

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID -TLEMCCEN

THÈSE

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES-DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité: Matériaux macromoléculaires et leurs applications

Par :

HAMMOUDI Naima

Sur le thème

**ELABORATION ET CARACTERISATION DE FILMS NANO-
COMPOSITES ANTIMICROBIENS
ALGINATE/MONTMORILLONITE/HUILE ESSENTIELLE DE
CITRON**

Soutenue publiquement le 08/06/2021 à Tlemcen devant le jury composé de :

M ^r ZIANI-CHERIF Houcine	Professeur	UABB Tlemcen	Président
M ^r BENMANSOUR Kamal	Professeur	UABB Tlemcen	Directeur de thèse
M ^r BENOSMAN A.Soufiane	Professeur	ESSAT de Tlemcen	Examineur
M ^r BELARBI Lahcen	Professeur	CU d'Ain Temouchent	Examineur
M ^r BELYAGOUBI Larbi	MCA	UABB Tlemcen	Examineur

*Laboratoire de Recherche sur les Macromolécules (LRM)
BP 119, 13000 Tlemcen – Algérie.*

À la mémoire d'une chère personne, qui m'a beaucoup appris la persévérance et le courage et que j'ai tant souhaité la voir présente, en ce jour de ma soutenance, ma grand-mère, décédée le 04 octobre 2020, qu'Allah lui Accorde sa miséricorde.

À mes chers parents, qu'Allah les protège, en témoignage de ma profonde affection, cette thèse représente l'aboutissement des encouragements qu'ils m'ont prodigués, tout au long de ma scolarité; je leur suis et demeure très reconnaissante. Leur fierté, à mon égard aujourd'hui, est pour moi la meilleure des récompenses.

REMERCIEMENTS



عن طلحة بن عبيد الله، رضي الله عنه، قال: قال رسول الله صلى الله عليه وسلم " من أولي معروفا فليذكره فمن ذكره فقد شكره ومن كتمه فقد كفره". (رواه الطبراني، وحسنه الألباني).

Ce mémoire de doctorat a été réalisé au sein du Laboratoire de recherche sur les macromolécules et leur application (LRM) à l'université Abou-Beker Belkaid de Tlemcen, dirigé successivement par M^{me} BEDJAOUI Lamia puis par M^r BERRAYAH Abdelkader. Je tiens à les remercier tous les deux de m'avoir accueilli au laboratoire.

Je tiens à exprimer à mon encadreur Professeur BENMANSOUR Kamel ma respectueuse gratitude de m'avoir encadré, aidé et apporté son soutien à accomplir cette étude tout en ayant bénéficié d'une partie de son savoir-faire, de son expérience et précieux conseils. Merci pour tout le temps et l'énergie consacrés à me former et m'encadrer.

J'adresse mes respectueux remerciements à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de participer à l'évaluation de mon travail et de pouvoir compter sur leurs vastes connaissances et leurs esprits critiques constructifs pour m'aider, par leurs commentaires et leurs discussions d'améliorer ce travail.

M^r ZIANI-CHERIF Houcine, Professeur à l'université de Tlemcen pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

M^r BENOSMAN A.Soufiane, Professeur à l'Ecole Supérieure en Sciences Appliquées de Tlemcen, M^r BELARBI Lahcen Professeur à Centre Universitaire d'Ain Temouchent et M^r BELYAGOUBI Larbi Maître de Conférences à Université de Tlemcen, qui ont eu l'amabilité d'examiner ce travail

Un merci particulière au Mr BELLATRECHE Noureddine pour ses qualités humaines, ses précieux conseils aux moments difficiles, ses aides et ses disponibilités. Je vous dois beaucoup de respect.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire ont apporté leur pierre à ce travail de thèse, tant sur le plan moral que scientifique. Une pensée particulière pour l'ingénieure du laboratoire Mr Sid Ahmed pour son aide et pour les conseils techniques et informatiques. Merci également à tous les différentes personnes que j'ai rencontré tout au long de ma formation doctorale et qui ont pu m'aider par leurs soutiens, Mr LARKAT Mohamed, HAIDRA Bendehiba, Nouria, Meriem, Donya et Annissa. J'adresse également mes remerciements au MIHOUB Boualem pour ses aides précieuses dans la correction de cette thèse.

Mes remerciements vont également à l'équipe de centre de recherche CRBT, Dr. BENSOUICI Chawki, Mr. SELMANIA Abdelrehmen et à tous ceux et celles qui de près ou de loin, m'ont apporté aide et encouragements. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

Ce travail n'aurait jamais pu se réaliser sans le soutien continu de mes parents qui ont eu confiance en moi et qui par leur présence et leur soutien, m'ont aidée à surmonter certains moments difficiles et m'ont permis de faire face aux obstacles de la vie et m'ont encouragée à toujours aller de l'avant et m'ont toujours soutenue dans mes décisions. A mes sœur qui m'ont montré un cœur plein d'affection et d'amour... merci mille fois ma très chère famille je ne pourrais jamais vous remercier assez.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تطوير شرائط طبيعية مركبة نانومترية باستخدام الأجنات و المونتموريلونايت مع دمج الزيت الأساسي للليمون .

نقدم في هذا العمل الدور الهام الذي تلعبه التفاعلات الفيزيائية و الكيميائية بين البوليمير و الطين .

الأغشية التي تم تحضيرها، أجريت عليها العديد من التقنيات التحليل لدراسة خصائصها الحرارية و البصرية باستخدام قياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية ؛ كما أشارت نتائج التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء FTIR ، التحليل الحراري التفاضلي -ATG DTG ، حيود الأشعة السينية DRX و مسح الكالوري التفاضلي DSC فعلا هناك تشتت للطين داخل البنية المركبة للأغشية .

أظهرت نتائج دمج الزيت الأساسي للليمون 0.5% ، 1% و 1.5% نشاطا جيدا ضد أنواع من الخلايا البكتيريا (غرام + و غرام -) و الفطريات باستعمال طريقتين مختلفتين :طريقة الانتشار على الأجار و طريقة العد .

كلمات مفتاحيه: الأغشية الطبيعية النانو مركبة ، الأجنات ، المونتموريلونايت، الزيت الأساسي للليمون ، الخاصية المضاد للنشاط الميكروبي.

RESUME

Le but de cette étude était de développer et caractériser de nouveaux films bio-nanocomposites à base d'alginate et de montmorillonite dans lesquels est incorporée l'huile essentielle de citron.

Nous présentons dans ce travail l'important rôle que joue la nature des interactions physico-chimiques entre le polymère et l'argile. Les nouvelles liaisons chimiques formées, la structure et la morphologie, les comportements thermiques et les propriétés optiques des films bio-nanocomposites obtenus ont été caractérisés par spectroscopie FTIR, DRX, ATG, DSC et spectrophotométrie UV-visible. Les résultats confirment l'interaction entre l'alginate et MMT par une dispersion homogène de l'argile dans la matrice et la formation d'une structure exfoliée.

L'efficacité antimicrobienne des membranes alg/MMT (0.5%,1% et 1.5%) LEO a été évaluée par deux méthodes : diffusion en disque et par dénombrement des bactéries. Les résultats obtenus montrent un effet bactéricide et antifongique de nos composite par rapport les Grams positif et négatif.

Mots clés : Films bio-nanocomposite - Alginate - Montmorillonite - huile essentielle de citron et activité antimicrobienne.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and characterize new bio-nanocomposite films based on alginate and montmorillonite activated with lemon essential oil (LEO).

The microstructure characterisation of alginate-montmorillonite/LEO (alg-MMT/LEO) nanocomposites was performed using X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the surface morphology of the films was examined using light microscopy. The XRD and FTIR results confirmed MMT exfoliation and revealed the presence of strong interaction between alginate and MMT in the presence of LEO.

Powerful antimicrobial and antifungal properties of the films alg/MMT improved by (0.5%,1%and 1.5%) LEO was evaluated by two methods: disc diffusion and by enumeration of bacteria.

Key words: Bio-nanocomposite films -Alginate - Montmorillonite- lemon essential oil- antimicrobial activity.

SOMMAIRE

Remerciements.....	i
ملخص	iii
Résumé	iv
Abstract	v
Sommaire.....	vi
Liste des figures.....	xi
Liste des tableaux.....	xii
Abréviations et symboles.....	xiii
Introduction générale.....	01
Références bibliographiques	06

Etude Bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les bio-nanocomposites

Introduction.....	08
I.1 Nanocomposite.....	08
I.1.1 Nanocomposites polymère/argile.....	09
I.1.1.1 La montmorillonite : un renfort lamellaire inorganique.....	10
I.1.1.2 Microstructure de la montmorillonite.....	10
I.1.1.3 Propriétés physico-chimiques.....	12
I.1.2 Elaboration et mise en œuvre des nano-composites.....	13
I.1.3 Caractérisation structurels des nanocomposite.....	15
I.2 Biopolymère étudié : Alginate de sodium.....	16
I.2.1 Propriétés physico-chimiques.....	17
I.2.1.1 Composition chimique.....	17
I.2.1.2 Solubilité.....	18
I.2.1.3 Gélification.....	19
I.2.1.4 Viscosité	20
I.2.2 Dégradation des chaînes alginates.....	22
I.2.3 Films nanocomposites en vue de leur utilisation comme conservateurs alimentaires.....	22
I.3 Les huiles essentielles.....	24
I.3.1 Activités biologiques des huiles essentielles.....	25
I.3.1.1 Activité antimicrobienne.....	25
I.3.1.2 Activité anti-oxydante.....	26
I.3.1.3 Activité anti-inflammatoire.....	26
I.3.2 Toxicité.....	26
Références bibliographiques.....	30

Etude Expérimentale

Chapitre II : Elaboration et caractérisation de nanocomposite Alginate/MMT

II.1 Introduction.....	38
II.2 Matériaux et produits utilisés.....	38

II.2.1	Matériaux.....	38
II.2.2	Produits chimiques.....	39
II.3	Méthode de préparation de film.....	39
II.4	Techniques expérimentales de caractérisation.....	41
II.4.1	Caractérisation morphologique.....	41
II.4.1.1	Microscope optique (MOP).....	41
II.4.1.2	Diffraction des rayons X.....	41
II.4.2	Caractéristique physico-chimique.....	41
II.4.2.1	L'épaisseur de film.....	41
II.4.2.2	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	42
II.4.3	Caractérisation thermique.....	42
II.4.3.1	Analyse thermogravimétrique (ATG).....	42
II.4.3.2	Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).....	42
II.4.4	Caractérisation optique.....	43

Chapitre III : Etude des activités antibactériennes et antifongique des dispersions de différente concentration d'huile essentielle dans la matrice

III.1	Test antibiogramme.....	45
III.1.1	Matériaux Utilisé.....	45
III.1.1.1	Origine et choix des souches bactériennes.....	45
III.1.1.2	Milieu de culture.....	45
III.1.1.3	Préparation des suspensions bactériennes.....	46
III.1.1.4	Préparation des disque.....	47
III.1.2	Protocole Expérimental.....	47
III.1.2.1	Méthode de diffusion en disque.....	47
III.2	Dénombrement des bactéries.....	50
III.2.1	Protocole expérimental.....	50
III.2.1.1	Echantillonnage.....	50
III.2.1.2	Dilution en cascade des échantillons.....	50
III.2.1.3	Mise en gélose normale.....	51
III.2.1.4	Lecture des résultats.....	52
	Références bibliographiques.....	55

Chapitre IV : Interprétation des Résultats

IV.1	Aspect des membranes.....	57
IV.2	Diffraction des rayons X.....	59
IV.3	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	60
IV.4	Comportement thermique.....	63
IV.4.1	Stabilité thermique.....	63
IV.4.2	Transition thermique.....	65
IV.5	Épaisseur de film et valeurs d'opacité des films nanocomposites Alg / MMT.....	67
IV.6	Test d'antibiogramme et efficacité antimicrobienne des films.....	69
IV.6.1	Activité antibactérienne.....	69
IV.6.2	Activité antifongique.....	72
	Références bibliographiques.....	75

Conclusion générale **79**

Publication: Preparation of active antimicrobial and antifungal alginate-montmorillonite/lemon essential oil nanocomposite films..... **81**

LISTE DES FIGURES

Introduction Générale

Figure I.1 :	Nombre de travaux de recherches publiées par an (a) sur les matériaux nanocomposites (Data base Google Scholar on 16/10/2017), (b) sur les films nanocomposites (Scopusdatabase 31/03/2015) et (c) sur les matériaux nanocomposites à matrice biopolymère (Scopusdatabase09/12/2017).....	3
---------------------	--	----------

Chapitre I : Généralité sur les bio-nanocomposites

Figure I.1 :	Structure chimique de montmorillonite.....	10
Figure I.2 :	Structure multi-échelle de la montmorillonite.....	10
Figure I.3 :	Schéma représentatif de la méthode d'élaboration des nanocomposites par voie solvant.....	13
Figure I.4 :	Non exfoliée (1), nanocomposite intercalé (2) et nanocomposite exfolié (3).....	13
Figure I.5 :	Diagramme de diffraction des rayons X MMT poudre et de film nanocomposite a base de chitosan /MMT a des proportions de 1%,3% et 5%.....	14
Figure I.6 :	Caractéristiques structurales d'alginate : (a) monomères de l'acide alginique, (b) polymère d'alginate, (c) distribution des blocs.....	17
Figure I.7 :	Gélification ionotropique de l'alginate. Modèle "egg-box".....	18
Figure I.8 :	Variations de la viscosité selon le type d'alginate en solution et en fonction de la concentration de l'agent gélifiant.....	20
Figure I.9 :	Dégradation d'un alginate extrait de la <i>Laminaria Digitata</i> . Mesure de la variation de l'inverse de la viscosité intrinsèque ($1/[\eta]$) après 5 heures à différents pH et à 68°C.....	21
Figure I.10:	structure chimique de monoterpènes et les sesquiterpène des huiles essentielles	23

Chapitre II : Elaboration et caractérisation de nanocomposite Alginate/MMT

Figure II.1 :	Les solutions filmogènes alg/MMT-LEO.....	39
Figure II.2 :	Micromètre électronique	40
Figure II.3 :	Appareillage pour l'analyse thermique.....	42

Chapitre III : Etude des propriétés antibactériennes et fongique des dispersions de différente concentration d'huile essentielle dans la matrice

Figure III.1 :	Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases.....	45
Figure III.2 :	Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion en gélose...	46
Figure III.3 :	Test antibiogramme.....	48
Figure III.4 :	Dénombrement bactériennes.....	50
Figure III.5 :	Méthode de comptage des cellules bactériennes.....	51

Chapitre IV : Interprétation des Résultats

Figure IV.1 :	Membranes d'alginate/3%MMT.....	56
Figure IV.2 :	Membranes Alginate/3%MMT-1.5%LEO.....	56
Figure IV.3 :	Morphologies de (a) alginate/MMT, (b) alginate/MMT/LEO 0,5%, (c) alginate/MMT/LEO 1 %, et (d) alginate/MMT-LEO1,5%	57
Figure IV.4 :	Diffraction des rayons X de MMT et de films nanocomposites à base d'alginate de sodium.....	58
Figure IV.5 :	Spectre IR de montmorillonite commercial.....	59
Figure IV.6 :	Spectre IR membrane d'alginate de sodium.....	60
Figure IV.7 :	Spectre IR de membrane alg/MMT.....	60
Figure IV.8 :	Spectre IR d'huile essentiel de citron (d), membrane alg/MMT-1.5% Cit (e).....	61
Figure IV.9 :	Thermogramme superposés des nanocomposite ATG(a) et dérivés DTA(b).....	62
Figure IV.10:	Thermogramme DSC des membranes élaborées : alginate pure (a), alg/MMT(b), alg/MMT-1.5%LEO(c).....	65
Figure IV.11:	Relation transmittance / longueur d'onde pour les films d'alginate et de nanocomposite.....	67
Figure IV.12:	Activité antibactérienne des films en solution alg-3%MMT : (a) <i>Staphylococcus aureus</i> ; (b) <i>Bacillus cereus</i> ; (c) <i>Escherichia coli</i> ; (d) <i>Salmonella enteritidis</i> de concentration de 1.5% LEO.....	68
Figure IV.13:	Activité antibactérienne de différents films contre (a) <i>S. aureus</i> et (b) <i>E. coli</i> sur milieu TSA-NaCl (3%) stocké à 10 ° C.....	69

FigureIV.14: Test d'inhibition.....	71
FigureIV.15: Activité antifongique des films en solution alg-3%MMT ; (e) <i>Candida albicans</i> ; (f) <i>Aspergillus brasiliensis</i> de concentration de 1.5% LEO.....	72

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I :	Généralité sur les bio-nanocomposites	
Tableau I.1 :	Quelque utilisation d'alginate dans différents secteurs industriels et exemple d'application.....	15
Tableau I.2 :	Caractérisation physico-chimiques d'huile essentielle de citron.....	26
Chapitre II :	Elaboration et caractérisation de nanocomposite Alginate/MMT	
Tableau II.1:	Caractéristique physico-chimique d'alginate de sodium.....	37
Tableau II.2:	Caractéristique physico-chimique de la montmorillonite.....	38
Tableau II.3:	Composition de différentes formulations préparées.....	39
Chapitre III :	Etude des propriétés antibactériennes et fongique des dispersions de différente concentration d'huile essentielle dans la matrice	
Tableau III.1:	Les conditions de préparation de milieu de culture.....	45
Chapitre IV :	Interprétation des Résultats	
Tableau IV.1:	Données détaillées correspondant à une perte de masse (Δm) en fonction de t_p de dégradation des membranes nanocomposites.....	63
Tableau IV.2:	Comportement thermique des membranes.....	64
Tableau IV.3:	Valeurs d'épaisseur et d'opacité des films nanocomposites Alg / MMT.....	66
Tableau IV.4:	Activité antibactérienne (zone d'inhibition) de solution de film alg/MMT incorpore par LEO contre les gram-positive et négative.....	69
Tableau IV.5:	Activité antifongique (zone d'inhibition) de solution de film alg/MMT incorpore par LEO contre <i>Candida albicans</i> et <i>Aspergillus brasiliensis</i>	72

ABRÉVIATIONS

AATCC	: American Association of Textile, Chemists and Colorists.
AFNOR	: Association française de normalisation
Alg	: Alginate
ANOVA	: Analysis of variance
ATCC	: American type culture collection
ATG	: Analyse thermogravimétrique
<i>d</i>	: la distance inter-feuillets.
DL ₅₀	: dose létale en g/kg, pour laquelle 50% de la population succombe
DRX	: Diffraction des rayons X
DSC	: Calorimétrie différentielle à balayage
DTA	: analyse thermique différentiel
FTIR	: Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HE	: Huiles essentielles
LEO	: Huiles essentielles de citron
MMT	: Montmorillonite;
MOP	: Microscope optique
N° EINECS	: European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances Number
N°CAS	: Chemical Abstracts Service Number
OMS	: Organisation mondiale de la santé;
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
T _c	: Température de cristallisation
T _f	: Température de fusion

Tg	: Température de transition vitreuse
UFC	: Unités formatrices de colonie
Δm	: Perte de masse
η	: La viscosité
λ	: La longueur d'onde
μ	: Vitesse de croissance bactérienne

Introduction Générale

Introduction Générale

L'incidence croissante des maladies d'origine alimentaire, au cours des dernières décennies, semble être liée dans de nombreux pays à l'infection microbienne d'origine alimentaire. Le rapport 2015 de l'OMS sur les estimations de la charge mondiale de morbidité due aux maladies d'origine alimentaire a présenté les premières estimations de cette charge due à 31 agents transmis par les aliments (bactéries, virus, parasites, toxines et produits chimiques) aux niveaux mondial et régional [1-2]. Chaque année, près de 600 millions de personnes, soit près de 1 sur 10 dans le monde, tombent malade après avoir consommé des aliments contaminés. Parmi elles, 420 000 en meurent, dont 125 000 enfants de moins de cinq ans [2]. Le rapport établi en 2018 par la Banque mondiale sur le poids économique des maladies d'origine alimentaire estime que les pertes de production annuelles dues à ces maladies dans les pays à revenu faible et intermédiaire s'élèvent à 95,2 milliards de dollars US, et le coût annuel des traitements à 15 milliards de dollars US. En Algérie, la contamination des aliments représente plus de 50.000 cas d'intoxication chaque année. Quelques 10.000 cas d'intoxication alimentaire, dont 7 décès, ont été enregistrés en 2018 [3], selon un bilan présenté par le directeur de la prévention, au ministère de la santé. La sécurité alimentaire est d'abord un enjeu de santé publique.

L'évaluation des risques microbiologiques est désignée comme un domaine de recherche scientifique pour améliorer nos systèmes de contrôle alimentaire dans le but de produire des aliments plus sains, de réduire le nombre de maladies d'origine alimentaire et de faciliter le commerce national et international des aliments.

La nécessité de lutter contre les bactéries pathogènes, justifie l'intérêt croissant pour le domaine de recherche scientifique sur les matériaux antibactériens, dits matériaux actifs afin de répondre à de nouvelles caractéristiques, tel que détecter, capturer, détruire ou encore inhiber la croissance d'agents pathogènes.

Les films biodégradables antibactériens ont reçu une attention toute particulière, à cause de leur potentiel à retarder la prolifération microbienne dans les aliments et à réduire le risque de la contamination superficielle des micro-organismes pathogènes. Les films bio-nano-composites sont considérés comme d'excellents véhicules d'une grande variété d'additifs, tels que les antioxydants, les agents antifongiques, et antimicrobiens. En conséquence, ces matériaux biodégradables pourraient jouer un rôle positif dans l'amélioration de la qualité des aliments en terme de produits d'emballage et de stockage, en prolongeant la durée de conservation et en minimisant la croissance microbienne du produit.

Ces matières naturelles dépendent des enjeux économiques et environnementaux, de la nécessité de développement de nouveaux produits et des changements dans les modes de consommation.

Dans ce contexte général, des travaux de recherche visent, de plus en plus, à développer des films nanocomposites (figure 1.a et 1.b). Parmi ces travaux, une bonne partie (figure 1.c) est axée sur les matériaux nanocomposites à matrice biopolymère.

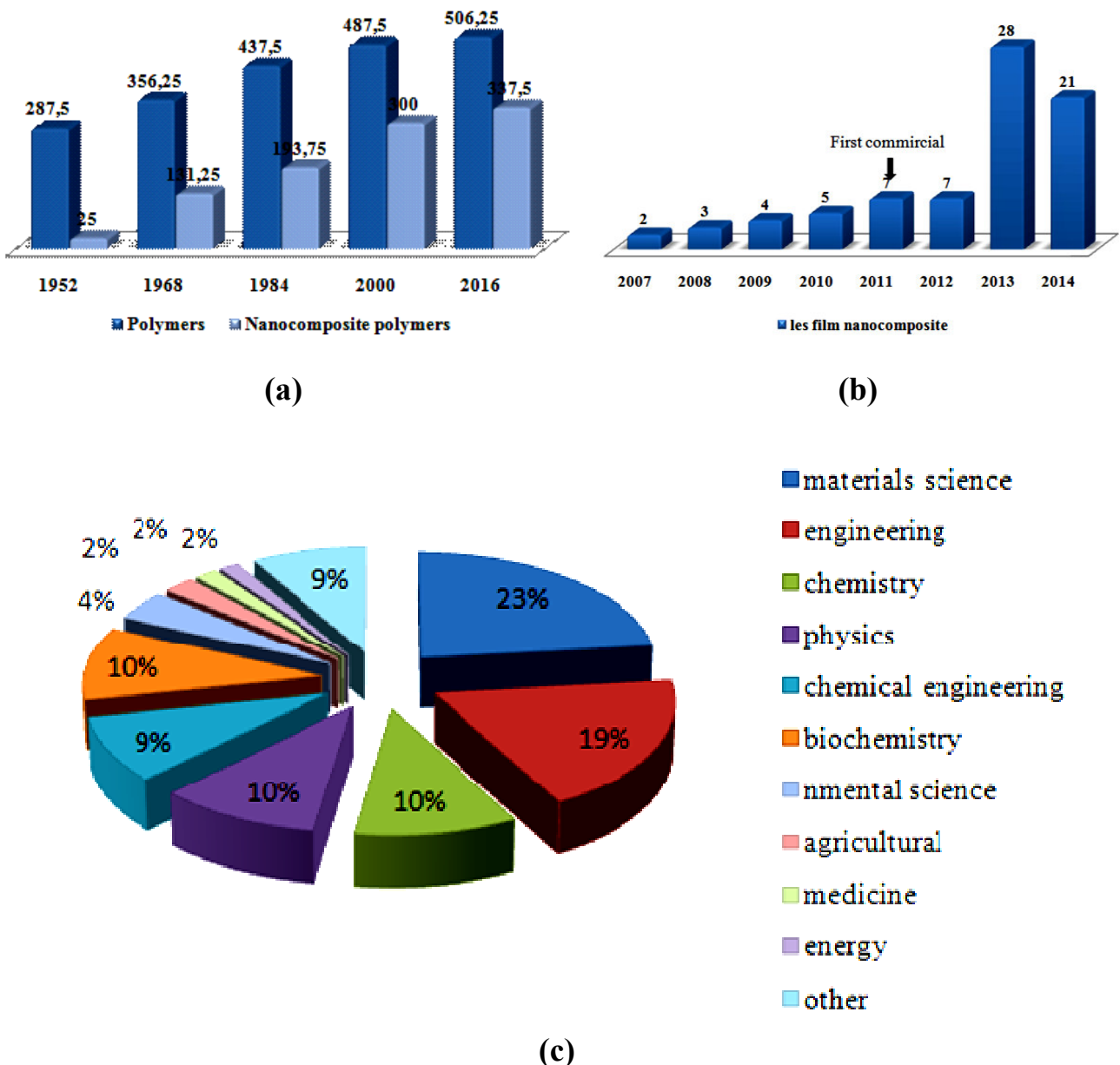


Fig1: Nombre de travaux de recherches publiées par an (a) sur les matériaux nanocomposites (Data base Google Scholar on 16/10/2017) (b) sur les films nanocomposites (Scopusdatabase 31/03/2015) et (c) sur les matériaux nanocomposites à matrice biopolymère (Scopusdatabase 09/12/2017)[4-5].

Dans le cas présent, ces films nanocomposites à matrice biopolymère possèdent des propriétés antimicrobiennes grâce à la possibilité d'incorporer des agents antimicrobiens naturels ou synthétiques dans les formulations filmogènes.

Actuellement, ces travaux sont orientés vers des stratégies alternatives afin de réduire l'utilisation d'additifs chimiques dans l'industrie alimentaire, en raison des risques qu'ils présentent pour la santé du consommateur. Dans ce contexte, l'utilisation des huiles essentielles (HE), comme sources potentielles de molécules naturelles, bioactives, présentent une efficacité importante en tant qu'agents antibactériens, antifongiques, antioxydants, antidiabétiques, etc...

Ce travail de thèse a pour but d'élaborer des films nanocomposites à base d'un polymère naturel : l'alginate (la matrice) et d'une argile : la montmorillonite (le renfort), dans lesquels est incorporée l'huile essentielle de citron et d'évaluer leurs propriétés antibactériennes et antifongiques.

Différentes équipes de recherches, avec des spécialités variées, se sont associées pour la réalisation et l'encadrement de ces travaux:

- ✓ Le Laboratoire de Recherche sur les Macromolécules (LRM)-Université de Tlemcen.
La majorité des travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans ce laboratoire, à savoir l'élaboration des nanocomposites à base d'alginate de sodium, la caractérisation de leurs propriétés physico-chimiques, et la détermination de leurs propriétés optiques.

- ✓ Le laboratoire de microbiologie et bioprocédés -Nutrition and food science - Food Biotechnology Division- du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBT). Dans ce laboratoire, l'activité antimicrobienne des films nanocomposites a pu être évaluée.

- ✓ Le Laboratoire des Systèmes Dynamiques et Applications-Université de Tlemcen.
Les résultats des travaux menés dans les deux laboratoires, cités ci-dessus, ont été analysés, dans ce laboratoire. Les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel OriginPro9.

Pour mener à bien cette étude, nous avons structuré ce mémoire en deux parties :

La première partie est une étude bibliographique en chapitre I, où sera présentée, dans un premier temps, une description générale des nanocomposites polymères/argile : propriétés, méthodes d'élaboration et de caractérisation. Les caractéristiques et les applications du polymère utilisé, l'alginate, seront détaillés dans un deuxième temps. Enfin un aperçu général sera donné sur les huiles essentielles, avec un regard particulier sur leurs activités biologiques.

La deuxième partie : l'étude expérimentale, organisée en trois chapitres :

Le chapitre II concernera la présentation des réactifs et produits, des méthodes d'élaboration des films ainsi que les méthodes de caractérisation utilisées pour ce travail.

Le chapitre III présentera l'activité antimicrobienne des films nanocomposites contenant différentes concentrations d'huile essentielle de citron. Ce chapitre sera focalisé sur l'évaluation du pouvoir inhibiteur de l'activité antimicrobienne et antifongique des films élaborés.

Le chapitre IV illustre les résultats obtenus, suivi des interprétations et discussions.

Enfin, notre thèse s'achève par une conclusion générale, résumant les principaux résultats obtenus lors de ce travail et perspectives.

Références bibliographiques

- [1] Safe Food : organisation mondial de la sante, "Estimations par l’OMS de la charge mondiale des maladies d’origine alimentaire", 2015.
- [2] World Health Organization : Estimations de l’OMS sur la charge mondiale de morbidité imputable aux maladies d’origine alimentaire, [2015] WHO/FOS/15.02.
- [3] Algérie presse service : Intoxications alimentaires: 10.000 cas dont 7 décès en 2018. aps.dz/sante-science-technologie.
- [4] Anthony Loiseau, "Elaboration et caractérisation de Nanocomposites modèles Laponite/Polyoxyde d’éthylène", thèse de doctorat de l’université du maine UFR Sciences et Techniques ,2006, p4.
- [5] Basak Yilin COLAK," Utilisation du caséinate de sodium pour la fabrication de films actifs pour l’emballage alimentaire : Etude des propriétés barrières aux gaz, de l’activité antimicrobienne et de la biodégradabilité", thèse de doctorat de l’université Jean Monnet, Saint-Etienne 2014,p4-5.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Introduction

Dans le domaine de la recherche sur les matériaux, l'élaboration de nanocomposites polymères se révèle être une activité de recherche multidisciplinaire dont les résultats pourraient élargir le champ d'application des polymères [1]. Depuis une vingtaine d'années, une très forte application des minéraux argileux, notamment les montmorillonites de dimension nanométrique, vont, en effet, y jouer un rôle fondamental, améliorant les propriétés macroscopiques des polymères. Dans cette synthèse bibliographique, nous nous sommes intéressés à comprendre le maximum de paramètres clés permettant de maîtriser l'amélioration des propriétés des polymères par l'incorporation de la montmorillonite. Nous nous intéressons, par la suite, aux biopolymères, particulièrement les polysaccharides. Ces matériaux ont, déjà, été beaucoup étudiés et présentent de nombreux avantages, tels que leur biocompatibilité, biodégradabilité, disponibilité en grande quantité, à un prix très compétitif et ne présentant aucun danger pour la santé et l'environnement. L'un des polymères de cette série étant l'alginate. Généralement, l'alginate ne possède pas de propriétés antibactériennes [2]. C'est une longue chaîne comportant beaucoup de charges négatives par la présence de groupements carboxyles CO_2^- dont la charge est contrebalancée par la charge positive de l'ion sodium Na^+ afin d'avoir une molécule neutre

Dans cette étude bibliographique, une partie est consacrée aux huiles essentielles et les propriétés biologiques qui en découlent, en passant par la connaissance de leurs principaux constituants chimiques, leur caractérisation physico-chimique et leur toxicité.

