of-plane	(Furlan et al. 2010, Le Dréau et al. 2009)
970	-HC=CH-(trans)	bending vibration out-of-plane	(Guillén and Cabo 1997b, Sun 2009)
1006	-HC=CH-(trans)	bending vibration out-of-plane	(Guillén and Cabo 1997b, Movasaghi et al. 2008, Sun 2009)
1027	C-O	stretching	(Le Dréau et al. 2009)
1060	C-O	stretching	(Lerma-García et al. 2011, Movasaghi et al. 2008)
1096	C-O	stretching	(Guillén and Cabo 1997a)
1121	C-O	stretching	(Rohman and Che Man 2011)
1145	C-O	stretching	(Lerma-García et al. 2011)
1157	C-O	stretching	(Le Dréau et al. 2009)
1165	C-O	stretching	(Le Dréau et al. 2009)
1237	C-O CH ₂	stretching or bending vibration out-of-plane	(Guillén and Cabo 1997b, Vlachos et al. 2006)
1270	CH ₂	twisting and wagging	(Guillén and Cabo 1997a, Lerma-García et al. 2011)



a



b

Fig. 2. FTIR spectra of avocado oils in 1690-1790 cm^{-1} region (a) and 2800-3050 cm^{-1} (b)

Table 2. Suggested chemical functional groups related to lipid molecular structure

Wavenumber (cm ⁻¹)	Function	Type of vibration	Assignments	References
1718	C = R OR	Stretching	Free fatty acids	(Guillén and Cabo 1997b)
1745	-C=O	Stretching	v(C=O)ester	(Guillén and Cabo 1997b, Sun 2009)
2853-2854	-C-H	Symmetric stretching	Asymmetric CH ₂ stretching vibration of methylene chains (lipids)	(Guillén and Cabo 1997b, Le Dréau et al. 2009, Movasaghi et al. 2008, Sun 2009)
2922-2923	-C-H	Asymmetric stretching	Asymmetric CH ₂ stretching vibration of acyl chains (lipids)	(Guillén and Cabo 1997b, Sun 2009)
2955	-C-H	Asymmetric stretching	Asymmetric CH ₃	(Guillén and Cabo 1997b, Movasaghi et al. 2008, Sun 2009)
3005-3006	=C-H(cis-)	Stretching	Unsaturated fatty acids	(Guillén and Cabo 1997b)
3025 (s)	=C-H(trans-)	Stretching	Unsaturated fatty acids	(Guillén and Cabo, 1997b)

The functional group assignments of all the spectral wave numbers related to 1700-1800 cm⁻¹ region and 2800-3050 cm⁻¹ region are given in Table 2. The spectra were normalized with respect to the CH₂ asymmetric stretching band. The olefinic acid band which is due to CH stretching mode of the HC=CH group can be used as a measure of

unsaturation in the acyl chains acting as indicator of unsaturated lipids (Abeysekara and Samadi, 2012; Saravanakumar et al., 2012).

It is not necessary to use pretreatments of raw data to highlight the vibrational band of olefinic acid (=CH) (~3010 cm⁻¹) as can be seen in Figs. 2b; 3a-b (Severcan et al., 2005).