I.1 Nanocomposite

L'idée d'amélioration et d'optimisation des propriétés des matériaux fut l'un des défis permanent dans les mondes académiques et industriels, au début des années 90, avec l'apparition d'une nouvelle génération de matériaux composites, au sein du centre de recherche et de développement de la société Toyota. Ce fut la première réalisation, avec succès, d'une dispersion de particules nanométriques d'argile, dans un polymère, parlant dès lors de nanocomposites[3-4].

Le terme 'nanocomposite' est de création récente, mais le concept n'est pas nouveau. Il existe déjà dans la nature, comme les os, la cutine, les toiles d'araignée. Certaines bactéries parviennent également à fabriquer des nanostructures [5].

Un nanocomposite est un matériau biphasique solide associant une matrice et des charges (renfort), ces dernières ayant au moins une dimension nanométrique (inférieure à 100 nanomètres).

Un matériau est dit composite lorsqu'il est constitué d'au moins deux phases et qu'il combine les avantages en termes de propriétés de chacun de ses constituants pris indépendamment tout en minimisant leurs inconvénients [6].

Les systèmes nanocomposites, à matrice polymère et de renforts des silicates en feuillets, ont la particularité de montrer une amélioration des propriétés de la matrice hôte telles que les propriétés mécaniques[7-8], la stabilité thermique[9-10], les propriétés fonctionnelles [11], les propriétés de barrière[12-13], et la solubilité dans l'eau[14], pour des faibles concentrations en charge (1 à 10% en masse), contrairement aux composites classiques dont le fort taux de charges inorganiques peut entraîner des effets indésirables tels que l'opacité ou la fragilité. L'amélioration peut être considérable quand les nanocharges sont exfoliées de telle sorte à individualiser les feuillets d'argile pour créer des interfaces multiples exceptionnellement grandes [15].

Les nanocomposites polymère/argile ont commencé, ces dernières années, à susciter l'intérêt de la recherche dans le monde académique et industriel, de ce fait, des revues, articles et brevets y afférents, sont en grande disponibilité dans la littérature, à peu près 400 articles publiés, en 2016. Dans ce contexte, les nanocomposites, à matrice biopolymère, issus de ressources renouvelables, d'applications à forte valeur ajoutée, de par leurs bonnes propriétés, leur faible coût, leur grande cadence de fabrication et leur grande souplesse d'emploi, commencent à déboucher sur les premières applications industrielles et commerciales.

I.1.1 Nanocomposites polymère/argile

Les nano-composites considérés sont constitués d'une dispersion de plaquettes ou lamelles argileuses dans une matrice polymère. La charge la plus utilisée est la montmorillonite, constituée d'un ensemble de feuillets (type « millefeuilles »). Les dimensions des feuillets individuels sont de l'ordre du nanomètre en épaisseur et de plusieurs dizaines de nm en longueur et largeur, ce qui leur confère un coefficient de surface très élevé (de 100 à 1000m²/g), et un très fort facteur de forme (longueur/épaisseur >100). Ces caractéristiques ont une influence déterminante sur les propriétés des nanocomposites.

I.1.1.1 La montmorillonite : un renfort lamellaire inorganique

Ce sont des matériaux inorganiques constitués par des feuillets de type montmorillonite d'épaisseur de l'ordre du nanomètre, faciles à extraire et des candidats idéals pour les nano-renforts. La montmorillonite est parmi les matériaux lamellaires les plus étudiés comme renfort dans les nanocomposites.

I.1.1.2 Microstructure de la montmorillonite

La montmorillonite, décrite par Mauduyt (1847), dans la localité de Montmorillon (à Vienne, en France), est connue sous le nom commercial " Bentonite ". C'est une argile de type phyllosilicate 2 : 1, appartenant à la famille des smectites.

La figure I.1 [16] donne une vision de ce qui est structuralement, une montmorillonite au niveau microscopique et de l'importance de la symétrie. La montmorillonite est constituée d'une couche d'octaèdres comprise entre deux couches de tétraèdres. Les sommets des octaèdres sont formés de quatre atomes d'oxygène et deux hydroxydes reliés à l'atome central d'aluminium par des liaisons de coordinence. Les tétraèdres ont, par contre, leurs sommets occupés par des atomes d'oxygène reliés à l'atome central de silicium. Les atomes d'oxygène aux sommets du tétraèdre et d'octaèdre sont reliés par une liaison covalente. La structure de la montmorillonite est obtenue, en substituant dans le réseau pyrophyllite, un certain nombre d'ions d'aluminium dans la couche octaédrique par les ions de Mg^{2+} ou de Fe^{2+} , Il en résulte, ainsi, un déficit de charges positives compensé par la fixation d'un cation H^+ , Na^+ , Ca^{2+} qui se placent dans l'espace inter-foliaire des feuillets. La présence de cations dans l'espace inter-foliaire permet de compenser ce déficit de charge pour conserver l'électroneutralité de la particule.

La formule générale de la montmorillonite est :



Où :M : cation échangeable.

IV : couche tétraédrique.

VI : couche octaédrique.

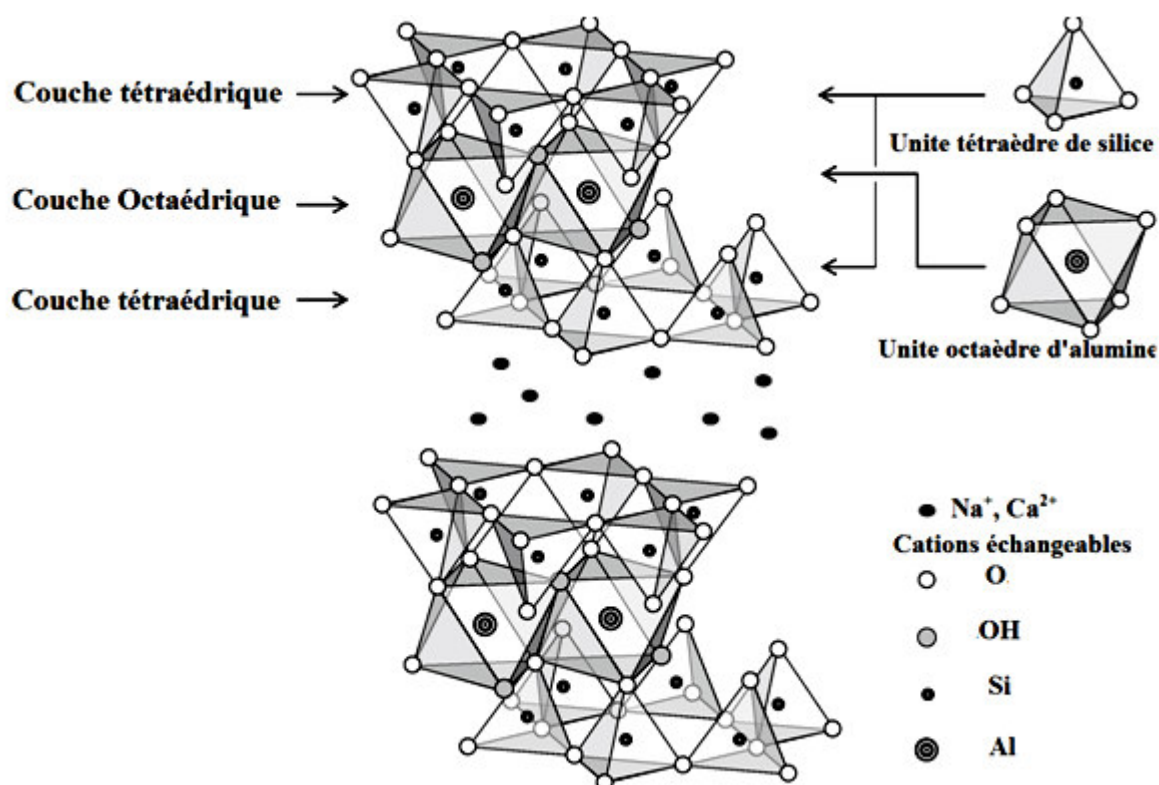
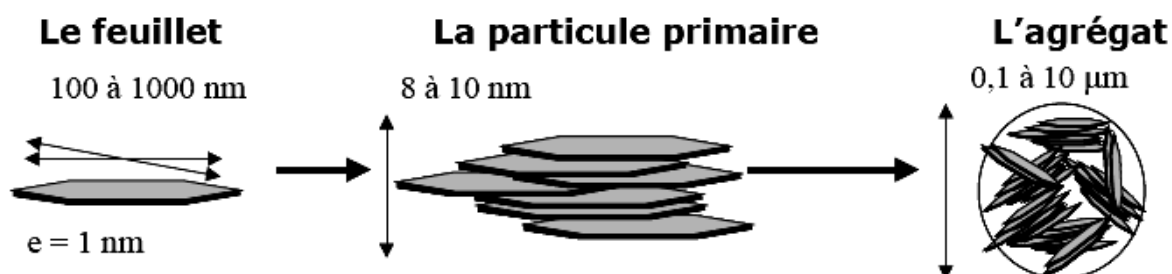


Fig I.1 : Structure chimique de montmorillonite [16].

Différents auteurs ont mis en évidence trois niveaux d'organisation dans les systèmes argileux, particulièrement les montmorillonites. Nous avons repris sur la figure I.2, la présentation des trois différents niveaux d'organisation caractéristiques de cette structure multiéchelle de la montmorillonite.



FigI.2 : Structure multi-échelle de la montmorillonite [18].

- **Feuillet**

C'est la répétition horizontale de la demi-maille dans les directions x et y. Il a la forme d'un disque ou d'une plaquette avec des dimensions d'environ cent et mille nanomètres de longueur et de dix Angström d'épaisseur. Ces plaquettes sont très souples, surtout en présence de l'eau, donc elles sont déformables. Dans la famille des smectites, la charge d'un feuillet varie de 0.2 à 0.6 électrons par maille [17].

Les cations compensateurs à la surface des feuillets des montmorillonites sont généralement des ions calcium ou sodium. On emploie les termes montmorillonites « calcique » et montmorillonites « sodique » pour faire référence à la nature de ces cations.

- **Particule primaire**

L'association régulière de 5 à 10 feuillets constitue une particule primaire [18]. La distance de séparation entre les plaquettes d'une même particule primaire est déterminée par des forces de Van der Waals et des forces électrostatiques qui s'exercent entre les feuillets et les cations compensateurs.

- **L'agrégat**

Le terme "agrégat" représente les argiles à l'état poudreux c'est un ensemble de particules primaires orientées dans toutes les directions. Ces particules sont reliées entre elles par des forces coulombiennes ou par des dépôts d'hydroxydes ou de matière organique [17]. Les agrégats ont une épaisseur moyenne 10 nm, forme des amas de taille micrométrique (1 à 10 μm),

I.1.1.3 Propriétés physico-chimiques

La montmorillonite est une argile blanche sa densité est généralement égale à 2,04. Elle est partiellement soluble dans l'acide chlorhydrique, mais totalement détruite par l'acide sulfurique. La propriété la plus importante est sa capacité d'échange de cations monovalents qu'il est possible de substituer aux cations compensateurs pour compenser la charge négative de 100 grammes d'argile présentes dans la solution aqueuse. Généralement, sa valeur est entre 70 et 120 meq/100g. Le remplacement des cations compensateurs inter-foliaires par des cations organiques trouve toute son application dans les nanocomposites, cette propriété permet de rendre les argiles organophiles et ainsi d'envisager leur dispersion dans la matrice

polymère [18-19]. Le groupe d'appartenance est le groupe des smectites (composés, ayant un fort pouvoir absorbant d'eau et des capacités d'échange de cations). De ce fait, en présence d'eau, la montmorillonite est « gonflante », c'est à dire qu'elle absorbe l'eau dans l'espace entre les feuillets, appelé espace interfoliaire, et dans toute autre porosité accessible. En présence d'eau, les cations sont à l'état hydraté. Cet état modifie les forces électriques et provoque un éloignement des feuillets les uns des autres, d'où le gonflement. L'influence de l'état d'hydratation de l'argile sur le gonflement de la structure peut être comprise, qualitativement, en considérant les forces électrostatiques existant entre le cation interfoliaire et la surface. Ces forces diminuent lorsque des molécules d'eau viennent écranter les interactions électrostatiques. On peut donc relier les notions d'hydratation des argiles et de gonflement avec les interactions électrostatiques [20].

I.1.2 Elaboration et mise en œuvre des nano-composites

Les principaux enjeux de l'élaboration des nano-composites concernent l'exfoliation des charges (la séparation des feuillets individuels), leur dispersion dans la matrice et la maîtrise de l'interaction charge-polymère. La technique de préparation par l'intercalation en solution (figure I.3) est également appelée exfoliation/adsorption [21]. Elle consiste à mélanger le polymère et l'argile dans un solvant commun susceptible de solubiliser le polymère. Les couches silicate sont d'abord dispersées et gonflées dans un solvant, comme l'eau, le chloroforme ou le toluène. Lorsque les solutions du polymère et des couches silicates sont mélangées, les chaînes de polymères s'intercalent dans l'espace inter-lamellaire des silicates. Après l'évaporation du solvant, la structure reste intercalée. La force responsable de l'intercalation entre les couches silicates à partir de la solution est l'entropie gagnée par la désorption des molécules du solvant, qui compense la diminution de l'entropie des chaînes confinées et intercalées [6-22]. La plus importante étape de cette technique est celle du choix du solvant qui doit être à la fois capable d'exfolier les feuillets d'argile et de solubiliser le polymère, et ce pour une meilleure compatibilité entre les trois composants (polymère, solvant, nanocharges).

Cette méthode est bonne pour l'intercalation des polymères un peu polaires ou apolaires et facilite la production de films minces de polymère avec des couches d'argiles intercalées et orientées.

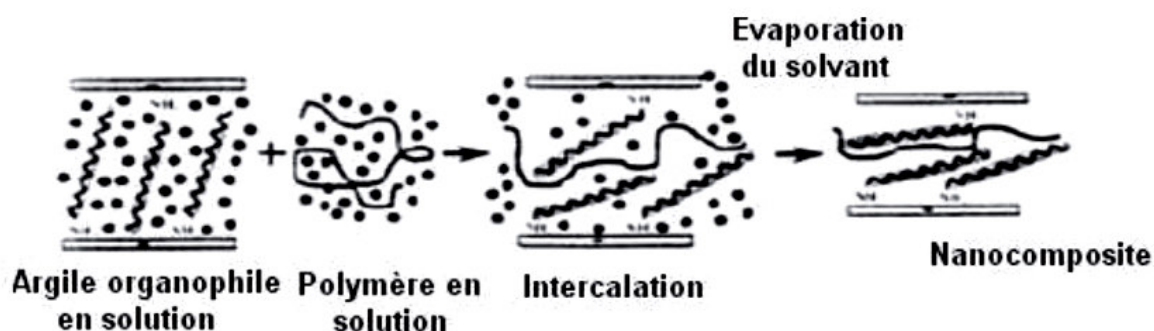


Fig I.3: Schéma représentatif de la méthode d'élaboration des nanocomposites par voie solvant [21].

Suivant l'état d'exfoliation et de dispersion dans la matrice (figure I.4), on peut distinguer trois types de structures :

1. une structure **non exfoliée**, lorsque les feuillets restent agglomérés sous forme de paquets ;
2. une structure **intercalée**, avec des feuillets incomplètement séparés et des liaisons polymères partielles entre feuillets ;
3. une structure **exfoliée** (ou délaminée) avec des feuillets individuels bien séparés et correctement dispersés et des liaisons polymère-feuillet fortes.

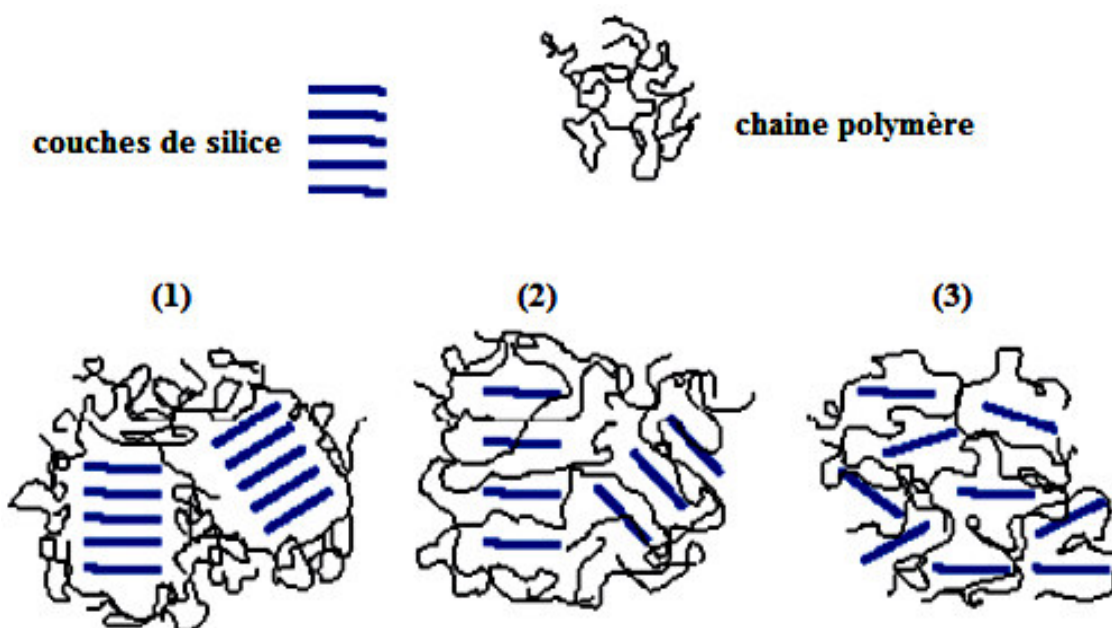


Fig I.4 : Non exfoliée(1), nanocomposite intercalé (2) et nanocomposite exfolié (3) [21].

I.1.3 Caractérisation structurale des nanocomposites.

Différentes techniques de caractérisation des matériaux nanocomposites permettent de définir des paramètres microstructuraux : exfoliation, intercalation, répartition et orientation des plaquettes. L'analyse par diffraction des rayons X (DRX) est généralement la plus utilisée pour étudier la nature des structures intercalées ou exfoliées, mais elle ne peut pas donner grand-chose sur la distribution ou non-homogénéité structurale dans les nanocomposites. Avec cette technique, il est possible d'évaluer la distance inter-feuillets d pour évaluer le degré de dispersion des nanocomposites. Plus cette distance inter-feuillet augmente le pic d'intensité détecté décroît, ce qui est le signe d'une éventuelle exfoliation comme illustré dans la figure I.5 [23-25].

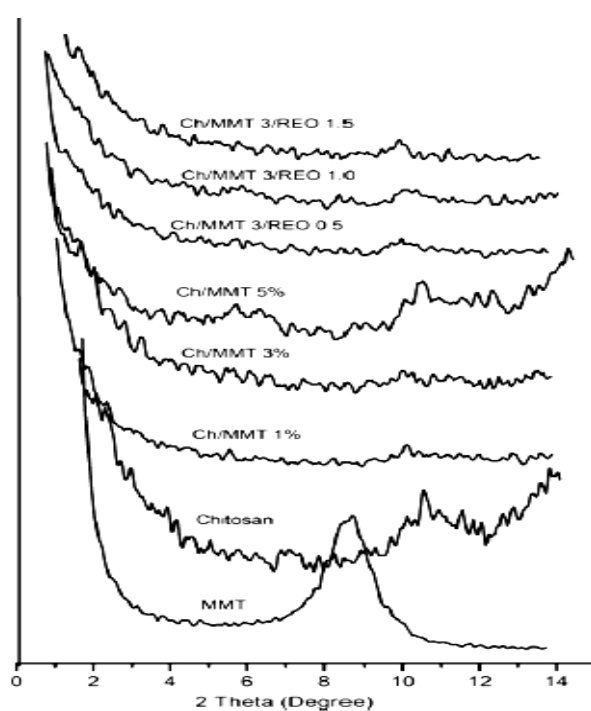


Fig I.5 : Diagramme de DRX de la poudre de MMT et des films nanocomposites chitosane /MMT à des proportions de 1%,3% et 5% [25]. .

I.2 Biopolymère étudié : Alginate de sodium

L'alginate de sodium est un polysaccharide de structure linéaire, bio-polymère anionique, extrait de certaines des algues brunes (*Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*) et peut, également, être produit par des bactéries aérobies fixatrices d'azote telles qu'*Azotobacter viscellandii*, *Pseudomonas aeruginosa*. Dans ce dernier cas, la structure moléculaire de l'alginate obtenu est mieux contrôlée [26-27].

L'alginate est un biomatériau qui a trouvé de nombreuses applications dans la science et l'ingénierie biomédicales en raison de ses propriétés intéressantes telles que la biocompatibilité et la facilité de gélification. Certains alginates, de grande qualité, peuvent être utilisés dans le domaine pharmaceutique, particulièrement attrayant, dans la cicatrisation des plaies, l'administration de médicaments et les applications d'ingénierie tissulaire. Une des applications les plus intéressantes est la préparation des capsules d'alginate qui jouent le rôle de pancréas de substitution en diffusant dans l'organisme du malade des cellules productrices d'insuline dans le traitement du diabète [28-29]. L'industrie agroalimentaire est un gros consommateur d'alginate (30% environ), où il est utilisé comme additif alimentaire (l'acide alginique E400, alginate de sodium E401) dans les crèmes glacées pour empêcher la formation de cristaux, ou comme protecteur (films alimentaires). Il existe bien d'autres applications en biotechnologies, dans l'industrie cosmétique et l'industrie du textile tableau I.1 [29].

Tableau I.1: Quelques utilisations de l'alginate dans différents secteurs industriels et exemples d'application.

Application	Rôle de l'Alginate
Pharmaceutique et biotechnologies	Immobilisation de cellules, diffusion contrôlée de principes actifs, dermatologie et guérison des plaies, empreintes dentaires
Agroalimentaire	Agent texturant (épaississant ou gélifiant) Conservateur dans de nombreux produits : confitures, jus de fruits, glaces (empêche la formation de cristaux). un protecteur (films alimentaires).
Industrie textile	Epaississant pour les pâtes d'impression, Epaississant et stabilisateur des teintures, Agent d'imperméabilisation, Agent plastifiant et filmogène.
Travail du papier	Amélioration de l'uniformité de surface
Production de céramiques	Réduction du dessèchement des surfaces, stabilisant

I.2.1 Propriétés physico-chimiques.

I.2.1 .1 Composition chimique.

Les alginates de sodium sont des sels d'acide alginique ($\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$) constitués de deux acides uroniques dans la macromolécule d'acide alginique : l'acide β – D – mannuronique (M) et acide α – L – guluronique (G) (figure I.6.a) ,de masse moléculaire $\approx 240000\text{g/mol}$, contient, au minimum 19% et un maximum 25% de groupes carboxyliques, (COOH) sous forme de poudre cristalline ou amorphe, blanche ou brun-jaune, inodore et sans saveur.

Les alginates sont donc considérés comme de vrais copolymères à blocs composés de régions homopolymères de M (blocs MM) et G (blocs GG) séparées par des zones aux structures alternées (blocs MG).

Les propriétés physico-chimiques des solutions et du gel d'alginate, en milieu aqueux, dépendent de la structure du polysaccharide et de la longueur des blocs MM, GG et MG (figure I.6 a et b)

- ✓ Acide D-mannuronique : blocs M dur difficiles à dépolymériser,
- ✓ Acide L-guluronique : blocs G également durs,
- ✓ les 2 acides: blocs MG fragiles, au niveau desquelles se fait souvent la cassure.

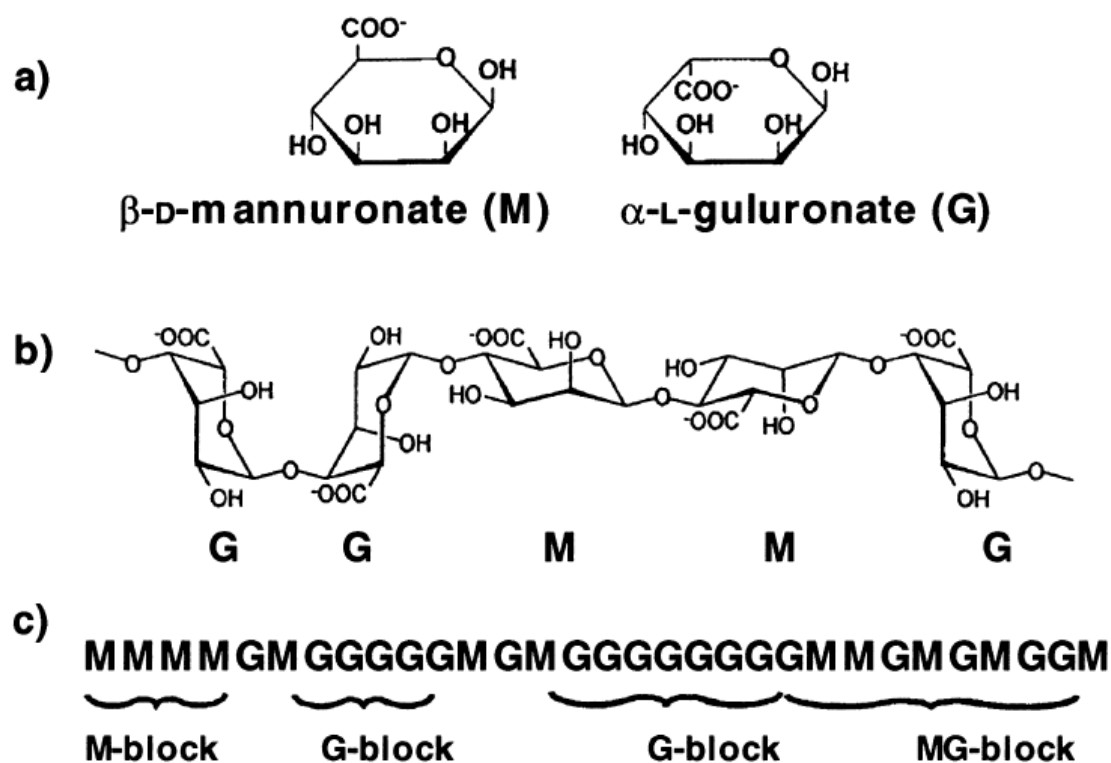


Fig I.6:Caractéristiques structurales d'alginate : (a) monomères de l'acide alginique, (b) polymère d'alginate, (c)distrubution des blocs [26].

I.2.1 .2 Solubilité

Les alginates sont solubles à froid et facilement solubles dans l'eau. L'alginate de sodium est le plus utilisé, pratiquement insoluble dans l'alcool et dans les solvants organiques. Trois paramètres essentiels déterminent et limitent la solubilité des alginates dans l'eau :

➤ le pH du solvant :

Les constantes de dissociation des monomères d'acide mannuronique et guluronique sont 3.38 et 3.65, respectivement. La valeur du pK_a de l'alginate est assez voisine des constantes d'acidité des monomères. Le pH de la solution joue un rôle important dans la solubilisation d'alginate ; si le pH de la solution est inférieur aux constantes des monomères, il va entraîner la précipitation des molécules de l'acide alginique [26]. Les alginates contenant plus de sections alternées (blocs MG), précipiteront à des valeurs de pH plus faibles que les alginates contenant plus de blocs homogènes (poly-M et poly-G).

➤ La force ionique du milieu :

Tout changement de la force ionique d'une solution d'alginate a un effet sur le comportement du polymère en limitant son hydratation en milieu aqueux.

➤ La présence ou non d'ions favorisant la gélification :

Le taux de cations gélifiants, présent dans le solvant, influence bien évidemment la solubilité de l'alginate.

I.2.1.4 Gélification

La gélification de l'alginate se fait par formation de liaison physique en présence de cations multivalents tels que les ions Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} et Al^{3+} afin de former des hydrogels. Le modèle boîte à oeufs (« egg-box » model) est la représentation la plus couramment utilisée pour rendre compte des interactions entre les chaînes d'alginate et les cations divalents (Figure I.7).

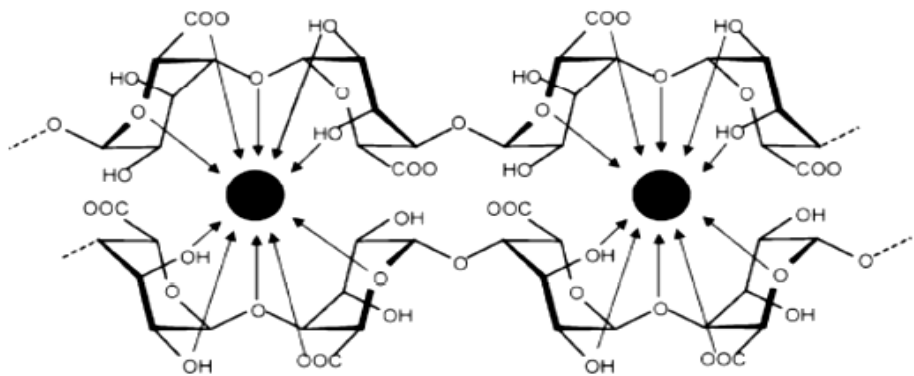


Fig I.7: Gélification ionotropique de l'alginate. Modèle "egg-box" [27].

I.2.1.3 Viscosité

La viscosité d'une solution d'alginate dépend essentiellement de la longueur moyenne des chaînes (masse molaire) et des conditions opératoires (solvant, température, force ionique). La forme et la rigidité de la macromolécule détermine également le comportement rhéologique de la solution obtenue. Une augmentation de la masse molaire d'un alginate implique naturellement une augmentation de la viscosité de la solution d'alginate, ce qui peut être bénéfique pour plusieurs applications dans l'industrie alimentaire ou les impressions textiles.

De façon prépondérante, la viscosité de la solution obtenue va dépendre du type d'alginate utilisé ; la figure I.8 compare les viscosités obtenues avec différents alginates pour des concentrations identiques en agent gélifiant (les mesures sont effectuées à 25°C).

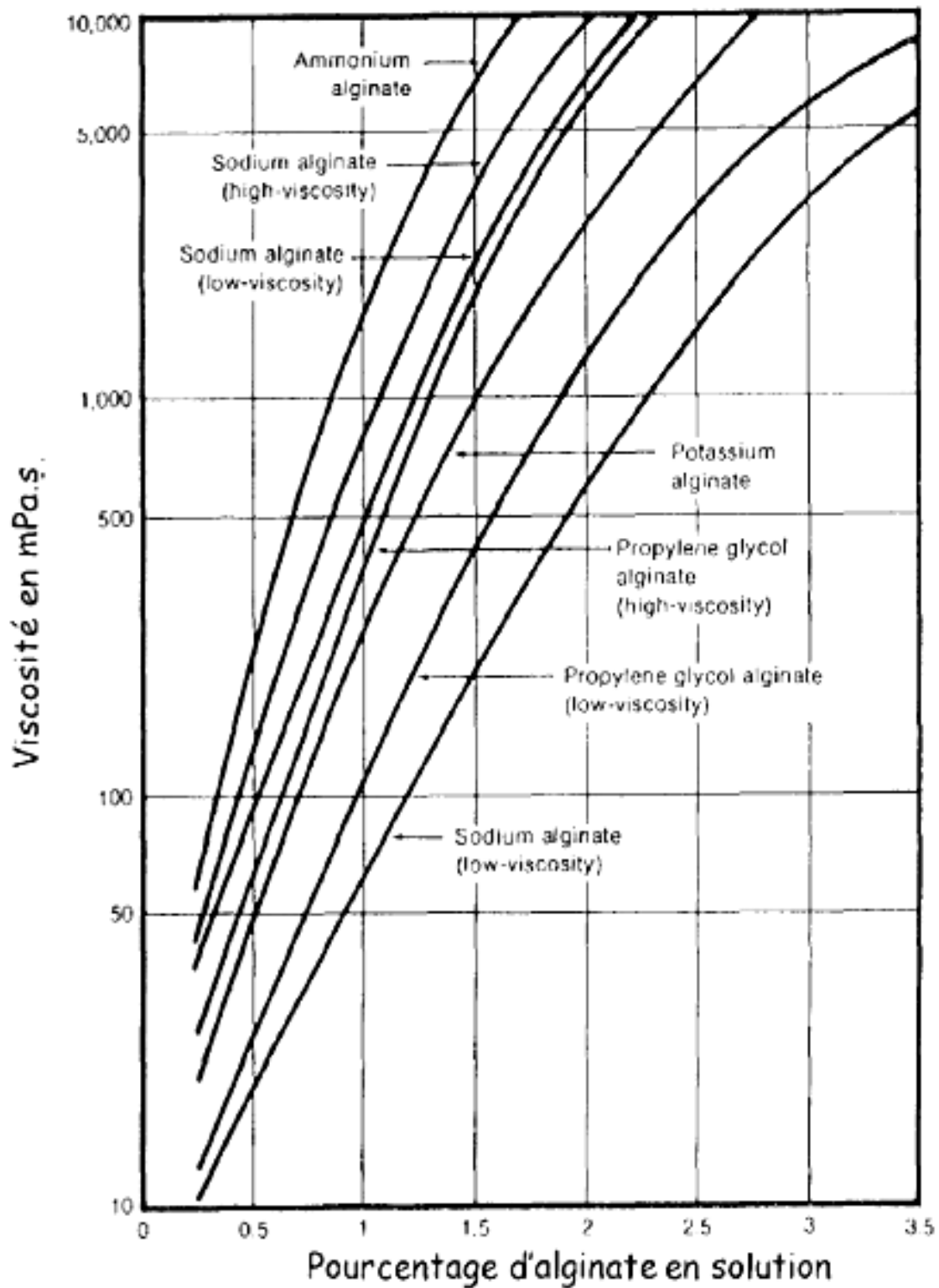


Fig I.8 : Variations de la viscosité selon le type d'alginate en solution et en fonction de la concentration de l'agent gélifiant [28].

I.2.2 Dégradation des chaînes alginates

La stabilité des alginates dépend fortement de la température, du pH et de la présence de contaminants. Les liaisons glycosidiques sont susceptibles de rompre lorsque l'alginate est utilisé en milieu acide ou basique. A titre d'exemple, pour des pH inférieurs à 5, l'hydrolyse acide de ces liaisons induit une diminution de la masse molaire par coupure des chaînes [29]. Ainsi, La dégradation des alginates peut être mise en évidence au cours du temps grâce à l'étude de la viscosité intrinsèque d'une solution d'alginate figure I.9.

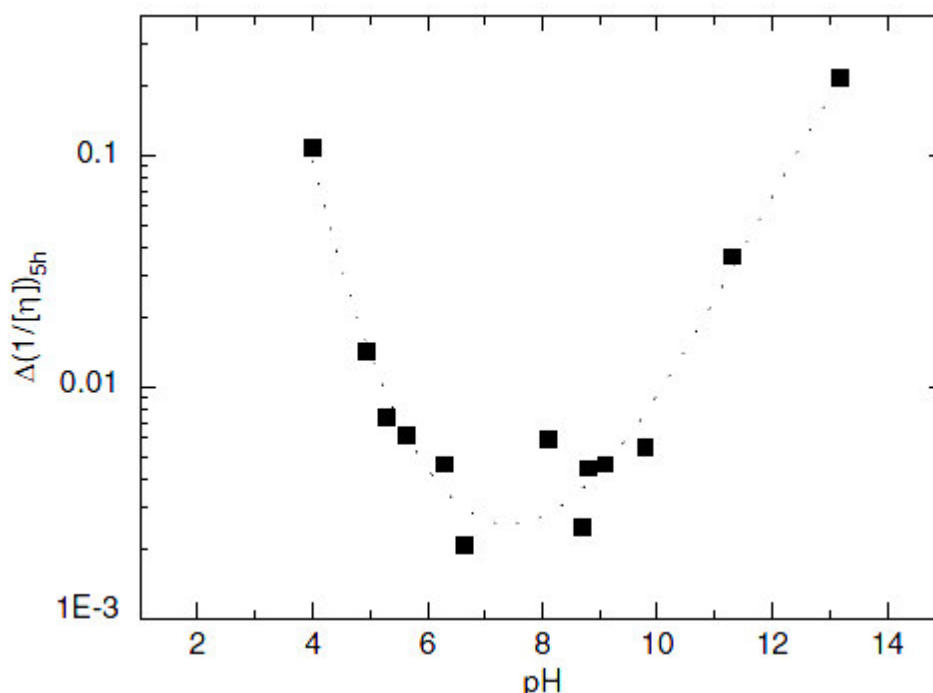


Fig I.9 : Dégradation d'un alginate ; extrait de la *LaminariaDigitata*. Mesure de la variation de l'inverse de la viscosité intrinsèque ($1/[\eta]$) après 5 heures à différents pH et à 68°C[29].

I.2.3 Film nanocomposite en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire

Le film nano-composite à matrice bio-polymère est un matériau actif, grâce à la possibilité d'incorporer des agents antimicrobiens naturels ou synthétiques dans les formulations filmogènes. La confection de ces matériaux actifs est de plus en plus recherchée par les industries, notamment dans le domaine alimentaire, afin de limiter les pertes importantes d'aliments lors de leur stockage et d'éviter par ailleurs le développement de bactéries. Les alginates étudiés pour le développement de films antimicrobiens ont permis la réduction de la croissance de la flore naturelle et des coliformes sur des produits carnés [30-

31]. Wu *et al* [32] ont emballé, sous vide, des boulettes de viande de bœuf précuites avec des films composites pour un stockage réfrigéré. Ils ont montré que les films, à base d'amidon et d'alginate, comportant de l'acide stéarique, diminuent la perte d'eau pendant le stockage [33].

La plupart des biopolymères sont hydrophiles, ce qui leur confère des propriétés de perméabilité à la vapeur d'eau. Ces propriétés sont dues notamment à la présence de fonctions polaires hydroxyle qui ont une forte réactivité avec l'eau par formation de ponts hydrogènes [34-35]. Cette propriété trouve également une application dans les emballages des produits humides. Bierhalz *et al.* [33-36] ont observé que les films à base d'alginate étaient plus adaptés que les films à base de pectine à l'élaboration de films comestibles antimicrobiens avec de la natamycine. De plus, l'étude biologique de Cha *et al.* a préparé des films à base d'alginate et de K-carraghénane pour examiner leur effet antimicrobien seul et en combinaison avec la nisine et autres substances antibactériennes (lysozyme, extrait de raisin). Les films d'alginate ont montré une large activité inhibitrice comparativement aux films de K-carraghénane avec les mêmes combinaisons et le même taux d'incorporation des agents antimicrobiens [34]. En outre, les films nanocomposites biopolymères sont d'excellents véhicules pour l'incorporation d'une grande variété d'additifs chimiques, tels que des antioxydants, des agents antifongiques et antimicrobiens, [37-38]. Dans ce contexte, des composés naturels, comme les huiles essentielles, avec leur efficacité anti-infectieuse et antioxydante [39], sont utilisés dans l'élaboration de films antimicrobiens. Ils peuvent, donc, être appliqués à la surface de produits alimentaires.

I.3 Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, les essences ou les huiles volatiles sont des substances naturelles volatiles à pression atmosphérique, généralement liquides, à température ambiante, caractérisées par une forte odeur [40]. Obtenues soit à partir de matière première naturelle (certains végétaux) par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau soit à partir des fruits par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques [41].

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fractions chimiques très diverses. Ces substances sont des molécules très volatiles, appartenant pour la grande majorité, à la famille des terpènes, comme les monoterpènes, (myrcène, β -pinène, γ -terpinène), les sesquiterpènes (β -caryophyllène, γ -humulène, β -bisabolène) et les phénols (thymol) [42-43].

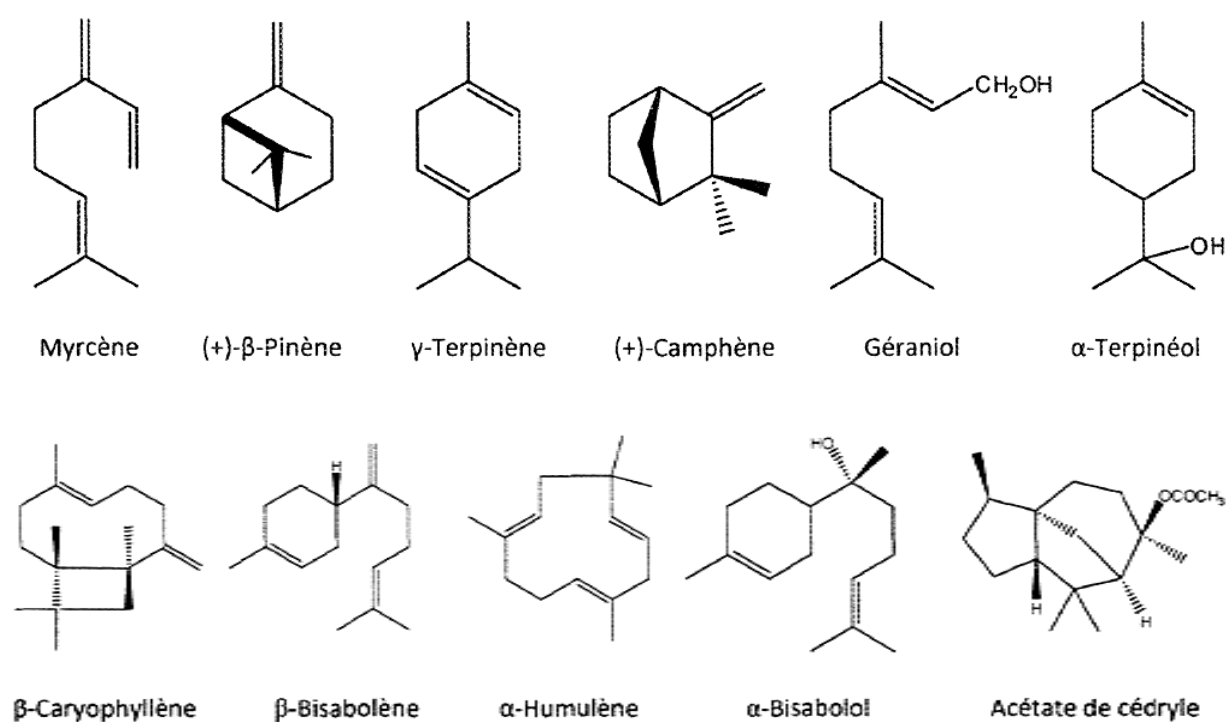


Fig I.10 : Structure chimique de monoterpènes et de sesquiterpènes des huiles essentielles[41].

I.3.1 Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans base scientifique précise. La recherche scientifique actuelle se limite à des recherches fondamentales de la phytochimie ou aux propriétés biologiques des huiles essentielles, notamment tout ce qui concerne l'infectiologie qui mène au développement des nouvelles applications dans les domaines pharmaceutique et alimentaire. L'activité biologique des huiles essentielles est liée à sa composition chimique, plus particulièrement aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) [44]. Cette diversité des groupes structuraux permet de protéger efficacement contre de nombreux pathogènes, tels que les bactéries, les champignons et les virus.

I.3.1.1 Activité antimicrobienne

Les huiles essentielles sont largement étudiées pour mieux cerner leur efficacité comme agents antimicrobiens naturels. L'activité antimicrobienne d'une huile essentielle peut être biocide vis-à-vis de certaines souches, biostatique vis-à-vis d'autres ou encore n'avoir aucun effet. Ceci peut être lié au type de microorganisme (Gram positif ou Gram négatif), à sa forme planctonique ou en biofilm, à son métabolisme et à sa résistance [45].

- **Activité antibactérienne**

Des études récentes ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants présentent un potentiel important en tant qu'agents antimicrobiens et dans plusieurs domaines industriels et médicaux. Belletti et Fisher, ont démontré que les huiles essentielles de citrus sont efficaces contre les bactéries pathogènes et contre certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que *Mycobacterium jejuni*, *Listeria monocytogens*, *Escherichia coli O157 :H7*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* et *Acrobacter butzli* [42-46-47].

- **Activité antifongique**

Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs présentent une importante activité antifongique contre les champignons

phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. L'activité antifongique des huiles essentielles a été évaluée sur l'espèce de levure *Candida albicans*. Ce microorganisme est responsable de nombreuses infections fongiques chez l'homme, notamment au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques[43-46]. Selon les travaux de Prudent, Sharma et Viuda-Martos, les H.E de citrus : d'orange douce, de citron, de mandarine et pamplemousse montrent une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. verrucosum*[48-50].

I.3.1.2 Activité anti-oxydante

Les huiles essentielles sont considérées comme des ressources potentielles de molécules bioactives naturelles, qui ont été étudiées pour leurs propriétés antioxydantes [51]. Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol font partie des molécules des huiles essentielles présentant les plus fortes activités antioxydantes ainsi que d'autres composés qui contribuent à cette activité tels que les monoterpènes, les alcools, les cétones, les aldéhydes, les hydrocarbures et les éthers[52-54].

L'étude Caillet et Lacroix ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) ou leur application par vaporisation à la surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation [51-55].

I.3.1.3 Activité anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire des huiles essentielles a été étudié en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires, telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite [43-56]. Les composés actifs α -terpinéol de huile essentielle de *Melaleuca Alternifolia* empêchent la libération d'histamine ou réduisent la production de médiateurs de l'inflammation [57]. Une autre étude sur les huiles essentielles de *Carlina acanthifolia*, *Citrus aurantium*, *Cyperus esculentus* et *Hedychium coronarium* a montré un effet anti-oedème des pattes chez les rats traités par le carraghénane [40].

I.3.2 Toxicité

Les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale, faible, ou très faible. La majorité de celles qui sont couramment utilisées ont une dose létale DL₅₀ comprise entre 2 et 5g/kg (Anis, eucalyptus, girofle...etc), ou ce qui est le plus fréquent supérieure à 5g/kg (camomille, citronnelle, lavande, vétiver...etc) donnée observée chez l'animal. Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles [58]. Certaines études se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. Les huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol, ou carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furacoumarines). D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone sont toxiques pour les tissus nerveux) [59]. Il existe aussi quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers, c'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme le safrole (*Sassafras*), l'estragole (*Artemisiadracunculus*), la β -asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol [42-43].

Dans ce travail, l'huile essentielle de citron a été incorporée dans les nanocomposites alginate/montmorillonite pour l'élaboration de films antibactériens.

Le tableau I.2 présente ses principales caractéristiques physico-chimiques.

Tableau I.2 : caractéristiques physico-chimiques d'huile essentielle de citron [33].

Nom botanique (famille végétale)	Citrus limon (L.) burm.f.(Rutaceae).
N°CAS	84929-31-7
N° EINECS	284-515-8
Organe du végétal traité	Ecorce ou péricarpe (zeste) du fruit.
Mode de traitement	L'extraction par expression à froid : il suffit de procéder à une forte pression hydraulique de la substance végétale. L'huile essentielle contenue dans de petites glandes du zeste est alors séparée du jus de son fruit par un système mécanique. L'huile essentielle distillée est obtenue par entraînement à la vapeur d'eau des fruits broyés.
Rendement(%)	Rendement par expression à froid :exemple en Italie 0.463%en octobre,

	0.01263% en mars, 0.158% en juin. Rdt par entraînement à la vapeur d'eau : 0.6% à 0.7%
Aspect	Liquide mobile, limpide pouvant être trouble par abaissement de la température. Couleur jaune clair à jaune verdâtre clair. Odeur caractéristique du péricarpe frais de citron.
Toxicité DL₅₀ (g/kg)	H.E exprimée : orale aigue chez le rat >5 Dermique aigue chez lapin >5 H.E distillée : oral aigue chez le rat >5 Dermique aigue chez lapin >5

Références bibliographiques

[1] Sahnoun Sousna , Mokhtar Boutahala, " Caractérisation physico chimique de l'Halloysite Algérienne nanotubulaire", communications au IVème Séminaire National Matériaux, Procédés et Environnement , FSI ; Boumerdès 15 & 16 Mai 2012.

[2] Léa ABI NASSIF, "Elaboration et caractérisation de biomatériaux antimicrobiens à base d'alginate pour des applications dans les domaines médicaux et marins", thèse de doctorat de l'université de Bretagne occidentale comue université Bretagne Loire , 2019, p42.

[3] Heriarivelo RISITE," Nanocomposites polymères/montmorillonites: rôle des interactions générées par la modification des argiles/ polymères sur la morphologie et les propriétés structurales, thermiques, rhéologiques et mécaniques", thèse de doctorat de l'université Mohammed V faculté des sciences Rabat, 2015, p 13.

[4] Djamilia SOUMEUR, "synthèses et caractérisations de nanocomposites polyaniline – magnétite", thèse de doctorat de l'université des sciences et de la technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, 2012, p10.

[5] Paul COSTA, Nanomatériaux Propriétés et applications, Techniques de l'Ingénieur, traité Matériaux métalliques, M 4 027p12.

[6] Saliha CHAOUI, "Elaboration et caractérisation de nanocomposite à matrice polymère : Approche expérimentale", thèse de doctorat de l'université Ferhat Abbas- Sétif, p3-4-11.

[7] Lavorgna, M., Piscitelli, F., Mangiacapra, P., Buonocore, G.G., Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films. *Carbohydrate Polymers* 82 (2), 291–298, 2010.

[8] Xu, Y., Ren, X., Hanna, M., Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization. *J. Appl. Polym. Sci* ,99 (4), 1684–1691, 2006.

[9]Darder, M., Colilla, M., Ruiz-Hitzky, E.,Biopolymer- Clay Nanocomposites Based on Chitosan Intercalated in Montmorillonite, *Chem. Mater* ,15 (20), 3774–3780,2003.

[10]Wang, S., Shen, L., Tong, Y., Chen, L., Phang, I., Lim, P., Liu, T., Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization. *Polym. Degrad. Stab.* 90 (1), 123–131, 2005.

- [11] Rhim, J., Hong, S., Park, H., Ng, P., Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem* ,54 (16), 5814–5822, 2006.
- [12] Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J., Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *J. Food Eng.* 110, 232–239, 2011.
- [13] Rhim, J., Ng, P., Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47 (4), 411–433, 2007.
- [14] Casariego, A., Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Teixeira, J.A., Cruz, L., Díaz, R., Vicente, A.A., Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. *Food Hydrocoll.* 23 (7), 1895–1902, 2009.
- [15] Nadège Follain, Sébastien Alix, Serge Bourbigot, Jérémie Soulestin et Stéphane Marais. Nanocomposites polyamide 6/montmorillonite : Effet sur les propriétés barrière aux gaz et à l'eau, HAL Id: hal-00597001, 2011.
- [16] Ju-Hwan Park, Hyeon-Jong Shin, Min Hwan Kim, Ji-Su Kim, Naewon Kang, Jae-Young Lee, Ki-Taek Kim, Jangik Ike Lee, Dae-Duk Kim, "Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug delivery systems", Review, *Int. J. Pharm. Investig.*, 10.1007/s40005-016-0258-8, (2016).
- [17] KAFI Bilal, "Préparation et Caractérisation de Bentonite Modifiée par un Polyoxométallate Application à l'adsorption du Bleu de Méthylène", thèse de doctorat de l'université de Badji Mokhtar- Annaba, 2019, p14-17.
- [18] Loïc LE PLUART, "Nanocomposites Epoxyde/amine/montmorillonite : Rôle des interactions sur la formation, la morphologie aux différents niveaux d'échelle et les propriétés mécaniques des réseaux", thèse de doctorat de l'université de Lyon, 2020, p31-32.
- [19] Fatiha ABDELLI, "élaboration et caractérisation de nanocomposite cellulose /Montmorillonite", thèse de magister de l'université M'hamed Bougera-Boumerdes, 2008, p22.

[20] Fabrice SALLES, "Hydratation des argiles gonflantes : séquence d'hydratation multi-échelle détermination des énergies macroscopiques à partir des propriétés microscopiques", thèse de doctorat de l'université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 2006, p39.

[21] Zoubida BOUDJNANE, " Synthèse des membranes à base de polymères et d'argile", thèse de doctorat de l'université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen ,2018, p 31.

[22] Moumen Abdelhak, " Contribution à l'étude de l'effet du traitement thermique sur les diverses propriétés d'un nanocomposite à matrice polypropylène", thèse de magister de l'université Ferhat Abbas- Sétif, 2014, p 18.

[23] Farida BENSADOUN, " développement et caractérisation d'un procédé de fabrication de composites et biocomposites à base de nanoparticules d'argile et de résine polyester insaturée destinés à l'industrie du transport", mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de maîtrisées sciences appliquées de l'université de Montréal ,2011p 31.

[24] Xu, Y., Ren, X., Hanna, M, "Chitosan/clay nanocomposite film preparation and characterization". *J. Appl. Polym. Sci.* 99 (4), 1684–1691,2006.

[25] Mehdi Abdollahi , Masoud Rezaei , Gholamali Farzi , " A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan", *J. Food Eng*,111 (2012) 343–350,2012.

[26] Nadir MOKRANI, " préparation et étude du comportement de membranes biopolymères alginate de sodium/chitosane", thèse de magister de l'université M'hamed Bougera-Boumerdes, 2013, p 17.

[27] Emilie VINCENT, " les alginates et leurs applications en pharmacie et en ingénierie application a la construction d'un biomatériau ", thèse le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, université Henri Poincaré - Nancy 1,2010, p6.

[28] Isabelle GOUJON, "Les Alginates : excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie Pharmaceutique Application à la synthèse d'un gel chimique", thèse le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincaré - Nancy I, 2004, p 67-65.

[29] Vincent PALLUAULT, "Nouveaux traitements de surface respectueux de l'environnement par des gels polymères réticulables : Application à la préparation des

surfaces d'usage dans le secteur aéronautique", thèse de doctorat de l'université de Bordeaux I, 2010, p 18-23.

[30] Óscar L. Ramos , João C. Fernandes , Sara I. Silva , Manuela E. Pintado & F. Xavier Malcata , " Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52:6, 533-552.

[31] Rajâa BENABBOU," Developpment et Caracterisation de Films Antimicrobiens pour La Biopréservation des Produits Marins Prêts à Consommer", thèse de doctorat de l'université Laval, 2009, p32.

[32] Wu, Y., "Moisture loss and lipid oxidation for precooked ground-beef patties packaged in edible starch-alginate-based composite films", *J. Food Sci.*, 2001.66(3): p. 486-493.

[33] Basak Yilin COLAK," Utilisation du caséinate de sodium pour la fabrication de films actifs pour l'emballage alimentaire : étude des propriétés barrières aux gaz, de l'activité antimicrobienne et de la biodégradabilité",thèse de doctorat de l'Université Jean Monnet, Saint-Etienne, 2014,p18.

[34] Auras R., HarteB., Selke S., An overview of polylactides as Packaging Materials. *Macromol. Biosci.* 4,2004, p. 835–864.

[35] Holy Nadia Rabetafika, Michel Paquot et Philippe Dubois., " Les polymères issus du végétal : matériaux à propriétés spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique", *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006 10 (3), 185 – 196.

[36] Bierhalz, A.C.K., M.A. da Silva, and T.G. Kieckbusch, Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *J. Food Eng.*, 2012. 110(1): p. 18-25.

[37] Rhim, J., Ng, P., 2007. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*47 (4), 411–433.

[38] Wong, D., Camirand, W., Pavlath, A., (1994). Development of edible coatings for minimally processed fruits and vegetables. Edible coatings and films to improve, *J. Food Qual.* 65–88.

[39] Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012). A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *J. Food Eng.*111(2), 343e350.

[40] Afaf LEMAOUÏ, " Activités antioxydante et anticoagulante des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa*.L Algérienne ", thèse de magister de l'université Ferhat Abbas-Sétif,2011,p 26.

[41] Jean GARERO, Huiles essentielles, Techniques de l'Ingénieur, traite constantes physico-chimiques k343p2-26.

[42] Zohra HELLAL," contribution a l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des citrus .application sur la sardine", thèse de magister de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 2011, p15-22.

[43] Marianne PIOCHON," étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse", mémoire présenté à l'université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables, 2008, p13-104.

[44] Amina ATTOU," Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent", thèse de magister de l'université Abou Bekr Belkaid –Tlemcen, 2011.

[45] Leila LAKHDAR,"Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude in vitro", thèse de doctorat de l'université de Mohammed V de Rebat ,2015p42.

[46] BELLETTI N., NIDAGIJIMANA M., SISTO C., GUERZONI M.E., LANCIOTTI R.,GARDINIF. "Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *saccharomyces cerevisiae* . *J. Agr. Food. Chem.* 52(23), 6932-6938, 2004.

[47] FISHER K., ROWE C. ET PHILLIPS C .,the survival of three strains of *acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components in vitro an food . *Lett. Appl. Microbiol.*, 44,495-499, 2007.

- [48] PRUDENT D., PERINEAUF., BESSIERE J.M., MICHEL G.M., BACCOU J.C .analysis of the essential oil oregano evaluation of bacteriostatic and fungistatic proprieties . *J. Essent. Oil Res.*7, 165-173, 1995.
- [49] SHARMA N., TRIPTHI A., FUNGITOXICITY OF CITRUS SINSSENSIS L .Essential oil on post-harvest pathogens . *World J Microb Biot*, 22,587-593, 2006.
- [50] VIUDA-MARTOS M., RUIZ-NAVAJAS Y., FERNANDEZ-LOPEZ J., PEREZ-ALVAREZ J., antifungal activity of lemon (citrus lemon L.), mandarin (citrus reticulata), grapefruit citrus paradisi l) and orange (citrus sinensis l.) essential oils .*Food Control*, 19,1130-1138,2008.
- [51] He, M.; Du, M.; Fan, M.; Bian, Z." *In vitro* activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms". *Mycopathologica* 163,137-143,2007.
- [52] S. athamena, I. chalghem, A. kassah-laouar, S. laroui et S. khebri ," activite anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *cuminum cyminum* L, *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 1, 2010.
- [53] A.P Ananda, B.S Nagendra, T.P Krishnakantha and Richard Joseph," Enhancement of antioxidant profile of Japanese cherry (*Muntingia calabura* Linn.) by alcoholic fermentation", *Int. J. Pharm. Life Sci.* 0976-7126.
- [54] Cristina Popovici, Ilonka Saykova, Bartek Tylkowski," Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH",*Revue de génie industriel* 2009, 4, 25-39.
- [55] Anthony Ojeil, Nada El Darra, Youssef El Hajj, Paulette Bou Mouncef 1, Toufic J. Rizk2 et Richard G. Maroun," Identification et caracterisation de composes Phenoliques extraits Du Raisin Chateau Ksara",*Lebanese Science Journal*, Vol. 11, No. 2, 2010.
- [56] LAIB Imène"Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les moisissures des légumes secs", thèse de magister de l'université Mentouri Constantine Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Argo-alimentaires (I.N.A.T.A.A), 2011, p26.

[57] Maruyama, N.; Sekimoto, N.; Ishibashi, H. 2005. Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *J. inflamm*, 2, 1-11.

[58] Hart, P.H.; Brand, C; Carson, CF.; Riley, T.V.; Prager, R.H.; Finlay-Jones, Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Malaleuca altemifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *inflamm. Res. J.J.* 2000,49, 619-626.

[59] Marie-Cécile PIBIRI, " Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles", thèse de doctorat de École Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2006, p33.

[60] Solene JOUAULT, "la qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité", thèse de doctorat en pharmacie de l'université de Lorraine, 2012, p103.

Chapitre II

Elaboration et caractérisation de films
nanocomposites

Alginate/MMT-LEO

II.1. Introduction

Ce chapitre regroupe la méthode d'élaboration et diverses techniques de caractérisation utilisées dans le cadre de ce travail de thèse. Cette étude met en évidence l'important rôle que joue la nature des interactions physico-chimiques entre le polymère naturel alginate et l'argile (montmorillonite); les nouvelles liaisons chimique formées, la structure, la morphologie, les comportements thermiques des films bio-nanocomposites obtenus et caractérisés par :

- la microscopie optique
- la diffraction des rayons X
- la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
- l'épaisseur
- l'analyse thermogravimétrique
- la calorimétrie différentielle à balayage
- l'opacité.