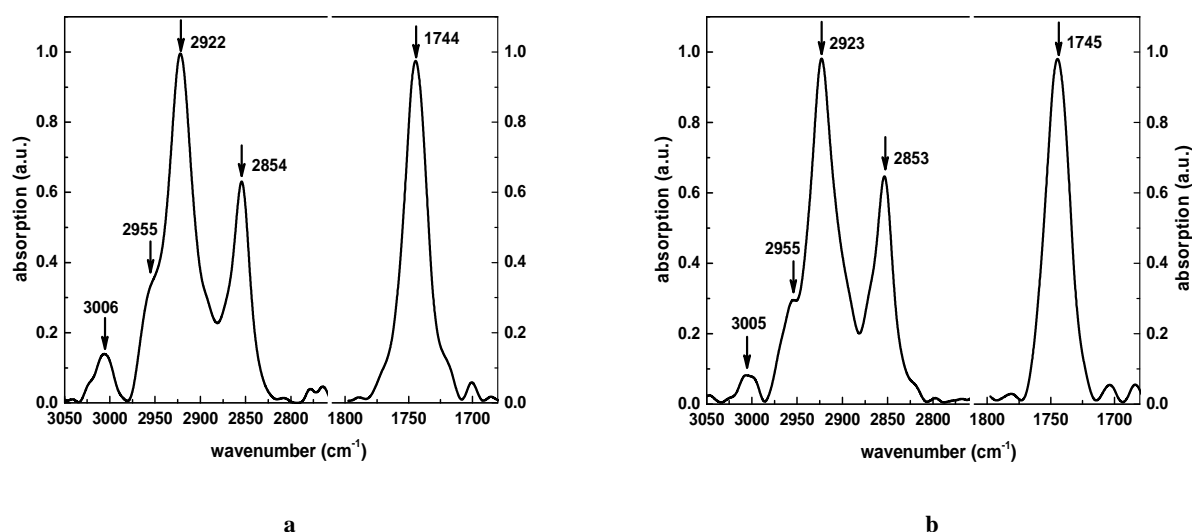


Fig. 3. Typical ATR-FTIR molecular spectrum in the region ca. 2800-3050 and 1700- 800 cm⁻¹ for commercial avocado oil (a) and for Lula oil (b) showing chemical functional groups related to lipid molecular structure

The degree of unsaturation of fats and oils was determined from the ratio of absorbance of the olefinic (3005 - 3006 cm⁻¹) and aliphatic (2857 cm⁻¹) CH stretching vibration bands (Guillén and Cabo, 1997b). These ratios differ significantly compared with the commercial oil sample ($df=5$, $p=0.009$). A profound investigation of this ratio will be made in another study.

3.3. Classification

Principal component analysis is a method which can be used for classification as well as for description and interpretation (Le Dréau et al., 2009). The mutual characteristics of all the spectra are modeled in one or more principal components for which the scores are not so different according to the

species. Moreover, the information that differentiates the species contributes to principal components whose scores are meaningful. Based on the scores and the characteristics of each species, a classification can be done (Le Dréau et al., 2009).

The classification of avocado oils regarding the degree of unsaturation was carried out using spectral regions at frequencies of 2800-3050 cm^{-1} , meanwhile frequencies at 1690-1790 cm^{-1} was exploited to describe variation of ester carbonyl absorption. The score plot shows the similarities and differences among the extracted oils samples. Samples close together on the score map are similar on the first two components (Esbensen et al., 2002).

The first classification model related to unsaturation degree was developed using the two PCs scores and an overall rate of 59.61% of correct classification was obtained by the model. In Fig. 4a, classification of avocado oil samples are categorized into four classes: high positive score (~ 0.09), medium positive score (~ 0.06), average score (~ 0.03) and high negative score (~ -0.15) using ATR-FTIR absorption signals measured at 66 wavelengths.

The score plots depicted a clear separation between commercial oil and extracted avocado oils. Indeed, the first component (33.30% of the total variance) was able to separate the commercial oil, characterized by highest negative scores values (~ -0.15), from all other samples.

The principal component PC1 differentiates better the oils into four groups (33.30% of the variance) (Fig. 4). Commercial avocado oil has a negative score; *Booth 7* and *Collinson* oils have approximately zero score, while *Hickson*, *Booth 8* and *Lula* oils have different positive scores. This component is possibly related to the total unsaturation as can be seen in the loading plot (Fig. 5). It is noted that the loading of PC1 has the strongest contribution in the region from 2800–3050 cm^{-1} , and concretely to $\sim 3008 \text{ cm}^{-1}$, the characteristic region of CH stretching in cis-olefins.

On PC1 axis, the groups are highlighted: the first is *Lula* oil, the second are *Hickson* and *Booth 8* oils, the third *Booth 7* and *Collinson* oils and the fourth is Commercial avocado oil (Fig. 4).