II.2. Matériaux et produits utilisés

II.2.1 Matériaux

Les principaux matériaux utilisés au cours de notre travail sont :

- Alginate de sodium ($\text{Na C}_6\text{H}_7\text{O}_6$) utilisé en poudre produit par Sigma Aldrich (Alginic Acid sodium salt, from brown algae) de lot #MKBT7870V

Tableau II.1 : Caractéristiques physico-chimiques de l'alginate de sodium

Propriété	Unité
Apparence (couleur)	Poudre : Blanc Crème.
pH	6,8 - 8 (1% dans H ₂ O)
Solubilité	Soluble dans l'eau: 10 g/l
Température de fusion	> 300 °C
Stabilité chimique	Stable dans les conditions normales
DL50 orale rat	> 5000 mg/kg

- Bentonite (la montmorillonite) $Al_2O_3 \cdot 4SiO_2 \cdot H_2O$ fourni par Sigma Aldrich, possède les propriétés présentées dans le tableau :

Tableau II.2: Caractéristiques physico-chimiques de la montmorillonite

Propriété	Spécification
Apparence (couleur)	Blanc à gris
Perte au séchage	< 8.0 %
pH	7.0 - 10.5
Masse volumique	2.5 g/cm ³

- Huile essentielle de citron (lemon, terpeneless, natural; FG; Batch # :MKBD6165 ; SAFC) utilisée comme agent antibactérien et antifongique

II.2.2 Produits chimiques.

- Tween 80(émulsifiant) crée une distribution uniforme et stable dans la matrice d'alginate.
- Glycérol (1, 2,3-propanetriol glycerin ca 87% ; lot# SZBB0800V, Sigma-Aldrich) améliore les propriétés mécaniques des membranes.

II.3 Méthode de préparation des films

Une solution d'alginate de sodium (1% p/v) est préparée en dissolvant 10g d'alginate de sodium en poudre dans 1000 ml d'eau distillée sous agitation magnétique (1200 trs/min) à 70°C pendant 45 min, 0.25% (g/g) de glycérol est ajoutée à la solution d'alginate. Une quantité spécifique de MMT (3% p/p par rapport à la teneur d'alginate de sodium solide) est dispersée dans 50 ml d'eau déminéralisée et remuée vigoureusement pendant 24h à température ambiante. Ensuite, 150 ml de la solution d'alginate sont ajoutés lentement à la solution d'argile, et le mélange préparé est agité pendant 4h. Enfin, l'huile essentielle de citron (0.5%, 1% et 1.5% par rapport au mélange), précédemment mélangée au tween 80 (0.25g/g d'huile essentielle), est incorporée dans la solution filmogène.

La composition des 5 formulations (de F1 à F5) utilisées est représentée sur le tableau II.3

Tableau II.3:Composition de Différentes formulations préparées

formulation	Concentration des différents composants						
	solution de film				Huile essentielle		
	Alginate %v/v	Argile p/v	Glycérol p/p	Tween80 p/p	Citron %v/v		
F1	1%	-	0.25%	0.25%	-	-	-
F2	1%	3%	0.25%	0.25%	-	-	-
F3	1%	3%	0.25%	0.25%	0.5%	-	-
F4	1%	3%	0.25%	0.25%	-	1%	-
F5	1%	3%	0.25%	0.25%	-	-	1.5%

Chaque mélange préparé est homogénéisé à 1000 tours/min (homogénéisateur Ultra-Turrax) pendant 10 mn et dégazé pendant 30 min. Enfin la solution filmogène est coulée (casting) dans des boîtes de pétri de 9cm de diamètre (figure II.1) et séchée pendant 72 h à température ambiante. Les films formés sont ensuite stockés dans un dessiccateur contenant une solution saturée du nitrate de magnésium.

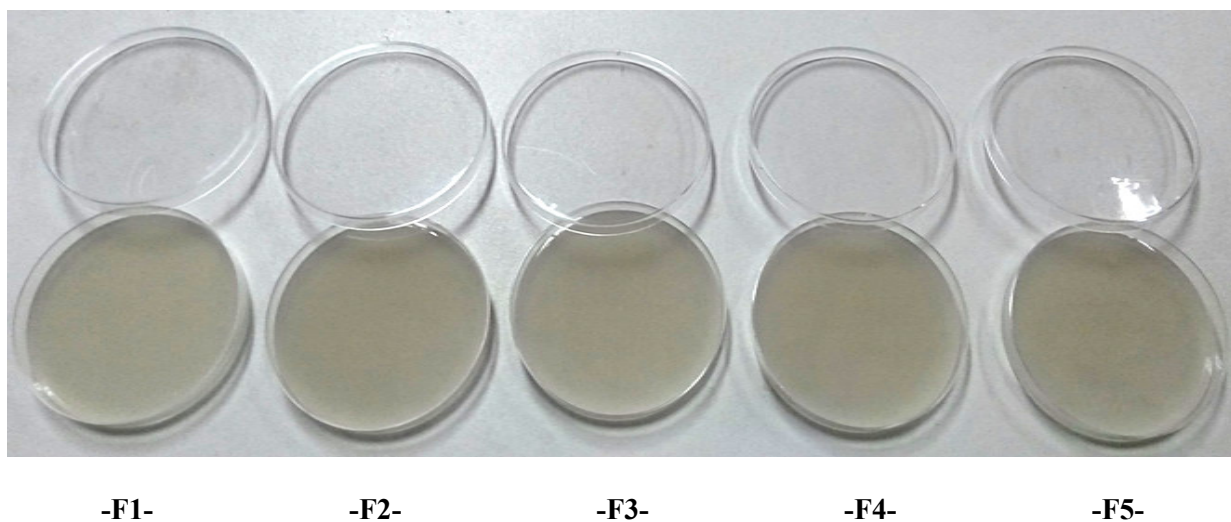


Fig II.1: Les solutions filmogènes alg/MMT-LEO.

II.4 Techniques expérimentales de caractérisation

La caractérisation microstructurale est essentielle pour la compréhension des relations entre la structure et les propriétés des nano-composites. Plusieurs techniques sont utilisées aujourd'hui pour la caractérisation de ces matériaux :

II.4.1 Caractérisation morphologique

II.4.1.1 Microscope optique (MOP)

L'étude morphologique des matériaux synthétisés a été examinée par microscope optique. Cette partie du travail permet de visualiser l'homogénéité de la surface du film nano-composite alg/MMT avant et après l'incorporation de l'huile essentielle à différentes concentrations. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique Olympus SC40 équipé d'une caméra numérique permettant l'acquisition des images obtenues.

II.4.1.2 Diffraction des rayons X

Cette technique est utilisée pour caractériser le taux d'exfoliation, les structures cristallines, et avoir une estimation sur la distance interfoliaire. L'analyse DRX a été réalisée sur un diffractomètre MiniFlex600 X-ray, (conditions de mesure: tube F.F 40kV et 15mA); les films ont été exposés à un rayonnement de Cu ($\lambda=1,54$ nm) et balayés sur la plage d'angle de diffraction $2\theta = 2-10^\circ$ et $2-40^\circ$ avec une vitesse de balayage de $4^\circ / \text{min}$ et un pas angulaire de $0,01^\circ$.

II.4.2 Caractérisation physico-chimique

II.4.2.1 L'épaisseur du film

L'épaisseur du film est mesurée à l'aide d'un micromètre électronique (Fig.II.2) ayant une sensibilité de 0,001 mm. Dix mesures d'épaisseur ont été prises pour chaque échantillon dans différents points. La valeur moyenne est utilisée pour déterminer l'épaisseur du film.

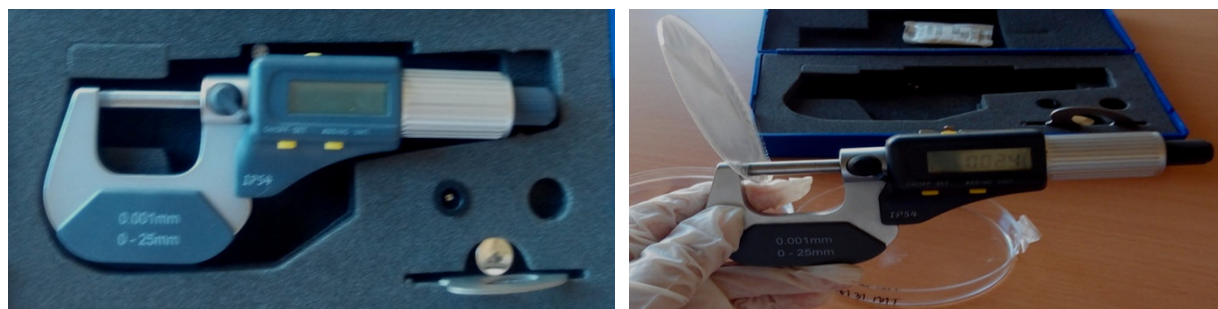


Fig II.2 : Micromètre électronique

II.4.2.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie FTIR est une technique d'analyse qui permet l'identification et la détermination des groupements chimiques caractéristiques de l'alginate de sodium, la montmorillonite et l'huile essentielle du citron. Nous pouvons, ainsi, mettre en évidence l'apparition ou la disparition de certaines bandes de façon très significative lors de la préparation des membranes alg/MMT. L'analyse a été réalisée sur un spectrophotomètre Agilent technologies Cary 640 FTIR en mode de transmission, dans la gamme d'onde allant de $400-4000\text{cm}^{-1}$ avec une résolution de 4cm^{-1} .

II.4.3 Caractérisation thermique.

L'analyse thermique des matériaux composites englobe une série de techniques de caractérisation qui apportent des informations complémentaires sur la composition chimico-minéralogique des matériaux composites.

II.4.3.1 Analyse thermogravimétrique (ATG)

Cette technique d'analyse mesure la variation de masse d'un échantillon lorsqu'il est exposé à un régime thermique donné afin de déterminer la température de désorption de l'eau, la température de dégradation et la stabilité thermique.

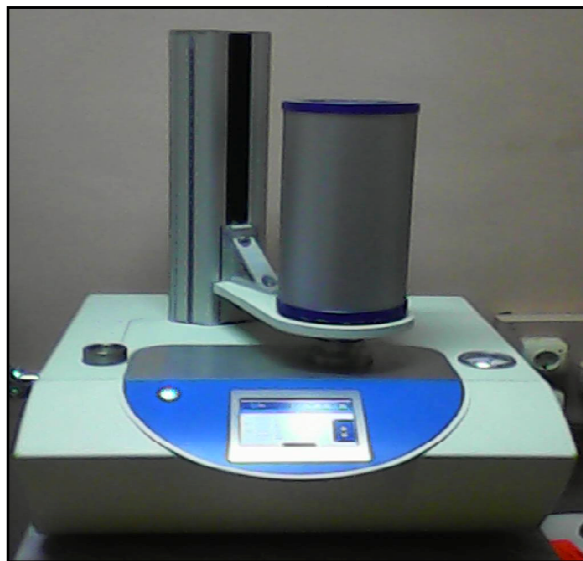
L'analyse thermogravimétrique a été réalisée sur un instrument LINSEIS.STA.PT1600.ATG sous un flux d'azote dans le domaine de température [20 - 800°C] avec une vitesse de chauffage de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

II.4.3.2 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

L'étude de variation des propriétés physiques, en fonction de la température, telles que la température de cristallisation (T_c), température de transition vitreuse (T_g) et température de fusion (T_f) a été réalisée par un calorimètre différentiel à balayage (TA Q2000). La masse initiale des échantillons est chauffée à des températures comprises entre 20 et 200°C , avec une vitesse de chauffage de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$.



DSC TA Q2000



LINSEIS.STA.PT1600.ATG

Fig II.3: Appareillage pour l'analyse thermique.

II.4.4 Caractérisation optique (Opacité).

La transparence a été mesurée par un spectrophotomètre UV-visible (Analytik Jena, Specord 200 plus), dans le but de déterminer les propriétés barrières des films alg/MMT/LEO contre les lumières ultraviolette et visible. Les films ont été découpés en forme rectangulaire et leur transparence est déterminée par balayage de la longueur d'onde de 200 à 800 nm.

L'opacité est donnée par l'équation suivante:

$$\text{Opacité} = \frac{\text{Abs 600}}{X}$$

X : l'épaisseur du film (mm)

Chapitre III

Etude des activités
antibactériennes et
antifongiques des dispersions de
différente concentration d'huile
essentielle dans la matrice

III.1. Test antibiogramme

Cette expérience a pour but, de mettre en évidence, l'effet d'incorporation d'huile essentielle de citron sur les propriétés antimicrobiennes des membranes alg/MMT et évaluer le pouvoir ou le potentiel d'inhibiteur vis à vis de 4 bactéries et 2 champignons.

III.1.1 Matériaux utilisés

III.1.1.1 Origine et choix des souches bactériennes

En raison de leur très large implication dans les phénomènes de contamination et d'infection alimentaire rencontrés dans le domaine médical, notre choix s'est porté sur les microorganismes suivants :

- bactéries : deux Gram positifs (*Staphylococcus aureus* ATCC : 25923; *Bacillus cereus* ATCC : 6633); deux Gram négatifs (*Escherichia coli* ATCC : 25922 ; *Salmonella enteritidis* ATCC : 13076) ;
- champignons : *Aspergillus baraziliensis* ATCC : 16404 et la levure : *Candida albicans* ATCC : 10230.

Ces souches ont été fournies par le laboratoire de microbiologie et bioprocédés du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBT).

III.1.1.2 Milieu De Culture

- **Bouillon B.H.I**

Le B.H.I (Brain Heart Infusion)-Sigma Aldrich- est un milieu de culture utilisé pour l'enrichissement d'un grand nombre de microorganismes tels que les bactéries et les champignons.

- **Gélose de Muller Hinton**

Le milieu de culture Muller Hinton – Biokar diagnostique – France est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens.

- **Milieu de culture Sabouraud**

Milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antifongique, la gélose de Sabouraud est le milieu classique d'isolement des champignons (moisissures et levures).

- **Milieu de culture Tryptone-Soja (TSA)**

Milieu de culture ordinaire qui permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de micro-organismes.

Tableau III.1 : les conditions de préparation du milieu de culture.

Milieu de culture	masse(g) dans 1L d'eau	pH	T (°C)
B.H.I	37	7.2	121/20min
La gelose M.H	38	7.3	121/20min
Sabouraud	60	5.7	121/20min
TSA	40	7,3	121/20min

III.1.1.3 Préparation des suspensions bactériennes

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir de cultures jeunes (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La figure III.1 décrit la courbe de croissance d'une culture bactérienne et ses différentes phases [1]:

1. **la phase de latence (λ)** : cette phase correspond à l'adaptation de l'inoculum (N_0) à son nouvel environnement. Durant cette période, la vitesse de croissance est nulle ($\mu=0$),
2. **la phase d'accélération** : les bactéries commencent à se multiplier pour atteindre progressivement la vitesse maximale de croissance (μ_{max}) ($0 < \mu < \mu_{max}$),
3. **la phase exponentielle** : la vitesse de croissance des bactéries est maximal ($\mu= \mu_{max}$),
4. **la phase de décélération** : la vitesse de croissance devient progressivement nulle ($\mu_{max} > \mu > 0$),
5. **la phase stationnaire** : la vitesse de croissance est nulle ($\mu = 0$) et la culture atteint sa densité maximale ($N=N_{max}$).

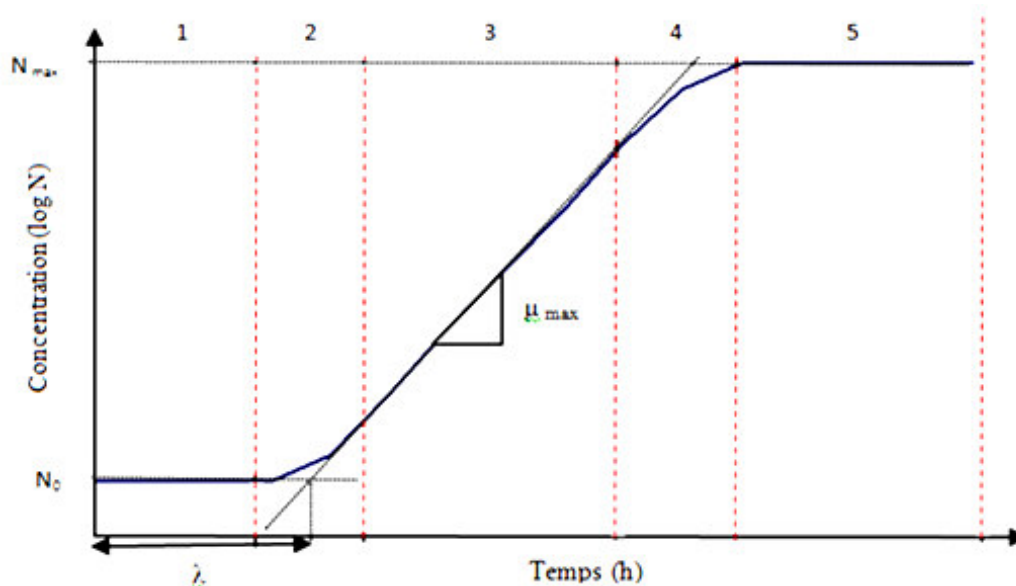


Fig III.1 : Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases.

La réactivation des souches est effectuée par l'ensemencement de l'espèce microbienne dans un milieu nutritive B.H.I après 24h d'incubation, à 37 °C. Les suspensions bactériennes sont diluées avec l'eau peptone stérile. La concentration de la suspension à 10^6 UFC/ml est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de $\lambda=620\text{nm}$ et une densité optique de 0.4.

III.1.1.4 Préparation des disques

Les disques sont fabriqués à partir du papier whatman n° 5, de diamètre 6 mm par un emporte-pièce. Ils sont, ensuite stérilisés à $T = 121^\circ\text{C}/20\text{min}$ puis stockés à température ambiante.

III.1.2 Protocole Expérimental

III.1.2.1 Méthode de diffusion sur disque

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. L'effet du produit antimicrobien sur le microorganisme ciblé est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition. Cette méthode nous permet de qualifier la sensibilité ou la résistance de ces bactéries vis-à-vis de l'huile essentielle de citron.

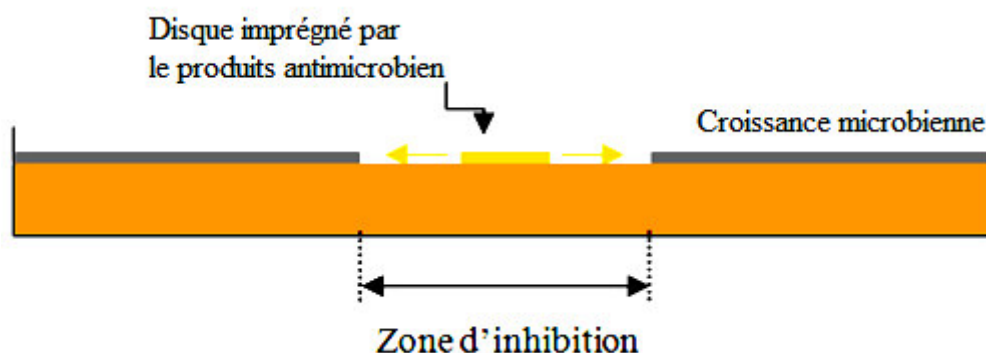


Fig III.2 : Schéma simplifié du principe de la méthode de diffusion en gélose.

▪ Ensemencement

On fait couler aseptiquement dans une boîte de pétri 20 ml de milieu de culture gélosé : Muller Hinton (M.H) pour les souches bactériennes et le Sbouraud pour l'activité antifongique, en surfusion. Après solidification du milieu de culture, un volume de 100 μl de suspension microbienne à tester est étalé sur toute la surface de gélose, afin d'obtenir une

quantité la plus homogène possible de bactéries à la surface. on laisse sécher pendant 10 à 15 min.

▪ Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, on prélève les disques (3 disques/ boîte) qui sont déposés sur la boîte, puis imbibés par 8 μ l de solution (alg/MMT-LEO) dans chaque disque. Les boîtes de pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 15 min, puis mises dans l'étuve à température de 37°C, pendant 24h.

▪ Expression des résultats

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (mm ou cm) de la zone claire autour du disque (halo translucide) appelée : zone d'inhibition. Les zones doivent être uniformément circulaires [2].L'activité antimicrobienne est exprimée en zones d'inhibition comme suit [3] :

- ✓ Diamètres inférieurs à 7 mm : *aucune activité antimicrobienne* (-),
- ✓ Diamètres de 7 à 9,9 mm : *activité antimicrobienne faible* (+),
- ✓ Diamètres de 10 à 11,9 mm : *activité antimicrobienne modeste* (+ +),
- ✓ Diamètres de 12 à 15 mm : *activité antimicrobienne élevée* (+ + +),
- ✓ Diamètres supérieurs à 15 mm : *activité antimicrobienne forte* (+ + + +).

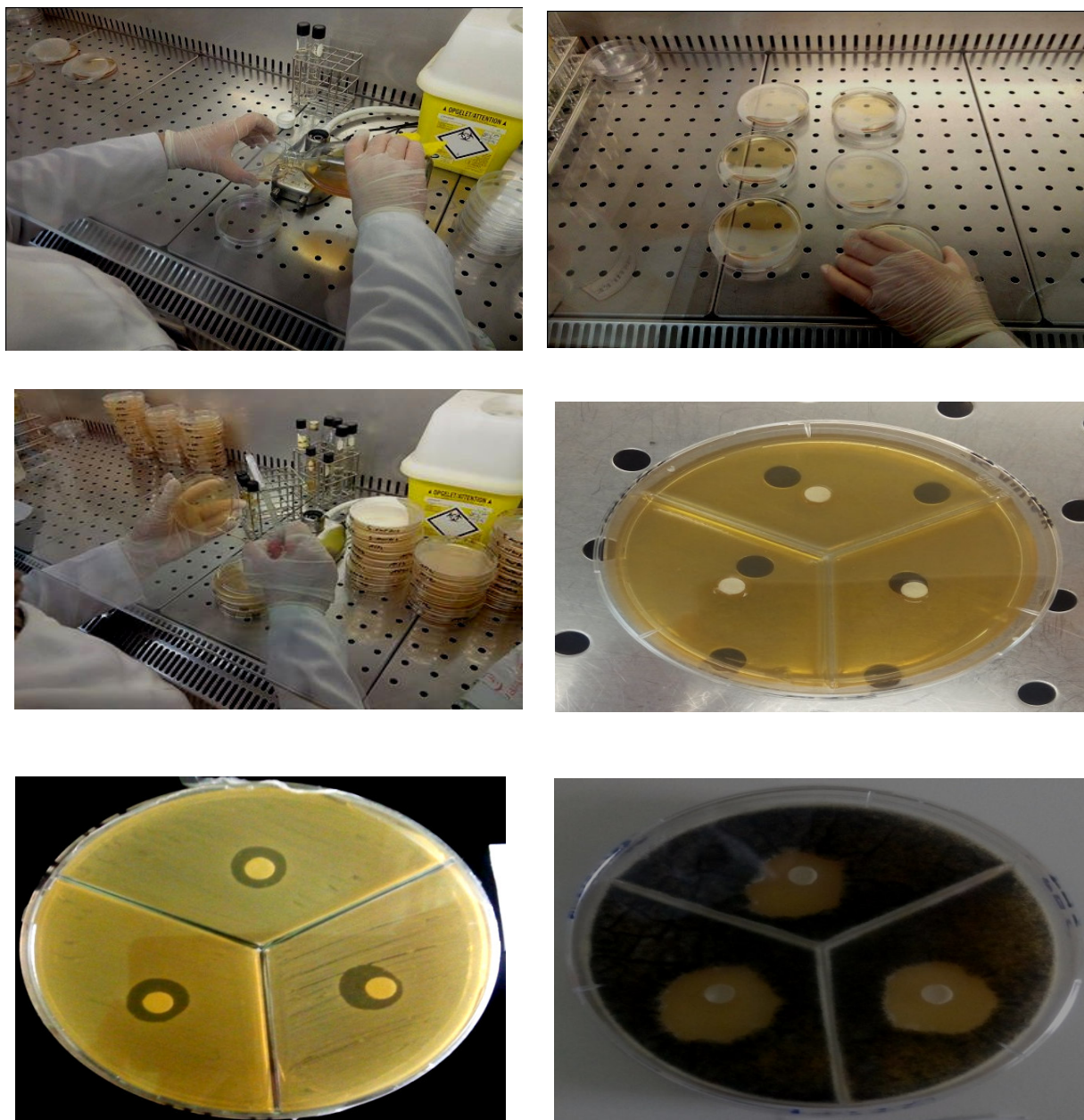


Fig III.3 : Test antibiogramme.

III.2 Dénombrement des bactéries

Cette méthode est une estimation statistique du nombre de micro-organismes distribués dans la boîte de pétri de manière parfaitement aléatoire, il s'agit d'une méthode quantitative.

Les bactéries sont dénombrées puis le nombre de bactéries est donné par unité de surface (UFC).

III.2.1 Protocole expérimental.

III.2.1.1 Echantillonnage

La méthodologie est adaptée, à partir des travaux de Sánchez-González [4] et Masoud Rezaei[5]. Une quantité de **20 g de TSA-3% NaCl** est coulée dans des boîtes de pétri, (09 cm de diamètre).Après la solidification du milieu, un volume de 100 µl de suspension bactérienne, proprement diluée, est inoculé à la surface de TSA-3% NaCl. Ensuite, différents films (contenant ou non des substances antimicrobiennes) ayant le même diamètre que les boîtes de pétri, sont placés sur la surface inoculée. La TSA-3%NaCl inoculée, non revêtue par les films, est utilisée comme témoin. Les boîtes de pétri sont conservées à 10° C, pendant 12 jours (figure III.4a et b).Le dénombrement microbien sur les plaques TSA-3%NaCl est examiné immédiatement après l'inoculation et régulièrement durant la période de stockage, l'agar est enlevé aseptiquement des boîtes de pétri et placé dans des récipients en verre stériles. 100 ml d'eau peptonée sont ajoutés à chaque récipient qui est alors homogénéisé pendant 3mn.

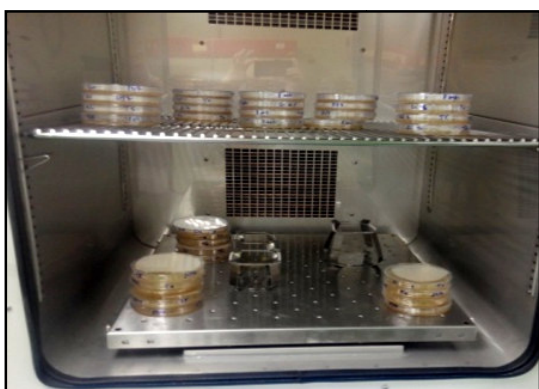
III.2.1.2 Dilution en cascade des échantillons

Une série de dilutions est réalisée par prélèvement d'un millilitre de notre système (échantillon), et transversé dans un tube contenant 9 mL d'eau physiologique. Une dilution au 1/10 est effectuée, c'est à dire que si notre suspension pur contenait 10 000 bactéries/ mL, notre second tube en contiendrait, maintenant 1 000 / mL. L'opération est renouvelée, jusqu'à ce que la concentration en bactérie devienne relativement faible (jusqu'à obtenir une dilution 10^{-8}).

III.2.1.3 Mise en gélose normale

On commence par noter les boîtes de pétri; (la date, la dilution qui va être effectuée...).

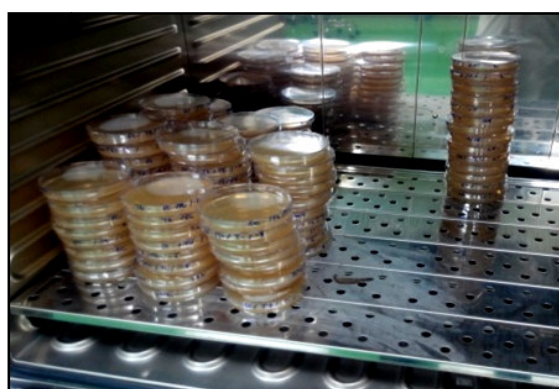
- Ensemencement en masse : 1 ml de dilution est réparti sur le fond de la boîte vide correspondante, tout en ajoutant 15 ml de milieu de culture M.H en surfusion (environ 45°C).
- Ensemencement : l'homogénéisation (les suspensions avec M.H) est réalisée par des mouvements circulaires doux, dans les deux sens, au moins dix fois.
- Incubation : les échantillons sont mis à incuber à 37°C;(figure III.4c), pendant 48h avant le dénombrement des colonies. Tous les tests sont réalisés en deux fois.



a : Incubation à 37°C



b: Incubation à 10°C



c: Conservation 12 jours dans l'incubateur

Fig III.4 : Dénombrement bactérien.

III.2.1.4 Lecture des résultats

Le dénombrement des cellules est la mesure directe de la croissance microbienne par le comptage du nombre de cellules (des bactéries) à l'aide d'un compteur spécial (figure III.5.)

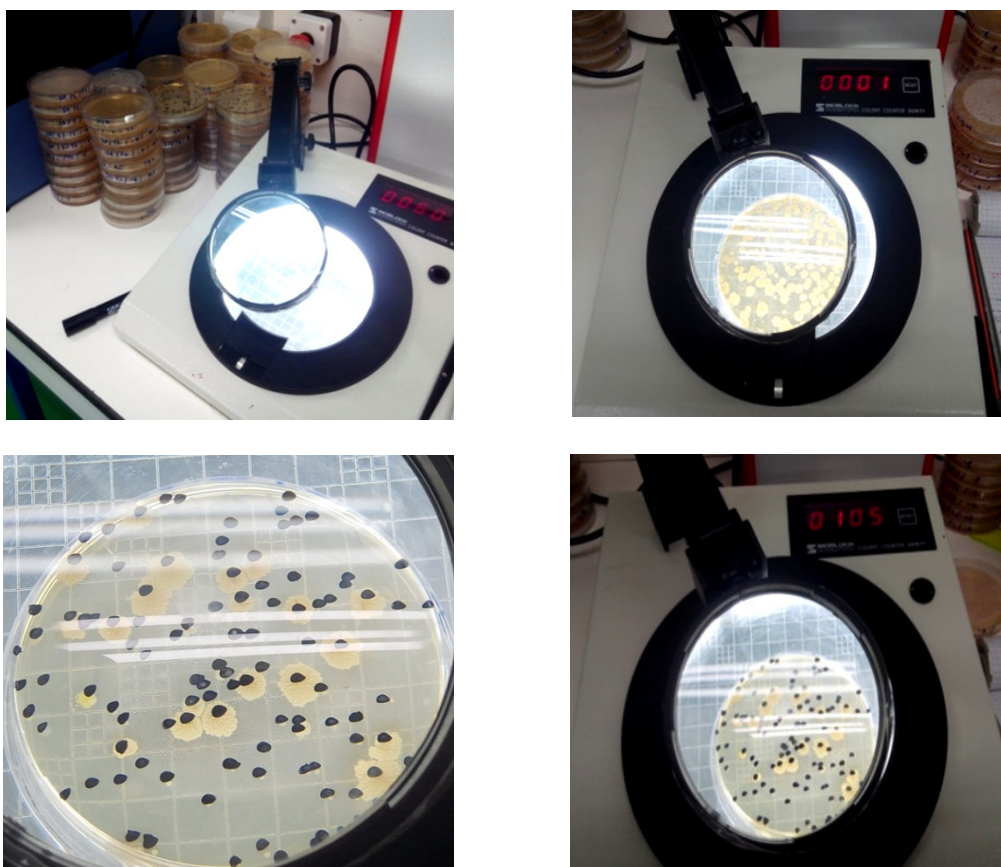


Fig III.5 : Methode de comptage des cellules bacteriennes.

La formule mathématique suivante peut être utilisée :

$$N = n \times 1/V \times 1/d$$

où :

N : est le nombre des Unités Formant Colonies (UFC) par ml de la suspension pure

n : est le nombre de colonies dénombrées dans les boîtes de Pétri

1/V : est l'inverse du volume d'inoculum utilisé (par exemple au cours de l'ensemencement par étalement, on a utilisé 0,1 ml donc $1/V = 1/0,1 = 10$).

1/d : inverse de la dilution (par exemple au cours de l'ensemencement par étalement, on a utilisé la dilution 10^{-5} donc $1/d = 1/10^{-5} = 10^5$).

Taux d'inhibition :

$$\text{Taux \%} = 100 - \left[\frac{X_f - X_0}{X_c - X_{c0}} \times 100 \right]$$

Où :

X_f : le nombre final de cellules

X_c : le nombre final de cellules de contrôle

X₀ : le nombre initial de cellules (à t=0)

X_{c0} : le nombre initial de cellules de contrôle (à t=0)

Remarque :

On considère que les colonies sont dénombrables, si leur nombre est compris entre 30 et 300. Au-dessus de 300, elles sont indénombrables, en dessous de 30, on considère qu'elles sont diluées pour être dénombrées.

Références bibliographiques

- [1] Laurent Delhalle, Georges Daube, Ysabelle Adolphe, Sébastien Crevecoeur, Antoine Clinquart, Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique), *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **16**(3), 369-381, 2012.
- [2] Richard Schwalbe, Lynn Steele-Moore, Avery C. Goodwin., Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols., International Standard Book Number-13: 978-0-8247-4100-6 (Hardcover), 2007, 204.
- [3] Ilyas CHIKHI , " composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plantes aromatiques et médicinales de l'ouest d'Algérie", thèse de doctorat de l'université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen , 2014, p 42.
- [4] Sánchez-González, L., Cháfer, M., Hernández, M., Chiralt, A., González-Martínez, C. ,Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. *Food Control*, 22(8), 1302-1310. 2011.
- [5] Masoud Rezaei , Mehdi Alboofetileh, Hedayat Hosseini , Mehdi Abdollahi ., Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. *Food Control* ,36 (2014) -7. 2013.

Chapitre IV

Interprétation des Résultats

IV.1 Aspect des membranes

Les matériaux élaborés se présentent macroscopiquement sous forme de films lisses et homogènes. Les membranes d'alginate sont fragiles, transparentes, souples et flexibles. Les membranes alg/MMT/LEO sont dures et légèrement opaques, ayant une structure discontinue (formation de 2 phases sur la matrice).



Fig. IV.1 : Membranes d'alginate/3%MMT.



Fig. IV.2 : Membranes Alginate/3%MMT-1.5%LEO.

La qualité de la surface des films a été analysée par le microscope optique et la dispersion de différentes concentrations d'huile essentielle (0.5, 1 et 1.5%) dans la matrice est présentée sur la figure IV.3. Les images illustrées sur la figure IV.3 (a),(b),(c) et (d), présentant une distribution aléatoire de LEO dans le composite alg/MMT, suggèrent la formation de deux phases sans agglomération significative. Cette observation explique la bonne miscibilité de LEO dans la matrice qui pourrait être due à la création de petits micro-domaines uniformes au sein de la matrice.

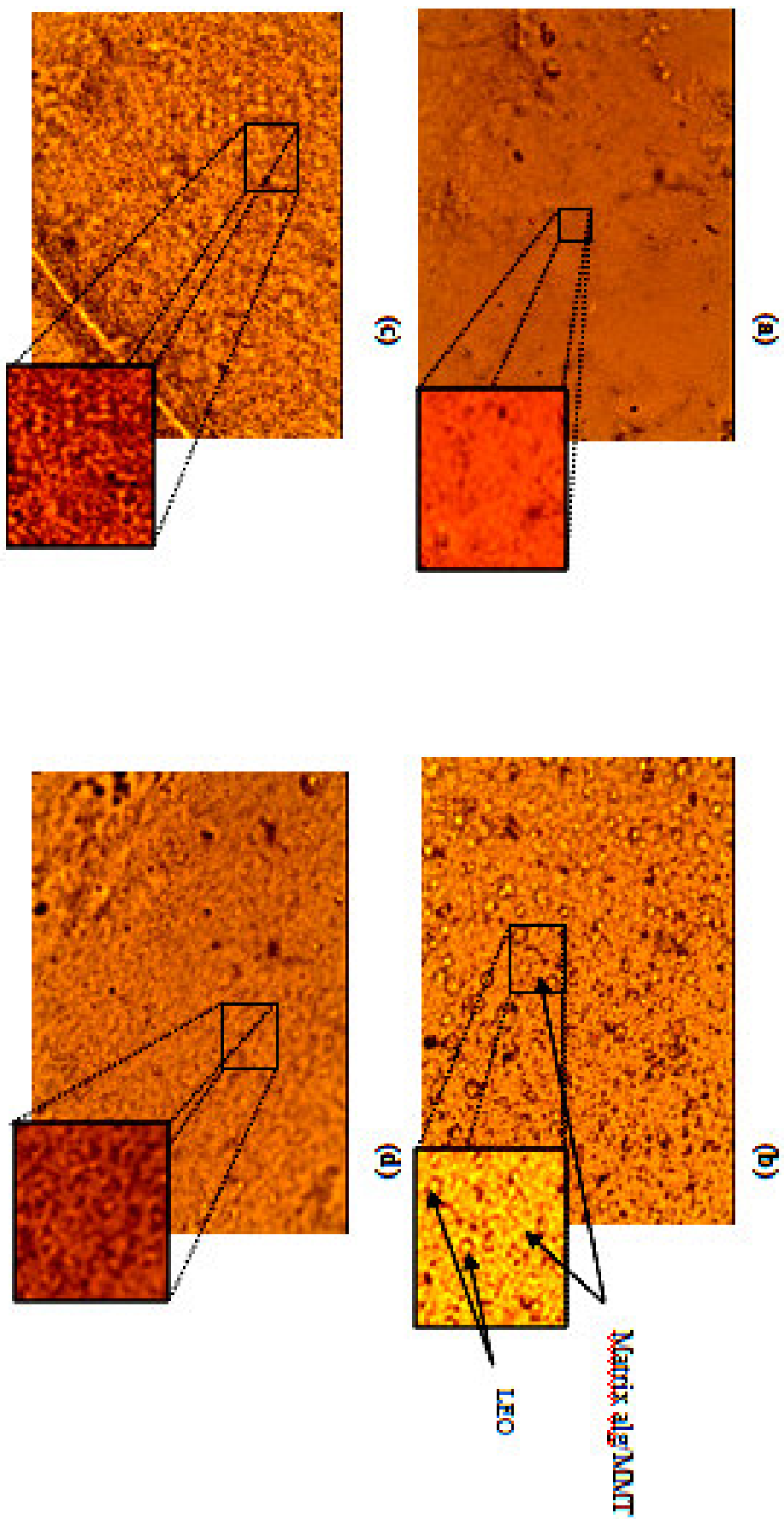


Fig IV.3 : Morphologies de **(a)** alginate/MMT, **(b)** alginate/MMT/LEO 0,5%, **(c)** alginate/MMT/LEO 1 %, et **(d)** alginate/MMT-LEO1,5%.

IV.2 Diffraction des rayons X

Afin de vérifier l'incorporation de l'huile essentielle dans la matrice alg/MMT et pour déterminer la distance interfoliaire, nous avons procédé à la caractérisation des échantillons par la technique de diffraction des rayons X.

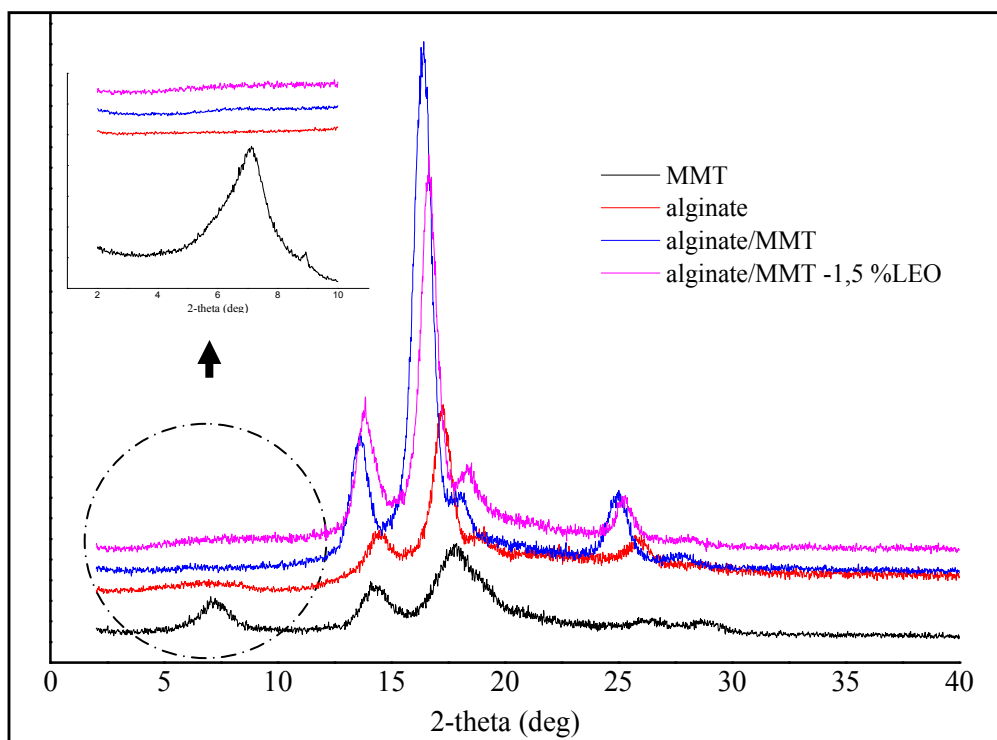


Fig. IV.4 : Diffraction des rayons X de MMT et de films nano composites à base d'alginate de sodium.

La figure IV.4 montre la superposition des spectres DRX de MMT, d'alginate de sodium pur, de films nano composites alg / MMT et alg / MMT-1,5% LEO.

MMT présente un pic à 2θ d'environ 7.34° correspondant à une distance interfoliaire de $12,03\text{\AA}$ dans le plan [001]. Il est bien établi que l'intercalation des chaînes de polymère dans la sous-structure d'argile augmente généralement l'espace inter couche conduisant à un décalage du pic de diffraction vers les petits angles. Une structure exfoliée est caractérisée par des feuillets individuels bien séparés et correctement dispersés et des liaisons polymère-feuillet fortes. De ce fait, il n'y a plus de pic de diffraction visible sur le diffractogramme. Lors de l'ajout de MMT à la matrice polymère, le pic de réflexion a disparu (voir le grossissement sur la figure IV.4), en raison d'une formation de structure désordonnée, de manière homogène. De plus, la figure montre que la structure du nanocomposite n'est pas affectée par la présence de LEO. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Abdollahi et al. [1] et par Alboofetileh et al. [2].

IV.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Les figures IV.5(a), IV.6(b), IV.7(c), IV.8(d) et IV.9(e) illustrant les résultats de l'analyse qualitative par FTIR de la montmorillonite commerciale, des membranes d'alginate de sodium et les membranes d'alg/MMT, montrent que la montmorillonite présente des bandes intenses à 3625 et 1629 cm^{-1} qui correspondent aux bandes d'élongation des groupements OH (Si-OH) de la couche octaédrique caractérisant la MMT [3] et aux molécules d'eau H_2O respectivement. Les bandes d'élongation situées à 993 et 1116 sont attribuées aux liaisons Si-O [4-5] et aux liaisons Si-O-Si (Figure IV5.a).

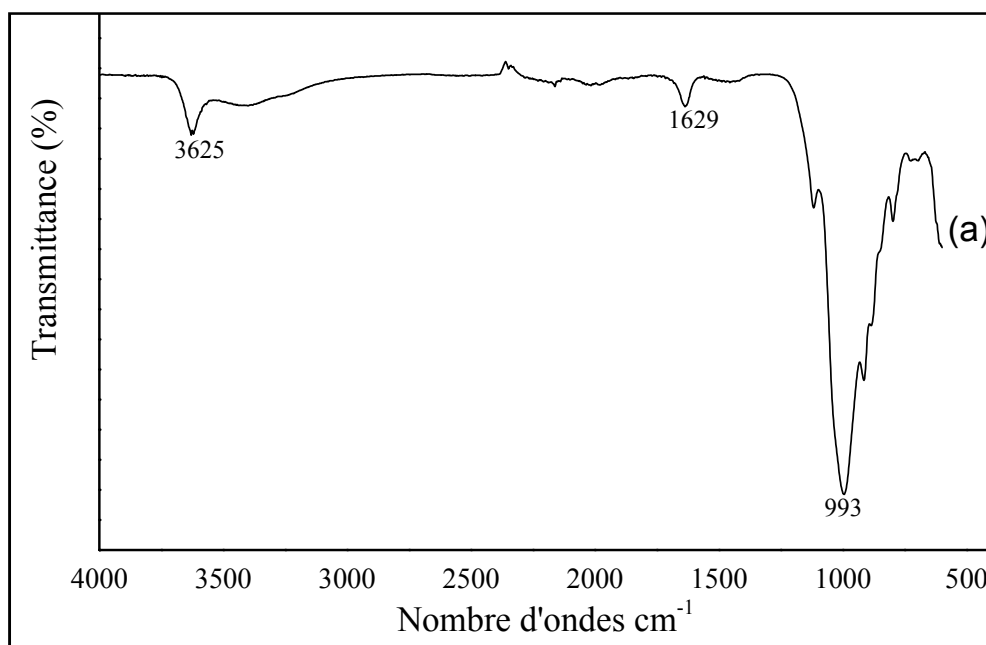


Fig IV.5 : Spectre IR de la montmorillonite commerciale.

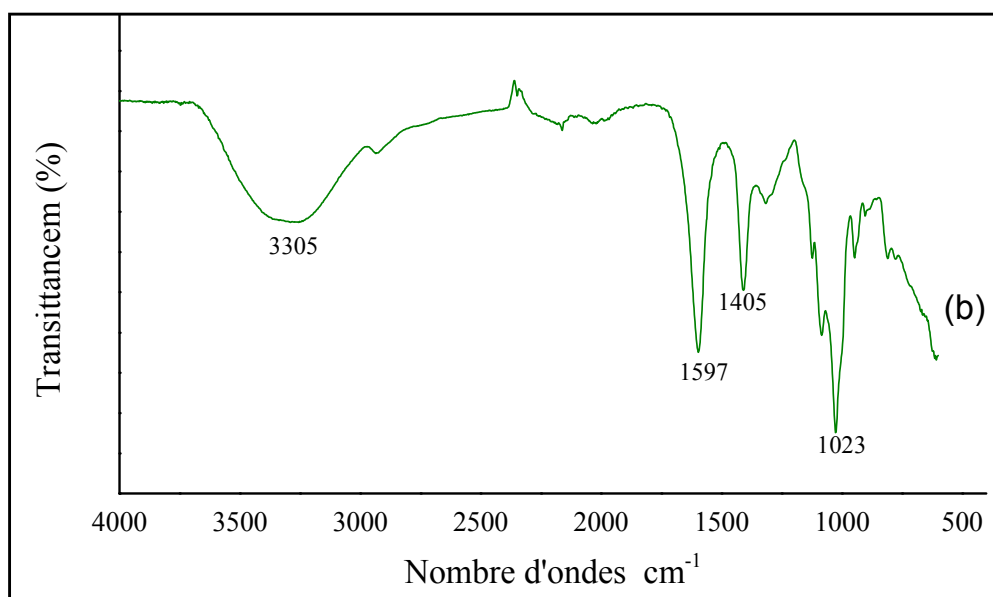


Fig IV.6: Spectre IR d'une membrane d'alginate de sodium.

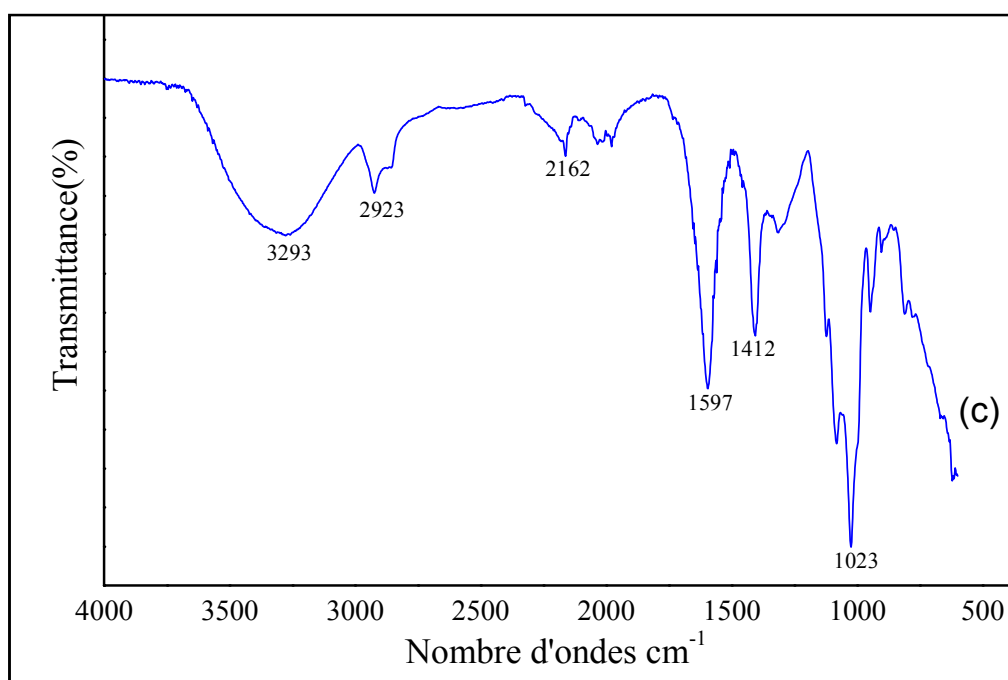


Fig. IV.7 : Spectre IR d'une membrane alg/MMT.

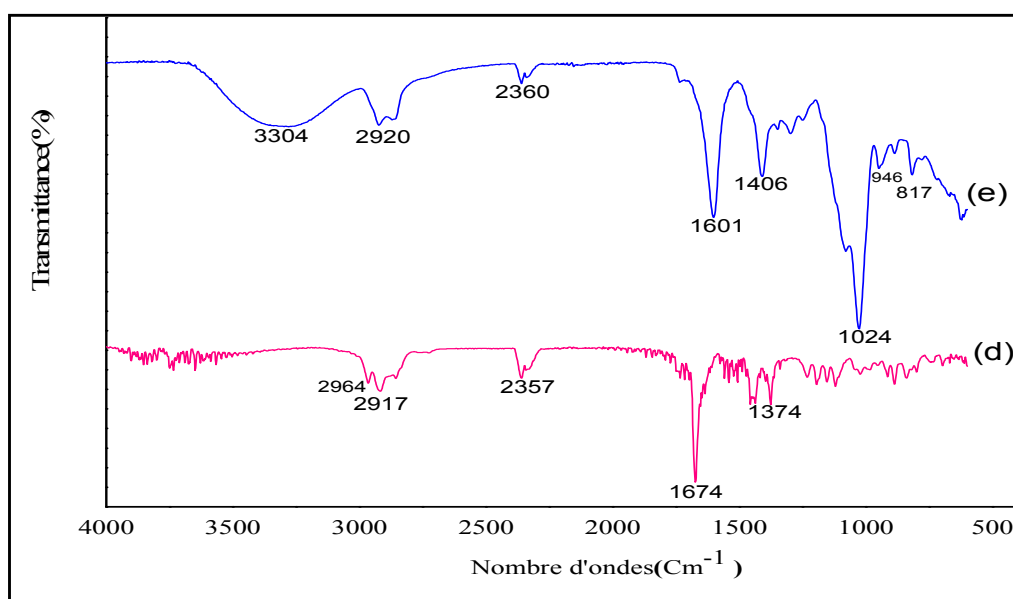


Fig IV.8: Spectre IR de l'huile essentielle de citron (d), membrane alg/MMT-1.5% LEO (e)

L'analyse de FTIR met en évidence pour l'alginate de sodium (Figure IV.6), deux bandes caractéristiques à 1597 et 1405 cm⁻¹ dues à la vibration asymétrique et symétrique respectivement du groupement carboxyle. Les autres bandes d'élongation correspondent à la vibration de l'éther cyclique à 1023cm⁻¹ et à la vibration des groupes OH à 3305 cm⁻¹ [6]. En comparant les spectres IR des membranes d'alginate, MMT et du nanocomposite alg/MMT (figure IV5.a, IV6.b et IV7.c), nous constatons qu'il y a eu interaction entre les groupes de l'alginate et ceux de la MMT. Par exemple, la disparition de la bande à 3625 cm⁻¹ du groupement silanol caractérisant la montmorillonite peut être expliquée par la liaison hydrogène qui s'est formée entre les groupes OH et groupes -COO⁻ de l'alginate [7]. Le déplacement de la bande d'élongation du groupe de COO⁻ de l'alginate de 1406 à 1412 cm⁻¹ dans le nanocomposite indique probablement des interactions entre les groupes -OH de la MMT et les groupes carboxyles à la surface de l'alginate. Ainsi, le spectre FTIR de l'alg / MMT confirme l'interaction entre l'alginate et la montmorillonite.

En outre, l'analyse de figure IV8.e montre que les bandes principales présentées dans le spectre de l'alg/MMT sont également importantes dans les nano-composites chargés par l'huile essentielle. Une forte interaction entre l'alginate et la MMT dans les nanocomposites est observée, même après l'addition de l'huile essentielle. Cependant, de nouveaux groupes sont formés en raison de la présence d'huile essentielle. Le déplacement des pics dans le

nanocomposite indique une interaction très probable entre de l'huile et l'alg/MMT. Les principaux pics à 3319, 2926 et 1601 cm^{-1} dans le nanocomposite chargé d'huile essentielle de citron sont attribués aux groupes fonctionnels C-H, O-H et C = O, respectivement.

IV.4 Comportement thermique

IV.4.1 Stabilité thermique

Une analyse thermogravimétrique (ATG) a été effectuée pour étudier la stabilité thermique de la matrice d'alginate pur, le nanocomposite et l'alg/MMT-1.5%LEO. Elle consiste à étudier la perte de masse en fonction de la température. Les courbes présentées sur la figure IV9.a et la figure IV9.b illustrent la dérivée de cette perte de masse (DTA). Nous pouvons constater ce qui suit :

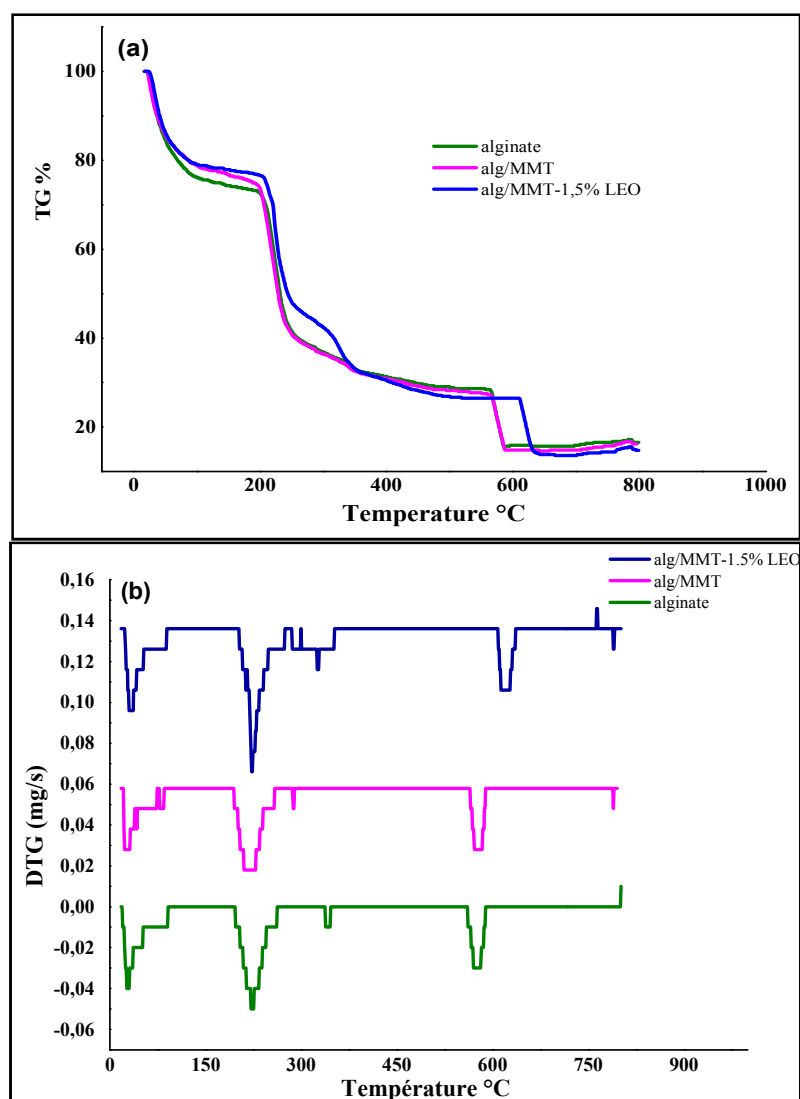


Fig IV.9 : Thermogramme superposé des nanocomposites ATG(a) et dérivés DTA(b).

La perte de masse est similaire pour tous les échantillons. La dégradation se fait en quatre étapes. Pour la membrane d'alginate pur; la première étape se situe entre 20 et 150°C et correspond à la déshydratation de la membrane; la 2^{ème} perte de masse dans l'intervalle 150-300°C, on observe un effet exothermique sur la courbe DTA à 221°C correspondant à la dégradation de l'alginate; la 3^{ème} perte de masse est enregistrée dans la plage de température 475-700 °C. A haute température entre 700-800°C (avec un maximum du 788°C) il y a combustion du carbone au cours de la décomposition de l'alginate. Une forte perte de masse de 40.35% d'alg/MMT dans l'intervalle de 150 à 300°C (tableau IV.1) et un effet exothermique sur la courbe DTA à 227°C sont observés. La perte de masse de la membrane alg/MMT-1.5% LEO se fait en quatre étapes : la 1^{ère} de 20à 150, en raison de l'évaporation de l'eau et des produits volatils (huile essentielle). Dans l'intervalle 150-300°C, l'effet exothermique sur la courbe DTA est à la température de 220°C. La perte de masse est de 35.65% et correspond à la décomposition d'alginate insérée dans l'espace interfoliaire de la MMT; la troisième perte de masse dans la région de température de 530 à 700°C est attribuée à l'élimination de l'eau de structure [6] et celle de la MMT de 13.01% est due à la libération du groupe OH; la 4^{ème} perte de masse dans l'intervalle de 700 à 800°C peut être liée à la combustion du carbone (craquage thermique) qui résulte de la décomposition de l'alginate et de l'huile essentielle. Un comportement thermique similaire a été rapporté dans la littérature dans laquelle de l'huile essentielle a été ajoutée au composite acétate de cellulose / MMT [8].

Tableau IV.1 : Données détaillées correspondant à la perte de masse (Δm) en fonction de la température de dégradation des membranes de nanocomposites.

Membranes	Température °C					Δm (%) 20-800
	20-150	150-300	300-630	630-700	700-800	
Alginate	25.75	37.34	7.91	13.12	0.6	85
Alg-MMT	22.91	40.35	8.37	13.52	1.45	84.7
AlgMM1.5%LEO	22.23	35.65	15.32	13.01	1.05	84.6

Nous avons dressé à partir des courbes ATG un tableau illustrant le processus de dégradation en indiquant pour les échantillons, trois températures à savoir :

T_{di} :	Température de début de dégradation
T_{d max} :	Température de dégradation maximale
Résidu (%) à 800°C :	fraction non dégradabile à 800°C

Tableau IV.2 : Comportement thermique des membranes.

Membranes	Analyse ATG			Analyse DSC	
	T _{di}	T _{d max}	Résidu (%) à 800°C	T _g	T _f
Alginate	147	270	15%	115	131
Alg-MMT	157	307	15.3%	121.64	136
AlgMMT1.5%LEO	159	308	15.38%	115.05	131.18

D'après les données ATG des membranes sur le tableau IV.2, nous pouvons dire que l'incorporation d'un taux de 3% MMT dans la matrice d'alginate –une structure exfoliée démontrée par la DRX –améliore la stabilité thermique des membranes élaborées [9]. La structure exfoliée de nanocomposites peut facilement conduire à la formation de charbon qui limite la diffusion des produits de la thermo-oxydation lors de la décomposition[10] et peut ainsi protéger les chaînes d'alginate contre les chocs thermiques. Cette protection aboutit finalement à déplacer la dégradation vers des températures plus élevées et réduire la perte de masse.