The space defined by the two first components (Fig. 6) matches the spectral data in which wavelengths were between 1690 cm^{-1} and 1790 cm^{-1} and account for 91.34% of the variance. From a preliminary examination of the spectra performed by PCA, it was observed two very different coherent clusters of cases, which were completely separated from each other and mainly distributed along the PC1. However, the principal component PC1 according to the scores distinguishes better the oils related to variation of ester carbonyl absorption into four groups (Fig. 6), with different scores: the first group includes *Booth 8* oil and *Hickson* oil, the second group includes *Lula* oil, the third group includes Commercial oil, and the last group includes *Booth 7* and *Collinson*. The largest loading values of

the PC1 corresponded to spectral data in which wavelengths were $\sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ (Fig. 7).

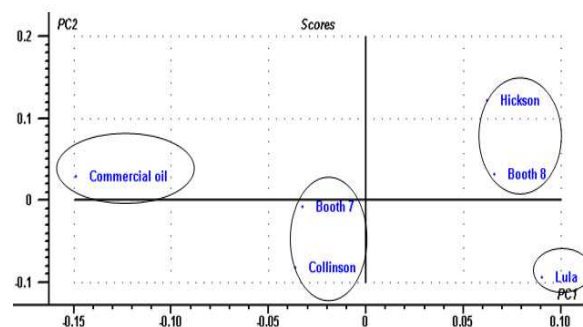


Fig. 4. The score plot discriminating the unsaturation degree found in the analyzed oil samples. Principal components PC1 and PC2 in 2800-3050 cm^{-1} region explain 33.30 % and 26.31% of the total spectral variation, respectively

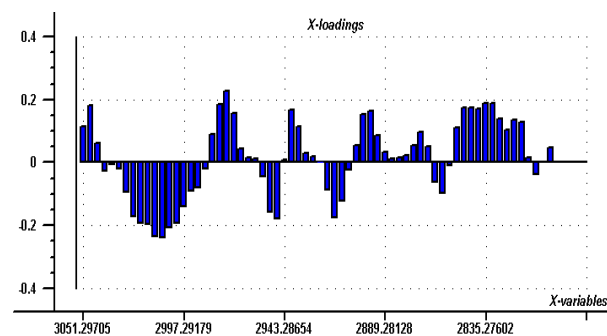


Fig. 5. Loading plot of spectral variables corresponding to PC1 in the region from 2800–3050 cm^{-1}

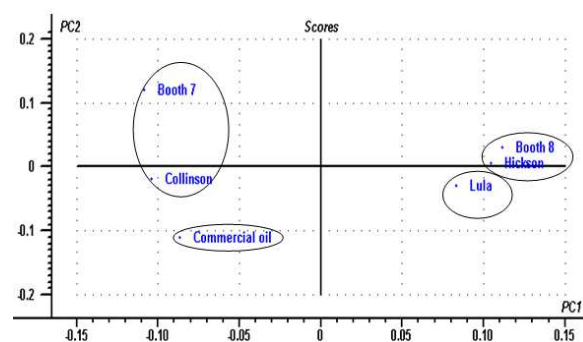


Fig. 6. The score plot discriminating the variation of ester carbonyl absorption found in the analyzed oil samples. Principal component one PC1 and PC2 explain 61.61 % and 30.27 % of the total spectral variation, respectively

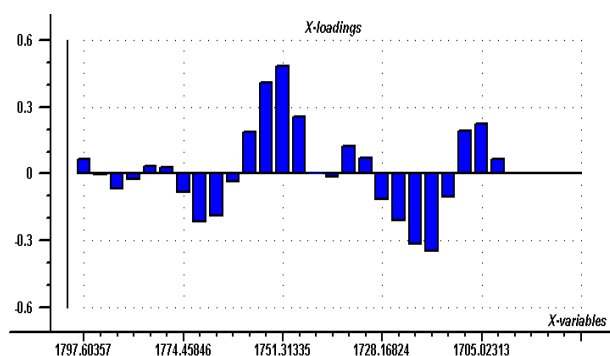


Fig. 7. Loading plot of spectral variables corresponding to PC1 in the region from 1690 cm^{-1} to 1790 cm^{-1}

This important peak was also reported by San-Blas et al. (2011) to cluster nematode samples. We could appreciate that the difference is given by the different quantity in carboxylic group of esters attributed to $\sim 1746\text{ cm}^{-1}$.

4. Conclusion

ATR-FTIR spectrometry has shown that each avocado cultivar has a characteristic peak within the region 900 to 1300 cm^{-1} . The characteristic spectral band of carboxylic group of esters attributed to 1746 cm^{-1} has been observed to constitute the main basis of classification. Thus, ATR-FTIR spectrometry coupled with chemometrics is a valuable tool for discrimination and analytical control of avocado oil extracted from various cultivars.

It is sustainable to use the obtained spectra associated with chemometric results in a further study in order to reveal: classification in relationship to their origin; visible adulterations relevant to avocado-based food quality control; the impact of geographic region of the growing area and the climatic influences for sustainable avocado agriculture that will lead to intensive, diversified and ecological production of avocado oils.

Acknowledgement

The authors are grateful to the “Agence universitaire de la Francophonie (AUF)” that has granted us the Eugen Ionescu scholarship to carry out this study.

References

Abeyssekara S., Samadi Y.P., (2012), Response and sensitivity of lipid related molecular structure to wet and dry heating in Canola tissue, *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **90**, 63-71.

Beltran Sanahuja A., Prats Moya M.S., Maestre Perez S.E., Grane Teruel N., Martin Carratala M.L., (2009), Classification of four almond cultivars using oil degradation parameters based on FTIR and GC data, *Journal of the American Oil Chemist' Society*, **86**, 51–

58.

Buenrostro M., Lopez-Munguia C.A., (1986), Enzymatic extraction of avocado oil, *Biotechnology Letters*, **8**, 505-506.

Esbensen K.H., Guyot D., Westad F., Houmøller L.P., (2002), *Multivariate Data Analysis in Practice, An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design*, Aalborg University, Esbjerg, Denmark.

Furlan P.Y., Wetzel P., Johnson S., Wedin J., Och A., (2010), Investigating the oxidation of biodiesel from used vegetable oil by FTIR spectroscopy: used vegetable oil biodiesel oxidation study by FTIR, *Spectroscopy Letters*, **43**, 580-585.

Gaillard J.P., (1987), *Avocado: Its Culture, Its Products* (in French), Maison Neuve et Larose, Paris, France.

Gomez-Lopez V.M., (1998), Characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) varieties of low oil content, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **46**, 3643 - 3647.

Gomez-Lopez V.M., (1999), Characterization of avocado (*Persea americana* Mill.) varieties of low oil content, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **47**, 2707-2710.

Gómez-López V.M., (2002), Fruit characterization of high oil content avocado varieties, *Scientia Agricola*, **59**, 403-406.

Groselj N., Marjan Vracko M., Fernández Pierna J.A., Baeten V., Novic M., (2008), The use of FT-MIR spectroscopy and counter-propagation artificial neural networks for tracing the adulteration of olive oil, *Acta Chimica Slovenica*, **55**, 935–941.

Guillén M., Cabo N., (1997a), Characterization of edible oils and lard by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Relationships between composition and frequency of concrete bands in the fingerprint region, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74**, 1281-1286.

Guillén M.D., Cabo N., (1997b), Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **75**, 1-11.

Harmanescu M., Moisuc A., Gergen I., (2012), FTIR spectroscopy - a nondestructive method to monitor the impact of different fertilizers on the floristic matrix of permanent grassland, *Environmental Engineering and Management Journal*, **11**, 351-357.

Lazar G., Ureche D., Ifrim I.L., Stamate M., Ureche C., Nedeff V., Nistor I.D., Finaru A.L., Lazar I.M., (2012), Effects of the environmental stress on two fish populations revealed by statistical and spectral analysis, *Environmental Engineering and Management Journal*, **11**, 109-124.

Le Dréau Y., Dupuy N., Gaydou V., Joachim J., Kister J., (2009), Study of jojoba oil aging by FTIR, *Analytica Chimica Acta*, **642**, 163-170.

Lerma-García M.J., Simó-Alfonso E.F., Bendini A., Cerretani L., (2011), Rapid evaluation of oxidized fatty acid concentration in virgin olive oil using Fourier-transform infrared spectroscopy and multiple linear regression, *Food Chemistry*, **124**, 679-684.