IV.4.2 Transition thermique

Les propriétés thermiques par analyse calorimétrique différentielle (DSC) des membranes nanocomposites obtenues à partir des premières rampes de chauffage sont présentées dans la figure IV.10. La différence de T_g entre l'alginate pure et le nanocomposite alg/MMT est de 7°C. La présence de structure désordonnée dans la matrice alg/MMT mène à une augmentation de la température vitreuse de 115 à 121.64°C (tableau IV.2). La diminution de la T_g de la membrane alg/MMT-1.5%LEO peut être attribuée à la réticulation des chaînes alginate dans la matrice résultante par la formation de certains ponts d'hydrogènes confirmés par FTIR. Des travaux similaires ont été réalisés par Alboofetileh [11] et MRezaei [12] montrent que la température de fusion (T_f) des nanocomposites renforcés par la MMT était supérieure à celle des films d'alginate pure. De plus, la liaison hydrogène entre les groupes d'alginate et la MMT peut également conduire à une amélioration des propriétés thermiques

des membranes alg/MMT. L'amélioration de la stabilité thermique par liaison hydrogène a été rapportée par Valiokas et al [13].

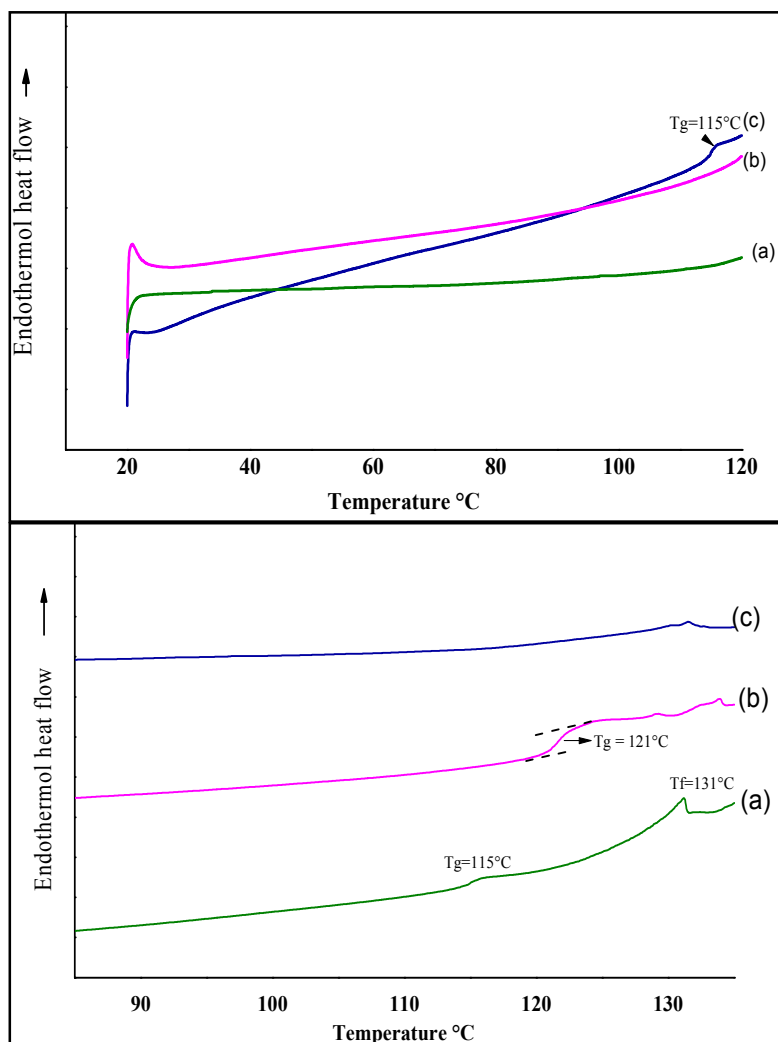


Fig IV.10: Thermogramme DSC des membranes élaborées : alginate pure (a), alg/MMT(b), alg/MMT-1.5%LEO(c).

IV.5 Épaisseur de film et valeurs d'opacité des films nanocomposites Alg / MMT

Les matériaux obtenus sont des films épais, de faible masse inférieure à 0.2022g et deviennent opaque lors de l'ajout de l'huile essentielle. Il est nécessaire d'avoir un matériau homogène en épaisseur et en composition sur la surface. La variation d'épaisseur du film influe sur les propriétés physiques et barrière. Les épaisseurs moyennes des membranes sont énumérées dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3 : Valeurs d'épaisseur et d'opacité des films nanocomposites Alg / MMT.

Film	Masse(g)	Epaisseur des films (mm)	Opacité
Alginate	0.1711±0.006	0.0225±0.006	2.04±0.003
Alg/MMT	0.1858±0.024	0.0260±0.018	2.33±0.044
Alg/MMT-LEO0.5%	0.1911±0.009	0.0250±0.002	9.808±0.00
Alg/MMT-LEO1%	0.1938±0.037	0.032±0.006	11.35±0.227
Alg/MMT-LEO1.5%	0.2022±0.077	0.0330±0.026	10.31±0.40

L'épaisseur moyenne est inférieure à 100 micromètres, délivrant un film flexible. Avec l'ajout d'une quantité de LEO, les films sont devenus plus épais. Nous pensons que les constituants de LEO, de faible masse moléculaire, s'intègrent dans les chaînes de polymère d'alginate, ce qui est probablement un facteur majeur conduisant à une épaisseur croissante du film [14].

L'opacité est une mesure optique qui établit la transparence du film et constitue donc une propriété pertinente, car elle a un impact direct sur l'apparence du produit emballé. La présence d'huile essentielle dans les films nanocomposites modifie leurs aspects optiques et leurs propriétés de barrière lumineuse. L'opacité des films nanocomposites est indiquée dans le tableau IV.3. La valeur d'opacité du film d'alginate pris comme référence est de $2,04 \pm 0,003$, tandis que, lors de l'ajout de LEO à des concentrations croissantes, l'opacité augmente jusqu'à $11,35 \pm 0,227$. Par conséquent, les films sans LEO sont plus transparents que leurs homologues contenant de LEO.

La transmission de la lumière UV-visible des films nanocomposites contenant diverses concentrations de LEO dans l'intervalle de longueur d'onde 200-800 nm est illustrée à la figure IV.11

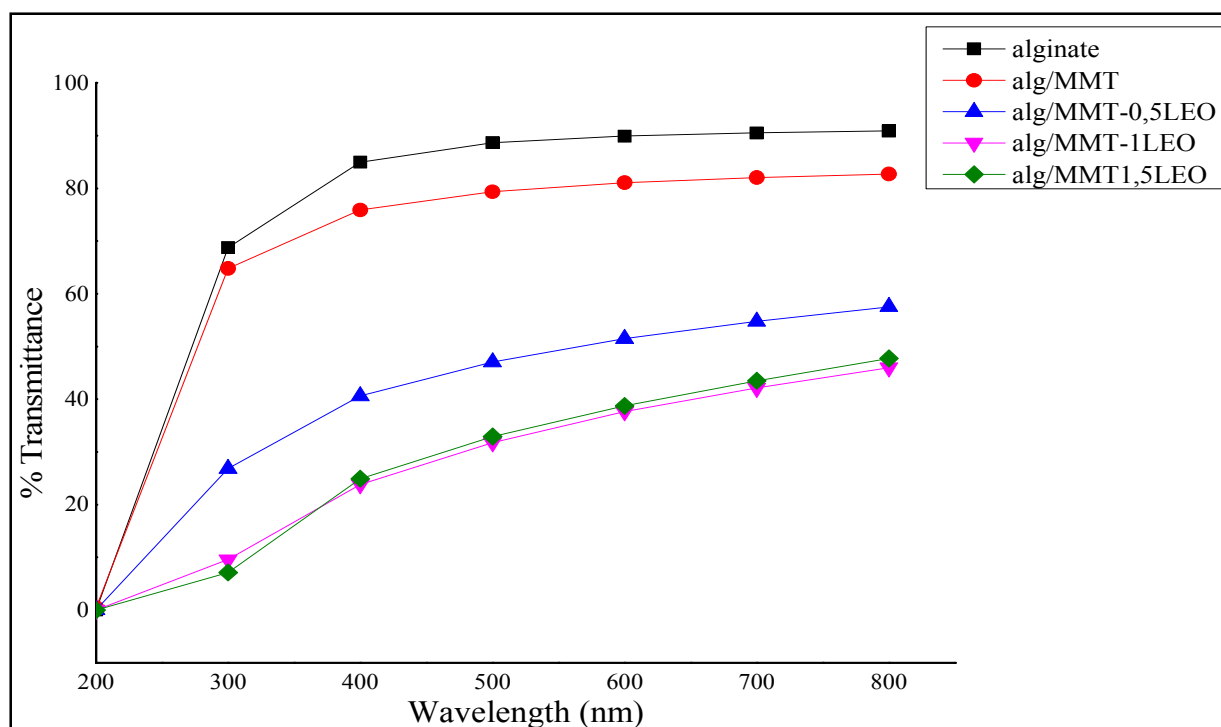


Fig IV.11 : Relation transmittance / longueur d'onde pour les films d'alginate et de nanocomposite.

De toute évidence, les films contenant de LOE sont capables d'arrêter le rayonnement ultraviolet dans la région de 200- 280 nm. Une diminution de la transmission lumineuse est probablement due à la diffusion de la lumière à la surface des gouttelettes d'huile essentielle dans la matrice du film [15]. Par conséquent, ces résultats suggèrent que les films alg /MMT-LOE peuvent retarder l'oxydation des lipides présents dans les aliments [16] par la lumière et prévenir les pertes de nutriments. Nos résultats sont cohérents avec des résultats similaires qui ont été rapportés dans la littérature. [17-18].

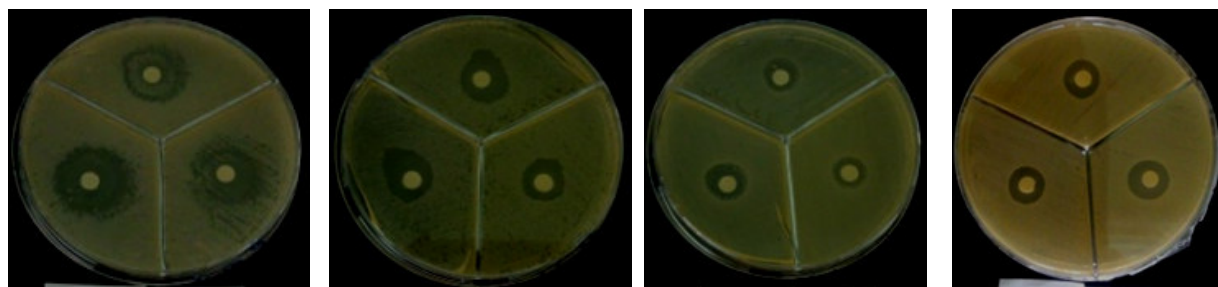
IV.6 Test d'antibiogramme et efficacité antimicrobienne des films.

IV.6.1 Activité antibactérienne.

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des dispersions de différentes concentrations d'huile essentielle dans la matrice alg/MMT vis-à-vis de 4 bactéries. Les zones d'inhibition sont indiquées dans le tableau IV.4. D'après la classification de Barros et coll.[19], les zones d'inhibition variant entre 9 et 20mm indiquent que toutes les souches sont sensibles à l'huile essentielle de citron.

Les résultats antimicrobiens des films nanocomposites alg/MMT-LEO exercent une bonne activité en agissant sur les bactéries Gram positive et Gram négative, avec un degré de sensibilité différent d'une souche à l'autre, en raison de leur membrane externe de protection supplémentaire [20]. Aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observé pour les films alg/MMT sans LEO qui ont servi de témoin.

En effet, les films alg/MMT-1.5%LEO figure IV.12 montrent des halos d'inhibition intermédiaires variant de 11.6 à 20.3mm contre *E. Coli* et *S. Aureus* respectivement. Ces premiers résultats qualitatifs démontrent bien l'effet antimicrobien des films nano composites dû à la présence de dérivés terpéniques dans l'huile essentielle [21].



-a-

-b-

-c-

-d-

Fig. IV.12 :Activité antibactérienne des films en solution alg-3%MMT : (a) *Staphylococcus aureus* ; (b) *Bacillus cereus*; (c) *Escherichia coli* ; (d) *Salmonella enteritidis* de concentration de 1.5% LEO.

Tableau IV.4: Activité antibactérienne (zone d'inhibition) de solution de film alg/MMT incorporé par LEO contre les Gram-positive et négative.

Souche bactérienne	LEO (v/v) % dans une solution de film	Zone d'inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram+)	control	R
	0.5	10.66±0.57
	1	18.66±0.57
	1.5	20.33±1.52
<i>Bacillus cereus</i> (Gram+)	control	R
	0.5	11.66±1.15
	1	14.33± 057
	1.5	17±1
<i>Escherichia coli</i> (Gram-)	control	R
	0.5	10.5±0.5
	1	10.66±0.57
	1.5	11.6± 0.57
<i>Salmonella enteritidis</i> (Gram-)	control	R
	0.5	9.33±0.57
	1	11± 1
	1.5	10.66±1.52

L'aspect quantitatif a été évalué, selon la méthode de dénombrement des bactéries. Celle-ci détermine l'efficacité antimicrobienne des films par l'application du phénomène de stockage jusqu'à 14 jours conservé à 10°C. En se basant sur les résultats obtenus, nous avons pu suivre la cinétique de développement de *E. coli* et *S.aureus*, en présence de trois concentrations de LEO (figure IV.13).

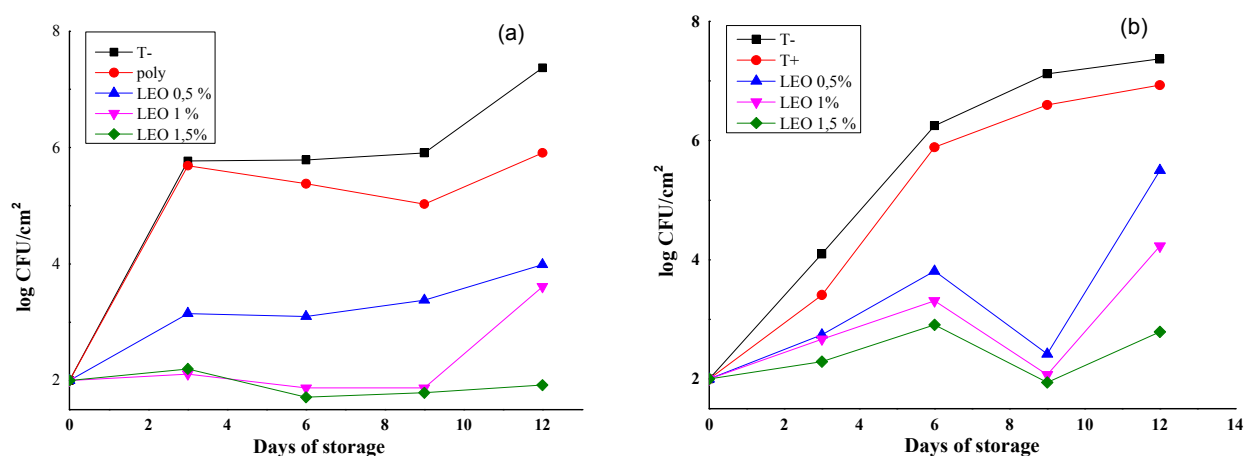


Fig. IV.13 : Activité antibactérienne de différents films contre (a) *S. Aureus* et (b) *E. Coli* en milieu TSA-NaCl (3%) et stocké à 10 ° C.

La figure IV13. montre des courbes de croissance de *S. Aureus* dans TSA-3%NaCl chargé des films nanocomposites à base d'alginate. À des fins de comparaison, une plaque de TSA-3% NaCl contenant uniquement *S. Aureus* est prise comme témoin (T⁻) pendant la même période de stockage. La population initiale de *S. Aureus* dans la plaque de référence était de 2 log CFU / cm². Le comptage microbien a considérablement augmenté pendant le stockage pour atteindre 7,48 log CFU / cm². Nos résultats sont en bon accord avec les données récemment publiées dans la littérature [22]. De plus, une faible activité antimicrobienne est observée dans les boîtes recouvertes d'un film d'alginate / MMT pendant la période de stockage. La plus faible population de *S. Aureus* est trouvée pour les films à une concentration de 1,5% de LEO en maintenant la population en dessous du niveau d'inoculation initial qui est de 1,92 log CFU / cm². À une concentration en LEO inférieure (1%), la matrice du film a montré une activité antimicrobienne moindre, car une inhibition totale de la croissance des micro-organismes est notée au cours des 6 premiers jours de la période de stockage. Après 12 jours, des films contenant 1% de LEO ont réduit la croissance à 3,61 log CFU / cm², par rapport au test témoin. Comme prévu à des teneurs en LEO plus faibles 0,5%, les films se sont révélés moins efficaces en termes d'activité antimicrobienne.

La figure IV13.b montre la croissance d'*E.Coli* dans le milieu de TSA-3% NaCl témoin(T⁻) et dans des boîtes comprenant des films contenant du LEO à différentes concentrations. Le nombre microbien a augmenté dans la boîte de référence de 2 log CFU / cm² à 7,3 log CFU / cm² à la fin de l'expérience (12 jours). À une concentration de LEO de 1,5% une inhibition totale a été observée au cours des 6 premiers jours de l'expérience avec une population comptée de 2,29 UFC / cm². À 1% de teneur en LEO une inhibition complète de la croissance microbienne est observée pendant le 6^{ème} jour de stockage et réduite à 2,67 UFC / cm². Cependant, une faible action antimicrobienne est observée pour les films contenant 0,5% de LEO.

Les nanocomposites alg/MMT-LEO possèdent plus qu'un effet bactériostatique, ils ont des propriétés bactéricides, car le nombre de bactéries a diminué par rapport à l'inoculum de base.

La figure IV.14 illustre la tendance de l'effet d'inhibition des films nanocomposites en fonction de la variation de concentration de LEO (0,5%, 1% et 1,5%). L'échantillon de LEO

le plus concentré (1,5%) présente un taux d'inhibition maximal de 93,8% pour *E. Coli* et 98,2% pour *S. Aureus*, après 12 jours de stockage.

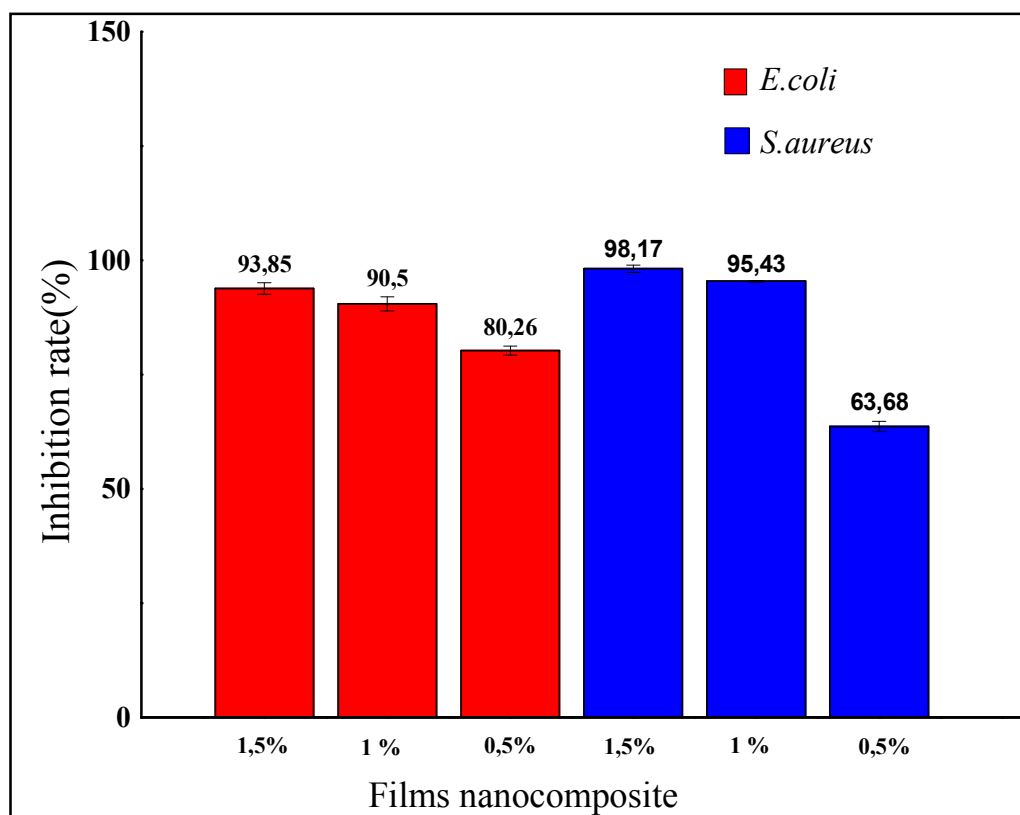


Fig. IV.14 : Test d'inhibition après 12 jours .

IV.6 .2 Activité antifongique

Les tests antifongiques ont été réalisées avec *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. *Candida albicans* est un pathogène fongique opportuniste qui existe comme commensal inoffensif dans les voies gastro-intestinales et génito-urinaires de 70% des humains et environ 75% des femmes souffrent d'une infection à *Candida* au moins une fois dans leur vie [23-24]. Cependant, il devient un pathogène opportuniste pour les patients immunodéprimés ainsi que pour certains individus immunologiquement faibles, ou même pour les personnes en bonne santé [25].

Le champignon *Aspergillus brasiliensis*, l'espèce la plus importante du genre *Aspergillus*, est un type de moisissure presque omniprésente dans notre environnement. Bien qu'*Aspergillus brasiliensis* soit également une souche de fermentation importante sur le plan industriel, elle provoque constamment la détérioration des aliments, la moisissure des produits

industriels et agricoles et la pollution par les mycotoxines. En particulier, *Aspergillus brasiliensis* pourrait induire des infections pulmonaires chez les personnes immunodéprimées [26].

Le tableau IV.5 résume les résultats des études in vitro menées avec *C.albicans* et *A.brasiliensis*. L'alg-MMT / LEO a eu un effet antifongique sur les deux champignons ; cependant, l'effet antifongique est plus puissant sur *Aspergillus barasiliensis* que sur *C.albicans* (figure IV.15). La sensibilité des champignons a montré que le film alg-MMT / LEO produit une zone d'inhibition de 30 mm de diamètre contre *Aspergillus brasiliensis* présentant ainsi une activité antifongique élevée.

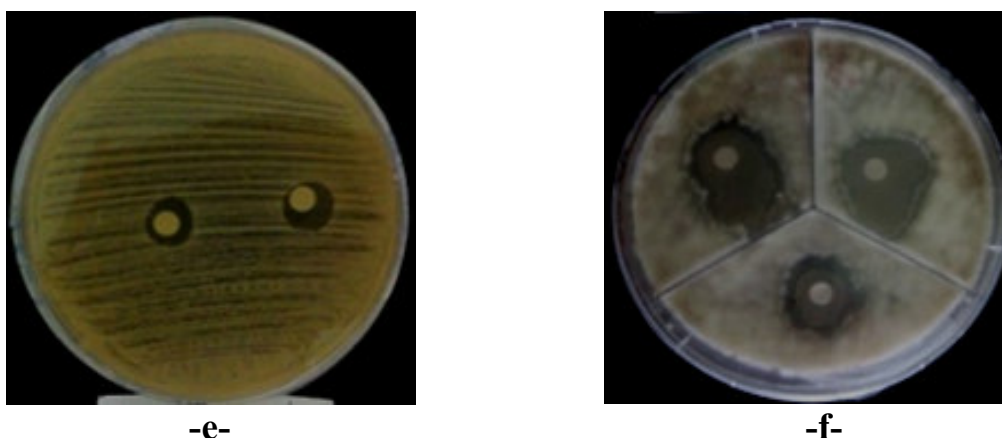


Fig IV.15:Activité antifongique des films en solution alg-3%MMT ; (e)*Candida albicans*; (f) *Aspergillus brasiliensis*deconcentration de 1.5% LEO.

Tableau IV.5:Activité antifongique (zone d'inhibition) de solution de film alg/MMT incorporé par LEO contre *Candida albicans*et*Aspergillus braziliensis*.

Souche fongique	LEO (v/v%) dansSolution de films	Zone d'inhibition
<i>Candida albicans</i>	Control	R
	0.5%	9.33±0.57
	1%	10±1
	1.5%	10.66±0.57
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Control	R
	0.5%	23± 1.52
	1%	23.33±.1.52
	1.5%	30±1

Références bibliographiques

- [1] Abdollahi M, Rezaei M, Farzi G. A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *J Food Eng.*111:343–350, 2012.
- [2] Alboofetileh M, Rezaei M, Hosseini H, et al. Efficacy of activated alginate-based nanocomposite films to control *Listeria monocytogenes* and spoilage flora in rainbow trout slice. *J Food Sci Technol.* 53:521–530, 2016.
- [3] Mme MOULAHSEN Née Fatiha ABDELLI, "élaboration et caractérisation de nanocomposite cellulose /Montmorillonite", thèse de magister de l'université M'hamed Bougera-Boumerdes, 2008, p254.
- [4] Zhou CH, Zhang D, Tong DS, et al. Paper-like composites of cellulose acetate-organo-montmorillonite for removal of hazardous anionic dye in water. *Chem Eng J.*209:223, 2012.
- [5] Kumar SK, Ramachandran R, Kalidhasan S, et al. Potential application of dodecylamine modified sodium montmorillonite as an effective adsorbent for hexavalent chromium. *Chem Eng J.*211/212:396, 2012.
- [6] Iliescu RI, Andronescu E, Ghitulica CD, et al. Montmorillonite–alginate nanocomposite as a drug delivery system - incorporation and in vitro release of irinotecan. *Int J Pharm*, 463:184, 2014.
- [7] Giovanni S, Franca B, Andrea P, et al. Electrophilic alkenylation of aromatics with phenylacetylene over zeolite HSZ-360. *Tetrahedron Lett*,36:9177-9180, 1995.
- [8] Polaa CC, Medeirosa EAA, Pereirab OLL, et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Pack Shelf Life.*9:69–78, 2016.
- [9] Joong Kon Park, Mazhar UI-Islam, Taous Khan," Nanoreinforced bacterial cellulose-montmorillonite composites for biomedical applications ", *Carbohydr.Polym.*, 1189-1197,2012.
- [10] Heriarivelo RISITE," Nanocomposites polymères/montmorillonites: Rôle des interactions générées par la modification des argiles/ polymères sur la morphologie et les

propriétés structurales, thermiques, rhéologiques et mécaniques", thèse de doctorat à l'université Mohammed V-RABAT, 2015, p83.

[11] Mehdi Alboofetileh, Masoud Rezaei, Hedayat Hosseini, Mehdi Abdollahi, "Morphological, physico-mechanical, and antimicrobial properties of sodium alginate-montmorillonite nanocomposite films incorporated with marjoram essential oil", *J Food Process Preserv*, 3596, 2018.

[12] Masoud Rezaei, Mehdi Abdollahi, Mehdi Alboofetileh, Masoud Rezaei, Rabi Behrooz, "Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers", *J. Food Hydrocoll* 32, 41-424, 2012.

[13] Valiokas, R., Ostblom, M., Svedhem, S., Svensson, S. C. T., & Liedberg, B., "Thermal stability of self-assembled monolayers: Influence of lateral hydrogen bonding. *J. Phys. Chem. B*, 106, 10401–10409, 2002.

[14] Krkić N, Lazić V, Gvozdrenović J. Chitosan biofilm properties as affected by the addition of oregano essential oil. *J process energy griculturea.*, 15 (3):165–168, 2013.

[15] Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. *Food Chem.*; 134:1571–1579, 2012.

[16] Carolina Montanheiro Noronha, Sabrina Matos de Carvalho, Renata Calegari Lino, Pedro Luiz Manique Barreto, "Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with a-tocopherol nanocapsules", *Food Chem.*; 159 ; 529–535, 2014.

[17] Ahmad M, Benjakul S, Prodpran T, et al. Physicomechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *J. Food Hydrocoll.*; 28:189–199, 2012.

[18] Atef M, Rezaei M, Behrooz R. Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. *J. Food Hydrocoll*; 45: 150-157, 2015.

[19] Barros L., Calhella R.C., Vaz J.A., Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Estevinho L.M., Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild *edible mushrooms*

methanolic extracts. *European Food Research and Technology*, Vol. 225, Issue: 2, 2007, pp. 151–156.

[20] Cozmuta AM, Turilaa A, Apjoka R, et al. Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. *J.Food Hydrocoll* , 49:144–155,2015.

[21] Cakir A, Kordali S, Zengin H, et al. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from hypericum hyssopifolium and hypericum heterophyllum. *J.Flav Frag.*; 19:62, 2004.

[22] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol.*;94(3):223–253,2004.

[23] Ruhnke M, Maschmeyer G. Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer review of the literature. *Eur J Med Res.*, (5):227–235,2002.

[24] Meiller TF, Hube B, Schild L, et al. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS One*.4(4):e5039,2009.

[25] Schulze J, Sonnenborn U. Yeast in the gut: from commensals to infectious agents. *Deutsches Arzteblatt.*,106(51-52):837-842,2009.

[26] Tolouee M, Alinezhad S, Saberi R, et al. Effect of *matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *Int J Food Microbiol.*,139:127–133,2010.

Conclusion Générale

Ces travaux de recherche ont permis de contribuer au développement et à la compréhension des propriétés physico-chimiques, thermiques et biologiques des nanocomposites à base de montmorillonite et d'alginate, ces matériaux ont été élaborés par une méthode d'intercalation en solution. L'ajout d'additif naturel d'huile essentielle de citron nous a permis de développer de nouveaux matériaux nanocomposites permettant de lutter contre la formation de biofilms bactériens dans le milieu médical et agro-alimentaire.

Les matériaux élaborés se présentent macroscopiquement sous forme de films lisses et homogènes. Les membranes d'alginate sont fragiles, transparentes, souples et flexibles. Les membranes alg/MMT/LEO sont dures et légèrement opaques, avec une structure discontinue. L'analyse par microscopie optique montre une distribution aléatoire de LEO dans le composite alg/MMT, et suggère la formation de deux phases sans agglomération significative. Cette observation explique la bonne miscibilité de LEO dans la matrice qui pourrait être due à la création de petits micro-domaines uniformes au sein de la matrice.

L'analyse structurale caractérisée par DRX et FTIR montre une interaction entre l'alginate et la montmorillonite conduisant à une dispersion homogène de l'argile dans la matrice et à la formation d'une structure exfoliée. Les propriétés thermiques présentent une forte amélioration par rapport à la membrane d'alginate seule. Des résultats intéressants ont, ainsi, pu être montrés à partir des comportements thermiques. Une amélioration de la stabilité thermique a été obtenue à haute température et qui peut être attribuée à la formation d'une couche carbonique protectrice favorisée par l'exfoliation des feuillets de la MMT dans la matrice. Ce qui a pour effet de retarder la dégradation de la matrice. La transparence a été mesurée par spectrophotométrie UV-visible afin de déterminer les propriétés barrière des films alg/MMT/LEO contre les lumières UV. L'effet d'huile essentielle sur la transparence des films peut être lié à la coloration de l'huile essentielle. Les résultats suggèrent que les films alg/MMT/LOE peuvent retarder l'oxydation par la lumière des lipides présents dans les aliments.

Un autre objectif essentiel de ce travail était l'étude de l'activité antimicrobienne des films nanocomposites contenant différentes concentrations d'huile essentielle de citron. Des tests antibactériens qualitatifs nous ont permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique de quatre formulations vis-à-vis de quatre bactéries, une levure et un champignon. Ce pouvoir d'inhibition est lié à la présence de la concentration élevée d'huile

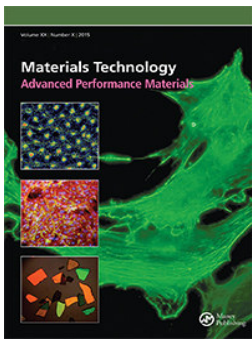
essentielle et non aux agents stabilisants des nanocomposites alg /MMT. Les membranes d'alg/MMT contenant 1.5% d'huile essentielle de citron étaient les plus efficaces.

L'étude quantitative d'inhibition, par dénombrement, des bactéries pathogènes en fonction du temps et de la température de stockage en milieu solide, a permis de vérifier que les films incorporés par 1.5% LEO présentent un effet bactéricide, avec un taux d'inhibition de 93,8% et de 98,2 % pour *E. Coli* et *S. aureus*, respectivement, après 12 jours de stockage.

D'après ces résultats, les matériaux élaborés alg/MMT-1.5%L.E.O, sont des candidats potentiels pour des applications dans l'emballage alimentaire (pour améliorer et/ou augmenter la durée de conservation) et dans toute utilisation biologique dans le domaine biomédical.

Ces résultats restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires approfondies. De nombreuses perspectives peuvent être envisageables:

- La caractérisation complémentaire par microscope électronique à transmission(MET) pour déterminer le taux d'exfoliation dans la matrice d'alg/3%MMT. Cette technique, qui offre une résolution jusqu'à 0.2nm, permet d'observer directement les feuillets et leur orientation dans la matrice.
- Une étude comparative sur la matrice alginate de calcium permettrait d'améliorer la perméabilité à la vapeur d'eau (WVP) et la résistance à l'eau. Cette propriété pourrait être un inconvénient dans certaines applications, notamment pour les emballages alimentaires,
- Des tests antibactériens seraient nécessaires sur des bactéries lactiques telles que les lactobacilles.



Preparation of active antimicrobial and antifungal alginate-montmorillonite/lemon essential oil nanocomposite films

Naima Hammoudi, Hocine Ziani Cherif, Fethi Borsali, Kamal Benmansour & Asma Meghezzi

To cite this article: Naima Hammoudi, Hocine Ziani Cherif, Fethi Borsali, Kamal Benmansour & Asma Meghezzi (2019): Preparation of active antimicrobial and antifungal alginate-montmorillonite/lemon essential oil nanocomposite films, *Materials Technology*, DOI: [10.1080/10667857.2019.1685292](https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1685292)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1685292>



Published online: 11 Dec 2019.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Preparation of active antimicrobial and antifungal alginate-montmorillonite/lemon essential oil nanocomposite films

Naima Hammoudi^a, Hocine Ziani Cherif^a, Fethi Borsali^b, Kamal Benmansour^a and Asma Meghezzi^c

^aMacromolecular Research Laboratory, Tlemcen University, Tlemcen, Algeria; ^bLaboratoire Systèmes Dynamiques et Applications, Tlemcen University, Tlemcen, Algeria; ^cLaboratory of microbiology and bioprocesses - Nutrition and food science - Food Biotechnology Division, C.R.Bt Biotechnology Research Center, Constantine, Algeria

ABSTRACT

The inclusion of antimicrobial and antifungal agents such as essential oils directly into a food packaging material is a form of active packaging elaboration. In this work, alginate-based films activated with lemon essential oil (LEO) at increasing concentration levels [0.5%, 1% and 1.5% (v/v)] were prepared, and their antibacterial and antifungal activities were investigated. The microstructure characterisation of alginate-montmorillonite/LEO (alg-MMT/LEO) nanocomposites was performed using X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the surface morphology of the films was examined using light microscopy. The XRD and FTIR results confirmed MMT exfoliation and revealed the presence of strong interaction between alginate and MMT in the presence of LEO. Thermogravimetric analysis (TGA) indicated that LEO-containing films exhibited a higher degradation temperature in comparison with pure alginate films. Powerful antimicrobial and antifungal properties of the films were also highlighted at 1.5% LEO concentration, suggesting that the formulated nanocomposites might be considered as promising active packaging materials.

ARTICLE HISTORY

Received 30 April 2019
Accepted 22 October 2019

KEYWORDS

Bionanocomposite; alginate; montmorillonite; lemon essential oil; food packaging

Introduction

The vast majority of commonly known ‘plastics’ are organic synthetic processed materials using petroleum both as feedstock and as energy during manufacture. The environmental concerns of the oil-based economy are being widely voiced as executive governmental policies and large impact companies hardly attempt to reduce their carbon footprints. On another related but stressing issue, that of worldwide waste management, studies on the ecological footprint of humanity have suggested that sustainability of human pressures on the world’s ecological resources shifted from 70% of global regenerative capacity in the 1960s to more than 120% today. As a response deriving from a normal physical law of action and reaction, the quest for a solution to this dramatic situation has been launched just few decades ago. This holy and hopefully not Sisyphean search for alternatives to traditional petroleum-based plastics is progressing at a pace that at the outcome, not just the source, but also the downstream consequences will be bypassed. In this endeavour, impressive efforts were focused on biopolymers. Their prominent position within the realm of natural substances propelled them obviously to the centre stage over the last two decades, since they provide a viable alternative to the environmentally harmful waste disposal of plastic foods packaging materials. Another interesting feature of this naturally occurring materials is that biopolymer films are considered as excellent vehicles

for the inclusion of a wide variety of additives, such as antioxidants, antifungal agents, antimicrobials and other nutrients [1,2]. Consequently, these biodegradable materials might play a positive role in improving food quality in terms of packaging and storage commodities by imparting shelf life extension and minimisation of microbial growth in the product. Alginates, a naturally occurring polysaccharides found in seaweed in the form of calcium, magnesium and sodium salts, are made of two urinate sugars (mannuronate and guluronate) as building blocks, which are obtained in the form of sodium salts of mannuronic and guluronic acid, respectively, during alginates extraction and neutralisation process (Figure 1). The ratio and distribution of these blocks will determine the alginate properties while the composition varies according to seaweed species and structure.

In the course of these studies, some relevant aspects of sodium alginate related to its rheological and chemical properties have attracted our attention. These include the viscosity increase through solution thickening effect and a tight binding to calcium, eventually leading to versatile and interesting gel- or film-forming applications. It also acts as stabiliser and emulsifier. However, alginate’s poor mechanical and gas barrier properties, as well as weak water resistance hamper its proper use particularly in the presence of water or humidity. More recently, remarkable improvements in the functional properties of these films have been made by reinforcement of the polymer

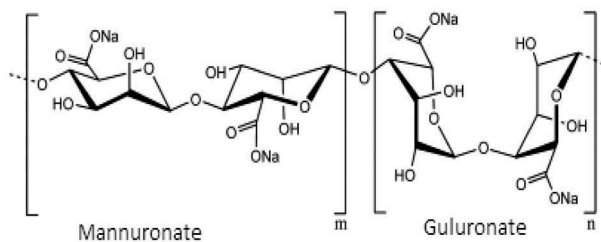


Figure 1. The molecular structure of sodium alginate.

matrix with layered silicates [3–7]. Outstanding and successfully crowned efforts have been reported in the literature whose main purpose was aimed at improving a whole range of alginate film's fundamental characteristics, such as mechanical and functional properties, thermal stability, barrier properties, and water solubility through incorporation of a nanoclay into alginate. Particularly, montmorillonite (MMT) which is a hydrated alumina-silicate-layered clay consisting of an edge-shared octahedral sheet of aluminium hydroxide sandwiched between two silica tetrahedral layers was the most extensively studied. The imbalance of the surface negative charges is largely compensated by exchangeable cations (typically Na^+ and Ca^{2+}). In the next task as a technological step forward, films exhibiting antimicrobial properties could be produced upon addition of antimicrobial agents, including either the commonly known inorganic compounds such as TiO_2 , Ag, ZnO, and MgO nanoparticles, or natural organic additives [8–12]. Indeed, an abundant literature focusing on the antimicrobial activity of some selected metals such as titanium, silver and copper derivatives, and its fine-tuning through blending or nanostructuring, eventually leading to its spectacular enhancement, is recently flourishing. Naturally, the potential of these advanced properties paved the way for their promising use primarily in solid-state hybrid materials, and more particularly in biomedical devices such as metallic implants [13–18].

However, one major issue of concern in using synthetic antimicrobials as film additives stems from their toxicity hazards as they may inauspiciously diffuse into the polymer matrix. Besides their historical central position in perfumery, essential oils (EOs) have been widely used for their numerous properties in phytotherapy, pharmacy and cosmetics. Yet, their seemingly limitless virtues propelled them once again at the front scene of natural products-based commodities. Carbogenic antimicrobial agents deriving from natural sources – such as essential oils (EOs) – were largely coveted for their natural antimicrobial activities [19]. Indeed, essential oils possessing antimicrobial activity play a key role in the mechanism of the reduction of virulence and pathogenicity of bacteria. Their antimicrobial activity effectiveness as film's additives is determined in part by the rate of releasing process. In case of too slow release, the

microbial growth would not be sufficiently inhibited, and oppositely, a too fast release would beget a non-sustained inhibition [20]. The rate of release depends also on other various parameters including the type of polymer, film preparation method, nature of interactions between polymeric and antimicrobial agents [21], and environmental conditions [22,23]. Montmorillonite may potentially serve to control the release of antimicrobial agents from film materials. Although several reports on alginate/clay nanocomposites have appeared in the literature, to our knowledge, few studies are available on the combined effect of nanoclay and antimicrobial compounds such as EOs. On hypothetical ground, we assumed that the combination of a nanoclay and an antimicrobial compound entrapped within alginate films should lead to a material bestowed with interesting functionalities without altering the bulk properties nor the structural integrity of the composite. Barrier properties would mainly be imparted by the nanocomposite matrix while antimicrobial activity provided by the loaded and conveniently selected essential oil. In addition, such nanocomposite films made strictly of natural biopolymers should be considered as environmentally friendly with all the downstream benefits one may expect from biopolymer and nanocomposite packaging materials [1]. Among the plethora of essential oils endowed with antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*, lemon essential oil (*Citrus limon* L.), containing limonene, β -pinene, γ -terpinene and citral (neral and geranial) as main components showed interesting antimicrobial features [24–26]. In the present study, the combined effects of MMT and lemon essential oil (LEO) on the physicochemical, antimicrobial and antifungal properties of alginate composite films have been investigated.

Materials and methods

Materials

Sodium alginate (medium viscosity), montmorillonite (MMT) and glycerol were obtained from Sigma-Aldrich Co. Lemon (*Citrus limon* L.) essential oil was purchased from Aldrich chemical Co and stored in a sealed dark container at 6°C. Tween 80 was purchased from Merck, Germany.

Biological material

Six reference microbial and fungal strains were used for the antibiogram test. The strains were *Staphylococcus aureus* (ATCC 25,923); *Salmonella enteritidis* (ATCC 13,076); *Escherichia coli* (ATCC 25,922) and *Bacillus cereus* (ATCC 6633); *Aspergillus baraziliensens* (ATCC 16,404) and the yeast *Candida albicans* (ATCC 10,230). All the stock cultures were generously provided by The Laboratory of microbiology and bioprocesses- C.R.B.T

Biotechnology Research Centre of Constantine -Algeria. The strains were transferred in brain heart infusion broth and grown in a shaker incubator to 37°C. The micro-organism suspensions were diluted with sterile peptone water. The bacterial population estimated at a wavelength $\lambda = 620$ nm reached a value of 0.4 which corresponded to a concentration of 10^6 UFC/ml.

Preparation of nanocomposite film

An aqueous solution of sodium alginate was prepared by dissolving 10 g of powdery sodium alginate in 1000 ml of distilled water (at 70°C) using a magnetic stirrer at 1200 rpm for 45 min to make a 1% w/v solution. Separately, a specific amount of MMT [(3% w/w)] based on solid sodium alginate contents] was dispersed in 50 mL of distilled water and stirred vigorously for 24 h at room temperature. The alginate solution was then slowly added to the preformed clay suspension and the resulting mixture was stirred for 4 h. A mixture of lemon essential oil and Tween 80 (0.25 g/g of essential oil) was added to the film-forming solution at different concentrations (0.5%, 1.0%, and 1.5% w/v on the basis of neat film solution). The final solution was homogenised at 1000 rpm for 5 min (*Ultra-Turrax homogeniser*), and the resulting mixture was degassed under vacuum for 30 min in order to remove all bubbles. Finally, the film-forming solution was cast onto Petri dishes (9 cm in diameter) and dried for 72 h at ambient conditions. The dried films were removed from the Petri dishes and preconditioned in desiccators containing saturated magnesium nitrate solution at 25°C.

Experimental techniques and characterisation

X-ray diffraction analysis

X-ray diffraction performed with a MiniFlex600 X-ray diffractometer was used for the measurement of the interredicular distance and determination of exfoliation rate, under the following conditions: F.F tube 40 kV and 15 mA. The films were exposed to Cu radiation at a wavelength of 1.54 nm. Alginate/MMT – LEO films were scanned over a 2θ diffraction angle interval = 2–10° and 2–40° with scan speed of 4°/min a steep interval of 0.01°.

Morphological study

The morphological study of the synthesised materials was carried out using light microscopy. The images were acquired with an Olympus SC40 Camera.

Fourier transformation infrared (FTIR) spectra

The Fourier transform infrared spectra of the nanocomposite films were recorded with an Agilent Cary 640 FTIR spectrophotometer over the range 400–4000 cm^{-1} using a transmission method.

Thermal properties

TGA-DTA analysis of films was performed using a Linseis TGA PT1600 differential thermal analyser. Samples of 10–15 mg were heated to 800°C at a rate of 10°C/min under nitrogen atmosphere. The weight loss was measured as a function of temperature.

Measurement of film thickness

The film thickness was measured using an electronic outside micrometre having a sensitivity of 0.001 mm. Ten measurements were taken for each sample at different points.

Opacity

Opacity values of the films were determined using an Analytik jena, Specord 200 plus UV/VIS spectrophotometer. The films were cut in rectangular pieces and placed in the sample compartment of the spectrophotometer. An empty compartment was used as reference in the measurements. The absorbance spectra of the films were recorded over the range 200 to 800 nm, and opacity values of the films were calculated using the following equation:

$$\text{Opacity} = \text{Abs600}/X$$

where Abs 600 is the absorbance value at 600 nm and X, the film thickness (mm).

Microbiological analysis

Antibiogram test

The antibacterial effect of film-forming solution was studied using the agar diffusion test. The test was performed by applying 0,1 ml inoculums of *S. aureus*, *salmonella*, *E. coli*, *Bacillus Aspergillus*, and the yeast *Candida*, respectively, each containing approximately 10^4 – 10^5 CFU/ml, directly to the surface of a specific culture media poured in a Petri dish. Then, film-forming solution (8 μl) was cast onto discs (6 mm in diameter each) that were previously cut from Whatman filter paper n°3 and sterilised in hot air oven. The discs were placed in the Petri dish and incubated at 37°C for antibacterial test or 25°C for antifungal test during 24 h. All tests were done in triplicate.

Antimicrobial effectiveness of films

Twenty grams of TSA-NaCl were poured into Petri dishes (9 cm diameter). After solidification of the medium, 100 μl aliquots of the appropriately diluted bacterial suspension were inoculated on the surface of TSA-3% NaCl. Then, different films and the control (containing or not antimicrobial substances) having the same diameter as the Petri dishes, were placed on the inoculated surface. Inoculated and uncoated TSA-NaCl was used as control. The plates were stored at 10°C for 12 days. Microbial counts on TSA-3% NaCl plates were

examined immediately after inoculation and then regularly during the storage period. For this purpose, the agar was aseptically removed from Petri dishes and placed in sterile glass containers. One hundred milliliters of peptone water were added to each container and homogenised for 3 min, giving an homogeneous system. Cascade dilutions were made and then poured onto TSA. Plates were incubated at 37°C for 48 h before colonies were counted.

Statistical analyses

Statistical analysis was carried out with ANOVA IBM SPSS program (IBM SPSS statistic 21.Ink). Data were given as mean \pm standard deviation for the treatment and Duncan's multiple range test determined the significant at $p < 0.05$ level.

Results and discussion

The elaboration of antimicrobial and antifungal nanocomposite plastic films that may be used in packaging commodities underscores the importance of a functionality-driven rational design using three components material. Alginate, which served as the core compound delivering the polymeric matrix, was modified with MMT nanoclay to improve mechanical, thermal and barrier properties of alginate films. Then, a homogeneous solution of lemon essential oil solubilised in the non-ionic hydrophilic emulsifier *Tween 80*[®] was added to alginate/MMT mixture. *Tween 80*[®] ensured a uniform and stable distribution of EO inside the polymeric matrix by virtue of its chemical nature and compatibility with alginate. The composite material was

characterised by means of X-ray diffraction, FT-IR, SEM, TGA and DSC techniques. Microbiological assays were performed against *S. aureus*, *salmonella*, *E. coli*, *Bacillus*, *Aspergillus*, and the yeast *Candida*. The results of our investigations are disclosed in this paper.

XRD analysis

XRD images of MMT, pure sodium alginate, alg/MMT and alg/MMT-1.5% LEO nanocomposite films are shown in Figure 2. It appears (see expanded view in Figure 2) from pure clay's diffractogram that the diffraction peak of MMT's [001] plane is centred at $2\theta = 7.34^\circ$ ($d = 12.03\text{\AA}$). It is well established that intercalation of the polymer chains within the clay substructure usually increases the interlayer spacing, leading to a shift of the diffraction peak towards lower angle values. As far as exfoliated structure is concerned, no more diffraction peaks are apparent in the XRD patterns. This may be either the result of a space increase between the layers or a consequence of a non-ordered structure formation. Upon addition of MMT to the polymer matrix, the reflection peak disappeared, revealing a disordered and undetectable XRD owing to a homogeneously dispersed structure formation. In addition, Figure 2 shows that the nanocomposite structure is not affected by the presence of LEO. These results are in good agreement with those obtained by Abdollahi et al. [27] and by Alboofetileh et al. [28].

Optical microscopy

Optical microscopic images illustrating the dispersion of LEO in the matrix are shown in Figure 3. While

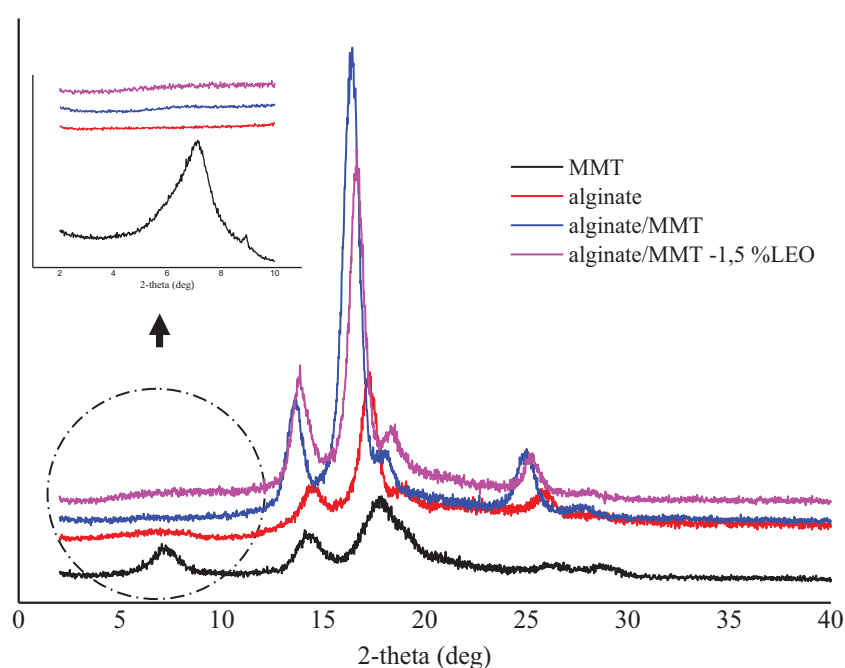


Figure 2. X-ray diffraction of MMT and sodium alginate-based nanocomposite films.

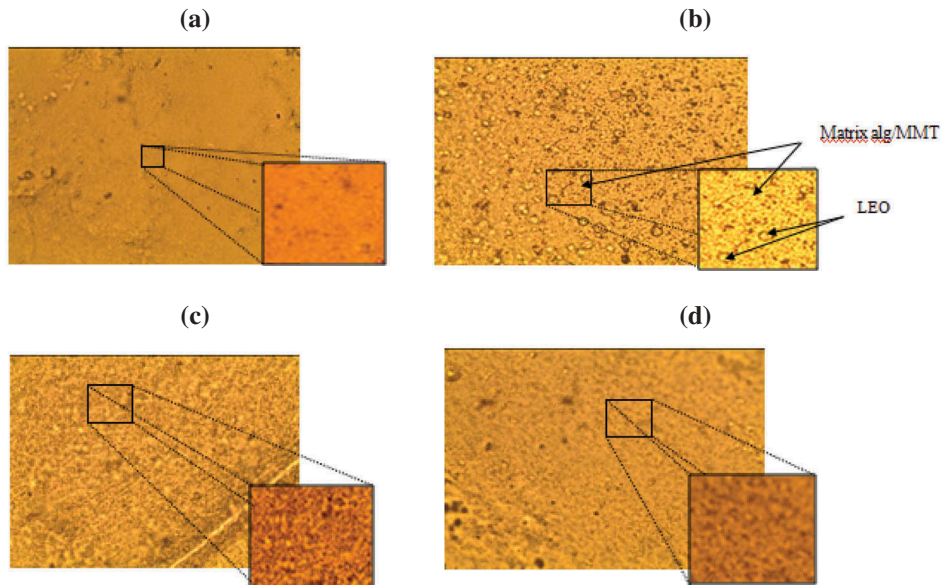


Figure 3. Morphology of (a) alginate/MMT, (b) alginate/MMT/LEO 0,5%, (c) alginate/MMT/LEO 1%, and (d) alginate/MMT-LEO1,5%.

a smooth and continuous structure is observed in LEO-free alginate/MMT film, fundamentally different aspects are visible in LEO-added materials. Surface discontinuities associated with the presence of essential oil are likely pointing to the formation of two phases in the matrix. At increasing LEO concentrations (0.5%, 1% and 1,5%), a random dispersion of LEO in alginate/MMT composites is observed with no significant essential oil phase-agglomeration. This observation is pertained to the fairly good miscibility between the LEO and the matrix which might be due to the creation of LEO's smaller and uniform micro-

domains within the matrix, or otherwise stated to a nanoscale LEO distribution.

FTIR analysis

FT-IR analysis of the composite material structure unravels some interesting features closely linked to the complex nature of interactions existing between the material's components.

The characteristic bands of montmorillonite indicate SiOH hydroxyl stretching at 3619 cm^{-1} and H_2O hydroxyl bending at 1632 cm^{-1} . Bands centred at 993

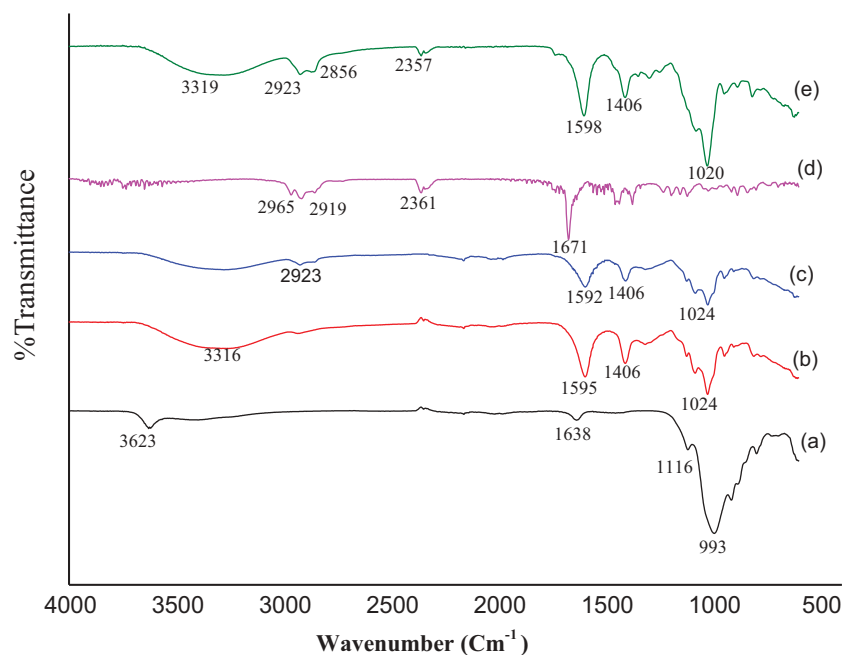


Figure 4. FTIR spectra of (a) MMT, (b) alginate, (c) alg/MMT, (d) LEO and (e) alg/MMT-LEO 1.5% films.

and 1116 cm^{-1} are attributed to the stretching vibration of the Si–O bonds [29,30] and Si–O–Si stretching (in-plane) vibration for silicates, respectively (Figure 4(a)). As shown in Figure 4(b), sodium alginate presents asymmetric and symmetric carboxylate stretching vibrations at 1595 and 1406 cm^{-1} and an oxygen stretching band at 1025 cm^{-1} for cyclic ether bridge. The band at 3317 cm^{-1} corresponds to OH stretching vibration [31]. Upon mixing alginate with MMT, the FTIR spectrum of the alg/MMT composite shows the combination of characteristic absorptions and the newly formed interactions between sodium alginate and montmorillonite groups (Figure 4(c)). For instance, disappearance of the 3619 cm^{-1} band assigned to silanol group of MMT surface in the nanocomposite spectrum may be explained by the hydrogen bonding between the silanol hydroxyl groups and alginate carboxyl and hydroxyl groups [32]. The other bands observed, and showing the incorporation of montmorillonite within alginate, are the COO^- (1595 and 1406 cm^{-1}) alginate stretching bands that has shifted to 1591 and 1409 cm^{-1} , respectively, in the composite. This shift comes from the developing interactions between –OH and carboxyl groups in the alginate surface. Thus, the FTIR spectrum of the alg/MMT confirms the interaction between alginate and montmorillonite.

Furthermore, analysis of Figure 4(e) shows that the major bands present in the spectra of alg/MMT are also prominent in the oil-loaded nanocomposites, revealing a strong interaction between alginate and montmorillonite in the nanocomposites even after essential oil addition. However, some new bands are formed due to the presence of essential oil. The shift indicates a highly possible and successful interaction of oil with the nanocomposite. Major peaks at 3319 , 2926 and 1601 cm^{-1} in lemon oil-loaded nanocomposite indicate the presence of C–H, O–H and C = O functional groups, respectively.

Thermal properties

The determination of films thermal behaviour intended to packaging commodities is critical from the standpoint of temperature interval of use. Indeed, inasmuch exposure of packaging films to extreme temperature variations such as heating, freezing or microwave irradiation is common [33], important structural changes of polymer films may befall. Thermogravimetric analyses of the neat alginate matrix and nanocomposites of alg-MMT and alg-MMT-LEO (1,5%) were undertaken. The thermograms illustrated (ATG-DTA) in Figure 5 show a common trend in terms of weight loss for all the

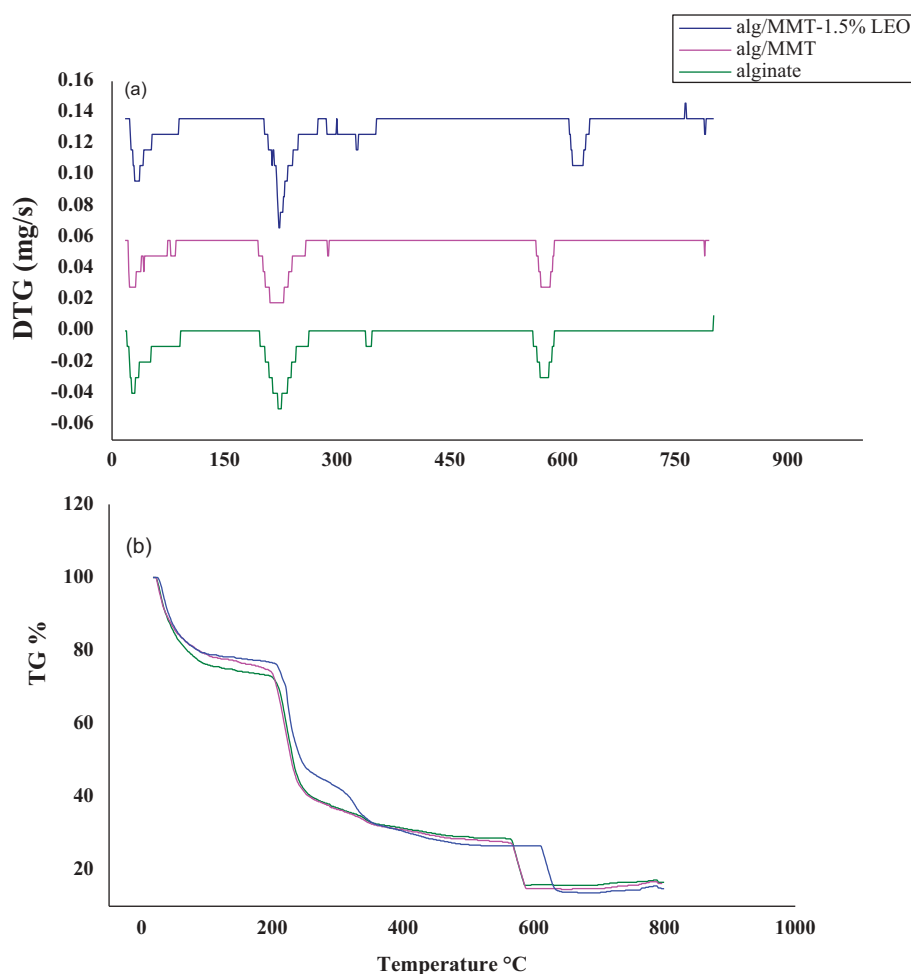


Figure 5. Thermogram DTG (a) et ATG (b) for alginate-based nanocomposite.