Logaraj T.V., Bhattacharya S., Sankar K.U., Venkateswaran G., (2008), Rheological behaviour of emulsions of avocado and watermelon oils during storage, *Food Chemistry*, **106**, 937–943.

Lu Q.Y., Arteaga J.R., Zhang Q., Huerta S., Go V.L.W., Heber D., (2005), Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **16**, 23–30.

- Moreno A.O., Dorantes L., Galiández J., Guzmán N.R.I., (2003), Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea americana* Mill.) oil, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **51**, 2216-2221.
- Movasaghi Z., Rehman S., Rehman D.I., (2008), Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, **43**, 134-179.
- Özdemir D., Öztürk B., (2007), Near infrared spectroscopic determination of olive oil adulteration with sunflower and corn oil, *Journal of Food and Drug Analysis*, **15**, 40-47.
- Rabasco A.M., Rodriguez G.M.L., (2000), Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations, *Grasas y aceites*, **51**, 74 - 96.
- Requejo-Tapia C., (1999), *International trends in fresh avocado and avocado oil production and seasonal variation of fatty acids in New Zealand-grown cv. Hass*, MSc Thesis, Massey University, New Zealand.
- Rohman A., Che Man Y.B., (2010), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil, *Food Research International*, **43**, 886-892.
- Rohman A., Che Man Y.B., (2011), The use of Fourier transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy for detection and quantification of adulteration in virgin coconut oil, *Food Chemistry*, **129**, 583-588.
- Rohman A., Che Man Y.B., (2012), The chemometrics approach applied to FTIR spectral data for the analysis of rice bran oil in extra virgin olive oil, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **110**, 129-134.
- Saha Foudjo B. U., Kansci G., Fokou E., Lazar I. M., Pontalier P. Y., Etoa F. X., (2012), Multi-response optimization of aqueous oil extraction from five varieties of Cameroon-grown avocados, *Environmental Engineering and Management Journal*, **11**, 2257-2263
- San-Blas E., Guerra M., Portillo E., Esteves I., Cubillán N., Alvarado Y., (2011), ATR/FTIR characterization of *Steinernema glaseri* and *Heterorhabditis indica*, *Vibrational Spectroscopy*, **57**, 220-228.
- San-Blas E., Cubillán N., Guerra M., Portillo E., Esteves I., (2012), Characterization of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria by Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR), *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **93**, 58-62.
- Saravanakumar M., Manivannan J., Sivasubramanian J., Silambarasan T., Balamurugan E., Raja B., (2012), Molecular metabolic fingerprinting approach to investigate the effects of borneol on metabolic alterations in the liver of nitric oxide deficient hypertensive rats, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **362**, 203-209.
- Severcan F., Gorgulu G., Gorgulu S.T., Guray T., (2005), Rapid monitoring of diabetes-induced lipid peroxidation by Fourier transform infrared spectroscopy: Evidence from rat liver microsomal membranes, *Analytical Biochemistry*, **339**, 36-40.
- Southwell K.H., Harris R.V., Swetman A.A., (1990), Extraction and refining of oil obtained from dried avocado fruit using a small expeller, *Tropical Science*, **30**, 121-131.
- Sun D.W., (2009), *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analyses and Control*, New York, USA: Elsevier Inc.
- Swisher H.E., (1988), Avocado oil from food use to skin care, *Journal of the American Oil Chemist' Society*, **65**, 1704-1706.
- Téliz D., (2000), *The Avocado and its Integrated Management* (in Spanish), Ediciones Mundi-Prensa, Mexico.
- Verbruggen G., (2006), Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases, *Rheumatology*, **45**, 129-138.
- Vlachos N., Skopelitis Y., Psaroudaki M., Konstantinidou V., Chatzilazarou A., Tegou E., (2006), Applications of Fourier Transform-Infrared Spectroscopy to edible oils, *Analytica Chimica Acta*, **573-574**, 459-465.
- Wong M., Requejo-Jackman C., Woolf A., (2010), What is unrefined, extra virgin cold-pressed avocado oil?, *Inform*, **21**, 198 - 202.