Table 1. Material weight loss (Δm) determined using thermal analysis data.

Material	Température °C					Δm (%)
	20–150	150–300	300–630	630–700	700–800	
Alginate	25.75	37.34	7.91	13.12	0.6	85
Alg-MMT	22.91	40.35	8.37	13.52	1.45	84.7
Alg-MMT -1.5%LEO	22.23	35.65	15.32	13.01	1.05	84.6

samples whose degradation occurs in 03 distinct and similar stages. Data of weight-loss at different temperatures are summarised in Table 1.

The first weight loss occurred between 20°C and 150°C for all samples. 25.75, 23 and 22% weight loss values of alginate film, alg-MMT and alg-MMT-LEO, respectively, were observed. The initial weight loss originates from the release of moisture and relatively high water contents that are present in alginate and alg/MMT nanocomposite films. A second weight loss monitored between 150°C and 300°C for all samples is presumably resulting from structure degradation of alginate film located inside MMT interlayer space. An additional weight loss recorded for alg-MMT/LEO films between 300°C and 630°C (15.32%) is reasonably ascribed to LEO loaded into the film matrix. In general, the second and third stage's degradation temperature of alg-MMT/LEO film was higher than the other films. A similar thermal behaviour has been reported in the literature in which EO was added to cellulose acetate/MMT composite material [34]. The greater thermal stability of LEO-containing alginate samples seems resulting from interaction between alginate and LEO, yielding a thermally resistant polymer matrix. Above 630°C, all curves

Table 2. Thickness and opacity values of Alg/MMT nanocomposite films.

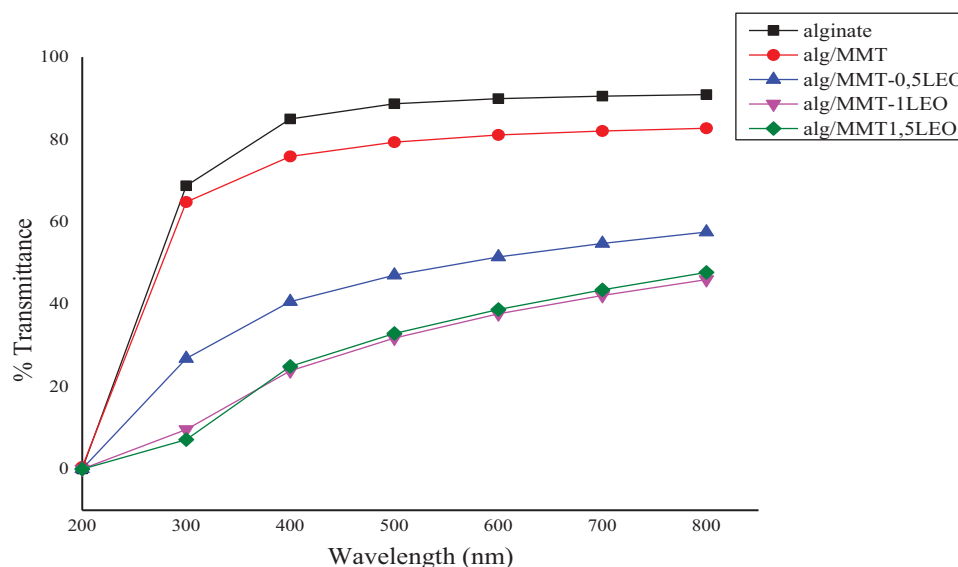
Film	Thickness (mm)	Opacity
Alginate	0.0225 \pm 0.006	2.04 \pm 0.003
Alg/MMT	0.0260 \pm 0.018	2.33 \pm 0.044
Alg/MMT-LEO 0.5%	0.0250 \pm 0.002	9.808 \pm 0.00
Alg/MMT-LEO1%	0.032 \pm 0.006	11.35 \pm 0.227
Alg/MMT-LEO1.5%	0.0330 \pm 0.026	10.31 \pm 0.40

are consistent since the remaining substances were mainly inorganic residues.

Film thickness and opacity values of Alg/MMT nanocomposite films

Thick and opaque films were obtained upon addition of oil whereas pure alginate film was thin and transparent. Variations in film thickness influence mechanical and barrier properties, and thus thickness uniformity is a quality-tied processing parameter. Table 2 summarises films thickness. The average thickness was less than 100 micrometres delivering flexible film. Upon addition of increasing amount of LEO, films became thicker. As a plausible explanation, we think that low molecular weight LEO components fit into alginate polymer chains and expand the polymeric network. Such plasticising effect, similarly described in the literature, is probably a major factor leading to observed growing film thickness [35].

Opacity is an established optical measurement of film transparency, and so it constitutes a relevant property since it has a direct impact on the appearance of the packaged product. Presence of essential oil in the nanocomposite films modifies their optical appearance and light barrier properties. Opacity of

**Figure 6.** Transmittance versus wavelength relationship for alginate and nanocomposite films.

nanocomposite films is reported in Table 2. The opacity value of alginate film taken as reference was 2.04 ± 0.003 , whereas, upon addition of LEO at increasing concentrations opacity changed proportionally to 11.35 ± 0.227 . Hence, EO's-free films were more transparent than their EO-containing counterparts. UV-visible light transmission of the nanocomposite films containing various concentrations of LEO in the 200–800 nm wavelength interval is shown in Figure 6. Clearly, EO-containing films are able to stop ultraviolet radiation in the region of 280 nm. Decreased light transmission is likely due to light scattering at the surface of essential oil droplets in the film matrix [36]. Hence, this phenomenon is able to postpone oil oxidation and prevent nutrient losses, discolouration, and off-flavours in food systems. Our results are consistent with similar findings that have been reported in the literature. Ahmad et al. [37] and by Atef et al. [38].

Antibiogram test and antimicrobial effectiveness of films

The antimicrobial activity of LEO-containing nanocomposite films of various concentrations (0.5%, 1% and 1.5%) deposited on filter paper discs against selected microorganisms is shown in Table 3. LEO-free alginate

Table 3. Antibacterial activity (inhibitory zone) of alg-MMT solution films incorporated with LEO against gram-positive and gram-negative bacteria.

Bacterial strain	con(v/v)% in Solution films	Inhibition diameter
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram+)	Control	R
	0.5	10.66 ± 0.57
	1	18.66 ± 0.57
	1.5	20.33 ± 1.52
<i>Bacillus cereus</i> (Gram+)	Control	R
	0.5	11.66 ± 1.15
	1	14.33 ± 0.57
	1.5	17 ± 1
<i>Escherichia coli</i> (Gram-)	Control	R
	0.5	10.5 ± 0.5
	1	10.66 ± 0.57
	1.5	11.6 ± 0.57
<i>Salmonella enteritidis</i> (Gram-)	Control	R
	0.5	9.33 ± 0.57
	1	11 ± 1
	1.5	10.66 ± 1.52

MMT nanocomposite film, which served as control, did not show any antibacterial effect as witnessed by the absence of inhibition zones. The highest antibacterial activity was recorded for alg-MMT films containing 1.5% LEO (Figure 7). Noteworthy, among the bacterial strains that were tested, *E. coli* and *S. enteritidis* proved more resistant to active films because they are Gram-negative bacteria and as such, they are prone to higher resistance towards antimicrobial compounds owing to their extra protective outer membrane [39]. In this regard, the essential oil showed its best antibacterial activity in the disc diffusion test on Gram-positive bacteria (i.e. *B.cereus*, *S.aureus*). Consequently, the antimicrobial efficacy of LEO-containing films is clearly due to the presence of LEO, which contains a plethora of terpene derivatives whose presence is strongly connected to antimicrobial action. Indeed, it has been reported that monoterpene or sesquiterpene hydrocarbons and their oxygenised derivatives, which are the major components of essential oils, exhibit potential antimicrobial activities [40]. Seemingly, these compounds are able to disintegrate the cytoplasmic membrane of bacteria and thereby triggering a series of events such as disrupting the proton motive force, electron flow, active transport, and/or coagulation of cell contents [41].

In addition to the inhibition zone tests, which provide qualitative assessment of the antibacterial properties of the films, quantitative antibacterial studies of alg MMT/LEO films were performed in accordance with TSA-3% NaCl in step model. The relationship between *S.aureus* and *E.coli*'s growth, taken as models of Gram+ and Gram- bacteria, respectively, and LEO-containing alginate films is presented in Figure 8.

Figure 8(a) shows curves of *S.aureus* growth in TSA-3% NaCl loaded with alginate base films. For comparison purpose, TSA-3% NaCl containing solely *S.aureus* was taken as reference during the same storage period. The initial *S.aureus* population in the reference plate was 2 log CFU/cm². The microbial counting increased substantially during the storage attaining 7.48 log CFU/cm². Our results are in good agreement with data recently reported in the literature [42]. Furthermore, low antimicrobial activity was observed in plates coated with alginate/MMT film during the storage period. The lowest *S.*

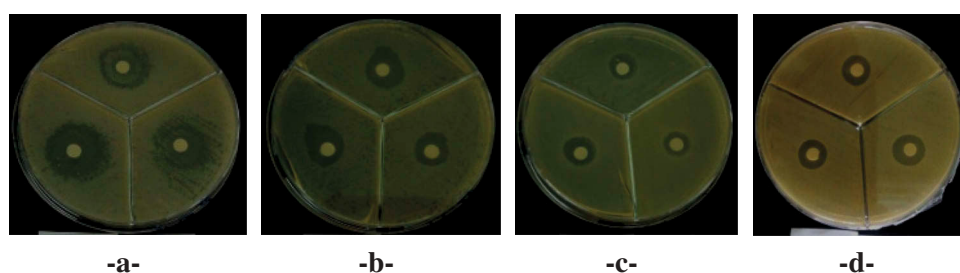


Figure 7. Antibacterial effect of alg-MMT solution films: (a) *Staphylococcus aureus*; (b) *Bacillus cereus*; (c) *Escherichia coli*; (d) *Salmonella enteritidis* at 1.5% concentration of LEO.

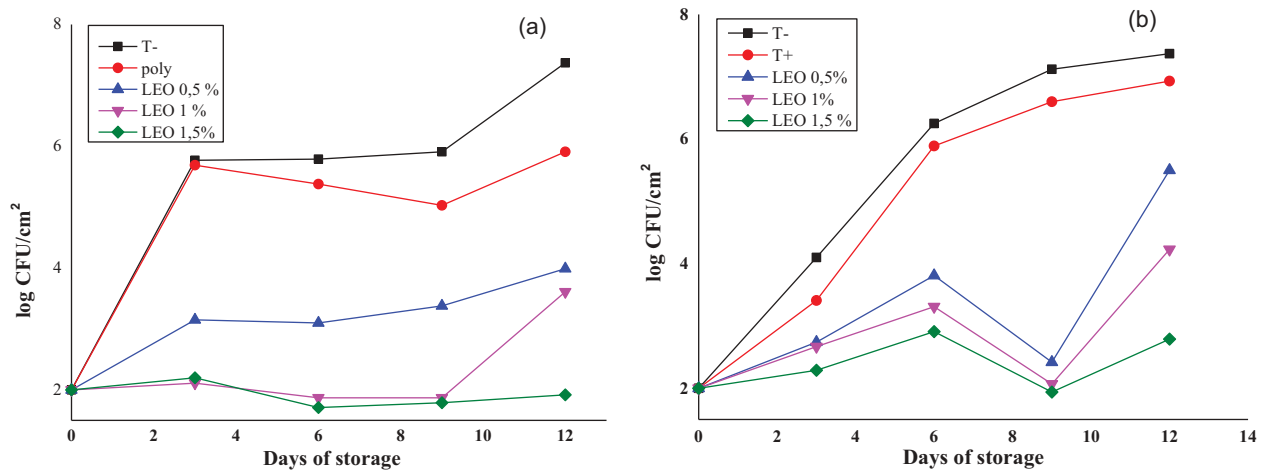


Figure 8. Antibacterial activity of different films against (a) *S. aureus* and (b) *E. coli* on TSA- NaCl (3%) medium stored at 10°C.

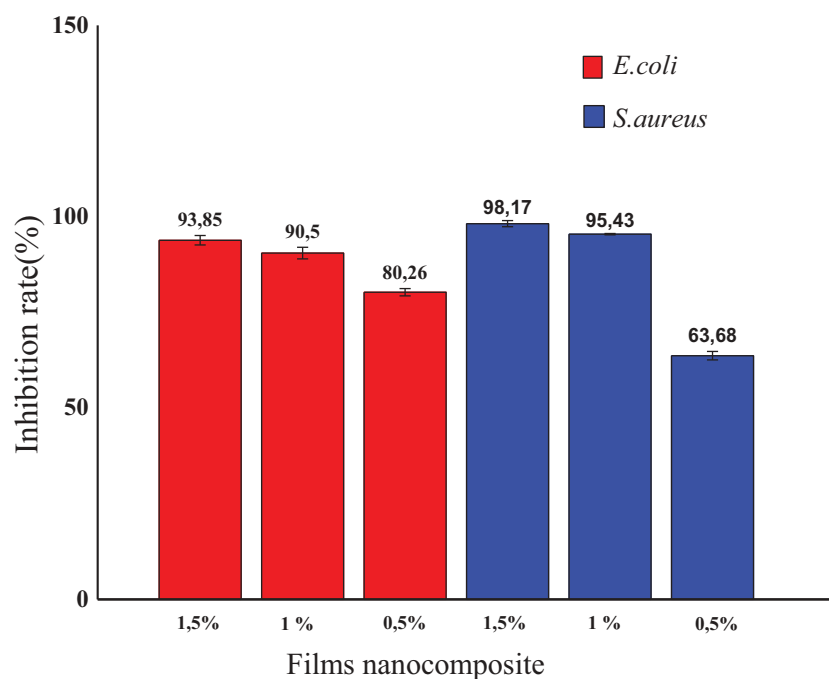


Figure 9. Inhibition tests.

aureus population was found for LEO-containing films at 1.5% LEO concentration, by maintaining the population below the initial inoculation level (1.92 log CFU/cm²). At lower LEO concentration (1%), the film matrix showed less antimicrobial activity as total inhibition of microorganism growth was noted during the first 6 days of the storage period. After 12 days, films containing 1% LEO reduced the growth to 3.61 log CFU/cm², as compared with the control assay. As expected, at lower LEO contents (0.5%) the films proved less efficient in terms of antimicrobial activity.

Figure 8(b) shows *E. coli*'s growth in the TSA-3% NaCl reference test and in TSA-3% NaCl plates comprising LEO-containing films at different concentrations. The microbial count increased in the reference plate from 2 log CFU/cm² to 7.3 log CFU/cm² by the end of the experiment (12 days). At LEO

Table 4. Antifungal activity (inhibitory zone) of alg-MMT solution films incorporated with LEO against *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*.

Fungal strain	con(v/v)in solution films	
	%	Inhibition diameter
<i>Candida albicans</i>	Control	R
	0.5	9.33 ± 0.57
	1	10 ± 1
	1.5	10.66 ± 0.57
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Control	R
	0.5	23 ± 1.52
	1	23.33 ± 1.52
	1.5	30 ± 1

concentration of 1.5%, a total inhibition was observed during the first 6 days of experiment, with a counted population of 2.29 CFU/cm². At 1% LEO contents, a complete inhibition of microbial growth was observed during the 6 days of storage and reduced to

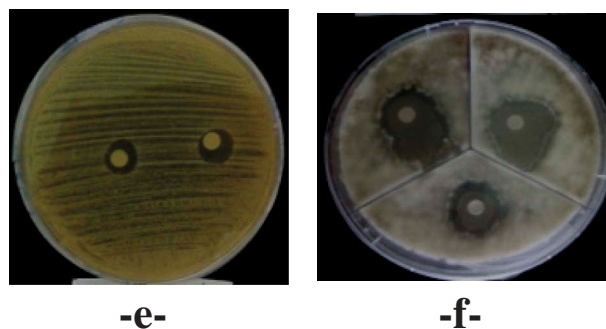


Figure 10. Antifungal effect of alg-MMT solution films; (e) *Candida albicans*; (f) *Aspergillus brasiliensis* at 1.5% concentration of LEO.

2.67 CFU/cm². However, low antimicrobial action was observed for films containing 0.5% LEO.

Figure 9 illustrates the trend of nanocomposite films inhibition effect in terms of LEO's concentration variations (0.5%, 1% and 1.5%). The most concentrated LEO sample (1.5%) exhibited the highest inhibition rate with 93.8% and 98.2% of *E. coli* and *S. aureus* growth inhibition after 12 days, respectively.

Antifungal activity measurement

Antifungal experiments were carried out with *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*.

Candida albicans is an opportunistic fungal pathogen that exists as a harmless commensal in the gastrointestinal and genitourinary tracts of 70% of humans and about 75% of women suffer from *Candida* infection at least once in their lifetime [43–46]. However, it becomes an opportunistic pathogen for immunocompromised patients as well as some immunologically weak individuals, or even for healthy persons.

The fungus *Aspergillus brasiliensis*, the most important species of *Aspergillus* genus, is a type of mould that is nearly ubiquitous in our environment. Although *A. brasiliensis* is also an industrially important fermentation strain, producing many enzymes, such as amylase, cellulase, and pectinase [47], it constantly causes food spoilage, industrial and agricultural products mouldy, and mycotoxin pollution (ochratoxin A). Especially, *A. brasiliensis* might induce otomycosis and pulmonary infections in immunocompromised persons [47].

Table 4 summarises the results of the in vitro studies conducted with *C. albicans* and *A. brasiliensis*. The alg-MMT/LEO had an antifungal effect on the two fungi; however, the antifungal effect was more potent on *Aspergillus brasiliensis* than on *C. albicans* (Figure 10). Fungi susceptibility showed that alg-MMT/LEO film produced a 30 mm in diameter inhibition zone against *Aspergillus brasiliensis* thus presenting a high antifungal activity.

Conclusion

In this study, the biocidal efficiency of alg-MMT/LEO films against two fungal and four bacterial strains was addressed. The antimicrobial films were easily prepared by controlled addition of LEO into alginate/MMT films at different concentrations. The results revealed that LEO-containing films were more effective against Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *B. cereus*) than Gram-negative bacteria (*E. coli* and *S. enteritidis*). Furthermore, a complete growth inhibition was observed for the films containing the highest concentration of lemon essential oil (i.e. 1.5%) in each of the four bacteria. As a preliminary foray in antifungal activity perspectives, evidence that alg-MMT/LEO films exhibit excellent antifungal activity against *A. brasiliensis*, used as model pathogenic fungus was provided. Thus, owing to their broad-spectrum antimicrobial efficacy, the potential for antimicrobial food packaging applications of these new films has clearly been demonstrated and will hopefully contribute to the advance of ecofriendly food packaging plastics.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- [1] Rhim J, Ng P. Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2007;47(4):411–433. doi:10.1080/10408390600846366
- [2] Wong D, Camirand W, Pavlath A. 1994. Development of edible coatings for minimally processed fruits and vegetables. In: Krochta JM, Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO, editors. *Edible coatings and films to improve food quality.* Lancaster, PA: Technomic Publishing Co. pp. 65–88.
- [3] Liang B, Zhao H, Zhang Q, et al. Ca²⁺ enhanced nacre-inspired montmorillonite–alginate film with superior mechanical, transparent, fire retardancy, and shape memory properties. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(42):28816–28823.

- [4] Alboofetileh M, Rezaei M, Hosseini H, et al. Morphological, physico-mechanical, and antimicrobial properties of sodium alginate-montmorillonite nanocomposite films incorporated with marjoram essential oil. *Crit Rev Food Sci Nutr*. DOI:10.1111/jfpp.1359
- [5] Tezcan F, Günister E, Ozen G, et al. Biocomposite films based on alginate and organically modified clay. *Int J Biol Macromol*. 2012 May 1;50(4):1165–1168. . Epub 2012 Jan 14.
- [6] Barreca S, Orecchio S, Pace A. The effect of montmorillonite clay in alginate gel beads for polychlorinated biphenyl adsorption: isothermal and kinetic studies. *Appl Clay Sci*. 2014;99:220–228.
- [7] Zlopasa J, Norder B, Koenders EAB, et al. Origin of highly ordered sodium alginate/montmorillonite bionanocomposites. *Macromolecules*. 2015;48(4):1204–1209.
- [8] Cerisuelo JP, Bermudez JM, Aucejo S, et al. Describing and modeling the release of an antimicrobial agent from an active PP/EVOH/PP package for salmon. *Food Eng*. 2013; 116–352.
- [9] Silvestre C, Duraccio D, Cimmino S. Food packaging based on polymer nanomaterials. *Prog Polym Sci*. 2011;36:1766.
- [10] Bradley EL, Castle L, Chaudhry Q. Applications of nanomaterials in food packaging with a consideration of opportunities for developing countries. *Trends Food Sci Tech*. 2011;22:604.
- [11] Manjula B, Babul RA, Varaprasad K, et al. Silver nanoparticles incorporated within intercalated clay/polymer nanocomposite hydrogels for antibacterial studies. *Polym Compos*. 2016;36:2220.
- [12] Yongjian X, Leigang Z, Tao L, et al. Preparation and characterization of cellulose/Ag nanocomposites. *Polym Compos*. 2014;36:2220.
- [13] Ramos-Corella KJ, Sotelo-Lerma M, Gil-Salido AA, et al. Controlling crystalline phase of TiO₂ thin films to evaluate its biocompatibility. *Mater Technol*. 2019;34:455–462.
- [14] Liu H, Li DR, Yang XL, et al. Fabrication and characterization of Ag₃PO₄/TiO₂ heterostructure with improved visible-light photocatalytic activity for the degradation of methyloange and sterilization of *E. coli*. *Mater Technol*. 2019;34:192–203.
- [15] Depan D, Misra RDK. On the determining role of network structure titania in silicone against bacterial colonization: mechanism and disruption of biofilm. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Jan 1;34:221–228.
- [16] Girase B, Depan D, Shah JS, et al. Silver-clay nanohybrid structure for effective and diffusion-controlled antimicrobial activity. *Mat Sci Eng C-Mater*. 2011;31:1759–1766.
- [17] Devesh R, Misra RDK, Girase B, et al. Hybrid nanoscale architecture for enhancement of antimicrobial activity: immobilization of silver nanoparticles on thiol-functionalized polymer crystallized on carbon nanotubes. *Adv Biomater*. 2012;14:B 93–100.
- [18] Venkatasubramanian R, Srivastava RS, Misra RDK. A comparative study of antimicrobial and photocatalytic activity of different dopants in titania-encapsulated nanoparticle composites. *Adv Mater Res Switz*. 2008;24;:589–595.
- [19] Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, et al. Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Ind Crops Prod*. 2015;67:403.
- [20] Kennedy LB, Peng JF, Yie J LX, et al. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydr Polym*. 2006;65:488–494.
- [21] Cha DS, Cooksey DK, Chinnan MS, et al. Release of nisin from various heat-pressed and cast films. *LWT - Food Sci Technol*. 2003;36:209–213.
- [22] Cagri A, Ustunol Z, Ryser ET. Antimicrobial edible films and coatings. *J Food Prot*. 2004;67:833–848.
- [23] Rico-Pena DC, Torres JA. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible film methylcellulose-palmitic acid film: water activity and pH effects. *J Food Sci*. 1991;56:1991–1995.
- [24] Kim YD, Morr CV. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. *J Agr Food Chem*. 1996;44:1314–1320.
- [25] Rodrigues GH, Susin I, Pires AV, et al. Replacement of corn by citrus pulp in high grain diets fed to feedlot lambs. *Ciência Rural, Santa Maria*. 2008;38(3):789–794.
- [26] Donsi F, Annunziata M, Sessa M, et al. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Sci Technol*. 2011;44:1908–1914.
- [27] Abdollahi M, Rezaei M, Farzi G. .A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan. *J Food Eng*. 2012;111:343–350.
- [28] Alboofetileh M, Rezaei M, Hosseini H, et al. Efficacy of activated alginate-based nanocomposite films to control *Listeria monocytogenes* and spoilage flora in rainbow trout slice. *J Food Sci Technol*. 2016 January;53:521–530.
- [29] Zhou CH, Zhang D, Tong DS, et al. Paper-like composites of cellulose acetate–organo-montmorillonite for removal of hazardous anionic dye in water. *Chem Eng J*. 2012;209:223.
- [30] Kumar SK, Ramachandran R, Kalidhasan S, et al. Potential application of dodecylamine modified sodium montmorillonite as an effective adsorbent for hexavalent chromium. *Chem Eng J*. 2012;211/212:396.
- [31] Iliescu RI, Andronescu E, Ghitulica CD, et al. Montmorillonite–alginate nanocomposite as a drug delivery system – incorporation and in vitro release of irinotecan. *Int J Pharm*. 2014;463:184.
- [32] Giovanni S, Franca B, Andrea P, et al. Electrophilic alkenylation of aromatics with phenylacetylene over zeolite HSZ-360. *Tetrahedron Lett*. 1995;36:9177–9180.
- [33] Hsieh TH, Ho KS. Effects of thermal stability on the crystallization behavior of poly(vinylidene chloride). *J Polym Sci*. 1999;37:3269–3276.
- [34] Polaa CC, Medeirosa EAA, Pereirab OLL, et al. Cellulose acetate active films incorporated with oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and organophilic montmorillonite clay control the growth of phytopathogenic fungi. *Food Pack Shelf Life*. 2016;9:69–78.
- [35] Krkić N, Lazić V, Gvozdenović J. Chitosan biofilm properties as affected by the addition of oregano essential oil. *J process energy griculturea*. 2013;15(3):165–168.
- [36] Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film

- incorporated with citrus essential oils. *Food Chem.* [2012](#);134:1571–1579.
- [37] Ahmad M, Benjakul S, Prodpran T, et al. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocoll.* [2012](#);28:189–199.
- [38] Atef M, Rezaei M, Behrooz R. Characterization of physical, mechanical, and antibacterial properties of agar-cellulose bionanocomposite films incorporated with savory essential oil. *Food Hydrocoll.* [2015](#);45:150–157.
- [39] Cozmuta AM, Turilaa A, Apjoka R, et al. Preparation and characterization of improved gelatin films incorporating hemp and sage oils. *Food Hydrocoll.* [2015](#);49:144–155.
- [40] Cakir A, Kordali S, Zengin H, et al. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from hypericum hyssopifolium and hypericum heterophyllum. *Flav Frag J.* [2004](#);19:62.
- [41] Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* [2004](#);94(3):223–253.
- [42] Rezaei M, Alboofetileh M, Hosseini H, et al. Morphological, physico-mechanical, and antimicrobial properties of sodium alginate-montmorillonite nanocomposite films incorporated with marjoram essential oil. *J Food Process Preserv.* [2018](#);42(5): e 13596.
- [43] Ruhnke M, Maschmeyer G. Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer—review of the literature. *Eur J Med Res.* [2002](#);7(5):227–235.
- [44] Meiller TF, Hube B, Schild L, et al. A novel immune evasion strategy of *Candida albicans*: proteolytic cleavage of a salivary antimicrobial peptide. *PLoS One.* [2009](#);4(4):e5039.
- [45] Schulze J, Sonnenborn U. Yeast in the gut: from commensals to infectious agents. *Deutsches Arzteblatt.* [2009](#);106(51–52):837–842.
- [46] Sobel JD. Vaginitis. *N Engl J Med.* [1997](#);337(26):1896–1903.
- [47] Tolouee M, Alinezhad S, Saberi R, et al. Effect of matricaria chamomilla L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *Int J Food Microbiol.* [2010](#);139:127–133.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تطوير شرائط طبيعية مركبة نانومترية باستخدام الألجنات و المونتموريلونايت مع دمج الزيت الأساسي للليمون .

نقدم في هذا العمل الدور الهام الذي تلعبه التفاعلات الفيزيائية و الكيميائية بين البوليمير و الطين . الأغشية التي تم تحضيرها، أجريت عليها العديد من التقنيات التحليل لدراسة خصائصها الحرارية و البصرية باستخدام قياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية ؛ كما أشارت نتائج التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء FTIR، التحليل الحراري التفاضلي ATG-DTG ، حيود الأشعة السينية DRX و مسح الكالوري التفاضلي DSC فعلا هناك تشتت للطين داخل البنية المركبة للأغشية

أظهرت نتائج دمج الزيت الأساسي للليمون 0.5%، 1% و 1.5% نشاطا جيدا ضد أنواع من الخلايا البكتيريا (غرام + و غرام -) و الفطريات باستعمال طريقتين مختلفتين :طريقة الانتشار على الأجار و طريقة العد .

كلمات مفتاحية:الأغشية الطبيعية النانو مركبة، الألجنات، المونتموريلونايت، الزيت الأساسي للليمون ، الخاصية المضاد للنشاط الميكروبي.

RESUME

Le but de cette étude était de développer et caractériser de nouveaux films bio-nanocomposites à base d'alginate et de montmorillonite dans lesquels est incorporée l'huile essentielle de citron.

Nous présentons dans ce travail l'important rôle que joue la nature des interactions physico-chimiques entre le polymère et l'argile. Les nouvelles liaisons chimiques formées, la structure et la morphologie, les comportements thermiques et les propriétés optiques des films bio-nanocomposites obtenus ont été caractérisés par spectroscopie FTIR, DRX, ATG, DSC et spectrophotométrie UV-visible. Les résultats confirment l'interaction entre l'alginate et MMT par une dispersion homogène de l'argile dans la matrice et la formation d'une structure exfoliée.

L'efficacité antimicrobienne des membranes alg/MMT (0.5%, 1% et 1.5%) LEO a été évaluée par deux méthodes : diffusion en disque et par dénombrement des bactéries. Les résultats obtenus montrent un effet bactéricide et antifongique de nos composite par rapport les Grams positif et négatif.

Mots clés : Films bio-nanocomposite - Alginate - Montmorillonite - huile essentielle de citron et activité antimicrobienne.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and characterize new bio-nanocomposite films based on alginate and montmorillonite activated with lemon essential oil (LEO).

The microstructure characterisation of alginate-montmorillonite/LEO (alg-MMT/LEO) nanocomposites was performed using X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the surface morphology of the films was examined using light microscopy. The XRD and FTIR results confirmed MMT exfoliation and revealed the presence of strong interaction between alginate and MMT in the presence of LEO.

Powerful antimicrobial and antifungal properties of the films alg/MMT improved by (0.5%, 1% and 1.5%) LEO was evaluated by two methods: disc diffusion and by enumeration of bacteria.

Key words: Bio-nanocomposite films -Alginate - Montmorillonite- lemon essential oil- antimicrobial activity.